

**Université de Limoges
Faculté de Médecine**

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement
le 14 avril 2017
par

Anne Guyot

né le 20 octobre 1988, à Toulouse

**Etude des marqueurs moléculaires du cycle cellulaire dans des
méningiomes récidivants et non récidivants**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur François LABROUSSE

Président

M. le Professeur François PARAF

Juge

M. le Professeur François CAIRE

Juge

M^{me} le Docteur Karine DURAND

Juge

M^{me} le Docteur Aurélie CHARISSOUX

Membre invité



**Université de Limoges
Faculté de Médecine**

Année 2017

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'état de docteur en Médecine

présentée et soutenue publiquement
le 14 avril 2017
par

Anne Guyot

née le 20 octobre 1988, à Toulouse

**Etude des marqueurs moléculaires du cycle cellulaire dans des
méningiomes récidivants et non récidivants**

Examineurs de la thèse :

M. le Professeur François LABROUSSE

M. le Professeur François PARAF

M. le Professeur François CAIRE

M^{me} le Docteur Karine DURAND

M^{me} le Docteur Aurélie CHARISSOUX

Président

Juge

Juge

Juge

Membre invité



Professeurs des Universités - praticiens hospitaliers

ABOYANS Victor	CARDIOLOGIE
ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ALAIN Sophie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ARCHAMBEAUD Françoise	MEDECINE INTERNE
AUBARD Yves	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
AUBRY Karine	O.R.L.
BEDANE Christophe	DERMATO-VENEREOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	O.R.L.
BORDESSOULE Dominique	HEMATOLOGIE
CAIRE François	NEUROCHIRURGIE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre	PSYCHIATRIE d'ADULTES
COGNE Michel	IMMUNOLOGIE
CORNU Elisabeth	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
COURATIER Philippe	NEUROLOGIE
DANTOINE Thierry	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
DARDE Marie-Laure	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
DAVIET Jean-Christophe	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
DESCAZEAUD Aurélien	UROLOGIE
DES GUETZ Gaëtan	CANCEROLOGIE
DESSPORT Jean-Claude	NUTRITION



DRUET-CABANAC Michel	MEDECINE et SANTE au TRAVAIL
DUMAS Jean-Philippe	UROLOGIE
DURAND-FONTANIER Sylvaine	ANATOMIE (CHIRURGIE DIGESTIVE)
ESSIG Marie	NEPHROLOGIE
FAUCHAIS Anne-Laure	MEDECINE INTERNE
FAUCHER Jean-François	MALADIES INFECTIEUSES
FEUILLARD Jean	HEMATOLOGIE
FOURCADE Laurent	CHIRURGIE INFANTILE
GAINANT Alain	CHIRURGIE DIGESTIVE
GUIGONIS Vincent	PEDIATRIE
JACCARD Arnaud	HEMATOLOGIE
JAUBERTEAU-MARCHAN M. Odile	IMMUNOLOGIE
LABROUSSE François	ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
LACROIX Philippe	MEDECINE VASCULAIRE
LAROCHE Marie-Laure	PHARMACOLOGIE CLINIQUE
LIENHARDT-ROUSSIE Anne	PEDIATRIE
LOUSTAUD-RATTI Véronique	HEPATOLOGIE
MABIT Christian	ANATOMIE
MAGY Laurent	NEUROLOGIE
MARIN Benoît	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
MARQUET Pierre	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
MATHONNET Muriel	CHIRURGIE DIGESTIVE
MELLONI Boris	PNEUMOLOGIE
MOHTY Dania	CARDIOLOGIE
MONTEIL Jacques	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE



MOREAU Jean-Jacques	NEUROCHIRURGIE
MOUNAYER Charbel	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
NATHAN-DENIZOT Nathalie	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
NUBUKPO Philippe	ADDICTOLOGIE
PARAF François	MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE
PLOY Marie-Cécile	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
PREUX Pierre-Marie	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
ROBERT Pierre-Yves	OPHTALMOLOGIE
SALLE Jean-Yves	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
SAUTEREAU Denis	GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE
STURTZ Franck	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre	ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
TREVES Richard	RHUMATOLOGIE
TUBIANA-MATHIEU Nicole	CANCEROLOGIE
VALLEIX Denis	ANATOMIE
VERGNENEGRE Alain	EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
VERGNE-SALLE Pascale	THERAPEUTIQUE
VIGNON Philippe	REANIMATION
VINCENT François	PHYSIOLOGIE
WEINBRECK Pierre	MALADIES INFECTIEUSES
YARDIN Catherine	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE

PROFESSEUR ASSOCIE DES UNIVERSITES A MI-TEMPS DES DISCIPLINES MEDICALES

BRIE Joël CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE



MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AJZENBERG Daniel	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
BARRAUD Olivier	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
BOURTHOUMIEU Sylvie	CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
BOUTEILLE Bernard	PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
CHABLE Hélène	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
DURAND Karine	BIOLOGIE CELLULAIRE
ESCLAIRE Françoise	BIOLOGIE CELLULAIRE
HANTZ Sébastien	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
JESUS Pierre	NUTRITION
LE GUYADER Alexandre	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
LIA Anne-Sophie	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
MURAT Jean-Benjamin	PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE
QUELVEN-BERTIN Isabelle	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
RIZZO David	HEMATOLOGIE
TCHALLA Achille	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
TERRO Faraj	BIOLOGIE CELLULAIRE
WOILLARD Jean-Baptiste	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE

P.R.A.G.

GAUTIER Sylvie	ANGLAIS
-----------------------	---------

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

BUCHON Daniel
DUMOITIER Nathalie



PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

MENARD Dominique

PREVOST Martine

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS DE MEDECINE GENERALE

HOUDARD Gaëtan

PAUTOUT-GUILLAUME Marie-Paule

PROFESSEURS EMERITES

ADENIS Jean-Paul du 01.09.2015 au 31.08.2017

ALDIGIER Jean-Claude du 01.09.2016 au 31.08.2018

MERLE Louis du 01.09.2015 au 31.08.2017

MOULIES Dominique du 01.09.2015 au 31.08.2017

VALLAT Jean-Michel du 01.09.2014 au 31.08.2017

VIROT Patrice du 01.09.2016 au 31.08.2018

Le 1^{er} septembre 2016



Assistants Hospitaliers Universitaires – Chefs de Clinique

ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES

CHARISSOUX Aurélie	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
CHARPENTIER Mathieu	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
CHUFFART Etienne	ANATOMIE
COUDERC Sylvain	PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
DUCHESNE Mathilde	ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES
FAYE Pierre-Antoine	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
FREDON Fabien	ANATOMIE
GAUTHIER François	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
KASPAR Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
LARRADET Matthieu	BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
LEGRAS Claire	ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
MARQUET Valentine	HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE et CYTOGENETIQUE
LOMBEL Guillaume	IMMUNOLOGIE

CHEFS DE CLINIQUE - ASSISTANTS DES HOPITAUX

ARDOUIN Elodie	RHUMATOLOGIE
ASSIKAR Safaë	DERMATO-VENEREOLOGIE
BAUDONNET Romain	OPHTALMOLOGIE
BIANCHI Laurent	GASTROENTEROLOGIE (A compter du 12 novembre 2015)
BIDAUT-GARNIER Mélanie	OPHTALMOLOGIE (à compter du 11 mai 2016)
BLOSSIER Jean-David	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
BOUSQUET Pauline	PEDIATRIE (à compter du 09 janvier 2017)



CASSON-MASSELIN Mathilde	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
CHAMPIGNY Marie-Alexandrine	PEDIATRIE
CHATAINIER Pauline	NEUROLOGIE
CHRISTOU Niki	CHIRURGIE DIGESTIVE
COMPAGNAT Maxence	MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
CROSSE Julien	PEDIATRIE
DANTHU Clément	MALADIES INFECTIEUSES
DARNIS Natacha	PEDOPSYCHIATRIE
DELUCHE Elise	CANCEROLOGIE
DIJOUX Pierrick	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
EVENO Claire	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
GARDIC Solène	UROLOGIE
GONZALEZ Céline	REANIMATION
HOUMAÏDA Hassane	CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE (A compter du 02 novembre 2015)
KENNEL Céline	HEMATOLOGIE
LACHATRE Denis	RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE
LAFON Thomas	MEDECINE d'URGENCE
LATHIERE Thomas	OPHTALMOLOGIE
LAVIGNE Benjamin	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LE BIVIC Louis	CARDIOLOGIE
LE COUSTUMIER Eve	MEDECINE INTERNE A
LEGROS Emilie	PSYCHIATRIE d'ADULTES
LEPETIT Hugo	GASTROENTEROLOGIE



MARGUERITTE François	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
MARTINS Elie	CARDIOLOGIE
MESNARD Chrystelle	GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE
PAPON Arnaud	GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT
PETITALOT Vincent	CARDIOLOGIE
RAMIN Lionel	ORL
ROUSSELLET Olivier	NEUROLOGIE
SAINT PAUL Aude	PNEUMOLOGIE
SALLE Henri	NEUROCHIRURGIE
SCOMPARIN Aurélie	O.R.L. (SURNOMBRE du 01-11-2016 au 20-02-2017 inclus)
TAÏBI Abdelkader	ANATOMIE
USSEGLIO-GROSSO Julie	CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE et STOMATOLOGIE
VAYSSE VIC Mathieu	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
VITAL Pauline	MEDECINE INTERNE B

CHEF DE CLINIQUE – MEDECINE GENERALE

RUDELLE Karen

CHEF DE CLINIQUE ASSOCIE – MEDECINE GENERALE

(du 1er novembre 2015 au 31 octobre 2016)

LAUCHET Nadège

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

BALLOUHEY Quentin
CHIRURGIE INFANTILE
(du 1er mai 2015 au 30 avril 2019)

CROS Jérôme
ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION
(du 1^{er} mai 2014 au 31 octobre 2018)



Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur François Labrousse pour m'avoir donné la possibilité de réaliser des stages de master, pour son enseignement patient et passionné tout au long de l'internat, pour avoir encadré ce travail de manière constructive et ce depuis le compte des mitoses.

Je remercie le Professeur François Paraf d'avoir accepté de juger ce travail, de m'avoir légué un de ses cas pour carrefour pathologie et bien sûr pour les staff du mardi matin.

Je tiens à remercier le Professeur François Caire d'avoir accepté de juger ce travail, les neurochirurgiens restent la meilleure arme contre les méningiomes.

Je tiens à remercier particulièrement le Docteur Karine Durand sans qui ce travail n'aurait pu aboutir, pour être toujours disponible à chaque étape clé, pour avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions quel que soit le moment, pour sa rigueur, sa motivation et surtout ses compétences en statistiques.

Je souhaite remercier chaleureusement le Docteur Charissoux d'avoir accepté de juger ce travail, d'avoir partagé une grande partie de cet internat avec moi, toujours avec énergie et bonne humeur, de savoir quoi faire en toute circonstance, d'être pleine de bon sens et de gentillesse (t'es au top et pas que des villi).

Je tiens à remercier le Professeur Marie-Odile Jauberteau de m'avoir permis de réaliser mes stages de master et mon travail de thèse au sein de son équipe.

Je remercie Emilie Guérin, ingénieur de l'unité de séquençage du CHU de Limoges pour avoir pris le temps de m'expliquer et de me montrer les différentes étapes du séquençage qu'elle a réalisé.

Je remercie Nicolas Bargues, bio-informaticien de la plateforme de génétique moléculaire des cancers, pour l'analyse des premières données, la cellule bioinformatique de l'université de Limoges, Romain, Erwan et Bastien pour le temps passé à traiter toutes les données en tenant compte de nos exigences et leur disponibilité pour m'éclairer sur ce domaine obscur.

Je tiens à remercier Sandrine Robert, toujours présente dès qu'il s'agit de (re) séquencer des méningiomes.

Je remercie médecins du service d'anatomo-pathologie, Manue pour son implication dans le service et son sourire, Véronique (et le monde à part de la pathologie mammaire), Isabelle pour son souci du détail indispensable à l'anapath, Valère pour prendre le temps d'enseigner, Monsieur Rougier pour partager ses petits cas, Sophie pour les lames de

miniatures et les diagnostics rares, Jocelyne, Catherine, Angélique, Bema (on va pas y passer la vie des rats).

Merci à Laura et Fabrice de m'avoir laissé (et de continuer à me laisser) être votre poussin, de m'avoir contaminé avec votre intérêt pour cette spécialité, d'être toujours là même en étant loin, pour votre dynamisme et votre envie d'exercer au mieux (le compteur et le microscope sont en sécurité).

Merci à Mathilde (dire que je n'ai même pas utilisé le bureau), Julien.

Merci à mes co-internes, pour partager l'enthousiasme des belles lames, pour me supporter au quotidien et m'avoir accordé le temps nécessaire à la réalisation de ce travail, Armand c'est à toi (et merci pour les nomenclatures), Bertrand (et l'avenir de l'anapath), Emeline (merci d'avoir accepté toutes les missions de mini chef des internes).

Merci aux autres internes, cliniciens ou radiologues, avec lesquels j'ai pu partager la plus belle des spécialités, Denis (nous c'est en couleur ! merci pour les images), Adeline, David, Kevin (un polynucléaire éosinophile !).

Merci à l'équipe de biologie moléculaire d'avoir partagé vos pipettes, vos thermocycleurs, vos conseils et vos rigolades, Sylvain (et la clé elle est dans ma blouse dans le casier avec un code dans le vestiaire des hommes auquel ... tu n'as pas accès), Emilie, Maeva (et le pyro), Murat.

A Alain, merci pour ton aide précieuse et les relectures de dernière minute.

Merci aux technicien(ne)s sans lesquels mon internat n'aurait pas été le même, pour nous guider dans nos premiers pas, pour votre patience, Brigitte, Chantal, Carine, Elodie, Marie, Carole, Sandrine, Fanny, Laura, Damien, Cédric (alors il est dilué à combien ce Ki ?), Pascale, Sylvie, Benjamin, Annie, Jade, Angèle, Stéphanie, Audrey. Et à la chef, Françoise.

Merci aux secrétaires, Mme Blain, Nadine, Joëlle, Manon, Isabelle, Khadra.

Merci au trio de choc, Nini, Daniel (c'est vendredi), Katia (bonjour !).

A mes coLocs, merci pour tous les beaux moments de vie commune, Blondie, Brive, Limoges, Poitiers... je n'aurais partagé tout ça avec personne d'autre, reviens vite ! Céci et Matthieu, c'est toujours un plaisir de savoir qu'on peut compter sur vous, pour s'amuser et pour tout le reste. Clemclem et Loulou merci de mettre de la vie dans cette maison. Barbou...merci de m'écouter toujours, d'être drôle et entière, c'est toi la meilleure !...(désolée les gars).



Merci aux copains de Limoges, Néjou pour être aussi géniale, Romain (piscine barbeuc), Fanny notre maman de Brive et Soso, Alexis et JMP mon couple préféré, Mazon tu me manques, EMD, Margaux, Tiff (t'es un soleil), Sophie (l'aventure poitevine), Pom'pom, Olivia, Claire, Flavie, Michèle, La Chab Rémiitch, Lucluc, Totor, Sanglier, Dadoudu33, Manu, Py, Barth, Aymeric, la coloc piscine, la sh***koulie, Cocooo, Le Kil et les autres.

Merci aux copines de toujours, Gégé (ça va être long 6 mois), Marine, Mathou, Lucette vous êtes indispensables. Merci aux copains de voyage Brubru, Nico, Paul. A Julie (et les minis-moi), Claire (trop loin la bretagne), Tuteur, Laeti, Cécile ma duettiste ... et à tous ceux que j'oublie.

A TPL, la crème des colocupains, aux autres cupains, à l'Hipstateam (mais pourquoi ?!!! vous êtes fous !).

A Thierry, Framboise, Baldo, Pascale, Chrichri, Sandra, la deuxième famille.

Merci à ma famille, à mes grands-parents Papou, Mamie, Yaya, Yayo, pour leur soutien inconditionnel, à mes oncles et tantes pour m'avoir toujours encouragé, à mes parents et ma soeur pour être disponibles dès que j'ai besoin de vous, pour être de si bon conseil, pour m'avoir appris à aimer travailler, pour votre EXCELLENCE même par téléphone, pour tout, je vous aime.

A Nathalie.



Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Introduction	23
I. Généralités	25
I.1. Anatomie - Embryogénèse	25
I.2. Epidémiologie	25
I.3. Etiologie	26
I.4. Diagnostic	26
I.4.1. Aspects cliniques	26
I.4.2. Aspects neuroradiologiques	26
I.4.2.1 Tomodensitométrie	26
I.4.2.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)	27
I.5. Histopathologie – Classification OMS	29
I.5.1. Analyse anatomo-pathologique	29
I.5.2. Facteurs de récurrence	35
I.6. Marqueurs moléculaires	37
I.6.1. Marqueurs moléculaires des méningiomes	37
I.6.2. Marqueurs moléculaires du cycle cellulaire	38
I.7. Traitement	40
I.7.1. Traitements conventionnels	40
I.7.1.1 Surveillance	40
I.7.1.2 Chirurgie	40
I.7.1.3 Radiothérapie	41
I.7.2. Thérapies systémiques	41
II. Objectifs	42
III. Matériels et méthodes	43
III.1. Données cliniques et histopathologiques	43
III.2. Génétique moléculaire	44
III.2.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des tissus	44
III.2.2. Quantification de l'ADN génomique	44
III.2.3. Génotypage par séquençage massivement parallèle	44
III.2.3.1 Design/conception des amorces	44
III.2.3.2 Préparation des bibliothèques	45
III.2.3.3 Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion	47
III.2.3.4 Chargement de la puce et réaction de séquençage	48
III.2.4. Analyse bio-informatique des données	49
III.2.5. Interprétation des données	52
III.2.6. Analyse statistique	52
IV. Résultats	53
IV.1. Données cliniques et histopathologiques	53
IV.1.1. Données cliniques et épidémiologiques	53
IV.1.2. Données histopathologiques	54
IV.2. Résultats du séquençage	56
IV.2.1. Données du rapport de séquençage	56
IV.2.2. Variants mis en évidence : données quantitatives	57

IV.2.3. Analyse des facteurs influençant le caractère récidivant des tumeurs	59
IV.2.3.1 Analyse en fonction des données cliniques et histopathologiques	59
IV.2.3.2 Analyse des altérations moléculaires	60
IV.2.3.3 Analyse de survie sans récurrence	63
IV.2.3.4 Analyse de survie globale	66
V. Discussion	67
Conclusion	73
Références bibliographiques	75
Annexes	79
Serment d'Hippocrate.....	95



Table des illustrations

Figure 1 : Méningiome sphénoïdal. Coupe tomodensitométrique sagittale après injection de produit de contraste iodé montrant une prise de contraste homogène (Service de Radiologie, CHU de Limoges).....	27
Figure 2 : IRM. Coupe axiale en séquence écho de spin T1 sans injection : méningiome temporal droit en isosignal (Service de Radiologie, CHU de Limoges).	28
Figure 3 : IRM. Coupe axiale en séquence FLAIR : œdème péri-tumoral (Service de Radiologie, CHU de Limoges).	28
Figure 4 : IRM. Coupe axiale en séquence écho de spin T1 après injection de gadolinium : prise de contraste du méningiome, base d'insertion durale large et aspect linéaire en « queue de comète » (Service de Radiologie, CHU de Limoges).	29
Figure 5 : Aspect macroscopique d'un méningiome au cours de l'exérèse chirurgicale (Service de Neurochirurgie, CHU limoges).	30
Figure 6 : aspect macroscopique d'un méningiome (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	30
Figure 7 : Méningiomes de grade I méningothélial (A) et fibroblastique (B), HPS (Hémalun Phloxine Safran) x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	32
Figure 8 : Méningiomes de grade II avec infiltration du parenchyme cérébral (A), HPS x 25 et nécrose tumorale (B), HPS x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).....	32
Figure 9 : Méningiome de grade III avec 49 mitoses (flèches) pour 1,6 mm ² , HPS x 400 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	33
Figure 10 : méningiome méningothélial exprimant l'EMA (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	34
Figure 11 : infiltration du parenchyme cérébral marqué par l'anticorps anti-GFAP (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	34
Figure 12 : Indice de prolifération Ki67 évalué à 50% en immunohistochimie x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).	36
Figure 13 : Modèle génétique de l'oncogenèse et de la progression des méningiomes d'après Louis et al. [4].	38
Figure 14 : Le cycle de division cellulaire et sa régulation, adapté d'après Meijer L. [34].	40
Figure 15 : Préparation des bibliothèques d'après le guide utilisateur Ion Ampliseq™.	47
Figure 16 : Pipeline de détection des variants somatiques adapté d'après https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/mutect2.php [42].	51
Figure 17 : Chargement de la puce dans le rapport du 1er séquençage.....	57
Figure 18 : Visualisation sous IGV de l'altération de CDKN2A (A) et de YWHAE (B).....	58
Figure 19 : Survie sans récurrence en fonction du sexe (A) et du grade tumoral (B). Temps en mois.	64

Figure 20 : Survie sans récurrence en fonction de l'index mitotique (A) et de l'indice de prolifération Ki67 (B). Temps en mois.....64

Figure 21 : Survie sans récurrence en fonction de la présence du variant de CDKN2A (A) et du variant de RB1 (SNV) (B). Temps en mois.65

Figure 22 : Survie sans récurrence en fonction de la présence du variant de CCNH (A) et du variant de MKI67 (B). Temps en mois.65



Table des tableaux

Tableau 1 : Classification histologique des méningiomes d'après l'OMS 2016.	31
Tableau 2 : Grade de Simpson lors de l'exérèse chirurgicale d'un méningiomes [1].....	41
Tableau 3 : Index mitotique et indice de prolifération Ki67 en fonction du grade tumoral.	54
Tableau 4 : Données cliniques et histopathologiques, * âge au diagnostic en années, **SSR : survie sans récurrence en mois, DDN*** : date des dernières nouvelles en mois après le diagnostic, Ki67**** (en %), TPNR : tumeur primitive non récidivante, TPR : tumeur primitive récidivante, NC : non connu.	55
Tableau 5 : Paramètres qualitatifs principaux du rapport de séquençage.	56
Tableau 6 : Nombre de variants identifiés par échantillon tumoral.	58
Tableau 7 : Analyse des données cliniques et histopathologiques en fonction du caractère récidivant ou non récidivant de la tumeur. N : nombre d'échantillons concernés.	59
Tableau 8 : Analyse des variants en fonction du caractère récidivant de la tumeur.	61
Tableau 9 : Présence ou absence des variants d'intérêt dans les tumeurs primitives récidivantes (TP) et la récurrence (R) correspondante. Le numéro de l'échantillon concerné est indiqué dans chaque cellule. NC : non connu.	62
Tableau 10 : Analyse des variants liés à la récurrence en fonction du sexe, du grade tumoral, de l'index mitotique et de l'indice Ki67.	63



Abréviations

ACE Antigène carcino-embryonnaire
AND Acide DésoxyriboNucléique
AKT1 V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APC Anaphase promoting complex
ATM Ataxia telangiectasia mutated
BAM Binary alignment/map
BCL Base call format
BED Browser extensible data
BWA Burrows-Wheeler Aligner
CAK CDK-activating kinase
CDC25A, B et C Cell division cycle 25 homolog A, B et C
CDK Cyclin-dependent kinase
CDKN2A Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDKN2B Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CKI Cyclin-dependent kinase inhibitor
CNV Copy number variation
COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer
CRBiolim Centre de Ressources Biologiques Cancer du CHU de Limoges
dbSNP The Single Nucleotide Polymorphism Database
EMA Antigène épithélial membranaire
FLAIR Fluid attenuated inversion recovery
GATK Genome Analysis Toolkit
GEIST Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques
GFAP protéine acide fibrillaire gliale
Hg 19 Human genome 19 ou GRCh37
HPS Hémalun Phloxine Safran
IGV Integrative Genomics Viewer
INDELs Insertions ou délétions
IRM Imagerie par résonance magnétique
KLF4 Kruppel-like factor 4
MCM7 Mini-chromosome maintenance-7 protein



MDM2 Mmurine double minute 2

NF2 Neurofibromin-2

NGS Next-generation sequencing

OMS Organisation Mondiale de la Santé

P53 Tumor protein P53

PIK3 Phosphoinositide 3-kinase

PP2A Protein phosphatase

PRB ou RB Retinoblastoma 1

SMO Smoothened, frizzled family receptor

SNV Single nucleotide variation

TGF β 1 Transforming growth factor, beta 1

TMA Tissue microarrays

TRAF7 Tumor necrosis factor receptor-associated factor 7

UTR Untranslated region

VCF variant call format

Wnt Wingless



Introduction

Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes extra-parenchymateuses. Ils correspondent aux tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes après les gliomes [1] et représentent 25 à 30% des tumeurs intracrâniennes primitives [2]. Les méningiomes se développent le plus souvent entre 50 et 60 ans [2] et sont plus fréquemment observés chez les femmes [3]. Les hommes sont davantage atteints de tumeurs de grade plus élevé [4].

Les méningiomes sont des tumeurs le plus souvent bénignes et de croissance lente, développées à partir des cellules arachnoïdiennes constituant les méninges [5][6][7]. Malgré le caractère bénin de la majorité des méningiomes, une étude portant sur 1986 patients avec un suivi sur 29 ans a retrouvé un taux de survie à dix ans de 86% [1].

Le pronostic de ces tumeurs est lié au risque de récurrence et à l'existence de formes malignes. Il existe pour le moment peu de marqueurs pronostiques dans les méningiomes.

Le risque de récurrence dépend principalement de la qualité de l'exérèse chirurgicale évaluée par l'échelle de Simpson et du grade tumoral déterminé par l'examen histologique d'après la classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 2016 [4]. Cette classification reconnaît trois grades de malignité croissante. Le nombre de mitoses pour une surface tumorale donnée, qui rend compte d'une activation du cycle cellulaire, est l'un des critères les plus fiables pour établir le grade OMS. L'indice de prolifération cellulaire Ki67 reflétant également une activation du cycle cellulaire fait partie des marqueurs corrélés au potentiel de récurrence [4][8].

En conséquence, une étude des facteurs intervenant dans la régulation du cycle cellulaire pourrait permettre d'identifier des marqueurs pronostiques supplémentaires.

