



HAL
open science

Les mécanismes moléculaires impliqués dans les tumeurs intracérébrales de la néoplasie endocrinienne multiple de type 1

Clara Camilla

► **To cite this version:**

Clara Camilla. Les mécanismes moléculaires impliqués dans les tumeurs intracérébrales de la néoplasie endocrinienne multiple de type 1. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02937467

HAL Id: dumas-02937467

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02937467>

Submitted on 14 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.

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 4 Septembre 2020

Par M^{lle} Clara CAMILLA
Née le 18 juin 1993
À Draguignan

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

**LES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES TUMEURS
INTRACEREBRALES DE LA NEOPLASIE ENDOCRINIENNE MULTIPLE
DE TYPE 1**

----oOo----

JURY :

Président : Madame le Professeur Catherine BADENS
Membres : Madame le Professeur Anne BARLIER
Monsieur le Docteur Thomas GRAILLON
Madame le Docteur Pauline ROMANET (Directrice de Thèse)

THÈSE D'EXERCICE / DOCTEUR JUNIOR

Phase d'Approfondissement du DES de Biologie Médicale

Soutenue le 4 Septembre 2020

Par M^{lle} Clara CAMILLA
Née le 18 juin 1993
À Draguignan

Conformément aux dispositions de l'Arrêté du 12 avril 2017
portant organisation du troisième cycle des études de Médecine et de Pharmacie

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

-----oOo-----

**LES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES TUMEURS
INTRACEREBRALES DE LA NEOPLASIE ENDOCRINIENNE MULTIPLE
DE TYPE 1**

-----oOo-----

JURY :

Président : Madame le Professeur Catherine BADENS
Membres : Madame le Professeur Anne BARLIER
Monsieur le Docteur Thomas GRAILLON
Madame le Docteur Pauline ROMANET (Directrice de Thèse)

LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT DE LA FAC



27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05

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

ADMINISTRATION :

- Doyen :* Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
- Vice-Doyens :* M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
- Chargés de mission :* Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
- Conseiller du Doyen :* M. Patrice VANELLE
- Doyens honoraires :* M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
- Professeurs émérites :* M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri Portugal
- Professeurs honoraires :* M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BIRAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
- Chef des Services Administratifs :* Mme Florence GAUREL
- Chef de Cabinet :* Mme Aurélie BELENGUER
- Responsable de la Scolarité :* 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 GILI

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 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

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE,
HYGIENE ET ZOOLOGIE

Mme Isabelle PAGNIER
Mme Sophie EDOUARD
M. Seydina Mouhamadou DIENE
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 CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE

Mme Anne FAVEL
Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION

Mme Catherine DEFOORT
M. Alain NICOLAY
Mme ESTELLE WOLF

Mme Elise LOMBARD
Mme Camille DESGROUAS

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET
NUISANCES TECHNOLOGIES

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 PRIMA
M. Cédric SPITZ
M. Sébastien REDON

PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE,
HOMEOPATHIE

M. Riad ELIAS
Mme Valérie MAHIOU-LEDDDET
Mme Sok Siya BUN
Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCES 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 Sylvie 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 NÉANT

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

*« 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. »*

REMERCIEMENTS

[Version courte]

A Madame la Présidente du Jury, le Professeur Catherine BADENS,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury de ma thèse. Je tiens également à vous exprimer ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans votre service il y a 3 ans. Votre disponibilité, votre bienveillance et la confiance que vous m'aviez accordée durant mon externat m'ont permis de découvrir la biologie moléculaire dans les meilleures conditions, ce qui a très fortement influencé mes choix par la suite. Pour tout cela, je vous exprime ma sincère gratitude.

A Madame le Professeur Anne BARLIER,

Je vous remercie très sincèrement de m'avoir accueillie dans votre service. Votre rigueur scientifique, votre enthousiasme, vos précieux conseils et la confiance que vous m'avez accordée m'ont fait progresser et m'ont énormément enrichie aussi bien sur le plan professionnel que personnel. Je vous renouvelle toute mon estime et mes remerciements pour votre participation à mon jury de thèse.

A Madame le Docteur Pauline ROMANET,

Ta présence dans mon jury de thèse en tant que directrice est un honneur. Travailler à tes côtés sur ce projet a été une très riche expérience. Je te remercie très sincèrement pour ta grande disponibilité à mon égard, tes conseils, ton implication dans ma formation et la confiance que tu m'as accordée durant mes deux choix dans le laboratoire. Tu m'as permis de bénéficier de ton savoir, de ton imagination ainsi que de ton expérience. Je m'attacherai désormais à en faire bon usage.

A Monsieur le Docteur Thomas GRAILLON,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie. C'était une chance pour moi de travailler avec vous sur ce projet et d'avoir pu profiter de votre expérience dans la prise en charge chirurgicale des tumeurs intracérébrales. Sachez que je suis sensible à votre participation et à l'estimation de ce travail.

Aux membres du service de Neurochirurgie du Professeur DUFOUR, et tout particulièrement le Docteur Thomas GRAILLON,

Aux membres du Groupe des Tumeurs Endocrines, et tout particulièrement le Professeur Pierre GOUDET,

Aux membres du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du Professeur Dominique FIGARELLA-BRANGER, et tout particulièrement le Docteur Romain APPAY,

Aux membres de l'équipe de recherche DIPNET du MMG, et tout particulièrement Christophe LISBONIS et Grégoire MONDIELLI,

Aux Docteurs Noémie BASSET et Florent DARRIET,

Aux membres du laboratoire du Professeur Anne BARLIER, et tout particulièrement le Docteur Catherine ROCHE, Arnaud LAGARDE, le Docteur Morgane PERTUIT, Amandine CHAMPETIER et Sandrine BOSCH.

Vous m'avez apporté une aide précieuse et indispensable à la réalisation de ce travail. Pour cela, je vous exprime toute ma gratitude et vous remercie infiniment.

Table des matières :

Partie 1 : Introduction

I. La néoplasie endocrinienne multiple de type 1	5
1. Généralités	5
2. Histoire de la maladie	5
3. Caractéristiques cliniques	6
a) Hyperparathyroïdie primaire	6
b) Tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques	9
c) Adénomes hypophysaires	14
d) Tumeurs carcinoïdes	15
e) Tumeurs surrenaliennes	16
f) Manifestations cutanées	16
g) Cancer du sein	17
h) Tumeurs intracrâniennes : méningiomes et épendymomes	18
4. Génétique moléculaire et Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1	18
a) Le gène <i>MEN1</i>	18
b) La protéine Ménine	19
c) Mutations germinales de <i>MEN1</i>	19
d) Mutations somatiques de <i>MEN1</i> : modèle des deux événements de Knudson	20
e) Corrélation génotype-phénotype	20
f) Phénocopies et mutations dans d'autres gènes	21
5. Dépistage, diagnostic et surveillance	21
a) Diagnostic génétique de la NEM1	21
b) Protocoles de dépistage et de surveillance chez les porteurs <i>MEN1</i>	23
c) Conseil génétique	24
II. Les méningiomes humains	25
1. Généralités	25
2. Classification des méningiomes	25
a) Grade I	26
b) Grade II	26
c) Grade III	26

3. Epidémiologie	26
4. Caractéristiques des méningiomes (forme, taille, localisation)	27
5. Aspects histologiques	28
6. Aspects cliniques	28
7. Aspects génétiques	29
a) Mutations constitutionnelles dans les méningiomes	29
b) Mutations somatiques dans les méningiomes	29
c) Corrélations génotype-phénotype	31
8. Diagnostic	32
a) Imagerie	32
b) Marqueurs biologiques	32
9. Traitement	33

Partie 2 : Tumeurs intracérébrales dans la NEM1

I. Objectifs	34
II. Matériels et méthodes	35
1. Matériel	35
a) Patients	35
b) Recueil des données	35
c) Tissus	36
2. Méthodes	37
a) Préparation des échantillons d'ADN	37
b) Amplification et séquençage ciblé du gène <i>MEN1</i> par technique Sanger	38
c) Etude du nombre de copies du gène <i>MEN1</i> dans les méningiomes méningothéliaux sporadiques (cohorte n°2) par technique MLPA (Multiple Ligation dependant Probe Amplification)	47
d) Etude du profil mutationnel des méningiomes méningothéliaux par séquençage à haut débit NGS	52
d) Etude du nombre de copies du gène <i>NF2</i> chez les patients des cohortes n°1 et n°2 par PCR en temps réel	63
e) Outils statistiques	64

III. Résultats	65
1. Résultats obtenus sur la cohorte n°1	65
a) Caractéristique génétiques et cliniques des patients de la cohorte n°1	65
b) Résultats	67
2. Résultats obtenus pour les patients de la cohorte n°2	75
a) Présentation des patients de la cohorte n°2	75
b) Résultats	78
IV. Discussion	82
Bibliographie	91
Annexes	98

Liste des abréviations :

- ACTH : Adréno CorticoTropic Hormone (hormone corticotrope)
- CBTRUS : The Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS)
- CEVOREM : Combination of EVerolimus and Octreotide in REsistant Meningioma
- dNTP : désoxynucléotide
- ddNTP : didésoxynucléotide
- FFPE : Formaldehyde Fixed and Paraffin Embedded
- GEP : Gastro-entéro-pancréatiques
- GH : Growth Hormone (hormone de croissance)
- GTE : Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines
- HPT : Hyperparathyroïdie
- IRM : Imagerie par résonance magnétique
- LOH : Loss Of Heterozygoty (perte d'hétérozygotie)
- NEM1 : Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1
- NLS : Signaux de Localisation Nucléaire
- Pb : Paires de bases
- PTH : Parathormone
- PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique
- SNC : Système Nerveux Central
- TDM : Tomodensitométrie
- TNE : Tumeurs neuroendocrines
- UMI : Unique Molecular Identifiers
- VASI : Variant de Signification Inconnue
- ZES : Syndrome de Zollinger-Ellison

Partie 1 : Introduction

I. La néoplasie endocrinienne multiple de type 1

1. Généralités

La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1) est un syndrome de prédisposition aux tumeurs endocriniennes, héréditaire, rare, de transmission autosomique dominante. Il survient chez environ un individu sur 30 000, sa pénétrance est de 94% à 50 ans [1]. Cliniquement, le diagnostic de la maladie peut se faire selon deux circonstances :

- la forme sporadique de la NEM1 se caractérise par la survenue chez un même individu d'au moins deux lésions tumorales du spectre de la maladie, parmi lesquelles les adénomes parathyroïdiens, les tumeurs endocrines entéro-pancréatiques ou encore les adénomes hypophysaires [2],
- la forme familiale quant à elle est définie par la présence d'au moins une de ces tumeurs endocrines chez un patient ayant des antécédents familiaux au premier degré [3].

D'autres atteintes endocrines peuvent être retrouvées telles que : des tumeurs des corticosurrénales, des bronches, du tube gastro-intestinal et du thymus ainsi que des lipomes, des angiofibromes, des collagénomes et des méningiomes [4][5].

2. Histoire de la maladie

Le premier cas de NEM1 a été décrit par Erdheim en 1903 dans le rapport d'autopsie d'un patient atteint d'acromégalie et d'hyperparathyroïdie [6]. En 1927, Cushing et Davidhoff rapportent le cas d'un patient atteint de la triade tumorale classique de la NEM1 [7]. En 1953, la première revue rapportant 8 cas de NEM1 est publiée [8]. Un an plus tard, Paul Wermer décrit pour la première fois le mode de transmission autosomique dominant du syndrome au sein d'une famille où le père et quatre de ses neuf enfants étaient atteints d'adénomes hypophysaires, parathyroïdiens et de tumeurs endocrines pancréatiques [9]. Il lui donne alors le nom de « Syndrome de Wermer ». En 1954, Robert Zollinger et Edwin Ellison le décrivent à

leur tour chez deux femmes de 19 et 36 ans atteintes de tumeurs endocrines entéro-pancréatiques [10]. Cette entité est alors nommée « Zollinger Ellison Syndrome » ou « ZES ». C'est en 1968 que les deux syndromes éponymes sont reconnus comme pouvant faire partie d'un seul et même syndrome désigné par le nom de Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1 (NEM1) [11]. Aujourd'hui le ZES peut être retrouvé dans le cadre d'une NEM1 ou être isolé et désigner une maladie peptique sévère (ulcères, maladie œsophagienne) due à une hypergastrinémie secondaire à un gastrinome entraînant une hypersécrétion gastrique acide. En 1986, une étude retrouve dans le plasma de patients atteints d'hyperparathyroïdie primaire une activité mitogène significativement supérieure à celle du plasma de patients contrôles, cette activité persistait jusqu'à quatre ans après parathyroïdectomie totale. Les auteurs concluaient alors que la NEM1 avait une origine humorale [12]. La même année, R. Schimke suggérait un modèle en deux étapes : une mutation constitutionnelle d'un récepteur de la membrane plasmique des glandes atteintes suivie d'une mutation somatique provoquant la dérégulation d'un oncogène [13]. En 1988, le locus *MEN1* est cartographié sur le chromosome 11. En 1997, *MEN1* sera identifié par clonage positionnel et plusieurs mutations seront confirmées comme responsable du syndrome (Chandrasekharappa et al). Comme nous allons le voir plus tard, c'est le modèle du second hit de Knudson qui est retenu pour expliquer la physiopathologie de la maladie.

3. Caractéristiques cliniques

a) Hyperparathyroïdie primaire

i. Épidémiologie

Les tumeurs parathyroïdiennes constituent la manifestation endocrinienne la plus fréquente de la NEM1 puisque sa pénétrance est presque de 100% à 50 ans [14]. Elle survient généralement vers l'âge de 30 ans mais dans certains cas avant 21 ans. La NEM1 étant une maladie rare, elle ne représente que 2 à 4% des cas d'hyperparathyroïdie primaire.

ii. Biologie

La conséquence de l'hyperparathyroïdie est une sécrétion inappropriée de parathormone à action hypercalcémiant et hypophosphatémiant. Une hypercalciurie est également présente.

iii. Clinique

L'hypercalcémie est d'abord asymptomatique puis peut se manifester par une asthénie, une polyurie, une polydipsie, une constipation ou un malaise (Tableau 1). D'autres signes cliniques tels que l'hypertension, un intervalle QT raccourci, un ulcère gastro-duodéal, une lithiase urinaire, une diminution de la densité minérale osseuse avec augmentation du risque fracturaire peuvent être des circonstances de découverte [3]. Les cas d'hypercalcémie sévère et de cancer parathyroïdien sont quant à eux très rares dans la NEM1 [15].

Organes	Symptômes cliniques
Système nerveux central	Léthargie, dépression, diminution de la vigilance, confusion
Tube digestif	Anorexie, constipation, nausées, vomissements, ulcères gastroduodénaux
Reins	Altération de la diurèse, hypercalciurie, risque accru de calculs rénaux
Os	Augmentation de la résorption osseuse avec risque de fracture plus élevé
Système cardiovasculaire	Hypertension, intervalle QT raccourci

Tableau 1 : Manifestations cliniques les plus courantes de l'hypercalcémie dans la NEM1.

Comparativement aux formes sporadiques, l'hyperparathyroïdie primaire associée à la NEM1 survient à un âge plus précoce avec un rapport homme/femme égal (1/1 contre 1/3). L'atteinte est généralement multi-glandulaire et le taux de récurrence après parathyroïdectomie subtotale est d'environ 50% à 12 ans contre 4 à 16% pour les cas sporadiques [16].

iv. Imagerie

Après une découverte le plus souvent fortuite à la suite d'un bilan biochimique, les examens de référence pour le diagnostic d'une hyperparathyroïdie primaire sont l'échographie cervicale et la scintigraphie parathyroïdienne au Tc^{99m} MIBI (méthoxyisobutylisonitrile) [17]. Un scanner cervical 4D ou une tomographie par émission de positons à la fluorocholine pourront être réalisés en seconde intention. L'intérêt de l'imagerie en préopératoire reste limité. Elle permet de mettre en évidence des glandes ectopiques ou plus récemment de réaliser des chirurgies moins étendues mais ces protocoles, encore à l'étude, doivent être validés. A l'heure actuelle, seule une exploration bilatérale ouverte du cou permet d'identifier les glandes parathyroïdes pathologiques [18]. Généralement les quatre glandes sont atteintes d'adénomes multiples ou d'hyperplasie, bien que cette distinction soit histologiquement difficile.

v. Prise en charge

La chirurgie est le traitement de choix des patients symptomatiques atteints l'hyperparathyroïdie primaire. Le type et l'étendue de la procédure varient au cas par cas selon le stade précoce ou tardif de la maladie. Le risque de récurrence est élevé si moins de 3 glandes parathyroïdiennes sont retirées mais le risque d'hypoparathyroïdie définitive est quant à lui augmenté après une parathyroïdectomie totale. La parathyroïdectomie subtotale (soit 3,5 glandes) est la procédure recommandée comme traitement initial [19]. Une hypercalcémie persiste ou récidive chez 40 à 60% des patients dans les 10 à 12 ans après cette chirurgie tandis que 10 à 30% d'entre eux auront une hypocalcémie nécessitant un traitement au long cours par vitamine D ou calcitriol [20]. Une parathyroïdectomie totale avec auto-transplantation de tissu parathyroïdien dans l'avant-bras peut être intéressante car elle permet d'éviter l'hypocalcémie définitive et la nécessité d'un médicament à base de vitamine D pour le patient (l'auto-transplantation peut également être extemporanée, dans ce cas une cryoconservation du tissu parathyroïdien est réalisée) [21]. La parathyroïdectomie totale sans transplantation est réservée aux cas sévères dont l'atteinte est précoce ou récidivante. Pendant la chirurgie, un suivi de la PTH est suggéré afin de surveiller l'ablation correcte des glandes parathyroïdes adénomateuses et/ou hyperplasiques [22].

Dans le même temps opératoire, une thymectomie est recommandée car le thymus peut être le siège de parathyroïdes ectopiques ou surnuméraires voire du développement de tumeurs neuroendocrines malignes. Néanmoins, cette pratique reste controversée.

Le Cinacalcet (Sinspar®) est un calcimimétique qui constitue une alternative thérapeutique pour les patients ayant une contre-indication chirurgicale ou de multiples récurrences. Cet agoniste des récepteurs de détection du calcium agit directement sur la glande parathyroïde en diminuant la libération de PTH et inhibant l'hyperplasie parathyroïdienne. Il permet de ralentir la progression des tumeurs parathyroïdiennes en contrôlant l'homéostasie calcique pendant au moins 12 mois après la mise en place du traitement. Il est dans certains cas prescrit en première intention ou bien après prise en charge chirurgicale [23].

b) Tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques

i. Généralités

Les tumeurs neuroendocrines (TNE) gastro-entéro-pancréatiques (GEP) sont les atteintes les plus fréquentes de la NEM1 après l'HPT primaire. L'incidence est de 30 à 80% selon les séries avec une pénétrance de 80% à 80 ans [4]. Le diagnostic de TNE est plus précoce chez les patients atteints de NEM1 que chez les cas sporadiques. Les lésions des îlots entéro-pancréatiques sont typiquement multicentriques, et s'étendent du microadénome aux carcinomes invasifs et métastatiques ; l'hyperplasie des îlots quant à elle est rare [24]. Les lésions surviennent dans n'importe quelle partie du pancréas ou sous forme de foyers dans la sous-muqueuse duodénale.

Les TNE gastro-entéro-pancréatiques peuvent être symptomatiques et sécrètent alors de l'insuline, de la gastrine, du peptide vaso-intestinal (VIP), du glucagon ou de la somatostatine ; ou bien asymptomatiques et dans ce cas sécrètent le polypeptide pancréatique. La forme la plus fréquemment diagnostiquée dans la NEM1 est cependant la forme de TNE non fonctionnelle qui est non sécrétante.

ii. Gastrinome

Les gastrinomes représentent 40% des TNE gastro-entéro-pancréatiques chez les patients NEM1 et 20% des gastrinomes sont liés à une NEM1. Ils sont le plus souvent multiples et localisés dans le duodénum. La plupart sont malins, 34 à 85% se compliquent avant le diagnostic de métastases des ganglions lymphatiques péripancréatiques et 6 à 16% de métastases hépatiques [25]. Leur pénétrance à 60 ans est significativement plus importante chez les hommes (55%) que chez les femmes (33%) [26].

Le diagnostic de gastrinome est défini par une concentration de gastrine à jeun 10 fois supérieure à la normale en présence d'hyperchlorhydrie (pH gastrique <2). Le syndrome de Zollinger-Ellison (ZES) fait référence à la constellation de signes cliniques associés à l'augmentation de la production d'acide gastrique causée par la gastrine. Environ 40% des patients NEM1 ont un gastrinome qui se manifeste par les symptômes du ZES : oesophagite, vomissements, douleurs abdominales, diarrhée chronique, ulcères duodénaux ou jéjunaux, perte de poids. La gastroscopie et l'échographie endoscopique sont les techniques d'imagerie utilisées pour localiser les gastrinomes duodénaux tandis que l'imagerie par résonance magnétique (IRM), l'angiographie abdominale, la tomographie par émission de positons (TEP-scan) ou la scintigraphie des récepteurs de la somatostatine sont utilisés pour le diagnostic des formes pancréatiques. Les métastases, qui devront également être localisées lors du diagnostic par imagerie, n'entraînent pas un mauvais pronostic lorsqu'elles sont ganglionnaires, le pronostic des patients atteints de gastrinome est associé à la taille de la tumeur et à la présence de métastases hépatiques [27].

La prise en charge thérapeutique des gastrinomes consiste principalement en une thérapie médicamenteuse qui vise à réduire la sécrétion d'acide gastrique par l'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'histamine 2, d'inhibiteurs de la pompe à protons ou d'analogues de la somatostatine (SSA) [28]. Ces médicaments ont démontré leur efficacité et leur innocuité à long terme pour contrôler l'hypergastrinémie et les complications du ZES ainsi qu'un effet anti-néoplasique pour les analogues de la somatostatine [29].

Concernant la prise en charge chirurgicale des gastrinomes dans la NEM1, le bénéfice est controversé étant donné la multiplicité et la petite taille des tumeurs. L'objectif est de diminuer le risque de métastases à distance et d'améliorer la survie sans progression. La chirurgie est proposée en présence d'une lésion pancréatique unique de plus de 2 cm. En présence de lésions multiples et localisées dans le duodénum, la chirurgie est plus délicate et doit souvent être large pour espérer une résection complète des lésions ce qui augmente la

morbidity. En cas de maladie métastatique avancée, la résection chirurgicale est associée à un traitement médical comme l'Évérolimus (inhibiteur de mTOR), le Sunitinib (inhibiteur de la tyrosine kinase), une chimiothérapie (Streptozotocine ou 5-Fluorouracile) ou en cas de métastases hépatiques à une chimoembolisation ou radioembolisation de l'artère hépatique [30].

iii. Insulinome

Les insulinomes sont des tumeurs qui se développent aux dépens des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas et sécrètent de l'insuline. Elles représentent 10 à 30% des TNE pancréatiques de la NEM1 et surviennent généralement au cours de la troisième décennie de la vie.

Les signes cliniques sont très variés expliquant un retard fréquent au diagnostic. Les manifestations chez plus de 90% des patients sont des symptômes neurologiques, parfois sévères comme une perte de connaissance ou une crise convulsive ; 60% des patients présentent des symptômes sympathicomimétiques, des sueurs principalement ; les autres signes sont aspécifiques, asthénie, prise de poids [31].

Le diagnostic est établi par l'augmentation de la concentration plasmatique d'insuline associée à une hypoglycémie lors d'un jeûne supervisé de 72 heures [14]. Dans le même temps, une recherche d'agents hypoglycémisants oraux est réalisée sur plasma ou urines afin d'éliminer une hypoglycémie médicamenteuse [14]. L'échoendoscopie est la technique d'imagerie recommandée en première intention pour localiser les insulinomes car elle présente une sensibilité de 94% [32]. L'échographie, le scanner par tomodensitométrie ou l'IRM peuvent également être utilisés ainsi que des techniques plus invasives telles que l'angiographie de l'axe coeliaque, la stimulation intra-artérielle sélective avec prélèvement veineux hépatique qui permettent de localiser plus de 80% des insulinomes [33].

Le traitement de choix de l'insulinome, selon certains experts, serait la résection pancréatique distale associée à l'énucléation de toute la tumeur. Cette double procédure est associée à la fois au plus faible risque de récurrence des hypoglycémies ainsi qu'au plus faible risque de complications post-opératoires. Cependant il n'y a pas de consensus sur l'étendue optimale de la résection chirurgicale qui dépend de la localisation, du nombre et de la taille des lésions et qui peut aller de l'énucléation d'une seule tumeur à l'excision de tous les néoplasmes en passant par une pancréatectomie distale ou partielle. La réalisation d'une échographie

pancréatique en per-opératoire ainsi que la surveillance du rapport insuline/glucose permettent d'évaluer la réussite de l'excision [34]. En cas de forme non résécable ou chez les patients très symptomatiques ou en récurrence, des traitements médicamenteux tels que du diazoxide (sulfamide à activité hyperglycémiant agissant par inhibition de la libération pancréatique d'insuline) ou des analogues de la somatostatine (effet anti-néoplasique permettant de diminuer le volume tumoral et donc le volume sécrétoire) peuvent être administrés. Les formes métastatiques sont très rares (4 à 14% des cas) et associent différentes lésions qui ne sont souvent pas toutes éligibles à un traitement chirurgical. Dans ce cas, une chimiothérapie associant Streptozotocine, 5-fluorouracile et Doxorubicine ou une embolisation des artères hépatiques peuvent être utilisées en complément de l'excision des lésions opérables [35].

iv. Glucagonome

Le glucagonome survient chez moins de 3% des patients NEM1. C'est un macroadénome des cellules α du pancréas, le plus souvent unique, sécrétant du glucagon et mesurant plus de 3 cm. La manifestation clinique caractéristique est une éruption cutanée de type érythème nécrolytique migrateur. Une intolérance au glucose ou un diabète peuvent également être présents, associés à une perte de poids, une anémie, une thrombose veineuse, une diarrhée ou une stomatite.

Le diagnostic est posé par une concentration sérique de glucagon augmentée chez un patient porteur d'une lésion pancréatique. Ces tumeurs surviennent le plus souvent dans la queue du pancréas et 50 à 80% des patients présentent des métastases au moment du diagnostic [36].

L'exérèse chirurgicale est le traitement de choix, associée à un traitement par SSA ou chimiothérapie (Streptozotocine, 5-Fluorouracile et diméthyltriazéno-imidazole) pour les formes métastatiques. Une embolisation hépatique peut être proposée en cas de lésions secondaires hépatiques.

v. VIPome

Les VIPomes sont des tumeurs sécrétant le peptide intestinal vasoactif (VIP). Elles sont rares dans la NEM1 et se présentent sous la forme d'un syndrome WDHA caractérisé par une diarrhée hydrique, une hypokaliémie et une achlorhydrie. Ce syndrome est aussi appelé

syndrome de Verner-Morrison ou syndrome de VIPome [36]. Comme les glucagonomes, ces tumeurs se situent préférentiellement dans la queue du pancréas.

Le diagnostic est établi par la preuve d'un volume de selles à jeun supérieur à un ou deux litres par jour chez un patient ne prenant ni laxatifs ni diurétiques, associée à une concentration de peptide intestinal vasoactif nettement accrue.

Le traitement de choix est l'exérèse chirurgicale lorsqu'elle est possible. En cas de tumeur non résécable, la stratégie thérapeutique est la même que celle des glucagonome : SSA ou chimiothérapie et embolisation des artères hépatiques en cas de métastases.

vi. TNE non fonctionnelles

Les tumeurs neuroendocrines non fonctionnelles sont asymptomatiques et associées à une très faible élévation du taux d'hormones pancréatiques. Ces sont les TNE les plus fréquentes puisqu'elles touchent 55% des patients NEM1, qui présentent une espérance de vie significativement plus faible que les patients non atteints par ce type de tumeurs [37].

Il existe une corrélation entre leur taille et la présence de métastases. L'objectif est donc de les diagnostiquer le plus tôt possible ce qui est permis par la sensibilité croissante des méthodes d'imagerie. Les recommandations actuelles préconisent un dépistage chez les patients asymptomatiques de moins de 15 ans [38] par échographie endoscopique. En cas de maladie étendue, la scintigraphie des récepteurs à la somatostatine sera utilisée pour rechercher d'éventuels métastases.

