



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2024

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**ETUDE DU PROFIL DE METHYLATION DE L'ADN DANS LES
TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL,
RETOUR SUR 30 MOIS D'EXPERIENCE AU CHU DE LILLE.**

Présentée et soutenue publiquement le 24 Octobre 2024 à 18h
au Pôle Formation
par **Michaël OUANOUNOU**

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

Assesseurs :

Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER

Madame le Docteur Marie CSANYI-BASTIEN

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE

Madame le Docteur Apolline MONFILLIETTE-DJELAD

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique

ATRT : atypical teratoid/rhabdoid tumor

CGH array : array Comparative genomic Hybridization

ddNTP : didésoxyribonucléotide

DNET : dysembryoplastic neuroepithelial tumor

ETMR : embryonal tumor with multilayered rosettes

FISH : fluorescence in situ hybridization

Idat : intensity data

IHC : immunohistochimie

IRM : imagerie par résonance magnétique

NF1 / 2 : neurofibromatose de type 1 ou 2

NGS : next-generation sequencing

NTRK : neurotrophic tyrosine receptor kinase

OCA : oncomine comprehensive array

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PLNTY : polymorphous low grade neuroepithelial tumor of the young

RGNT : rosette-forming glioneuronal tumor

RGPD : Règlement général sur la protection des données

SNC : système nerveux central

SNP : single nucleotide polymorphism

t-SNE : t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding

UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection

WGA : Whole Genome Amplification

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Épidémiologie.....	1
1.2	Classification histomoléculaire des tumeurs du SNC	2
1.3	La méthylation de l'ADN	8
1.4	Place du méthylome dans la classification des tumeurs du SNC	12
1.4.1	La méthode Illumina	13
1.4.2	Exploitation informatique des fichiers .idat	16
1.5	Exploitation des données de méthylation	17
1.5.1	Random forest.....	17
1.5.2	UMAP et t-SNE	18
1.6	Les autres techniques permettant d'explorer la méthylation	19
1.6.1	Le nanopore.....	19
1.6.2	Le pyroséquençage.....	20
1.6.3	L'immunohistochimie H3K27M et H3G34.....	21
1.7	Autres techniques moléculaires en usage en neuro-oncologie.....	22
1.7.1	Snapshot PCR.....	22
1.7.2	PCR digitale « ddPCR » (droplet digital PCR)	22
1.8	Problématique	24
2	Patients, matériels et méthodes	25
2.1	Patients.....	25
2.2	Caractéristiques de la cohorte.....	26
2.3	Déclaration de l'étude	26
2.4	Procédures et protocoles techniques	27
2.4.1	Analyse du méthylome selon la technologie Infinium	27
2.4.2	NGS	39
2.4.3	CGH	40
2.4.4	Archer	40
2.4.5	OCA	40
3	Résultats	41
3.1	Gliomes diffus de l'adulte	41
3.2	Gliomes diffus de sous-type pédiatrique de bas grade et de haut grade	45
3.3	Gliomes circonscrits astrocytaires.....	47
3.4	Tumeurs glioneuronales et neuronales.....	50
3.5	Tumeurs neuroépithéliales de bas grade.....	55

3.6	Tumeurs épendymaires	59
3.7	Tumeurs des plexus choroïdes	60
3.8	Tumeurs embryonnaires : les médulloblastomes	60
3.9	Tumeurs embryonnaires : « autres tumeurs embryonnaires du SNC ».....	60
3.10	Tumeurs pinéales	61
3.11	Tumeurs des nerfs crâniens et paravertébraux	62
3.12	Méningiomes	63
3.13	Tumeurs mésenchymateuses non méningothéliales du SNC.....	64
3.14	Tumeurs mélanocytaires	65
3.15	Tumeurs de la région sellaire.....	66
3.16	Métastases du SNC	66
3.17	Autres	68
4.	A propos d'un patient	70
4.1	Histoire clinique.....	70
4.2	Une nouvelle entité : glioneuronal tumour with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA).	84
4.3	La fusion <i>SPECCL1::NTRK2</i>	85
5.	Discussion	88
	Bibliographie	100
	ANNEXE 1	109

RESUME

Contexte :

Le diagnostic des tumeurs du système nerveux central est en constante évolution et l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis une meilleure compréhension des processus de cancérogénèse et ainsi des mises à jour régulières de la classification de ces tumeurs.

Depuis 2018, le Département de Neuropathologie d'Heidelberg en Allemagne a établi un « classifieur » basé sur l'analyse de modifications épigénétiques en l'occurrence la méthylation des cytosines grâce à la technologie *Illumina*.

Méthode :

Tout patient pour lequel a été réalisé un méthylome dans le cadre du diagnostic de sa tumeur entre le 1^{er} décembre 2020 et le 15 juin 2023 a été inclus rétrospectivement. La série a été bornée arbitrairement à 245 patients. Les patients ont été recensés à partir des archives du laboratoire d'oncologie moléculaire regroupant tous les méthylomes réalisés. Tout patient ayant eu un méthylome était inclus, sans critère d'exclusion.

Résultats :

Nous mettons en avant l'importance du méthylome dans le diagnostic intégré des tumeurs du SNC, notamment les gliomes diffus de l'adulte, les tumeurs gliales astrocytaires circonscrites et les tumeurs glioneuronales. Par ailleurs, nous soulignons l'utilité spécifique du méthylome pour certaines tumeurs, telles que les gliomes diffus de haut grade de sous-type pédiatrique, les tumeurs embryonnaires, épendymaires et mélanocytaires, qui sont classées selon leurs voies moléculaires, conformément aux recommandations de l'OMS. Le méthylome met en exergue des cas exceptionnels auparavant méconnus. Nous rapportons en exemple un cas de *Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA)*.

Conclusions :

Le méthylome est une technique innovante développée par les biologistes moléculaires au profit des patients et de tous les acteurs impliqués dans leur prise en charge (notamment neurochirurgien, pathologiste, neuro-oncologue), qui joue un rôle clé dans le diagnostic intégré des tumeurs du SNC. En offrant une meilleure

compréhension et une caractérisation plus précise des tumeurs, il contribue au traitement optimal et personnalisé pour chaque patient.

1 Introduction

1.1 Épidémiologie

Parmi les 382 000 cas de cancers nouvellement diagnostiqués en 2018, 5886 affectaient le système nerveux central (SNC) (3280 chez l'homme et 2606 chez la femme), soit 1,5% des nouveaux cancers. Le nombre de décès était estimé à 4128 (2346 hommes, 1782 femmes) soit 2,6% de l'ensemble des décès par cancer (1) (2).

Les premières estimations pour l'année 2023 font état de 433 136 nouveaux cancers, dont 5910 affectant le SNC (3).

L'incidence des tumeurs invasives du système nerveux central, qui était en légère augmentation, se stabilise depuis 2010 chez l'homme et chez la femme mais reste plus élevée chez l'homme.

Les tumeurs primitives du SNC font partis des cancers dont le pronostic de survie à 5 ans est sombre comparativement aux cancers affectant d'autres organes. La survie nette standardisée à 5 ans de patient atteint de ce type de cancer était de 26% entre 2010 et 2015 toutefois en amélioration de 4% par rapport à ce qu'elle était entre 1990 et 2015. Toutefois, le pronostic est très différent selon l'âge, avec une survie nette standardisée à 5 ans variant de 60% chez les personnes âgées de 30 ans au diagnostic à 4% chez les personnes de 80 ans (4).

En moyenne sur la période 2014-2020 un diagnostic de cancer a été porté chez 2260 enfants (0-17 ans) par an, soit 0,6% des tumeurs, tous âges confondus. 25% des tumeurs de l'enfant sont des tumeurs primitives du SNC, soit 565 cas par an, les leucémies 26%, les lymphomes 18% (5).

Plusieurs facteurs liés entre eux ont un impact sur la survie : le type histologique, le site anatomique, l'âge et l'état général au moment du diagnostic (6).

1.2 Classification histomoléculaire des tumeurs du SNC

La 5^{ème} édition de la classification des tumeurs cérébrales a été publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé en 2021, se substituant à celle de 2016.

Les avancées rapides en biologie moléculaire ont permis l'identification d'anomalies génétiques clés impliquées dans la cancérogenèse des tumeurs du SNC.

Des mises à jour régulières prenant en comptes ces progrès moléculaires sont publiées au fil de l'eau par le *Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy* (« cIMPACT-NOW ») (7).

La classification des tumeurs du SNC publiée par l'OMS en 2021 regroupe 12 grandes catégories (8):

- 1) gliomes, tumeurs glioneuronales, tumeurs neuronales,
- 2) tumeurs des plexus choroïdes,
- 3) tumeurs embryonnaires,
- 4) tumeurs pinéales,
- 5) tumeurs des nerfs crâniens et de la moelle spinale,
- 6) méningiomes,
- 7) tumeurs mésenchymateuses, non méningothéliales affectant le SNC,
- 8) tumeurs mélanocytaires,
- 9) leucémies et lymphomes primitifs du SNC,
- 10) tumeurs germinales,

11) tumeurs de la région sellaire,

12) métastases du SNC.

Certaines catégories sont divisées en sous-catégories.

Par exemple, la première catégorie, « gliomes, tumeurs glioneuronales, tumeurs neuronales » est divisée en 6 sous-catégories : les gliomes diffus de l'adulte, les gliomes diffus de type pédiatrique de bas grade, les gliomes diffus de type pédiatrique de haut grade, les gliomes circonscrits astrocytiques, les tumeurs glioneuronales et neuronales, et les tumeurs épendymaires.

Chacune sous-catégorie comprend des entités diagnostiques (Figure 1).

