

Comment l'analyse de la méthylation de l'ADN tumoral aide au diagnostic des tumeurs cérébrales pédiatriques. Cas clinique d'un neuroblastome du système nerveux central *FOXR2*-activé

How DNA methylation profiling can help in the diagnosis of pediatric brain tumors. Case report of central nervous system neuroblastoma FOXR2-activated

ROCQ L.¹, FRICX C.², LUBANSU A.³, SADEGHI N.⁴, DEVALCK C.⁵, ABSIL L.¹, RACU M.-L.¹, D'HAENE N.¹, SALMON I.^{1,6,7} et LEBRUN L.¹

¹Département d'Anatomie pathologique, H.U.B - Hôpital Erasme

²Département de Pédiatrie, H.U.B - Hôpital Erasme

³Département de Neurochirurgie, H.U.B - Hôpital Erasme

⁴Département de Radiologie, H.U.B - Hôpital Erasme

⁵Département d'Oncologie médicale, H.U.B - Hôpital universitaire des Enfants Reine Fabiola (HUDERF)

⁶Centre universitaire inter-régional d'Expertise en Anatomie pathologique hospitalière (CurePath, CHIREC, CHU Tivoli, ULB), Jumet

⁷DIAPath, Center for Microscopy and Molecular Imaging, Gosselies
Université libre de Bruxelles (ULB)

RÉSUMÉ

Le neuroblastome du système nerveux central, auparavant classé parmi les tumeurs neuroectodermiques primitives, est une tumeur de grade 4 extrêmement rare. La présence d'un profil de méthylation d'ADN spécifique associé à l'activation du gène *FOXR2* a permis d'en définir une entité tumorale à part entière dans la classification de l'Organisation mondiale de la Santé de 2021. Néanmoins, les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, histologiques et moléculaires restent mal définies.

Nous rapportons le cas d'une patiente de 4 ans présentant des céphalées, phono-photophobies, nausées, vomissements et boiterie du membre inférieur droit depuis 3 mois. À l'examen neurologique, on met en évidence un signe de Romberg latéralisé à droite, une marche avec steppage et une latéropulsion du tronc vers la droite. L'IRM cérébrale montre une lésion expansive de 87 x 81 x 78 mm, intraparenchymateuse, fronto-pariétale gauche avec une extension vers le carrefour ventriculaire et la région intraventriculaire, entraînant une déviation des structures médianes vers la droite et un engagement sous-falcarien. L'examen microscopique montre une prolifération de cellules tumorales, richement cellularisée, constituée de petites cellules bleues, discohérentes, mitotiquement actives, exprimant les protéines Synaptophysine, OLIG2 et NeuN. L'analyse du profil moléculaire par « *Next Generation Sequencing* » et du

ABSTRACT

Primary central nervous system neuroblastoma, previously classified as a primary neuroectodermal tumor, is an extremely rare grade 4 tumor. The presence of a specific DNA methylation profile associated with activation of the *FOXR2* gene made possible to define a tumor entity in its own right in the classification of the 2021 World Health Organization. Nevertheless, the epidemiological, clinical, histological, and molecular characteristics remain poorly defined.

We report the case of a 4-year-old patient presenting with headaches, phono-photophobia, nausea, vomiting and limping of the right lower limb for 3 months. On physical examination, we highlight a lateralized Romberg sign on the right, walking with stepping and lateropulsion of the trunk to the right. On cerebral MRI, an expansive lesion of 87 x 81 x 78 mm, intraparenchymal, left fronto-parietal is observed with an extension towards the ventricular junction and the intraventricular region, causing a deviation of the median structures to the right and a subfalcine engagement. Microscopic examination shows a proliferation of tumor cells, richly cellularized, made up of small blue, discohesive, mitotically active cells, expressing the Synaptophysin, OLIG2 and NeuN proteins. Analysis of the molecular profile by Next Generation Sequencing and the methylation profile of the tumor DNA revealed a gain of chromosome 1q36 and the activation of the transcription factor *FOXR2*.

profil de méthylation de l'ADN tumoral ont révélé un gain du chromosome 1q36 et l'activation du facteur de transcription *FOXR2*.