Le Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines (GTE) préconise la non exérèse chirurgicale des tumeurs de taille inférieure à deux centimètres ne présentant pas un comportement agressif tel qu'une croissance rapide. En effet, la morbimortalité d'une chirurgie pancréatique est supérieure au risque métastatique ou au risque de décès dû à une tumeur de taille inférieure à ce seuil [39]. En cas de maladie métastatiques, la stratégie thérapeutique est identique à celle évoquée précédemment pour les autres types de TNE (analogues de la somatostatine, chimiothérapie, etc.).

c) Adénomes hypophysaires

L'incidence des tumeurs hypophysaires chez les patients NEM1 varie de 15 à 50% selon les séries avec un âge moyen d'apparition de 38 ans [40]. C'est la 3^{ème} atteinte par ordre de fréquence après l'HPT et les TNE gastro-entéro pancréatiques et elle touche significativement plus les femmes que les hommes [41].

Le macroadénome (diamètre supérieur à 1cm) est la forme clinique la plus fréquente. Environ 60% des adénomes sont des prolactinomes (sécrétion de prolactine), 25% des adénomes somatotropes (sécrétion de GH), 5% des adénomes corticotropes (sécrétion d'ACTH) et les formes non fonctionnelles représentent 30 à 42% des adénomes selon les études. Certains adénomes plurisécrétants ont été rapportés et seraient plus fréquents chez les patients NEM1 que dans la population générale [40].

Les manifestations cliniques dépendent de l'hormone sécrétée et de la taille de la tumeur. En cas d'hyperprolactinémie, les femmes peuvent présenter aménorrhée, infertilité et galactorrhée, les hommes impuissance et infertilité ; une hypersécrétion de GH provoque une acromégalie ; enfin une hypersécrétion d'ACTH provoque un hypercorticisme (maladie de Cushing). Si sa taille est importante, l'adénome hypophysaire peut comprimer les structures adjacentes telles que le chiasma optique (zone de croisement des deux nerfs optiques) ou le tissu hypophysaire sain et provoquer respectivement des troubles visuels (hémianopie bitemporale, vision trouble) et des maux de tête ou un hypopituitarisme.

Le diagnostic fait généralement suite à un bilan biochimique révélant un excès d'hormones et il est confirmé par la mise en évidence de l'adénome hypophysaire à l'IRM.

Le traitement des adénomes hypophysaires consiste peut être médicamenteux : médicamenteuse à base d'agonistes dopaminergiques (Bromocriptine, Cabergoline) pour les prolactinomes et à base d'analogues de la somatostatine (Octréotide, Lanréotide) pour les adénomes à GH ou ACTH, ou chirurgicale par adénomectomie transphénoïdale. La radiothérapie peut être utilisée en cas de résidus adénomateux non résécables. Les adénomes hypophysaires dans la NEM1 sont plus résistants aux traitements comparativement aux adénomes sporadiques et le recours à la chirurgie est plus fréquent [42]. Chez les patients traités avec succès, le dépistage des tumeurs hypophysaires devra être poursuivi à vie car le tissu hypophysaire restant peut provoquer une récurrence. De même chez les patients mutés MEN1 sans atteinte hypophysaire, une évaluation biochimique annuelle des taux hormonaux est recommandée ainsi qu'une IRM hypophysaire tous les 3 à 5 ans [4].

d) Tumeurs carcinoïdes

Les tumeurs carcinoïdes surviennent chez plus de 3% des patients NEM1 à un âge moyen au diagnostic de 39 à 50 ans selon les séries. La tumeur carcinoïde peut être localisée dans les bronches, le tractus gastro-intestinal, le pancréas ou le thymus. Elle est plus fréquemment retrouvée dans les bronches chez les femmes et dans le thymus chez les hommes [43]. Le tabagisme excessif a été identifié comme facteur de risque de carcinoïde thymique [44]. Ce dernier serait particulièrement agressif et associé à une augmentation significative du risque de décès. Cette association n'est pas observée pour les carcinoïdes bronchiques [45]. La survie médiane après le diagnostic d'une tumeur thymique serait d'environ 9,5 ans et le décès des suites directes de la tumeur est observé chez 70% des patients [43]. Des carcinoïdes gastriques à cellules entérochromaffines de type II ont été décrits chez 70% des patients NEM1 atteints de gastrinome. Ils sont généralement multiples, de taille inférieure à 1,5 cm et localisés même si certaines formes plus agressives peuvent métastaser au foie [46].

La plupart des patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic et peuvent le rester jusqu'à un stade avancé lorsque des métastases hépatiques, osseuses ou pulmonaires sont détectées. Le bilan biochimique est souvent peu informatif car les taux de sérotonine (marqueur des tumeurs thymiques) et chromogranine A (marqueur des tumeurs bronchiques) sont très rarement augmentés. Le dépistage de ces tumeurs dépend donc de l'imagerie radiologique. La tomодensitométrie et l'IRM sont les méthodes les plus sensibles pour la détection des tumeurs thymiques et bronchiques bien qu'une scintigraphie à l'octréotide (SSA) peut également se révéler efficace dans la détection de certains carcinoïdes. Afin de détecter de manière précoce les masses thymiques et bronchiques chez les patients NEM1, les recommandations actuelles préconisent de réaliser une IRM ou une tomодensitométrie tous les un à deux ans [47]. Les carcinoïdes gastriques, quant à eux, sont généralement détectés accidentellement au moment de l'endoscopie gastrique réalisée dans l'exploration d'un gastrinome.

La prise en charge thérapeutique consiste en une exérèse chirurgicale complète de la tumeur. La radiothérapie adjuvante est utilisée en cas de résection incomplète. Certains traitements médicamenteux tels que les SSA (Octréotide, Lanréotide), la chimiothérapie (Cisplatine, Etoposide) et les inhibiteurs de mTOR sont indiqués en cas de tumeur non résécable. La thymectomie transcervicale prophylactique est généralement réalisée au moment de la parathyroïdectomie pour l'HPT mais cela n'élimine pas le risque de développer une tumeur du thymus à cause du tissu thymique résiduel. La surveillance par imagerie est donc justifiée, que les patients aient bénéficié ou non d'une chirurgie antérieure.

e) Tumeurs surrenaliennes

Les tumeurs des surrenales toucheraient 20 à 73% des patients NEM1. Les statistiques diffèrent entre les études selon la méthode d'imagerie utilisée pour les détecter [48] [49]. Ces tumeurs sont généralement non fonctionnelles et incluent des adénomes corticaux souvent uniques, parfois multiples, une hyperplasie surrenalienne, une hyperplasie nodulaire, des kystes ou des carcinomes. Seuls 10% des patients présentent une hypersécrétion hormonale provoquant dans la majorité des cas un hyperaldostéronisme primaire ou un syndrome de Cushing indépendant de l'ACTH. Une hyperandrogénémie peut parfois être détectée notamment en cas de carcinome surrenalien. Le phéochromocytome quant à lui est rare dans la NEM1.

Des analyses biochimiques telles que la mesure des taux plasmatiques de rénine et aldostérone, le test de freinage faible à la dexaméthasone seront réalisées chez des patients symptomatiques ayant des signes évocateurs de tumeurs surrenales fonctionnelles ou pour les patients dont la tumeur à une taille supérieure à 1cm. Un examen annuel de suivi par imagerie est préconisé chez tous les patients NEM1 atteints de tumeur surrenale.

L'ablation chirurgicale sera indiquée en cas de croissance significative ou d'une taille supérieure à 4cm. Le traitement des tumeurs surrenales est le même pour les patients mutés NEM1 que pour les patients atteints de tumeurs sporadiques.

f) Manifestations cutanées

Angiofibromes et collagénomes sont rapportés chez plus de 70% des patients NEM1, souvent en association. Les angiofibromes faciaux sont des tumeurs bénignes comprenant des vaisseaux sanguins et du tissu conjonctif. Ils sont constitués de papules acnéiformes ne régressant pas, souvent multiples et localisées au niveau du visage sur le bord vermillon des lèvres. Les collagénomes se présentent sous la forme de nodules cutanés multiples, de couleur peau ou parfois hypopigmentés. Ils sont disposés symétriquement sur le tronc, le cou et les membres supérieurs. Ils sont généralement asymptomatiques, arrondis, à élasticité ferme et peuvent varier de quelques millimètres à plusieurs centimètres [4]. Le traitement de ces lésions n'est généralement pas nécessaire. Les lipomes sont des tumeurs bénignes de tissu adipeux qui surviennent chez 20 à 30% des patients [4]. Ils sont généralement nodulaires, de taille variable, multicentriques, sous-cutanés, rarement viscéraux et non récidivants après exérèse chirurgicale.

Ces atteintes cutanées, surtout lorsqu'elles sont combinées, sont plus fréquentes chez les patients NEM1 et peuvent être un moyen utile au diagnostic présymptomatique [50].

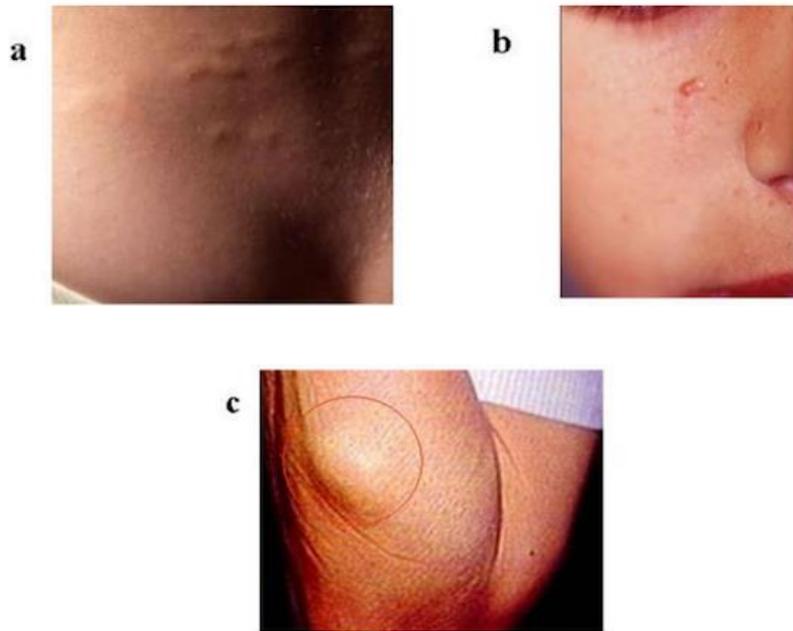


Figure 1 : Manifestations cutanées de la NEM1 : a) Collagénome, b) Angiofibrome facial, c) Lipome.

g) Cancer du sein

Les patientes mutées *MEN1* courent un risque accru de cancer du sein. En effet, une étude menée sur 190 femmes atteintes de NEM1 a montré un risque relatif de cancer du sein invasif de 2,83 et un âge moyen au moment du diagnostic de 48 ans contre 60 à 65 ans dans la population générale. Les ratios de risque pour les autres cancers majeurs n'étaient pas élevés. Une perte d'expression de *MEN1* ainsi qu'une perte d'hétérozygotie du gène dans les cellules cancéreuses mammaires étaient observées [51].

Une autre étude a retrouvé un âge médian au diagnostic du cancer de 45 ans chez des femmes atteintes d'une NEM1, n'ayant ni antécédents familiaux de cancer du sein ni facteurs de risque de cancer du sein connus. L'âge médian au diagnostic dans la population de référence était de 61,2 ans. Ainsi une surveillance spécifique est suggérée chez les femmes atteintes d'une NEM1 à partir de l'âge de 40 ans [52].

h) Tumeurs intracérébrales : méningiomes et épendymomes

En 1984 et 1996, deux études rapportent pour la première fois les cas de deux patients atteints de NEM1 et de méningiome [53], [54].

En 2004, Asgharian et al. mènent une étude prospective sur 74 individus atteints de NEM1 : 8% des patients présentaient un méningiome sur une recherche systématique à l'IRM. Les méningiomes rapportés dans cette étude étaient asymptomatiques avec un sex-ratio de 2 femmes pour 1 homme et un âge moyen de survenue de 51 ans. Leur taille moyenne au moment de la détection était plus petite que celle des méningiomes sporadiques asymptomatiques et 60% n'ont montré aucune croissance au cours du temps (3,6 ans de suivi en moyenne). Chez l'un d'entre eux une LOH de *MEN1* est mise en évidence dans la tumeur.

Comme pour le diagnostic des méningiomes sporadiques, l'IRM est la technique d'imagerie utilisée en première intention. Les recommandations actuelles préconisent de rechercher un méningiome lorsqu'une IRM du cerveau est réalisée pour l'évaluation d'un éventuel adénome hypophysaire chez un patient NEM1. L'IRM peut être complétée par une scintigraphie des récepteurs à la somatostatine à l'octréotide radiomarqué. Ce marqueur possède une forte affinité avec les récepteurs de la somatostatine dont la densité élevée a également été rapportée dans les méningiomes des patients NEM1. Concernant la prise en charge thérapeutique, elle ne diffère pas de celle indiquée pour les méningiomes sporadiques [5].

Des épendymomes ont également été décrits chez des patients atteints de NEM1 dans plusieurs rapports de cas mais aucune LOH de *MEN1* au sein d'un épendymome n'a été mise en évidence [5], [55]–[58].

4. Génétique moléculaire et Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1

a) Le gène *MEN1*

Le gène *MEN1* est un gène suppresseur de tumeur, situé sur le bras long du chromosome 11 (11q13) et s'étend sur environ 9000 paires de bases. Il se compose de 10 exons dont un exon (l'exon 1) est non traduit. La transcription de *MEN1* produit un ARN messager primaire de 2800 paires de bases qui sera traduit en une protéine nucléaire de 610 acides aminés appelée ménine. Un autre transcrit de 4000 paires de bases a été mis en évidence dans le pancréas et le thymus suggérant un épissage alternatif spécifique à ces tissus.

b) La protéine Ménine

La protéine Ménine est une protéine de 610 acides aminés hautement conservée chez l'Homme. Des études in-vitro ont montré qu'elle est principalement localisée dans le noyau [59]. Elle possède en effet des séquences de localisation nucléaire (NLS), situées dans la région C-terminale, et peut interagir avec l'ADN.

La localisation nucléaire de la protéine et des preuves expérimentales suggèrent qu'elle est impliquée dans la régulation de la transcription, la stabilité du génome, la division cellulaire et la prolifération cellulaire. En effet, des études récentes ont montré que la surexpression de la Ménine dans un modèle cellulaire induisait une diminution de la prolifération, une suppression de la croissance dans la gélose et une inhibition de la croissance tumorale chez la souris [60]. Ménine est donc soupçonnée de réprimer la tumorigenèse par la répression de la prolifération cellulaire, principalement via trois mécanismes :

- l'interaction directe avec des facteurs de transcription (JunD, NF-kB, PPAR γ , VDR) qui induisent ou suppriment la transcription des gènes
- l'interaction avec diverses enzymes modifiant les histones (MLL, HDAC, EZH2)
- l'interaction directe avec les promoteurs de gènes : rôle de facteur de transcription

Il existe de plus des preuves que Ménine peut agir dans la réparation ou la synthèse d'ADN [61].

c) Mutations germinales de *MEN1*

Plus de 400 mutations germinales ont été mises en évidence dans le gène *MEN1* [62]. Les mutations sont réparties tout au long du gène. Bien que certaines mutations soient plus fréquentes, il n'y a pas de véritable hot spot mutationnel [63], [64]. Environ 50% des mutations identifiées sont de petites insertions ou délétions entraînant un décalage du cadre de lecture, 20% sont des mutations non-sens entraînant l'apparition d'un codon stop, 20% sont des mutations faux sens et environ 7% sont des mutations affectant les sites d'épissage. Le reste des mutations sont des délétions entières ou partielles du gène ou bien des mutations se produisant dans les promoteurs ou régions non traduites de *MEN1*, qui restent à étudier [65]. Les mutations stop, les mutations affectant les sites d'épissage et la plupart des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture aboutissent à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle voire à l'absence complète de protéine.

d) Mutations somatiques de *MEN1* : modèle des deux événements de Knudson

Dans la NEM1, le premier événement inactivateur du gène est hérité de l'un des parents et est donc présent dans toutes les cellules de l'organisme. Ce sont les mutations dites germinales, à l'état hétérozygote. Lorsque cette première mutation est combinée à un second événement de type perte somatique ou post-natale d'un fragment du chromosome 11 où se trouve *MEN1* ou du chromosome entier, l'expansion clonale néoplasique de la cellule est initiée [66]. On parle dans ce cas de perte d'hétérozygotie ou LOH (Loss Of Heterozygoty). Elle est décrite dans plus de 90% des tumeurs chez les patients ayant une mutation germinale de *MEN1* et également dans 5 à 50% des tumeurs endocriniennes sporadiques (non déterminée génétiquement) [62]. Le deuxième événement somatique peut également être une mutation ponctuelle sur l'allèle non muté au niveau germinale. Ce phénomène est décrit dans l'hypothèse des deux événements (ou « Two-hit hypothesis ») de Knudson [67]. Il confirme le rôle suppresseur de tumeur du gène *MEN1* puisque la combinaison des deux événements entraînant une perte de la Ménine fonctionnelle, conduit à la néoplasie.

e) Corrélation génotype-phénotype

Les manifestations et la localisation des tumeurs associées à *MEN1* ne peuvent être prédites car aucune corrélation directe génotype-phénotype n'a été identifiée dans cette pathologie [68]. Plusieurs études réalisées dans différentes familles ont observé la même mutation de *MEN1* dans différentes familles avec des manifestations cliniques différentes. A l'inverse, un large éventail de mutations de *MEN1* a été identifié dans plusieurs familles NEM1 ayant les mêmes manifestations cliniques [69]–[71]. Les manifestations cliniques, l'âge d'apparition et l'histoire naturelle de la maladie sont également très variables entre les membres d'une même famille. Une corrélation génotype-phénotype spécifique n'est probablement pas possible en raison de l'hétérogénéité des mutations rapportées dans le gène *MEN1*. Cela suggère également qu'il doit exister d'autres facteurs génétiques et épigénétiques ou environnementaux influençant les phénotypes cliniques.

f) Phénocopies et mutations dans d'autres gènes

Environ 5 à 25% des patients atteints de NEM1 n'ont pas de mutation dans *MEN1*. Cette variabilité dans la détection des mutations peut être en partie attribuable aux différences dans les méthodes utilisées pour identifier les mutations. En effet, les délétions de grande taille ne sont pas toujours recherchées alors qu'elles sont retrouvées chez environ 30% des patients, présentant cliniquement une NEM1, et n'ayant pas de mutation ponctuelle dans les régions codantes du gène [72]. De plus, cette variabilité peut être aussi due à la constatation d'un phénotype s'apparentant à une NEM1 chez des patients ayant des mutations dans d'autres gènes. On parle dans ce cas de phénocopies. Les gènes à considérer pour le dépistage des phénocopies de *MEN1* comprennent :

- *CDC73* (également appelé *HRPT2*) : gène suppresseur de tumeur qui code pour la protéine parafibromine dont les mutations sont impliqués dans le syndrome des tumeurs parathyroïdiennes ;
- *CaSR* : gène qui code pour les récepteurs de détection du calcium dont les mutations sont associées à des hypercalcémies hypocalciuriques familiales bénignes ;
- *AIP* : gène suppresseur de tumeur dont les mutations sont associées à des adénomes hypophysaires isolés familiaux ;
- *CDKN1B* : gène codant pour un inhibiteur de kinase dépendant de la cycline p27kip1 ;
- *GNA11* : gène qui code pour la protéine G alpha 11 dont les mutations sont retrouvées chez les patients atteints d'hyperparathyroïdie familiale ;
- *AP2S1* : gènes qui code pour le complexe protéique lié à l'adaptateur 2, sous-unité sigma 1, dont les mutations sont retrouvées également chez les patients atteints d'hyperparathyroïdie familiale.

Ainsi, l'approche diagnostique syndromique par analyse d'un panel de gènes semble être adaptée à la NEM1.

5. Dépistage, diagnostic et surveillance

a) Diagnostic génétique de la NEM1

La NEM1 est un syndrome monogénique de transmission autosomique dominante. Chaque patient atteint à 50% de probabilité de transmettre la mutation à sa descendance, indépendamment du sexe. La détection précoce des individus porteurs d'une mutation dans

MEN1, facilitée par les tests génétiques, permet de réduire la morbidité et la mortalité de cette pathologie grâce à une prise en charge précoce.

Selon les recommandations de pratique clinique [4], l'analyse mutationnelle de *MEN1* doit être réalisée chez les patients répondant aux critères cliniques de la NEM1 (présence de deux lésions du spectre NEM1, ou présence d'une lésion chez un patient avec antécédents familiaux de tumeur du spectre NEM1), chez les patients ayant un parent au premier degré porteur d'une mutation dans *MEN1* et chez tous les patients chez qui une NEM1 est suspectée devant la présence d'une tumeur endocrine de survenue précoce ou atypique, malgré que le phénotype ne corresponde pas à la triade classique des tumeurs endocrines (parathyroïdienne, hypophysaire et entéro-pancréatique). Lorsque cela est possible, le test génétique doit être effectué au cours de la première décennie de la vie. Cela permet une identification précoce des porteurs de gènes mutants éligibles à un dépistage biochimique et/ou radiologique périodique des tumeurs endocrines caractéristiques de la NEM1.

Les analyses de diagnostic moléculaire, réalisées sur échantillon de sang, varient selon les cas :

- Lorsqu'un patient répond aux critères cliniques de la NEM1 sans antécédent familial ni mutation familiale connue, il entre dans le cadre d'un diagnostic syndromique et bénéficie d'une analyse par séquençage de nouvelle génération (NGS) d'un panel de gènes, à la recherche d'une variation ponctuelle ou d'une variation du nombre de copies des gènes. Ce panel peut être élargi, en fonction du type de lésion qu'il présente (par exemple : panel élargi aux gènes impliqués dans les hyperparathyroïdie primaire et hypercalcémie hypocalciuriques familiales en cas d'hyperparathyroïdie isolée avant l'âge de 50 ans.)
- Lorsqu'une mutation de *MEN1* est connue au sein d'une famille, l'analyse chez les apparentés du patient atteint consiste en une recherche ciblée de la mutation identifiée chez ce dernier. Pour cela un séquençage par méthode Sanger de l'exon porteur de la mutation est réalisé sur deux prélèvements indépendants. A l'issue de ces tests moléculaires, de nombreux variants peuvent être mis en évidence. Les polymorphismes de *MEN1* doivent être connus du laboratoire pratiquant l'analyse et distingués des mutations incriminables à la pathologie.

b) Protocoles de dépistage et de surveillance chez les porteurs *MEN1*

Le dépistage périodique des tumeurs endocriniennes chez des patients porteurs de mutations de *MEN1* permet d'améliorer la prise en charge. La pénétrance liée à l'âge pour toutes les manifestations cliniques de la pathologie semble être proche de zéro avant 5 ans, atteignant environ 50% à 20 ans et plus de 95% à 40 ans [73].

Le programme de surveillance des individus atteints de NEM1 recommande un bilan biochimique annuel (dosage sérique de la prolactine, glucose, insuline, calcium, chromogranine, polypeptide pancréatique, glucagon, peptide intestinal vasoactif, gastrine) et un bilan d'imagerie tous les 3 à 5 ans (IRM tête et cou, TDM ou IRM thoraco-abdominal). Des examens complémentaires (écho-endoscopie pour les TNE digestives) seront réalisés en fonction des résultats de ce dépistage.

Type de tumeur	Age de début du dépistage	Analyse biochimique	Technique d'imagerie
Parathyroïde	8 ans	Calcium, PTH	Aucune
Gastrinome	20 ans	Gastrine	Aucune
Insulinome	5 ans	Glycémie, insuline	Aucune
TNE pancréatique	Avant 10 ans	Chromogranine, polypeptide pancréatique, glucagon, VIP	IRM, échographie endoscopique
Hypophyse	5 ans	Prolactine, IGF-1	IRM
Surrénale	Avant 10 ans	Aucune	IRM ou TDM
Carcinoïde thymique ou bronchique	15 ans	Aucune	IRM

Tableau 2 : Age recommandé de dépistage biochimique et radiologique en fonction du type de tumeur chez les patients atteints de NEM1 d'après Thakker et al JCEM 2012 [4].

c) Conseil génétique

Le conseil génétique est le processus consistant à fournir aux patients et leurs familles des informations sur la nature, l'hérédité et les implications des atteintes génétiques pour les aider à prendre des décisions médicales et personnelles éclairées.

Le syndrome *MEN1* est hérité de manière autosomique dominante. Environ 90% des patients diagnostiqués ont l'un de leurs deux parents affecté, les 10% restant sont porteurs d'une mutation de novo. Les antécédents familiaux peuvent dans certains cas sembler négatifs en raison de l'incapacité à reconnaître le trouble chez les autres membres de la famille, de la mort précoce du parent atteint avant l'apparition des symptômes ou de l'apparition tardive de la maladie chez le parent affecté. Par conséquent des antécédents familiaux négatifs ne peuvent être confirmés que si les tests effectués sur les parents le sont. C'est pourquoi les tests de génétique moléculaire sont recommandés pour les parents d'un patient porteur d'une mutation de *MEN1*.

Chaque enfant d'un individu atteint a 50% de probabilité d'hériter de l'allèle morbide de *MEN1*. Ce risque est identique chez les frères et sœurs d'un patient atteint chez qui la recherche d'antécédents familiaux par analyse génétique des parents s'est révélée positive.

Le test génétique moléculaire est fortement recommandé pour les membres asymptomatiques à risque c'est à dire les parents au premier degré d'un individu porteur d'une mutation. Les analyses moléculaires doivent être réalisées le plus tôt possible, dans la première décennie de la vie voire avant l'âge de 5 ans, afin que les individus présentant une mutation dans *MEN1* puissent bénéficier d'une surveillance clinique appropriée. L'éducation et l'information par le conseil génétique de toutes les personnes à risque au sein d'une famille est recommandé avant les tests génétiques.

Le diagnostic prénatal en cas de grossesse à risque et le diagnostic préimplantatoire sont possibles dans le cadre de la NEM1. Il est donc important que les jeunes adultes affectés ou à risque de développer une NEM1 puissent bénéficier d'un conseil génétique avant une éventuelle grossesse.

II. Les méningiomes humains

1. Généralités

Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes extra-parenchymateuses le plus souvent bénignes, développées aux dépens des cellules arachnoïdiennes. Ce sont les tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes chez l'adulte (20 à 30 % des tumeurs primitives) mais elles restent rares chez l'enfant (0,4% à 4,6% selon les séries) [74].

Le terme de méningiome a été utilisé pour la première fois par Harvey Cushing en 1922 mais il faudra attendre 1979 pour que paraisse la première classification de l'OMS. Celle-ci reposait sur des caractéristiques histologiques spécifiques de ces tumeurs les séparant en deux groupes selon qu'elles soient bénignes ou malignes [75]. La nouvelle classification parue en 2000 classe désormais les méningiomes en trois grades selon leur malignité. Cette classification a depuis connu deux révisions, une en 2007 et une en 2016 [76], [77].

2. Classification des méningiomes

La classification des méningiomes repose sur les critères suivants :

- l'activité mitotique ;
- la densité cellulaire de la population tumorale ;
- les atypies architecturales ;
- les atypies cytologiques ;
- la présence d'une nécrose tumorale spontanée ;
- la présence d'un envahissement du parenchyme cérébral.

Ces différents critères permettent de classer les méningiomes en 3 grades, chaque grade étant associé à un potentiel de croissance, de dissémination métastatique, de récurrence et à un pronostic différents. Plusieurs types histologiques sont également recensés dans chacun des grades avec des caractères cytologiques propres [76], [77].

a) Grade I

Le grade I rassemble les méningiomes bénins. Ce sont les plus fréquents, ils ne possèdent que de rares événements mitotiques [78]. Neuf types architecturaux sont définis au sein de ce groupe. Les trois types les plus fréquents sont les méningiomes méningothéliaux, fibroblastiques et transitionnels. Les 6 autres, plus rares, sont les méningiomes psammomateux, angiomateux, microkystique, sécrétant, riche en lymphoplasmocytes et métaplasiques.

b) Grade II

Ce grade regroupe les méningiomes possédant des caractéristiques histologiques propres et dont l'agressivité est comprise entre celle des méningiomes du grade I et ceux du grade III. Trois types architecturaux sont compris dans cette catégorie : les méningiomes atypiques, les méningiomes à cellules claires et les méningiomes chordoïdes.

c) Grade III

Les méningiomes appartenant à ce grade sont rares mais agressifs. Cette catégorie de grade tumoral regroupe également trois types architecturaux : les méningiomes anaplasiques, les méningiomes papillaires et les méningiomes rhabdoïdes.

3. Epidémiologie

En raison de leur caractère bénin, peu d'études épidémiologiques à grande échelle ont été menées sur les méningiomes [78]. Ces tumeurs sont tout de même considérées comme les tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes chez l'adulte avec une incidence annuelle de 7,8 individus pour 100 000. Les méningiomes représentent 20 à 30% des tumeurs intracrâniennes primitives avec un pic de fréquence entre 55 et 75 ans et un sex-ratio d'un homme pour trois femmes.