Gliomas, glioneuronal tumours, and neuronal tumours

Adult-type diffuse gliomas

Astrocytoma, IDH-mutant
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted
Glioblastoma, IDH-wildtype

Paediatric-type diffuse low-grade gliomas

Diffuse astrocytoma, MYB- or MYBL1-altered
Angiocentric glioma
Polymorphous low-grade neuroepithelial tumour of the young
Diffuse low-grade glioma, MAPK pathway-altered

Paediatric-type diffuse high-grade gliomas

Diffuse midline glioma, H3 K27-altered
Diffuse hemispheric glioma, H3 G34-mutant
Diffuse paediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype
Infant-type hemispheric glioma

Circumscribed astrocytic gliomas

Pilocytic astrocytoma
High-grade astrocytoma with piloid features
Pleomorphic xanthoastrocytoma
Subependymal giant cell astrocytoma
Chordoid glioma
Astroblastoma, MN1-altered

Glioneuronal and neuronal tumours

Ganglioglioma
Gangliocytoma
Desmoplastic infantile ganglioglioma / desmoplastic infantile astrocytoma
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour
Diffuse glioneuronal tumour with oligodendroglioma-like features and nuclear clusters
Papillary glioneuronal tumour
Rosette-forming glioneuronal tumour
Myxoid glioneuronal tumour
Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour
Multinodular and vacuolating neuronal tumour
Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)
Central neurocytoma
Extraventricular neurocytoma
Cerebellar liponeurocytoma

Ependymal tumours

Ependymal tumours: Introduction
Supratentorial ependymoma
Supratentorial ependymoma, ZFTA fusion-positive
Supratentorial ependymoma, YAP1 fusion-positive
Posterior fossa ependymoma
Posterior fossa group A (PFA) ependymoma
Posterior fossa group B (PFB) ependymoma
Spinal ependymoma
Spinal ependymoma, MYCN-amplified
Myxopapillary ependymoma
Subependymoma

Figure 1 : catégorie des gliomes, tumeurs glioneuronales et neuronales (vert). En jaune, les sous-catégories. En bleu, les entités diagnostiques appartenant à ces sous-catégories.

Parmi les 12 grandes catégories de tumeurs, certaines comptent moins de sous-catégories, voire pas de sous-sous-catégories (entités diagnostiques distinctes).

C'est le cas des catégories des tumeurs des plexus choroïdes, des tumeurs pinéales, des tumeurs des gaines nerveuses, des méningiomes, des tumeurs germinales, des tumeurs de la région sellaire, des métastases du SNC (Figure 2).

Pineal tumours

Pineal tumours: Introduction
Pineocytoma
Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation
Pineoblastoma
Papillary tumour of the pineal region
Desmoplastic myxoid tumour of the pineal region, SMARCB1-mutant

Cranial and paraspinal nerve tumours

Cranial and paraspinal nerve tumours: Introduction
Schwannoma
Neurofibroma
Perineurioma
Hybrid nerve sheath tumours
Malignant melanotic nerve sheath tumour
Malignant peripheral nerve sheath tumour
Cauda equina neuroendocrine tumour (previously paraganglioma)

Meningioma

Meningioma

Figure 2 : catégories (en vert) des tumeurs pinéales, des gaines nerveuses et méningiomes, ainsi que les entités diagnostiques correspondantes (en bleu).

Dans la version 2021 de la classification, la catégorisation repose de plus en plus sur la présence d'altérations moléculaires : par exemple celle des tumeurs embryonnaires, notamment les médulloblastomes (Figure 3).

Embryonal tumours

Medulloblastoma

Medulloblastoma: Introduction

Medulloblastomas, molecularly defined

Medulloblastoma, WNT-activated

Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype

Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant

Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH

Medulloblastomas, histologically defined

Medulloblastoma, histologically defined

Other CNS embryonal tumours

Other CNS embryonal tumours: Introduction

Atypical teratoid/rhabdoid tumour

Cribiform neuroepithelial tumour

Embryonal tumour with multilayered rosettes

CNS neuroblastoma, FOXR2-activated

CNS tumour with BCOR internal tandem duplication

CNS embryonal tumour NEC/NOS

Figure 3 : catégorie des tumeurs embryonnaires (vert), sous catégories (jaune). Distinction entre les médulloblastomes définis par des altérations moléculaires et/ou des caractères histologiques (encadré rouge).

La figure 4 illustre le changement de paradigme dans la catégorisation de la classification OMS 2021.

OMS 2016

Tumeurs astocytaires et oligodendrogiales diffuses
Astrocytome diffus, IDH-muté
Astrocytome diffus, IDH-non-muté
Astrocytome diffus, NOS
Astrocytome anaplasique, IDH-muté
Astrocytome anaplasique, IDH-non-muté
Astrocytome anaplasique, NOS
Glioblastome, IDH-non-muté
Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27M-muté
Oligodendrogliome, IDH-muté et 1p/19q-codéleté
Oligodendrogliome, NOS
Oligodendrogliome anaplasique, IDH-muté et 1p/19q-codéleté
Oligodendrogliome anaplasique, NOS
Oligoastrocytome, NOS
Oligoastrocytome anaplasique, NOS
Autres tumeurs astocytaires
Astrocytome pilocytique
Astrocytome pilomyxoïde
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire
Xantho-astrocytome pléomorphe
Xantho-astrocytome pléomorphe anaplasique
Autres gliomes
Gliome choroïde du 3 ^{ème} ventricule
Gliome angiocentrique
Astroblastome
Tumeurs neuronales et glioneuronales
Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique
Gangliocytome
Gangliogliome
Gangliogliome anaplasique
Gangliocytome dysplasique du cervelet (Maladie de Lhermitte-Duclos)
Tumeur glioneuronale papillaire
Tumeur glioneuronale à rosettes (RGNT)
Tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT)
Neurocytome central
Neurocytome extra-ventriculaire
Liponeurocytome du cervelet
Paragangliome
Tumeurs épendymaires
Subépendymome
Ependymome myxopapillaire
Ependymome
Ependymome papillaire
Ependymome à cellules claires
Ependymome tanycytique
Ependymome avec fusion RELA
Ependymome anaplasique
Tumeurs des plexus choroïdes
Papillome des plexus choroïdes
Papillome atypique des plexus choroïdes
Carcinome des plexus choroïdes
Tumeurs embryonnaires
Médulloblastome, WNT-activé
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-non-muté
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-muté
Médulloblastome, non-WNT/non-SHH
Médulloblastome, groupe 3
Médulloblastome, groupe 4
Médulloblastome, classique
Médulloblastome, desmoplasique/nodulaire
Médulloblastome avec nodularité extensive
Médulloblastome, anaplasique / à cellules géantes
Médulloblastome, NOS
Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées C19MC-altered
Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées NOS
Médulloépithéliome
Neuroblastome du SNC
Ganglioneuroblastome du SNC
Tumeur embryonnaire du SNC, NOS
Tumeur rhabdoïde tétotoïde atypique (ATRT)
Tumeur embryonnaire du SNC avec aspects rhabdoïdes
Tumeurs de la région pinéale
Pinéocytome
Tumeur du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire
Pinéoblastome
Tumeur papillaire de la région pinéale

OMS 2021

Gliomes, tumeurs glioneuronales et neuronales
• Gliomes diffus de l'adulte
Astrocytome, IDH-muté
Oligodendrogliome, IDH-muté et 1p/19q-codéleté
Glioblastome, IDH-non-muté
• Gliomes diffus pédiatriques de bas grade
Astrocytome diffus, avec altération de MYB ou MYBL1
Gliome angiocentrique
Tumeur neuro-épithéliale polymorphe de bas grade du sujet jeune (PLNTY)
Gliome diffus de bas grade avec altération de la voie des MAP Kinases
• Gliomes diffus pédiatriques de haut grade
Gliome diffus de la ligne médiane, H3 K27-altéré
Gliome diffus hémisphérique, H3 G34-muté
Gliome diffus pédiatrique de haut grade H3- et IDH-non-muté
Gliome hémisphérique infantile
• Gliomes astrocytaires circonscrits
Astrocytome pilocytique
Astrocytome anaplasique avec aspects piloïdes
Xantho-astrocytome pléomorphe
Astrocytome à cellules géantes sous-épendymaire
Gliome choroïde
Astroblastome, avec altération de MN1
• Tumeurs glioneuronales et neuronales
Gangliogliome
Gangliocytome
Gangliogliome desmoplasique infantile/astrocytome desmoplasique infantile (DIG/DIA)
Tumeur neuro-épithéliale dysembryoplasique
Tumeur glioneuronale avec des aspects oligo-like et des clusters de noyaux (DGONC)
Tumeur glioneuronale papillaire
Tumeur glioneuronale à rosettes (RGNT)
Tumeur glioneuronale myxoïde
Tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT)
Tumeur neuronale multinodulaire et vacuolisée (MVNT)
Gangliocytome dysplasique du cervelet (Maladie de Lhermitte-Duclos)
Neurocytome central
Neurocytome extra-ventriculaire
Liponeurocytome du cervelet
• Tumeurs épendymaires
Ependymome supra-tentorial
Ependymoma supra-tentorial, avec fusion ZFTA
Ependymoma supra-tentorial, avec fusion YAP1
Ependymome de la fosse postérieure
Ependymome de la fosse postérieure groupe A (PFA)
Ependymome de la fosse postérieure groupe B (PFB)
Ependymome spinal
Ependymoma spinal avec amplification de MYCN
Ependymome myxopapillaire
Subépendymome
Tumeurs des plexus choroïdes
Papillome des plexus choroïdes
Papillome atypique des plexus choroïdes
Carcinome des plexus choroïdes
Tumeurs embryonnaires
• Médulloblastomes
Médulloblastome, WNT-activé
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-non-muté
Médulloblastome, SHH-activé et TP53-muté
Médulloblastome, non-WNT/non-SHH
Médulloblastome défini histologiquement
• Autres tumeurs embryonnaires du SNC
Tumeur rhabdoïde tétotoïde atypique (ATRT)
Tumeur neuro-épithéliale cribiforme (CRINET)
Tumeur embryonnaire avec rosettes multistratifiées (ETMR)
Neuroblastome du SNC FOXR2-activé
Tumeur embryonnaire du SNC avec BCOR ITD
Tumeur embryonnaire du SNC
Tumeurs du parenchyme pinéal
Pinéocytome
Tumeur du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire
Pinéoblastome
Tumeur papillaire de la région pinéale
Tumeur myxoïde desmoplasique de la région pinéale SMARCB1-muté

Figure 4 : tableau comparatif des classifications OMS 2016 et 2021. Les diagnostics conservés sont en noir, ceux supprimés en gris et en rouge sont les nouveaux items (9).