Actuellement le traitement de référence des méningiomes est l'exérèse chirurgicale, parfois associée à une radiothérapie. Les traitements systémiques ont des effets limités. Les options thérapeutiques sont réduites en cas de tumeur récidivante ou lorsque la chirurgie ne peut être réalisée. L'identification de marqueurs du risque de récurrence pourrait amener à considérer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les techniques de séquençage massivement parallèle permettent de rechercher des anomalies moléculaires au sein d'échantillons tumoraux. Le séquençage est une technique de biologie moléculaire utilisée pour déterminer la séquence nucléotidique d'une molécule d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique). Les techniques de séquençage massivement parallèle développées récemment ont des capacités de séquençage supérieures aux techniques

conventionnelles et donnent la possibilité d'analyser des ADN de plusieurs échantillons en même temps.

Dans ce travail, nous avons recherché par séquençage massivement parallèle des altérations génomiques somatiques sur 84 gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire dans une série de 30 méningiomes récidivants et non récidivants. L'analyse a porté sur 30 cas de méningiome avec leur récurrence soit un total de 45 échantillons tumoraux. Notre objectif était de mettre en évidence des altérations génomiques susceptibles de favoriser une récurrence tumorale.



I. Généralités

I.1. Anatomie - Embryogénèse

Les méninges correspondent à un tissu conjonctif qui enveloppe le système nerveux central pour en assurer la vascularisation et la protection mécanique. Différents feuillets constituent les méninges : la dure-mère ou pachyméninge et les leptoméninges comprenant l'arachnoïde et la pie-mère. La dure-mère est le feuillet le plus externe adhérent à l'os, ses expansions forment la faux du cerveau et la tente du cervelet. L'arachnoïde à partir de laquelle se développent les méningiomes tapisse la face interne de la dure-mère. A l'étage rachidien, elle se prolonge autour des racines spinales dans les espaces intervertébraux. L'arachnoïde participe à la résorption du liquide céphalo-rachidien via des villosités, les granulations de Pacchioni. La pie-mère, très fine, adhère complètement à la surface du cerveau [9]. Au niveau embryologique, les méninges se forment autour du tube neural après sa fermeture au cours des 3 premiers mois de développement in utéro. L'arachnoïde dérive des crêtes neurales ou ectomésenchyme, constitué par des cellules qui migrent des ganglions rachidiens autour du tube neural dès le début du 2^{ème} mois [10].

I.2. Epidémiologie

Le pic d'incidence des méningiomes se situe entre 50 et 60 ans [2] avec une fréquence environ deux fois plus importante chez la femme [3]. Les tumeurs de grade II et III surviennent à des fréquences plus élevées chez les hommes [4]. L'incidence des méningiomes augmente avec l'âge [1]. Une étude descriptive basée sur l'existence d'un réseau national multidisciplinaire établi par la French Brain Tumor DataBase a recensé 13038 nouveaux cas de méningiomes en France entre 2006 et 2010. Parmi ces cas, 74,9% concernaient des femmes et 25,1% des hommes avec un âge moyen au diagnostic de 57,7 ans. Le taux brut estimé de méningiomes opérés en France est de 4,2/100000 habitants/an [11]. Le registre des tumeurs primitives du Système Nerveux Central de la Gironde a observé entre 2000 et 2006, une incidence des méningiomes de 2,85 pour 100000 habitants/an pour les hommes et de 8,02 pour les femmes [12]. Des chiffres comparables ont été retrouvés aux Etats-Unis entre 2004 et 2006 avec une incidence de 3,76 pour 100000 personnes/an pour les hommes et de 8,44 pour 100 000 personnes/an pour les femmes. La prévalence des méningiomes aux Etats-Unis est de 70,7 cas pour 100000 habitants [13].



I.3. Etiologie

L'oncogenèse des méningiomes semble multifactorielle. Le rôle de facteurs génétiques a été mis en évidence avec le développement de méningiomes dans un cadre familial, notamment chez les patients atteints de neurofibromatose de type 2. Des facteurs environnementaux sont impliqués, en particulier l'exposition aux radiations ionisantes. Les méningiomes sont les tumeurs radio-induites les plus fréquentes du système nerveux central. Devant la prédominance féminine des méningiomes, la participation des hormones et des récepteurs hormonaux dans l'oncogenèse semble possible mais n'a pour le moment pas été démontrée. D'autres facteurs tels que les traumatismes crâniens, les virus oncogènes, l'obésité et l'utilisation des téléphones portables ont été évoqués mais aucun lien avec le développement des méningiomes n'a été mis en évidence [14][15][4].

I.4. Diagnostic

I.4.1. Aspects cliniques

Différents symptômes peuvent se manifester au cours du développement tumoral en fonction de la localisation du méningiome [14]. Les méningiomes intracrâniens sont généralement localisés au niveau de la convexité cérébrale, de la plaque olfactive, de la région sellaire, du nerf optique, de la tente du cervelet et de la fosse postérieure [4]. Les céphalées constituent le symptôme le plus fréquent et sont présentes dans un tiers des cas. Environ 29% des patients développent un déficit moteur ou sensitif. Dans un quart des cas, la tumeur est révélée par une épilepsie. A noter que plus de 9% des patients sont asymptomatiques avec une découverte fortuite de la tumeur [11]. D'autres manifestations cliniques sont rapportées tels que des troubles psychiques, visuels ou du langage [14].

I.4.2. Aspects neuroradiologiques

I.4.2.1 Tomodensitométrie

Le scanner permet de détecter jusqu'à 95% des méningiomes après injection de produit de contraste iodé. La tumeur apparaît sous la forme d'une masse homogène, sphérique ou lobulée. Ses contours sont réguliers et nets, refoulant le parenchyme adjacent avec un point d'attache à une structure méningée durale et souvent osseuse. Le méningiome est hyperdense ou isodense par rapport au parenchyme cérébral sur coupes non injectées. Dans plus de la moitié des cas, on observe une zone périphérique hypodense correspondant



à un œdème cérébral péri-tumoral. Après injection de produit de contraste, un rehaussement intense et homogène de la tumeur est observé dans environ 90% des cas (figure 1).

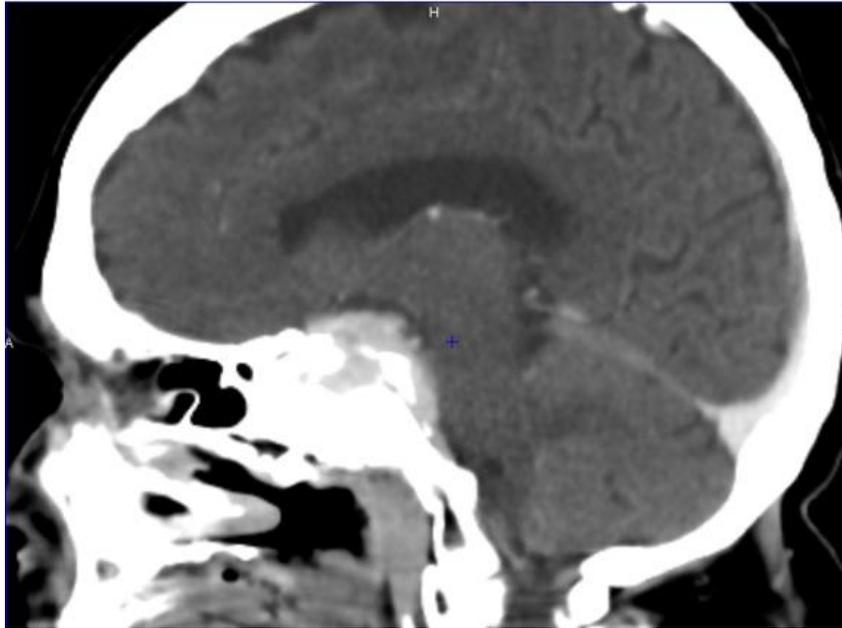


Figure 1 : Méningiome sphénoïdal. Coupe tomographique sagittale après injection de produit de contraste iodé montrant une prise de contraste homogène (Service de Radiologie, CHU de Limoges).

I.4.2.2 Imagerie par résonance magnétique (IRM)

L'IRM fournit des renseignements plus précis sur la topographie, l'extension, le retentissement tumoral et les rapports avec les structures neurovasculaires adjacentes. Le méningiome est visualisé sous la forme d'une masse en isosignal ou en hyposignal modéré sur les séquences en écho de spin pondérées T1 (figure 2). Le signal est variable sur les séquences en écho de spin pondérées T2. La séquence FLAIR (fluid attenuated inversion recovery) est utile pour visualiser l'œdème péri-tumoral (figure 3). On observe un rehaussement intense et homogène dans plus de 95% des cas après injection de gadolinium. Cette prise de contraste concerne la portion charnue de la tumeur et la dure-mère adjacente réalisant un aspect linéaire en « queue de comète » (figure 4). Il n'a pas été mis en évidence de lien entre la consistance du méningiome révélée par l'imagerie et son caractère histologique [14].



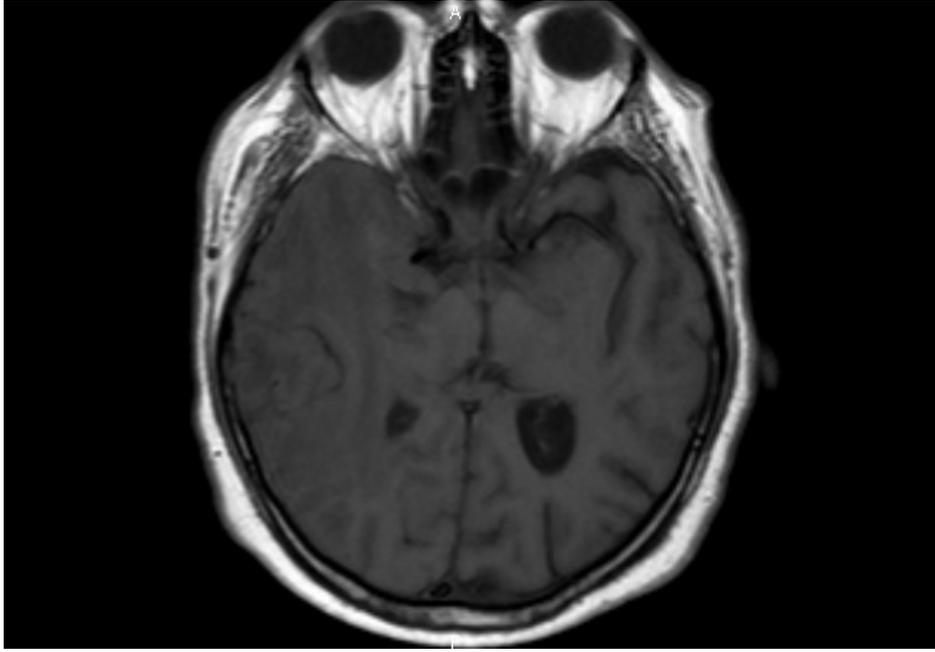


Figure 2 : IRM. Coupe axiale en séquence écho de spin T1 sans injection : méningiome temporal droit en isosignal (Service de Radiologie, CHU de Limoges).

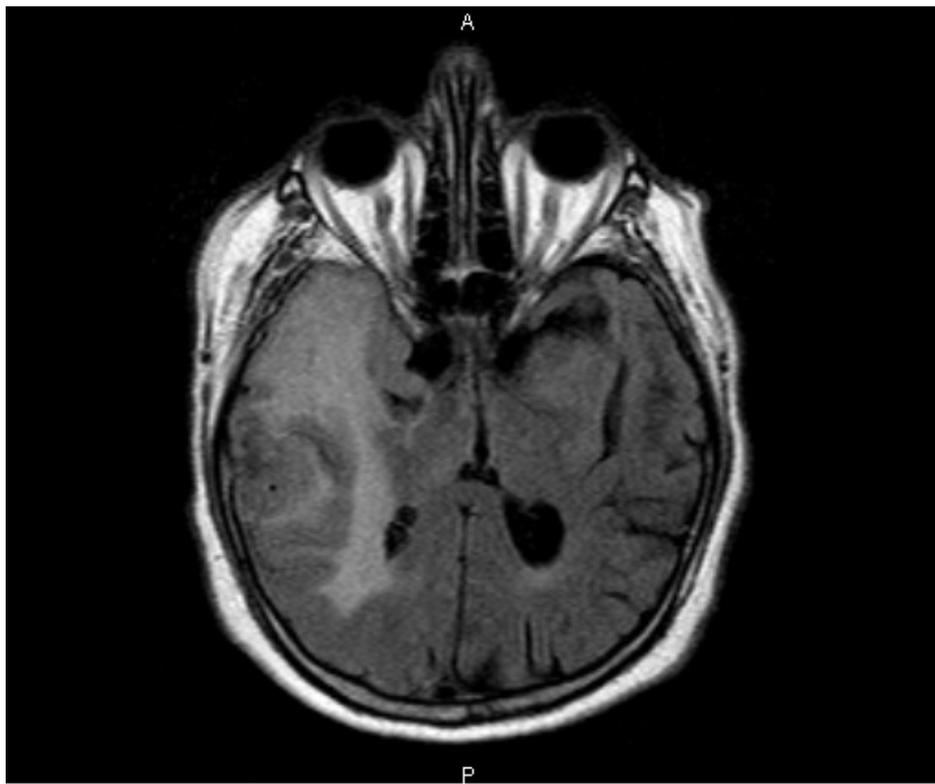


Figure 3 : IRM. Coupe axiale en séquence FLAIR : œdème péri-tumoral (Service de Radiologie, CHU de Limoges).



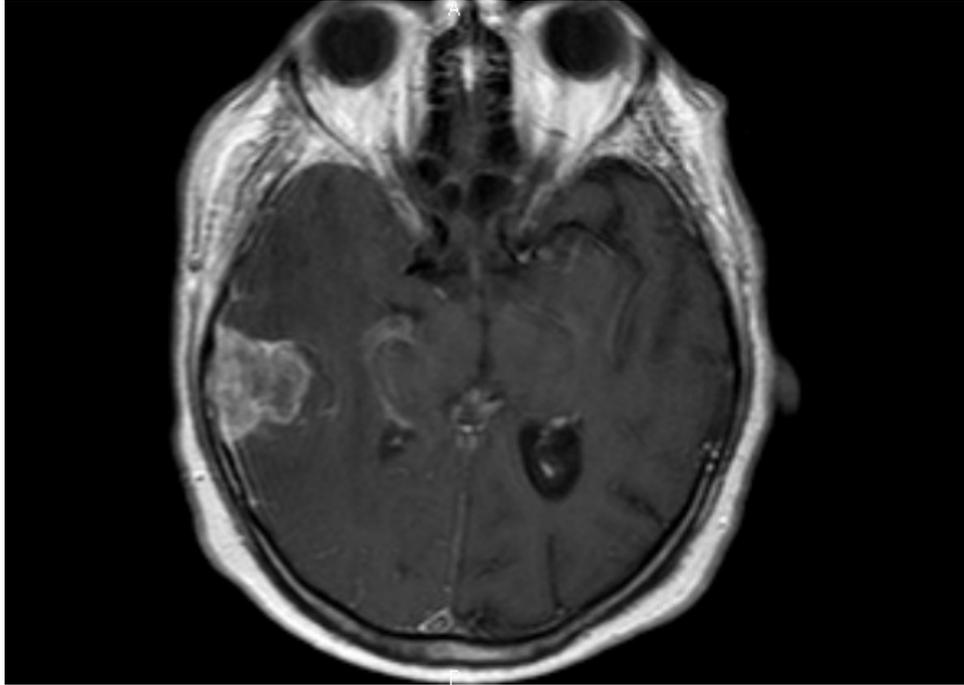


Figure 4 : IRM. Coupe axiale en séquence écho de spin T1 après injection de gadolinium : prise de contraste du méningiome, base d'insertion durale large et aspect linéaire en « queue de comète » (Service de Radiologie, CHU de Limoges).

I.5. Histopathologie – Classification OMS

I.5.1. Analyse anatomo-pathologique

Macroscopie

La plupart des méningiomes ont un aspect macroscopique de masse ronde, souvent lobulée, bien délimitée, de consistance ferme ou caoutchouteuse, parfois calcifiée ou ossifiée (figures 5 et 6). La présence de nécrose ou de tissu cérébral adhérent est recherchée. Une invasion de la dure-mère est assez fréquente [4].



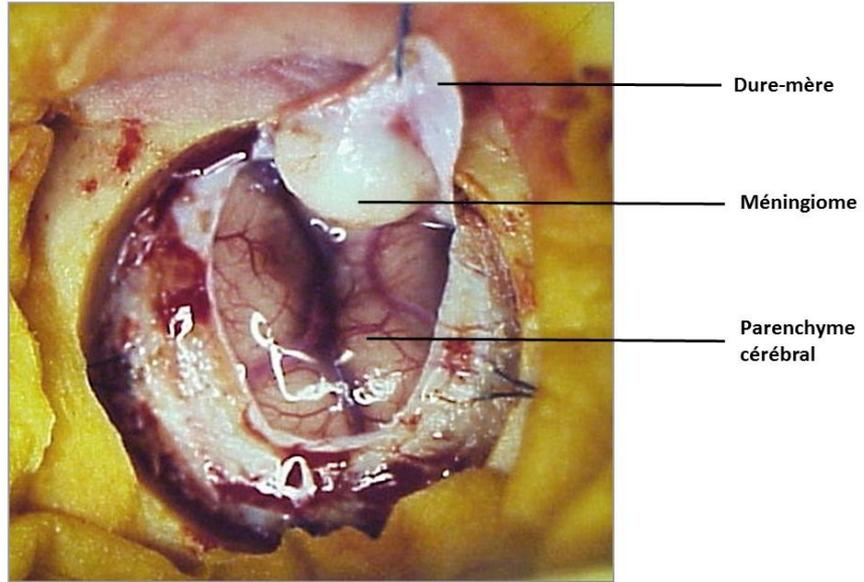


Figure 5 : Aspect macroscopique d'un méningiome au cours de l'exérèse chirurgicale (Service de Neurochirurgie, CHU limoges).

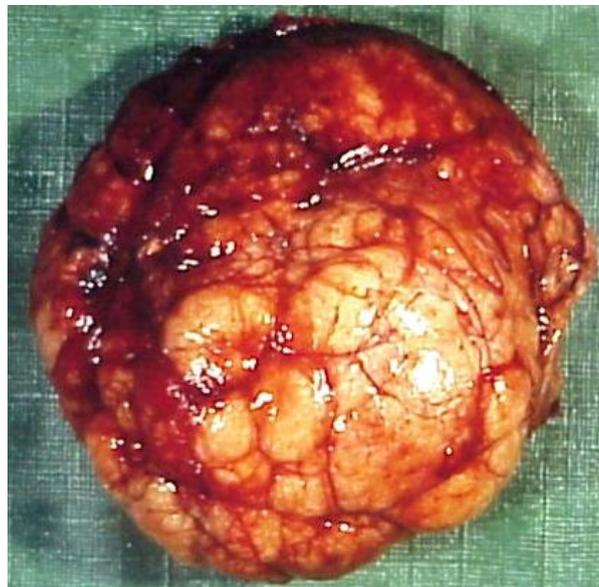


Figure 6 : aspect macroscopique d'un méningiome (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Microscopie

L'analyse histologique du méningiome permet de définir le type histologique et le grade tumoral selon la classification OMS 2016. Il existe de nombreux sous-types de méningiomes, les plus fréquents étant les méningiomes méningothéliaux, fibroblastiques et transitionnels. Le grade est déterminé suivant des critères morphologiques. Les méningiomes sont des tumeurs qui infiltrent fréquemment la dure-mère, parfois l'os ou le parenchyme cérébral mais les métastases sont rares.

Les aspects histopathologiques sont résumés dans le tableau 1. La classification OMS 2016 des méningiomes est peu modifiée par rapport à celle de 2007. Elle inclut désormais les méningiomes avec un indice de prolifération Ki67 élevé dans le groupe des tumeurs ayant une plus grande probabilité de récurrence et d'évolution agressive. En cas de tumeur « mixte », le diagnostic du type histologique majoritaire (plus de 50% de la tumeur) est retenu. La présence d'un contingent minoritaire mais de potentiel plus agressif doit être signalée. L'élément caractéristique d'une prolifération méningothéliale est la présence d'enroulements cellulaires également appelés « whorls ». Ces éléments histologiques sont illustrés avec les figures 7 à 9.

Faible risque de récurrence et d'évolution agressive	Plus grande probabilité de récurrence et d'évolution agressive	
Grade I	Grade II	Grade III
<ul style="list-style-type: none"> • Méningothélial • Fibroblastique • Transitionnel • Psammomateux • Angiomateux • Microkystique • Sécrétoire • Riche en lymphocytes et plasmocytes • Métaplasique 	<ul style="list-style-type: none"> • Chordoïde • Cellules claires • Atypique : <ul style="list-style-type: none"> - ≥ 4 mitoses et < 20 pour $1,6 \text{ mm}^2$ - Infiltration cérébrale - ≥ 3 des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> Hypercellularité Petites cellules Nucléole proéminent Désorganisation architecturale Nécrose tumorale 	<ul style="list-style-type: none"> • Papillaire • Rhabdoïde • Anaplasique (malin) • ≥ 20 mitoses pour $1,6 \text{ mm}^2$
Meningiome avec un indice de prolifération élevé		

Tableau 1 : Classification histologique des méningiomes d'après l'OMS 2016.



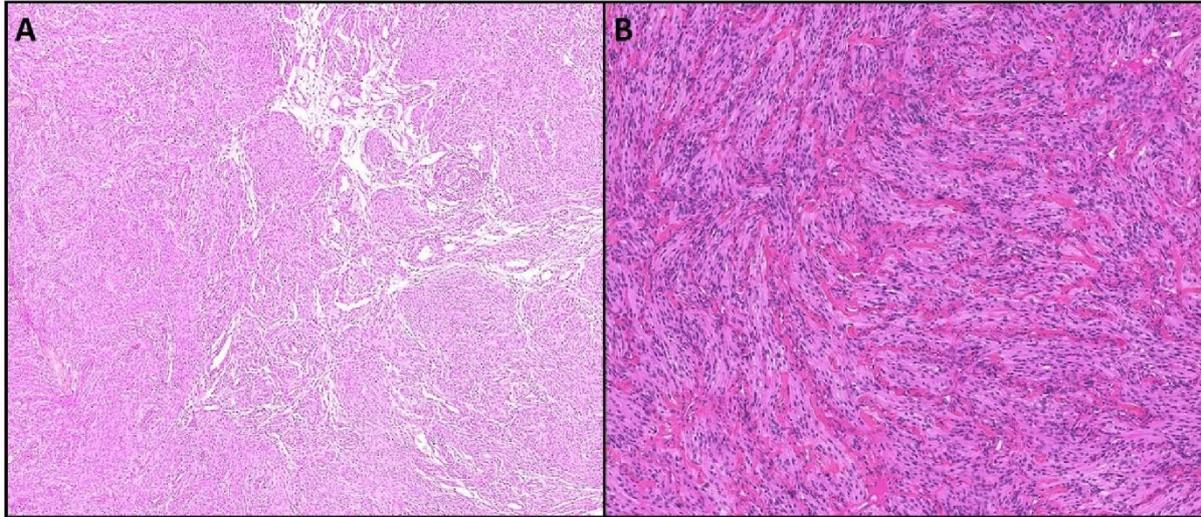


Figure 7 : Méningiomes de grade I méningothélial (A) et fibroblastique (B), HPS (Hémalun Phloxine Safran) x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

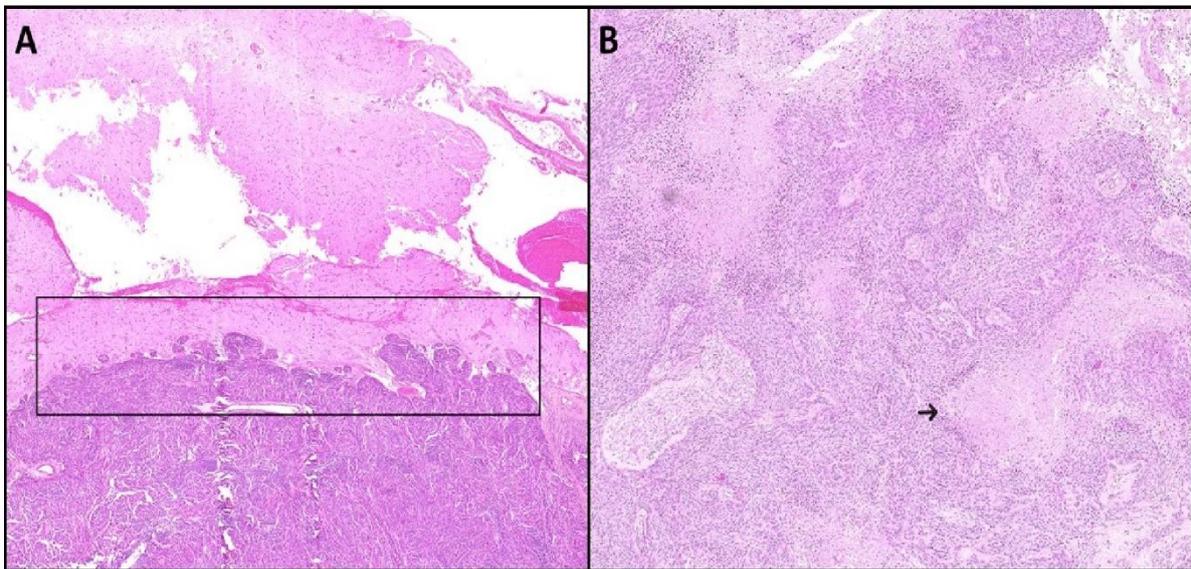


Figure 8 : Méningiomes de grade II avec infiltration du parenchyme cérébral (A), HPS x 25 et nécrose tumorale (B), HPS x 50 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

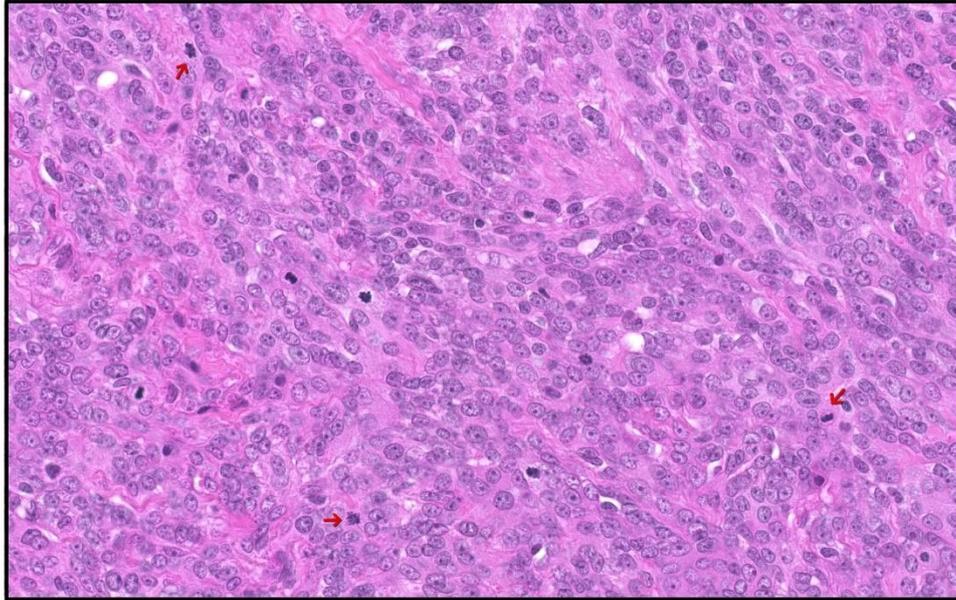


Figure 9 : Méningiome de grade III avec 49 mitoses (flèches) pour 1,6 mm², HPS x 400 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Au niveau immunohistochimique, la plupart des méningiomes expriment l'EMA (antigène épithélial membranaire) avec un marquage membranaire et cytoplasmique hétérogène (figure 10). La vimentine est aussi exprimée dans les méningiomes mais n'est pas spécifique. Les récepteurs à la somatostatine sont plus fréquemment exprimés dans les méningiomes de grade élevé. L'expression de la protéine S100 est observée principalement dans les méningiomes fibroblastiques [4]. Les récepteurs hormonaux sont largement exprimés dans les méningiomes avec une positivité du récepteur à la progestérone dans 88% des méningiomes primitifs. Les méningiomes sécrétoires expriment l'ACE (antigène carcino-embryonnaire) et les cytokératines contrairement aux autres méningiomes de grade I. La GFAP (protéine acide fibrillaire gliale) est utilisée pour rechercher une infiltration du parenchyme cérébral (figure 11). Certains marqueurs sont utiles pour identifier les diagnostics différentiels comme les tumeurs fibreuses solitaires qui expriment CD34 et STAT6 [16].