Les méningiomes de grade I représenteraient 80 à 90% de tous les méningiomes avec une médiane de survie supérieure à 10 ans. Les méningiomes de grade II et III sont plus rares et leur survie est évaluée respectivement à moins de 5 ans et moins de 3 ans [78]. Les autres facteurs identifiés comme influençant la survie sont l'âge au diagnostic, le caractère malin du méningiome, la qualité de l'exérèse chirurgicale et la survenue d'une complication opératoire [79].

Entre 2004 et 2009 en France, le Recensement National des Tumeurs cérébrales primitives a comptabilisé sur toute la population (adultes et enfants confondus) 12 363 méningiomes sur un total de 43 929 tumeurs intracérébrales primitives soit 28%. L'âge médian au diagnostic était de 58 ans [80]

4. Caractéristiques des méningiomes (forme, taille, localisation)

Les méningiomes se présentent sous deux formes principales. Ils ont le plus souvent la forme d'une masse, plus ou moins arrondie, parfois polylobée. Ils prennent plus rarement la forme d'un épaissement en plaque pouvant perturber les structures osseuses du voisinage. Quelques rares formes kystiques ont également été rapportées [81].

Leur taille dépend du moment du diagnostic. Les méningiomes situés à proximité d'un nerf crânien ne font en général que quelques millimètres de diamètre. En raison de leur localisation, ils sont rapidement symptomatiques et donc précocement diagnostiqués. Un méningiome frontal peut mesurer jusqu'à plusieurs centimètres de diamètre car il peut rester longtemps asymptomatique. Les signes cliniques dépendent donc de la localisation et sont les conséquences d'un effet de masse local.

Les méningiomes sont habituellement isolés et sporadiques. Les localisations multiples sont observées dans les formes familiales.

Les méningiomes intracrâniens sont ubiquitaires et peuvent se développer à partir de n'importe quelle structure sous arachnoïdienne. Chaque variété porte le nom de la structure anatomique la plus proche. Les méningiomes de la convexité hémisphérique sont les plus fréquents (35% des méningiomes intracrâniens), suivis des méningiomes de la base du crâne (30%), des méningiomes parasagittaux ou de la faux du cerveau (25%) et les plus rares sont les méningiomes intraventriculaires [82].

Les méningiomes extracrâniens sont moins fréquents. Ce sont des méningiomes du canal rachidien localisés dans 70% des cas au niveau thoracique, 25% des cas au niveau

cervical, 5% des cas au niveau lombaire et exceptionnellement dans la région lombo-sacrée. Ils touchent des femmes dans 90% de cas, âgées de plus 40 ans [83].

5. Aspects histologiques

Les méningiomes sont des tumeurs cérébrales extra-parenchymateuses qui dérivent de l'arachnoïde, l'un des trois feuillets constitutifs des méninges [84]. Ils se développent aux dépens des cellules formant les villosités arachnoïdiennes, qui s'invaginent en doigt de gant dans les veines et les sinus duraux [85].

La vascularisation des méningiomes est double, provenant des vaisseaux méningés et des artères corticales. Un œdème péri lésionnel est parfois observé, d'importance variable et provenant d'un phénomène de sécrétion active par les cellules tumorales. La présence d'un œdème aggrave la symptomatologie sans modifier le pronostic.

Les méningiomes sont des tumeurs capables de provoquer quel que soit leur grade une réaction osseuse en regard de leur base d'implantation. Cet épaississement de l'os peut aller parfois jusqu'à la formation d'un ostéome. Cet envahissement osseux peut être à l'origine de récurrences malgré une exérèse macroscopiquement complète du méningiome. Une calcification de ces tumeurs est aussi très souvent observée.

6. Aspects cliniques

Les manifestations cliniques incriminables aux méningiomes sont aspécifiques. Elles sont dues à la localisation de la tumeur, à sa taille et à son effet de masse local, c'est pourquoi ces signes sont les mêmes pour toutes les tumeurs intracrâniennes [81].

Les symptômes généralement observés sont :

- des crises d'épilepsie : symptôme le plus fréquemment rencontré dans le cadre du méningiome ;
- des céphalées diffuses ou localisées, qui s'aggravent régulièrement et sont rebelles aux antalgiques ;
- des douleurs de types névralgies faciales ;
- une hypertension intracrânienne ;

- des déficits neurologiques focaux plus ou moins rapidement progressifs, liés directement à la compression du parenchyme cérébral par la tumeur ;
- des troubles psychiatriques.

Certains méningiomes sont asymptomatiques et leur découverte est fortuite suite à un examen radiologique.

Des métastases ne sont observées que dans 1% des méningiomes de grade élevé le plus souvent, et de localisation pulmonaire préférentiellement [86].

7. Aspects génétiques

a) Mutations constitutionnelles dans les méningiomes

Il existe plusieurs syndromes de susceptibilité tumorale au sein desquels sont observés des méningiomes.

Le syndrome le plus fréquent est la neurofibromatose de type II avec une incidence de 1/33000 naissances. C'est une affection autosomique dominante liée à des mutations germinales inactivatrices du gène *NF2* situé sur le chromosome 22. Ce syndrome est associé à des atteintes neurologiques, cutanées et oculaires dont la sévérité est variable d'un patient à l'autre avec une pénétrance proche de 100% à 60 ans [87].

Des méningiomes ont également été décrits dans la maladie de Von Hippel Lindau, le syndrome de Li Fraumeni, le syndrome de Cowden, le syndrome de Gorlin et dans la Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1 respectivement dus à des mutations dans les gènes *VHL*, *TP53*, *PTEN*, *PTCH1* et *MEN1*.

b) Mutations somatiques dans les méningiomes

La perte totale ou partielle du chromosome 22 est la première anomalie décrite dans les méningiomes sporadiques en 1972 [88]. Cette monosomie est retrouvée dans 40 à 60% des méningiomes sporadiques et entraîne la perte du gène suppresseur de tumeur *NF2* situé en position 22q12.2. Elle est associée dans la majorité des cas à une mutation du gène *NF2* situé sur l'autre allèle. Une mutation de *NF2* est retrouvée dans 50% des méningiomes [89]. Le plus souvent il s'agit de mutations non-sens, de microdélétions ou insertions, ou de mutations au niveau d'un site d'épissage résultant en une protéine tronquée et non fonctionnelle.

L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a révolutionné la compréhension des fondements génétiques des méningiomes sporadiques et de nouvelles voies oncogénétiques alternatives à *NF2* ont émergé. Des études ont permis de mettre en évidence de nombreux gènes impliqués dans les méningiomes tels que : *AKT1*, *SMO*, *SMARCB1*, *TRAF7*, *KLF4*, *PIK3CA*, *TERT* et *POLR2A* [90]–[94].

Ces gènes sont impliqués dans diverses voies d'initiation tumorale. L'une d'entre elles implique les gènes *TRAF7*, *AKT1*, *PIK3CA* et *KLF4* :

- *TRAF7* : situé sur le chromosome 16, ce gène code pour la protéine E3 ubiquitin-protein ligase TRAF7 qui est une protéine pro-apoptotique [95] ;
- *AKT1* : situé sur le chromosome 14, ce gène code pour une sérine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) et appartient à la voie de signalisation PIK3-AKT-mTOR qui régule de nombreux processus biologiques, y compris la prolifération, la croissance, et l'apoptose des cellules [95] ;
- *PIK3CA* : situé sur le chromosome 3, ce gène code pour la sous unité catalytique de la phosphatidylinositol 3-kinase qui appartient également à la voie de signalisation PIK3-AKT-mTOR [96] ;
- *KLF4* : situé sur le chromosome 9, ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des facteurs de transcription Kruppel qui contrôle la transition G1-à-S du cycle cellulaire à la suite de l'endommagement de l'ADN par la médiation du gène suppresseur de tumeur *p53*.

Les mutations identifiées dans *TRAF7* sont soit isolées soit en association avec des mutations dans *KLF4* ou *AKT1*. *KLF4* présente toujours la même mutation dans les méningiomes (p.Lys409Gln) et est toujours associée à une mutation dans *TRAF7*. De même, *AKT1* porte toujours la même mutation dans les méningiomes (p.Glu17Lys) et est associée dans 50% des cas à une mutation dans *TRAF7*.

D'autres gènes impliqués chacun dans des voies d'initiation tumorale différentes ont été rapportés :

- *SMO* : situé sur le chromosome 7, ce gène code pour une protéine transmembranaire de type récepteur couplé aux protéines G qui appartient à la voie de signalisation Hedgehog et est impliquée dans plusieurs processus incluant la prolifération, la différenciation, l'angiogenèse et l'organisation de la matrice extracellulaire [95] ;

- *SMARCB1* : situé sur le chromosome 22, ce gène est un suppresseur de tumeur qui code pour une protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne, elle fait partie d'un complexe qui permet le relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription.
- *TERT* : situé sur le chromosome 5, ce gène code pour la télomérase, protéine qui maintient les extrémités des télomères par ajout de la répétition nucléotidique TTAGGG. Elle joue un rôle dans la sénescence cellulaire. Elle est normalement réprimée dans les cellules somatiques postnatales entraînant un raccourcissement progressif des télomères. La dérégulation de l'expression de la télomérase dans les cellules somatiques peut être impliquée dans l'oncogenèse pour l'immortalisation des cellules [97].
- *POLR2A* : situé sur le chromosome 17, ce gène code pour la plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II, responsable de la synthèse de l'ARN messager chez les eucaryotes [94].

c) Corrélations génotype-phénotype

Les corrélations génotype-phénotype concernent principalement la localisation et le sous-type histologique des méningiomes mais également le pronostic.

En effet, le génotype *NF2* semble prédominer au niveau de la convexité et au niveau postérieur de la base du crâne et semble associé à une histologie de type fibroblastique ou transitionnel. Le génotype *PIK3CA* est retrouvé préférentiellement au niveau de la base du crâne et est associé à une histologie de type méningothélial ou transitionnel. Les génotypes *TRAF7*, *AKT1* et *SMO* sont quant à eux retrouvés généralement au niveau de la partie antérieure de la base du crâne ou de la partie antérieure de la convexité et semblent plutôt associés au type méningothélial ou sécrétant en cas de tumeur ayant deux mutations associées dans *TRAF7* et *KLF4* [98], [99].

Concernant le pronostic, certaines études montrent qu'un grade tumoral élevé est préférentiellement associé à un génotype complexe. Dans une étude, 75% des méningiomes de grade II présentaient une mutation dans *NF2* et une instabilité chromosomique [94].

Une autre a montré que les méningiomes mutés *SMO* présentaient un taux de récurrence plus élevé [100]. Enfin, les méningiomes mutés dans *AKT1* présenteraient un temps de survie sans récurrence réduit [101].

La détermination du génotype tumoral pourrait permettre de proposer un traitement pharmacologique ciblé par inhibition des voies oncogéniques mises en cause ou d'appréhender

l'agressivité tumorale et proposer d'emblée une radiothérapie adjuvante à l'exérèse chirurgicale. Cela pourrait également permettre d'adapter la durée et la fréquence du suivi. Actuellement des drogues agissant comme inhibiteurs des voies AKT, SMO ou PIK3 sont en développement.

8. Diagnostic

a) Imagerie

L'indication de l'imagerie cérébrale fait suite à l'apparition de symptômes tels qu'un déficit neurologique ou une crise comitiale. Les méningiomes apparaissent classiquement comme des tumeurs rondes, isolées, ayant un contact étroit avec la dure-mère et un renforcement après injection de produit de contraste. Aucun signe radiologique n'est pathognomonique du grade tumoral. Le diagnostic n'est affirmé qu'après examen histologique d'une biopsie issue de l'exérèse de la lésion [102].

L'IRM est la technique d'imagerie recommandée car elle permet de localiser le processus expansif, de préciser les caractéristiques de la tumeur, de diagnostiquer certaines complications évolutives et de définir la suite de la stratégie diagnostique. Le scanner est utilisé pour une analyse plus fine des atteintes osseuses et des éventuelles calcifications intratumorales. La scintigraphie à l'octréotide radiomarqué est une technique non invasive, très sensible et spécifique dans le diagnostic des méningiomes. Elle est utilisée en cas de doute diagnostique et peut aider au guidage biologique per-opératoire lors de la résection tumorale.

b) Marqueurs biologiques

Il n'existe pas de marqueur biologique spécifique des méningiomes mais certains marqueurs comme l'anticorps anti-EMA (Antigène Epithélial Membranaire), l'ACE (antigène Carcino-Embryonnaire) ou la phosphatase alcaline sont des outils qui aident à la détermination du grade tumoral et du sous-type histologique et sont utilisés en complément des techniques de coloration habituelle par les anatomo-pathologistes.

En pratique, le seul marqueur utilisé en complément du grade pour apprécier l'agressivité de la tumeur est le pourcentage de Ki-67. Il s'agit d'un antigène nucléaire exprimé lors des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire mais absent en G0. Il permet donc d'estimer

le taux de cellules en prolifération. Les cellules dont le noyau est marqué positivement par les anticorps anti-Ki-67 sont comptées par technique immunohistochimique ce qui permet d'établir le pourcentage de cellules tumorales. Des taux élevés de Ki-67% sont corrélés à un grade tumoral élevé, à une extension plus importante et à une récurrence accrue [103].

9. Traitement

Actuellement la prise en charge thérapeutique du patient comprend trois volets : la surveillance, la chirurgie et la radiothérapie seule ou en adjuvant après la chirurgie. Le traitement est dépendant de plusieurs critères, il doit être planifié au cas par cas après concertation pluridisciplinaire. L'âge, l'état général du patient, la localisation et la taille de la tumeur, le retentissement clinique sont à prendre en compte. A ce jour la chirurgie reste l'option de choix dès que cela est possible. Il n'existe pas actuellement de chimiothérapie efficace dans le traitement des méningiomes.

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

- En cas de méningiome asymptomatique : abstention thérapeutique avec simple surveillance ;
- En cas de méningiome symptomatique : chirurgie quel que soit le grade tumoral, quand celle-ci est possible (en fonction de l'état général du patient et de la localisation de la tumeur). Cette chirurgie peut être associée à une radiothérapie en fonction du grade tumoral et du degré de résection de la tumeur ;
- En cas de méningiome symptomatique lorsque la chirurgie n'est pas envisageable : radiochirurgie ou radiothérapie ;
- En cas de méningiome symptomatique si aucune option chirurgicale ou radio thérapeutique n'est possible : traitement pharmacologique expérimental envisageable [98], [104].

Partie 2 : Tumeurs intracérébrales dans la NEM1

I. Objectifs

Les méningiomes dans la NEM1 ainsi que la perte d'hétérozygotie du gène *MEN1* au sein de ces tumeurs ont été très peu étudiés. A ce jour, une seule étude apporte des arguments sur le fait que le méningiome est une tumeur spécifique de la NEM1. Cette étude s'est portée sur 74 patients porteurs d'une mutation germinale de *MEN1*, qui ont bénéficié d'une recherche de méningiome systématique à l'IRM. Au sein de cette cohorte, six patients développaient un méningiome [5]. Une recherche de LOH a pu être effectuée chez l'un d'eux porteur d'un méningiome méningothélial, et s'est révélée positive. Selon l'hypothèse de Knudson, cette perte d'hétérozygotie pourrait constituer le second événement somatique initiant la néoplasie. Concernant les épendymomes, quelques cas ont été rapportés chez des patients atteints de NEM1 mais aucune analyse du gène *MEN1* à la recherche d'une éventuelle perte d'hétérozygotie au niveau somatique n'avait été effectuée.

Dans ce contexte, nous nous sommes posé la question de l'implication de *MEN1* dans la tumorigenèse de ces deux types de tumeurs intracérébrales. Pour cela, notre travail s'est décomposé en deux parties.

Dans un premier temps nous allons étudier une cohorte de 6 patients porteurs d'une mutation germinale du gène *MEN1* et ayant développé une tumeur intracérébrale. Au sein de ces tumeurs, nous allons analyser le statut moléculaire du gène *MEN1* à la recherche d'un second événement somatique tel qu'une perte d'hétérozygotie du gène ou une deuxième mutation ponctuelle. Une autre anomalie moléculaire de la tumorigenèse des méningiomes méningothéliaux sera explorée au niveau somatique par séquençage NGS d'un panel de gènes et PCR quantitative.

Dans un second temps, nous allons rechercher une anomalie du gène *MEN1* par séquençage Sanger et MLPA dans 21 méningiomes méningothéliaux sporadiques, également préalablement caractérisés sur le plan moléculaire par un panel de gènes impliqués dans les méningiomes.

II. Matériels et méthodes

1. Matériel

a) Patients

La première partie de notre étude s'est portée sur une cohorte de 6 patients issus de la base NEM1 du Professeur Pierre GOUDET du Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines (GTE). La base NEM1 est une base de données cliniques française recensant de façon longitudinale les données de suivi cliniques des patients diagnostiqués comme NEM1 depuis plus 30 ans. Fin 2019 cette base recensait 1369 patients symptomatiques. Parmi ces patients, 27 ont présenté une tumeur intracérébrale (2%), dont 12 méningiomes (0,9%), 6 épendymomes (0,4%), 5 tumeurs astrocytaires ou oligodendrocytaires (0,4%), 4 schwannomes dont 2 de localisation vestibulaire (0,3%). Les centres de compétence où sont suivis ces patients, ont été sollicités afin que du matériel tumoral soit récupéré pour notre étude. Nous avons ainsi pu obtenir des lames de fragments tumoraux inclus en paraffine (FFPE) de 6 patients (2 avec méningiomes et 4 avec épendymomes). Ces 6 patients font partie d'une cohorte que nous appellerons cohorte n°1.

La deuxième partie de notre étude s'est portée sur 21 patients atteints de méningiomes méningothéliaux sporadiques, issus d'une cohorte marseillaise de 83 patients atteints de méningiomes de tous types. Pour notre étude, nous nous sommes uniquement intéressés aux méningiomes méningothéliaux car un lien spécifique entre *MEN1* et ce type de tumeur était fortement suspecté. Les patients ont été hospitalisés en raison de leur méningiome et opérés dans le Service de Neurochirurgie du Professeur Henry DUFOUR au CHU La Timone à Marseille entre octobre 2010 et février 2017. Ces 21 patients constituent la cohorte n°2.

Les deux parties de cette étude ont été menées de façon rétrospective.

b) Recueil des données

Pour la cohorte n°1, nous avons disposé des données cliniques de la base NEM1 et de certaines données histologiques telles que le type et le sous-type de tumeur, le pourcentage de cellules tumorales dans chaque tumeur et pour certaines le nombre de mitoses et le pourcentage de Ki-67. Nous disposons également de la mutation du gène *MEN1* identifiée au niveau constitutionnel et responsable de la pathologie.

Pour la cohorte n°2, les données cliniques ont été extraites des travaux de thèse de Noémie BASSET et Florent DARRIET, menés sur la cohorte initiale de 83 patients atteints de méningiomes. Ces données ont été obtenues via le serveur Axigate de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, sur lequel sont accessibles les dossiers médicaux des patients. Les paramètres suivants ont été recueillis :

- Sexe et âge au diagnostic
- Localisation cérébrale
- Grade OMS
- Valeur du Ki-67%
- Nombre de mitoses par champ
- Atypies cellulaires
- Présence ou non de nécrose
- Présence ou non d'un envahissement du parenchyme cérébral
- Présence ou non d'un oedème
- Récidive et localisations multiples

c) Tissus

Pour la cohorte n°1, 5 blocs de tumeurs et un fragment nous ont été transmis par le Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines. Des coupes fines de ces blocs tumoraux ont été réalisées et fixées en paraffine sur lames FFPE (Formaldehyde fixed and paraffin embedded) au laboratoire d'anatomo-pathologie du Professeur Dominique FIGARELLA-BRANGER (CHU Timone). Six lames ont été réalisées pour chaque bloc dont une colorée afin de délimiter la zone tumorale. L'ADN du fragment d'épendymome a quant à lui été extrait directement, la pièce étant trop petite pour en faire des lames FFPE.

Concernant la cohorte n°2, nous disposons de morceaux de tumeurs fraîches congelés à -80°C.

2. Méthodes

a) Préparation des échantillons d'ADN

i. *Extraction d'ADN :*

L'extraction d'ADN à partir des lames FFPE est une technique manuelle qui consiste en une première étape de déparaffination des lames grâce à la Deparaffinization Solution de QIAgen. L'extraction à proprement dite est ensuite réalisée grâce au kit d'extraction manuelle QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Afin de limiter la contamination par du tissu sain, nous nous sommes rapportés à la lame colorée pour ne sélectionner que la zone tumorale sur les lames.

L'extraction d'ADN à partir du matériel tumoral frais congelé est également une technique manuelle réalisée grâce au kit d'extraction QIAamp DNA kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur.

Les échantillons d'ADN obtenus sont conservés à +4°C avant leur utilisation puis stockés à -80°C.

ii. *Quantification et qualification de l'ADN :*

La quantité d'ADN extrait à partir des lames FFPE est évaluée par mesure de la densité optique au spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) à une longueur d'onde de 260 nm. La qualité de l'extraction est évaluée par les rapports d'absorbance à 260 nm sur 230 nm et à 260 nm sur 280 nm. Le rapport 260/230 évalue la contamination par les hydrates de carbones et les phénols, mais également l'EDTA et doit être compris entre 2 et 2,2. Le rapport 260/280 évalue la contamination protéique, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2.

La quantité d'ADN extrait à partir des tumeurs congelées est évaluée par fluorimétrie sur le Qubit à l'aide du Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). La qualité de l'extraction est évaluée à l'aide d'une plateforme microfluidique (2100 Bioanalyzer de Agilent Technologies) avec le kit Agilent DNA 1000.

b) Amplification et séquençage ciblé du gène *MEN1* par technique Sanger

Nous recherchons, au sein de l'ADN tumoral des 6 patients de la cohorte n°1, un second événement somatique dans *MEN1*, de type LOH ou mutation ponctuelle, par PCR suivie d'un séquençage par technique Sanger.

Une recherche d'anomalie moléculaire dans le gène *MEN1* est également réalisée par cette méthode dans l'ADN des méningiomes sporadiques des 21 patients de la cohorte n°2.

i. Principe général de l'amplification par PCR

La Polymerase Chain Reaction (PCR) ou Amplification en Chaîne par Polymérase est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par Kary Mullis, qui obtint pour ses travaux le prix Nobel de Chimie en 1993. Cette technique d'amplification d'ADN *in vitro* permet d'amplifier une séquence ciblée d'ADN afin d'en obtenir une quantité suffisante pour la détecter et l'étudier.

Une série de 3 étapes permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant. L'amplification est donc exponentielle, elle permet d'obtenir 2^n copies de la séquence ciblée d'ADN avec n le nombre de cycles de PCR. Les trois étapes de chaque cycle sont les suivantes :

- Etape 1 : dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C pour séparer les deux brins qui le composent ;
- Etape 2 : hybridation des amorces encadrant la séquence ciblée par diminution de la température entre 40 et 65°C ;
- Etape 3 : élongation des brins d'ADN grâce à l'action d'une ADN polymérase (Taq polymérase) par hausse de la température à 72°C (température optimale d'action de la Taq polymérase).

Ces trois étapes sont effectuées à des températures différentes afin de contrôler l'activité enzymatique. Pour effectuer ces transitions de températures, les microtubes contenant le mélange réactionnel sont placés dans un appareil programmable, un thermocycleur. Cet appareil présente un bloc chauffant qui permet d'exposer les tubes qui contiennent le mélange réactionnel à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur [105], [106].

Le risque principal de cette technique d'amplification est la contamination au cours de l'expérience par l'introduction involontaire d'ADN (ou d'amplicons) dans le tube de réaction lors de son ouverture. Il est donc nécessaire de réaliser les manipulations de pré-PCR et post-PCR dans des pièces séparées, soit de respecter la « marche en avant ».

ii. Choix des amorces de PCR

Contraintes à respecter lors du choix des amorces :

- Taille relativement courte : entre 17 et 24 nucléotides en moyenne ;
- Ne contenant pas de structure secondaire interne (épingle à cheveux) ;
- Contenant à 40 à 60% de GC ;
- Ne pas avoir d'extrémité 3' complémentaires (sinon formation de dimères d'amorces et amplification inefficace) ;
- Avoir un T_m (température d'hybridation des amorces) de 55-65°C, idéalement >60°C.

Etapes du « design » des amorces :

- Récupérer la séquence d'intérêt sur un site en ligne de données de séquences génomiques (ex : UCSC) en tenant compte du transcrit du gène utilisé de manière consensuelle par les sociétés savantes.
- Repérer l'exon d'intérêt et les séquences introniques flanquantes avant de les copier et coller dans un logiciel d'aide au design (ex : Primer Blast).
- Choisir le couple d'amorces en fonction de la taille de l'amplicon produit (entre 300 et 600 paires de bases), de l'absence de structures secondaires aux températures atteintes lors des étapes de PCR, de l'alignement à la séquence de référence d'intérêt et l'absence de polymorphisme fréquent sur les amorces (ex : SNPcheck).

Chaque amorce de PCR spécifique est associée à une séquence universelle M13 :

- M13 Forward (F) : TGT AAA ACG ACG GCC AGT
- M13 Reverse (R) : CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Les amorces M13 permettent d'utiliser toujours la même amorce de séquençage sens ou anti-sens, quelque soit le gène au moment de la réaction de séquence.

Les séquences des couples d'amorces utilisées pour l'amplification des 9 exons codants de MEN1 sont renseignées dans le tableau 3 (séquences universelles M13 en bleu).

Exon	Amplicon	Taille amplicon (pb)	Séquence 5'-3'	Nom du Primer	Nombre de bases
exon 2	2	675	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTA GCG GAC CCT GGG AGG AG	M-MEN1-2F	38
	2.1	387	CAG GAA ACA GCT ATG ACC GGC GGC GAT GAT AGA CAG GTC	M-MEN1-2.1R	39
	2.2	362	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CTG GCG GCC TCA CCT ACT TTC	M-MEN1-2.2F	39
	2		CAG GAA ACA GCT ATG ACC CGA ACC TCA CAA GGC TTA CAG TTC T	M-MEN1-2R	43
exon 3	3	326	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GCA CAG AGG ACC CTC TTT CAT TAC	M-MEN1-3F	42
	3		CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCC CAA GAA AAT GGA GTC CC	M-MEN1-3R	38
exon 4	4	356	TGT AAA ACG ACG GCC AGT AGC CTT GTC CCC TTC ATA CTG TAG T	M-MEN1-4F	43
	4		CAG GAA ACA GCT ATG ACC TCC CAC AGC AAG TCA AGT CTG G	M-MEN1-4R	40
exon 5	5	378	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT CCC TGT TGG TTC TGA CC	M-MEN1-5F	38
exon 6	6		CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTC AGC CAC TGT TAG GGT CTC C	M-MEN1-6R	40
exon 7	7	286	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGC TGC CTC CCT GAG GAT C	M-MEN1-7F	37
	7		CAG GAA ACA GCT ATG ACC CTG GAC GAG GGT GGT TGG	M-MEN1-7R	36
exon 8	8	308	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTG AGA CCC CTT CAG ACC CTA C	M-MEN1-8F	40
	8		CAG GAA ACA GCT ATG ACC CCC TAA TCC CGT ACA TGC AG	M-MEN1-8R	38
exon 9	9	362	TGT AAA ACG ACG GCC AGT CCC AAC CTA TGC TTA CCT TTT CTG	M-MEN1-9F	42
	9		CAG GAA ACA GCT ATG ACC TGT CAC CAC CTG TAG TGC CCA GAC C	M-MEN1-9R	43
exon 10	10.1	562	TGT AAA ACG ACG GCC AGT GGT CTG GGC ACT ACA GGT GGT GAC	M-MEN1-10.1F	42
	10.1		CAG GAA ACA GCT ATG ACC GCC CTT CAT CTT CTC ACT CTG G	M-MEN1-10.1R	40
	10.2	344	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TGC CAG CAC CCG CAG CAT C	M-MEN1-10.2F	37
	10.2		CAG GAA ACA GCT ATG ACC TTG GGC TGG GGG CAG AAC	M-MEN1-10.2R	36

Tableau 3 : Caractéristiques des amorces utilisées pour le séquençage Sanger des 9 exons codants du gène *MEN1*.

iii. Choix des conditions de PCR

Le design des amorces et leurs conditions d'amplification sont validés si les critères suivants sont remplis :

- la taille de la bande obtenue après amplification correspond à la taille théorique ;
- présence d'une seule bande sur le gel (absence de produit secondaire non spécifique) ;
- la séquence d'ADN obtenue par Sanger s'aligne sur la séquence de référence.