1.3 La méthylation de l'ADN

Le méthylome correspond à l'ensemble des données recueillies lors de l'étude du profil de méthylation de l'ADN d'un échantillon, par exemple de tumeur primitive du SNC. La méthylation est une modification épigénétique, elle correspond à l'ajout d'un groupe méthyle par une enzyme, l'ADN méthyltransférase, sur le carbone en position 5 de la cytosine. Cette réaction chimique est réversible et ne s'accompagne pas de modification de la séquence d'ADN.

Il existe environ 30 millions de motifs CpG dans le génome humain, 60 à 80% sont méthylées par défaut. Une minorité de cytosine sont impliquées dans des sites CpG. Les sites méthylés ne représentent que 3% de toutes les cytosines (Figure 5 et 6).

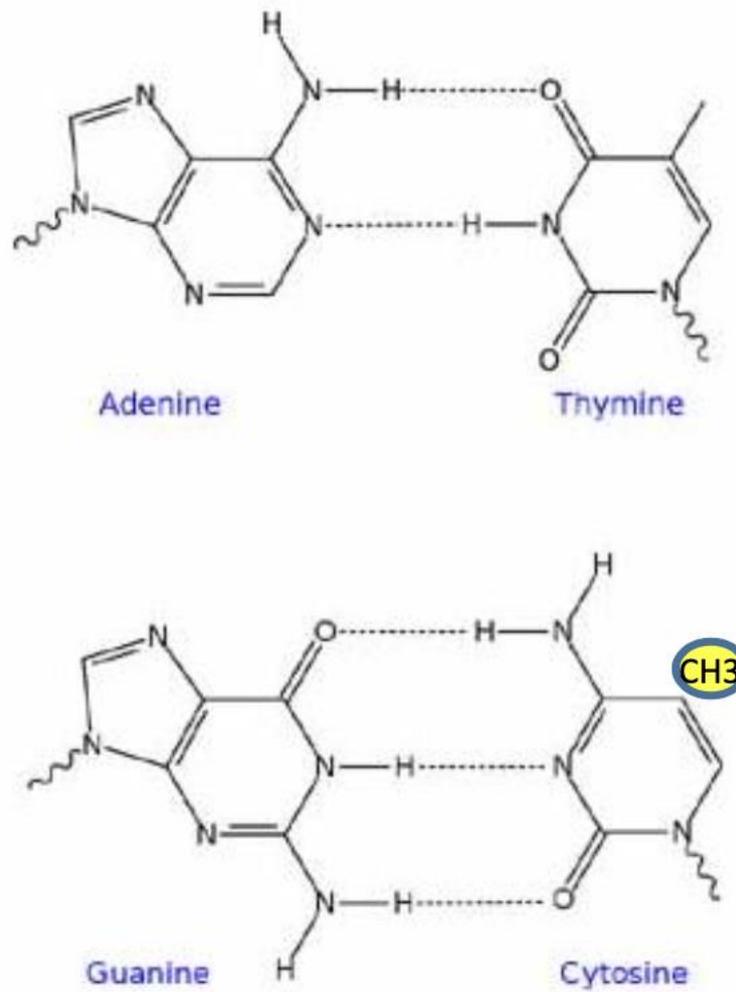


Figure 5 : couples AT et GC. Le CH₃ coloré en jaune correspond au seul site de méthylation possible des 4 bases constitutives de l'ADN (10).

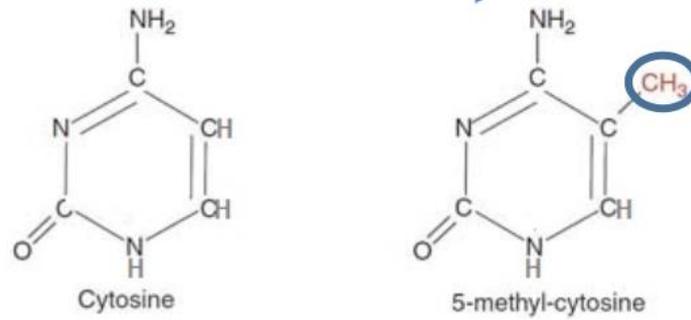


Figure 6 : méthylation de la cytosine en position 5, par le biais d'une enzyme de type méthylase. La réaction inverse se produisant par une déméthylase (10).

Les cytosines méthylées se trouvent quasi systématiquement dans le dinucléotide CpG (5'-Cytosine-phosphate-Guanine-3'). Ce dinucléotide correspond à une succession d'une cytosine et d'une guanine sur le même brin d'ADN (à différencier de la paire de base C-G entre deux brins d'ADN différents). Lorsque ce dinucléotide CpG est représenté plus fréquemment et se répète sur un même brin d'ADN, on parle d'« îlots CpG » (11).

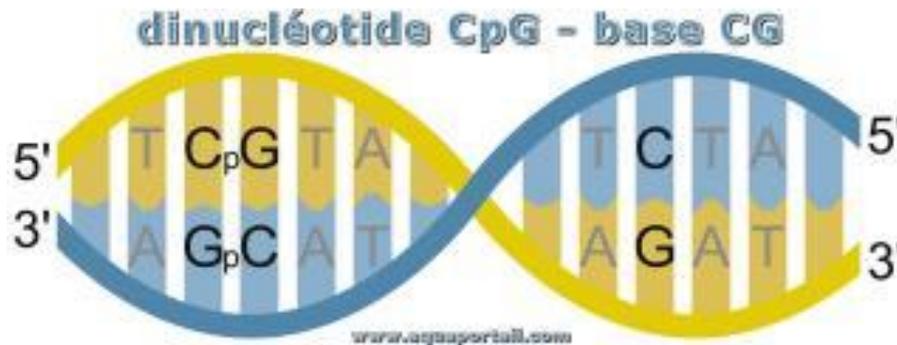


Figure 7 : double hélice d'ADN montrant la différence entre un dinucléotide CpG (partie gauche de la figure) et un appariement C-G (partie droite de la figure) (12).

Les îlots CpG sont l'un des outils régulant l'expression des gènes. Ils sont beaucoup plus fréquemment représentés dans les promoteurs des gènes.

En règle générale, l'hyperméthylation des îlots CpG entraîne la compaction de l'ADN le rendant moins accessibles voir inaccessible aux facteurs de transcriptions.

A contrario, l'hypométhylation des îlots CpG entraîne le relâchement des brins d'ADN, le rendant accessible aux facteurs de transcription. Les promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs sont généralement hyperméthylés. A l'inverse, les promoteurs des gènes pro oncogènes sont généralement hypométhylés.

Dans les zones intergéniques, les îlots CpG sont hypométhylés dans les cellules cancéreuses, favorisant les réarrangement et pertes chromosomiques contribuant à l'instabilité chromosomique globale. Le niveau de méthylation globale de l'ADN d'une cellule non tumorale est en général inférieur à celui de l'ADN d'une cellule cancéreuse du même phénotype.

L'hyperméthylation des gènes de cellules non cancéreuses confère une relative stabilité aux chromosomes (13) (14) (15).

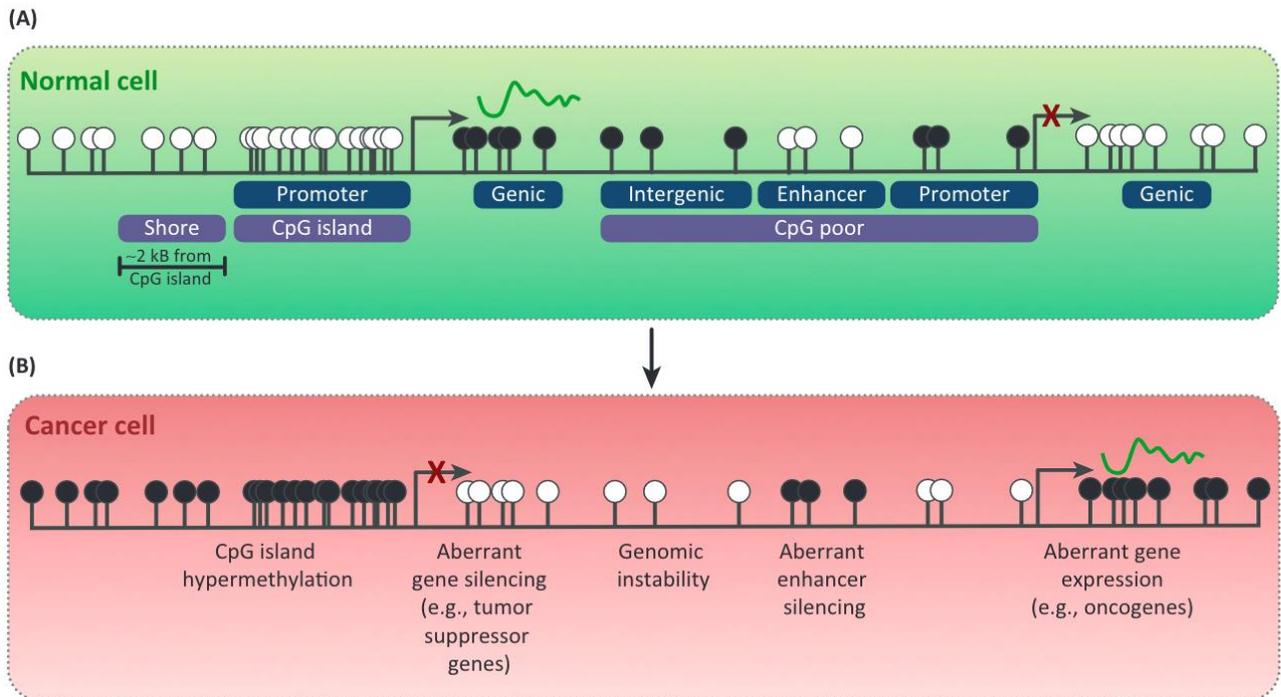


Figure 8 : représentation schématique du profil de méthylation d'une cellule normale et d'une cellule cancéreuse. L'hyperméthylation des îlots CpG est représentée en noir. L'hypométhylation des îlots CpG en blanc (16).