Ce cas supporte que le profil de méthylation d'ADN permet le diagnostic de tumeurs pédiatriques qui auraient été auparavant inclassées ou mal classées, permettant une prise en charge optimale du patient.

Rev Med Brux 2023; 44 : 591-595

Doi : 10.30637/2023.22-054

Mots-clés : neuroblastome, protéine FOXR2 humaine, méthylation de l'ADN, séquençage moléculaire, pathologie

This case supports that DNA methylation profile allows the diagnosis of pediatric tumors that would have previously been unclassified or misclassified, allowing for optimal patient management.

Rev Med Brux 2023; 44: 591-595

Doi: 10.30637/2023.22-054

Key words: neuroblastoma, FOXR2 protein human, DNA methylation, molecular sequencing, pathology

INTRODUCTION

Le neuroblastome du système nerveux central (SNC) est une tumeur embryonnaire de grade 4 extrêmement rare. Auparavant classé parmi les tumeurs neuroectodermes primitives (« PNET »), le neuroblastome apparaît, dans la classification de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) de 2021 comme étant une entité tumorale à part entière¹. Cependant, les caractéristiques épidémiologiques, cliniques, radiologiques, histologiques et moléculaires restent mal définies, probablement dû à leur rareté². D'autres entités de tumeurs embryonnaires sont mieux caractérisées au niveau moléculaire. En effet, l'amplification du gène *C19MC* dans la « *Embryonal Tumor with Multilayered Rosettes* » (ETMR) ou la perte d'expression de la protéine *INI1/SMARCB1* dans les « *Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumour* » (AT/RT) permet d'orienter le diagnostic vers ces entités et mène donc à une prise en charge adaptée du patient^{3,4}. Récemment, l'étude de la méthylation de l'ADN tumoral a révolutionné le diagnostic des tumeurs cérébrales. La méthylation de l'ADN est un composant relativement stable de l'épigénome, spécifique de la cellule mais aussi du tissu d'origine. Le *German Cancer Research Center* (DKFZ) et l'Université de Heidelberg ont développé un modèle de classification des tumeurs du SNC basé sur le profil de méthylation de l'ADN tumoral (« *CNS tumors Classifier v11* »). Ce modèle de « *Machine Learning* » a été « entraîné » sur base d'une référence de 2.801 prélèvements de tumeurs cérébrales regroupant 82 classes tumorales⁵. De ce modèle a émergé une classification des tumeurs du SNC qui peut potentiellement aider dans la définition de nouvelles entités tumorales. Chaque classification (classe de méthylation, *methylation class*, MC) proposée par ce modèle est associée à un score calibré (score calibré, *calibrated score*, cs) qui fournit un indice de confiance pour la MC. Le score obtenu doit être supérieur au seuil de 0,9 pour être prédictif⁵. De récentes études ont permis de montrer la présence d'un profil de méthylation d'ADN spécifique pour les neuroblastomes associés à une activation du gène *FOXR2*. Cependant, le pourcentage de neuroblastomes diagnostiqués histologiquement et présentant

ce profil de méthylation de l'ADN tumoral reste inconnu⁶⁻⁹. L'objectif de cet article est de souligner l'importance de l'étude du profil de méthylation d'ADN des tumeurs pédiatriques du SNC et particulièrement dans le diagnostic des neuroblastomes.