Deux conditions différentes de PCR sont utilisées selon les amplicons amplifiés et sont décrites dans le tableau 4 :

- conditions « bleues » pour les amplicons 3, 4, 7, 8, 9, 10.2 ;
- conditions « rouges » pour les amplicons 2, 2.1, 2.2, 5.6, 10.1.

Réactifs	Conditions « bleues » (sans adjuvant)	Conditions « rouges » (avec adjuvant)
H ₂ O (qsp 25 µL)	9,5 µL	7 µL
Master Mix (2X)	12,5 µL	12,5 µL
BSA (2mg/mL)	0,5 µL	0,5 µL
Adjuvant 5X (GC enrichment)	/	2,5 µL
Amorce F + Amorce R (25µM chacune)	0,5 µL	0,5 µL
ADN	2 µL	2 µL
Programme de PCR (Thermocycleur AB2720)	TD66-20C	TD62-26C

Tableau 4 : Conditions de PCR utilisées pour l'amplification de *MEN1*.

iv. Vérification des produits de PCR

La vérification des produits se fait par dépôt sur gel d'agarose à 2% (2g d'Agarose dissout dans 100ml de Tampon TAE 0.5X) avec un marqueur de taille et de poids moléculaire. Les critères suivants sont vérifiés :

- les produits obtenus font la taille attendue et sont uniques (absence de bandes aspécifiques) ;
- les produits ont une intensité correcte (quantité) ;

- faible quantité de dimères d'amorces en front de migration ;
- absence de bande d'amplification dans le témoin négatif de PCR ;
- bonne intensité et séparation des diverses bandes qui composent le marqueur de taille.

La révélation se fait à l'aide d'un intercalant génétique fluorescent aux UV (SybrSAFE) introduit dans le gel. Une image du gel est sauvegardée et jointe avec la fiche de travail.

v. *Purification des produits de PCR*

La purification des produits de PCR est un traitement nécessaire à la poursuite des analyses. C'est une méthode basée sur l'action simultanée de deux enzymes. L'exonucléase I élimine l'excédent d'amorces et la phosphatase alcaline élimine l'excédent de dNTP. Le réactif Exosap contient ces deux enzymes. La réaction se fait sur un thermocycleur modèle AB2720 avec un programme dédié. Les enzymes ont une action simultanée à 37°C et sont inactivées à 80°C. Cette méthode permet de purifier des produits de PCR de 100pb jusqu'à 20kb, sans perte d'échantillon (rendement de 100%). Les produits de PCR purifiés sont directement utilisables pour la réaction de séquence.

vi. *Réaction de séquence par technique Sanger*

Frederick Sanger a obtenu le prix Nobel de Chimie en 1980 pour sa méthode éponyme qu'il a mis au point en 1977. La réaction de séquence repose sur la méthode Sanger. Elle consiste en une nouvelle amplification des produits de PCR purifiés. Elle se fait sur l'un des deux brins de la PCR grâce à l'introduction d'une seule amorce universelle M13. La matrice (PCR purifiées préalablement obtenues) doit être présente en grande quantité, d'où la nécessité de la première étape d'amplification par PCR. Elle est ajoutée à un mélange réactionnel comprenant une ADN polymérase ADN dépendante (Taq polymérase), une amorce s'hybridant en 5' du fragment à séquencer, un tampon et un mélange de désoxynucléotides (dNTP) et ddNTP ; l'incorporation aléatoire d'un ddNTP stoppe la réaction d'élongation, il est dit « terminateur de chaîne ». La synthèse d'ADN se fait de façon complémentaire à la matrice initiale. Ainsi, à chaque position de A sur le brin matrice, un dTTP ou ddTTP fluorescent sera incorporé. Comme la réaction de séquençage est réalisée à partir d'un très grand nombre de copies de la matrice dans un milieu réactionnel où le rapport

spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de l'ADN polymérase pour chacun d'eux sont optimisés, l'incorporation aléatoire de ddNTP conduit à leur incorporation à toutes les positions possibles sur le fragment d'ADN. Le thermocycleur AB2720 est de nouveau utilisé pour la réaction de séquence.

vii. Purification de la réaction de séquence

La purification des produits de séquence est un traitement nécessaire avant la migration dans les capillaires du séquenceur pour obtenir un électrophorégramme correct. Ce traitement permet d'éliminer l'excédent d'amorces (oligonucléotides), de dNTP et ddNTP (bruit de fond, contamination). La méthode utilisée est une méthode par gel filtration au travers d'une résine Séphadex G-50. Cette résine se présente sous la forme d'une poudre à régénérer (Séphadex™G-50 Superfine (#263 387), fournisseur Applied Biosystems) disposée dans une plaque 96 puits MultiScreen®-HV (0,45µm Hydrophilic Low Protein Binding Durapore® Membrane, fournisseur Millipore) et mélangée à de l'eau distillée.

viii. Séquençage

Les fragments néosynthétisés purifiés sont ensuite séparés après migration électrophorétique sur un gel très résolutif de polyacrylamide qui va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire (taille). Les plus petits fragments vont migrer plus rapidement que les grands. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base.

Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent dont le spectre d'émission est spécifique. Un faisceau laser en regard des capillaires excite le fluorochrome des ddNTP. Après capture par une caméra CCD, un électrophorégramme est obtenu après analyse des données brutes (raw data) par un logiciel d'analyse (correction du bruit de fond, reconnaissance des bases, calcul du QV= Quality Value). Cette analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. C'est l'analyse primaire ou « Base calling », réalisée par le logiciel 3500 Dx Series (Data Collection Software).

Le séquençage est réalisé sur l'automate « 3500xl DX Genetic Analyzer » (Applied Biosystems). Les caractéristiques principales de l'automate sont les suivantes :

- 24 capillaires de 36 cm de long
- Polymère : POP7
- 1 run = 1h, 1 plaque = 4 runs
- Auto-sampler pouvant accueillir 2 plaques de 96 échantillons
- Ensemble des réactifs et tampons IVD et gérés par l'automate (CEIVD)
- 1 enceinte close

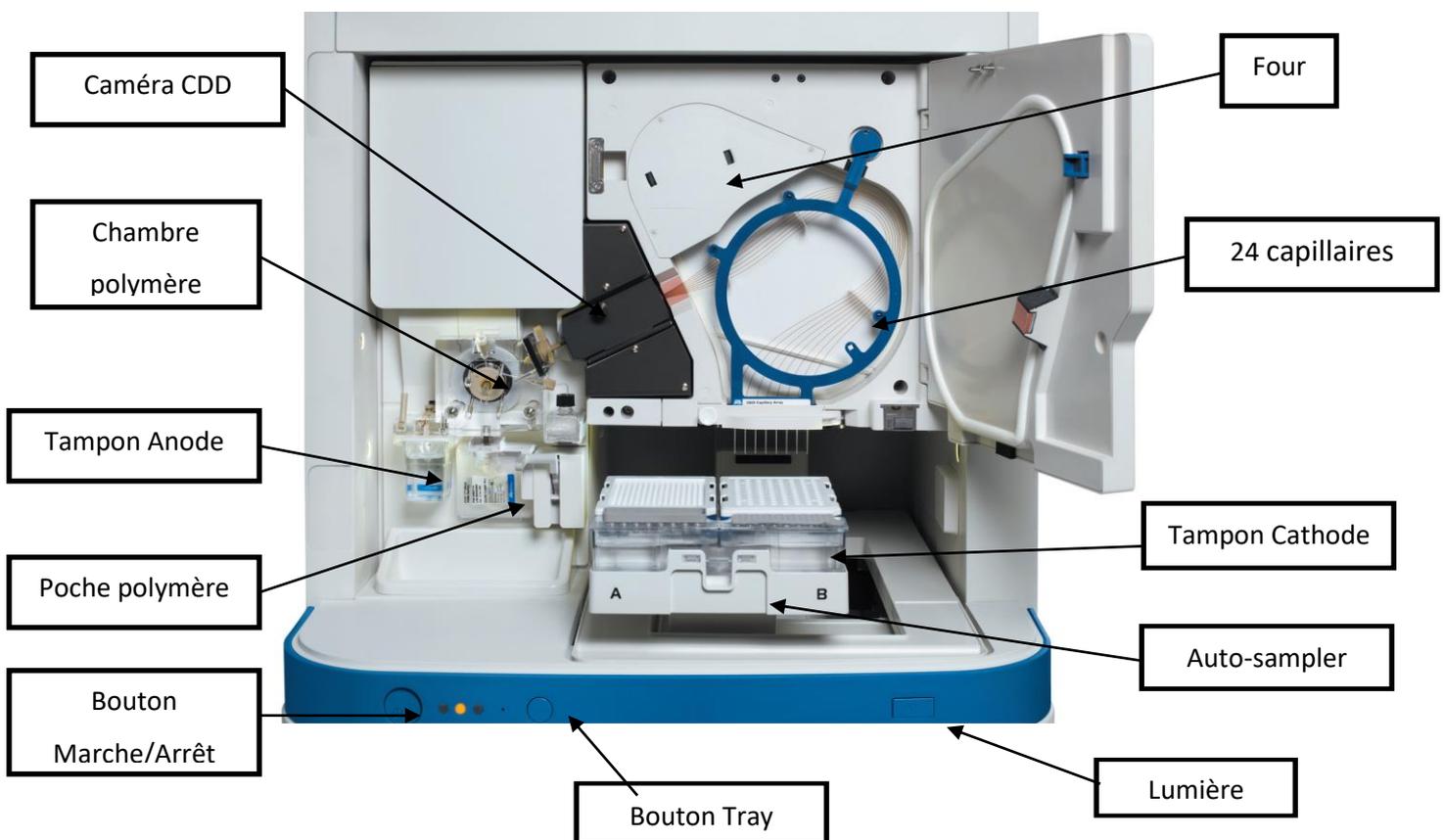


Figure 2 : Séquenceur 3500xl DX Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

ix. *Export et analyse des données du séquençage*

L'électrophorégramme du patient est comparé à une séquence de référence de manière à identifier, par le changement du profil, une variation à l'état homozygote ou hétérozygote (selon le mode de transmission de la maladie considérée).

On parle d'analyse secondaire qui se fait sur le logiciel dédié « Variant Reporter ». Cette analyse permet d'identifier les variations alléliques des différentes bases qui composent la séquence par alignement de celle-ci avec la séquence de référence avec une indication des QV (Quality Value : confiance à la base identifiée).

Dans notre étude, une perte d'hétérozygotie a été recherchée chez les patients de la cohorte n°1, par séquençage Sanger ciblé de l'exon porteur de la mutation germinale. La présence du seul allèle muté, soit la mutation germinale hétérozygote apparaissant à l'état faussement homozygote dans la tumeur, confirmerait la perte de l'allèle sain.

En cas de non mise en évidence d'une LOH chez les patients de la cohorte n°1 et pour tous les patients de la cohorte n°2, le séquençage de tous les exons de *MEN1* a été réalisé par séquençage Sanger à la recherche d'un événement mutationnel (second événement pour les patients de la cohorte n°1).

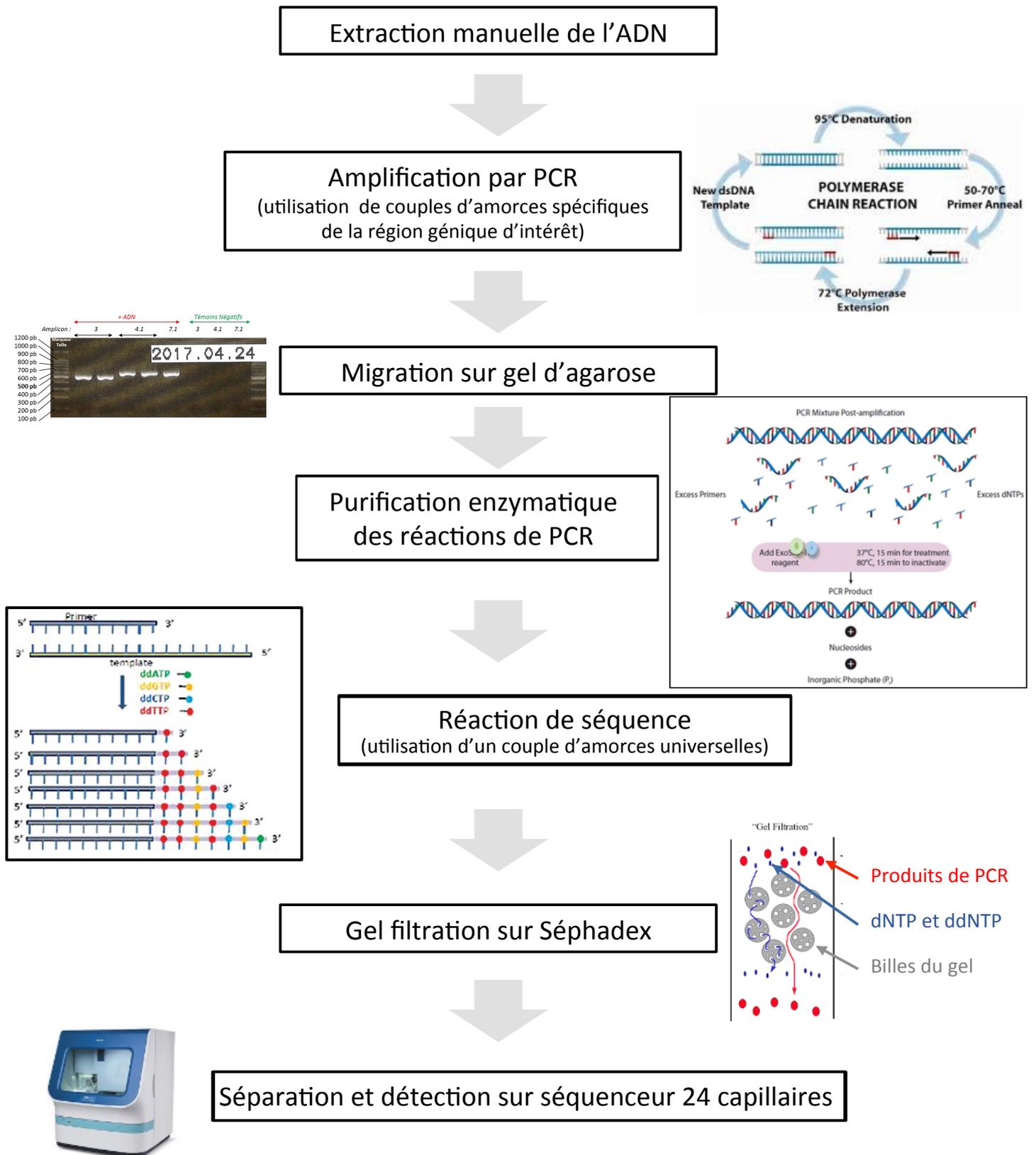


Figure 3 : Principe du séquençage Sanger

c) Etude du nombre de copies du gène *MEN1* dans les méningiomes méningothéliaux sporadiques (cohorte n°2) par technique MLPA (Multiple Ligation dependant Probe Amplification)

Le nombre de copies du gène *MEN1* a été étudié dans les 21 méningiomes méningothéliaux sporadiques constituant la cohorte n°2 par technique MLPA (Multiple Ligation dependant Probe Amplification).

i. Principe général de la technique

La MLPA permet de rechercher des variations du nombre de copies de différentes séquences géniques par une réaction unique de PCR multiplex. Cette méthode a été décrite pour la première fois en 2002 par Schouten et al. et est actuellement brevetée par la société MRC HollandTM. C'est une technique de quantification dite « relative » puisqu'elle se fait par comparaison à des témoins négatifs issus d'échantillons de même nature. Le principe général est fondé sur l'hybridation à une séquence cible spécifique de deux oligonucléotides adjacents (ou demi-sondes) formant une sonde unique après ligation. Chacune de ces demi-sondes est constituée :

- d'un oligonucléotide court composé d'une séquence d'hybridation spécifique de la séquence cible à son extrémité 3' et d'une séquence d'hybridation commune de l'amorce sens universelle couplé à un fluorophore à son extrémité 5'
- d'un oligonucléotide long composé d'une séquence d'hybridation spécifique de la séquence cible à son extrémité 5', d'une séquence non spécifique de taille variable et unique pour chaque sonde dite « stuffer » (permet de différencier les amplicons en fonction de leur taille) et d'une séquence d'hybridation commune de l'amorce anti-sens universelle à son extrémité 3'

Le principe fondamental de la technologie MLPA repose sur le fait que ce ne sont pas les échantillons d'ADN qui sont amplifiés au cours de la PCR mais les différentes sondes qui se sont hybridées de manière spécifique à l'ADN. Lors de l'électrophorèse dans un séquenceur à capillaires, la présence d'un « stuffer » de taille différente dans chaque sonde permet de séparer les amplicons en fonction de leur taille et la présence du fluorophore permet de les détecter et de les quantifier.

ii. *Kit utilisé*

Nous avons utilisé le kit de sondes spécifiques « SALSALSA-MLPA probemix *AIP.MENI.CDKN1B* p244 » ciblant les gènes *AIP* et *MENI* situés sur le chromosome 11 et le gène *CDKN1B* situé sur le chromosome 12 ainsi que le kit « SALSALSA-MLPA EK1 FAM* Reagents kit » contenant l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction de MLPA.

Ce kit contient au total 45 sondes dont 27 sondes ciblant de manière spécifique les 3 gènes, 10 sondes réparties sur tout le génome dites « références » servant d'étalons internes et 8 sondes dites « contrôles » servant de contrôles qualité internes et permettant de valider les résultats (tableaux 5 et 6).

Nom du fragment	Taille (nucléotides)	Interprétation
Benchmark	92	Sonde de référence utilisée pour comparer les autres fragments contrôles
Q-fragments (« Quantity »)	64, 70, 76	Sonde ne nécessitant ni hybridation sur l'ADN ni de ligation pour être amplifiées. Ces fragments sont présents en très petite quantité par rapport aux sondes spécifiques du kit
D-fragments (« Denaturation »)	88, 96	Sondes qui s'hybrident sur une séquence génique riche en îlots CpG (régions chromosomiques riches en GC donc difficiles à dénaturer due à la présence de 3 liaisons hydrogènes). Une faible intensité de ces fragments signifie une dénaturation incomplète
Fragments X et Y	100, 105	Sondes s'hybridant sur une séquence spécifique des chromosomes sexuels. Elles permettent de repérer une inversion d'échantillon et de vérifier le sexe du patient.

Tableau 5 : Nom, taille et rôle des sondes dites "contrôles internes"

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.
247	MEN1-10	11q13.1	11-064,328444
154	MEN1-9	11q13.1	11-064,329133
436	MEN1-8	11q13.1	11-064,329728
301	MEN1-7	11q13.1	11-064,330321
195	MEN1-6	11q13.1	11-064,331020
202	MEN1-5	11q13.1	11-064,331208
167	MEN1-4	11q13.1	11-064,331646
283	MEN1-3	11q13.1	11-064,331999
220	MEN1-2b	11q13.1	11-064,333971
191	MEN1-1	11q13.1	11-064,334695
400	MEN1-Up	11q13.1	11-064,335058
328	SNX15-1	11q13.1	11-064,551590
355	FAM89B-2	11q13.1	11-065,097462
229	RELA-4	11q13.1	11-065,185750
382	SART1-10	11q13.1	11-065,491325
160	BRMS1-2	11q13.2	11-065,866203
292	AIP-1	11q13.2	11-067,007156
175	AIP-1	11q13.2	11-067,007232
238	AIP-2	11q13.2	11-067,011119
364	AIP-3	11q13.2	11-067,013399
209	AIP-4	11q13.2	11-067,014135
266	AIP-5	11q13.2	11-067,014401
319	AIP-6	11q13.2	11-067,014890
310	CCND1-4	11q13.3	11-069,171944
391	CDKN1B-1	12p13.1	12-012,762011
148	CDKN1B-2	12p13.1	12-012,763072
427	CDKN1B-3	12p13.1	12-012,765324
346	Reference*	01p22.1	01-094,298692
417	Reference*	03q13.2	03-113,700933
409	Reference*	06p12.2	06-051,932696
445	Reference*	08q13.3	08-071,130073
274	Reference*	09q22.32	09-097,278894
184	Reference*	12q24.22	12-116,148894
373	Reference*	15q21.1	15-046,576792
257	Reference*	17q21.2	17-035,822653
136	Reference*	18q21.1	18-045,817181
337	Reference*	22q13.2	22-039,895472

Tableau 6 : Listing des tailles (en nombre de nucléotides) et des positions chromosomiques et génomiques des 37 sondes contenues dans le kit de MLPA utilisé (les sondes « contrôles » ne sont pas mentionnées)

iii. Déroulement de l'analyse

❖ Les étapes de la réaction de MLPA

Il s'agit de 4 étapes successives réalisées dans un thermocycleur selon les recommandations données par le fournisseur :

① Dénaturation de l'ADN pendant 5 min à 98°C dans un thermocycleur

② Hybridation des sondes : lorsque la température est à 25°C, 1,5µL de MLPA Buffer (tampon d'hybridation) et 1,5µL de Probemix (ensemble des demi-sondes du kit) sont introduits dans chaque tube. La réaction d'hybridation se déroule sur la nuit (durant 16 à 20h) à 60°C afin qu'elle soit optimale pour l'ensemble des demi-sondes.

③ Ligation des sondes : le mélange réactionnel de ligation comprend pour chaque tube 3µL de Ligase Buffer A, 3µL de Ligase Buffer B (tampons de ligation), 25µL d'eau ultra-pure et 1µL de Ligase-65 (enzyme). Le programme est ensuite lancé pendant 15 minutes à 54°C, puis 5 minutes à 98°C afin d'inactiver l'enzyme.

④ Amplification par PCR : lorsque la température du thermocycleur est à 20°C, l'amplification des sondes est démarrée après ajout du mélange réactionnel de PCR contenant pour chaque tube 2µL de SALSA PCR primer mix (couple universel d'amorces de PCR), 7,5µL d'eau ultra pure et 0,5µL de SALSA polymérase (enzyme). 35 cycles de PCR sont réalisés pour l'amplification (dénaturation thermique à 95°C puis hybridation des amorces à 60°C puis élongation à 72°C) suivis d'un cycle d'élongation finale de 20min à 72°C.

❖ Séparation des produits de PCR obtenus par électrophorèse

Pour chaque échantillon, 0,7µL de produits de PCR obtenus par la réaction de MLPA sont mélangés à 9µL de HiDi Formamide (formamide déminéralisé pour remettre en suspension les échantillons) et 0,2µL de marqueur de taille GeneScan 600LIZ (Applied Biosystems®) dans une plaque 96 puits compatible avec le séquenceur utilisé. Après incubation dans un

thermocycleur pendant 3 minutes à 86°C, la plaque est placée immédiatement dans de la glace pendant 2 minutes. Elle sera ensuite stockée à 4°C jusqu'à ce qu'elle soit installée sur le séquenceur.

L'électrophorèse capillaire permet de séparer les produits de PCR obtenus à la fin de la réaction de MLPA. De la même manière que pour le séquençage Sanger, on utilise l'automate ABI 3500xl DxGenetic Analyzer (Applied Biosystems). A la différence du séquençage, il faut au préalable réaliser une calibration spectrale pour analyse de fragment sur l'automate. La longueur des capillaires utilisés est dépendante de l'activité réalisée (résolution et longueur de lecture souhaitée). Pour la MLPA, les capillaires utilisés font 50cm de long et doivent être les plus récents possibles. La poche de polymère POP7 ne doit pas être installée depuis plus de 48 heures sur l'instrument afin de prévenir tout problème lié à sa dégradation éventuelle. En effet, la qualité de la migration et donc de la séparation des fragments va grandement contribuer à la qualité des résultats.

Une différence de potentiel d'injection (1,6kV) est appliquée pendant 16 secondes ce qui permet aux fragments à analyser, chargés négativement, de migrer dans les capillaires.

iv. Analyse des données

Les données brutes sont analysées avec le logiciel Coffalyser.Net, commercialisé par la société MRC Holland™.

❖ Validation des électrophorégrammes

A la fin de l'électrophorèse, pour chaque patient est obtenu un électrophorégramme dont chaque pic correspond aux produits d'amplification d'une sonde distincte. Divers critères doivent être validés afin de garantir la qualité des résultats (migration correcte des échantillons sur l'appareil, profil global des pics de l'électrophorégramme, contrôle de qualité internes validés).

❖ Normalisation des résultats

La normalisation des intensités des signaux observés pour les échantillons patients se fait à la fois par rapport aux sondes de référence servant « d'étalon interne » (on parle d'intra-normalisation) et à la fois par rapport aux échantillons d'ADN de même nature servant de contrôles négatifs (on parle d'inter-normalisation).

L'intra-normalisation est le rapport de l'intensité de fluorescence d'une sonde *n* pour un échantillon sur l'intensité moyenne des sondes de référence pour ce même échantillon.

L'inter-normalisation est la comparaison du signal relatif (calculé grâce à l'intra-normalisation) à la moyenne des signaux relatifs calculés pour les échantillons témoins pour la même sonde. Ce rapport permet d'obtenir un ratio dont la valeur permet d'identifier un nombre de copie normal ou anormal selon les règles d'interprétation décrites dans le tableau 7.

Ratio	Nombre de copies	Signification
0	0 copie	Délétion homozygote
0,40 – 0,65	1 copie	Délétion hétérozygote
0,8 – 1,2	2 copies	Profil normal
1,3 – 1,65	3 copies	Duplication hétérozygote
1,75 – 2,15	4 copies	Duplication homozygote

Tableau 7 : Interprétation du nombre de copies du gène *MEN1* en fonction de la valeur du ratio, selon les recommandations du fournisseur.

d) Etude du profil mutationnel des méningiomes méningothéliaux par séquençage à haut débit NGS

Chez les deux patients de la cohorte n°1 atteints de méningiomes méningothéliaux, nous avons recherché par séquençage NGS une anomalie moléculaire dans 13 gènes impliqués dans les méningiomes.

Pour cela, nous utilisons le kit de séquençage haut débit QIAseq targeted DNA (Qiagen) qui permet l'élaboration de bibliothèques ciblées sur un panel de gènes (déterminés après étude bibliographique cf. Tableau 5) et marqués par des séquences uniques appelées codes-barres moléculaires.

La technologie de séquençage haut débit QIAseq targeted DNA (Qiagen) est basée sur l'ajout de ces codes-barres moléculaires à chaque molécule d'ADN. Grâce à eux, des molécules d'ADN de même origine résultant d'une amplification par PCR porteront la même séquence unique. Leur intérêt est d'augmenter la sensibilité de détection de variants de séquence en permettant, au moment de l'analyse des séquences, de discriminer les reads générés à partir de molécules d'ADN natives différentes, qui porteront alors des codes-barres différents. Ceci permet de supprimer par un traitement bioinformatique un variant artificiel qui serait 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.

L'élaboration de la librairie se fait en ligne sur le site internet de Qiagen à partir du nom des gènes ou des coordonnées génomiques des régions d'intérêt. Les amorces de séquençage sont sélectionnées afin de couvrir théoriquement 99% des régions codantes et régions introniques flanquantes (30pb de part et d'autre des exons) des 13 gènes du panel (Tableau 8) soit un total de 24 486 pb et 362 amorces.

Pour les 21 patients de la cohorte n°2, nous avons analysé les résultats des travaux de séquençage réalisés par Noémie BASSET et Florent DARRIET sur un total de 83 patients dans le cadre de leurs thèses respectives. Le même mode opératoire a été utilisé.