1.4 Place du méthylome dans la classification des tumeurs du SNC

Dans le cas concret de l'étude des tumeurs du SNC, tous les îlots CpG de l'ADN d'une cellule tumorale ne sont pas explorés, mais seulement une sélection de sites CpG considérés comme discriminants.

Cette application a été développée en particulier par l'université d'Heilderberg (dkfz/ Deutsches Krebsforschungszentrum, KiTZ / Hopp-KinderTumorZentrum) et le SickKids (centre hospitalier de Toronto) pour le diagnostic des tumeurs cérébrales (17).

Seule une partie de la carte des sites de méthylation des îlots CpG de l'ADN d'une tumeur est explorée, afin de la comparer avec celle d'autres tumeurs déjà explorées

et dont les données de méthylation sont colligées dans une base internationale accessible en ligne.

En fonction d'outils biostatistiques disponibles à un moment donné, les données de méthylation communes permettent de la regrouper avec un groupe de tumeur parfaitement caractérisé (« cluster »).

1.4.1 La méthode Illumina

La technique Illumina est largement utilisée. Elle est basée sur le séquençage de fragments marqués par des bases fluorescentes. La puce de séquençage utilisée au CHU de Lille est la « Infinium Methylation EPIC BeadChip ». La version de cette puce utilisée dans notre étude couvre près de 850 000 îlots CpG et utilisent la technologie des « puces à bille », dit « BeadChip ».

Un grand nombre (des milliers) de billes fluorescentes qui portent des sondes d'ADN spécifiques sont fixées sur une lame de verre. Si on ajoute un ADN d'intérêt à la puce, il va s'hybrider à celui des billes qui portent les séquences complémentaires.

Plusieurs étapes sont nécessaires, l'ADN extrait de la tumeur à partir des blocs de tissus inclus en paraffine est incubé en présence de bisulfite de sodium, c'est la conversion bisulfite. Le bisulfite va dé-aminer les cytosines de fragments d'ADN simple brin et convertir ces cytosines en uraciles. Les cytosines méthylées ne subissent pas de modifications.

Les fragments d'ADN simple brin seront ensuite amplifiés puis hybridés aux billes comportant les séquences alléliques complémentaires.

Une partie des billes est complémentaires des sites CpG méthylées, tandis que d'autres sont complémentaires des sites CpG non méthylées.

Les deux types de billes différentes seront différenciés par des fluorochromes. On aura ainsi une couleur pour les sites méthylés, et une autre couleur pour les sites non méthylés.

C'est la quantification de la fluorescence qui permettra de distinguer la méthylation de la cytosine, et donc, la méthylation de l'îlot CpG.

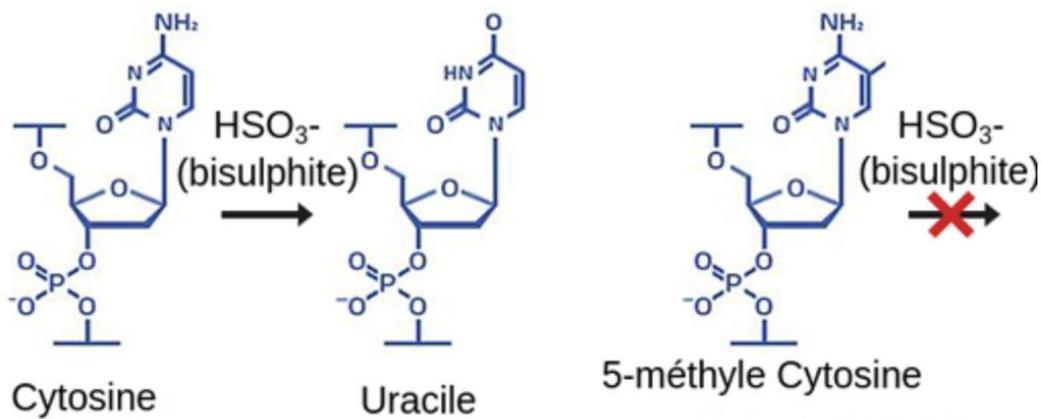


Figure 9 : Conversion d'une cytosine non méthylée par le bisulfite de sodium (partie gauche du schéma) ; la cytosine non méthylée n'est pas convertie (partie droite du schéma) (18).

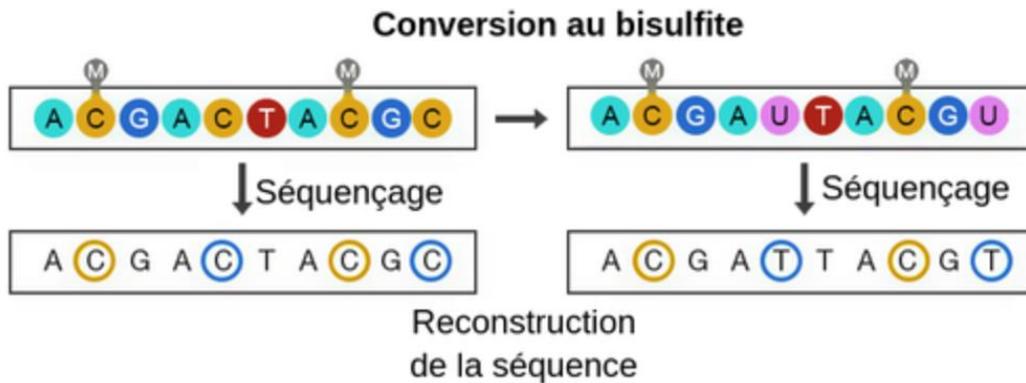


Figure 10 : effet de la conversion bisulfite sur la séquence avant amplification, et effet sur les produits d'amplifications attendus lors du séquençage d'un fragment d'ADN (18).

En haut à gauche, la séquence initiale d'ADN.

En haut à droite, la séquence après traitement bisulfite : les cytosines méthylées sont inchangées. Les cytosines méthylées sont converties en Uracile (disques roses).

Les deux rectangles du bas représentent les deux séquences après amplification.

En bas à gauche, les cytosines méthylées et non méthylées restent telles quelles.

En bas à droite, les cytosines méthylées sont inchangées, les thymines se substituent aux uraciles.

Les puces, qui peuvent accueillir l'ADN de 8 patients, sont analysées sur scanner («iScan » ou scanner couplé au séquenceur Next-Seq 550, Illumina). Les données brutes sont accessibles sous la forme d'un fichier .idat (= intensity DATA). Il contient les données d'intensité des signaux de fluorescence détectés par le séquenceur pour chacune des 850 000 cytosines explorées. Chaque valeur du fichier varie de 0 à 1 et correspond au pourcentage global de méthylation. Les données brutes sont ensuite traitées par un « pipeline bioinformatique ».

1.4.2 Exploitation informatique des fichiers .idat

L'intégration des données anonymisées a visée de recherche dans un diagnostic pose problème d'un point de vue réglementaire, même si l'utilisateur et l'outil sont européens et soumis à la réglementation RGPD (Règlement général sur la protection des données). De même, les données sont envoyées via une connexion internet non dédiée. Les données attendues sont des données épigénétiques, il persiste une ambiguïté sur la possible présence de données identifiantes liées à des populations cellulaires non tumorales séquencées en même temps que les données tumorales. Le mode d'obtention de ces données (séquençage d'ADN) pourrait être identifiant. Le niveau de connaissance actuelle permet par déconvolution de récupérer certaines données identifiantes.

La déconvolution utilise des algorithmes spécifiques pour identifier des sous-populations au sein d'un échantillon tumoral, tel que les lymphocytes, les fibroblastes, ou autres cellules du micro-environnement tumoral, en identifiant des profils de méthylation distincts spécifiques de ces cellules. Il est également possible d'utiliser les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), CNV (Copy Number Variations), les microsatellites et STR (Short Tandem Repeats), l'expression des gènes grâce au RNA-seq. (19) (20).