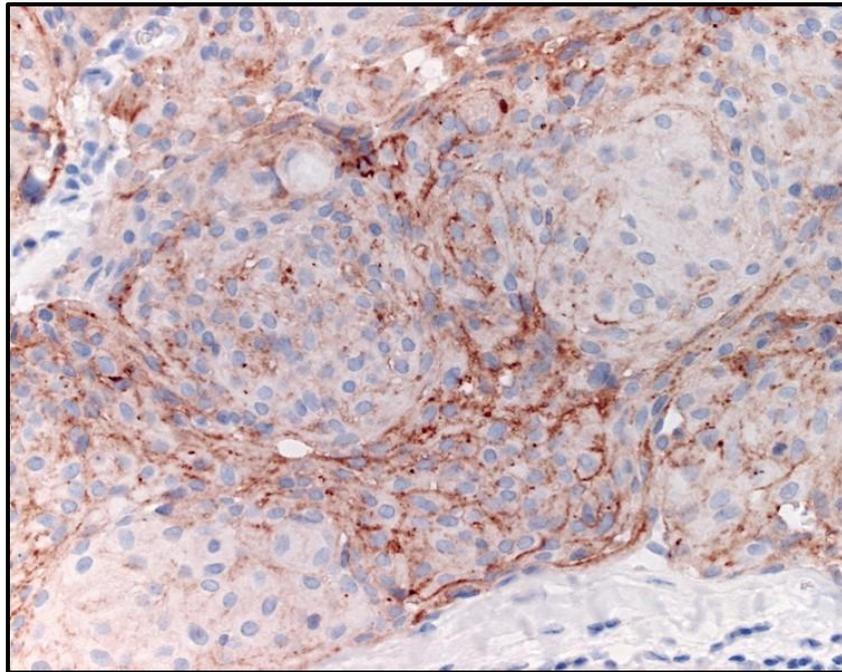


Figure 10 : méningiome méningothélial exprimant l'EMA (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

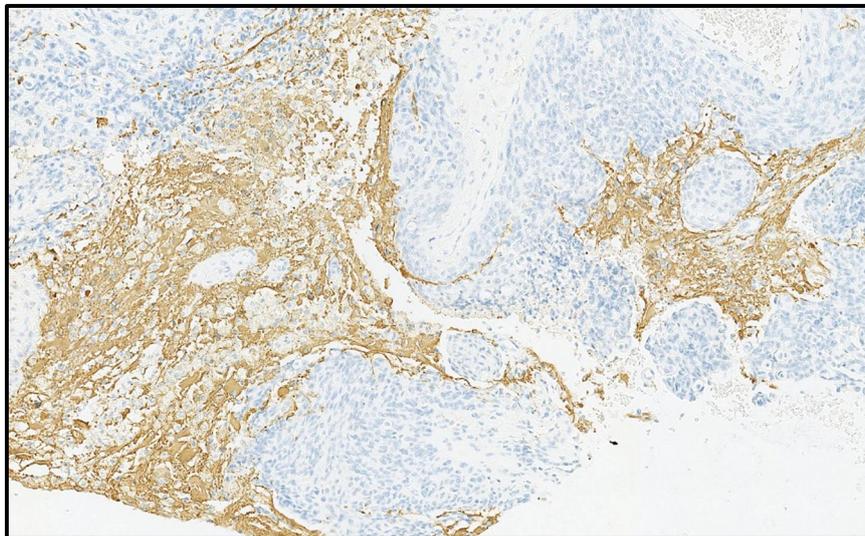


Figure 11 : infiltration du parenchyme cérébral marqué par l'anticorps anti-GFAP (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).



I.5.2. Facteurs de récurrence

Le facteur clinique principal intervenant dans la survenue d'une récurrence est la qualité de l'exérèse chirurgicale qui dépend de la localisation tumorale et de l'étendue de l'infiltration. Elle est évaluée par l'échelle de Simpson.

Au niveau histologique, le grade OMS est prédictif du risque de récurrence [4]. Les méningiomes de grade I de la classification de l'OMS sont considérés comme bénins et représentent 70 à 80% des méningiomes. Leur taux de récurrence est cependant estimé entre 7 et 25%. Les méningiomes de grade II ou III sont de moins bon pronostic et prédominent chez les hommes. Les méningiomes de grade II correspondent à 20% des méningiomes. Leur taux de récurrence est compris entre 29 à 52%. Les méningiomes de grade III représentent 1 à 3% des méningiomes avec un taux de récurrence de 50 à 94% et une moyenne de survie comprise entre 2 et 5 ans [1][4][17].

L'indice de prolifération cellulaire Ki67 évalué en immunohistochimie reflète le nombre de cellules entrées dans le cycle cellulaire (figure 12). En moyenne, cet indice est évalué à 3% dans les tumeurs de grade I, à 8% dans les tumeurs de grade II et à 17% dans les méningiomes de grade III [5]. Plusieurs études suggèrent que lorsque cet indice est supérieur à 4%, le risque de récurrence est plus élevé et devient proche de celui des méningiomes atypiques ou de grade II. De même les méningiomes ayant un indice Ki67 supérieur à 20% ont un taux de mortalité équivalent à celui observé pour les méningiomes anaplasiques ou de grade III [4]. Dans leur série, Guillaudeau et al. ont observé une survie sans récurrence significativement plus élevée pour les patients ayant un méningiome avec un indice Ki67 inférieur à 10% [8]. Cependant, des variabilités techniques et d'interprétation de l'indice de prolifération rendent difficile l'établissement d'une valeur seuil utilisable par toutes les équipes [4][18].



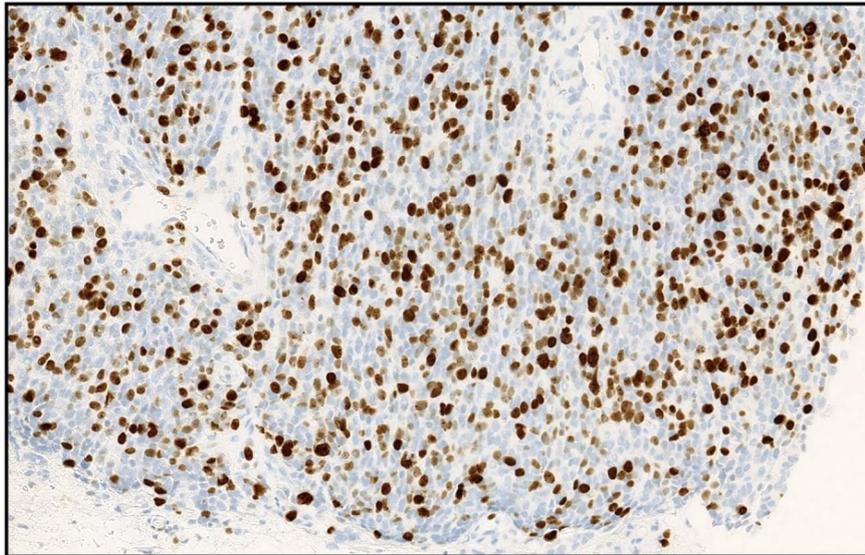


Figure 12 : Indice de prolifération Ki67 évalué à 50% en immunohistochimie x 200 (Laboratoire de Pathologie, CHU de Limoges).

Dans une étude publiée en 2015, Olar et al. ont mis en évidence une association entre l'indice mitotique et la survie sans récurrence. L'indice mitotique correspond au nombre de cellules en mitose évalué en immunohistochimie à l'aide d'un anticorps ciblant l'histone H3 phosphorylé sur la sérine 10. En comparaison de l'index mitotique ou de l'indice Ki67, l'utilisation de cet anticorps semble plus aisée avec une meilleure reproductibilité. Dans cette étude, l'indice mitotique était évalué pour 1000 cellules dans la zone de la tumeur où il était le plus élevé. Trois sous-groupes d'indice mitotique ont été définis : 0-2, 3-4, ≥ 5 . Chacun de ces groupes étaient respectivement associés avec une médiane de survie sans récurrence de 681, 425 et 218 semaines [19].

Des résultats similaires ont été observés en évaluant l'indice de prolifération en immunohistochimie avec l'anticorps anti-MCM7 (mini-chromosome maintenance-7 protein). MCM7 est une protéine décrite comme un marqueur spécifique de prolifération cellulaire. Elle intervient dans le complexe pré-répliatif de l'ADN autorisant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. L'indice de prolifération dans cette étude était significativement plus élevé dans les méningiomes récidivants et associé avec la survie sans récurrence [20].

D'autres facteurs pouvant intervenir dans le risque de récurrence sont évoqués. Il s'agit d'un traitement par radiothérapie, d'une surexpression de la protéine P53 (tumor protein P53), du pourcentage de cellules tumorales en phase S, de l'activité de la télomérase et de nombreux profils d'expression génétique [5] avec notamment la perte des régions chromosomiques 1p36 [21] et 9p21 [22].



I.6. Marqueurs moléculaires

I.6.1. Marqueurs moléculaires des méningiomes

Les déterminants de l'oncogenèse des méningiomes sont peu connus avec pour la plupart de ces tumeurs une fréquence d'altération génomique inférieure à celle des autres tumeurs de l'adulte [23]. Les anomalies les plus fréquemment rapportées concernent le gène *NF2* (*Neurofibromin-2*). Une perte allélique de la région 22q12.2 portant le gène *NF2* est retrouvée dans la majorité des méningiomes associés à une neurofibromatose de type 2 et dans 40 à 70% des méningiomes sporadiques [2]. Des mutations du gène *NF2* ont également été rapportées dans 60% des tumeurs [18] et dans 33 à 50% des tumeurs monosomiques sur l'allèle restant [24]. La fréquence des mutations est sensiblement égale dans les différents grades indiquant qu'il s'agirait d'un événement précoce dans l'oncogenèse puis conservé au cours de l'évolution de la tumeur.

Certaines anomalies chromosomiques sont plus souvent observées dans les méningiomes atypiques et anaplasiques comme une perte allélique des bras chromosomiques 1p, 6q, 9p, 10q, 14q, 18q et un gain allélique des bras chromosomiques 1q, 9q, 12q, 15q, 17q et 20q [25][16]. La perte allélique du bras 1p est associée avec un plus fort risque de récurrence, seulement 4,3% des méningiomes récidivant ne présentent pas de perte de ce bras. Des délétions du bras 14q peuvent également être considérées comme un facteur pronostic de récurrence et une co-délétion 1p/14q est plus fréquemment observée dans des tumeurs de grade élevé [5][4][26][27].

De récentes études de séquençage génomique ou ciblé portant sur des méningiomes sans altération du gène *NF2* ont permis de mettre en évidence de nouvelles mutations. Pour les méningiomes de grade I, des mutations des gènes *AKT1* (*v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*, entraînant une activation de la voie PI3K), *TRAF7* (*Tumor necrosis factor receptor-associated factor 7*, codant pour l'ubiquitine ligase E3 pro-apoptotique), *KLF4* (*Krupple-like factor 4*, facteur de transcription induisant la pluripotence) et *SMO* (*Smoothed, frizzled family receptor*, entraînant une activation de la voie Hedgehog) ont été identifiées et semblent mutuellement exclusives des altérations de *NF2* [28]. Des mutations du gène *SMARCE1* ont été rapportées dans des méningiomes à cellules claires et des mutations du gène *SMARCB1* sont impliquées dans les méningiomes multiples [4]. Ces mutations sont par ailleurs associées avec la localisation de la tumeur et le sous-type histologique. Dans des méningiomes de grade plus élevé, des mutations du promoteur de *TERT* ont été rapportées entraînant une surexpression de la télomérase et un échappement à la sénescence des cellules tumorales.

Ces différentes altérations moléculaires sont résumées dans la figure 13.

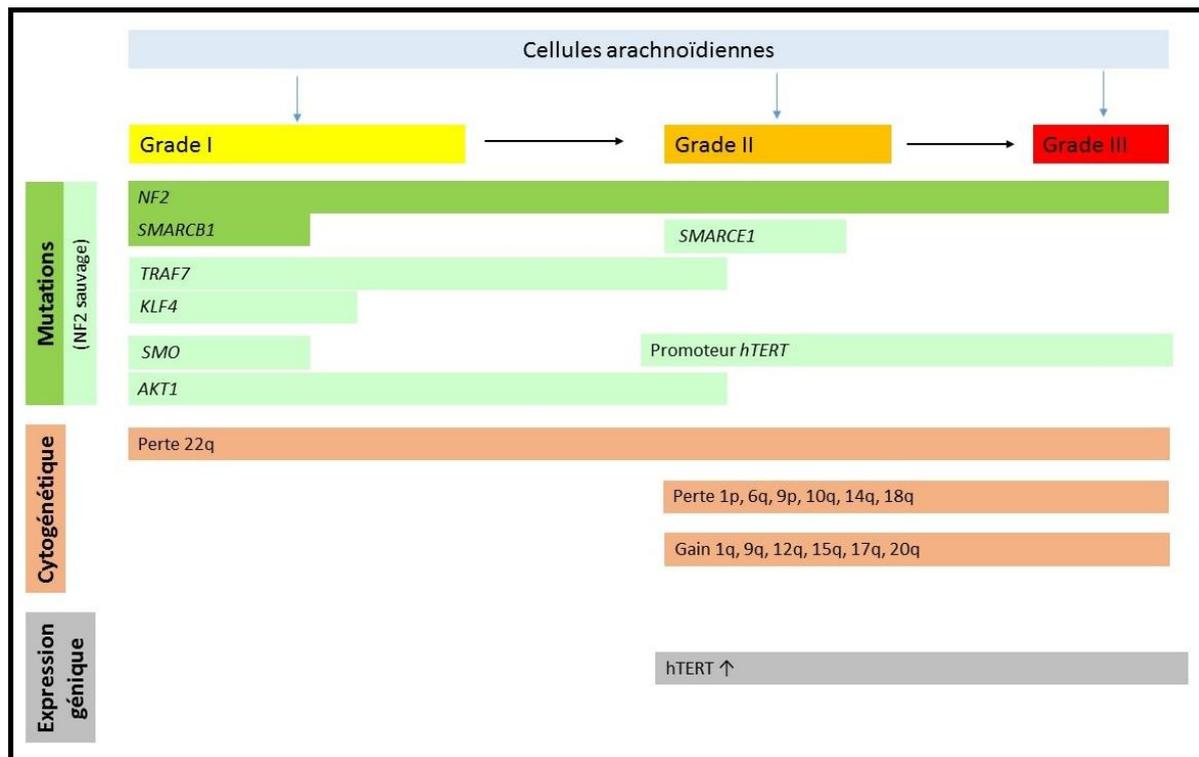


Figure 13 : Modèle génétique de l'oncogenèse et de la progression des méningiomes d'après Louis et al. [4].

I.6.2. Marqueurs moléculaires du cycle cellulaire

L'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67 sont parmi les facteurs les mieux corrélés avec le grade et le risque de récurrence des méningiomes [25][8], indiquant une possible implication des altérations des voies régulant la prolifération cellulaire.

Des anomalies de certaines cyclines, des kinases dépendantes des cyclines (CDK) ou de leurs protéines inhibitrices (CKI : Cyclin-dépendant kinase inhibitor) jouent un rôle important dans plusieurs types de cancers [29]. On peut notamment citer la protéine P16 (CDKN2A : Cyclin-dépendant kinase inhibitor 2A), acteur majeur de la régulation du cycle cellulaire ou encore la protéine PRB (ou RB, Retinoblastoma 1) impliquée dans plus de 80% des cancers.

Un exemple de régulation du cycle cellulaire par ces différentes protéines est présenté dans la figure 14. La cycline D se lie à CDK4 ou CDK6. Ce complexe phosphoryle PRB qui libère alors E2F, facteur de transcription nucléaire responsable de la synthèse de gènes nécessaires à la transition G1/S. C'est également à cette étape qu'interviennent les protéines inhibitrices P15 (CDKN2B : Cyclin-dépendant kinase inhibitor 2B) et P16, en empêchant l'entrée en phase S par inhibition du complexe CDK4/CyclineD.

Des délétions homozygotes et des mutations somatiques des gènes localisés en 9p21 codant pour *CDKN2A* et *CDKN2B* ont été rapportées dans des méningiomes anaplasiques, en accord avec la notion qu'une inactivation de la régulation du cycle cellulaire est un critère important dans la progression tumorale [22][30][31]. L'expression de ces protéines a été analysée en immunohistochimie dans une étude qui a mis en évidence une association entre la récurrence de méningiomes atypiques et l'expression des protéines P16, CDK6 et PRB. Cette étude confirme également l'association de marqueurs prolifératifs (indice Ki67, index mitotique et P53) avec la récurrence de méningiomes atypiques [32]. Par ailleurs, Kheirollahi et al. ont montré une diminution importante de l'expression des ARN messagers de la cycline D2, des protéines P53, PRB et ATM (ataxia telangiectasia mutated) dans des méningiomes de grade II par rapport aux tumeurs de grade I [33]. Dans leur étude, Cheng et al. ont observé qu'une expression élevée de la cycline D1 est associée avec un mauvais pronostic pour les patients atteints de méningiomes, et suggèrent qu'inhiber l'expression de cette cycline pourrait être un traitement potentiel des méningiomes malins [29]. Le rôle de *CDKN2A* et *CDKN2B* dans le développement des méningiomes a été souligné à l'aide de modèles murins par ailleurs inactivés pour le gène *NF2*. Une perte homozygote de *CDKN2A* et *CDKN2B* chez ces souris est associée avec une augmentation de la fréquence de survenue des méningiomes [7][22]. Dans une étude s'intéressant aux gènes suppresseurs de tumeurs dans des méningiomes atypiques et anaplasiques, une amplification des gènes *CDK4* et *MDM2* (murine double minute 2, protéine ubiquitine ligase) et une mutation non-sens de *CDKN2C* ont été observées dans deux méningiomes atypiques distincts [31].

D'autres gènes interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, tels que *CDC25A*, *B* et *C* (Cell division cycle 25 homolog A, B et C) qui codent pour des phosphatases entraînant l'activation des CDK. La famille des polo-kinases quant à elle favorise la transition G2/M et le bon déroulement de la mitose. On peut également citer les protéines du groupe PP2A (Protein phosphatase 2) qui forment des complexes avec une activité phosphatase responsable d'une activation de CDK1. Le gène *TGFβ1* (Transforming growth factor, beta 1), lui, joue un rôle antimitotique par induction des inhibiteurs de CDK. Enfin, les protéines 14-3-3 régulent l'activité de CDC25C par séquestration cytoplasmique.

Ces gènes ont été peu étudiés dans les méningiomes. La découverte d'altérations moléculaires pourrait permettre de modifier les stratégies thérapeutiques [32].

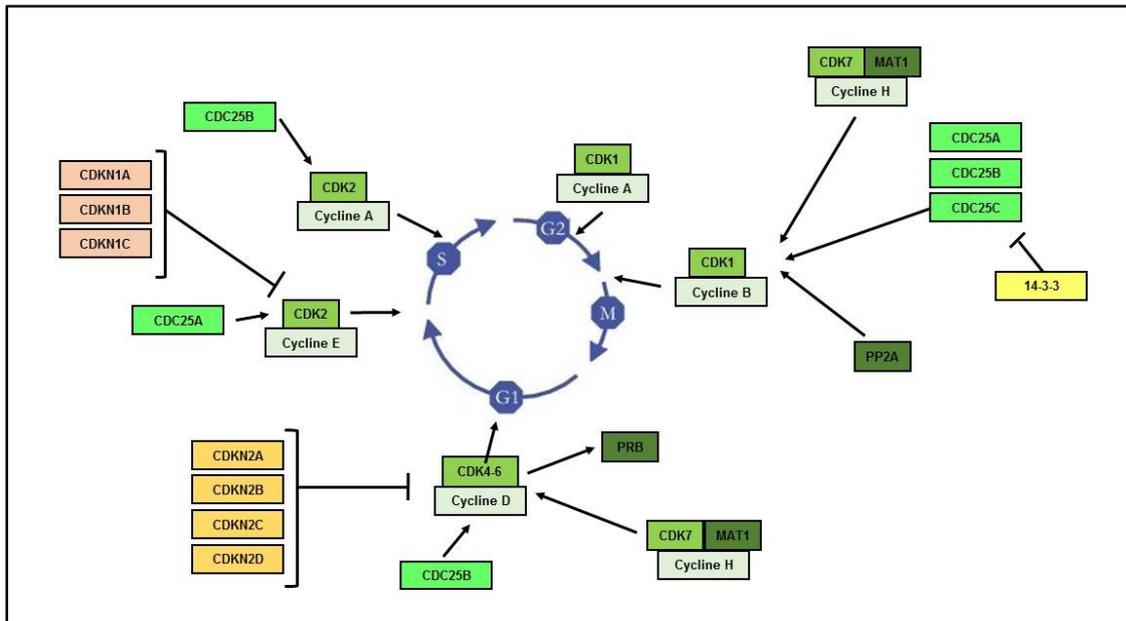


Figure 14 : Le cycle de division cellulaire et sa régulation, adapté d'après Meijer L. [34].

I.7. Traitement

La prise en charge des méningiomes est discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire lorsqu'il s'agit de tumeurs de grade II ou III, ou en cas de récives multiples. Le traitement dépend de plusieurs facteurs dont l'âge du patient, la présence de comorbidités, les symptômes, la localisation et la taille tumorale ainsi que l'association à un effet de masse [7].

I.7.1. Traitements conventionnels

I.7.1.1 Surveillance

En cas de méningiome asymptomatique et localisé à distance de structures fonctionnelles majeures, une surveillance rapprochée clinique et radiologique peut être mise en place. Cette stratégie est envisageable en raison d'une faible croissance des méningiomes de bas grade, évaluée entre 1 et 3 mm par an [7].

I.7.1.2 Chirurgie

Il s'agit du traitement de référence des méningiomes. Une exérèse de la tumeur et de sa base dure est réalisée lorsque la localisation de la tumeur le permet. La qualité de la chirurgie précisée par le grade de Simpson (tableau 2) est liée au risque de récive. Lors d'une exérèse de grade 1 de Simpson, le taux de survie sans progression à 5 ans est de 95% contre 81% lors d'une exérèse de grade 4. [7]



Grade de Simpson	Définition
1	Exérèse macroscopiquement complète intéressant l'attache durale et l'envahissement osseux si présent
2	Exérèse macroscopiquement complète avec coagulation de l'insertion durale
3	Exérèse macroscopiquement complète sans coagulation de l'insertion durale ou sans résection de l'envahissement osseux
4	Exérèse incomplète
5	Biopsie

Tableau 2 : Grade de Simpson lors de l'exérèse chirurgicale d'un méningiomes [1].

I.7.1.3 Radiothérapie

La radiothérapie peut être indiquée en première intention lorsque la tumeur n'est pas résécable. Elle est utilisée en traitement adjuvant lors d'une résection incomplète ou après exérèse d'une tumeur de grade II ou III. Ce traitement est également envisagé lors des récurrences tumorales [14][35]. La technique de référence est l'irradiation en condition stéréotaxique non fractionnée (radiochirurgie) ou fractionnée. Ces techniques très ciblées ont pour but de réduire les risques de complications neurologiques secondaires [7][36].

I.7.2. Thérapies systémiques

Ces thérapies sont généralement envisagées lorsque la chirurgie et la radiothérapie ne peuvent plus être réalisées. Les chimiothérapies classiques ont des effets limités [14]. Des investigations précliniques et de petites études cliniques ont permis d'identifier des thérapies ciblées potentielles tels que des agents anti-angiogéniques (bevacizumab) et des inhibiteurs de tyrosine kinase (sunitinib). En effet, les inhibiteurs des facteurs de croissance vasculaires endothéliaux et de leurs récepteurs ont parfois montré une diminution du volume tumoral [5]. D'autres études évaluent l'efficacité de la trabectedine (drogue cytotoxique se liant à l'ADN et empêchant la fixation de facteurs de transcription de gènes indispensables à la division cellulaire) et des inhibiteurs de *SMO* et *AKT1* dans des méningiomes porteurs des mutations de ces gènes [7].