CAS CLINIQUE

Une patiente de 4 ans et 9 mois, sans antécédent notable, se présente aux urgences pour céphalées pariétales, douleurs oculaires, phono-photophobies, nausées, vomissements et boiterie au niveau du membre inférieur droit depuis 3 mois. L'examen neurologique met en évidence une marche avec steppage, un signe de Romberg (les yeux ouverts et fermés) et une latéropulsion du tronc vers la droite. La sensibilité profonde (vibration), la sensibilité superficielle (douleur et température) au niveau des extrémités, la fonction cérébelleuse (test doigt-nez) ainsi que les douze paires de nerfs crâniens ont été testés et ne montrent pas de déficit. La force des muscles proximaux et distaux (y compris les doigts) des membres supérieurs et inférieurs n'est pas déficitaire (5/5 selon la « *medical Research Council scale* »). Les réflexes moteurs au niveau des biceps, triceps, genoux et chevilles sont normaux bilatéralement (échelle médicale : 2/5). Le réflexe de Babinski est négatif avec une flexion de tous les orteils bilatéralement. Un examen ophtalmologique (fond d'œil) a permis d'exclure un œdème papillaire. A l'IRM cérébrale, une volumineuse lésion expansive intraparenchymateuse de 87 x 81 x 78 mm a été mise en évidence. Celle-ci était localisée en fronto-pariétal gauche avec une extension vers le carrefour ventriculaire et la région intraventriculaire, entraînant une déviation des structures médianes vers la droite de 10 mm et un engagement sous-falciforme. Elle présentait un aspect bien délimité, majoritairement solide, partiellement kystique et se rehaussait de façon intense et hétérogène après injection de produit de contraste. Une anomalie du signal FLAIR est observée en périphérie de la lésion. Une lésion de 17 mm de localisation secondaire est mise en évidence au niveau de la corne occipitale gauche (figure 1-A-B-C). Une exérèse chirurgicale étendue mais partielle de la tumeur a été réalisée

(volume tumoral résiduel évalué à 34% du volume tumoral initial).

L'examen microscopique (coloration routine d'Hémaléoxylène Eosine, épaisseur 5 µM) montre une prolifération de cellules tumorales, richement cellularisées, constituée de petites cellules bleues, discohésives. Les cellules tumorales s'organisent en couronne autour de vaisseaux hyperplasiés, formant des pseudorosettes. Ces cellules tumorales sont rondes et présentent peu d'atypies nucléocytoplasmiques. Elles sont constituées d'un noyau rond, à chromatines fines, homogènes et d'un cytoplasme peu abondant et clair. De nombreuses mitoses et corps apoptotiques sont visualisés. Nous n'observons pas de nécrose sur le prélèvement mis à notre disposition (figure 1-D). L'immunomarquage anti-Synaptophysine est positif de façon diffuse et intense (figure 1-F). Les immunomarquages anti-OLIG2 (figure 1-E) et NeuN sont positifs de façon intense et hétérogène au sein des cellules tumorales. Il n'y a pas de perte d'expression de la protéine INI1 au sein des cellules tumorales (figure 1-I). Nous n'avons pas observé d'expression tumorale des immunomarquages anti-GFAP (figure 1-G), MIC2, LIN 28A (figure 1-H), HH3K27M, β-caténine, IDH1. L'indice de prolifération cellulaire déterminé à l'aide de l'immunomarquage anti-KI67 est estimé à plus de 50% (figure 1-J). Une analyse du profil moléculaire par « *Next Generation Sequencing* » (NGS) a mis en évidence un gain du chromosome 1q. Les analyses de « *Fluorescence In Situ Hybridization* » (FISH) ont révélé par la suite un gain du chromosome 1q36. L'étude du