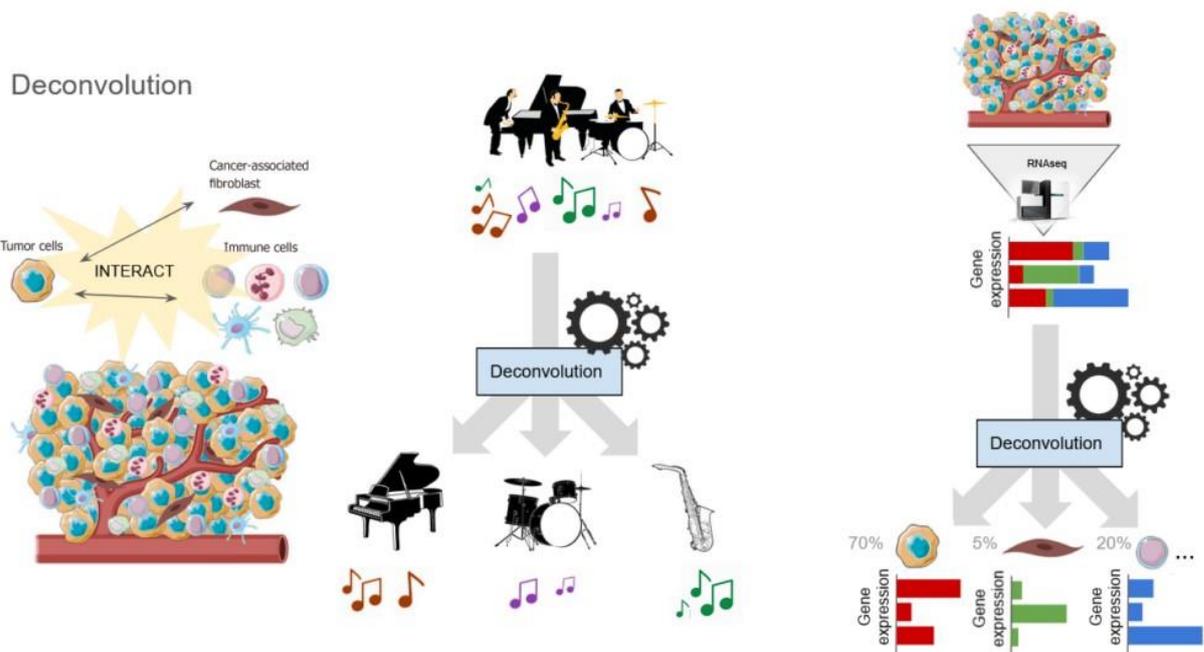


Figure 11 : représentation schématique du principe de déconvolution (21).

A gauche: représentation des interactions entre des cellules tumorales ainsi que les cellules du stroma.

Au milieu: analogie entre une tumeur, consistant en un ensemble de notes de musiques représentant les cellules qui la composent, séparées ensuite selon par notes et instruments.

A droite: différence d'expression des gènes au sein d'une tumeur selon la cellule analysée qui la compose établit grâce à une technique de RNA-seq.

1.5 Exploitation des données de méthylation

1.5.1 Random forest

La forêt aléatoire (ou random forest) est un algorithme utilisé en machine learning. Elle est constituée d'un ensemble d'arbre de décision indépendant. Il en aboutit une séquence, basée sur des facteurs discriminants.

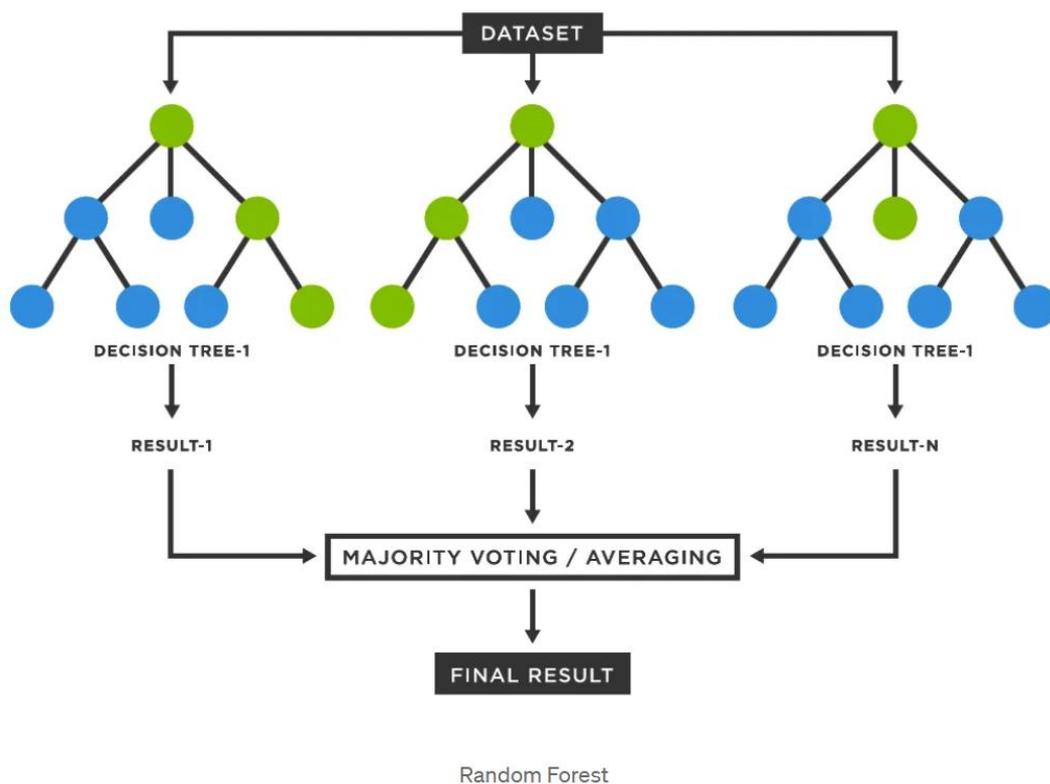


Figure 12 : représentation schématique d'un random forest (22).

Dans l'étude de la méthylation de l'ADN, le dataset (ensemble des données) constitue les idat. La progression dans l'arbre se fait selon la présence ou non de méthylations des 850 000 îlots CpG étudiés. La présence d'altérations communes mène à un groupe de tumeurs (ici « result-1 » « result-2 » « result-N »).

1.5.2 UMAP et t-SNE

L'UMAP (Uniform Manifold Approximation and Projection) et le t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding) sont des algorithmes qui projettent des profils de méthylation en deux dimensions. Chaque profil de méthylation est représenté par un point et chaque classe de méthylation par un ensemble de point correspondant à une entité diagnostique, ayant alors un profil de méthylation équivalent. La valeur

charge ionique des bases de l'ADN, en faisant passer les molécules sur un nanopore biologique inséré sur une membrane diélectrique (membrane n'ayant pas d'électron libre, pouvant transporter un courant électrique et être polarisée par un champ électrique). Ainsi, un courant électrique est appliqué, permettant d'attirer les molécules d'ADN, leur passage à travers le nanopore perturbe ce courant, et ce sont les modifications de valeurs de différence de potentiel qui sont détectées.

D'autres « classifieurs » sont basés sur le nanopore (25) (26).

1.6.2 Le pyroséquençage

Le pyroséquençage est une technique d'amplification de l'ADN ciblant 5 cytosines situés dans le promoteur de la O-6-methylguanine-DNA methyl-transferase (MGMT), au cours de la réaction la libération de pyrophosphates est détectée par une méthode de luminescence (27).

Cette technique est le goldstandard en routine pour établir la méthylation du promoteur du gène de la MGMT. Le traitement des glioblastomes est fondé en parti sur l'utilisation du témozolomide qui est un agent alkylant. La MGMT est une enzyme qui permet d'éliminer les radicaux alkyles formés par la chimiothérapie et de permettre à nouveau la prolifération tumorale. La transcription de cette enzyme est sous la dépendance de son promoteur, qui peut subir des modifications épigénétiques, dont la méthylation. En cas de méthylation de son promoteur, la transcription de la MGMT est empêchée, l'enzyme n'est plus synthétisée, rendant les patients éligibles à un traitement associant radiothérapie et agent alkylant ; en cas d'hypométhylation les thérapeutiques alternatives aux alkylants sont limitées et moins efficaces (28).

1.6.3 L'immunohistochimie H3K27M et H3G34

Dans les gliomes diffus de la ligne médiane, il existe une mutation en position 27 de l'histone H3, où la lysine (K) est remplacée par une méthionine (M), au niveau des gènes *H3F3A* et *HIST1H3B/C*, codant pour des variants de l'histone H3.

Il est possible de rechercher cette altération par technique immunohistochimique, grâce à un anticorps dirigé, permettant de mettre en évidence une perte d'expression nucléaire de H3K27me3 par les cellules tumorales, traduisant la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (29).

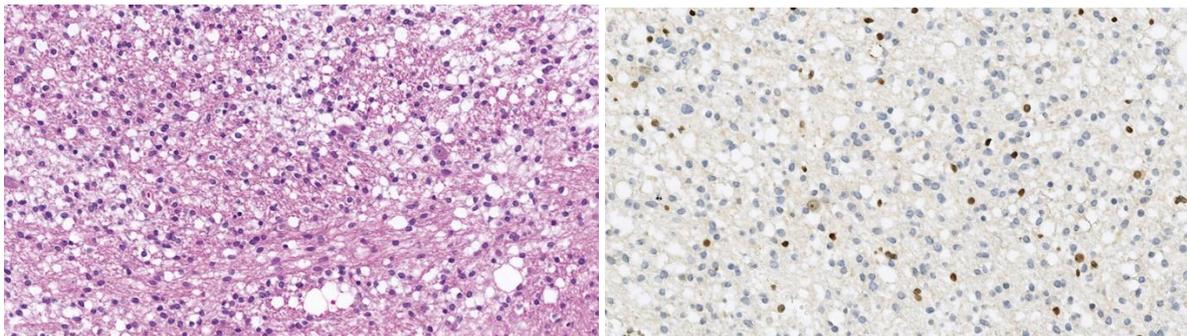


Figure 14 : gliome diffus de la ligne médiane et expression de H3K27me3 (30).

A gauche, cliché HES d'un gliome diffus de la ligne médiane.

A droite, cliché IHC H3K27me3 montrant une perte d'expression dans le noyau des cellules tumorales. Maintien de l'expression nucléaire au niveau de témoin interne représenté par des cellules endothéliales et neurones résiduels.

Il existe par ailleurs des anticorps détectant les variants des histones mutées G34 et K27 qui permettent de compléter le diagnostic (31).

1.7 Autres techniques moléculaires en usage en neuro-oncologie

Actuellement le méthylome ne fournit pas toutes les informations diagnostiques nécessaires à la prise en charge des patients, en neuro-oncologie. Les différentes techniques abordées ci-après sont en usage au CHU de Lille dans ce domaine.