II. Objectifs

Un des challenges majeur concernant la prise en charge des méningiomes est l'identification des tumeurs à haut risque de récurrence. Malgré les informations apportées par la classification histologique, la variabilité du risque de récurrence reste importante pour les tumeurs de grade I et II. Une meilleure compréhension des altérations moléculaires impliquées dans le développement des méningiomes pourrait faciliter l'identification des tumeurs de mauvais pronostic afin d'en modifier la prise en charge (radiothérapie adjuvante, suivi rapproché) et servir ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques.

La corrélation de l'index mitotique et de l'indice de prolifération Ki67 avec le potentiel de récurrence des méningiomes oriente vers une probable altération des voies de régulation du cycle cellulaire dans ces tumeurs récidivantes.

L'objectif principal de ce travail est la recherche d'anomalies moléculaires des acteurs du cycle cellulaire intervenant dans la récurrence des méningiomes.

Les objectifs secondaires sont d'étudier l'association entre les anomalies moléculaires impliquées dans la récurrence et les données cliniques (sexe, survie sans récurrence (SSR), survie globale) et histologiques (grade tumoral, index mitotique et indice Ki67).

Nous avons pour cela étudié 30 cas de méningiome avec leur récurrence, soit un total de 45 échantillons, par technique de séquençage nouvelle génération (NGS, next-generation sequencing) avec un panel comprenant des amorces qui encadrent les séquences codantes de 84 gènes du cycle cellulaire. Le matériel biologique inclus en paraffine a pu être obtenu grâce au Centre de Ressources Biologiques Cancer du CHU de Limoges (CRBiolim). Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une thématique de recherche au sein de l'équipe d'accueil 3842 « Homéostasie Cellulaire et Pathologies ». Il a été réalisé en collaboration avec le laboratoire de Pathologie du CHU Dupuytren de Limoges et la Plateforme de Génétique Moléculaire des Cancers du Limousin (PGMC).



III. Matériels et méthodes

III.1. Données cliniques et histopathologiques

Les 45 échantillons de tissus tumoraux sélectionnés rétrospectivement proviennent de 30 patients atteints de méningiome intracrânien, opérés et traités au Centre Hospitalier Universitaire de Limoges entre 1989 et 2016. Du tissu sain correspondant a été sélectionné pour 11 cas (tissu en périphérie de la tumeur). Les échantillons de ces tumeurs ont été inclus en paraffine après fixation dans du formol-zinc pendant 12 à 24h. Une partie de certains des échantillons a été congelée et conservée à -80°C.

Pour chaque cas, une lame représentative de la tumeur a été sélectionnée après étude au microscope optique par un pathologiste. Le diagnostic de ces tumeurs a été établi selon la classification de l'OMS 2016. Dans les cas où une embolisation de la tumeur a été réalisée avant l'exérèse chirurgicale, la présence de nécrose n'a pas été prise en compte pour l'établissement du grade tumoral. Les échantillons ont été utilisés en conformité avec la Loi de Bioéthique 2004.

Les données cliniques incluant la date de naissance, la date de décès, le sexe, la date de la chirurgie, la date de la récurrence, les symptômes au moment du diagnostic, la localisation de la tumeur et la date des dernières nouvelles ont été obtenues de manière rétrospective en étudiant les dossiers des patients. Le grade de Simpson a été déterminé à l'aide du compte-rendu opératoire et de l'imagerie post-opératoire. La survie sans récurrence a été calculée en utilisant la date de chirurgie de la tumeur primitive et la date de la première récurrence.

La récurrence a été définie sur les examens d'imagerie comme l'apparition d'une masse tumorale après exérèse macroscopiquement totale ou l'augmentation notable de la taille d'un résidu tumoral après une période de stabilité.

L'index mitotique a été analysé en fonction des catégories définissant les grades tumoraux de l'OMS.

L'indice de prolifération Ki67 a été évalué dans la zone tumorale dans laquelle il était le plus élevé en comptant le nombre de noyaux marqués pour 100 cellules tumorales (CONFIRM anti-Ki-67 (30-9) Rabbit Monoclonal Primary Antibody, automate BenchMarck XT, Roche®, Meylan, France). Un seuil de 5% a été établi pour les analyses, proche du seuil associé avec le caractère récidivant des méningiomes dans d'autres études.

III.2. Génétique moléculaire

III.2.1. Extraction de l'ADN génomique à partir des tissus

Après sélection d'une zone riche en cellules tumorales ou d'une zone de tissu sain (parenchyme cérébral, méninge ou épiderme) sur les lames colorées par l'HPS, environ 10 mg de tissu ont été prélevés par grattage sur le bloc de paraffine correspondant. L'extraction a été réalisée avec le kit Promega® Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) dans l'automate d'extraction Maxwell 16 (Promega). Les échantillons ont d'abord été incubés avec 20 µL de Protéinase K et 180 µL de Tampon d'incubation pendant 2h à 70°C. Puis 400 µL de Tampon de lyse ont été ajoutés. Après centrifugation, les échantillons ont été déposés dans les cartouches de l'automate. Les échantillons ont alors été récupérés dans des tubes contenant 70 µL de solution d'élution.

III.2.2. Quantification de l'ADN génomique

Les concentrations en ADNg (ADN génomique) ont été évaluées par spectrophotométrie (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) puis par fluorimétrie (QuantiFluor® ONE dsDNA System, Promega). Pour l'utilisation du fluorimètre, 1 µL de solution (eau, échantillon standard et échantillons à analyser) a été mélangé à 199 µL de solution QuantiFluor® ONE Dye suivi d'une incubation à l'abri de la lumière pendant 5 minutes. L'appareil a été calibré à l'aide des mélanges contenant l'eau et l'échantillon standard puis les différents échantillons ont pu être analysés.

III.2.3. Génotypage par séquençage massivement parallèle

III.2.3.1 Design/conception des amorces

L'utilisation de l'outil en ligne Ion Ampliseq™ Designer (Thermo Fisher Scientific) a permis de réaliser un panel d'amorces spécifique des gènes d'intérêt en utilisant le symbole des gènes d'après la nomenclature HUGO (Human Genome Organisation). La constitution du panel a été effectuée en intégrant 84 gènes (annexe 1) parmi ceux intervenant au plus proche dans la régulation du cycle cellulaire [37] [38]. Afin d'améliorer la couverture *in silico*, la spécificité du design a été diminuée. La couverture correspond à la proportion des séquences recherchées qui sont couvertes par le séquençage. Ceci a permis d'obtenir une couverture moyenne de 94,2%. Le panel a été réalisé sous la forme de deux mélanges permettant d'obtenir 1095 (mélange d'amorces 1) et 1083 (mélange d'amorces 2) amplicons correspondant à 216,77 Kb. La taille des amplicons est comprise entre 125 et 175 pb.



III.2.3.2 Préparation des bibliothèques

Amplification des cibles

L'amplification des gènes d'intérêt a nécessité l'apport de 12 ng d'ADN (3 µL à 4 ng/µL) pour chaque mélange d'amorces, auxquels ont été ajoutés 2 µL de Ion Ampliseq™ HiFi Mix et 5 µL de Ion Ampliseq™ Primer pool pour un volume réactionnel de 10 µL. Différents cycles de PCR (Polymerase Chain Reaction) ont ensuite été réalisés selon le protocole du fabricant détaillé ci-dessous afin d'amplifier les régions cibles.

Etape	But	Température	Temps
Unique	Activation de l'enzyme	99°C	2 minutes
21 cycles	Dénaturation des doubles brins d'ADN	99°C	15 secondes
	Elongation des nouveaux brins	60°C	8 minutes
Unique	Conservation de la réaction	10°C	Prolongé

Digestion partielle des amorces

A partir de cette étape, les amplifications obtenues avec les mélanges d'amorces 1 et 2, pour un même échantillon ont été réunies. Pour chaque échantillon, 2 µL de FuPa Reagent ont été ajoutés puis un nouveau programme dans le thermocycleur a été effectué pour d'obtenir la digestion partielle des amorces. Ce programme comprenait 4 étapes uniques : une de 10 minutes à 50°C, une de 10 minutes à 55°C, une de 20 minutes à 60°C et une d'une heure maximum à 10°C.

Ligation des index et des adaptateurs

Afin de séquencer plusieurs bibliothèques sur une même puce (multiplexage), un index a été assigné à chaque échantillon. Ces index correspondent à des séquences uniques de 6 à 10 nucléotides. Ils permettent d'identifier l'échantillon et de repérer d'éventuelles contaminations. Pour réaliser la ligation de ces index aux amplicons, un mélange adaptateur/index a été effectué contenant : 0,5 µL de Ion P1 Adapter, 0,5 µL de Ion Xpress™ Barcode X (X correspondant au numéro de l'index choisit pour l'échantillon) et 1 µL d'eau sans nucléase. L'étape suivante a été l'ajout à chaque échantillon amplifié de 4 µL de Switch Solution, 2 µL de mélange adaptateur/index et 2 µL d'ADN Ligase. Les réactions de ligation ont été effectuées dans le thermocycleur selon le programme suivant : 30 minutes à 22°C, 10 minutes à 72°C et une heure maximum à 10°C.



Purification des librairies

Les échantillons ont été mélangés avec 45 µL de NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select (Macherey-Nagel, Hoerd, France) afin de pouvoir réaliser deux lavages successifs des billes sur lesquelles sont fixés les amplicons avec 150 µL d'éthanol à 70%.

Quantification des librairies amplifiées

La quantification des librairies avant le séquençage a nécessité une étape supplémentaire d'amplification des librairies avec des amorces communes et complémentaires des adaptateurs liés précédemment aux amplicons. Pour cela, 50 µL de Platinum PCR SuperMix High Fidelity et 2 µL de Library Amplification Primer Mix ont été ajoutés à chaque échantillon. Le surnageant des tubes a été récupéré grâce à un support magnétique et placé dans le thermocycleur pour réaliser le programme suivant.

Etape	Température	Temps
Unique	98°C	2 minutes
5 cycles	98°C	15 secondes
	64°C	1 minute
Unique	10°C	Prolongé

Cette amplification a été suivie d'une purification des échantillons à l'aide du réactif NucleoMag® NGS Clean-up and Size Select et d'éthanol à 70%. Les librairies ont ensuite été mélangées à 50 µL de Low TE et le surnageant récupéré.

La quantification a été effectuée à l'aide de l'Agilent® 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Santa Clara, United States) pour 10 échantillons. Cela a permis de s'assurer de la présence de fragments d'ADN entre 125 et 300 paires de base, correspondant à la taille des fragments d'ADN amplifiés. Tous les échantillons ont été quantifiés avec le Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) à l'aide du kit Qubit® dsDNA HS Assay à partir de 10 µL de chaque échantillon.

Les différentes étapes de préparation des librairies sont illustrées dans la figure 15.



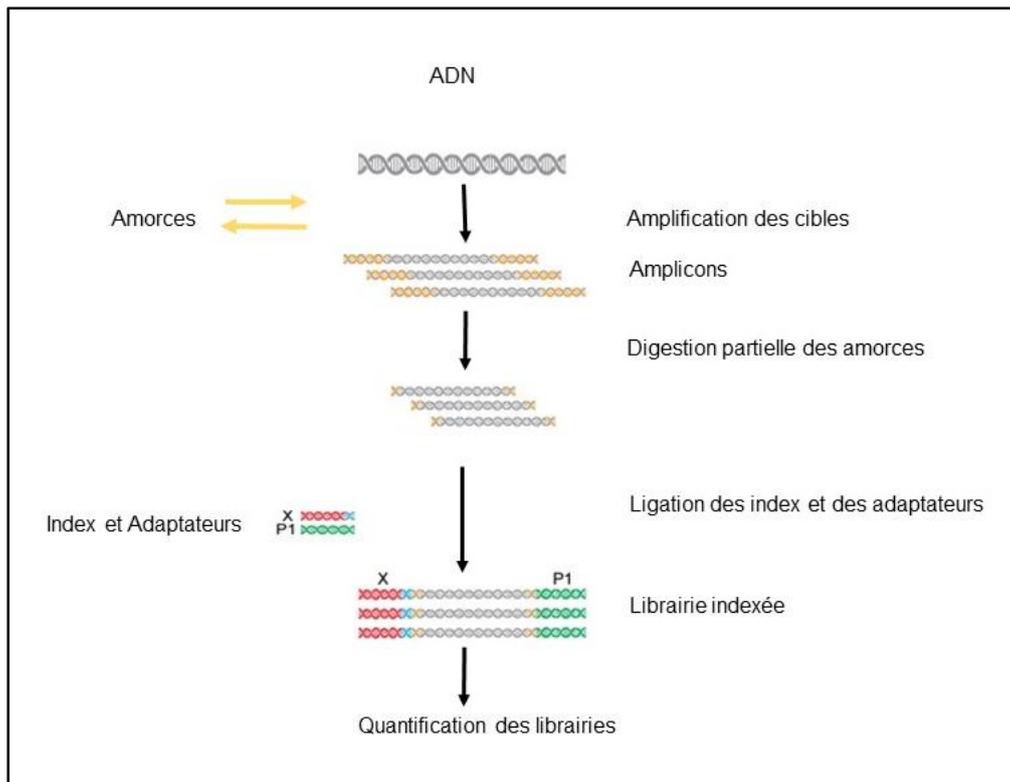


Figure 15 : Préparation des librairies d'après le guide utilisateur Ion Ampliseq™.

III.2.3.3 Réaction d'amplification clonale par PCR en émulsion

Avant de procéder à la réaction de PCR en émulsion, les librairies ont été diluées pour obtenir une concentration à 100pM (soit 15ng/mL pour des amplicons allant jusqu'à 225 pb). Cela a permis de réaliser un mélange équimolaire des librairies, nécessaire à l'obtention d'un ratio idéal d'un fragment d'ADN par particule ISP (Ion Sphere™ particles, Thermo Fisher Scientific) pour chaque fragment d'ADN amplifié.

L'amplification clonale ainsi que le chargement de la puce ont été effectués par l'ingénieur en charge de l'unité de séquençage du CHU de Limoges (Genolim). J'ai pu assister aux différentes phases de ces étapes. La PCR en émulsion a été réalisée à l'aide du kit Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 (Thermo Fisher Scientific). Les librairies ont d'abord été mélangées aux ISP et à un mix contenant les éléments nécessaires à la PCR puis le mélange a été placé dans le filtre de l'Ion OneTouch™ 2 System (Thermo Fisher Scientific). Lorsque la solution contenant les librairies passe à travers le filtre, des microréacteurs contenant idéalement une sphère et un fragment d'ADN sont générés dans l'huile. La réaction de PCR se produit dans ces microréacteurs. Les sphères possèdent à leur surface des fragments d'ADN qui vont permettre la liaison des ADN synthétisés aux sphères via les adaptateurs P1. Chaque

matrice est ainsi amplifiée de manière monoclonale à la surface d'une ISP afin de rendre les signaux détectables lors du séquençage (environ un million de copies d'un fragment d'ADN sur une sphère). Une étape d'enrichissement des sphères est ensuite nécessaire pour éliminer celles ne contenant pas de fragment d'ADN à leur surface. Pour cela des billes magnétiques recouvertes de streptavidine sont utilisées. Les fragments d'ADN complémentaires de ceux liés aux sphères portent à leur extrémité une biotine. Le mélange des billes magnétiques avec le produit de la PCR grâce au couplage biotine / streptavidine permet de conserver uniquement les sphères portant des fragments d'ADN à leur surface. Puis une étape de dénaturation est effectuée pour éliminer les brins d'ADN portant la biotine. Les sphères obtenues sont recouvertes à leur surface d'ADN simple brin. Le fluorimètre Qubit 2.0 a permis de vérifier le chargement des sphères et de procéder au chargement de la puce lorsque le ratio de sphères liées à l'ADN sur les sphères non liées était suffisant (10 à 25%).

III.2.3.4 Chargement de la puce et réaction de séquençage

Le séquenceur utilisé est l'Ion Proton™ System de Life Technologies (Thermo Fisher Scientific). Sa capacité de lecture est d'environ 10 giga bases par séquençage. La détection d'altérations somatiques nécessite une profondeur de lecture, c'est-à-dire un nombre de fois où chaque base est séquencée, d'environ 500 à 1000X.

La réaction de séquençage effectuée par l'Ion Proton est une technique de séquençage massivement parallèle, également appelée nouvelle génération, qui permet de regarder en même temps la réplication de milliers de fragments d'ADN. Elle repose sur un principe de technologie semi-conductrice (Ion Torrent™) basée sur les propriétés de l'ADN polymérase qui lorsqu'elle incorpore un nucléotide au brin d'ADN en cours de synthèse crée une liaison phosphodiester, entraînant la libération d'un ion hydrogène (H⁺). Les sphères contenant les fragments d'ADN à séquencer sont chargées sur la puce Ion PI™ Chip v3 (Thermo Fisher Scientific). Cette puce contient 163 millions de micro-puits. Chaque puit va accueillir une sphère grâce à une brève étape de centrifugation. Ces micro-puits contiennent un milieu réactionnel ainsi qu'une couche mince pH-mètre au fond du puit. Des nucléotides non modifiés (A,T,C,G) sont successivement injectés dans chaque micro-puits. Lorsqu'un nucléotide est incorporé par la polymérase sur le principe de la complémentarité des bases, la libération d'un ion H⁺ entraîne une variation de pH dans le puit qui est détectée et transformée en signal numérique, finalement converti en base dans la séquence pour interprétation par l'utilisateur. Lorsque deux nucléotides identiques sont incorporés à la suite, le signal double et est alors enregistré en 2 bases identiques. Cependant cette interprétation



n'est fiable que pour 5 à 6 nucléotides identiques successifs, cela peut donc être problématique lorsque de nombreux homopolymères sont présents.

III.2.4. Analyse bio-informatique des données

Outils de filtration des données brutes

L'analyse par séquençage nouvelle génération permet de détecter une variation d'un seul nucléotide (SNV : single nucleotide variation), des insertions ou délétions de petite taille (INDELS) ainsi qu'une variabilité du nombre de copies d'un gène ou d'un locus donné (CNV : copy number variation).

Les rapports récupérés après chaque séquençage donnent des informations sur la qualité du séquençage : chargement de la puce, nombre de bases analysées, nombre total de lectures (« reads »), score de qualité relié à la probabilité d'erreur d'identification d'une base (Phred Score)... afin de s'assurer de la validité des résultats.

Plusieurs étapes de transformation des données sont nécessaires avant de pouvoir les interpréter. Les signaux acquis par le séquenceur sont d'abord convertis en nucléotides (base calling) sous forme d'un fichier BCL (base call format). Puis le démultiplexage avec repérage des index et attribution des lectures à chaque échantillon permet d'obtenir un fichier FASTQ. Ces fichiers FASTQ ont pu être récupérés sur le serveur Torrent Browser du CHU de Limoges et transmis à la cellule Bioinformatique de l'institut GEIST (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques) de Limoges.

Pré-traitement des données

Un contrôle qualité a été effectué à l'aide de l'outil MultiQC [39] qui permet de rassembler les différentes réactions de séquençage dans un même fichier pour les comparer entre elles (plusieurs éléments sont analysés comme le pourcentage de GC). Les « reads » contenus dans les fichiers FASTQ ont ensuite été alignés sur le génome de référence Hg 19 (human genome 19 ou GRCh37) grâce au logiciel d'alignement BWA mem (Burrows-Wheeler Aligner, version 0.7.12-r1039) [40]. Ce logiciel est adapté aux « reads » dont la longueur est supérieure ou égale à 70 pb. Il a été paramétré avec des options permettant d'éliminer les « reads » alternatifs (alignements non-linéaires) et non primaires (duplicats) ainsi que ceux ayant un score de qualité ou MAPQ (MAPping Quality) inférieur à 20 (ce score donne la probabilité que l'alignement reporté soit correct et reflète l'unicité de l'alignement). Le fichier BED (browser extensible data) fourni lors de la réalisation du panel d'amorces est également utilisé pour restreindre l'analyse bio-informatique aux régions ciblées par ce panel. Le fichier



généralisé après alignement est un fichier BAM (binary alignment/map). La suite logicielle Picard (version 1.88) [41] permet de trier et d'indexer le fichier BAM pour en faciliter la manipulation.

Appel des variants

Cette étape a pour objectif d'identifier les variants (ou altérations) qui sont définis comme une modification de la séquence ADN dans les tissus tumoraux par rapport au tissu sain et/ou au génome de référence. Le gestionnaire d'outils Genome Analysis Toolkit (GATK, version 3.7) [42] a permis de recalibrer la qualité des bases avec l'outil GATK BQSR (base quality score recalibration), de récupérer la profondeur de lecture pour chaque amplicon et de réaliser l'appel des variants. L'algorithme utilisé pour l'appel des variants provient des recommandations fournies par GATK qui font partie des meilleures pratiques pour détecter des variants somatiques. Cet algorithme initialement destiné à l'analyse de données de séquençage de génome ou d'exome a été adapté à nos données de séquençage ciblé.

Dans notre analyse, les duplicats ont été conservés puisque l'analyse portait sur des séquences ciblées amplifiées, donc dupliquées par définition, par PCR.

1/ Pour les tissus tumoraux avec tissu sain correspondant

Le module ContEst de GATK [43] a été appliqué. Ce module permet d'estimer le niveau de contamination croisée entre tissu tumoral et tissu sain pour un échantillon afin d'en minimiser l'effet lors de l'appel des variants. La commande Mutect2 a été utilisée pour l'appel des variants. Cette commande utilise plusieurs fichiers annexes qui servent de filtre : un Panel of Normal (PON) créé avec l'ensemble des variants identifiés dans les 11 tissus sains, les bases de données 1000 genomes, dbSNP (The Single Nucleotide Polymorphism Database) et COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer).

2/ Pour les tissus tumoraux sans tissu sain correspondant

En l'absence de tissu sain correspondant, le module ContEst n'a pas pu être appliqué. Seuls les variants avec une fréquence allélique supérieure ou égale à 5% ont été retenus. Les filtres dbSNP et COSMIC ont été utilisés puis les échantillons ont été comparés au PON obtenu à partir des tissus sains avec un filtre manuel.

Les variants obtenus ont été qualifiés de variants PASS, c'est-à-dire considérés comme vrais variants somatiques. Le fichier regroupant ces variants est un fichier VCF (variant call format).

Annotation des variants

L'outil ANNOVAR [44] a été utilisé pour annoter le fichier VCF qui a ensuite été converti en

fichier excel. Ce fichier excel comportait de multiples annotations pour chaque variant : le chromosome concerné, la localisation selon génome de référence Hg 19, le nucléotide de référence, le nucléotide variant, la fréquence allélique, la profondeur, le type de variant (SNV, INDELS), le gène sur lequel se situe le variant, le changement induit par le variant (silencieux, faux-sens, non-sens), la modification entraînée selon le numéro d'accèsion NM_ du gène, la position du variant au sein de l'amplicon ainsi que sa localisation intronique ou exonique. Ce fichier indiquait également si le variant identifié était déjà référencé dans les bases de données COSMIC ou ClinVar.

Les différentes étapes de l'analyse bio-informatiques sont résumées dans la figure 16.

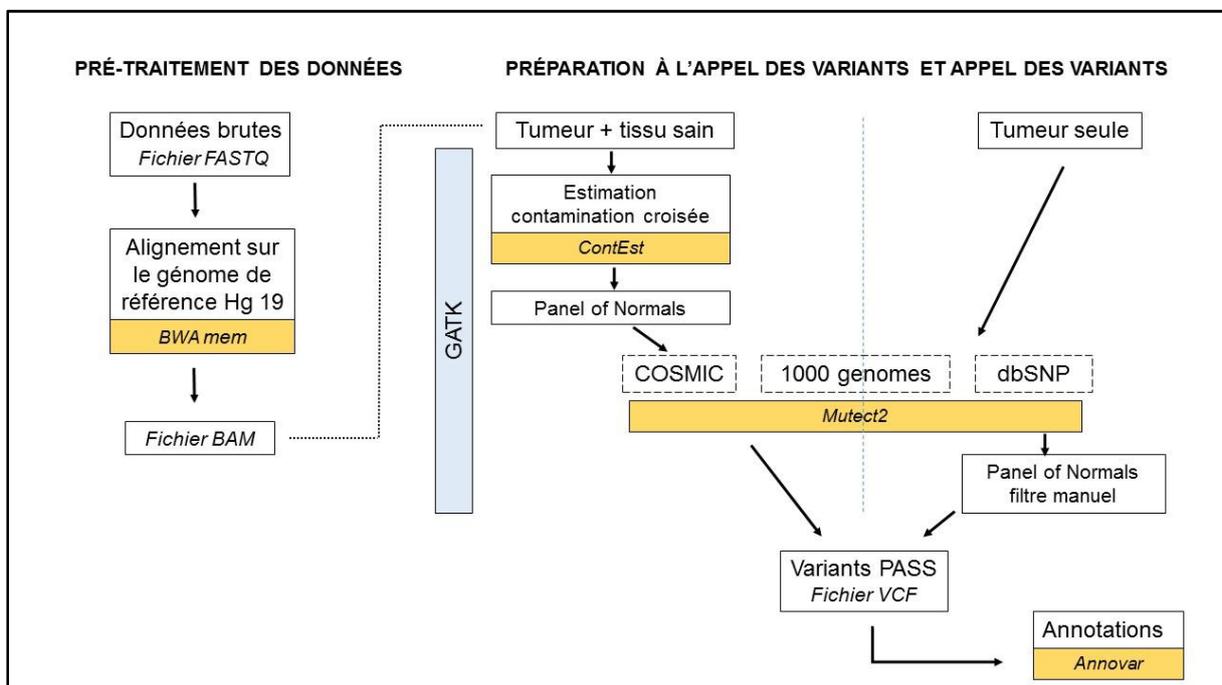


Figure 16 : Pipeline de détection des variants somatiques adapté d'après <https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/mutect2.php> [42].