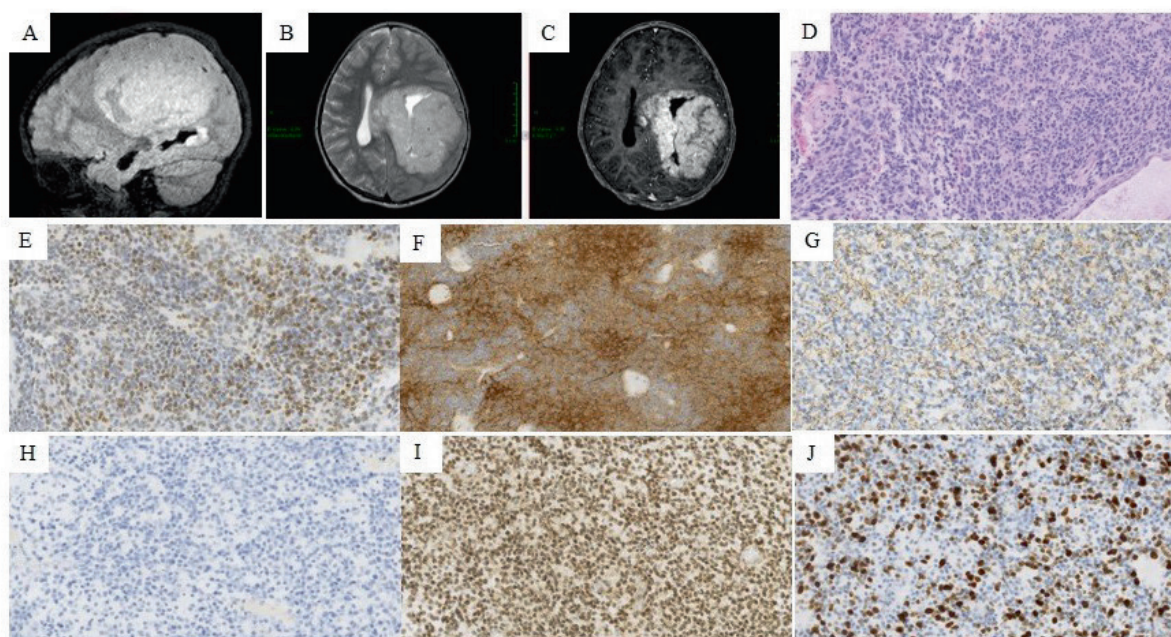
profil de méthylation de l'ADN tumoral a été soumise au « *CNS tumors Classifier v11* » disponible en ligne⁵ qui a proposé une MC de Neuroblastome *FOXR2* avec un cs de 0,99. Une chimiothérapie adjuvante par une cure de *Vinblastine-Carboplatine*, un conditionnement de *Thiotépa* suivie d'une radiothérapie craniospinale puis par 6 cycles de *Témzolomide* ont été réalisées. A deux ans du suivi post-opératoire, la patiente est en rémission complète. Des complications à long terme post-radiothérapie et post-chirurgie à type de radionécrose ainsi qu'une hémiparésie du membre supérieur droit séquellaire sont à déplorer à ce stade.

DISCUSSION

La classification de l'OMS de 2016 a drastiquement modifié le diagnostic des tumeurs du SNC par l'intégration des résultats de biologie moléculaire dans le diagnostic histologique. Plus encore, la nouvelle classification de l'OMS de 2021 recommande l'utilisation de l'étude de la méthylation de l'ADN tumoral pour le diagnostic de certaines entités, devenant même un critère essentiel dans le diagnostic de certaines d'entre elles dont notamment l'astrocytome de haut grade avec aspects de type piloïde¹⁰. En effet, l'étude du profil de méthylation d'ADN des tumeurs du SNC a mené à l'émergence de nouvelles entités dans la classification OMS, particulièrement en neuropathologie pédiatrique, dont le diagnostic était initialement uniquement basé sur la morphologie. C'est Capper *et al.*, qui a publié une large étude en 2018 démontrant

Figure 1

Image de l'IRM pré-opératoire et examen microscopique de la tumeur.