1.7.1 Snapshot PCR

La technologie SNaPshot détecte des mutations ponctuelles. Elle a l'avantage d'être rapide, peu coûteuse et de pouvoir analyser plusieurs sites en une seule réaction. Elle se base sur la polymérisation in vitro de ddNTP (didéoxynucléotide triphosphate) complémentaire d'une matrice. Les produits résultant de la réaction d'extension sont séparés par électrophorèse capillaire, sur un séquenceur automatique d'ADN (32).

Elle est utilisée au laboratoire notamment pour rechercher les mutations du promoteur de *TERT* en position C228T et C250T. La télomérase transcriptase inverse est codée par le gène *TERT*. Elle contribue à l'immortalisation des cellules tumorales en prolongeant leur télomère.

Ainsi, sa présence intervient dans le grading des gliomes *IDH* non-mutés pour le diagnostic de « glioblastome moléculaire, grade IV » (33) ; et dans le classement des méningiomes en méningiomes de grade 3 (34).

1.7.2 PCR digitale « ddPCR » (droplet digital PCR)

La PCR digitale est une technique avancée qui se base sur le fractionnement de l'échantillon tumorale. Chaque fraction est constituée de plusieurs milliers de gouttelettes et subit un cycle de PCR pour être analysée séparément, afin de déterminer la présence ou non de mutation. Elle a pour avantage notamment de détecter des mutations à des fréquences basses (35).

Cette méthode pourrait être appliquée dans la mesure du niveau de méthylation de MGMT (36).

Elle est notamment utilisée au laboratoire en neuro-oncologie pour détecter les altérations du gène *FGFR1* à savoir les mutations N546K, K656E et la duplication en tandem au niveau de l'exon 11-18.

Son application porte dans le diagnostic de gliomes diffus de bas grades (37) et la tumeur glioneuronale formant des rosettes (« Rosette-forming glioneuronal tumour » ou RGNT »).

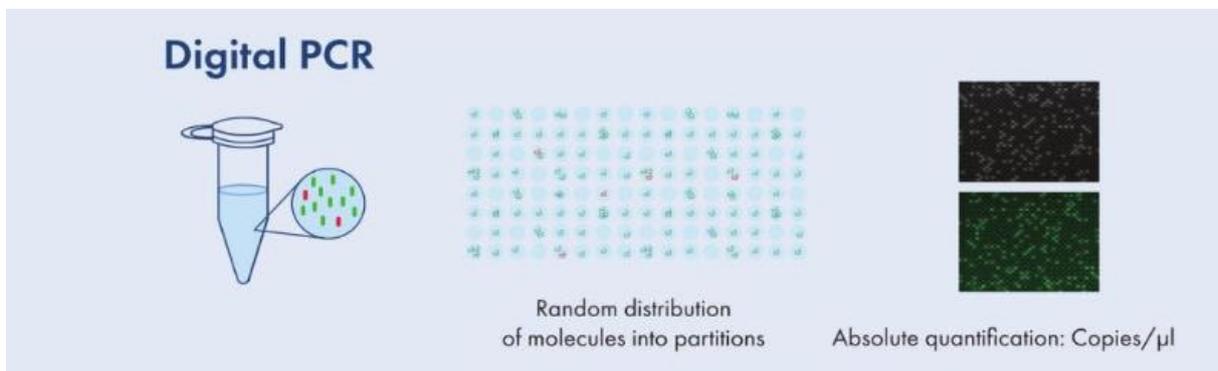


Figure 15 : représentation schématique du fractionnement de l'échantillon de base en de multiples fractions (38).

1.8 Problématique

L'usage du méthylome en neuropathologie est récent (17). Son coût est conséquent en termes d'investissements matériels, de réactifs, de consommables, et du temps d'investissement des équipes.

Nous avons principalement évalué le gain qualitatif de cette technique au terme de 3 ans d'utilisation dans le diagnostic intégré des tumeurs du système nerveux central :

- La concordance est-elle bonne entre le diagnostic de méthylome et le diagnostic sans méthylome (microscopique et moléculaire) ?
- En cas de concordance, y-a-t-il un gain de précision diagnostique imputable au seul méthylome ?
- En cas de discordance, le méthylome a-t-il rectifié le diagnostic ?

Nous souhaitons faire un focus sur un cas peu ou non décrit dans la littérature, détecté dans la série à l'aide du méthylome.

2 Patients, matériels et méthodes

2.1 Patients

Tout patient pour lequel a été réalisé un méthylome dans le cadre du diagnostic de sa tumeur entre le 1^{er} décembre 2020 et le 15 Juin 2023 a été inclus rétrospectivement. La série a été bornée arbitrairement à 245 patients. Les patients ont été recensés à partir des archives du service d'oncologie moléculaire regroupant tous les méthylomes réalisés. Ainsi, tout patient ayant eu un méthylome était inclus, sans critère d'exclusion (d'où l'absence de Flow-chart).

Par la suite, à l'aide du logiciel patient « Sillage » du CHU de Lille, du logiciel d'édition de comptes-rendus anatomo-pathologiques du service « Diamic », du logiciel de résultats de biologie et biologie moléculaire « Molis », plusieurs caractéristiques étaient colligées :

- Le numéro d'examen, le sexe du patient, l'âge au diagnostic, et le « dataset » minimal exigé lorsqu'on pose ce type de diagnostic : les principaux signes cliniques initiaux, la localisation de la tumeur, les principales données IRM, le diagnostic clinico-radiologique,
- le diagnostic microscopique,
- puis au cas par cas, les autres données moléculaires (notamment résultats du NGS (next-generation sequencing), de la CGH, du test Archer, du test OCA).

L'ensemble du recueil des patients est disponible en annexe 1 (excel). Un code couleur arbitraire permet de séparer les grandes catégories de tumeurs. Certaines données (telles que l'imagerie ou la clinique) ont été masquées par soucis de clarté. Les lignes correspondent aux patients. Les colonnes correspondent de gauche à droite à l'âge du patient au diagnostic, son sexe, la localisation de la tumeur, le diagnostic HES et IHC, les données CGH, les données NGS et OCA, les données Archer, la synthèse

pré-méthylome lorsqu'elle était possible, la *methylation class* en v12.8 (en vert un score > 0,9 ; en orange entre 0,6 – 0,89, en rouge < à 0,6) puis le diagnostic final.

2.2 Caractéristiques de la cohorte

L'ensemble de la cohorte regroupe 245 patients. 122 de sexe féminins et 123 de sexe masculins.

173 sont des adultes.

72 sont des enfants.

La moyenne d'âge est de 34 ans (âge minimal : nouveau-né ; axe maximal : 83 ans).

Données	Valeurs
Nombre total de patients	245
Sexe féminin	122
Sexe masculin	123
Adultes (≥ 18 ans)	173
Enfants (<18 ans)	72
Âge moyen	34 ans
Âge minimal	Nouveau-né
Âge maximal	83 ans

Tableau 1 : caractéristiques de la cohorte.

2.3 Déclaration de l'étude

La thèse a été déclarée via le formulaire de déclaration de recherche disponible sur l'intranet du CHU de Lille (déclaration n°132) sur le registre du Data Protection Officer (DPO). Une attestation de déclaration a été fournie.

Le projet s'est rendu conforme à la Méthodologie de référence MR004 de la Commission Nationale de l'Informatique et des libertés (CNIL), concernant le Règlement Général sur la Protection des Données (RGPD).

Une étude d'impact sur la vie privée (EIVP) ou Privacy Impact Assessment (« PIA ») a été remplie (fichier Excel).

Une note d'information destinée aux patients a été rédigée puis envoyée par courrier postal et mail aux patients ou parents de patients.

Une lettre d'intention concernant l'utilisation et l'exploitation des données médicales au CHU de Lille a été transmise.

Ces démarches ont été réalisées avec l'appui des attachés de recherche clinique du Centre de Biologie Pathologie (CBP) du CHU de Lille.

2.4 Procédures et protocoles techniques

Les techniques de biologie moléculaire détaillées ci-dessous sont réalisées au CHU de Lille selon les protocoles établis au sein du laboratoire d'oncologie moléculaire des tumeurs solides.

L'expression des résultats satisfait la nomenclature du *Human Genome Variation Society* (HGVS).

2.4.1 Analyse du méthylome selon la technologie Infinium

L'ensemble du workflow en vue d'une analyse de méthylation sur puce EPIC, tel qu'il est réalisé au CHU de Lille, a été établi par le Dr Laurence STECHLY (ingénieure en biologie), il se répartit sur 6 jours.

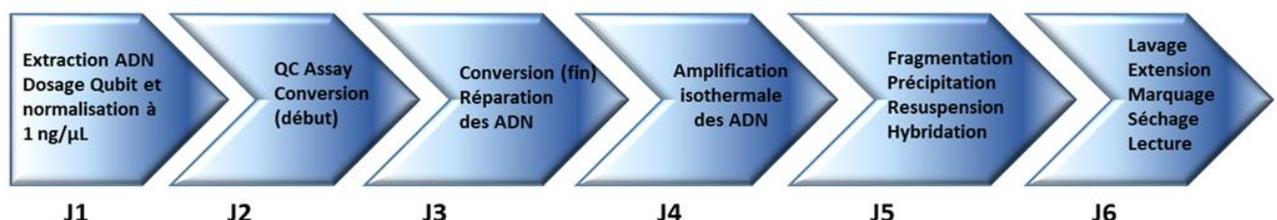


Figure 16 : représentation schématique du workflow.