CNV

L'analyse des CNV par séquençage massivement parallèle nécessite pour être fiable des données provenant de séquençage d'exome ou de génome, permettant de normaliser les profondeurs obtenues pour chaque locus par la moyenne des profondeurs de l'ensemble des fragments. Des logiciels sont en cours de développement pour appliquer cette analyse à des séquençages ciblés.

III.2.5. Interprétation des données

Pour les différents variants d'intérêt identifiés, plusieurs bases de données ont été consultées. Les sites GenAtlas [45] et Ensembl GRCh37 [46] ont permis d'obtenir des informations sur le gène impliqué (numéro d'accension de la séquence de référence et fonction). Les sites COSMIC [47] et ClinVar [48] ont été consultés lorsque le variant identifié dans notre étude était référencé.

III.2.6. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView 5.0 (SAS Institute). Les comparaisons des variables qualitatives ont été réalisées par un test du Chi-2. L'analyse de survie sans récurrence (SSR) a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier avec une comparaison des médianes de survie par le test du Log-rank ou par le test de Breslow-Gehan-Wilcoxon (les valeurs obtenues avec ce test seront marquées par un astérisque). La date d'origine était la date de diagnostic de la tumeur primitive ou de la récurrence. Le seuil de significativité p choisi pour l'ensemble des analyses statistiques est de 0,05.



IV. Résultats

IV.1. Données cliniques et histopathologiques

IV.1.1. Données cliniques et épidémiologiques

L'âge moyen au diagnostic de la tumeur primitive était de 58 ans (± 14) tous grades confondus, de 54 ans (± 14) pour les tumeurs primitives de grade I et de 60 ans pour les tumeurs primitives de grade II (± 12) et III (± 16).

Dans notre série, le sex ratio était de 1,7 (19 femmes et 11 hommes) en ce qui concerne les tumeurs primitives, avec une prédominance de femmes pour les méningiomes de grade I (91%) et une prédominance d'hommes pour les tumeurs de grade III (67%).

Au moment du diagnostic, des céphalées étaient présentes dans 38% des cas, un déficit neurologique dans 33% des cas et une épilepsie dans 27% des cas. Les patients étaient asymptomatiques dans 13% des cas.

Les tumeurs étaient majoritairement localisées au niveau de la convexité cérébrale (64%) et parmi les tumeurs de grade I, 54% étaient de type transitionnel.

La durée entre la tumeur primitive et la première récurrence était en moyenne de 60 mois (± 75).

A la date de point fixée au 15 février 2017, la durée moyenne du suivi des patients était de 75 mois (± 73).

Aucun des patients n'était connu comme ayant une neurofibromatose de type 2.



IV.1.2. Données histopathologiques

L'analyse a porté sur 30 tumeurs primitives dont 17 méningiomes récidivants correspondant à 4 tumeurs de grade I, 5 tumeurs de grade II et 8 tumeurs de grade III. Les 13 autres tumeurs primitives étaient des méningiomes non récidivants correspondant à 7 tumeurs de grade I, 5 tumeurs de grade II et une de grade III. Les. L'étude a également été réalisée sur 15 récurrences des méningiomes primitifs précédemment décrits dont 2 tumeurs de grade I, 4 tumeurs de grade II et 9 tumeurs de grade III.

Le tableau 3 indique l'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67 en fonction du grade tumoral pour l'ensemble des échantillons tumoraux.

Les données cliniques et histopathologiques sont détaillées dans le tableau 4. Les informations relatives aux tissus sains sont précisées dans l'annexe 2.

	Grade I	Grade II	Grade III	<i>p</i>
Index mitotique				<i>< 0,0001</i>
Inférieur à 4	13	3	0	
4-19	0	11	1	
Supérieur ou égal à 20	0	0	17	
Ki67				<i>0,0009</i>
Inférieur ou égal à 5%	8	2	1	
Supérieur à 5%	5	12	17	

Tableau 3 : Index mitotique et indice de prolifération Ki67 en fonction du grade tumoral.



Cas	Caractéristique	Age au diagnostic*	Sexe	Symptôme au diagnostic			SSR**	DDN***	Etat clinique	Localisation	Grade de Simpson	Type histologique	Grade OMS	Mitoses (nombre pour 1,6 mm ²)	Ki67****
				Comitahé	Déficit	Céphalée									
1	TPNR	46	F	Oui	Non	Non	Non	90	Stable puis perdu de vue	Convexité	4	Transionnel	1	2	6
2	TPNR	65	F	Non	Non	Oui	Non	127	Stable	Convexité	2	Fibroblastique	1	3	5
3	TPNR	57	F	Oui	Oui	Non	Non	60	Stable puis perdu de vue	Convexité	1	Microkystique	1	1	1
5	TPNR	44	F	Non	Non	NC	Non	57	Stable puis perdu de vue	Falcotentorial	2	Transionnel	1	3	2
6	TPNR	71	F	Non	Non	Oui	Non	5	Stable puis perdu de vue	Convexité	2	Transionnel	1	2	1
8	TPNR	53	F	Oui	Non	Oui	Non	123	Stable	Convexité	2	Transionnel	1	1	1
9	TPNR	75	F	Non	Oui	Oui	Non	24	Stable	Base	2	Méningothélial	1	2	2
10	TPR	36	F	Oui	NC	NC	Non	320	Stable	Convexité	NC	Transionnel	1	2	12
11	Récidive cas 10	60	F	Oui	Oui	Non	Non	289	Stable	Falcotentorial	4	Atypique	2	8	30
12	TPR	38	F	NC	NC	NC	NC	123	Stable	Convexité	NC	Fibroblastique	1	2	8
13	Récidive cas 12	54	F	Non	Non	Non	Non	41	Stable	Convexité	1	Fibroblastique	1	1	7
14	TPR	66	M	Non	Oui	Non	Non	90	Stable	Convexité	2	Transionnel	1	2	3
16	Récidive cas 14	70	F	Non	Non	Non	Oui	42	Stable	Falcotentorial	2	Atypique	2	6	12
17	TPR	40	F	Non	Non	NC	Non	77	Stable	Convexité	4	Transionnel	1	2	3
19	Récidive cas 17	43	F	Non	Non	Non	Oui	6	Stable	Base	4	Méningothélial	1	2	8
20	TPNR	69	F	Non	Non	NC	Non	6	Stable puis perdu de vue	Convexité	1	Atypique	2	1	8
21	TPNR	69	F	Non	Oui	NC	Non	1	Décédé	Convexité	2	Atypique	2	2	25
23	TPNR	64	F	Non	Oui	Non	Non	61	Stable	Convexité	1	Stable	2	4	3
25	TPNR	67	M	Non	Non	Oui	Non	1	Stable puis perdu de vue	Convexité	1	Atypique	2	6	1
26	TPNR	77	F	Non	Oui	Non	Non	29	Décédé	Falcotentorial	2	Atypique	2	5	10
27	TPR	52	F	Non	Non	Non	Oui	154	Stable	Intraventriculaire	4	Atypique	2	8	10
28	Récidive cas 27	65	F	Non	Non	Non	Non	19	Stable	Intraventriculaire	3	Malin	3	36	50
29	TPR	67	M	Non	Oui	Oui	Non	31	Stable	Convexité	2	Atypique	2	1	8
30	Récidive cas 29	68	M	Non	Oui	NC	Non	17	Stable puis perdu de vue	Convexité	4	Atypique	2	5	8
31	TPR	45	F	Non	Non	Oui	Non	54	Stable	Convexité	2	Atypique	2	10	10
32	Récidive cas 31	46	M	Non	Non	Oui	Non	3	Stable	Falcotentorial	4	Malin	3	23	28
33	TPR	41	M	Non	Oui	Oui	Non	30	Stable	Convexité	4	Atypique	2	12	25
34	Récidive cas 33	41	M	Non	Non	Non	Oui	200	Stable	Convexité	4	Malin	3	29	40
35	TPR	48	M	Non	Oui	Oui	Non	141	Décédé	Falcotentorial	1	Atypique	2	5	12
36	Récidive cas 35	60	M	Non	Non	Oui	Non	13	Décédé	Convexité	2	Malin	3	10	5
38	TPR	69	M	Oui	Oui	Non	Non	20	Récidive	Convexité	4	Malin	3	31	70
40	TPR	72	M	Oui	Non	Oui	Non	3	Décédé	Base	4	Malin	3	22	50
41	TPNR	81	F	Non	Non	Oui	Non	22	Stable	Falcotentorial	4	Malin	3	29	30
42	TPR	48	M	Oui	Oui	Oui	Non	19	Stable	Convexité	4	Malin	3	42	30
43	Récidive cas 42	50	M	Oui	Non	NC	Non	41	Stable puis perdu de vue	Convexité	4	Malin	3	49	20
44	TPR	53	M	Oui	Non	NC	Non	96	Décédé	Convexité	2	Malin	3	30	15
45	Récidive cas 44	60	M	NC	NC	NC	NC	42	Décédé	NC	2	Malin	3	24	20
47	TPR	71	F	NC	NC	NC	NC	61	Décédé	Falcotentorial	1	Malin	3	26	10
48	Récidive cas 47	74	F	Non	Non	Non	Oui	74	Décédé	Convexité	4	Malin	3	20	10
50	TPR	60	F	Non	Oui	NC	Non	21	Décédé	Convexité	1	Malin	3	22	20
51	Récidive cas 50	62	F	NC	NC	NC	NC	37	Décédé	Convexité	2	Malin	3	20	20
52	TPR	29	M	Non	Non	Oui	Non	152	Décédé	Convexité	2	Malin	3	26	10
53	Récidive cas 52	32	M	Non	Non	Oui	Non	17	Décédé	Base	2	Malin	3	21	30
54	TPR	61	M	Oui	Non	Oui	Non	26	Décédé	Convexité	2	Malin	3	30	30
56	Récidive cas 54	62	M	Oui	Oui	Oui	Non	62	Récidive	Falcotentorial	4	Atypique	2	5	30

Tableau 4 : Données cliniques et histopathologiques, * âge au diagnostic en années, **SSR : survie sans récidive en mois, DDN*** : date des dernières nouvelles en mois après le diagnostic, Ki67**** (en %), TPNR : tumeur primitive non récidivante, TPR : tumeur primitive récidivante, NC : non connu.

IV.2. Résultats du séquençage

IV.2.1. Données du rapport de séquençage

L'analyse de l'ensemble des échantillons a été réalisé en 5 réactions de séquençage. La qualité du séquençage a été étudiée grâce au rapport de séquençage en fonction des paramètres indiqués dans le tableau 5.

Séquençage	Chargement de la puce	Nombre de puits chargés	Nombres de bases lues	Nombre total de lectures	Longueur moyenne des lectures
1	91%	135.10 ⁶	9,16 gb	85.10 ⁶	107 pb
2	82%	122.10 ⁶	6,27 gb	62.10 ⁶	102 pb
3	85%	125.10 ⁶	2,38 gb	22.10 ⁶	109 pb
4	76%	113.10 ⁶	7,11 gb	50.10 ⁶	108 pb
5	85%	125.10 ⁶	6,06 gb	65.10 ⁶	109 pb

Tableau 5 : Paramètres qualitatifs principaux du rapport de séquençage.

En moyenne, 124 millions de micro-puits contenaient des sphères sur les 163 millions disponibles soit un chargement moyen de la puce à 84%. La figure 17 illustre un exemple du résultat de chargement de la puce observé dans le rapport de séquençage. Le nombre moyen de lectures obtenues par séquençage était de 56,8 millions et le nombre moyen de lecture par échantillon de 2,9 millions. La longueur moyenne d'une lecture était de 107 pb. Le score de qualité PHRED était supérieur à 20 (probabilité d'erreur d'identification d'une base pour 100) pour en moyenne 280 millions de bases. La profondeur moyenne observée sur l'ensemble des lectures était de 2522X. La profondeur de lecture par échantillon est détaillée dans l'annexe 3. Le nombre moyen d'alignements par amplicon était de 5328.



91%
ISP Loading
ISP Density

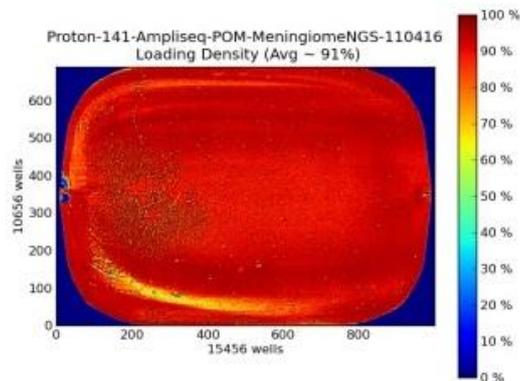


Figure 17 : Chargement de la puce dans le rapport du 1er séquençage.

IV.2.2. Variants mis en évidence : données quantitatives

Les échantillons 36, 37 et 42 n'ont pas pu être analysés à cause d'une qualité et d'une quantité d'ADN médiocres malgré plusieurs extractions d'ADN.

L'analyse par séquençage a permis d'identifier plus de 8000 variants dont 1285 étaient retrouvés dans au moins deux échantillons tumoraux différents.

Pour l'analyse des tumeurs seules, 380 variants en moyenne ont été observés contre 16 variants en moyenne pour les tumeurs avec tissu sain correspondant (tableau 6).

Parmi ces nombreux variants, nous avons étudié ceux référencés dans la base de données COSMIC observés dans au moins 4 échantillons, les SNV identifiés dans 4 échantillons ou plus et les INDELS présents dans au moins 10 échantillons (un tiers des tumeurs primitives analysées). Ces critères ont été établis pour diminuer le risque de faux positifs.

Dans certains cas, le logiciel IGV (Integrative Genomics Viewer) nous a permis de visualiser les variants à partir du fichier BAM pour déterminer leur position au sein de l'amplicon et obtenir une image des différentes lectures du variant (figure 18).

Au total, 152 variants ont été retenus (annexe 4) dont 60 délétions, 41 insertions et 51 SNV. Parmi ces variants, 15 étaient référencés dans COSMIC et 2 dans ClinVar.



Tumeur seule				Tumeur + tissu sain	
Cas	Nombre variants	Cas	Nombre variants	Cas	Nombre variants
1	131	30	216	3	9
2	169	31	187	6	36
5	133	32	160	14	1
8	168	33	185	17	9
9	168	34	205	23	3
10	1311	35	147	45	53
11	189	40	188	48	2
12	736	41	239		
13	305	43	135		
16	179	44	1019		
19	133	47	134		
20	26	50	1456		
25	225	51	1778		
26	141	52	403		
27	196	53	202		
28	202	56	1216		
29	247				

Tableau 6 : Nombre de variants identifiés par échantillon tumoral.

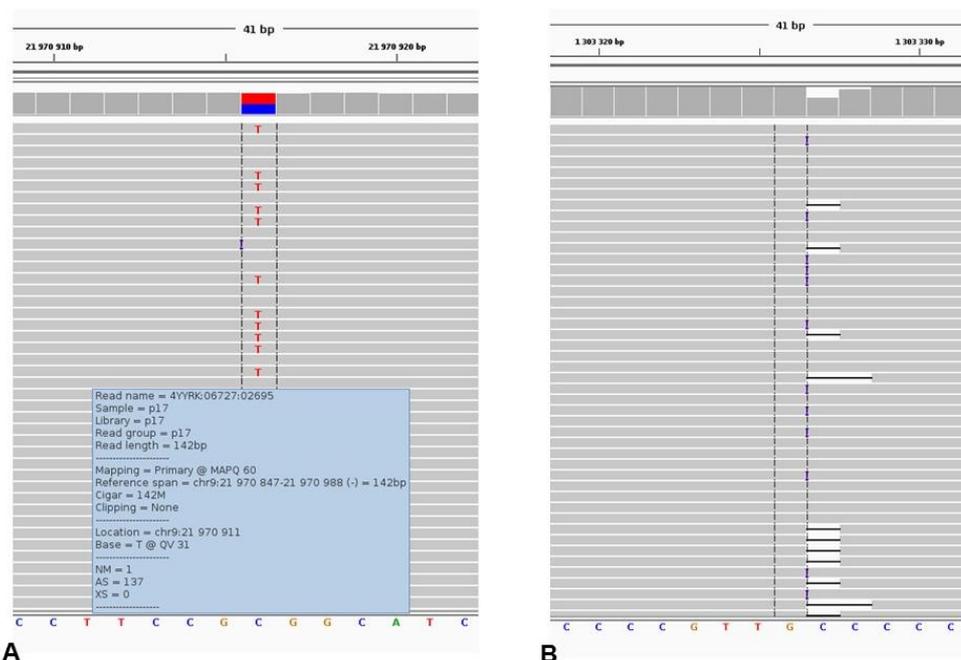


Figure 18 : Visualisation sous IGV de l'altération de *CDKN2A* (A) et de *YWHAE* (B).



IV.2.3. Analyse des facteurs influençant le caractère récidivant des tumeurs

IV.2.3.1 Analyse en fonction des données cliniques et histopathologiques

Cette analyse présentée dans le tableau 7 a été réalisée en fonction du caractère récidivant ou non récidivant de la tumeur.

En ce qui concerne les données cliniques, les résultats obtenus mettent en évidence un nombre significativement plus important de tumeurs récidivantes chez les hommes ($p=0,04$). La localisation tumorale n'est pas associée au caractère récidivant.

Au niveau histologique, l'analyse du grade tumoral est proche de la significativité avec un nombre plus important de tumeurs de grade III dans le groupe des tumeurs récidivantes et un nombre plus importants de tumeurs de grade I dans le groupe des tumeurs non récidivantes.

L'analyse de l'index mitotique a été effectuée en utilisant les seuils définissant le grade tumoral selon les recommandations OMS. Elle met en évidence une différence significative entre tumeurs récidivantes et tumeurs non récidivantes ($p=0,04$). L'indice de prolifération Ki67 est également lié au caractère récidivant avec un indice plus élevé dans les tumeurs récidivantes ($p=0,004$).

		Tumeur récidivante	Tumeur non récidivante	<i>p</i>
N		17	13	
Sexe	F	7	12	0,04
	H	10	1	
Age	Inférieur ou égal à 58 ans	10	4	0,2
	Supérieur à 58 ans	7	9	
Localisation	Base	1	1	0,7
	Convexité	13	9	
	Falcotentorial	2	3	
	Intraventriculaire	1	0	
Grade	I	4	7	0,05
	II	5	5	
	III	8	1	
Index mitotique	Inférieur à 4	5	9	0,04
	4-19	4	3	
	Supérieur ou égal à 20	8	1	
Indice Ki67	Inférieur ou égal à 5%	2	8	0,004
	Supérieur à 5%	15	5	

Tableau 7 : Analyse des données cliniques et histopathologiques en fonction du caractère récidivant ou non récidivant de la tumeur. N : nombre d'échantillons concernés.



IV.2.3.2 Analyse des altérations moléculaires

Analyse des altérations moléculaires en fonction du caractère récidivant ou non récidivant de la tumeur

L'étude des 152 variants retenus a permis de mettre en évidence une association significative entre le caractère récidivant de la tumeur et 9 altérations moléculaires. Pour 3 autres altérations leur présence tendait à être corrélée avec la récurrence.

Les variants dont la présence était associée de manière significative aux tumeurs récidivantes concernaient les gènes *CDKN2A* ($p=0,03$), *FBXO5* ($p=0,003$), *MKI67* ($p=0,006$), *RB1* ($p=0,03$ pour la délétion), *SFN* ($p=0,02$), *STRN* ($p=0,01$ pour la délétion et $p=0,03$ pour l'insertion) et *YWHAE* ($p=0,03$).

Le variant identifié sur le gène *CCNH* était plus fréquemment présent dans les tumeurs non récidivantes ($p=0,04$).

En ce qui concerne les altérations des gènes *CCNB1*, *CDC25C* et *RB1* (pour le SNV), elles semblaient être plus souvent identifiées dans les tumeurs récidivantes mais l'analyse statistique n'a pas mis en évidence de lien significatif.

Au total, 12 variants d'intérêt ont été identifiés à l'issue de cette analyse, 6 délétions, 4 insertions et 2 SNV. Ces éléments sont détaillés dans le tableau 8.



	Position selon le génome de référence Hg 19 et conséquence du variant	Présence du variant	Tumeur récidivante	Tumeur non récidivante	p
CCNB1	68464057	Oui	4	0	0,05
Délétion	NM_031966, exon3, c.251delA, p.Glu84fs	Non	12	13	
CCNH	86695334	Oui	2	6	0,04
Délétion	Intron	Non	14	7	
CDC25C	137661464	Oui	8	2	0,05
Insertion	Intron	Non	8	11	
CDKN2A	21970916	Oui	5	0	0,03
SNV	NM_000077, exon2, c.G442A, p.Ala148Thr	Non	11	13	
FBXO5	153296500	Oui	8	0	0,003
Délétion	NM_012177, exon2, c.359delA, p.Asn120fs	Non	8	13	
MKI67	129913670	Oui	7	0	0,006
Insertion	NM_002417, exon7, c.1001dupG, p.Gly334fs	Non	9	13	
RB1	48916885	Oui	5	0	0,03
Délétion	Intron	Non	11	13	
RB1	48955411	Oui	4	0	0,05
SNV	NM_000321, exon17, c.A1527G, p.Gly509Gly	Non	12	13	
SFN	27190293	Oui	9	2	0,02
Insertion	NM_006142, exon1, c.591dupT, p.Thr197fs	Non	7	11	
STRN	37121182	Oui	8	1	0,01
Délétion	Intron	Non	8	12	
STRN	37076556	Oui	7	1	0,03
Insertion	UTR3'	Non	9	12	
YWHAE	1303326	Oui	10	3	0,03
Délétion	Intron	Non	6	10	

Tableau 8 : Analyse des variants en fonction du caractère récidivant de la tumeur.

Analyse comparative des variants liés à la récurrence entre tumeurs primitives et récidives

Pour chacun des 12 variants d'intérêt, nous avons reporté dans le tableau 9 le numéro de cas dans lequel le variant était présent pour les tumeurs primitives récidivantes et les récurrences correspondantes. Certains variants présents dans la tumeur primitive ne sont pas toujours retrouvés dans la récurrence correspondante.



CCNB1 Délétion		CCNH Délétion		CDC25C Insertion		CDKN2A SNV	
TP	R	TP	R	TP	R	TP	R
27	absent	12	absent	27	28	10	11
29	30	27	absent	29	30	12	13
35	NC			33	absent	27	absent
47	absent					29	30
						52	absent
FBXO5 Délétion		MKI67 Insertion		RB1 Délétion		RB1 SNV	
TP	R	TP	R	TP	R	TP	R
12	absent	12	absent	12	13	29	30
27	28	33	absent	33	absent	33	absent
29	30	35	NC	35	NC	44	absent
33	absent	40	absent	44	absent	50	absent
35	NC	44	absent	52	absent		
		47	absent				
		52	absent				
SFN Insertion		STRN Délétion		STRN Insertion		YWHAE Délétion	
TP	R	TP	R	TP	R	TP	R
12	13	12	absent	12	13	10	11
27	28	27	28	27	absent	27	28
29	30	31	absent	29	absent	29	absent
33	absent	33	34	33	absent	33	absent
				35	NC		
				40	absent		

Tableau 9 : Présence ou absence des variants d'intérêt dans les tumeurs primitives récidivantes (TP) et la récurrence (R) correspondante. Le numéro de l'échantillon concerné est indiqué dans chaque cellule. NC : non connu.

Analyse des variants liés à la récurrence en fonction du sexe, du grade tumoral, de l'index mitotique et de l'indice Ki67

La présence de certains de ces variants était significativement plus fréquente chez les hommes (*CDC25* $p=0,004$, *SFN* $p=0,03$) à l'exception du variant du gène *CCNH* plus fréquent chez les femmes ($p=0,046$).

Une association significative a été observée entre le grade tumoral et les variants de *SFN* et *YWHAE* ($p=0,04$). Ces mêmes variants étaient également corrélés à l'index mitotique ($p=0,04$).

Un index mitotique supérieur à 5 était plus fréquemment observé lorsque les variants des gènes *FBXO5* ($p=0,047$), *STRN* pour l'insertion ($p=0,047$) et *YWHAE* ($p=0,02$) étaient présents.

Ces résultats sont détaillés dans le tableau 10.

		Sexe			Grade			Index mitotique			Indice Ki67				
		F	H	<i>p</i>	I	II	III	<i>p</i>	<4	4-19	≥20	<i>p</i>	≤5	>5	<i>p</i>
CCNB1	Oui	2	2	0,88	0	3	1	0,55	1	2	1	0,31	0	4	0,31
Délétion	Non	17	8		11	7	7		13	5	7		10	15	
CCNH	Oui	8	0	0,046	5	3	0	0,08	6	2	0	0,1	3	5	>0,99
Délétion	Non	11	10		6	7	8		8	5	8		7	14	
CDC25C	Oui	3	7	0,004	1	5	4	0,08	2	4	4	0,08	2	8	0,43
Insertion	Non	16	3		10	5	4		12	3	4		8	11	
CDKN2A	Oui	3	2	>0,99	2	2	1	0,91	3	1	1	0,84	0	5	0,20
SNV	Non	16	8		9	8	7		11	6	7		10	14	
FBXO5	Oui	3	5	0,12	1	4	3	0,22	2	3	3	0,29	0	8	0,047
Délétion	Non	16	5		10	6	5		12	4	5		10	11	
MKI67	Oui	2	5	0,05	1	2	4	0,11	1	2	4	0,07	0	7	0,08
Insertion	Non	17	5		10	8	4		13	5	4		10	12	
RB1	Oui	1	4	0,06	1	2	2	0,64	1	2	2	0,37	0	5	0,2
Délétion	Non	18	6		10	8	6		13	5	6		10	14	
RB1	Oui	1	3	0,20	0	2	2	0,23	1	1	2	0,50	0	4	0,31
SNV	Non	18	7		11	8	6		13	6	6		10	15	
SFN	Oui	4	7	0,03	1	5	5	0,04	2	4	5	0,04	1	10	0,06
Insertion	Non	15	3		10	5	3		12	3	3		9	9	
STRN	Oui	5	4	0,73	2	4	3	0,50	2	4	3	0,12	1	8	0,17
Délétion	Non	14	6		9	6	5		12	3	5		9	11	
STRN	Oui	3	5	0,12	1	4	3	0,22	2	3	3	0,29	0	8	0,047
Insertion	Non	16	5		10	6	5		12	4	5		10	11	
YWHAE	Oui	7	6	0,42	2	5	6	0,04	3	4	6	0,04	1	12	0,02
Délétion	Non	12	4		9	5	2		11	3	2		9	7	

Tableau 10 : Analyse des variants liés à la récidence en fonction du sexe, du grade tumoral, de l'index mitotique et de l'indice Ki67.