A : IRM sagittale pré-opératoire en séquence FLAIR intéressant la tumeur principale et la tumeur satellite ; B : IRM axiale pré-opératoire en séquence T2 intéressant la tumeur principale ; C : IRM axiale pré-opératoire en séquence T1 intéressant la tumeur principale ; D : H&E (grossissement X20) ; E : immunohistochimie OLIG2 (grossissement X20) ; F : immunohistochimie Synaptophysine (grossissement X20) ; G : immunohistochimie GFAP (grossissement X20) ; H : immunohistochimie LIN 28A (grossissement X20) ; I : immunohistochimie INI1 (grossissement X20) ; J : immunohistochimie KI67 (indice de prolifération cellulaire estimé à plus de 50 %, grossissement X20).

que le diagnostic basé sur la méthylation d'ADN de la tumeur permet de changer le diagnostic initial de 129 cas. Parmi ceux-ci, 92 ont changé de grade histologique⁹. C'est le cas des neuroblastomes *FOXR2*-activés, reconnus actuellement comme une entité à part entière dans la classification OMS 2021¹⁰. Ces tumeurs pédiatriques sont des tumeurs embryonnaires peu différenciées induisant, pour certains cas, une variabilité histo-diagnostique inter-observateur importante⁶. Les diagnostics différentiels histologiques (tableau) sont nombreux dont certains sont associés à des pronostics et des modes de traitement très différents. Le traitement des tumeurs embryonnaires consiste en une exérèse chirurgicale étendue, suivi d'une chimiothérapie adjuvante intensive à base de

Platine suivie d'une radiothérapie crâniospinale⁶. Ce type de traitement est indiqué dans les tumeurs embryonnaires contrairement aux tumeurs d'origine gliale⁶. De plus, des études suggèrent l'utilisation potentielle de thérapies ciblées dans certaines de ces tumeurs, notamment les AT/RT et les ETMR⁶. Peu de données concernant le pronostic sont disponibles pour les neuroblastomes *FOXR2*-activés. Néanmoins, certaines tumeurs embryonnaires comme les ATRT, tout comme les gliomes diffus de type pédiatrique de haut grade, présentent un pronostic sombre¹⁰. L'apparition de ce nouveau mode de diagnostic permet donc d'attribuer une valeur pronostique mais surtout de donner un traitement adéquat aux patients.

Tableau 1

Diagnostics différentiels du Neuroblastome FOXR2-activé en fonction du profil d'expression immunohistochimique¹⁰.

Diagnostics différentiels		IHC +	IHC -
Tumeurs embryonnaires	« Atypical teratoid / rhabdoid tumor »	GFAP, Synaptophysine, NeuN, LIN 28A, OLIG2	INI1, IDH1, MIC2, HH3K27M
	« CNS tumor with BCOR internal tandem duplication »	GFAP +/-, Olig2 +/-, Synaptophysine +/-, NeuN +/-, INI1	HH3K27M, LIN 28A, IDH1, MIC2
	Neuroblastome	Synaptophysine, Olig2, NeuN, INI1, GFAP +/-	HH3K27M, LIN28A, IDH1, MIC2
	« Embryonal tumor with multilayered rosettes »	Synaptophysine, NeuN, INI1, LIN 28A GFAP +/-	Olig2, HH3K27M, IDH1, MIC2
	Médulloblastome	Synaptophysine, NeuN, INI1, GFAP +/-	Olig2, HH3K27M, LIN 28A, IDH1, MIC2
Tumeurs gliales	Gliomes diffus de haut-grades de type pédiatriques (Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27-altéré, Gliome diffus hémisphérique, H3 G34-muté, Gliome diffus de type pédiatrique de haut grade, H3-wildtype et IDH-wildtype, Gliome hémisphérique de l'enfant)	GFAP, Olig2, HH3K27M (Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27-altéré), INI1	Synaptophysine, NeuN, LIN 28A, IDH1, MIC2
	Ependymome supratentorial	GFAP, Olig2 +/-, INI1	Synaptophysine, NeuN, LIN 28A, IDH1, HH3K27M, MIC2
Tumeurs mésenchymateuses non méningothéliales	Sarcome d'Ewing	INI1, MIC2	GFAP, Synaptophysine, NeuN, Olig2, HH3K27M, IDH1, LIN 28A

IHC : immunohistochimie

CONCLUSION

Actuellement, le diagnostic basé sur le profil moléculaire des tumeurs du SNC, particulièrement le profil de méthylation d'ADN tumoral, permet de classer ou d'affiner le diagnostic de tumeurs pédiatriques auparavant inclassées ou mal classées. Cette technique moléculaire est centrale dans le diagnostic en neuropathologie pédiatrique et doit être intégrée aux techniques moléculaires déjà validées en routine clinique dans le but de préciser la prise en charge clinique du patient.