- i. Gènes constituant le panel NGS « Méningiomes », sélectionnés pour leur implication dans les méningiomes méningothéliaux sporadiques (Tableau 8)*

Gène	Localisation chromosomique	Transcrit	Nombre d'exons	Fonction protéique principale	Type de mutation dans les méningiomes	Hot spot mutationnel	Mutations recensées dans d'autres types de tumeurs
NF2 NEUROFIBROMIN 2	22q12.2	NM_000268.3	15	Inhibition de contact via la régulation de la voie AKT-PIK3-mTOR et la voie Hippo	Constitutionnelle et somatique	Non	Schwannomes et épendymomes
AKT1 V-AKT MURINE THYMOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG 1	14q32.3	NM_001014431.1	15	Sérine thréonine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) appartenant à la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR qui régule de nombreux processus biologiques, y compris prolifération, croissance et apoptose cellulaire	Somatique	Glu17Lys	8% des cancers du sein, 6% des cancers du colon, 2% des cancers de l'ovaire
KLF4 KRUPPER LIKE FACTOR 4	9q31.2	NM_004235.4	5	Contrôle de la transition G1-S du cycle cellulaire à la suite de l'endommagement de l'ADN par la médiation du gène suppresseur de tumeur p53 et contrôle de la différenciation de nombreux types cellulaires	Somatique	Lys409Gln	Non
SMO SMOOTHENED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF TRAF7	7q32.1	NM_005631.4	12	Protéine transmembranaire de type récepteur couplé aux protéines G, appartenant à la voie de signalisation Hedgehog	Somatique	Leu421Phe Trp535Leu	Carcinomes basocellulaires et médulloblastomes
TNF RECEPTOR- ASSOCIATED FACTOR 7	16p13.3	NM_032271.2	21	Protéine pro-apoptotique et régulatrice de la transcription NF-kappa-B	Somatique	Non	Rare cas de mésothélium
PIK3CA PHOSPHATIDYL- INOSITOL-3-KINASE, CATALYTIC, ALPHA	3q26.3	NM_006218.2	21	Sous unité catalytique de la phosphatidylinositol-3-kinase appartenant à la voie de signalisation PIK3-AKT-mTOR	Somatique	Glu545Lys His1047Arg	Nombreux cancers
CDKN2A CYCLIN DEPENDANT KINASE INHIBITOR 2A	9q21.3	NM_058195.3	3	Contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6) et via la stabilisation de p53	Non déterminé	Non déterminé	Nombreux cancers

Tableau 8 : Description des gènes inclus dans le panel NGS méningiome.

Gène	Localisation chromosomique	Transcrit	Nombre d'exons	Fonction protéique principale	Type de mutation dans les méningiomes	Hot spot mutationnel	Mutations recensées dans d'autres types de tumeurs
CDKN2B CYCLIN DEPENDANT KINASE INHIBITOR 2B	9q21.3	NM_004936.3	2	Contrôle du cycle cellulaire via les kinases dépendantes des cyclines 4 et 6 (CDK4 et CDK6)	Non déterminé	Non déterminé	Nombreux cancers
TERT TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE	5p15.3	NM_198253.2	16	La télomérase est une ribonucléoprotéine polymérase qui maintient les extrémités des télomères en ajoutant la répétition TTAGGG	Somatique	g.1295228C>T g.1295250C>T (promoteur)	43% des cancers du SNC, 59% des cancers de la vessie, 10% des cancers folliculaires de la thyroïde et 29% des mélanomes
SUFU SUPPRESSOR OF FUSED, DROSOPHILA, HOMOLOG OF	10q24.3	NM_016169.3	12	Régulation de la voie de signalisation de Hedgehog via l'inhibition du facteur de transcription GLI1	Constitutionnelle	Non déterminé	Carcinomes basocellulaires et médulloblastomes
PTEN PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOG	10q23.3	NM_000314.4	9	Phosphatase, régulatrice de la voie PIK3-AKT-mTOR par antagonisme de la PI3Kinase et de la voie des MAP-kinase	Non déterminé	Non déterminé	Nombreux cancers
SMARCB1 SWI/SNF-RELATED MATRIX-ASSOCIATED ACTIN-DEPENDANT REGULATOR OF CHROMATIN (SMARC) SUBFAMILY B MEMBER 1	22q11.2	NM_003073.3	9	Protéine impliquée dans l'architecture chromatinienne, fait partie d'un complexe permettant le relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription	Constitutionnelle et somatique	Non déterminé	Tumeurs rhabdoïdes
SMARCE1 SMARC SUBFAMILY E MEMBER 1	17q21.2	NM_003079.4	11	Architecture chromatinienne, relâchement de la chromatine nécessaire à la transcription	Constitutionnelle	Non déterminé	Non

Tableau 8 : Description des gènes inclus dans le panel NGS méningiome.

ii. Préparation des bibliothèques de séquençage à haut débit

La préparation des bibliothèques se déroule en cinq grandes étapes réparties sur 3 jours, à partir d'une prise d'essai de 15µL maximum.

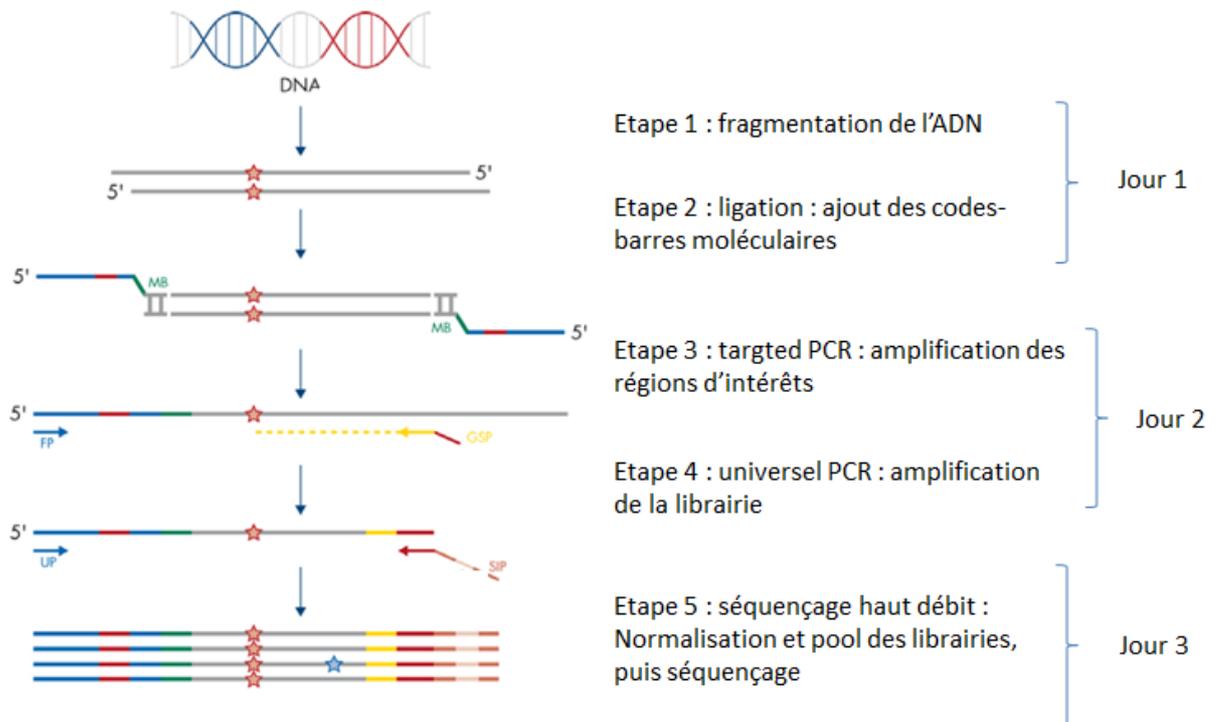


Figure 4 : Etapes d'élaboration de la bibliothèque de séquençage haut débit avec le kit QIAseq targeted DNA.

❖ Première étape : fragmentation de l'ADN

Des endonucléases fournies dans le kit fragmentent l'ADN de façon aléatoire, à une température de 32°C. S'en suit une étape de réparation des extrémités des fragments. En parallèle, une incorporation de désoxyadénosine monophosphate (dAMP) sur l'extrémité 3' des fragments d'ADN est réalisée afin de préparer l'étape de ligation.

❖ Deuxième étape : ligation

Avant l'amplification, chaque molécule d'ADN originale est attachée par son extrémité 5' à une séquence unique appelée UMI (Unique Molecular Index). Ce code-barre moléculaire de 12 nucléotides se lie à l'ADN à une température de 20°C via une séquence commune appelée adaptateur et une DNA ligase. L'UMI est attaché à l'amorce de séquençage haut débit « Read 2 sequencing primer site », à l'adaptateur de séquençage haut débit p7, ainsi qu'aux index I7

servant à l'identification des échantillons pour permettre le multiplexage. Une étape de lavage par des billes magnétiques et de l'éthanol est ensuite réalisée sur une plaque magnétique pour purifier l'ADN et enlever les dimères d'adaptateurs. L'ADN est ensuite congelé à -20°C.

❖ Troisième étape : Targeted PCR

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

- Des amorces spécifiques des régions d'intérêts « GSP (Gene Specific Primer) » reliées à l'amorce de séquençage haut débit « Read 1 sequencing primer » ;
- Des amorces « IL-Forward », complémentaires de l'adaptateur de séquençage haut débit « P7 ».

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

Il s'agit d'une étape d'enrichissement des régions cibles par PCR. Cette étape permet à la fois d'amplifier les régions d'intérêts et d'intégrer la seconde amorce de séquençage haut débit Read 2 sequencing primer, mais aussi d'amplifier les molécules d'ADN ayant intégré un code-barre moléculaire.

❖ Quatrième étape : Universal PCR

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

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

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

Cette étape permet à la fois d'amplifier la librairie, 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.

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

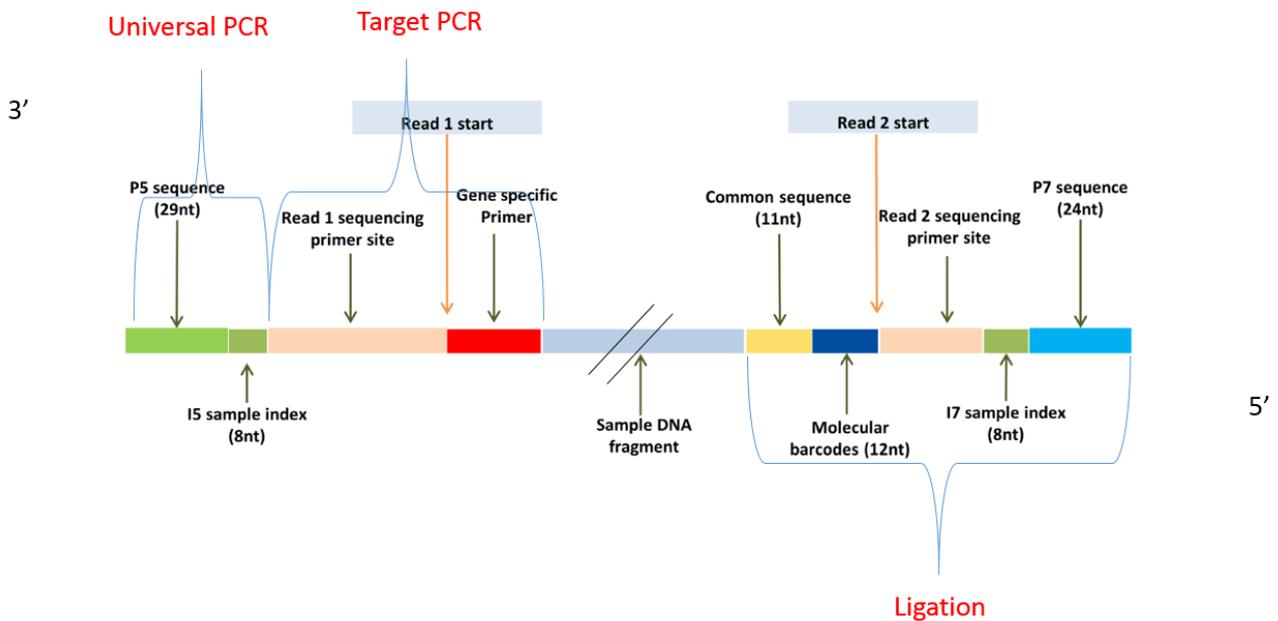


Figure 5 : Structure d'un fragment issu de la technologie QIAseq Targeted DNA. Modifié de "Detecting very low allele fraction variants using targeted DNA sequencing and a novel molecular barcode-aware variant caller" Xu et al. BMC Genomics (2017)

❖ 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 et 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.

iii. 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 qui utilise l'algorithme d'alignement de variant calling smCounter. smCounter 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.

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

① Elagage des lectures de séquence

Sur le read 1 : tous les éléments n'appartenant pas à la séquence d'ADN d'origine sont découpés (UMI, adaptateurs de séquençage, séquence commune, adaptateurs de PCR universelle), excepté les amorces spécifiques des régions d'intérêts (GSP : gene specific primer).

Sur le read 2 : les adaptateurs de séquençage, la séquence commune, ainsi que les adaptateurs de la PCR universelle sont découpés.

Les 12 bases de l'UMI sont extraites et ajoutées à l'identité du read (la séquence commune qui est exactement identique pour chaque read permet une extraction plus aisée des UMI par le logiciel).

Les read trop courts (<40 nt) sont filtrés à cette étape (il s'agit principalement de dimères d'amorces).

② Alignement

Les reads élagués sont alors alignés sur le génome via l'algorithme BWA-MEM, qui produit un fichier.SAM. Les fichiers .SAM (Sequence Alignment/Map) sont des fichiers d'alignements, ils se décomposent en deux parties, l'en-tête et le corps. L'en-tête donne des informations sur le génome ou sur l'alignement ; le corps est un format tabulé. L'alignement est affiné et les fichiers .SAM sont convertis en fichiers .BAM via samtools. Les fichiers .BAM (Binary SAM) sont des fichiers du format SAM, binaires (plus facilement lisible pour une machine) et compressés.

③ Filtre post alignement

Les reads sont ensuite filtrés par le logiciel selon plusieurs critères :

- Si le Read 1 et le Read 2 correspondant ne sont pas alignés sur le même chromosome ou sur le même locus ;
- Si le Read 1 et le Read 2 correspondant sont alignés suivant la même orientation (forward-forward ou reverse-reverse) ;
- Si le score de qualité de l'alignement (MAPQ) des Read 1 ou 2 est inférieur à 17 ;
- Si les séquences en début de read ne correspondent pas aux séquences des amorces spécifiques des régions d'intérêts GSP attendues en début de read ;
- Si le Read 1 et le Read 2 correspondant se chevauchent de moins de 15 pb.

④ Barre code clustering

Les reads commençant à la même position et ayant le même sens et le même UMI sont regroupés. Ils correspondent à de multiples lectures d'une même séquence d'ADN. Seuls ces groupements sont utilisés dans l'analyse en aval.

⑤ Masquage des amorces spécifiques des régions d'intérêts

Modification des fichiers .bam pour masquer les séquences d'amorces spécifiques identifiées en début de read 1 et potentiellement en fin de read 2, avant l'annotation des variants.

⑥ Variant calling

A partir des fichiers .bam modifiés à l'étape ci-dessus, un fichier .VCF est généré par Smcounter. Les fichiers .VCF (Variant Call Format) sont des fichiers de variation de séquence, ils donnent des informations sur les variants trouvés dans un génome par rapport à une référence (ici la version GRCh37/hg19 du génome humain).

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

- .BAM et .BAI (fichier binaire qui indexe un fichier BAM, comme une table des matières qui servirait aux outils de visualisation afin d'accélérer l'affichage des données contenues dans un fichier BAM), qui regroupe les données d'alignement des séquences par rapport aux séquences de référence ;
- .VCF (variant calling format) qui regroupe les données sur les variants de séquence ;
- .BEDGRAPH (Browser Extensible Format graph) qui regroupe les données de couverture ;
- 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 par le pipeline smCounter ont été annotées selon la nomenclature HGVS en utilisant comme référence la version GRCh37/hg19 du génome humain.

Pour interpréter les variants et déterminer leur classe de pathogénicité, nous avons collecté différentes données afin de constituer un argumentaire :

- des données épidémiologiques telles que la fréquence à laquelle est retrouvée le variant dans différentes populations. La base de données gnomAD (Genome Aggregation Database) agrège des données génomiques de plus de 120 000 individus non apparentés

issus d'études populationnelles ou spécifiques de certaines maladies, à l'exclusion des maladies pédiatriques graves. Cette base de données fournit donc la fréquence du variant au sein d'une population d'individus théoriquement sains.

- les données bibliographiques sont accessibles sur des bases de données telles que PubMed ou HGMD qui permettent d'avoir accès à des publications (si elles existent) dans lesquelles le variant a déjà été rapporté et classé.
- le variant est également recherché dans des bases de données de patients malades telles que ClinVar (ressource publique qui contient des informations sur les mutations génétiques des maladies rares provenant d'une douzaine de bases de données) ou COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) qui récence les mutations somatiques rencontrées en cancérologie. Enfin, les bases de données locales qui collectent les résultats du laboratoire et certaines bases de données nationales pour des gènes donnés, peuvent être d'une grande utilité car elles permettent souvent d'avoir accès au phénotype individuel ou familial associé au variant.
- des données structurales telles que la nature du variant et son effet potentiel sur la structure de la protéine. Selon qu'un variant entraîne l'apparition d'un codon stop, se situe dans un site canonique d'épissage, soit un variant faux-sens ou soit isosémantique, l'effet prédit sur la protéine ne sera pas le même. Plusieurs logiciels de prédictions bio-informatiques existent en fonction de la nature du variant. Le logiciel NMDEscPredictor permet de prédire en fonction de la position d'un variant non-sens dans la séquence nucléotidique, si l'ARN messager sera détruit ou non par le mécanisme de contrôle qualité des ARNm des cellules eucaryotes (NMD : Nonsense-Mediated Decay) et donc s'il y aura une absence totale de synthèse de la protéine ou la synthèse d'une protéine tronquée non-fonctionnelle. Pour les variants faux-sens, il existe plusieurs logiciels de prédiction de pathogénicité comme SIFT, MutationTaster, Polyphen-2 ou UMD-Predictor. Ce sont des algorithmes qui attribuent un score de pathogénicité à un variant en prenant en compte plusieurs critères : conservation de la base nucléotidique et de l'acide aminé dans l'évolution, distance physico-chimique entre le résidu aminoacide sauvage et muté, position dans un domaine fonctionnel connu de la protéine, etc. Enfin des logiciels tels que HSF (Human Splicing Finder) permettent de prédire l'effet potentiel sur l'épissage.
- les données fonctionnelles, lorsqu'elles sont disponibles, sont issues d'études *in vivo* ou *in vitro* publiées qui ont étudié l'impact d'un variant sur un gène ou son produit. Dans ce

cas l'argument fourni de pathogénicité est bien plus fort car il a été démontré contrairement aux études *in silico* qui ne fournissent que des prédictions.

- enfin les données cliniques personnelles et familiales peuvent permettre de savoir si le variant est co-ségrégant avec la pathologie chez plusieurs membres de la famille atteints (utile pour les variations constitutionnelles mais pas pour les somatiques).

Le recueil de tous ces arguments nous permet donc de conclure à un effet pathogène ou non d'un variant et de l'incriminer ou non comme responsable de la pathologie.

d) Etude du nombre de copies du gène *NF2* chez les patients des cohortes n°1 et n°2 par PCR en temps réel

Pour 4 patients de la cohorte n°1 ainsi que pour les 21 patients de la cohorte n°2, nous avons étudié le nombre de copies du gène *NF2*. Pour les patients de la cohorte n°2, nous avons analysé les résultats des travaux de PCR en temps réel réalisés par Noémie BASSET et Florent DARRIET sur un total de 83 patients dans le cadre de leurs thèses respectives. Le même mode opératoire a été suivi pour les patients des deux cohortes, il est décrit ci-après.

❖ Principe de la PCR en temps réel par hydrolyse de sondes Taqman Assay

L'analyse du nombre de copie 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. En cas de variation du nombre de copie du gène *NF2*, le caractère somatique sera confirmé par l'étude de l'ADN extrait de la couche leuco-plaquettaire lorsque cela est possible.

❖ 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 *RNaseP*). Une moyenne ΔCt est ensuite 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.

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

Tableau 9 : Interprétation du nombre de copies du gène *NF2* en fonction de la valeur RQ, selon les recommandations du fournisseur.

e) Outils statistiques

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

III. Résultats

1. Résultats obtenus sur la cohorte n°1

a) Caractéristique génétiques et cliniques des patients de la cohorte n°1

i. Les méningiomes

Parmi les 6 patients composant la cohorte n°1, deux sont atteints de méningiomes. Les données cliniques (sexe, date de naissance, phénotype et âge au diagnostic), anatomo-pathologiques (sous-type tumorale, grade OMS, pourcentage de Ki-67, nombre de mitoses pour 10 champs) et biologiques (mutation germinale de *MEN1*, densité optique obtenue après extraction manuelle de l'ADN tumoral) de ces deux patients sont exposées dans le tableau 7.

ii. Les épendymomes

Parmi les 6 patients composant la cohorte n°1, quatre sont atteints d'épendymomes. Les données cliniques (sexe, date de naissance, phénotype et âge au diagnostic), anatomo-pathologiques (sous type tumoral, parfois non renseigné) et biologiques (mutation germinale de *MEN1*, densité optique obtenue après extraction manuelle de l'ADN tumoral) de ces quatre patients sont exposées dans le tableau 8.

Patient	Sexe	DDN	Phénotype clinique NEMI	Age au diagnostic de la tumeur intracrânienne	Type tumoral (matériel)	Grade OMS	Ki-67	Nombre de mitoses/10 champs	Mutation germinale MEN1	DO (ng/µL)
1	M	01/08/76	Hyperparathyroïdie, prolactinome, tumeur pancréatique non sécrétante et lipome. Pas d'antécédents familiaux.	36 ans	Méningiome atypique (6 lames FFPE)	II	NR	4	Exon 2 : c.252_253delTAinsG p.(Ile85Serfs*34)	33,5
2	M	31/12/46	Hyperparathyroïdie, gastrinome, tumeur pancréatique non sécrétante et atteinte surrénalienne. Pas d'antécédents familiaux.	62 ans	Méningiome méningothélial (6 lames FFPE)	I	5-6 %	5	Exon 7 : c.1037_1038delCT p.(Thr346Serfs*20)	180,9
3	M	30/12/69	Hyperparathyroïdie et glucagonome. Tumeur pancréatique chez la mère (pas de diagnostic génétique).	38 ans	Ependymome (6 lames FFPE)	NA	NA	NA	Exon 2 : c.249_252del p.(Ile85serfs*33)	7,3
4	F	28/03/59	Hyperparathyroïdie, gastrinome, insulinoïde, atteinte surrénalienne. Pas d'antécédents familiaux.	NR	Ependymome (fragment)	NA	NA	NA	Exon 9 : c.1259 T>A p.(Ile420Asn)	46,2
5	F	15/10/51	Insulinome et atteinte surrénalienne. Hyperparathyroïdie chez le père et la soeur, porteurs de la même mutation.	52 ans	Ependymome papillaire (6 lames FFPE)	NA	NA	NA	Exon 3 : c.515A>T p.(Asp172Val)	60,3
6	M	11/06/49	Hyperparathyroïdie. Hyperparathyroïdie et tumeur pancréatique non sécrétante chez le fils (cas index) porteur de la même mutation.	59 ans	Ependymome (6 lames FFPE)	NA	NA	NA	Exon 10 : c.1643C>G p.(Ser548Ter)	1,6

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques, anatomo-pathologiques et biologiques des patients de la cohorte n°1 (NR : non renseigné ; NA : non applicable).

iii. *Mutations germinales hétérozygotes de MEN1 chez les patients de la cohorte n°1*

Les patients n°1, 2, 3 et 6 sont porteurs de mutations germinales de *MEN1* entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré dans la séquence d'acides aminés.

Le patient n°5 est porteur d'un variant faux sens classé comme pathogène par le groupe TENGGEN (<http://www.umd.be/>). Sa sœur et son père, qui portent aussi ce variant ont également développé une hyperparathyroïdie (les données de suivi de la sœur ne sont pas disponibles). Le patient n°4 est lui aussi porteur d'un variant faux sens pathogène mais ne présente aucun antécédent familial.

b) Résultats

L'extraction d'ADN a été réussie pour les 6 patients de la cohorte. Le séquençage a pu être réalisé chez 5 patients sur 6. La mauvaise qualité du matériel tumoral du patient 6 (épendymome) n'a pas permis une extraction d'ADN de qualité et quantité suffisantes, permettant une amplification par PCR.

i. *Résultats du séquençage Sanger*

❖ Patient 1 :

Absence de perte d'hétérozygotie de *MEN1* : le séquençage ciblé de l'exon 2 de *MEN1* retrouve la mutation germinale à l'état hétérozygote dans la tumeur. La recherche d'un second évènement ponctuel dans *MEN1* n'a pas abouti en raison de l'échec de l'amplification des exons 2.1, 2.2, 4, 5.6 et 10.1. Dans les exons 3, 7, 8, 9 et 10.2 qui ont pu être amplifiés et séquencés, aucune variation pathogène n'est retrouvée.

❖ Patient 2 :

Mise en évidence d'une perte d'hétérozygotie au niveau somatique par séquençage ciblé de l'exon 7 de *MEN1* (figure 6).

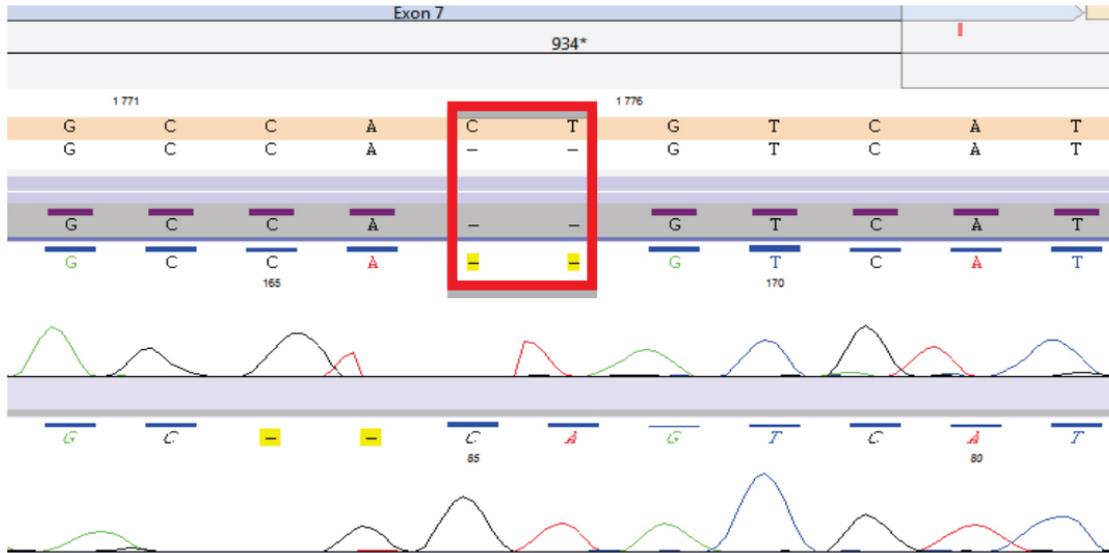


Figure 6 : LOH du gène *MEN1* chez le patient 2 : perte sur les deux brins des bases C et T en positions 1037 et 1038 de l'exon 7 (délétion homozygote)

❖ Patient 3 :

Mise en évidence d'une perte d'hétérozygotie au niveau somatique par séquençage ciblé de l'exon 2 de *MEN1* (figure 7).

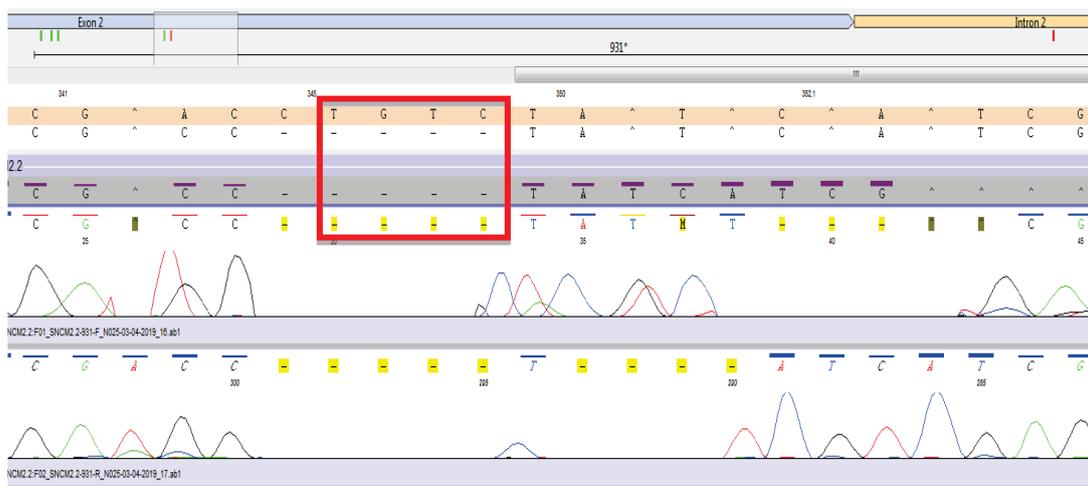


Figure 7 : LOH du gène *MEN1* chez le patient 3 : perte sur les deux brins des bases T, G, T et C en positions 249 à 252 de l'exon 2 (délétion homozygote)

❖ Patient 5 :

Mise en évidence d'une perte d'hétérozygotie au niveau somatique par séquençage ciblé de l'exon 3 de *MEN1* (figure 8).