IV.2.3.3 Analyse de survie sans récidence

Analyse de survie sans récidence en fonction des données cliniques et histopathologiques

Dans notre étude, la survie sans récidence est supérieure chez les femmes par rapport aux hommes (153,5 mois vs. 19 mois). Les hommes ont plus fréquemment des tumeurs de grade II qui récidivent davantage ($p < 0,0001$).



De même la survie sans récurrence est corrélée au grade tumoral (288,7 mois pour les tumeurs de grade I vs. 140,8 mois pour celles de grade II et 21 mois pour les tumeurs de III, $p=0,002$). Ces éléments sont illustrés avec la figure 19.

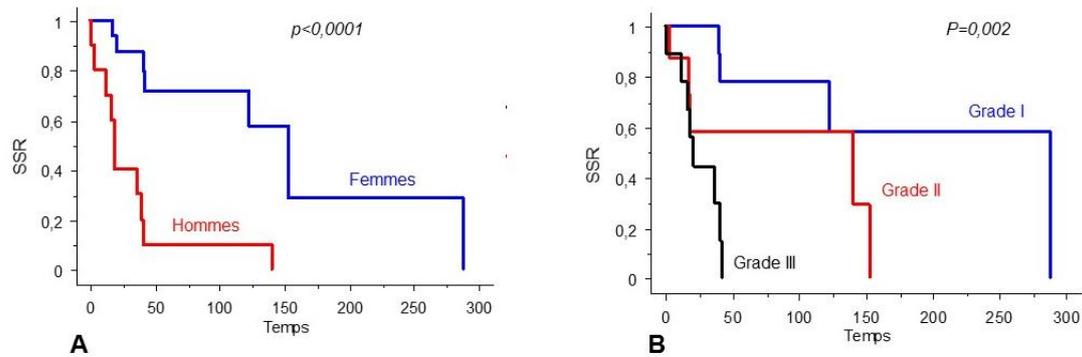


Figure 19 : Survie sans récurrence en fonction du sexe (A) et du grade tumoral (B). Temps en mois.

Concernant les marqueurs histologiques et immunohistochimiques, un index mitotique bas (inférieur à 4 mitoses) était associé à une survie sans récurrence plus longue (288,7 mois) qu'un index mitotique compris entre 4 et 19 (140,8 mois, $p=0,03$). Un index mitotique supérieur ou égal à 20 mitoses était un facteur de mauvais pronostic dans notre étude avec une survie sans récurrence de 21 mois. Un indice de prolifération Ki67 supérieur à 5% est associé à une survie sans récurrence plus courte (médiane de survie de 37 mois, non atteinte pour un indice inférieur ou égal à 5%, $p=0,047$). Ces résultats sont illustrés dans la figure 20.

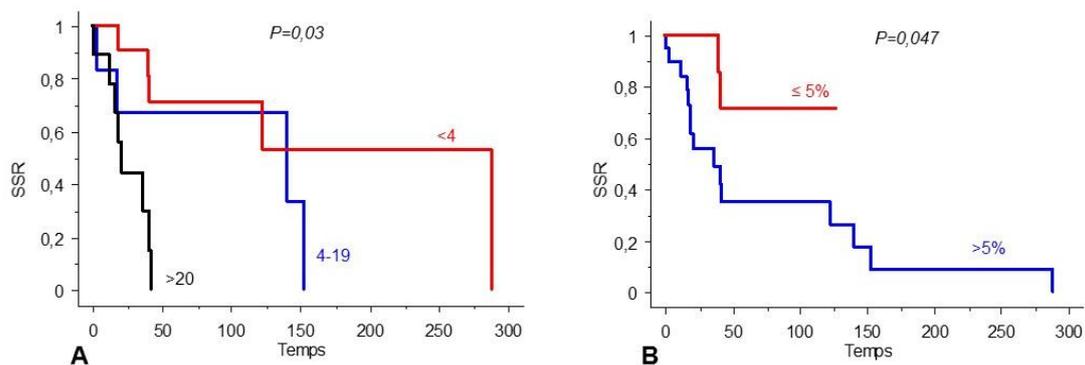


Figure 20 : Survie sans récurrence en fonction de l'index mitotique (A) et de l'indice de prolifération Ki67 (B). Temps en mois.



Analyse de survie sans récurrence en fonction des altérations moléculaires

Cette analyse a été effectuée avec les 12 variants d'intérêt associés ou probablement associés avec le caractère récidivant des tumeurs dans notre étude. L'analyse a mis en évidence une survie sans récurrence significativement plus courte (19 mois vs 123,1 mois) pour les patients dont la tumeur présentait le variant du gène *RB1* (SNV). Pour le variant du gène *MKI67*, on observait une tendance similaire avec une survie sans récurrence de 41,3 mois en présence du variant et de 153,5 mois en son absence ($p=0,05$). A l'inverse, la présence du variant du gène *CCNH* était associée avec une meilleure survie sans récurrence (153,5 mois contre 40,6 mois, $p=0,03$).

L'analyse pour le variant du gène *CDKN2A* ne donnait pas de résultat significatif. Les figures 21 et 22 rendent compte de ces résultats.

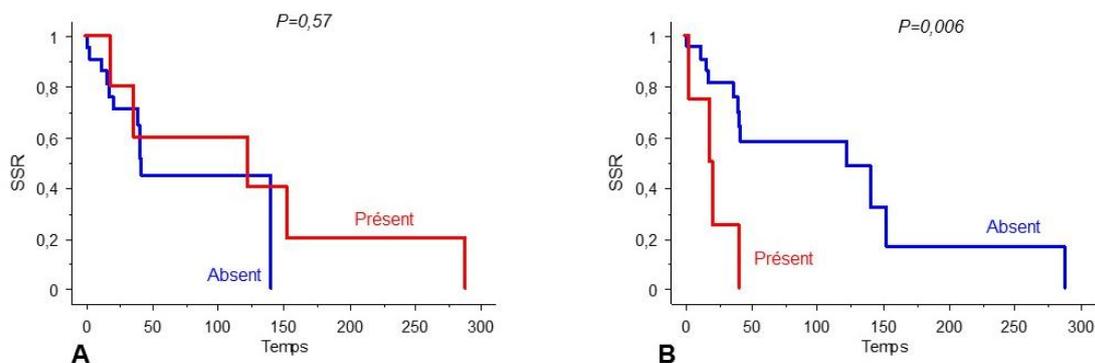


Figure 21 : Survie sans récurrence en fonction de la présence du variant de *CDKN2A* (A) et du variant de *RB1* (SNV) (B). Temps en mois.

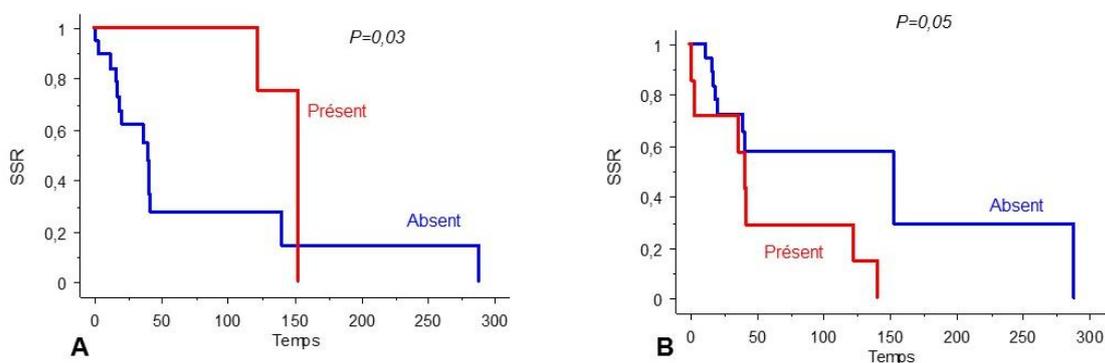


Figure 22 : Survie sans récurrence en fonction de la présence du variant de *CCNH* (A) et du variant de *MKI67* (B). Temps en mois.



IV.2.3.4 Analyse de survie globale

Analyse de survie globale en fonction des données cliniques et histopathologiques

Dans notre série, la survie globale était corrélée à l'âge au diagnostic de la tumeur primitive. La survie médiane était de 199,6 mois pour les patients ayant 58 ans ou moins au moment du diagnostic et de 74,1 mois pour ceux ayant plus de 58 ans lors du diagnostic ($p=0,009$). Nous n'avons pas observé de lien significatif avec le sexe.

La présence d'une infiltration du parenchyme cérébral était associée à une survie plus courte (74,1 mois en présence d'infiltration vs. une médiane non atteinte en absence d'infiltration, $p=0,009$). Un index mitotique élevé était un facteur de mauvais pronostic dans notre étude avec une survie de 74,1 mois pour 20 mitoses ou plus, de 199,6 mois entre 4 et 19 mitoses et non atteinte pour moins de 4 mitoses. L'indice de prolifération Ki67 n'était pas corrélé à la survie globale dans notre série.

Analyse de survie globale en fonction des altérations moléculaires

Parmi les variants associés au caractère récidivant des méningiomes, aucun n'avait d'impact significatif sur la survie globale.



V. Discussion

Les données de la littérature [4] indiquent que les méningiomes sont des tumeurs dont le pronostic est lié au grade tumoral défini par la classification de l'OMS et au risque de récurrence. L'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67 qui reflètent le nombre de cellules en cycle sont également corrélés au grade ainsi qu'à la récurrence. Dans cette étude nous avons recherché par séquençage massivement parallèle des altérations moléculaires des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire dans des méningiomes de grade I, II ou III, récurrents ou non récurrents, dans l'objectif général de mettre en évidence des marqueurs moléculaires qui pourraient prédire la récurrence de ces tumeurs.

L'analyse des données cliniques et histopathologiques de notre série est en accord avec les notions classiques établies dans les méningiomes avec un âge moyen au diagnostic de 58 ans, une prédominance féminine des méningiomes et un plus grand nombre de tumeurs de grade II et III chez les hommes [4].

En ce qui concerne le caractère récurrent des tumeurs primitives, nous avons observé un plus grand nombre de tumeurs récurrentes chez les hommes ainsi qu'une association avec l'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67 en accord avec les résultats d'autres études [4][8][19].

Dans notre étude la récurrence a été définie sur les examens d'imagerie comme l'apparition d'une masse tumorale après exérèse macroscopiquement totale ou l'augmentation notable de la taille d'un résidu tumoral après une période de stabilité. Bien que cette définition soit utilisée dans d'autres études [19][49], le risque de récurrence dépend en partie de la qualité de l'exérèse représentant de ce fait un biais potentiel en ce qui concerne les facteurs de récurrence.

Les méningiomes sont des tumeurs qui récurrent parfois tardivement nécessitant un suivi assez long. La durée moyenne du suivi dans notre série était supérieure à 6 ans. L'analyse de survie sans récurrence a mis en évidence une survenue de récurrence plus précoce chez les hommes et pour les tumeurs de grade plus élevé. Un index mitotique élevé et un indice Ki67 supérieur à 5% étaient significativement associés avec une survie sans récurrence plus courte témoignant de l'implication de la prolifération cellulaire dans le risque de récurrence.

L'étude statistique des variants a mis en évidence 8 variants dont la présence était corrélée avec le caractère récidivant de la tumeur, un variant dont la présence était associée aux tumeurs non récidivantes et 3 variants potentiellement associés avec la survenue d'une récidive. Ces variants étaient répartis sur 10 gènes différents.

Le gène *CCNB1*, localisé en 5q13.2, code pour la cycline B intervenant pendant les phases G2 et M du cycle cellulaire. Nous avons identifié sur ce gène un variant pouvant être impliqué dans la récidive. Il s'agissait d'une délétion sur l'exon 3 (NM_031966, exon3, c.251delA, p.Glu84fs) entraînant un décalage du cadre de lecture. Ce variant n'était pas observé dans les tumeurs non récidivantes. Il n'était pas référencé dans les bases de données interrogées.

Pour le gène *CDC25C* localisé en 5q31.2, nous avons identifié un variant tendant à être plus fréquemment présent dans les méningiomes récidivants. L'altération observée était une insertion intronique. Ce variant était présent dans 8 tumeurs récidivantes. Le gène *CDC25C* code pour une phosphatase impliquée dans l'activation de CDK1.

Le gène *SFN* localisé en 1p36.11 code pour une protéine de la famille 14-3-3 qui intervient dans la régulation de l'activité de la phosphatase *CDC25C*. L'altération identifiée était présente dans 9 tumeurs récidivantes. Il s'agissait d'une insertion au niveau de l'exon 1 (NM_006142, exon1, c.591dupT, p.Thr197fs) entraînant un décalage du cadre de lecture. Cette altération n'était pas référencée dans la base de données COSMIC.

Deux variants ont été observés sur le gène *STRN* localisé en 2p22.2. L'un (position 37121182) correspondait à une délétion intronique présente dans 8 tumeurs récidivantes et l'autre (position 37076556) correspondait à une insertion dans l'UTR (untranslated region) en 3' observée dans 7 tumeurs récidivantes et dans seulement une des tumeurs non récidivantes. Ce gène code pour une protéine interagissant avec les protéines du groupe PP2A. Ce groupe de protéines constitue une sérine thréonine phosphatase activant CDK1. Les altérations de *STRN* identifiées n'étaient pas référencées dans les bases de données consultées.

L'altération concernant le gène *YWHAE* était présente dans 10 des 16 tumeurs récidivantes. Ce gène localisé en 17p13.3 code également pour une protéine de la famille 14-3-3. Le variant identifié correspond à une délétion au niveau de l'intron. En dehors d'une translocation observée dans des sarcomes du stroma endométrial, peu d'altérations de ce gène ont été décrites dans les cancers [50].



Parmi ces 5 gènes dont 3 présentent des altérations significativement liées aux tumeurs récidivantes, 4 sont impliqués dans l'activation de la kinase CDK1. La cycline B quant à elle fait partie du complexe CDK1/Cycline B jouant un rôle majeur à la phase tardive du cycle cellulaire pour la transition G2/M.

Le variant observé sur le gène CCNH localisé en 5q14.3 était une délétion dans l'intron non référencée dans les bases de données COSMIC ou ClinVar. Ce gène code pour la cycline H qui fait partie du complexe CAK (CDK-activating kinase) activant les kinases cycline-dépendantes. La présence de ce variant dans notre étude était associée aux tumeurs non récidivantes.

Un variant du gène FBXO5 localisé en 6q25.2 correspondait à une délétion dans l'exon 2 (NM_012177, exon2, c.359delA, p.Asn120fs) impliquant un décalage du cadre de lecture. Ce variant était observé dans 8 méningiomes récidivants et absent des tumeurs non récidivantes. Il n'était pas référencé dans les bases de données interrogées. Le gène FBXO5 intervient dans la régulation de la mitose via une inhibition du complexe APC (anaphase promoting complex).

Pour le gène MIK167 localisé en 10q26.2, nous avons observé une insertion dans l'exon 7 (NM_002417, exon7, c.1001dupG, p.Gly334fs) entraînant un décalage du cadre de lecture. Ce variant était présent dans 7 tumeurs récidivantes et absent des méningiomes non récidivants. Bien que nécessaire au maintien de la prolifération cellulaire, le rôle précis de ce gène dans le cycle cellulaire est peu connu. Le variant identifié n'était pas référencé dans les bases de données consultées.

Parmi les différents SNV analysés, la présence d'un variant du gène CDKN2A localisé en 9p21.3 était associée aux méningiomes récidivants. Ce variant était présent dans 5 des tumeurs récidivantes et absent de toutes les tumeurs non récidivantes. *CDKN2A* est un gène suppresseur de tumeur qui joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire via la protéine P16INK4A qui inhibe les complexes cycline/CDK à la phase G1/S. Ce gène a aussi un rôle dans la régulation de l'apoptose avec la protéine P14ARF qui inhibe la dégradation de P53 via un blocage de MDM2. Des délétions homozygotes, des mutations somatiques de ce gène et une inactivation par hyperméthylation du promoteur ont été observées dans des méningiomes anaplasiques [30]. Par ailleurs, une autre étude montre une perte de la région chromosomique 9p21 dans 70% des méningiomes anaplasiques et pouvant correspondre à un facteur de mauvais pronostic [22]. Le variant identifié dans notre étude était une mutation faux sens dans l'exon 2 (NM_000077, exon2, c.G442A, p.Ala148Thr) correspondant à la séquence codant pour P16INK4A. Ce variant était référencé dans COSMIC (COSM3774361,



COSM3736958, COSM3774362) et Clinvar comme étant non pathogène (RCV000034482.3, RCV000078114.6, RCV000119155.3, RCV00015). Cette mutation a été identifiée dans des carcinomes à cellules claires du rein, dans des adénocarcinomes du pancréas [51] et chez des patients atteints de mélanome [52]. D'autres mutations de ce gène ont été observées dans des méningiomes [31].

Deux variants du gène *RB1* ont été identifiés. Le premier (position 48916885) était une délétion intronique absente des tumeurs non récidivantes et significativement associée avec les méningiomes récidivants. Le deuxième (position 48955411) tendait à être lié aux tumeurs récidivantes. Il était présent dans 4 tumeurs récidivantes et absent dans toutes les tumeurs non récidivantes. Il s'agissait d'un SNV situé dans l'exon 17 qui correspond à une mutation silencieuse (NM_000321, exon17, c.A1527G, p.Gly509Gly). Le gène *RB1* localisé en 13q14.2 est impliqué dans la régulation de E2F. Ces altérations n'étaient pas référencées dans la base de données des mutations somatiques COSMIC. Le SNV décrit n'entraîne pas de changement d'acide aminé mais a néanmoins été conservé dans nos analyses pour l'importance que peut avoir un changement de base sur l'ADN quant au métabolisme de ce gène (régulation par changement de conformation locale du brin d'ADN, site d'épissage alternatif). L'implication de ce SNV est à confirmer par une analyse complémentaire *in silico*, qui est en cours.

Les variants identifiés dans les tumeurs primitives ne sont pas toujours retrouvés dans les récidives. Bien que les méningiomes soient considérées comme des tumeurs monoclonales [4][23], la diversité des altérations génomiques observées témoigne d'une évolution de la tumeur au cours du temps.

Les variants analysés ont été identifiés dans des méningiomes sporadiques. Bien que notre étude ait mis en évidence des variants associés avec les tumeurs récidivantes, d'autres mécanismes sont probablement impliqués dans la récurrence. Notre étude a porté sur l'analyse des gènes du cycle cellulaire sans tenir compte des gènes intervenant dans la ségrégation des chromosomes en fin de mitose. D'autre part nous nous sommes intéressés à la séquence ADN de ces gènes mais d'autres mécanismes peuvent intervenir dans la régulation de leur expression. Certaines études rapportent une diminution d'expression de *RB1* dans les méningiomes [53] et une hyperméthylation du promoteur de *TP53* dans plus de 50% des tumeurs faisant de cette anomalie un événement important dans la progression des méningiomes [54]. Dans leur étude, Olar et al ont mis en évidence deux sous-groupes moléculaires de méthylation différents associés avec la survie sans récurrence dans les méningiomes ainsi qu'un nombre plus important de CNV dans le groupe de plus mauvais

pronostic [49]. Une étude publiée en 2017 a observé un nombre important d'altérations des régulateurs de la chromatine dans 7 cas de méningiomes [55]. Une implication des microARN dans l'oncogenèse des méningiomes semble possible [54]. Ces mécanismes de régulation de l'expression de gènes peuvent également être à l'origine d'altérations dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, des altérations d'autres voies de signalisation semblent elles aussi associées avec des tumeurs plus agressives comme les voies Hedgehog, Notch, Wnt (wingless) et PIK3/Akt [5].

L'identification de gènes plus spécifiquement impliqués dans la dérégulation du cycle cellulaire est un élément important pouvant orienter la recherche de cibles thérapeutiques. Plusieurs types de thérapies peuvent être utilisés pour cibler les acteurs du cycle cellulaire. On peut notamment citer la découverte de micro-ARN jouant un rôle de suppresseur de tumeur en ciblant des régulateurs du cycle cellulaire dans le carcinome hépato-cellulaire [56]. Des inhibiteurs spécifiques des kinases cycline-dépendantes ont également été développés. Le Terameprocol (EM-1421, référence de l'essai : NCT00664677) et le P-276-00 qui ciblent la kinase CDK1 sont en cours d'étude dans des essais de phase I [57].

La technique de NGS utilisée a engendré des résultats de qualité satisfaisante pour la majorité des échantillons avec une profondeur moyenne de lecture de 2522X permettant de détecter des variants somatiques survenant à une faible fréquence allélique. Trois cas n'ont pu être analysés en raison d'une qualité ou d'une quantité insuffisante d'ADNg obtenue après extraction. Pour 5 cas (10,44,50,51,56) nous avons observé plus de 1000 variants par cas contre 380 en moyenne dans les autres échantillons. Parmi ces cas, 4 correspondaient à des tumeurs opérées avant 1994. Il est possible qu'une partie de ces nombreux variants soient des mutations artéfactuelles liées à une dégradation de l'ADN du fait d'une durée de conservation élevée des blocs de paraffine [58][59]. Plusieurs études ont rapporté une augmentation du nombre de transitions (Ts) ou substitutions d'un nucléotide par le même type de nucléotide (pyrimidine à pyrimidine C<>T, purine à purine A<>G) par rapport au nombre de transversions (Tv) ou substitutions par un type différent de nucléotide (pyrimidine vers purine ou inversement A<>T, C<>G) lors du séquençage d'échantillons conservés en bloc de paraffine [58][59]. La répartition entre transitions et transversions parmi les différents variants identifiés dans notre étude est homogène (annexe 4) écartant l'hypothèse de mutations artéfactuelles liées à ces modifications.

L'analyse bio-informatique a permis d'identifier 380 variants en moyenne dans les échantillons de tumeur seule contre 16 variants en moyenne pour les tumeurs avec tissu

sain correspondant. Cela soulève la question de l'utilisation d'un filtre trop stringent en présence de tissu sain associé à la tumeur. Par ailleurs, un seul pipeline d'analyse bio-informatique a été appliqué. Il pourrait être intéressant de reproduire cette analyse avec un deuxième pipeline pour conforter la validité des variants identifiés.

Les études ayant analysé le génome ou l'exome de plusieurs méningiomes n'ont pas identifié les mutations décrites dans notre série. Cela peut s'expliquer par plusieurs facteurs. Ces études ont pour la plupart analysé des échantillons issus de matériel congelé avec la technique de séquençage Illumina®. Du sang était utilisé comme tissu sain de contrôle pour la majorité des cas. Les profondeurs de lecture obtenues dans ces études se situaient entre 50 et 250X, largement inférieures à la profondeur moyenne obtenue dans notre série, pouvant expliquer l'identification de variants survenant à de plus faibles fréquences alléliques [23][28][55][60].



Conclusion

Dans cette étude portant sur 30 méningiomes primitifs, nous avons mis en évidence par une technique de séquençage massivement parallèle et sur du matériel inclus en paraffine, des altérations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, liées à une récurrence tumorale.

Dans notre série, les critères histologiques classiques notamment l'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67 étaient corrélés avec une récurrence.

Sur le plan fondamental, il est intéressant de constater que 5 des gènes concernés par ces variants jouent un rôle à la phase tardive de la mitose (transition G2/M). La dérégulation du cycle cellulaire à l'origine d'une prolifération cellulaire accrue dans les méningiomes pourrait donc se situer à ce niveau. Cette étude a également permis d'observer un variant du gène *CDKN2A*, gène dont le rôle a déjà été incriminé dans le développement et l'agressivité des méningiomes.

L'analyse de survie sans récurrence a confirmé l'implication de facteurs déjà identifiés tels que le sexe, le grade tumoral, l'index mitotique et l'indice de prolifération Ki67. Deux des variants identifiés dans notre étude, concernant les gènes *CCNH* et *RB1* (SNV) avaient un impact opposé sur la survie sans récurrence.

En ce qui concerne la survie globale, nous avons observé une association avec l'âge au diagnostic, la présence d'une infiltration tumorale du parenchyme cérébral et l'index mitotique. Aucun des variants analysés n'était associé avec une modification de la survie globale.

Ces résultats originaux permettent d'envisager dès à présent de nombreuses perspectives de ce travail.

Il est dans un premier temps nécessaire de vérifier les altérations génomiques identifiées par séquençage massivement parallèle, par une technique de séquençage de référence comme la technique Sanger. A cette étape, une analyse comparative entre tissu inclus en paraffine et tissu congelé pourra se révéler utile. Si ces altérations sont avérées, une étude multivariée devra être réalisée pour confirmer l'association des altérations identifiées avec le caractère récidivant des méningiomes analysés. Une étude comparative approfondie des altérations entre les tumeurs primitives et les récurrences pourra permettre d'identifier des variants apparaissant dans les récurrences, signe d'une modification de la tumeur au cours de son évolution.

La « technique Sanger » étant simple et relativement peu onéreuse, une analyse sur un plus grand nombre de cas est envisageable.

D'autres tissus peuvent également être examinés afin de savoir si l'altération est spécifique des méningiomes.

Enfin la réalisation de TMA (tissue microarrays) permettra de tester l'expression des gènes impliqués dans la récurrence afin d'identifier une association entre un marqueur immunohistochimique et l'altération du gène correspondant, pouvant être utile en pratique diagnostique.