Conflits d'intérêt : néant.

Remerciements :

Nous remercions les différents intervenants du laboratoire d'Anatomie pathologique et de l'Hôpital Erasme qui ont participé à la prise en charge de la patiente de manière adéquate ce qui a permis d'aboutir au diagnostic. Le Service d'Anatomie pathologique de l'Hôpital Erasme est soutenu par les Fonds Yvonne Boël.

Consentement : Le protocole d'observation a été validé par les commissions institutionnelles d'éthique et d'examen de la recherche de l'Hôpital Erasme. Les patients ont signé un formulaire de consentements éclairés lors de l'admission à l'hôpital. Les patients ont choisi à l'admission d'accepter ou de refuser de donner leur consentement. Le consentement a été établi par le comité d'éthique local (comité d'éthique Erasme-ULB) et est conforme au droit belge et international (déclaration d'Helsinki).

BIBLIOGRAPHIE

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK *et al.* The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
2. Holsten T, Lubieniecki F, Spohn M, Mynarek M, Bison B, Löbel U *et al.* Detailed Clinical and Histopathological Description of 8 Cases of Molecularly Defined CNS Neuroblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2021;80(1):52-59.
3. Korshunov A, Ryzhova M, Jones DTW, Northcott PA, van Sluis P, Volckmann R *et al.* LIN28A immunoreactivity is a potent diagnostic marker of embryonal tumor with multilayered rosettes (ETMR). *Acta Neuropathol.* 2012;124(6):875-81.
4. Nesvick CL, Lafay-Cousin L, Raghunathan A, Bouffet E, Huang AA, Daniels DJ. Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor: Molecular Insights and Translation to Novel Therapeutics. *J Neurooncol.* 2020;150(1):47-56.
5. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M *et al.* Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol.* 2018;136(2):181-210.
6. Sturm D, Orr BA, Toprak UH, Hovestadt V, Jones DTW, Capper D *et al.* New Brain Tumor Entities Emerge from Molecular Classification of CNS-PNETs. *Cell.* 2016;164(5):1060-72.
7. Korshunov A, Okonechnikov K, Schmitt-Hoffner F, Ryzhova M, Sahm F, Stichel D *et al.* Molecular analysis of pediatric CNS-PNET revealed nosologic heterogeneity and potent diagnostic markers for CNS neuroblastoma with *FOXR2*-activation. *Acta Neuropathol Commun.* 2021;9(1):20.
8. Schmitt-Hoffner F, van Rijn S, Toprak UH, Mauermann M, Rosemann F, Heit-Mondrzyk A *et al.* *FOXR2* Stabilizes MYCN Protein and Identifies Non-MYCN-Amplified Neuroblastoma Patients With Unfavorable Outcome. *J Clin Oncol.* 2021;39(29):3217-28.
9. Łastowska M, Trubicka J, Sobocińska A, Wojtas B, Niemira M, Szałkowska A *et al.* Molecular identification of CNS NB-*FOXR2*, CNS EFT-CIC, CNS HGNET-MN1 and CNS HGNET-BCOR pediatric brain tumors using tumor-specific signature genes. *Acta Neuropathol Commun.* 2020;8(1):105.
10. Louis D, Perry A, Wesseling P, Brat D, Cree I, Figarella-Branger, D *et al.* The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 2021;23(8):1231-51.

Travail reçu le 29 juin 2022 ; accepté dans sa version définitive le 17 janvier 2023.

AUTEUR CORRESPONDANT :

L. LEBRUN
H.U.B - Hôpital Erasme
Département d'Anatomie pathologique
Route de Lennik, 808 - 1070 Bruxelles
E-mail : Laetitia.LebRUN@hubruxelles.be