Figure 8 : LOH chez le patient 5 : substitution sur les deux brins du nucléotide A par un nucléotide T en position 515 de l'exon 3

ii. Résultats du séquençage NGS des 13 gènes du panel « Méningiome »

❖ Evaluation de la qualité du séquençage à haut débit à partir des données brutes :

Les paramètres de validation technique des données brutes de séquençage sont générés directement après la fin du séquençage par l'automate MiSeq et visualisables sur le logiciel MiSeq Reporter.

L'analyse du score de qualité des séquences est réalisée par le logiciel FASTQC à partir des fichiers .fastq produits par l'automate MiSeq. Les séquences obtenues pour les patients 1 et 2 sont de très bonnes qualités. Pour chaque read (sens et anti-sens), le Phred score est supérieur à 30 (Q30). Au sein des séquences, la probabilité d'erreur de base est donc inférieure à une toutes les mille bases. Les scores de qualité obtenus pour le read 1 chez le patient 1 sont illustrés par la figure 9. Les scores de qualité obtenus pour le read 2 du patient 1 et les deux read du patient 2 ont des profils similaires.

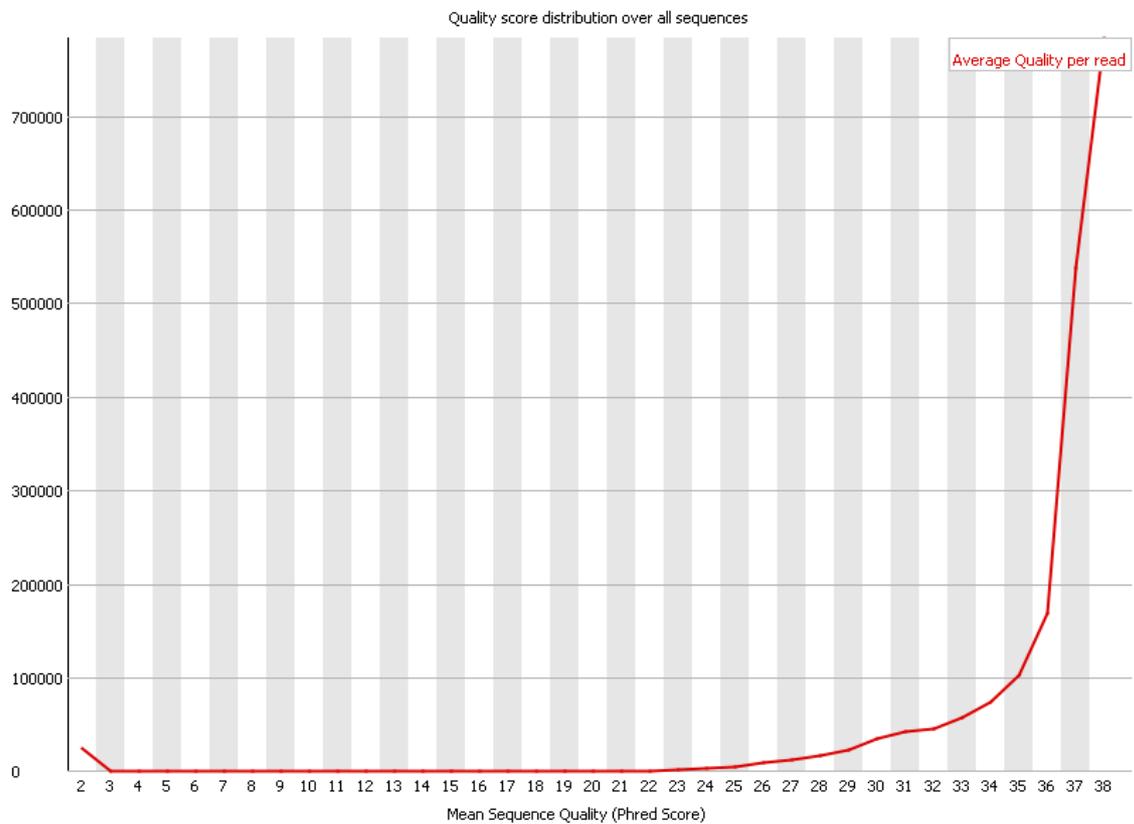
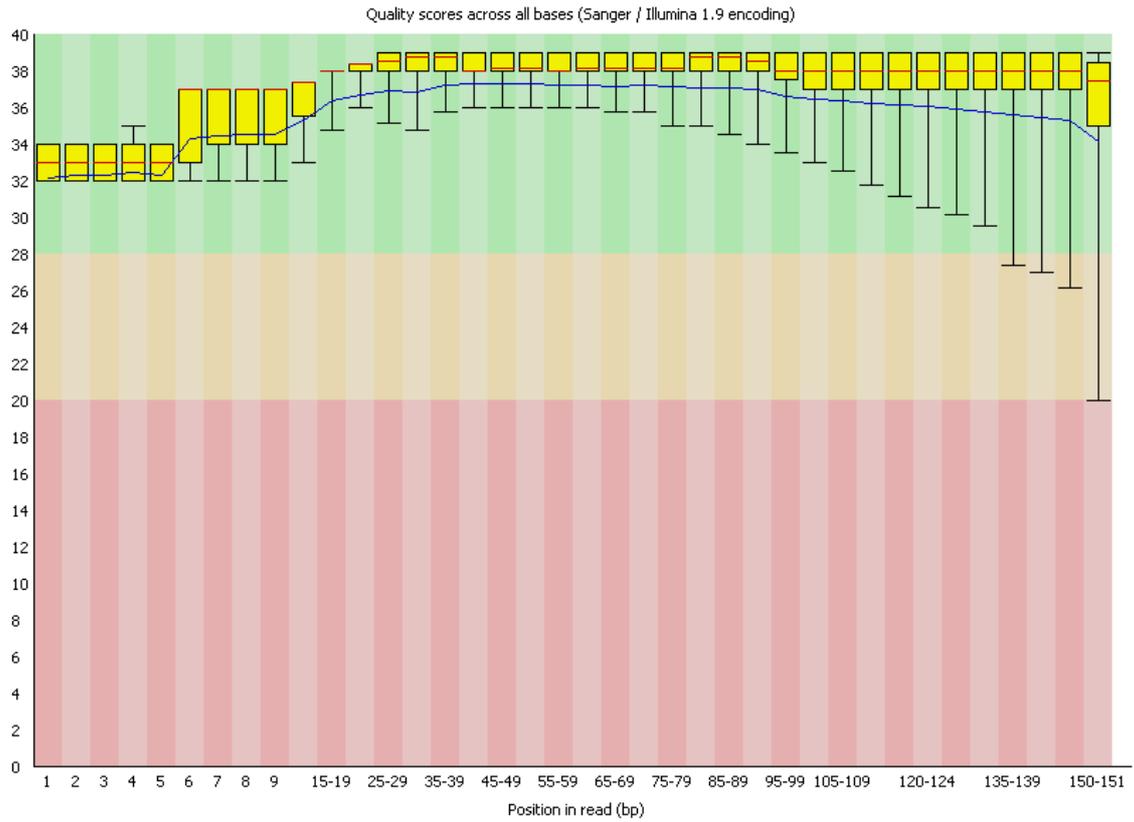


Figure 9 : Scores qualités obtenus pour le Read 1 chez le patient 1.

❖ Paramètres des séquences produites après analyse par le pipeline d'analyse bio-informatique

Le pipeline d'analyse fournit des informations quant aux séquences générées par le l'automate MiSeq. Certaines de ces informations figurent dans le tableau 10. La profondeur de lecture ainsi que la couverture sont de très bonnes qualités chez les deux patients. Nous notons cependant chez le patient 1 un nombre total de fragments générés inférieur à celui du patient 2. De plus, le nombre d'UMI total est inférieur et plus de fragments de séquence sont porteurs du même UMI chez le patient 1, ce qui montre une proportion importante de duplicats de PCR, dus certainement à une plus faible quantité de molécules d'origine. Par conséquent, à l'issue du séquençage, l'image de la diversité tumorale obtenue est moins fine chez le patient 1 que chez le patient 2, d'où un seuil de détection des variants de 10% contre 5% pour le patient 2. Ce seuil correspond à la fréquence minimale que doit avoir un variant pour qu'il existe 95% de chance qu'il soit vrai, les variants dont les fréquences sont inférieures aux seuils respectifs de chaque échantillon sont filtrés.

READ SET	Patient 1	Patient 2
Nombre total de fragments	1 954 483	3 377 444
Nombre de fragments « dans » la cible (panel)	1 412 288	2 585 568
Nombre total d'UMIs	191 218	822 693
Moyenne de fragments portant le même UMI	7,4	3,1
Profondeur moyenne avec UMI	528,23X	2272,63X
Couverture moyenne pour une profondeur de 100X	99,04%	99,85%
Fréquence minimale pour 95% de chance que le variant soit vrai	0,1	0,05

Tableau 12 : Données de séquençage générées par le pipeline d'analyse pour les patients 1 et 2.

❖ Résultats du patient 1 :

Onze variants ont été mis en évidence au sein du panel de 13 gènes. Leur classification a été établie grâce à des analyses *in-silico*. Les résultats sont présentés dans le tableau 11. Un variant pathogène est retrouvé dans le gène *NF2* à l'état hétérozygote (fréquence de 47%), c'est une microdélétion-insertion : c.905_916delinsA, (p.Gly302Aspfs*26). Deux autres variants pathogènes ont également été mis en évidence dans le gène *PIK3CA* : c.1539+1G>A et c.1722G>A, p.Trp574*, à une fréquence de 10%.

Chr	Gène	Variant	Freq %	Classification et arguments
10	<i>SUFU</i>	c.1362G>A p.(Glu454Glu)	0,11	VASI (Variant de Signification Inconnue) : variant synonyme, 3 occurrences dans GnomAD, pas d'impact épissage.
22	<i>NF2</i>	c.883C>T p.(Leu295Leu)	0,13	VASI : variant synonyme, 1 occurrence dans GnomAD, pas d'impact épissage.
22	<i>NF2</i>	c.905_916delinsA p.(Gly302Aspfs*26)	0,48	Variant pathogène : variant non sens, NMD+, aucune occurrence GnomAD.
3	<i>PIK3CA</i>	c.1413A>C p.(Pro471Pro)	0,2	VASI : variant synonyme, aucune occurrence dans GnomAD, pas d'impact épissage.
3	<i>PIK3CA</i>	c.1539+1G>A	0,1	Variant pathogène : disparition du site donneur d'épissage, aucune occurrence dans GnomAD, analyse in-silico : « disease causing ».
3	<i>PIK3CA</i>	c.1722G>A p.(Trp574*)	0,1	Variant pathogène : variant non sens, NMD+, aucune occurrence GnomAD.
3	<i>PIK3CA</i>	c.1974G>A p.(Leu658Leu)	0,12	VASI : variant synonyme, aucune occurrence dans GnomAD, pas d'impact épissage.
5	<i>TERT</i>	c.3184G>A p.(Ala1062Thr)	0,52	Variant bénin : 1062 occurrence dans GnomAD dont 44 hmz, polymorphisme dans uniprot, bases de données de variants : classé en bénin.
7	<i>SMO</i>	c.74A>G p.(Asp25Gly)	0,28	Variant bénin : GnomAD : fréquence 12%.
7	<i>SMO</i>	c.1164G>C p.(Gly388Gly)	0,99	Variant bénin : GnomAD : 80% avec 90000/140000 hmz, pas d'impact épissage.

Tableau 13 : Variants identifiés chez le patient 1 après séquençage NGS des gènes du panel méningiome.

❖ Résultats du patient 2

5 variants ont été mis en évidence au sein du panel de 13 gènes. Leur classification a été établie grâce à des analyses *in-silico*. Les résultats sont présentés dans le tableau 12. Un variant pathogène est retrouvé dans le gène *PIK3CA* à une fréquence de 25% : c.1090G>A, p.Gly364Arg.

Chr	Gène	Variant	Freq %	Classification et arguments
10	<i>SUFU</i>	c.1299T>C p.(Ile433Ile)	0,33	Variant bénin : variant synonyme, GnomAD : 14%, ClinVar : bénin
16	<i>TRAF7</i>	c.1377C>T, p.(Cys459Cys)	0,64	Variant bénin : variant synonyme, GnomAD : 34 occurrences, pas d'impact épissage
3	<i>PIK3CA</i>	c.1090G>A p.(Gly364Arg)	0,25	Variant Pathogène : changement d'acide aminé identique à un variant pathogène connu, localisation dans un hotspot mutationnel, aucune occurrence dans gnomAD, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 5,6, effet pathogène prédit par les analyses in-silico, disease causing dans uniprot
3	<i>PIK3CA</i>	c.1173A>G p.(Ile391Met)	0,99	Variant bénin : ExAC : 15000 occurrence dont 50% sont HMZ, analyses in-silico : toléré, bénin dans ClinVar
7	<i>SMO</i>	c.1164G>C p.(Gly388Gly)	0,99	Variant bénin : gnomAD : 80% dont la moitié homozygote, bénin dans ClinVar

Tableau 14 : Variants identifiés chez le patient 2 après séquençage NGS des gènes du panel méningiome.

iii. Résultats de l'étude du nombre de copies du gène *NF2* par PCR en temps réel :

La recherche de perte d'hétérozygotie du gène *NF2* a été réalisée pour les 4 patients de la cohorte par PCR quantitative en temps réel. Pour les patients 1 et 3, une seule copie du gène *NF2* a été mise en évidence, traduisant une perte d'hétérozygotie du gène. Pour le patient 2, deux copies du gène ont été retrouvées traduisant l'absence de perte d'hétérozygotie. Le patient 5 présente une valeur intermédiaire (RQ = 0,72) en faveur d'une délétion de *NF2* en raison du risque de contamination du prélèvement par du tissu sanguin normal.

N° patient (cohorte 1)	Type tumoral	RQ	Interprétation
Calibrateur		1	Normal
1	Méningiome atypique	0,41	Délétion
2	Méningiome méningothélial	0,99	Normal
3	Ependymome	0,54	Délétion
5	Ependymome papillaire	0,72	Délétion*

Tableau 15 : Résultats de l'analyse du nombre de copies du gène *NF2* des patients de la cohorte n°1

* cette valeur intermédiaire est en faveur d'une délétion de *NF2*

2. Résultats obtenus pour les patients de la cohorte n°2

a) Présentation des patients de la cohorte n°2

Les données cliniques, biologiques et anatomo-pathologiques sont exposées dans le tableau 13. La cohorte n°2 est constituée de 21 patients dont 16 femmes et 5 hommes, soit 76% de femmes. La moyenne d'âge au diagnostic est de 58 ans, allant de 36 à 86 ans. Dix-neuf tumeurs sont des méningiomes de grade I de l'OMS et 2 sont de grade II car considérés comme des méningiomes méningothéliaux atypiques.

Patient	Sexe	Age au diag	Grade oms	Données histologiques	Anti KI-67%	Localisation	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Nombre de mitoses/10 champs	Oedème/effet de masse
M24	F	36	I	Méningothélial	3%	Base du crane	Non	Non	Non	Non	NR
M25	F	51	I	Méningothélial	7%	Inter orbitaire	NR	Non	Non	Non	NR
M253	F	73	I et I	Méningothélial et méningothélial psammomateux	6% et 1%	Supra sellaire	NR	NR	NR	NR	NR
M254	F	69	I	Méningothélial et quelques atypies	5%	Pariétal	Os	Non	Aspect lymphocytoïde, perte de différenciation focale + nucléole	< 2	Oui
M255	F	40	I	Méningothélial	4%	Pariétal	NR	Non	NR	NR	Oedème seul
M256	F	80	I	Méningothélial et nombreux psammomes	6%	Sphénoïde droit	NR	Non	NR	< 1	Oui
M257	F	77	II	Méningothélial atypique	10%	Occipital	Dure-mère	Non	Non	5	NR
M258	M	46	I	Méningothélial	3%	Supra sellaire	NR	Non	Non	Non	NR
M260	F	86	I	Méningothélial et quelques psammomes	2%	Inter optique	NR	Non	Non	Non	NR
M261	F	57	I	Méningothélial et quelques atypies	7%	Toit de l'orbite	Dure-mère	Non	Inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	< 2	NR

Tableau 16 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques de la cohorte n°2 (NR : non renseigné).

Patient	Sexe	Age au diag	Grade oms	Données histologiques	Anti Ki-67%	Localisation	Envahissement	Nécrose	Atypie cytonucléaire	Nombre de mitoses/10 champs	Oedème/effet de masse
M263	F	52	I	Méningothélial	3%	Canal optique	NR	Non	Non	< 1	NR
M265	F	46	I	Méningothélial et quelques atypies	6%	Para sagittal frontal gauche	Dure-mère	Non	Inflexion lymphocytoïde, nucléoles marqués	3	Non
M275	F	54	I	Méningothélial et quelques atypies	7%	Sphéno-orbitaire gauche	NR	Non	Non	Non	NR
M341	M	52	I	Méningothélial	4%	Portion osseuse et péri-orbital	Dure-mère	Non	Non	Non	NR
M343	F	62	I	Méningothélial	5%	Frontal parasagittal	Non	Non	Non	Non	Cerveau oedemateux
M356	M	43	I	Méningothélial	7%	Fosse postérieure	Non	Non	Non	1	Masse lobe cérébelleux
M358	M	46	I	Méningothélial	3%	Supra sellaire	Non	Non	Non	Non	Non
M369	F	76	I	Méningothélial	4%	Sinus caverneux	Fissure orbitaire + foramen	NR	Non	1	Non
M370	F	52	I	Méningothélial	3%	Apophyse clinoidienne antérieure	Sinus caverneux et intra sellaire	Non	Non	1	Non
M372	M	47	I	Méningothélial	1%	Supra-sellaire	Sous arachnoïdien	Non	Non	1	Non
M382	F	77	II	Méningothélial atypique	12%	Frontal gauche	Non	Oui	Nucléoles marqués	2	Non

Tableau 16 : Données cliniques, biologiques et anatomopathologiques de la cohorte n°2 (NR : non renseigné).

b) Résultats

i. Résultats du séquençage Sanger du gène MEN1

Le séquençage du gène entier par technique Sanger a été une réussite pour les 21 patients de la cohorte n°2. Aucun de ces patients atteints de méningiomes méningothéliaux sporadiques ne présente d'anomalie ponctuelle dans *MEN1*.

ii. Résultats de l'étude du nombre de copies du gène MEN1 par technique MLPA

Sur les 21 méningiomes de la cohorte n°2, 20 ont pu être analysés en MLPA. Le méningiome M257 n'a pas pu être analysé par manque de matériel.

Une délétion hétérozygote des gènes *AIP* et *MEN1*, situés tous deux sur le bras long du chromosome 11 (11q), a été observée dans les méningiomes M356, M358 et M382. Le gène *CDKN1B* situé sur le bras court du chromosome 12 (12p) présente lui un nombre de copies normal dans ces 3 échantillons.

Les 17 autres méningiomes de la cohorte ne présentent pas d'anomalie du nombre de copies dans les trois gènes étudiés.

Les résultats obtenus sont présentés en annexes.

iii. Résultats du séquençage NGS des 13 gènes du panel « Méningiome »

Quatorze patients présentent une anomalie moléculaire dans les gènes du panel « Méningiome », soit 66,7% des patients (tableau 18) :

- 10 patients (52,4%) présentent une anomalie ponctuelle dans l'un des 13 gènes du panel méningiome,
- 1 patient (4,8%) présente deux anomalies ponctuelles dans deux gènes différents du panel,
- 2 patients (9,5%) présentent deux anomalies combinées à l'état hétérozygote dans le même gène *NF2*, une délétion du gène associée à une mutation,
- 5 patients (23,8%) présentent une anomalie du nombre de copies de *NF2*.

Patient	Grade	Mutation somatique	Gène muté	Mutation	Fréquence	Arguments de pathogénicité
M24	I	oui	<i>TRAF7</i>	c.1862A>G p.(Tyr621Cys)	36%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : délétère (UMD, SIFT, Polyphen2), se situe dans le domaine fonctionnel WD6, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,3
M25	I	non				
M253	I et I	non				
M254	I	oui	<i>AKT1</i>	c.49G>A p.(Glu17Lys)	31%	1 occurrence dans gnomAD, analyse <i>in-silico</i> : délétère, se situe dans le domaine PH (permettant adhésion à la membrane plasmique), changement d'acide aminé identique à un variant pathogène connu (ClinVar), gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,5
M255	I	oui	<i>NF2</i>	DUPLICATION		
M256	I	oui	<i>NF2</i>	c.139delT p.(Phe47Leu)fs*7 6 + DELETION de NF2	44%	Variant non sens, NMD+, aucune occurrence gnomAD
M257	II	oui	<i>NF2</i>	DELETION		
M258	I	non				
M260	I	oui	<i>TRAF7</i>	c.1606G>A p.(Gly536Ser)	36%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : délétère (UMD, SIFT, Polyphen2) se situe dans le domaine fonctionnel WD4, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,3
M261	I	oui	<i>TRAF7</i>	c.1675G>T p.(Gly559Cys)	42%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : potentiellement délétère (UMD, SIFT, Polyphen2), se situe dans le domaine fonctionnel WD5, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,3
			<i>KLF4</i>	c.1225A>C p.(Lys409Gln)	47%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : délétère, se situe dans le domaine de liaison à l'ADN, gène tolérant aux faux sens : Zscore = 0,1

Tableau 17 : Résultats du séquençage NGS de la cohorte n°2.

Patient	Grade	Mutation somatique	Gène muté	Mutation	Fréquence	Arguments de pathogénicité
M263	I	oui	<i>TRAF7</i>	c.1911G>C p.(Gln637His)	24%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : potentiellement délétère (UMD, SIFT, Polyphen2), se situe dans le domaine fonctionnel WD7, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,3
M265	I	oui	<i>NF2</i>	DELETION		
M275	I	oui	<i>SMO</i>	c.1234C>T p.(Leu412Phe)	28%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : délétère, se situe dans le domaine transmembranaire, recensé 1 fois dans ClinVar, gène tolérant aux faux sens : Zscore = 1,9
M341	I	oui	<i>TRAF7</i>	c.1559A>G p.(Asn520Ser)	14%	Aucune occurrence dans gnomAD, analyses <i>in-silico</i> : délétère (UMD, SIFT, Polyphen2) se situe dans le domaine fonctionnel WD4, gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,3
M343	I	oui	<i>AKT1</i>	c.49G>A p.(Glu17Lys)	39%	1 occurrence dans gnomAD, analyse <i>in-silico</i> : délétère, se situe dans le domaine PH (permettant adhésion à la membrane plasmique), changement d'acide aminé identique à un variant pathogène connu (ClinVar), gène intolérant aux faux sens : Zscore = 3,5
M356	I	non				
M358	I	oui	<i>PIK3CA</i>	c.3140A>G p.(His1047Arg)	26%	1 occurrence dans gnomAD, analyse <i>in-silico</i> : délétère, recensé 42 fois dans ClinVar comme pathogène (30 publications), gène intolérant aux faux sens : Zscore = 5,6
M369	I	non				
M370	I	non				
M372	I	non				
M382	II	oui	<i>NF2</i>	c.1021C>T p.(Arg341*) + DELETION	44%	Variant non-sens, NMD+, aucune occurrence gnomAD, recensé 4 fois dans Clinvar comme pathogène (1 publication)

Tableau 17 : Résultats du séquençage NGS de la cohorte n°2.

iv. Résultats de l'étude du nombre de copies du gène *NF2* par PCR en temps réel :

Quatre patients ont une délétion du gène et un patient présente une duplication.

Patient	Grade tumoral	RQ	Interprétation
Calibrateur		1	Normal
M24	I	0,93	Normal
M25	I	0,96	Normal
M253	I et I	0,92	Normal
M254	I	0,95	Normal
M255	I	1,51	Duplication
M256	I	0,64	Délétion
M257	II	0,59	Délétion
M258	I	0,91	Normal
M260	I	0,94	Normal
M261	I	0,84	Normal
M263	I	0,98	Normal
M265	I	0,75	Délétion
M275	I	0,93	Normal
M341	I	0,95	Normal
M343	I	1,09	Normal
M356	I	1,01	Normal
M358	I	1,01	Normal
M369	I	0,99	Normal
M370	I	0,99	Normal
M372	I	1,04	Normal
M382	II	0,73	Délétion

Tableau 18 : Résultats de l'analyse du nombre de copies du gène *NF2* des patients de la cohorte n°2.

IV. Discussion

Les méningiomes dans la NEM1 ainsi que la perte d'hétérozygotie du gène *MEN1* au sein de ces tumeurs ont été très peu étudiés. A ce jour, une seule étude apporte des arguments sur le fait que le méningiome est une tumeur spécifique de la NEM1. Cette étude s'est portée sur 74 patients porteurs d'une mutation germinale de *MEN1*, qui ont bénéficié d'une recherche de méningiome systématique à l'IRM. Au sein de cette cohorte, six patients développaient un méningiome [5]. Une recherche de LOH a pu être effectuée chez l'un d'eux porteur d'un méningiome, et s'est révélée positive. Selon l'hypothèse de Knudson, cette perte d'hétérozygotie pourrait constituer le second événement somatique initiant la néoplasie, et serait en faveur de l'implication du gène *MEN1* dans la tumorigenèse des méningiomes. En effet, une LOH au locus *MEN1* sur le chromosome 11q13 a été identifiée dans plus de 90% des tumeurs endocrines chez des patients atteints de NEM1, notamment dans les tumeurs des parathyroïdes, les tumeurs gastro-entéro-pancréatiques, les tumeurs hypophysaires, les angiofibromes cutanés, les lipomes ou encore les tumeurs carcinoïdes des bronches ou de l'estomac [62]. Cependant, les LOH peuvent survenir également de manière sporadique dans les tumeurs et ne peuvent être un argument suffisant pour affirmer l'implication du gène dans la tumorigenèse. En effet dans la littérature, 10% des méningiomes de tout grade confondu présentent une perte du bras long du chromosome 11 où se trouve *MEN1* [107].

Néanmoins, dans la base NEM1 du GTE, la prévalence des méningiomes est de 12/1369 soit 0.9%, ce qui est nettement supérieur à la prévalence estimée de 0,098% (97,5 pour 100 000) de la cohorte CBTRUS [108]. De plus, les patients NEM1 ont développé un méningiome à un âge relativement jeune (6/12 ont moins de 45 ans). Concernant les épendymomes, la prévalence observée dans la base NEM1 est de 6/1369 (0.4%) contre une prévalence calculée de 0.003% (2,88 pour 100 000) dans la population américaine d'après les données CBTRUS [109], ce qui est fortement en faveur d'une implication du gène *MEN1* dans ces tumeurs. Des explorations complémentaires sont donc nécessaires pour pouvoir incriminer *MEN1* dans la tumorigenèse intra-cérébrale.

Dans notre cohorte n°1, nous avons mis en évidence trois pertes d'hétérozygotie du gène *MEN1* parmi les quatre tumeurs intracérébrales que nous avons pu étudier : dans le méningiome méningothélial du patient 2 et dans les épendymomes des patients 3 et 5 (tableau 19).

Nous avons mis en évidence une absence de LOH de *MEN1* chez le patient 1 atteint d'un méningiome. Chez ce même patient, la recherche d'un second événement ponctuel dans le gène n'a pas pu être complète à cause de l'échec du séquençage de certains exons.

Chez le patient 4, le séquençage ciblé n'a pas retrouvé dans la tumeur la mutation identifiée au niveau germinale. Pour éliminer l'existence d'une préférence allélique avec le couple d'amorces utilisé, nous avons « designé » un nouveau couple mais la mutation n'a toujours pas été retrouvée. Par ailleurs, le séquençage du gène entier n'a mis en évidence aucune anomalie ponctuelle. Nous avons donc exclu ce patient de l'analyse car nous ne pouvons pas écarter une erreur d'identité sur ce prélèvement.

Un séquençage à haut débit par technique NGS a été réalisé sur les deux méningiomes de la cohorte (tableau 19). Chez le patient 1, un variant pathogène dans le gène *NF2* a été mis en évidence à l'état hétérozygote ainsi que deux variants pathogènes de fréquence plus faible dans le gène *PIK3CA*. Chez le patient 2, un variant pathogène de faible fréquence a également été mis en évidence dans *PIK3CA*.

La recherche de perte d'hétérozygotie du gène *NF2* a été réalisée pour les 4 patients de la cohorte par PCR quantitative en temps réel (tableau 19). Pour les patients 1 et 3, une seule copie du gène *NF2* a été mise en évidence, traduisant une perte d'hétérozygotie du gène. Le résultat du patient 5 est en faveur d'une délétion.