- **Extraction** de l'ADN à partir de tissus inclus en paraffine (FFPE : Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded) :
- **Dosage** de l'ADN au Qubitflex à l'aide du kit *Qubit™ dsDNA Assay Kit BR* puis normalisation (= permet que chaque échantillon ait une concentration en ADN équivalente) par dilution sur NanoDrop™ .
- **Dénaturation** de l'ADN préalable sur plaque thermofisher souple à 95°C dans un thermocycleur.
- **Conversion et réparation** des ADN (requiert idéalement 1000 ng d'ADN) au bisulfite de sodium. La qualité de la conversion est grandement dépendante du kit de conversion choisi (EZ DNA Methylation Kit™) et, pour les tissus inclus en paraffine, du kit de restauration (Infinium HD FFPE DNA Restore Kit).
- **Amplification isotherme** par PCR selon la méthode Whole Genome Amplification (WGA).
- **Fragmentation** en utilisant la Fragmentation Solution (FMS), aboutissant à des fragments d'ADN de 300 à 600 paires de bases.
- **Précipitation** de l'ADN pour éliminer tous les réactifs utilisés (hexamères, enzyme...) en utilisant le Precipitation solution 1 (PM1) et de l'isopropanol 100%.
- **Resuspension** des culots d'ADN fragmenté dans solution RA1 contenant des ADN synthétiques qui serviront de contrôle internes (validation de la technique de la puce) et de formamide (évite la renaturation des ADN).
- **Hybridation** de l'ADN fragmentés sur support Infinium « beadchip » (puce) : support de silicium perforé de milliards de puits dans lesquels sont logées des

billes. Chaque puit contient une bille et chaque bille est associée à une courte séquence nucléotidique complémentaire de la région d'intérêt.

Puce utilisée : puce EPIC permettant de discriminer 850 000 CpG sur 8 échantillons (8 patients) différents.

Le statut de méthylation de chaque îlot CpG est étudié à l'aide d'une seule bille sur laquelle s'hybridera le brin d'ADN par complémentarité de bases, et s'appuie sur le principe de l'extension à base unique. Selon la base ajoutée et la fluorescence liée à cette dernière, l'îlot considéré sera méthylé ou non méthylé.

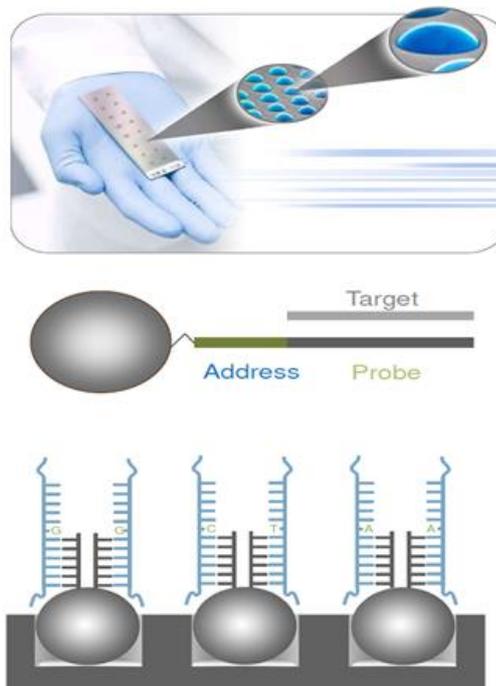


Figure 17 : représentation schématique des billes avec la courte séquence d'ADN.

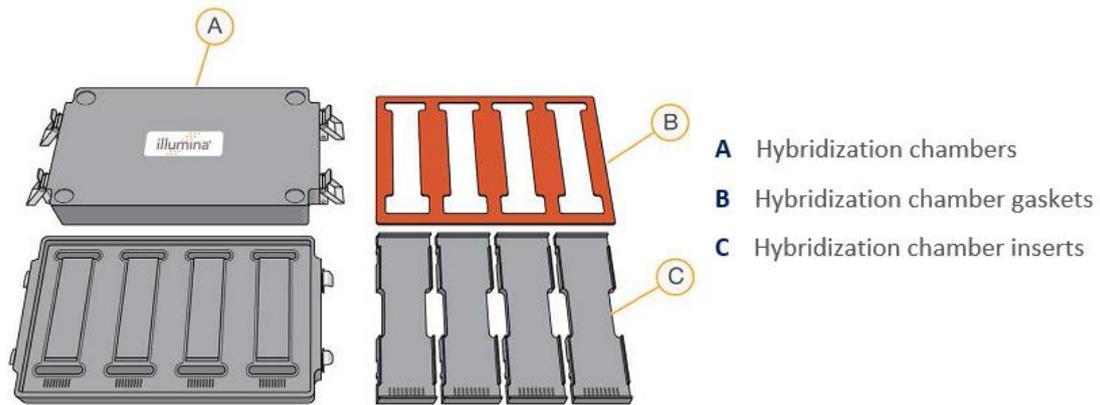


Figure 18 : représentation schématique d'une chambre d'hybridation Illumina.

- **Lavage** de la puce (permet d'éliminer les fragments non hybridés).
- **Montage** de la chambre de marquage.



Figure 19 : illustration schématique du montage de la chambre de marquage avec les puces.

- **Extension et marquage** de la puce.

L'étape d'hybridation des ADN sur les billes de la beadchip est suivie d'une étape d'extension d'une seule base.

L'hybridation s'arrête une base en amont de l'îlot CpG. L'extension consiste à ajouter une base marquée, dont le marquage sera discriminant du statut de méthylation de l'îlot concerné.

En effet, après conversion au bisulfite, les cytosines méthylées demeurent des cytosines, alors que les cytosines non méthylées sont converties en uracile. Lors de la Whole Genome Amplification, il y a production d'un millier de copies de chaque brin initial. Aussi, les cytosines méthylées deviennent des guanines, alors que les uraciles deviennent des thymines.

Lors de l'extension, les complexes ADN-billes sont mis en contact avec les 4 types de base, les adénines et thymines étant marquées au dinitrophénol (DNP) et les cytosines et guanine à la biotine.

La fixation d'une thymine ou d'une adénine sera discriminée à l'aide d'anticorps (IgG) anti-DNP qui fluorescent dans le rouge. Ces anticorps seront reconnus par des anticorps secondaires anti-IgG marqués eux aussi au DNP.

La fixation d'une cytosine ou d'une guanine sera quant à elle discriminée à l'aide de streptavidine marquée qui fluoresce dans le vert. Elle sera reconnue par des anticorps anti-complexe streptavidine-biotine marqués eux-aussi à la biotine.

Les incubations successives de ces différents types de réactifs et anticorps favorisent la détection du signal fluorescent en augmentant son intensité.

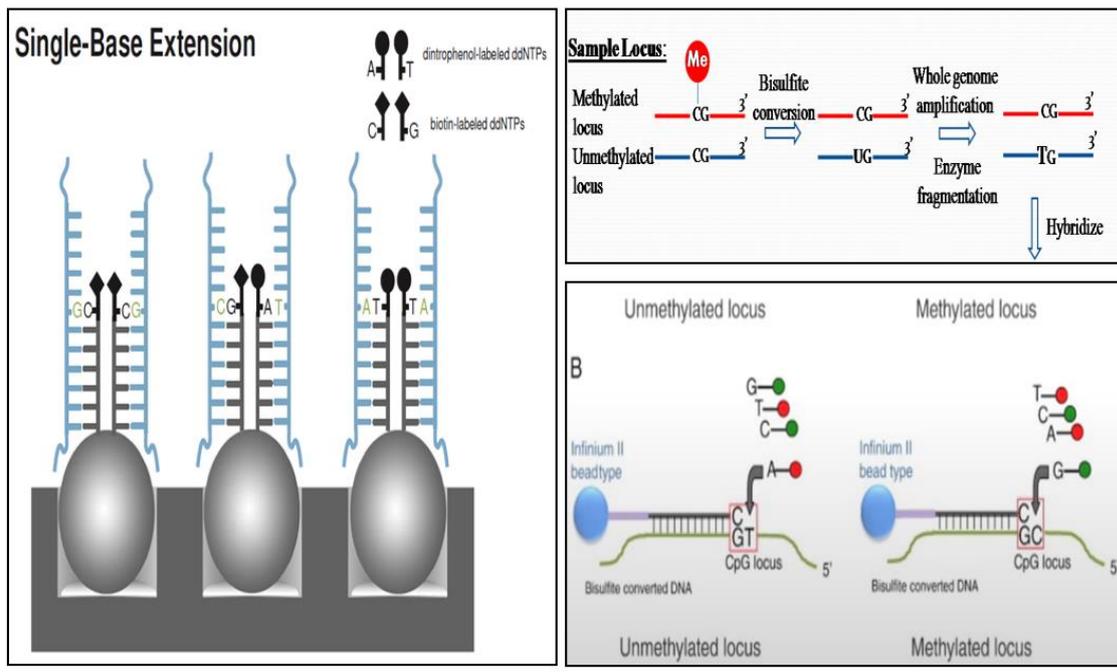


Figure 20 : représentation schématique de l'élongation des brins d'ADN selon le statut méthylé ou non du brin d'ADN.

A gauche : complexe ADN-billes mis en contact avec les 4 types de bases d'ADN, A et T marquées au DNP ; C et G à la biotine.

A droite : élongation des brins d'ADN selon leur séquence après conversion bisulfite.

Les bases d'ADN A et T fluorescent en rouge, C et G en vert.