Références bibliographiques

- [1] S. Saraf, B. J. McCarthy, and J. L. Villano, "Update on meningiomas," *Oncologist*, vol. 16, no. 11, pp. 1604–1613, 2011.
- [2] M. Delisle and K. Mokhtari, *Neuropathologie tumorale*. Bulletin de la Division Française de l'AIP, 2011.
- [3] N. Zeghari-Squalli, D.-J. David, and S.-H. Lee-Robin, "Place de l'irradiation intracrânienne en conditions stéréotaxiques (radiochirurgie et radiothérapie stéréotaxique) dans le traitement de pathologies non cancéreuses," Haute Autorité de Santé, Tome 1 : Les méningiomes, Nov. 2011.
- [4] D. N. Louis, O. D. Wiestler, and W. K. Cavenee, *WHO classification of tumours of the central nervous system*, Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2016.
- [5] A. Yew *et al.*, "Chromosomal alterations, prognostic factors, and targeted molecular therapies for malignant meningiomas," *J Clin Neurosci*, vol. 20, no. 1, pp. 17–22, Jan. 2013.
- [6] P. C. Burger and B. W. Scheithauer, *Tumors of the central nervous system*. Washington, DC: American Registry of Pathology, Armed Forces of Pathology, 2007.
- [7] C. Mawrin, C. Chung, and M. Preusser, "Biology and clinical management challenges in meningioma," *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, pp. e106–115, 2015.
- [8] A. Guillaudeau *et al.*, "EGFR soluble isoforms and their transcripts are expressed in meningiomas," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, p. e37204, 2012.
- [9] D. Hasboun, "Neuromorphologie." 2007-2006.
- [10] M. Catala, "Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebrospinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses.," *Arch Anat Cytol Pathol*, vol. 46, no. 3, pp. 153–169, 1998.
- [11] S. Zouaoui *et al.*, "Descriptive epidemiology of 13,038 newly diagnosed and histologically confirmed meningiomas in France: 2006-2010," *Neurochirurgie*, Jun. 2015.
- [12] I. Baldi, A. Gruber, E. Berteaud, C. Dantas, and X. Schwall, "Registre des tumeurs primitives du Système Nerveux Central de la Gironde," Bordeaux, Lettre d'information n°8, Mai 2009.
- [13] Marie E. Beckner *et al.*, "Low-level amplification of oncogenes correlates inversely with age for patients with nontypical meningiomas," *World Neurosurg*, vol. 79, no. 2, pp. 313–319.e1–10, Feb. 2013.
- [14] M. Ben Ismail, C. Rousselot, and P. François, "Méningiomes intracrâniens," *EMC - Neurologie*, 2015.
- [15] J. Wiemels, M. Wrensch, and E. B. Claus, "Epidemiology and etiology of meningioma," *J. Neurooncol.*, vol. 99, no. 3, pp. 307–314, Sep. 2010.
- [16] M. Shibuya, "Pathology and molecular genetics of meningioma: recent advances," *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, vol. 55, no. 1, pp. 14–27, 2015.



- [17]V. Barresi, M. Caffo, and G. Tuccari, "Classification of human meningiomas: lights, shadows, and future perspectives," *J. Neurosci. Res.*, Jul. 2016.
- [18]C. Mawrin and A. Perry, "Pathological classification and molecular genetics of meningiomas," *J. Neurooncol.*, vol. 99, no. 3, pp. 379–391, Sep. 2010.
- [19]A. Olar *et al.*, "Mitotic Index is an Independent Predictor of Recurrence-Free Survival in Meningioma," *Brain Pathol.*, vol. 25, no. 3, pp. 266–275, May 2015.
- [20]T. L. Winther and S. H. Torp, "MCM7 expression is a promising predictor of recurrence in patients surgically resected for meningiomas," *J. Neurooncol.*, vol. 131, no. 3, pp. 575–583, Feb. 2017.
- [21]S. Linsler *et al.*, "Molecular biological determinations of meningioma progression and recurrence," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 4, p. e94987, 2014.
- [22]P. J. Cimino, "Malignant progression to anaplastic meningioma: Neuropathology, molecular pathology, and experimental models," *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 99, no. 2, pp. 354–359, Oct. 2015.
- [23]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.
- [24]Y. Lee *et al.*, "Genomic landscape of meningiomas," *Brain Pathol.*, vol. 20, no. 4, pp. 751–762, Jul. 2010.
- [25]D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, and W. K. Cavenee, *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Fourth Edition*. 2007.
- [26]S. Kumar *et al.*, "Evaluation of 1p and 14q status, MIB-1 labeling index and progesterone receptor immunoexpression in meningiomas: Adjuncts to histopathological grading and predictors of aggressive behavior," *Neurol India*, vol. 62, no. 4, pp. 376–382, Aug. 2014.
- [27]W. Och *et al.*, "The correlation of clinical and chromosomal alterations of benign meningiomas and their recurrences," *Neurol. Neurochir. Pol.*, Jul. 2016.
- [28]V. E. Clark *et al.*, "Genomic analysis of non-NF2 meningiomas reveals mutations in TRAF7, KLF4, AKT1, and SMO," *Science*, vol. 339, no. 6123, pp. 1077–1080, Mar. 2013.
- [29]G. Cheng, L. Zhang, W. Lv, C. Dong, Y. Wang, and J. Zhang, "Overexpression of cyclin D1 in meningioma is associated with malignancy grade and causes abnormalities in apoptosis, invasion and cell cycle progression," *Med. Oncol.*, vol. 32, no. 1, p. 439, Jan. 2015.
- [30]P. Domingues *et al.*, "Genetic/molecular alterations of meningiomas and the signaling pathways targeted," *Oncotarget*, vol. 6, no. 13, pp. 10671–10688, May 2015.
- [31]J. Boström *et al.*, "Alterations of the tumor suppressor genes CDKN2A (p16(INK4a)), p14(ARF), CDKN2B (p15(INK4b)), and CDKN2C (p18(INK4c)) in atypical and anaplastic meningiomas," *Am. J. Pathol.*, vol. 159, no. 2, pp. 661–669, Aug. 2001.
- [32]M. S. Kim *et al.*, "Results of immunohistochemical staining for cell cycle regulators predict the recurrence of atypical meningiomas," *J. Neurosurg.*, vol. 121, no. 5, pp. 1189–1200, Nov. 2014.

- [33] M. Kheirollahi, M. Mehr-Azin, N. Kamalian, and P. Mehdipour, "Expression of cyclin D2, P53, Rb and ATM cell cycle genes in brain tumors," *Med. Oncol.*, vol. 28, no. 1, pp. 7–14, Mar. 2011.
- [34] L. Meijer, "Le cycle de division cellulaire et sa régulation," *Bulletin du Cancer*, vol. 93, no. 4, pp. 41–53, Apr. 2006.
- [35] G. Noël, A. Renard, C. Valéry, K. Mokhtari, and J. J. Mazon, "[Role of radiotherapy in the treatment of cerebral meningiomas]," *Cancer Radiother*, vol. 5, no. 3, pp. 217–236, Jun. 2001.
- [36] M. Delannes, I. Latorzeff, M. E. Chand, A. Huchet, C. Dupin, and P. Colin, "[Radiotherapy of benign intracranial tumors]," *Cancer Radiother*, vol. 20 Suppl, pp. S88–95, Sep. 2016.
- [37] D. O. Morgan, *The cell cycle: principles of control*. London: NSP New Science Press, 2007.
- [38] "Human Cell Cycle PCR Array." [Online]. Available: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-020A.html. [Accessed: 11-May-2016].
- [39] P. Ewels, M. Magnusson, S. Lundin, and M. Käller, "MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report," *Bioinformatics*, vol. 32, no. 19, pp. 3047–3048, Oct. 2016.
- [40] "Burrows-Wheeler Alignment Tool." [Online]. Available: <http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [41] "Picard Tools - By Broad Institute." [Online]. Available: <http://broadinstitute.github.io/picard/>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [42] "GATK | GATK Home Page." [Online]. Available: <https://software.broadinstitute.org/gatk/>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [43] K. Cibulskis, A. McKenna, T. Fennell, E. Banks, M. DePristo, and G. Getz, "ContEst: estimating cross-contamination of human samples in next-generation sequencing data," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 18, pp. 2601–2602, Sep. 2011.
- [44] "ANNOVAR Documentation." [Online]. Available: <http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>. [Accessed: 09-Mar-2017].
- [45] "GENATLAS -Université Paris Descartes." [Online]. Available: <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr/>. [Accessed: 18-Mar-2017].
- [46] "Ensembl genome browser 87." [Online]. Available: <http://www.ensembl.org/index.html>. [Accessed: 18-Mar-2017].
- [47] "COSMIC: Catalogue of Somatic Mutations in Cancer - Home Page." [Online]. Available: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>. [Accessed: 18-Mar-2017].
- [48] "ClinVar." [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. [Accessed: 18-Mar-2017].

- [49]A. Olar *et al.*, “Global epigenetic profiling identifies methylation subgroups associated with recurrence-free survival in meningioma,” *Acta Neuropathol.*, vol. 133, no. 3, pp. 431–444, Mar. 2017.
- [50]A. Isphording *et al.*, “YWHAЕ-FAM22 endometrial stromal sarcoma: diagnosis by reverse transcription-polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor,” *Hum. Pathol.*, vol. 44, no. 5, pp. 837–843, May 2013.
- [51]M. Dal Molin *et al.*, “Very Long-term Survival Following Resection for Pancreatic Cancer Is Not Explained by Commonly Mutated Genes: Results of Whole-Exome Sequencing Analysis,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1944–1950, Apr. 2015.
- [52]R. M. Bakos *et al.*, “The CDKN2A p.A148T variant is associated with cutaneous melanoma in Southern Brazil,” *Exp. Dermatol.*, vol. 20, no. 11, pp. 890–893, Nov. 2011.
- [53]L. Shi *et al.*, “miR-335 promotes cell proliferation by directly targeting Rb1 in meningiomas,” *J. Neurooncol.*, vol. 110, no. 2, pp. 155–162, Nov. 2012.
- [54]M. Venza *et al.*, “Involvement of epimutations in meningioma,” *Brain Tumor Pathol*, vol. 32, no. 3, pp. 163–168, Jul. 2015.
- [55]M. Tang *et al.*, “Whole-genome sequencing identifies new genetic alterations in meningiomas,” *Oncotarget*, Feb. 2017.
- [56]M. Furuta *et al.*, “The tumor-suppressive miR-497-195 cluster targets multiple cell-cycle regulators in hepatocellular carcinoma,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, p. e60155, 2013.
- [57]J. Robert and E. Raymond, *Thérapie ciblée des cancers*. John Libbey Eurotext, 2012.
- [58]H. Do and A. Dobrovic, “Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase,” *Oncotarget*, vol. 3, no. 5, pp. 546–558, May 2012.
- [59]D. M. Carrick *et al.*, “Robustness of Next Generation Sequencing on Older Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7, p. e0127353, 2015.
- [60]X. Zhang *et al.*, “Exome sequencing on malignant meningiomas identified mutations in neurofibromatosis type 2 (NF2) and meningioma 1 (MN1) genes,” *Discov Med*, vol. 18, no. 101, pp. 301–311, Dec. 2014.

Annexes

Annexe 1. Détail des gènes étudiés.....	80
Annexe 2. Données cliniques des échantillons de tissu sain.....	84
Annexe 3. Profondeur moyenne de lecture par échantillon	85
Annexe 4. Variants retenus pour l'analyse statistique	86



Annexe 1. Détail des gènes étudiés

Nom	Symbole	Locus	N°Accession	Rôle	Couverture
Cycline A	<i>CCNA2</i>	4q27	NM_001237	Phases S et G2	98,1%
Cycline B	<i>CCNB1</i>	5q13.2	NM_031966	Phase G2 et M	98,7%
Cycline D1	<i>CCND1</i>	11q13.3	NM_053056	Phase G1 précoce	99,9%
Cycline D2	<i>CCND2</i>	12p13.32	NM_001759	Phase G1 précoce	94,6%
Cycline D3	<i>CCND3</i>	6p21.1	NM_001760	Phase G1 précoce	96,3%
Cycline E	<i>CCNE1</i>	19q12	NM_001238	Transition G1/S	97,1%
	<i>CCNE2</i>	8q22.1	NM_057749, NM_004702, NM_057749	Transition G1/S	87,4%
Cycline F	<i>CCNF</i>	16p13.3	NM_001761	Phase G2 / Liaison SCF (ubiquitination)	94,5%
Cycline G	<i>CCNG1</i>	5q32-q34	NM_004060	Modulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose	96,0%
Cycline H	<i>CCNH</i>	5q14.3	NM_001239	Fait partie du complexe CAK (CDK-activating kinase)	95,9%
Cell division cycle 25 homolog A	<i>CDC25A</i>	3p21.31	NM_001789	Phosphatase, activation CDK	99,7%
Cell division cycle 25 homolog B	<i>CDC25B</i>	20p13	NM_021873, NM_004358, NM_021872, NM_001287524, NM_001287516	Phosphatase, déphosphoryle CDC2	95,7%
Cell division cycle 25 homolog C	<i>CDC25C</i>	5q31	NM_0228009, NM_001790, NM_001287582	Phosphatase, activation CDC2	100,0%
Cycline dependant kinase 1 / CDC2	<i>CDK1</i>	10q21.2	NM_001786, NM_033379, NM_001170407, NM_001170406	Phases G2 et M	97,9%
Cycline dependant kinase 2	<i>CDK2</i>	12q13.2	NM_001798, NM_052827, NM_001290230	Phases G1 tardive et S	100,0%
Cycline dependant kinase 4	<i>CDK4</i>	12q14.1	NM_052984, NM_000075	Phase G1 précoce	98,3%
Cycline dependant kinase 6	<i>CDK6</i>	7q21.2	NM_001259, NM_001145306	Phase G1 précoce	100,0%
Cycline dependant kinase 7	<i>CDK7</i>	5q13.1	NM_001799	Fait partie du complexe CAK (CDK-activating kinase)	92,4%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A / P21	<i>CDKN1A</i>	6p21.2	NM_078467, NM_000389	Inhibiteur de CDK (phase G1/S), activé par P53	91,3%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B / P27	<i>CDKN1B</i>	12p13.1	NM_004064	Inhibiteur de CDK	96,8%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C / P57	<i>CDKN1C</i>	11p15.4	NM_000076	Inhibiteur de CDK	69,2%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A / P16INK4A	<i>CDKN2A</i>	9p21.3	NM_058195, NM_000077, NM_058197, NM_058196	Inhibiteur CDK4/CDK6	81,8%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B / P15INK4B	<i>CDKN2B</i>	9p21.3	NM_004936, NM_078487	Inhibiteur CDK4/CDK6	95,5%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C / P18INK4C	<i>CDKN2C</i>	1p32.3	NM_001262, NM_078626	Inhibiteur CDK4/CDK6	84,7%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D / P19INK4D	<i>CDKN2D</i>	19p13.2	NM_079421, NM_001800	Inhibiteur CDK4/CDK6	95,3%
Cyclin-dependent kinase inhibitor 3	<i>CDKN3</i>	14q22.2	NM_005192	Point de contrôle G1/S, inhibiteur CDK1/CDK2	100,0%

Nom	Symbole	Locus	N°Accession	Rôle	Couverture
Cerebellar degeneration-related protein 1	<i>CDR1</i>	Xq27.1-q27.2	NM_004065	Inhibiteur WEE1 par phosphorylation	96,5%
CHK1 checkpoint homolog	<i>CHEK1</i>	11q24.2	NM_001274, NM_001114121	Inhibiteur CDC25C par phosphorylation en réponse aux dommages de l'ADN	97,1%
E2F transcription factor 1	<i>E2F1</i>	20q11.22	NM_005225	Facteur de transcription activateur (se lie à pRB)	85,3%
E2F transcription factor 2	<i>E2F2</i>	1p36.11	NM_004091	Facteur de transcription activateur (se lie à pRB)	81,6%
E2F transcription factor 3	<i>E2F3</i>	6p22.3	NM_001949, NM_001243076	Facteur de transcription activateur (se lie à pRB)	88,9%
E2F transcription factor 4	<i>E2F4</i>	16q22.1	NM_001950	Facteur de transcription répresseur (se lie à pRB, p130 et p107)	89,4%
E2F transcription factor 5	<i>E2F5</i>	8q21.2	NM_001951	Facteur de transcription répresseur (se lie à p130)	82,7%
E2F transcription factor 6	<i>E2F6</i>	2p25.1	NM_198256	Facteur de transcription répresseur	92,7%
E2F transcription factor 7	<i>E2F7</i>	12q21.1	NM_203394	Facteur de transcription répresseur	93,5%
E2F transcription factor 8	<i>E2F8</i>	11p15.1	NM_001256371	Facteur de transcription répresseur	96,3%
F-box protein 5 / EMI1	<i>FBXO5</i>	6q25.2	NM_012177	Liaison SCF (ubiquitination) Régulateur mitotique (inhibition APC)	97,9%
Mdm2 p53 binding protein homolog	<i>MDM2</i>	12q15	NM_006881, NM_002392, NM_006882, NM_006880, NM_006878, NM_006879	Régulateur négatif P53 (ubiquitination)	99,4%
Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	<i>MKI67</i>	10q26.2	NM_002417, NM_001145966	Nécessaire au maintien de la prolifération cellulaire	96,2%
Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 10	<i>MLLT10</i>	10p12.31	NM_004641, NM_001195626	Susceptibilité aux méningiomes Remodelage chromatinien, modulation de la transcription	95,1%
Menage a trois 1	<i>MNAT1</i>	14q23	NM_002431, NM_001177963	Fait partie du complexe CAK (CDK-activating kinase)	100,0%
NIM1 Serine/Threonine Protein Kinase	<i>NIM1K</i>	5p12	NM_153361	Inhibiteur WEE1 par phosphorylation	95,7%
Protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1	<i>PKMYT1</i>	16p13.3	NM_004203, NM_001258450	Activation CDK1 par phosphorylation Tyr 14 et 15	88,6%
Polo-like kinase 1	<i>PLK1</i>	16p12.2	NM_005030	Kinase favorisant la transition G2/M Assemblage du fuseau mitotique	94,4%
Polo-like kinase 2	<i>PLK2</i>	5q11.2	NM_006622	Kinase favorisant la transition G2/M	96,0%
Polo-like kinase 3	<i>PLK3</i>	1p34.1	NM_004073	Kinase favorisant la transition G2/M	86,5%
Polo-like kinase 4	<i>PLK4</i>	4q28.2	NM_001190799	Kinase favorisant la transition G2/M Contrôle duplication centrosomes	97,2%
Polo-like kinase 5	<i>PLK5</i>	19p13.3	NM_001243079	Kinase favorisant la transition G2/M	97,8%



Nom	Symbole	Locus	N°Accession	Rôle	Couverture
PP2A			Multiples sous-unités	Serine threonine phosphatase Activation CDC2	
Protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyne	<i>PPP2CA</i>	5q31.1	NM_002715	Sous unité catalytique C	95,3%
Protein phosphatase 2, catalytic subunit, beta isozyne	<i>PPP2CB</i>	8p12	NM_004156, NM_001009552	Sous unité catalytique C	87,2%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, alpha isoform	<i>PPP2R1A</i>	19q13.41	NM_014225	Sous unité structurelle A	97,9%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform	<i>PPP2R1B</i>	11q23.1	NM_002716, NM_001177563, NM_001177562	Sous unité structurelle A	100,0%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	<i>PPP2R2A</i>	8p21.2	NM_002717, NM_001177591	Sous unité régulatrice B de la protéine phosphatase 2A	100,0%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	<i>PPP2R2B</i>	5q32	NM_004576, NM_181678, NM_181677, NM_181674, NM_181676, NM_181675	Sous unité régulatrice B	93,3%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), gamma isoform	<i>PPP2R2C</i>	4p16.1	NM_020416, NM_181876	Sous unité régulatrice B	99,1%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, delta isoform	<i>PPP2R2D</i>	10q26.3	NM_001291310	Sous unité régulatrice B	98,6%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", alpha	<i>PPP2R3A</i>	3q22.2-q	NM_002718, NM_181897, NM_001190447	Sous unité régulatrice B	98,0%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", beta	<i>PPP2R3B</i>	Xp22.33	NM_013239	Sous unité régulatrice B	58,1%
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", gamma	<i>PPP2R3C</i>	14q12	NM_001305155	Sous unité régulatrice B	95,4%
Protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4	<i>PPP2R4</i>	9q34.11	NM_021131, NM_178001, NM_178000, NM_178003, NM_178002, NM_001271832	Sous unité régulatrice B	99,8%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), alpha isoform	<i>PPP2R5A</i>	1q41	NM_006243, NM_001199756	Sous unité régulatrice B	96,9%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), beta isoform	<i>PPP2R5B</i>	11q13	NM_006244	Sous unité régulatrice B	95,2%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), gamma isoform	<i>PPP2R5C</i>	14q32.2	NM_002719, NM_178586, NM_178587, NM_178588	Sous unité régulatrice B	96,0%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), delta isoform	<i>PPP2R5D</i>	6p21.1	NM_006245, NM_180976, NM_180977	Sous unité régulatrice B	94,2%
Protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56), epsilon isoform	<i>PPP2R5E</i>	14q23.1	NM_006246, NM_001282181	Sous unité régulatrice B	94,9%
Retinoblastoma 1	<i>RB1</i>	13q14.2	NM_000321	Régulation E2F	92,8%
Retinoblastoma-like 1 / P107	<i>RBL1</i>	20q11.22	NM_002895	Régulation E2F	96,0%
Retinoblastoma-like 2 / P130	<i>RBL2</i>	16q12.2	NM_005611	Régulation E2F	91,6%
Striatin, calmodulin binding protein	<i>STRN</i>	2p22.2	NM_003162	Interaction avec PPP2PAC	93,4%
Striatin, calmodulin binding protein 3	<i>STRN3</i>	14q12	NM_014574, NM_001083893	Interaction avec STRN et PPP2R2AC	96,4%

Nom	Symbole	Locus	N°Accession	Rôle	Couverture
Transcription factor Dp-1 / DP1	<i>TFDP1</i>	13q34	NM_007111	Facteur de transcription (hétérodimère avec E2F)	93,6%
Transcription factor Dp-2 / DP2	<i>TFDP2</i>	3q23	NM_006286, NM_001178142	Facteur de transcription (hétérodimère avec E2F)	89,5%
Transforming growth factor, beta 1	<i>TGFB1</i>	19q13.2	NM_000660	Anti-mitotique (via SMAD), Induction CKI (supresseur tumeur)	96,2%
Transforming growth factor, beta 2	<i>TGFB2</i>	1q41	NM_003238	Rôle dans la prolifération cellulaire (SMAD)	100,0%
Tumor protein p53	<i>TP53</i>	17p13.1	NM_00546, NM_001126118, NM_001126115	Arrêt du cycle et apoptose en réponse aux dommages de l'ADN	91,7%
WEE1 homolog	<i>WEE1</i>	11p15.4	NM_003390, NM_001143976	Activation CDK1 par phosphorylation Tyr 14 et 15	91,8%
14-3-3					
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide	<i>YWHA B</i>	20q13.12	NM_003404, NM_139323	Régulation CDC25C	95,5%
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	<i>YWHA E</i>	17p13.3	NM_006761	Régulation CDC25C	94,6%
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	<i>YWHA G</i>	7q11.23	NM_012479	Régulation CDC25C	100,0%
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	<i>YWHA H</i>	22q12.3	NM_003405	Régulation CDC25C Régulation ZBTB17	79,2%
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide	<i>YWHA Q</i>	2p25.1	NM_006826	Régulation CDC25C	94,6%
Stratifin / YWHAS	<i>SFN</i>	1p36.11	NM_006142	Régulation CDC25C	100,0%
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	<i>YWHA Z</i>	8q22.3	NM_003406, NM_145690	Régulation CDC25C	94,1%
Zinc finger protein 151 / MIZ1	<i>ZBTB17</i>	1p36.1	NM_001242884, NM_001287603	Régulation de l'expression de CDKN2B (via MYC)	92,3%



Annexe 2. Données cliniques des échantillons de tissu sain

Cas	Correspondance	Type de tissu sain
4	Tissu sain du cas 3	Méninge
7	Tissu sain du cas 6	Méninge
15	Tissu sain du cas 14	Cérébral
18	Tissu sain du cas 17	Cérébral
22	Tissu sain du cas 21	Cérébral
24	Tissu sain du cas 23	Cérébral
37	Tissu sain du cas 36	Cérébral
39	Tissu sain du cas 38	Cérébral
46	Tissu sain du cas 45	Epiderme
49	Tissu sain du cas 48	Cérébral
55	Tissu sain du cas 54	Méninge



Annexe 3. Profondeur moyenne de lecture par échantillon

Cas	Profondeur moyenne	Cas	Profondeur moyenne	Cas	Profondeur moyenne
1	1482	19	1903	39	1490
2	1482	20	46	40	2396
3	1548	21	1707	41	4697
4	3534	22	1465	43	487
5	1750	23	2404	44	3085
6	1771	24	3272	45	1026
7	2350	25	2941	46	1208
8	2225	26	1544	47	1197
9	1992	27	1246	48	1725
10	1337	28	2552	49	1308
11	2397	29	2062	50	961
12	1845	30	1322	51	545
13	6483	31	3576	52	1740
14	2138	32	1642	53	1584
15	1380	33	2344	54	11490
16	2257	34	2891	55	10526
17	1609	35	1378	56	12652
18	1823	38	1845		



Annexe 4. Variants retenus pour l'analyse statistique

Cas	Chrom	Position	Ref	Var	Gène	Type	Localisation	Conséquence	Détail	Cosmic	Clinvar
31, 32, 40, 56	chr4	122740454	T	G	CCNA2	SNP, 1 tv	intronic
13, 27, 29, 30, 32, 35, 43, 47, 53, 56	chr5	68464057	GA	G	CCNB1	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_031966, exon3, c.251delA, p.Glu84fs	.	.
10, 11, 13, 16, 20, 26, 27, 28, 31, 34, 41, 43	chr12	4383455	TC	T	CCND2-AS1	INDEL, 1 del	ncRNA_intronic
11, 13, 16, 28, 29, 30, 33, 41, 52, 56	chr19	30312739	AT	A	CCNE1	INDEL, 1 del	intronic
31, 32, 50, 51	chr19	30308385	T	C	CCNE1	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_001238, exon6, c.T399C, p.Phe133Phe	.	.
27, 35, 43, 44, 56	chr19	30312738	A	T	CCNE1	SNP, 1 tv	intronic
27, 35, 43, 44, 56	chr19	30312740	T	A	CCNE1	SNP, 1 tv	intronic
29, 43, 44, 50	chr8	95897794	T	G	CCNE2	SNP, 1 tv	intronic
8, 11, 12, 13, 16, 27, 29, 30, 41, 52	chr16	2503520	CG	C	CCNF	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_001761, exon15, c.1698delG, p.Ser568fs	.	.
1, 2, 5, 8, 11, 12, 20, 26, 27, 30, 51, 53	chr5	86695334	CA	C	CCNH	INDEL, 1 del	intronic
8, 11, 12, 13, 16, 25, 27, 28, 29, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 47, 52, 53	chr3	48205800	C	CG	CDC25A	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_001789, exon13, c.1318dupC, p.Arg440fs	.	.
8, 11, 12, 16, 25, 28, 30, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 47, 52, 53	chr3	48218914	A	AG	CDC25A	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_001789, exon8, c.702dupC, p.Ser235fs	.	.
1, 8, 9, 16, 25, 30, 40, 41, 43, 44, 52, 53, 56	chr3	48218957	T	A	CDC25A	SNP, 1 tv	intronic
2, 16, 25, 33, 35, 40, 41, 43, 52, 53	chr20	3781941	G	GC	CDC25B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_021873, exon8, c.747dupC, p.Ser249fs	.	.
8, 11, 12, 25, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 44, 52, 56	chr20	3781546	C	CG	CDC25B	INDEL, 1 ins	intronic
8, 11, 12, 13, 16, 25, 28, 32, 33, 40, 41, 43, 44, 53	chr20	3781980	A	AG	CDC25B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_021873, exon8, c.786dupG, p.Glu262fs	.	.
10, 16, 20, 51	chr20	3785397	G	A	CDC25B	SNP, 1 ts	intronic
16, 29, 30, 50, 51	chr20	3777172	C	T	CDC25B	SNP, 1 ts	UTR5
9, 10, 12, 13, 26, 47	chr20	3782702	G	A	CDC25B	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_021873, exon10, c.G1053A, p.Arg351Arg	.	.
16, 20, 29, 30, 50, 51	chr20	3783764	C	T	CDC25B	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_021873, exon13, c.C1267T, p.Leu423Leu	.	.