N° patient	Mutation germinale <i>MEN1</i>	Séquençage Sanger de <i>MEN1</i>	Séquençage NGS du panel de gènes « méningiome »	qPCR <i>NF2</i>
1	Exon 2 : c.252_253delTAinsG p.(Ile85Serfs*34)	Absence de LOH + Echec de séquençage du gène entier	Variant Pathogène <i>NF2</i> : c.905_916delinsA, (p.Gly302Aspfs*26), HTZ 2 variants pathogènes dans <i>PIK3CA</i> à une fréquence de 10% : c.1539+1G>A et c.1722G>A, p.(Trp574*)	LOH
2	Exon 7 : c.1037_1038delCT p.(Thr346Serfs*20)	LOH	Variant pathogène dans <i>PIK3CA</i> à une fréquence de 25% : c.1090G>A, p.(Gly364Arg)	Absence de LOH
3	Exon 2 : c.249_252del p.(Ile85serfs*33)	LOH	<i>Non réalisé</i>	LOH
4	Exon 9 : c.1259 T>A p.(Ile420Asn)	<i>Patient exclu de l'analyse</i>		
5	Exon 3 : c.515A>T p.(Asp172Val)	LOH	<i>Non réalisé</i>	LOH*
6	Exon 10 : c.143C>G p.(Ser548Ter)	<i>Echec de l'analyse</i>		

Tableau 19 : Synthèse des résultats obtenus par séquençage Sanger, NGS et qPCR chez les patients de la cohorte n°1.

Le patient 2 est atteint d'un méningiome méningothélial de grade I de l'OMS. Les méningiomes de grade I sont plutôt bénins et généralement asymptomatiques. Le sex-ratio est de deux femmes pour un homme avec une médiane d'âge au diagnostic de 51 ans. Le patient 2 est un homme dont le diagnostic de méningiome a été posé à l'âge de 62 ans. Une LOH du locus *MEN1* a été mise en évidence chez ce patient. Cette LOH intervient comme deuxième événement somatique (selon l'hypothèse du « second hit » de Knudson), s'ajoutant à une mutation germinale dans l'exon 7 du gène. Le séquençage NGS des 13 gènes

de susceptibilité aux méningiomes a mis en évidence un variant pathogène dans le gène *PIK3CA* à une fréquence de 25%. Dans ce contexte et vu sa fréquence allélique, la mutation dans *PIK3CA* pourrait ne pas être l'évènement initiateur de la néoplasie mais contribuer à la tumorigenèse en tant qu'évènement secondaire. La présence d'une mutation dans ce gène est toutefois cohérente avec le type histologique du méningiome puisque *PIK3CA* est retrouvé muté dans les méningiomes méningothéliaux et transitionnels principalement. Une absence de LOH du gène *NF2* a également été mise en évidence chez ce patient. Les caractéristiques phénotypiques du méningiome du patient 2 ainsi que l'absence d'anomalie majeure dans les 13 gènes du panel « Méningiome » sont des arguments en faveur du rôle principal de la perte d'hétérozygotie somatique du gène *MEN1* dans l'initiation de la néoplasie intracérébrale.

Le patient 1 est atteint d'un méningiome plus agressif que le patient 2. C'est un méningiome atypique de grade II de l'OMS. Chez ce patient, une LOH de *MEN1* n'a pas été retrouvée et l'absence d'un second évènement dans le gène ne peut être affirmée. En effet, cinq des dix amplicons du gène n'ont pas pu être amplifiés et séquencés par méthode Sanger, malgré de nombreuses tentatives avec différentes conditions d'amplification. Ces multiples essais nous permettent d'affirmer que l'impossibilité d'amplifier l'ADN n'est pas due aux conditions expérimentales de PCR mais à l'ADN lui-même, probablement trop dégradé. Nous notons que, pour la grande majorité, les amplicons n'ayant pas pu être amplifiés sont ceux dont la taille dépasse 350 pb. En parallèle, le séquençage par technique NGS qui nécessite de l'ADN fragmenté en petites séquences de tailles inférieures à 150 pb a été une réussite. Les alternatives pour réussir à analyser complètement le gène *MEN1* par méthode Sanger seraient de « designer » de nouveaux couples d'amorces dont les amplicons générés feraient moins de 200 pb ou bien de séquencer le gène *MEN1* par NGS. Toutefois, suite à l'analyse des 13 gènes du panel « Méningiome », il ne nous semble pas pertinent de poursuivre les investigations sur le gène *MEN1* chez ce patient. En effet, nous avons mis en évidence un variant pathogène ainsi qu'une perte d'hétérozygotie dans le gène *NF2*. Ce variant entraîne l'apparition d'un codon STOP prématuré et produit un ARNm soumis aux mécanismes de dégradation cellulaire NMD et donc certainement une absence de synthèse de la protéine. *NF2* est le gène le plus fréquemment impliqué dans les méningiomes, d'origine sporadique comme constitutionnelle, et dans 75% des méningiomes de grade II [94]. Il y a donc une exacte corrélation génotype-phénotype chez le patient 1. Les deux variants dans *PIK3CA* retrouvés à une fréquence de 10% viennent certainement potentialiser dans un second temps la tumorigenèse initiée par la mutation de *NF2*.

Dans la cohorte n°2, les analyses réalisées sur le gène *MEN1* n'ont révélé l'existence d'aucune anomalie ponctuelle (tableau 20). L'analyse par MLPA s'est révélée plus complexe, en raison de la nature tumorale des échantillons, et de l'absence d'échantillon contrôle du même type et du même mode d'extraction permettant une analyse optimale. Dans chaque manipulation sont inclus des échantillons témoins négatifs, auxquels sont normalisés les échantillons patients. Ce sont théoriquement des ADN de même qualité que les ADN étudiés, pour lesquels les gènes ciblés par le kit de MLPA sont connus pour être en nombre de copies normal, c'est-à-dire ni délétés ni dupliqués. Une première analyse avec des échantillons négatifs d'ADN génomique issus d'une manipulation précédente a été réalisée et a permis d'identifier 5 tumeurs normales au sein de notre cohorte. Une autre analyse a alors été lancée en les utilisant comme témoins négatifs permettant ainsi d'analyser les autres patients avec des témoins issus de prélèvements de même nature (ADN somatique). Nous avons ainsi pu mettre en évidence 3 pertes d'hétérozygotie du gène *MEN1* sur les 20 méningiomes analysés (méningiomes M356, M358 et M382, tableau 20).

Patient	Grade oms	Gène muté	Mutation	Fréquence	<i>MEN1</i>	<i>NF2</i>
M24	I	<i>TRAF7</i>	c.1862A>G p.(Tyr621Cys)	36%	N	N
M25	I	Aucun			N	N
M253	I et I	Aucun			N	N
M254	I	<i>AKT1</i>	c.49G>A p.(Glu17Lys)	32%	N	N
M255	I	<i>NF2</i>			N	Dupliqué
M256	I	<i>NF2</i>	c.139delT p.(Phe47Leufs*76)	44%	N	Déléte
M257	II	<i>NF2</i>			N	Déléte
M258	I	Aucun			N	N
M260	I	<i>TRAF7</i>	c.1606G>A p.(Gly536Ser)	36%	N	N
M261	I	<i>TRAF7 et KLF4</i>	c.1675G>T p.(Gly559Cys) et c.1225A>C p.(Lys409Gln)	42% et 47%	N	N
M263	I	<i>TRAF7</i>	c.1911G>C p.(Gln637His)	24%	N	N
M265	I	<i>NF2</i>			N	Déléte
M275	I	<i>SMO</i>	c.1234C>T p.(Leu412Phe)	28%	N	N
M341	I	<i>TRAF7</i>	c.1559A>G p.(Asn520Ser)	14%	N	N
M343	I	<i>AKT1</i>	c.49G>A p.(Glu17Lys)	39%	N	N
M356	I	<i>MEN1</i>			Déléte	N
M358	I	<i>PIK3CA MEN1</i>	c.3140A>G p.(His1047Arg)	26%	Déléte	N
M369	I	Aucun			N	N
M370	I	Aucun			N	N
M372	I	Aucun			N	N
M382	II	<i>NF2</i>	c.1021C>T p.(Arg341Ter)	44%	Déléte	Déléte
		<i>MEN1</i>				

Tableau 16 : Résumé de tous les résultats obtenus chez les patients de la cohorte n°2 (N = nombre de copies normal).

Grâce à l'analyse NGS des tumeurs de la cohorte n°2 nous avons recherché l'existence d'autres anomalies initiatrices de la tumorigenèse. Parmi les 21 patients analysés en NGS, 14 présentent une mutation dans l'un des 13 gènes de susceptibilité aux méningiomes (tableau 20). Les résultats en termes de fréquence et de type d'anomalies sont concordants avec ceux observés dans la littérature. Les deux méningiomes atypiques de grade II de la cohorte (M257 et M382) sont porteurs d'anomalies dans *NF2*. La tumeur M257 présente une délétion du gène et la tumeur M382, une délétion associée à une mutation STOP. Ici encore, la corrélation génotype (anomalie dans *NF2*) – phénotype (méningiome de grade II) est vérifiée. Le patient M382 présente également une LOH de *MEN1* qui dans ce contexte ne semble pas être l'évènement initiateur de la tumorigenèse. Le patient M356 pour lequel aucun évènement n'avait été mis en évidence, ainsi que le patient M358 pour lequel une mutation a été mise en évidence dans le gène *PIK3CA*, présentent une LOH de *MEN1*.

En conclusion, pour la seconde fois, nous avons mis en évidence une LOH de *MEN1* dans un méningiome survenu dans un contexte de mutation germinale de *MEN1*. Nous avons suspecté une association entre le gène *MEN1* et les méningiomes méningothéliaux car il s'agit des tumeurs de grade I parmi les plus fréquentes, surreprésentées dans la base NEM1 du GTE (4/5^{ème} des tumeurs analysées en anatomo-pathologie). La mise en évidence de la LOH de *MEN1* chez le patient 2 porteur d'un méningiome méningothélial semble confirmer le rôle de *MEN1* dans la tumorigenèse méningée associée à la NEM1. Il serait nécessaire de poursuivre les investigations mais plusieurs paramètres sont limitants : la NEM1 est une maladie rare, le méningiome est une lésion rare de cette maladie et les méningiomes ne sont pas toujours opérés.

De plus, dans notre cohorte de méningiomes méningothéliaux sporadiques, nous observons une LOH de *MEN1* dans 15% des cas, ce qui est supérieur à la fréquence rapportée par Clark et al. [94] de la perte du chromosome 11q dans les méningiomes de grade I ou II : 5/253 soit 2%. Cependant, dans cette étude, seul 1 méningiome méningothélial sur 85 présentait une perte du chromosome 11, associée à de nombreuses anomalies chromosomiques de grandes tailles ou focalisées, sans anomalie du gène *NF2*. Dans une série de 19 méningiomes non méningothéliaux de grade I ou II analysés par MLPA du gène *MEN1* au laboratoire, nous avons retrouvé une seule LOH du gène *MEN1* dans un méningiome fibroblastique de la fosse temporale chez un patient de 79 ans (données non présentées dans ce rapport). En l'état, les analyses réalisées sur cette cohorte ne permettent pas d'impliquer le gène *MEN1* comme gène « driver » de la tumorigenèse des méningiomes méningothéliaux

sporadiques. Néanmoins, l'étude des méningiomes sporadiques doit donc être poursuivie, d'autant plus que dans cette cohorte, seuls 7 méningiomes étaient de réels « bons » candidats à une implication de *MEN1* dans la tumorigenèse. En effet, dans les 14 autres, des mutations « driver » dans les gènes du panel méningiome avaient été mises en évidence.

Par ailleurs, il serait intéressant de mieux connaître l'histoire clinique des patients atteints de NEM1 et ayant développé un méningiome. En effet, dans la littérature, de nombreux cas de méningiomes secondaires à la radiothérapie sont référencés [110]–[112]. Ce type de thérapie est notamment utilisé dans la prise en charge des adénomes hypophysaires que peuvent présenter les patients atteints de NEM1. Il serait intéressant de comparer le statut mutationnel de *MEN1* chez des patients ayant été traités par radiothérapie par rapport à des patients n'ayant pas eu ce traitement. On pourrait imaginer par exemple que la radiothérapie serait le facteur environnemental à l'origine de la perte du bras long du chromosome 11 et donc à l'origine de l'événement secondaire entraînant par la suite la néoplasie.

Concernant les épendymomes de la cohorte n°1, seuls 3 ont pu être analysés sur les 4 inclus initialement. Le matériel tumoral du patient 6 était trop dégradé pour permettre une extraction d'ADN de qualité et quantité suffisante à l'amplification. Deux des trois épendymomes analysés, ceux des patients 3 et 5, présentent une LOH de *MEN1*. Chez le patient 4, la mutation germinale n'a pas été retrouvée dans la tumeur et aucune variation pathogène n'a été retrouvée après séquençage complet du gène *MEN1*. Face à ce résultat, nous avons décidé d'exclure le patient de notre cohorte car nous ne pouvons pas exclure une erreur d'identité du prélèvement. Toutefois, la présence uniquement de l'allèle sauvage pourrait également être due à une perte de l'allèle muté. Pour vérifier cette hypothèse, une analyse du nombre de copies du gène par technique qPCR nous permettrait de savoir si un allèle est en effet manquant ou non. Concernant le patient 3, nous avons également mis en évidence une LOH de *NF2*, associée à celle de *MEN1*. Chez le patient 5, la valeur intermédiaire du RQ obtenue, en faveur d'une délétion de *NF2*, pourrait traduire une perte d'hétérozygotie non homogène au sein de la tumeur ou une contamination par de l'ADN sanguin normal.

Grâce à notre étude, nous avons pu mettre en évidence pour la première fois une perte d'hétérozygotie de *MEN1* dans les épendymomes survenus dans un contexte de mutation germinale de NEM1. Pour en savoir plus sur le rôle de *MEN1* dans le développement de ces tumeurs, il serait intéressant de poursuivre les analyses sur ces tumeurs, notamment à la

recherche de mutation somatique de *NF2*. En effet, *NF2* est un gène fréquemment muté dans les épendymomes [113].

Une étude sur un plus grand nombre de patients ayant développé ce type de tumeur dans le cadre d'une néoplasie endocrinienne multiple de type 1 nous permettrait de savoir s'il existe réellement un lien de causalité entre une atteinte de *MEN1* et les épendymomes. De même, une étude sur des épendymomes sporadiques nous aiderait à mieux connaître le rôle de *MEN1*.

Bibliographie

- [1] S. C. Chandrasekharappa *et al.*, “Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1,” *Science (80-.)*, vol. 276, no. 5311, pp. 404–406, Apr. 1997.
- [2] F. Marini *et al.*, “Multiple endocrine neoplasia type 1,” 2006.
- [3] F. Giusti, F. Marini, and M. L. Brandi, “Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” in *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set*, vol. 2, 2008, pp. 1345–1374.
- [4] R. V. Thakker *et al.*, “Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1),” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 97, no. 9, pp. 2990–3011, Sep-2012.
- [5] B. Asgharian *et al.*, “Meningiomas May Be a Component Tumor of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 3, pp. 869–880, Feb. 2004.
- [6] J. Erdheim, “Zur normalem und pathologischen istologie der glandola thyroidea, parathyroidea, und hypophysis.,” *Beitr Pathol Anat.*, vol. 33, no. 158, p. 236, 1903.
- [7] H. Cushing and L. Davidoff, “The Pathological Findings in Four Autopsied Cases of Acromegaly,” *Rockefeller Inst. Med.*, 1927.
- [8] L. O. Underdahl, L. B. Woolner, and B. M. Black, “Multiple endocrine adenomas: Report of 8 cases in which the parathyroids, pituitary and pancreatic islets were involved,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 13, no. 1, pp. 20–47, 1953.
- [9] P. Wermer, “Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands,” 1954.
- [10] R. M. Zollinger and E. H. Ellison, “Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas,” 1955.
- [11] D. J. Lulu, T. E. Corcoran, and M. Andre, “Familial endocrine adenomatosis with associated zollinger-ellison syndrome. Wermer’s syndrome,” 1968.
- [12] M. L. Brandi *et al.*, “Parathyroid Mitogenic Activity in Plasma from Patients with Familial Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 314, no. 20, pp. 1287–1293, May 1986.
- [13] R. N. Schimke, “Genetic Aspects of Multiple Endocrine Neoplasia,” *Annu. Rev. Med.*, vol. 35, no. 1, pp. 25–31, Feb. 1984.
- [14] M. L. Brandi *et al.*, “Consensus: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2,” in *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001, vol. 86, no. 12, pp. 5658–5671.
- [15] G. Di Meo, L. I. Sgaramella, V. Ferraro, F. P. Prete, A. Gurrado, and M. Testini, “Parathyroid carcinoma in multiple endocrine neoplasm type 1 syndrome: case report and systematic literature review,” *Clinical and Experimental Medicine*, vol. 18, no. 4, Springer-Verlag Italia s.r.l., pp. 585–593, 01-Nov-2018.
- [16] R. Rizzoli, J. Green, and S. J. Marx, “Primary hyperparathyroidism in familial multiple endocrine neoplasia type I. Long-term follow-up of serum calcium levels after parathyroidectomy,” *Am. J. Med.*, vol. 78, no. 3, pp. 467–474, 1985.
- [17] M. L. De Feo *et al.*, “Parathyroid glands: Combination of ^{99m}Tc MIBI scintigraphy and US for demonstration of parathyroid glands and nodules,” *Radiology*, vol. 214, no. 2, pp. 393–402, 2000.
- [18] F. L. De Menezes Montenegro *et al.*, “Could the less-than subtotal parathyroidectomy be an option for

- treating young patients with multiple endocrine neoplasia type 1-related hyperparathyroidism?," *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 10, no. MAR, 2019.
- [19] S. M. Wilhelm *et al.*, "The American Association of Endocrine Surgeons Guidelines for Definitive Management of Primary Hyperparathyroidism.," *JAMA Surg.*, vol. 151, no. 10, pp. 959–968, 2016.
- [20] J. Waldmann, C. L. López, P. Langer, M. Rothmund, and D. K. Bartsch, "Surgery for multiple endocrine neoplasia type 1-associated primary hyperparathyroidism," *Br. J. Surg.*, vol. 97, no. 10, pp. 1528–1534, Oct. 2010.
- [21] F. Tonelli, T. Marcucci, G. Fratini, M. S. Tommasi, A. Falchetti, and M. L. Brandi, "Is Total Parathyroidectomy the Treatment of Choice for Hyperparathyroidism in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1?," *Ann. Surg.*, vol. 246, no. 6, pp. 1075–1082, Dec. 2007.
- [22] N. Nilubol *et al.*, "Utility of intraoperative parathyroid hormone monitoring in patients with multiple endocrine neoplasia type 1-associated primary hyperparathyroidism undergoing initial parathyroidectomy," *World J. Surg.*, vol. 37, no. 8, pp. 1966–1972, Aug. 2013.
- [23] F. Giusti *et al.*, "Cinacalcet therapy in patients affected by primary hyperparathyroidism associated to Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome type 1 (MEN1).," *Endocrine*, vol. 52, no. 3, pp. 495–506, Jun. 2016.
- [24] M. F. Le Bodic *et al.*, "Immunohistochemical study of 100 pancreatic tumors in 28 patients with multiple endocrine neoplasia, type I," *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1378–1384, Nov. 1996.
- [25] M. H. Singh, D. L. Fraker, and D. C. Metz, "Importance of Surveillance for Multiple Endocrine Neoplasia-1 and Surgery in Patients With Sporadic Zollinger-Ellison Syndrome," *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 10, no. 11, pp. 1262–1269, Nov. 2012.
- [26] P. Goudet *et al.*, "Gender-related differences in MEN1 lesion occurrence and diagnosis: A cohort study of 734 cases from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 165, no. 1, pp. 97–105, Jul. 2011.
- [27] J. A. Norton *et al.*, "Surgery to Cure the Zollinger–Ellison Syndrome," *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, no. 9, pp. 635–644, Aug. 1999.
- [28] U. Plöckinger, "Diagnosis and treatment of gastrinomas in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1)," *Cancers*, vol. 4, no. 1, pp. 39–54, Mar-2012.
- [29] E. M. Wolin, "The expanding role of somatostatin analogs in the management of neuroendocrine tumors," *Gastrointestinal Cancer Research*, vol. 5, no. 5, pp. 161–168, Sep-2012.
- [30] J. A. Norton, D. S. Foster, T. Ito, and R. T. Jensen, "Gastrinomas: Medical or Surgical Treatment," *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, vol. 47, no. 3, W.B. Saunders, pp. 577–601, 01-Sep-2018.
- [31] L. G. Valente, K. Antwi, G. P. Nicolas, D. Wild, and E. Christ, "Clinical presentation of 54 patients with endogenous hyperinsulinaemic hypoglycaemia: a neurological chameleon (observational study).," *Swiss Med. Wkly.*, vol. 148, p. w14682, 2018.
- [32] A. M. McLean and P. D. Fairclough, "Endoscopic ultrasound in the localisation of pancreatic islet cell tumours," *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 19, no. 2, Bailliere Tindall Ltd, pp. 177–193, 2005.
- [33] A. F. Scarsbrook, R. V. Thakker, J. A. H. Wass, F. V. Gleeson, and R. R. Phillips, "Multiple endocrine

- neoplasia: Spectrum of radiologic appearances and discussion of a multitechnique imaging approach,” *Radiographics*, vol. 26, no. 2. pp. 433–451, Mar-2006.
- [34] F. Giudici, G. Nesi, M. L. Brandi, and F. Tonelli, “Surgical Management of Insulinomas in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” *Pancreas*, vol. 41, no. 4, pp. 547–553, May 2012.
- [35] É. Baudin *et al.*, “Recommandations pour la prise en charge de l’insulinome malin,” *Press. Medicale*, vol. 43, no. 6P1, pp. 645–659, 2014.
- [36] G. Åkerström and P. Hellman, “Surgery on neuroendocrine tumours,” *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 21, no. 1. pp. 87–109, Mar-2007.
- [37] L. Thomas-Marques *et al.*, “Prospective endoscopic ultrasonographic evaluation of the frequency of nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1,” *Am. J. Gastroenterol.*, vol. 101, no. 2, pp. 266–273, Feb. 2006.
- [38] P. J. Newey *et al.*, “Asymptomatic Children with Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Mutations May Harbor Nonfunctioning Pancreatic Neuroendocrine Tumors,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 94, no. 10, pp. 3640–3646, Oct. 2009.
- [39] F. Triponez *et al.*, “Is surgery beneficial for MEN1 patients with small (≤ 2 cm), nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumor? An analysis of 65 patients from the GTE,” *World J. Surg.*, vol. 30, no. 5, pp. 654–662, May 2006.
- [40] B. Vergès *et al.*, “Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 Multicenter Study,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 2, pp. 457–465, Feb. 2002.
- [41] J. Trouillas *et al.*, “Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): A case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients,” *Am. J. Surg. Pathol.*, vol. 32, no. 4, pp. 534–543, Apr. 2008.
- [42] A. Beckers, D. Betea, H. V. Socin, and A. Stevenaert, “The treatment of sporadic versus MEN1-related pituitary adenomas,” *J. Intern. Med.*, vol. 253, no. 6, pp. 599–605, Jun. 2003.
- [43] P. Goudet *et al.*, “Thymic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: A comparative study on 21 cases among a series of 761 MEN1 from the GTE (Groupe des Tumeurs Endocrines),” *World J. Surg.*, vol. 33, no. 6, pp. 1197–1207, 2009.
- [44] B. T. Teh *et al.*, “Clinicopathologic Studies of Thymic Carcinoids in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 76, no. 1, pp. 21–29, Jan. 1997.
- [45] P. Goudet *et al.*, “Risk factors and causes of death in men1 disease. a gte (groupe d’etude des tumeurs endocrines) cohort study among 758 patients,” *World J. Surg.*, vol. 34, no. 2, pp. 249–255, Feb. 2010.
- [46] M. J. Berna *et al.*, “A prospective study of gastric carcinoids and enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 and Zollinger-Ellison syndrome: Identification of risk factors,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 93, no. 5, pp. 1582–1591, 2008.
- [47] J. Manoharan, M. B. Albers, and D. K. Bartsch, “The future: diagnostic and imaging advances in MEN1 therapeutic approaches and management strategies,” *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 24, no. 10, pp. T209–T225, 2017.
- [48] S. Schaefer *et al.*, “Natural course of small adrenal lesions in multiple endocrine neoplasia type 1: an endoscopic ultrasound imaging study,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 158, pp. 699–704.
- [49] P. Langer *et al.*, “Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1,” in *World Journal of*

- Surgery*, 2002, vol. 26, no. 8, pp. 891–896.
- [50] A. Vidal, M. Iglesias, B. Fernández, E. Fonseca, and F. Cordido, “Cutaneous lesions associated to multiple endocrine neoplasia syndrome type 1,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.*, vol. 22, no. 7, pp. 835–838, Jul. 2008.
- [51] K. M. A. Dreijerink, P. Goudet, J. R. Burgess, and G. D. Valk, “Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1,” *New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 6. Massachusetts Medical Society, pp. 583–584, 07-Aug-2014.
- [52] R. S. van Leeuwen *et al.*, “MEN1-Dependent Breast Cancer: Indication for Early Screening? Results From the Dutch MEN1 Study Group,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 102, no. 6, pp. 2083–2090, Jun. 2017.
- [53] S. Banik, P. S. Hasleton, and R. L. Lyon, “An unusual variant of multiple endocrine neoplasia syndrome: a case report,” *Histopathology*, vol. 8, no. 1, pp. 135–144, Jan. 1984.
- [54] J. P. Chigot, S. Bendib, G. Turpin, and P. Benlian, “[Characteristic pathological associations in multiple endocrine neoplasia type 1],” *Presse Med.*, vol. 25, no. 27, pp. 1229–33, Sep. 1996.
- [55] H. Kato *et al.*, “CASE REPORT Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Associated with Spinal Ependymoma,” 1996.
- [56] S. Giraud *et al.*, “A Large Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Family with Clinical Expression Suggestive of Anticipation*,” 1997.
- [57] A. K. Cuevas-Ocampo *et al.*, “Genetic confirmation that ependymoma can arise as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome,” *Acta Neuropathol.*, vol. 133, no. 4, pp. 661–663, 2017.
- [58] A. Al-Salameh *et al.*, “Intracranial ependymoma associated with multiple endocrine neoplasia type 1,” *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 33, no. 5, pp. 353–356, 2010.
- [59] S. K. Agarwal *et al.*, “Molecular pathology of the MEN1 gene,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1014. New York Academy of Sciences, pp. 189–198, Apr-2004.
- [60] Y. S. Kim *et al.*, “Stable overexpression of MEN1 suppresses tumorigenicity of RAS,” *Oncogene*, vol. 18, no. 43, pp. 5936–5942, Oct. 1999.
- [61] S. Matkar, A. Thiel, and X. Hua, “Menin: a scaffold protein that controls gene expression and cell signaling,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 38, no. 8, pp. 394–402, Aug. 2013.
- [62] M. C. Lemos and R. V Thakker, “MUTATION UPDATE Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): Analysis of 1336 Mutations Reported in the First Decade Following Identification of the Gene,” *Hum. Mutat.*, vol. 29, no. 1, 2008.
- [63] N. Hai, N. Aoki, A. Matsuda, T. Mori, and S. Kosugi, “Germline MEN1 mutations in sixteen Japanese families with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1),” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 141, no. 5, pp. 475–480, 1999.
- [64] A. Morelli *et al.*, “MEN1 gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1,” *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 142, no. 2, pp. 131–137, Feb. 2000.
- [65] E. Tham, U. Grandell, E. Lindgren, G. Toss, B. Skogseid, and M. Nordenskjöld, “EXTENSIVE CLINICAL EXPERIENCE Clinical Testing for Mutations in the MEN1 Gene in Sweden: A Report on 200 Unrelated Cases,” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 92, pp. 3389–3395, 2007.
- [66] C. Larsson, B. Skogseid, K. Öberg, Y. Nakamura, and M. Nordenskjöld, “Multiple endocrine neoplasia