8, 11, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 43, 44, 47, 52, 53	chr5	137661464	T	TA	CDC25C	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
2, 5, 8, 9, 12, 16, 25, 27, 28, 29, 32, 33, 35, 41, 52, 56	chr10	62539881	GT	G	CDK1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
9, 11, 13, 19, 25, 28, 40, 41, 44, 56	chr7	92244611	GA	G	CDK6	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 41, 52, 53, 56	chr7	92247457	GA	G	CDK6	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_001259, exon7, c.762delT, p.Phe254fs	.
1, 5, 11, 16, 25, 27, 28, 32, 43, 50, 51	chr12	12870764	C	CG	CDKN1B	INDEL, 1 ins	UTR5	.	.	.
5, 9, 19, 25, 29, 30, 33	chr12	12871052	G	GC	CDKN1B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_004064, exon1, c.280dupC, p.Arg93fs	COSM1628450
8, 9, 11, 12, 16, 28, 29, 30, 40, 41, 52, 53	chr11	2905833	TG	T	CDKN1C	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
2, 5, 8, 9, 11, 12, 16, 19, 26, 28, 29, 31, 33, 41, 52, 53	chr11	2905875	C	CG	CDKN1C	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
5, 8, 11, 12, 13, 25, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 44, 47, 52, 53	chr11	2905308	C	CG	CDKN1C	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_000076, exon2, c.876dupC, p.Ala293fs	.
10, 11, 12, 13, 16, 27, 29, 30, 52, 53	chr9	21970916	C	T	CDKN2A	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_000077, exon2, c.G442A, p.Ala148Thr	COSM374361 COSM3736958 COSM374362
5, 8, 12, 25, 28, 29, 30, 33, 35, 52	chr9	22008917	G	GC	CDKN2B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_004936, exon1, c.35dupG, p.Gly12fs	RCV000034482.3 RCV000078114.6 RCV000119155.3 RCV000157755.3 RCV000412408.1
8, 9, 11, 12, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 44, 52, 53, 56	chr9	22008876	A	AC	CDKN2B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_004936, exon1, c.76_77insG, p.Leu26fs	.
1, 8, 11, 16, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 35, 43, 47, 53	chr9	22005936	GA	G	CDKN2B-AS1	INDEL, 1 del	lncRNA_intronic	.	.	.
5, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 41, 43, 44, 52, 53, 56	chr9	22008608	GT	G	CDKN2B-AS1	INDEL, 1 del	lncRNA_intronic	.	.	.



1, 11, 27, 28, 29, 31, 32, 44	chr1	51439777	C	T	CDKN2C	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_001262, exon3, c.C342T, p.Gly114Gly	COSM6020094	.
9, 11, 19, 25, 28, 29, 33, 40, 44, 56	chr14	54868234	C	CT	CDKN3	INDEL, 1 ins	intronic
1, 2, 32, 34, 43, 47	chrX	139866248	T	C	CDR1	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_004065, exon1, c.A284G, p.Glu95Gly	.	.
8, 12, 25, 28, 29, 33, 40, 44, 47, 53	chr20	32274162	GC	G	E2F1	INDEL, 1 del	UTR5
8, 11, 13, 25, 27, 28, 30, 33, 35, 40, 44, 47, 52	chr2	11593802	G	GT	E2F6	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_198256, exon3, c.285dupA, p.Leu96fs	.	.
8, 9, 11, 12, 13, 16, 27, 28, 29, 30, 35, 44, 52, 53	chr12	77419605	GC	G	E2F7	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_203394, exon12, c.2297delG, p.Gly766fs	.	.
8, 11, 13, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 40, 41, 44, 52, 56	chr12	77468459	AT	A	E2F7	INDEL, 1 del	intronic
13, 25, 28, 30, 33, 35, 40, 41, 43, 47, 56	chr12	77419298	T	TC	E2F7	INDEL, 1 ins	intronic
5, 9, 19, 29, 30, 33, 34, 35, 41, 47, 56	chr11	19247170	GA	G	E2F8	INDEL, 1 del	intronic
8, 9, 11, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 44, 47, 52	chr11	19261654	CT	C	E2F8	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_001256371, exon2, c.14delA, p.Lys5fs	.	.
2, 8, 47, 52	chr11	19251440	A	G	E2F8	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_001256371, exon10, c.T1454C, p.Leu485Pro	.	.
5, 28, 52, 53, 56	chr11	19251704	G	A	E2F8	SNP, 1 ts	intronic
12, 16, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 43, 44, 47, 52, 53	chr6	153296500	AT	A	FBXO5	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_012177, exon2, c.359delA, p.Asn120fs	.	.
11, 13, 27, 28	chr14	35565873	C	A	LOC101927178	SNP, 1 tv	ncRNA_intronic
8, 9, 12, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 40, 52, 53, 56	chr12	69207352	CT	C	MDM2	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_002392, exon3, c.119delT, p.Leu40fs	.	.
5, 8, 9, 11, 12, 16, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 40, 43, 44, 50, 51, 52, 53, 56	chr12	69218525	CT	C	MDM2	INDEL, 1 del	intronic
2, 8, 19, 25, 27, 28	chr19	52725338	T	C	MIR6801	SNP, 1 ts	ncRNA_exonic
9, 11, 13, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 40, 43, 56	chr10	129904797	TA	T	MK167	INDEL, 1 del	exonic	stopgain	NM_002417, exon13, c.5306delT, p.Leu1769X	.	.



9, 11, 16, 19, 25, 27, 28, 30, 31, 33, 40, 41, 43, 56	chr10	129910354	GA	G	MK167	INDEL, 1 del	intronic
12, 28, 30, 33, 35, 40, 44, 47, 52, 53	chr10	129913670	G	GC	MK167	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_002417, exon7, c.1001dupG, p.Gly634fs	.	.
9, 27, 28, 56	chr10	129906468	C	T	MK167	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_002417, exon13, c.G3636A, p.Gln1212Gln	.	.
12, 13, 29, 30	chr10	129907610	G	A	MK167	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_002417, exon13, c.C2494T, p.Arg832Trp	.	.
2, 10, 12, 13, 20, 25, 35, 43, 47, 50, 51, 53	chr10	129903802	A	G	MK167	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_002417, exon13, c.T6302C, p.Ile2101Thr	COSM3751614	.
30, 31, 32, 47, 50, 51	chr10	129902203	TTG	T	MK167	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_002417, exon13, c.7899_7900del, p.His2633fs	COSM391154	.
8, 12, 16, 19, 33, 35, 40, 52, 53	chr10	21962269	T	A	MLLT10	SNP, 1 tv	intronic
8, 9, 11, 16, 29, 30, 44	chr10	21962451	AG	A	MLLT10	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_004641, exon11, c.1225delG, p.Gly409fs	COSM1347230 COSM1347229	.
9, 12, 13, 16, 25, 27, 28, 30, 32, 33, 35, 40, 41	chr14	61285352	A	G	MNAT1	SNP, 1 ts	intronic
9, 11, 13, 27, 28, 29, 30, 32, 40, 50	chr16	3023965	T	TC	PKMYT1	INDEL, 1 ins	intronic
11, 13, 25, 27, 28, 30, 33, 35, 40, 41, 44	chr16	3025240	T	TC	PKMYT1	INDEL, 1 ins	intronic
2, 5, 8, 9, 11, 12, 16, 19, 26, 29, 30, 33, 44, 51, 52, 53, 56	chr5	57753062	GT	G	PLK2	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_006622, exon7, c.953delA, p.Asn318fs	.	.
33, 34, 43, 44	chr5	57753251	T	A	PLK2	SNP, 1 tv	intronic
33, 34, 43, 50	chr5	57754007	T	G	PLK2	SNP, 1 tv	intronic
33, 34, 43, 50	chr5	57753116	C	T	PLK2	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_006622, exon7, c.G900A, p.Pro300Pro	COSM3761266	.
33, 34, 43, 50	chr5	57753149	A	G	PLK2	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_006622, exon7, c.T867C, p.Tyr289Tyr	COSM3761267	.
1, 8, 12, 44	chr1	45267471	G	A	PLK3	SNP, 1 ts	intronic
5, 12, 13, 25, 28, 29, 33, 40, 41, 52, 56	chr4	128806843	C	CT	PLK4	INDEL, 1 ins	intronic
8, 12, 13, 16, 30	chr4	128811117	G	C	PLK4	SNP, 1 tv	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_001190799, exon6, c.G1460C, p.Trp487Ser	.	.
5, 11, 12, 13, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 35, 43, 44, 51, 52, 53	chr19	1529448	TC	T	PLK5	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_001243079, exon10, c.450delC, p.Ile150fs	.	.



2, 8, 9, 10, 11, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 31, 40, 41, 50, 52, 56	chr19	1527048	TG	T	PLK5	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
5, 8, 9, 11, 13, 16, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 40, 41, 44, 52, 56	chr5	133534751	G	GA	PPP2CA	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
25, 26, 35, 43, 50, 51	chr19	52716143	G	A	PPP2R1A	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
2, 8, 19, 25, 26, 27, 28	chr19	52719190	A	G	PPP2R1A	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
19, 26, 27, 28	chr19	52719011	C	G	PPP2R1A	SNP, 1 tv	intronic	.	.	.
2, 19, 25, 26, 27, 28	chr19	52714434	T	A	PPP2R1A	SNP, 1 tv	intronic	.	.	.
8, 9, 11, 13, 16, 19, 28, 29, 33, 40, 41, 43, 52	chr8	26196365	GA	G	PPP2R2A	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 13, 16, 28, 30, 33, 40, 41, 43, 44	chr5	146017784	GC	G	PPP2R2B	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
1, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 47, 50, 52, 53, 56	chr5	145972568	CA	C	PPP2R2B	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_181678, exon10, c.984delT, p.Phe328fs	.
9, 11, 12, 13, 16, 19, 25, 28, 29, 32, 33, 40, 41, 44, 56	chr5	146080638	A	AC	PPP2R2B	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_181678, exon4, c.104dupG, p.Gly35fs	.
25, 35, 44, 50	chr5	145972496	A	G	PPP2R2B	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
9, 27, 33, 34, 35, 40	chr5	146077526	C	T	PPP2R2B	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
1, 2, 16, 20, 28, 30, 32, 43, 52, 53	chr4	6330902	CG	C	PPP2R2C	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
1, 2, 9, 13, 16, 25, 31, 32, 35, 40, 41, 44, 56	chr4	6382641	CT	C	PPP2R2C	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
5, 9, 19, 25, 30, 32, 35, 44, 52, 53	chr10	133760992	A	AT	PPP2R2D	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
10, 19, 25, 26, 27, 29, 32, 43, 50, 51, 52	chr10	133769306	C	CG	PPP2R2D	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_001291310, exon7, c.707dupG, p.Arg236fs	.



8, 11, 12, 13, 16, 28, 29, 40, 43, 47, 52, 53	chr10	133747840	C	CT	PPP2R2D	INDEL, 1 ins	upstream
1, 5, 9, 11, 26, 27, 32, 40, 50, 51, 52	chr3	135721207	GA	G	PPP2R3A	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_002718, exon2, c.868delA, p.Lys290fs	.	.
1, 5, 8, 10, 16, 26, 27, 29, 31, 32, 40, 53	chr3	135720706	GA	G	PPP2R3A	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_002718, exon2, c.367delA, p.Lys123fs	.	.
8, 11, 12, 25, 27, 29, 30, 33, 52, 56	chr3	135768254	G	GT	PPP2R3A	INDEL, 1 ins	intronic
8, 40, 43, 52, 53	chr3	135721781	C	G	PPP2R3A	SNP, 1 tv	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_002718, exon2, c.C1441G, p.Pro481Afs	.	.
1, 2, 9, 11, 31, 33, 34, 35, 41, 56	chr9	131909810	GC	G	PPP2R4	INDEL, 1 del	UTR3
1, 2, 11, 13, 26, 31, 32, 34, 41, 47, 52, 56	chr9	131898977	AG	A	PPP2R4	INDEL, 1 del	intronic
1, 11, 13, 26, 27, 31, 34, 40, 41, 53, 56	chr9	131909798	A	AC	PPP2R4	INDEL, 1 ins	UTR3
1, 2, 8, 16, 26, 31, 33, 34, 35, 43, 44, 47, 50, 51	chr9	131898951	G	GC	PPP2R4	INDEL, 1 ins	intronic
12, 13, 25, 27, 29, 30, 35, 43, 47, 52	chr1	212529946	C	CT	PPP2R5A	INDEL, 1 ins	intronic
8, 11, 16, 27, 29, 30, 43, 47, 52, 53	chr1	212506764	T	TA	PPP2R5A	INDEL, 1 ins	intronic
1, 9, 12, 27, 29, 35, 44, 47, 52, 53, 56	chr1	212534039	T	TA	PPP2R5A	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_006243, exon13, c.1389dupA, p.Leu463fs	.	.
8, 11, 12, 13, 16, 25, 27, 28, 29, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 53, 56	chr1	212520672	C	CT	PPP2R5A	INDEL, 1 ins	intronic
10, 26, 28, 34, 50, 53	chr1	212459481	C	G	PPP2R5A	SNP, 1 tv	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_006243, exon1, c.C29G, p.Ala10Gly	.	.
5, 9, 12, 16, 25, 27, 29, 30, 40, 41, 52	chr11	64693221	GC	G	PPP2R5B	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_006244, exon2, c.16delC, p.Pro6fs	.	.
9, 11, 13, 16, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 41, 43, 47, 52, 56	chr11	64693171	CG	C	PPP2R5B	INDEL, 1 del	UTR5
29, 41, 43, 52, 53, 13, 25, 27, 31, 32, 34, 41, 43, 47, 50, 56	chr14	102375852	C	G	PPP2R5C	SNP, 1 tv	intronic
	chr6	42976831	CA	C	PPP2R5D	INDEL, 1 del	intronic



1, 2, 10, 12, 16, 26, 30, 33, 35, 40, 44, 51	chr14	63856636	AT	A	PPP2R5E	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
1, 8, 12, 16, 19, 26, 27, 33, 43, 47, 51, 53	chr14	63858676	GA	G	PPP2R5E	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 13, 16, 19, 25, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 43, 44	chr14	63920408	AT	A	PPP2R5E	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_006246, exon3, c.352delA, p.Met118fs	.
12, 13, 16, 28, 33, 35, 43, 44, 52, 53	chr13	48916885	TA	T	RB1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
11, 12, 13, 16, 25, 28, 29, 30, 33, 40, 41, 47, 56	chr13	48923030	GA	G	RB1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
5, 8, 11, 12, 13, 19, 25, 27, 29, 30, 32, 33, 40, 41, 44, 52, 53, 56	chr13	48923061	GT	G	RB1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 12, 13, 16, 27, 29, 33, 35, 40, 41, 44, 53	chr13	48923035	C	CT	RB1	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
16, 29, 30, 33, 44, 50	chr13	48955411	A	G	RB1	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_000321, exon17, c.A1527G, p.Gly509Gly	.
11, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 30, 32, 35, 40, 43, 56	chr13	48921884	A	G	RB1	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
31, 34, 41, 56	chr13	48923143	AT	A	RB1	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_000321, exon6, c.592delT, p.Phe198fs	COSM5682401 COSM5682402
9, 12, 13, 31, 32, 33, 34, 51	chr13	49051481	T	A	RB1	SNP, 1 tv	intronic	.	.	RCV000078639.6 RCV000262633.1
8, 9, 11, 12, 13, 16, 19, 29, 31, 33, 41, 44	chr20	35724075	AG	A	RBL1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 16, 19, 25, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 44, 52, 56	chr20	35695373	CA	C	RBL1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
2, 5, 9, 13, 19, 25, 26, 27, 28, 30, 32, 33, 40, 44, 56	chr20	35651340	TA	T	RBL1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 12, 16, 25, 28, 29, 32, 33, 35, 40, 44, 52, 53	chr20	35627207	T	TA	RBL1	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_002895, exon22, c.3161dupT, p.Leu1054fs	.
8, 9, 11, 12, 13, 19, 25, 28, 30, 31, 32, 33, 41, 44	chr20	35724137	C	CG	RBL1	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.



1, 8, 12, 13, 16, 19, 20, 27, 30, 31, 44	chr16	53496598	G	A	RBL2	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
9, 25, 32, 33, 41, 52, 56	chr16	53488646	T	G	RBL2	SNP, 1 tv	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_005611, exon8, c.T1071G, p.Asp357Glu	.
8, 13, 35, 56	chr16	53476703	AT	A	RBL2	INDEL, 1 del	exonic	frameshift_deletion	NM_005611, exon3, c.506delT, p.Ile169fs	COSM2834970
11, 13, 16, 25, 29, 30, 32, 33, 35	chr16	53481010	A	G	RBL2	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_005611, exon4, c.A629G, p.Tyr210Cys	COSM4129114
8, 13, 16, 19, 20, 30, 33, 44	chr16	53503943	C	G	RBL2	SNP, 1 tv	exonic	synonymous_SNV	NM_005611, exon15, c.C2091G, p.Arg697Arg	COSM5426064
11, 12, 13, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 47, 52, 53	chr1	27190293	C	CT	SFN	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_006142, exon1, c.591dupT, p.Thr197fs	.
8, 11, 12, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 40, 47, 52, 53	chr2	37121182	GA	G	STRN	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
12, 13, 16, 27, 29, 32, 33, 35, 40, 41, 52	chr2	37076556	T	TA	STRN	INDEL, 1 ins	UTR3	.	.	.
8, 11, 12, 13, 16, 25, 29, 30, 32, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 52, 56	chr2	37076601	A	AT	STRN	INDEL, 1 ins	exonic	stoploss	NM_003162, exon18, c.2340dupA, p.Ter781delinsMet	.
1, 26, 30, 43, 44	chr2	37152425	T	C	STRN	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
26, 29, 30, 41, 43, 50	chr2	37105178	G	A	STRN	SNP, 1 ts	intronic	.	.	.
26, 29, 30, 41, 43, 44, 50	chr2	37111123	G	A	STRN	SNP, 1 ts	exonic	nonsynonymous_SNV	NM_003162, exon9, c.C1138T, p.Pro380Ser	.
1, 26, 30, 41, 43, 44	chr2	37152372	A	C	STRN	SNP, 1 tv	intronic	.	.	.
8, 9, 11, 13, 16, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 40, 41, 43, 44, 47, 52, 53, 56	chr14	31371852	GA	G	STRN3	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.



10, 12, 19, 25, 27, 31, 32, 34, 41, 52, 56	chr13	114287420	CT	C	TFDP1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
11, 27, 28, 29, 30, 40, 41, 43, 44, 56	chr3	141688984	CT	C	TFDP2	INDEL, 1 del	splicing	.	.	.
8, 11, 13, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 43, 44, 47, 52, 56	chr3	141688987	TA	T	TFDP2	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 13, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 40, 41, 43, 44	chr19	41847939	CT	C	TGFB1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 11, 12, 16, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 35, 40, 41, 44	chr19	41848169	A	AG	TGFB1	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
1, 5, 8, 9, 11, 12, 16, 19, 27, 29, 30, 32, 33, 35, 41, 43, 44, 47, 52, 53, 56	chr1	218607759	T	TA	TGFB2	INDEL, 1 ins	exonic	frameshift_insertion	NM_003238, exon4, c.724dupA, p.Asn241fs	.
5, 8, 9, 11, 16, 19, 27, 28, 29, 30, 32, 43, 44, 52	chr11	9608210	AT	A	WEE1	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
5, 8, 9, 11, 12, 13, 16, 19, 26, 27, 28, 30, 33, 34, 35, 40, 41, 44, 52	chr11	9598220	A	AT	WEE1	INDEL, 1 ins	intronic	.	.	.
2, 5, 20, 26, 35	chr11	9607032	A	G	WEE1	SNP, 1 ts	exonic	synonymous_SNV	NM_003390, exon8, c.A1428G, p.Glu476Glu	COSM3752829
8, 10, 11, 13, 26, 27, 28, 29, 33, 35, 40, 41, 44, 47, 50, 52, 56	chr17	1303326	GC	G	YWHAE	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
8, 9, 11, 12, 13, 19, 25, 26, 30, 33, 40, 47, 53	chr2	9770589	G	CGGG	YWHAQ	INDEL, 1 ins	UTR5	.	.	.
9, 11, 13, 19, 25, 27, 28, 29, 30, 33, 40, 41, 44, 52, 56	chr8	101936287	TA	T	YWHAZ	INDEL, 1 del	intronic	.	.	.
1, 27, 28, 29, 30	chr8	101937057	A	C	YWHAZ	SNP, 1 tv	intronic	.	.	.

Chromosome (Chrom) et position d'après le génome de référence Hg19 (GRCh37). Ref correspond au nucléotide attendu à la position donnée et Var au variant observé. Ts : transition, Tv :transversion.



Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

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

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



Etude des marqueurs moléculaires du cycle cellulaire dans des méningiomes récidivants et non récidivants

Les méningiomes correspondent aux deuxièmes tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes. Le pronostic de ces tumeurs est étroitement lié au risque de récurrence qui dépend du grade histologique de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et de la qualité de l'exérèse. L'index mitotique et le nombre de cellules en cycle cellulaire évalué par l'indice Ki67 sont également corrélés au risque de récurrence. L'objectif de l'étude était de rechercher des altérations moléculaires somatiques potentiellement impliquées dans la récurrence, dans un panel de 84 gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire. Nous avons étudié une série de 30 cas de méningiomes, 17 récidivants et 13 non récidivants par technique de séquençage massivement parallèle. Les récurrences de 15 tumeurs ont été analysées comparativement à la tumeur primitive correspondante. L'analyse a permis d'identifier 9 altérations significativement associées avec le caractère récidivant, concernant les gènes *CCNH*, *CDKN2A*, *FBXO5*, *MKI67*, *SFN*, *STRN* et *YWHAE*. L'étude de survie sans récurrence a mis en évidence une récurrence plus précoce pour les tumeurs avec un index mitotique supérieur ou égal à 4 mitoses et un indice Ki67 supérieur à 5%. La présence de l'altération sur le gène *CCNH* est associée à une récurrence plus tardive. Les gènes *SFN*, *STRN* et *YWHAE* sont impliqués dans l'activation de la kinase cycline-dépendante de type 1 (CDK1) intervenant lors de la transition G2/M du cycle cellulaire. Les altérations identifiées doivent être vérifiées par d'autres techniques d'analyse avant de pouvoir explorer leur rôle dans la récurrence afin de savoir si certains peuvent conduire à l'élaboration de thérapies ciblées.

Mots-clés : méningiome, NGS, cycle cellulaire, index mitotique, Ki67, *CCNH*, *CDKN2A*, *FBXO5*, *MKI67*, *SFN*, *STRN*, *YWHAE*

Study of cell cycle molecular markers in recurrent and non-recurrent meningiomas

Meningiomas account for the second most common primitive brain tumors. Their prognosis is closely linked to recurrence risk which depends on tumoral WHO grade (World Health Organisation) and on quality of surgical resection. The mitotic index and the number of proliferating cells assessed by Ki67 index are also associated with recurrence risk. The objective of the study was to search for somatic molecular alterations potentially involved in recurrence, amongst a set of 84 genes acting as cell cycle regulators. We studied a series of 30 meningioma cases (17 recurring cases, 13 non-recurring cases) by next-generation sequencing. Fifteen recurrences were compared to matching original tumors. Nine alterations regarding *CCNH*, *CDKN2A*, *FBXO5*, *MKI67*, *SFN*, *STRN* and *YWHAE* genes were significantly associated with recurrence. Progression-free survival analysis revealed an earlier recurrence for tumors with a mitotic index greater than or equal to 4 mitosis and a Ki67 index above 5%. *CCNH* gene alteration was linked to a longer time of recurrence. *SFN*, *STRN* and *YWHAE* genes are involved in cyclin-dependent kinase 1 activation which contributes to G2/M cell cycle transition. Identified alterations must be confirmed with other analysis methods before investigating their part in recurrence to assess if some of these alterations could lead to targeted therapy development.

Keywords: meningioma, NGS, cell cycle, mitotic index, Ki67, *CCNH*, *CDKN2A*, *FBXO5*, *MKI67*, *SFN*, *STRN*, *YWHAE*