- type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma,” *Nature*, vol. 332, no. 6159, pp. 85–87, 1988.
- [67] A. G. Knudson, “Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 68, no. 4, pp. 820–823, Apr. 1971.
- [68] M. A. Kouvaraki *et al.*, “Genotype-phenotype analysis in multiple endocrine neoplasia type 1,” *Arch. Surg.*, vol. 137, no. 6, pp. 641–647, Jun. 2002.
- [69] J. H. D. Bassett *et al.*, “Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 62, no. 2, pp. 232–244, Feb. 1998.
- [70] B. T. Teh *et al.*, “Clinicopathologic Studies of Thymic Carcinoids in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 76, no. 1, pp. 21–29, Jan. 1997.
- [71] B. T. Teh *et al.*, “Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1,” *Ann. Surg.*, vol. 228, no. 1, pp. 99–105, Jul. 1998.
- [72] B. M. Cavaco *et al.*, “Mutational analysis of Portuguese families with multiple endocrine neoplasia type 1 reveals large germline deletions,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 56, no. 4, pp. 465–473, Apr. 2002.
- [73] D. Trump *et al.*, “Clinical studies of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1),” *QJM*, vol. 89, no. 9, pp. 653–670, Sep. 1996.
- [74] X. Gao, R. Zhang, Y. Mao, and Y. Wang, “Childhood and juvenile meningiomas,” *Child’s Nerv. Syst.*, vol. 25, no. 12, pp. 1571–1580, Dec. 2009.
- [75] P. Kleihues, P. C. Burger, and B. W. Scheithauer, *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System, World Health Organization, Geneva*. 1979.
- [76] D. N. Louis *et al.*, “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system,” *Acta Neuropathologica*, vol. 114, no. 2. Springer, pp. 97–109, 06-Aug-2007.
- [77] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” *Acta Neuropathologica*, vol. 131, no. 6. Springer Verlag, pp. 803–820, 01-Jun-2016.
- [78] I. Baldi *et al.*, “Epidemiology of meningiomas,” *Neurochirurgie*, vol. 64, no. 1. Elsevier Masson SAS, pp. 5–14, 01-Mar-2018.
- [79] D. N’Dri, M. Ben Ismail, P. François, and M. Jan, “Analyse du devenir post-opératoire des méningiomes intracrâniens,” *Neurochirurgie*, vol. 51, no. 5, p. 535, 2005.
- [80] S. Zouaoui *et al.*, “Recensement national histologique des tumeurs primitives du système nerveux central: Résultats généraux sur 40 000 cas, principales applications actuelles et perspectives,” *Neurochirurgie*, vol. 58, no. 1, pp. 4–13, Feb. 2012.
- [81] J. Brunon, “Les méningiomes - Campus de Neurochirurgie.” [Online]. Available: <http://campus.neurochirurgie.fr/spip.php?article367>. [Accessed: 22-Feb-2020].
- [82] I. R. Whittle, C. Smith, P. Navoo, and D. Collie, “Meningiomas,” in *Lancet*, 2004, vol. 363, no. 9420, pp. 1535–1543.
- [83] M. I. Vargas *et al.*, “Les méningiomes rachidiens extraduraux: Données IRM à propos de deux observations,” *J. Neuroradiol.*, vol. 31, no. 3, pp. 214–219, Jun. 2004.
- [84] F. Gray and J. Poirier, “Neuropathologies des tumeurs intra-crâniennes,” *Campus de Neurochirurgie*, 2008. [Online]. Available: <http://campus.neurochirurgie.fr/spip.php?article378>. [Accessed: 22-Feb-

- 2020].
- [85] R. Lüllmann-Rauch, *Histologie - De Boeck Supérieur*. 2008.
- [86] A. Surov *et al.*, “Distant metastases in meningioma: An underestimated problem,” *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 112, no. 3. Springer, pp. 323–327, 13-May-2013.
- [87] A. R. Asthagiri *et al.*, “Neurofibromatosis type 2,” *The Lancet*, vol. 373, no. 9679. Elsevier, pp. 1974–1986, 06-Jun-2009.
- [88] H. Zankl and K. D. Zang, “Cytological and cytogenetical studies on brain tumors - IV. Identification of the missing G chromosome in human meningiomas as No. 22 by fluorescence technique,” *Humangenetik*, vol. 14, no. 2, pp. 167–169, Jun. 1972.
- [89] M. Peyre and M. Kalamarides, “Molecular genetics of meningiomas: Building the roadmap towards personalized therapy,” *Neurochirurgie*, vol. 64, no. 1. Elsevier Masson SAS, pp. 22–28, 01-Mar-2018.
- [90] P. K. Brastianos *et al.*, “Genomic sequencing of meningiomas identifies oncogenic SMO and AKT1 mutations,” *Nat. Genet.*, vol. 45, no. 3, pp. 285–289, Mar. 2013.
- [91] V. E. Clark *et al.*, “Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO,” *Science (80-.)*, vol. 339, no. 6123, pp. 1077–1080, Mar. 2013.
- [92] M. Abedalthagafi *et al.*, “Oncogenic PI3K mutations are as common as AKT1 and SMO mutations in meningioma.”
- [93] F. Sahn *et al.*, “TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 108, no. 5, p. 377, 2016.
- [94] V. E. Clark *et al.*, “Recurrent somatic mutations in POLR2A define a distinct subset of meningiomas,” *Nat. Genet.*, vol. 48, no. 10, pp. 1253–1259, Oct. 2016.
- [95] S. Yuzawa, H. Nishihara, and S. Tanaka, “Genetic landscape of meningioma,” *Brain Tumor Pathol.*, vol. 33, no. 4, pp. 237–247, Oct. 2016.
- [96] N. Chalhoub and S. J. Baker, “PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, vol. 4, no. 1, pp. 127–150, Feb. 2009.
- [97] J. Vinagre *et al.*, “Frequency of TERT promoter mutations in human cancers,” *Nat. Commun.*, vol. 4, no. 1, pp. 1–6, Jul. 2013.
- [98] M. Preusser, P. K. Brastianos, and C. Mawrin, “Advances in meningioma genetics: Novel therapeutic opportunities,” *Nature Reviews Neurology*, vol. 14, no. 2. Nature Publishing Group, pp. 106–115, 01-Feb-2018.
- [99] S. A. Rempel, K. Schwechheimer, R. L. Davis, W. K. Cavenee, and M. L. Rosenblum, “Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 10 Suppl, pp. 2386–92, May 1993.
- [100] J. Boetto, F. Bielle, M. Sanson, M. Peyre, and M. Kalamarides, “SMO mutation status defines a distinct and frequent molecular subgroup in olfactory groove meningiomas,” *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 3, pp. 345–351, 2017.
- [101] Ü. Yesilöz *et al.*, “Frequent AKT1 E17K mutations in skull base meningiomas are associated with mTOR and ERK1/2 activation and reduced time to tumor recurrence,” *Neuro. Oncol.*, vol. 19, no. 8, pp. 1088–1096, 2017.
- [102] J. Rockhill, M. Mrugala, and M. C. Chamberlain, “Intracranial meningiomas: an overview of diagnosis

- and treatment.,” *Neurosurg. Focus*, vol. 23, no. 4, pp. 1–7, 2007.
- [103] J. Bruna, M. Brell, I. Ferrer, P. Gimenez-Bonafe, and A. Tortosa, “Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma,” *Neuropathology*, vol. 27, no. 2, pp. 114–120, Apr. 2007.
- [104] Haute Autorité de Santé, *Irradiation intracrânienne en conditions stéréotaxiques : les méningiomes – Rapport d’évaluation : Tome I*. 2011.
- [105] “PCR: généralités et animation | RN’ Bio.” [Online]. Available: https://rnbio.sorbonne-universite.fr/bio-mol_pcr1. [Accessed: 25-Feb-2020].
- [106] “Principe de la PCR.” [Online]. Available: <http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/principe/principe.htm>. [Accessed: 25-Feb-2020].
- [107] W. L. Bi, V. C. Prabhu, and I. F. Dunn, “High-grade meningiomas: Biology and implications,” *Neurosurg. Focus*, vol. 44, no. 4, pp. 2–6, 2018.
- [108] R. L. Achey, H. Gittleman, J. Schroer, V. Khanna, C. Kruchko, and J. S. Barnholtz-Sloan, “Nonmalignant and malignant meningioma incidence and survival in the elderly, 2005-2015, using the Central Brain Tumor Registry of the United States,” *Neuro. Oncol.*, vol. 21, no. 3, pp. 380–391, 2019.
- [109] H. Gittleman *et al.*, “Descriptive epidemiology of germ cell tumors of the central nervous system diagnosed in the United States from 2006 to 2015,” *J. Neurooncol.*, vol. 143, no. 2, pp. 251–260, Jun. 2019.
- [110] O. Al-Mefty, C. Topsakal, S. Pravdenkova, J. R. Sawyer, and M. J. Harrison, “Radiation-induced meningiomas: Clinical, pathological, cytogenetic, and cytogenetic characteristics,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 100, no. 6. American Association of Neurological Surgeons, pp. 1002–1013, 01-Jun-2004.
- [111] M. Brada *et al.*, “Risk of second brain tumour after conservative surgery and radiotherapy for pituitary adenoma,” *Br. Med. J.*, vol. 304, no. 6838, pp. 1343–1346, May 1992.
- [112] H. Zattara-Cannoni *et al.*, “Cytogenetic study of six cases of radiation-induced meningiomas,” *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 126, no. 2, pp. 81–84, Apr. 2001.
- [113] K. W. Pajtler *et al.*, “Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups,” *Cancer Cell*, vol. 27, no. 5, pp. 728–743, May 2015.

Annexes

Sample report: M358

Sample type: Sample | Project: P244-C1-MLPA-AIP-MEN1-p27 | Experiment: 2020-05 MLPA-AIP-MEN Meningiomas | Dye: 6-FAM | Performed by: Adriaan
Machine: ABI3500 | Report date: 15/06/2020 | Run date: 15/06/2020 | Software Version: v.140721.1958 | Normal range: 0.7 - 1.3

Authorization
Date

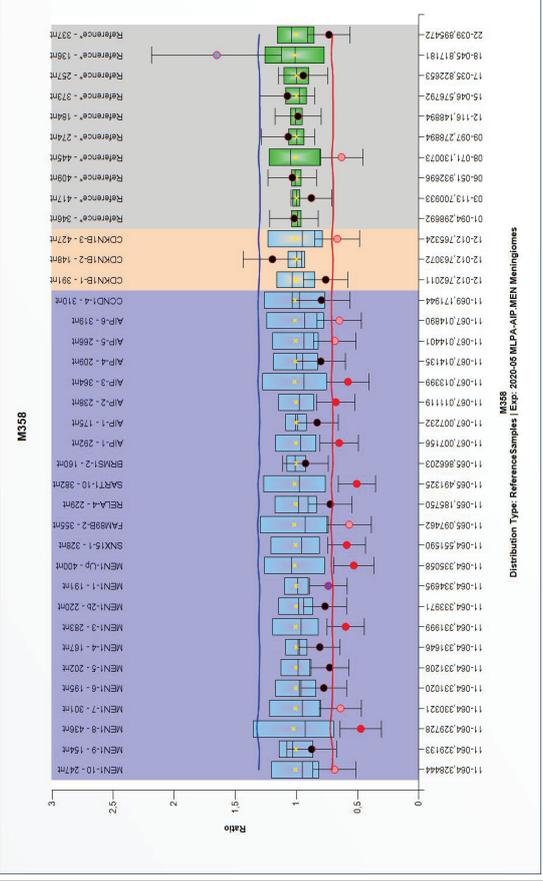
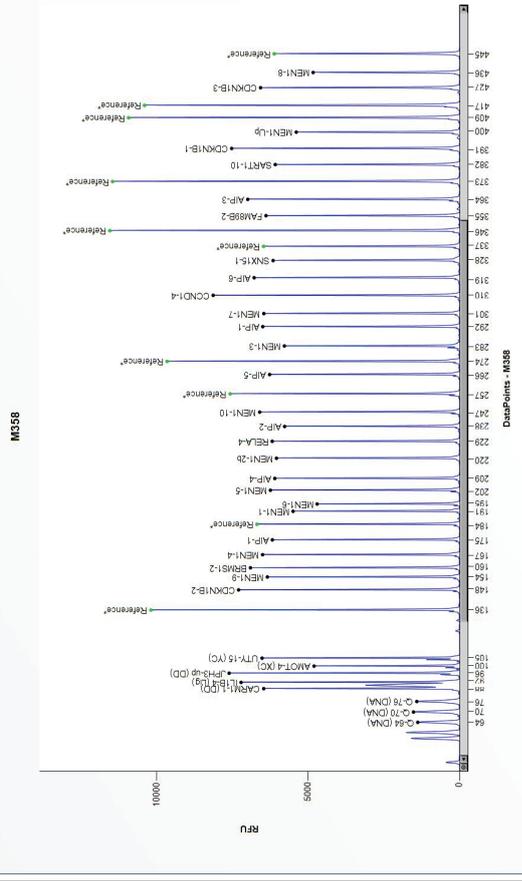
MLPA probe mix: P244-AIP-MEN1-CDKN1B
Lot number: C1-0815
Sheet date: 20/09/2017 16:31:15
Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
Analysis method: Block SSC: On
Used metric: Peak height
Reference Samples: M258 | M260 | M25 | M263 | M253

FRS: OK 100%
FRMS: OK 95%
PSLP: Bad 39%
RSQ: Warning
RPQ: Warning
CAS: Warning 70%

Nr of test probes: 37/37
Nr of ref probes: 10/10
DNA concentration: OK
DNA denaturation: OK
Expected gender: Male
Residual primer %: OK 13%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
247	MEN1-10	11q13.1	11-064,328444	6605	31424	0.69	0.09	<*	?	49	0.1
154	MEN1-9	11q13.1	11-064,329133	6351	28580	0.88	0.1	=	=	49	-0.1
436	MEN1-8	11q13.1	11-064,329728	4839	27370	0.47	0.08	<*	?	50	0.0
301	MEN1-7	11q13.1	11-064,330321	6468	30803	0.64	0.09	<*	?	47	0.1
195	MEN1-6	11q13.1	11-064,331020	4707	21057	0.78	0.09	=	=	34	0.0
202	MEN1-5	11q13.1	11-064,331208	6251	29486	0.73	0.08	=	=	55	0.1
167	MEN1-4	11q13.1	11-064,331646	6509	29264	0.81	0.08	=	=	37	-0.1
283	MEN1-3	11q13.1	11-064,331999	5790	29831	0.6	0.08	<*	?	46	-0.1
220	MEN1-2b	11q13.1	11-064,333971	6049	28085	0.77	0.09	=	=	50	0.1
191	MEN1-1	11q13.1	11-064,334695	5503	24909	0.74	0.08	<*	?	31	0.1
400	SNX15-1	11q13.1	11-064,335058	5395	29835	0.53	0.08	<*	?	37	0.0
328	SNX15-1	11q13.1	11-064,551590	6160	31834	0.59	0.08	<*	?	63	0.2
355	FAM89B-2	11q13.1	11-065,097462	6396	33730	0.57	0.09	<*	?	44	0.0
229	RELA-4	11q13.1	11-065,195750	6190	28099	0.72	0.09	=	=	58	0.0
382	SART1-10	11q13.1	11-065,491325	6090	32585	0.51	0.08	<*	?	58	-0.1
160	BRMS1-2	11q13.2	11-065,866203	6910	29921	0.93	0.09	=	=	39	0.0
292	AIP-1	11q13.2	11-067,007156	6503	30468	0.65	0.08	<*	?	39	0.0
175	AIP-1	11q13.2	11-067,007232	6186	27174	0.83	0.09	=	=	41	0.0
238	AIP-2	11q13.2	11-067,011119	5781	27220	0.68	0.08	<*	?	35	0.1
364	AIP-3	11q13.2	11-067,013399	6999	38375	0.58	0.09	<*	?	51	0.1
209	AIP-4	11q13.2	11-067,014135	6105	27709	0.8	0.1	=	=	53	0.1
266	AIP-5	11q13.2	11-067,014401	6278	29980	0.69	0.09	<*	?	49	0.1
319	AIP-6	11q13.2	11-067,014890	6788	33365	0.65	0.09	<*	?	57	0.1
391	CDKN1B-1	12p13.1	12-012,762011	8141	39529	0.8	0.12	=	=	33	0.0
148	CDKN1B-2	12p13.1	12-012,763072	7302	32376	1.2	0.12	=	=	47	0.0
427	CDKN1B-3	12p13.1	12-012,765324	6576	37267	0.67	0.09	<*	?	34	0.0
346	Reference*	01p22.1	01-094,298692	11554	57928	1.02	0.1	=	=	43	0.1
417	Reference*	03q13.2	03-113,700933	10408	59948	0.88	0.08	=	=	49	0.0
409	Reference*	09p12.2	06-051,932696	10935	60996	1.03	0.1	=	=	58	0.1
445	Reference*	08q13.3	08-071,130073	6123	34318	0.63	0.09	<*	?	53	0.1
274	Reference*	09q22.32	09-097,278894	6660	45257	1.07	0.11	=	=	39	0.0
184	Reference*	12q24.22	12-116,148894	6696	30366	0.99	0.09	=	=	39	-0.1
373	Reference*	15q21.1	15-046,576792	11463	61138	1.08	0.11	=	=	66	0.1
257	Reference*	17q21.2	17-035,822653	7581	36271	0.94	0.1	=	=	51	0.1
136	Reference*	18q21.1	18-045,817181	10197	45098	1.65	0.27	>*	?	51	0.0
337	Reference*	22q13.2	22-039,895472	6476	33465	0.73	0.09	=	=	64	0.0
6476				6476	31424	0.74	0.09			49	0.03

Median value all probe values:



Normal range: 0.7 - 1.3. Essential information on the use of this product is present in the product description which is available on <http://www.mba.com>. For questions, mailto:info@mba.com. Probes located in the MEN1 and AIP gene, as well as certain flanking probes, are located within, or close to, a very strong CpG island and can give false positive deletions in DNA samples containing salt. Please check the 88 and 96 nt DNA denaturation control probes in case of a low probe signal. See Product Description for the identity of these probes. ... Please see the product description for all notifications.

Sample report: M382

Sample type: Sample | Project: P244-C1-MLPA-AIP-MEN1-p27 | Experiment: 2020-05 MLPA-AIP-MEN Meningiomes | Dye: 6-FAM | Performed by: Adriaan
Machine: ABI3500 | Report date: 15/06/2020 | Software Version: v.140721.1958 | Normal range: 0.7 - 1.3

Authorization
Date

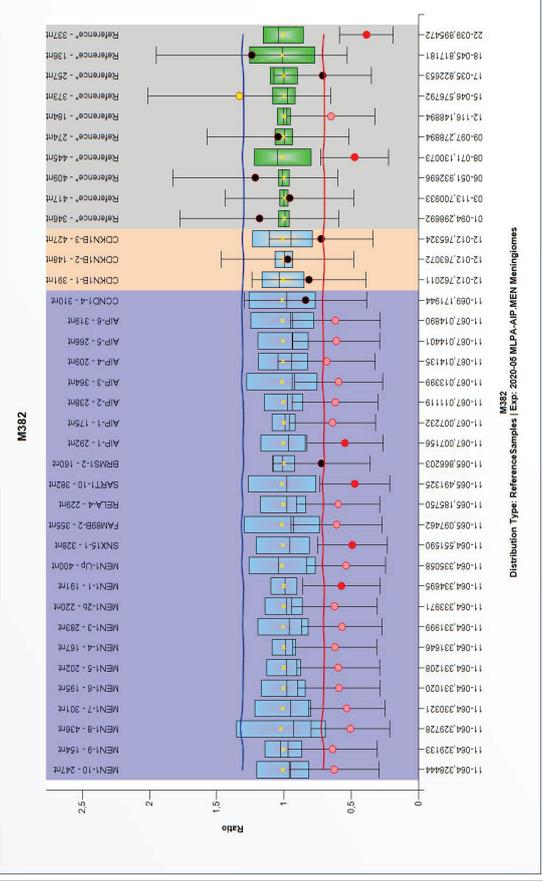
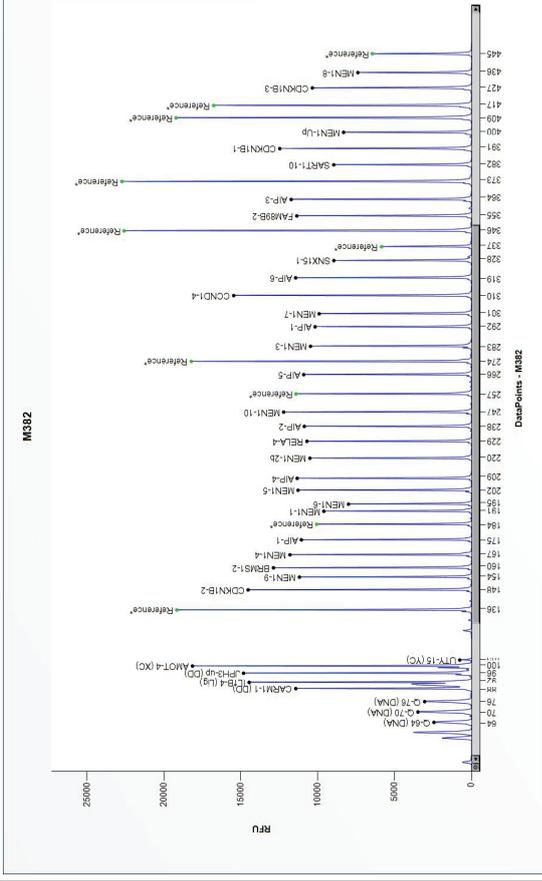
MLPA probe mix: P244-AIP-MEN1-CDKN1B
Lot number: C1-0815
Sheet date: 20/09/2017 16:31:15
Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 (A2-0)
Analysis method: Block SSC; On
Used metric: Peak height
Reference Samples: M258 | M260 | M25 | M263 | M253

FRS: OK 100%
FRMS: OK 85%
PSLP: Bad 78%
RSQ: OK
RPQ: Bad
CAS: Warning 55%

Nr of ref probes: 10/10
DNA concentration: OK
DNA denaturation: OK
Expected gender: Female
Residual primer %: OK 13%

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	df[nt]
247	MEN1-10	11q13.1	11-064.328444	12227	58863	0.63	0.17	<*	?	37	0.0
154	MEN1-9	11q13.1	11-064.329133	11198	50198	0.64	0.17	<*	<*	42	-0.1
436	MEN1-8	11q13.1	11-064.329728	7400	44034	0.51	0.15	<*	?	59	-0.1
301	MEN1-7	11q13.1	11-064.330321	9916	50714	0.53	0.14	<*	<*	50	0.0
195	MEN1-6	11q13.1	11-064.331020	8008	37208	0.59	0.15	<*	<*	37	0.0
202	MEN1-5	11q13.1	11-064.331208	11289	52004	0.6	0.15	<*	<*	46	-0.1
167	MEN1-4	11q13.1	11-064.331646	11812	53256	0.62	0.16	<*	<*	46	-0.1
283	MEN1-3	11q13.1	11-064.331999	10475	52695	0.57	0.15	<*	?	42	0.0
220	MEN1-2b	11q13.1	11-064.333971	10515	49101	0.63	0.16	<*	?	42	0.0
191	MEN1-1	11q13.1	11-064.334695	9611	44079	0.57	0.14	<*	<*	33	0.0
400	MEN1-Up	11q13.1	11-064.335058	8328	46672	0.54	0.15	<*	?	35	0.0
328	SNX15-1	11q13.1	11-064.551590	8959	47302	0.49	0.13	<*	?	71	0.0
355	FAM89B-2	11q13.1	11-065.097462	11370	60027	0.61	0.17	<*	?	36	-0.1
229	RELA-4	11q13.1	11-065.185790	10709	50649	0.6	0.16	<*	?	49	0.0
382	SART1-10	11q13.1	11-065.491325	8967	48402	0.48	0.13	<*	?	49	-0.1
160	BRMS1-2	11q13.2	11-065.866203	12888	57844	0.72	0.18	=	=	46	-0.1
292	AIP-1	11q13.2	11-067.007156	10178	49194	0.55	0.14	<*	?	49	-0.1
175	AIP-2	11q13.2	11-067.007232	11072	48638	0.64	0.16	<*	?	39	-0.1
364	AIP-3	11q13.2	11-067.011119	10880	52597	0.62	0.16	<*	?	53	0.0
209	AIP-4	11q13.2	11-067.014135	11344	50906	0.69	0.18	<*	?	47	0.0
266	AIP-5	11q13.2	11-067.014401	10919	52334	0.61	0.16	<*	?	41	0.1
319	AIP-6	11q13.2	11-067.014890	11446	57637	0.62	0.17	<*	?	50	0.0
310	CCND1-4	11q13.3	11-069.171944	15476	76215	0.84	0.23	=	=	53	0.0
391	CDKN1B-1	12p13.1	12-012.762011	12477	68735	0.82	0.21	=	=	57	0.0
148	CDKN1B-2	12p13.1	12-012.763072	14535	64624	0.97	0.25	=	=	34	0.0
427	CDKN1B-3	12p13.1	12-012.765324	10358	60775	0.72	0.19	=	=	58	0.0
346	Reference*	01p22.1	01-094.298692	22601	117078	1.18	0.3	=	=	43	0.0
417	Reference*	03q13.2	03-113.700933	16776	99129	0.96	0.24	=	=	58	0.0
409	Reference*	09p12.2	06-051.932866	19225	107626	1.21	0.31	=	=	58	0.1
445	Reference*	08q13.3	08-071.130073	6455	38287	0.48	0.13	<*	?	53	-0.1
274	Reference*	09q22.32	09-097.278894	18231	88193	1.05	0.26	=	=	38	-0.1
184	Reference*	12q24.22	12-116.148894	10075	45915	0.65	0.16	<*	?	50	-0.1
373	Reference*	15q21.1	15-046.576792	22749	123898	1.33	0.34	?	?	69	-0.1
257	Reference*	17q21.2	17-035.822653	11423	54543	0.71	0.18	=	=	46	0.0
136	Reference*	18q21.1	18-045.817181	19173	86541	1.24	0.36	=	=	57	-0.1
337	Reference*	22q13.2	22-039.895472	5855	30535	0.39	0.1	<*	<*	41	-0.1
				11198	52597	0.62*	0.16*			47	-0.02

Median value all probe values:



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.

Résumé

Introduction : La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1) est un syndrome de prédisposition aux tumeurs héréditaires, rare, de transmission autosomique dominante et provoqué par une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *MEN1*. La NEM1 est caractérisée par la survenue de plusieurs lésions du système endocrine, en particulier hyperparathyroïdie, adénome hypophysaire et tumeurs neuroendocrines digestives, auxquelles s'associent plus rarement des tumeurs intracérébrales : méningiomes et épendymomes. Le rôle du gène *MEN1* dans la tumorigenèse de ces tumeurs intracérébrales a été très peu étudié.

Objectif : Mettre en évidence le rôle de *MEN1* dans la tumorigenèse intracérébrale dans un contexte de mutation germinale de *MEN1* et dans un contexte de méningiome de survenue sporadique, en recherchant des anomalies du gène *MEN1* et d'autres gènes impliqués dans la tumorigenèse des méningiomes.

Matériels et méthodes : Deux cohortes de patients ont été étudiées. La 1^{ère} comporte des patients porteurs d'une mutation germinale du gène *MEN1* et ayant développé une tumeur intracérébrale, issus de la base NEM1 du GTE (Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines), collectée par le Pr Pierre Goudet. La 2^{ème} comporte des patients atteints de méningiomes sporadiques, opérés dans le service de neurochirurgie du Pr Henry Dufour au CHU La Timone, Marseille. Par séquençage Sanger et MLPA, nous avons recherché un second événement somatique (perte d'hétérozygotie (LOH) du gène ou 2^{ème} mutation ponctuelle) pour les patients de la cohorte n°1 ; une anomalie ponctuelle ou une LOH de *MEN1* pour les patients de la cohorte n°2. Une analyse par NGS d'un panel de gènes impliqués dans les méningiomes a également permis de caractériser plus largement les tumeurs.

Résultats : Dans la cohorte n°1, 3 LOH du gène *MEN1* ont été mises en évidence par séquençage Sanger parmi les 4 tumeurs intracérébrales étudiées (2 méningiomes et 2 épendymomes), au sein des 6 initialement incluses (2 méningiomes et 4 épendymomes). Dans la cohorte n°2, 3 LOH du gène *MEN1* par MLPA ont été retrouvées parmi les 20 méningiomes sporadiques étudiés au sein des 21 initialement inclus. De plus 14/21 méningiomes portaient des mutations dans d'autres gènes « drivers » des méningiomes, identifiées par NGS.

Conclusion : La mise en évidence de la LOH de *MEN1* chez les patients de la cohorte n°1 semble confirmer le rôle de ce gène dans la tumorigenèse méningée dans un contexte de NEM1. De plus, pour la première fois, nous avons mis en évidence une LOH de *MEN1* dans des épendymomes survenus dans un contexte de mutation germinale. Concernant la cohorte n°2, les analyses réalisées en l'état ne permettent pas d'impliquer *MEN1* comme gène « driver » de la tumorigenèse des méningiomes. Cependant, les analyses méritent d'être poursuivies. En effet, seuls 7 des 21 méningiomes ne présentaient pas de mutation « driver » dans les autres gènes et étaient donc susceptibles d'être de bons candidats.