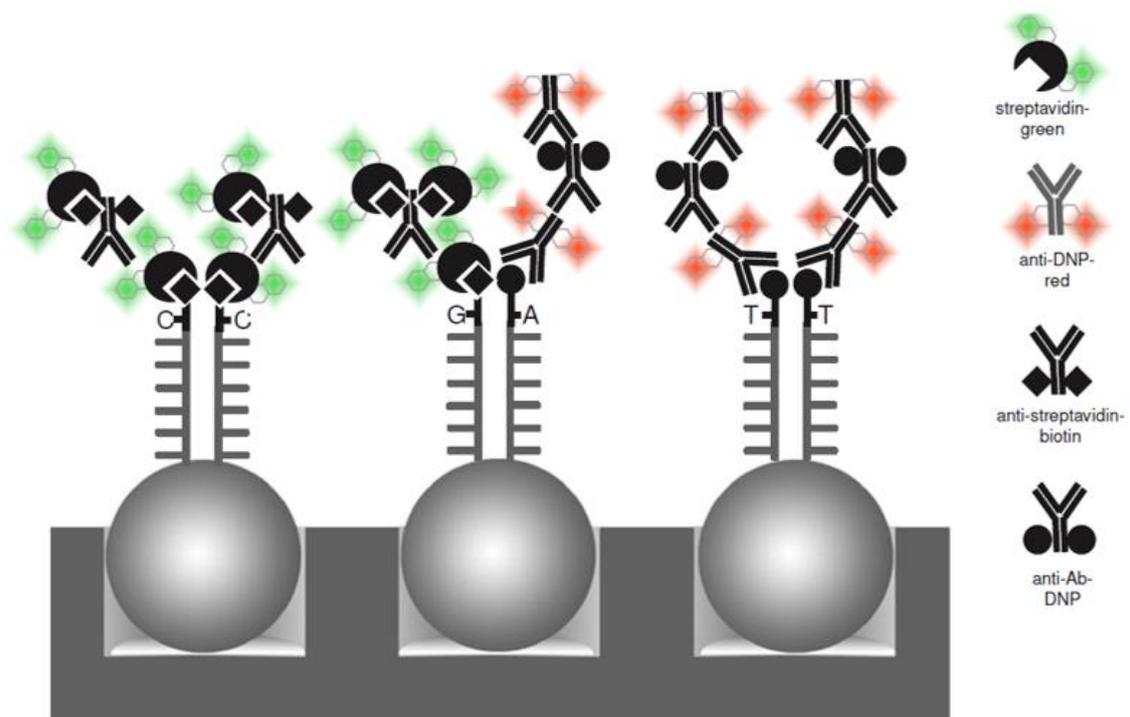


Figure 21 : représentation schématique centrée sur la fixation des bases d'ADN lors de l'élongation après la mise en contact des complexe ADN-billes.

Les bases A et T marquées au DNP plus les anticorps anti-DNP qui fluorescent en rouge.

Les bases C et G marquées à la streptavidine plus les anticorps anti-streptavidine qui fluorescent en vert.

- **Lavage et coating** de la puce : élimination de toute trace de réactif grâce à des lavages successifs et préservation des billes de la puce avec un film protecteur.
- **Lecture de la puce** sur séquenceur Nextseq550 générant le fichier .idat.



Figure 22 : séquenceur Nextseq550 d'Illumina (39).

- **Contrôles qualité :**

Contrôles indépendants des échantillons sources :

- Staining controls : témoin de coloration pour s'assurer de l'efficacité de la coloration dans la fluorescence rouge et verte.
- Extension controls : test de l'efficacité de l'extension des nucléotides A,T,C et G sur des beadchips indépendantes de l'échantillons.
- target removal controls : s'assurer de l'efficacité de l'étape d'élimination de l'ADN matrice après traitement à la formamide.
- Hybridization controls : test de performance globale à l'aide d'ADN synthétiques présents à des concentrations différentes et donc des signaux de fluorescence différents.

Contrôles dépendants des échantillons sources :

- Bisulfite-Conversion controls : contrôles permettant de vérifier que c'est bien une adénine (visualisable dans le canal rouge) et non une guanine (visualisable dans le canal vert) qui a été intégrée.

- Specificity controls : s'assurent de la spécificité de l'extension à base unique et vérifient l'apparition de signaux de méthylation non spécifique.
- Non-polymorphic controls : test la performance de l'analyse réalisée en ciblant des régions non polymorphiques du génome.
- Negative controls : témoin du bruit de fond de l'analyse. Les contrôles ciblent les séquences converties au bisulfite ne contenant pas de dinucléotides CpG.
- Restoration controls : s'assure de l'étape de restauration. L'intensité doit être supérieure à 1000 pour les ADN restaurés, et inférieure à 250 pour des ADN de bonnes qualités non restaurés.

ANNEXE 4 : MATERIEL INFINIUM

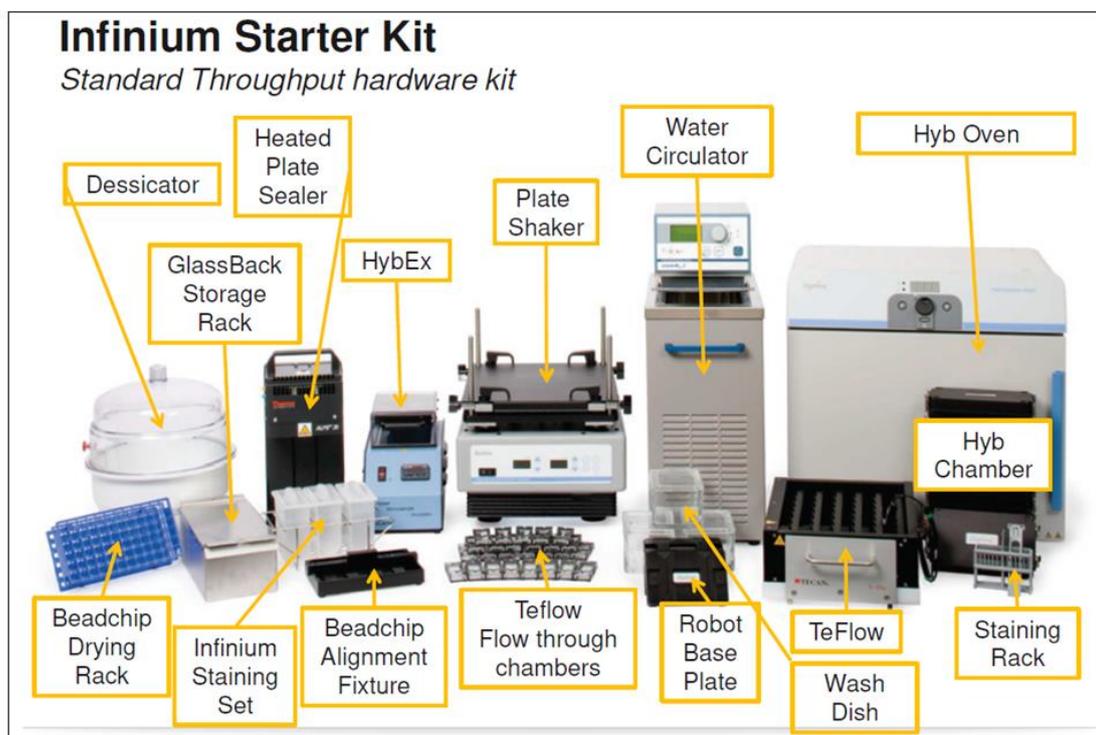


Figure 23 : matériel nécessaire avec la technologie Infinium.

Le stockage des ADN convertis se fait à -20°C pour un délai de 30 jours maximum et -80°C pour une plus longue durée.

Les puces se conservent 72H à température ambiante, à l'abri de la lumière.

Les fichiers sont ensuite téléchargés sur le site <https://www.molecularneuropathology.org/> (site de l'université d'Heidelberg)

Plusieurs informations sont renseignées en même temps : le diagnostic proposé, la localisation de la tumeur, l'âge du patient, son sexe, le type de puce utilisé et si l'ADN est extrait de tissu congelé ou fixé. L'utilisation de ce site était gratuite au moment de la rédaction de la thèse. Les données recueillies le sont exclusivement dans un but exclusif de recherche, selon les termes du préliminaire devant être accepté par l'utilisateur du site. L'intégration des résultats obtenus grâce à ce site au diagnostic « intégré » est désormais internationalement validée.

Sample name (mandatory)

Diagnosis (mandatory)

Location (mandatory)

Age (empty or integer)

Gender

Array type

Sample type

Sample idat files
 aucun fichier sélectionné
 aucun fichier sélectionné
 It is necessary to upload two idat-files (*_Grn.idat, *_Red.idat). The file order is not important.

Research case
 I agree that the anonymous methylation and clinical data may be used for future improvement of the classifying algorithm.

Terms & Conditions / EULA / Privacy statement
 I accept the terms and conditions / EULA [\[Link\]](#) and the data privacy statement [\[Link\]](#) and I confirm that:
 Classification using methylation profiling is a tool for research use only, it is not verified and has not been clinically validated and, therefore, must not be used for diagnostic purposes. This tool is not HIPAA compliant.
 Please, check if all mandatory fields are filled.

Figure 24 : les champs à remplir avant de télécharger le fichier .idat sur le site molecularneuropathology.org.

Au moment de la rédaction de cette thèse, c'est la version 12.8 du *classifieur* des tumeurs cérébrales qui est en usage.

Les résultats se présentent de la sorte : une première partie concerne les « copy number prediction » de l'ADN tumoral de la tumeur patient.

Il s'agit d'une représentation des altérations dans le nombre de copies de gènes (amplifications ou délétions) du génome de la tumeur, avec certains gènes clefs connus de la tumorigénèse représentés sur leur position chromosomique.

La représentation graphique choisie par Heidelberg est proche de celle d'une CGH array, mais elles sont différentes : en CGH array, un ADN tumoral est hybridé avec un ADN non tumoral de référence afin de détecter des variations pathologiques de séquence.

Vient ensuite la prédiction du classifieur pour le diagnostic de la tumeur.

Il est représenté sous forme classe puis de sous-classe, allant de la grande catégorie diagnostique, jusqu'au diagnostic tel que formulé dans l'OMS, puis d'un diagnostic moléculaire établi selon le méthylome lui-même (« MC » pour methylation class).

Un score de calibration > 0,9 est considéré comme significatif.

Classifier prediction (Version 12.8 of the brain classifier; Version: 12.8)

Methylation classes (Highest level >= 0.3, lower levels >= 0.1, all remaining reference groups)	Calibrated score	Interpretation
Medulloblastoma	0.98546	match ✓
Medulloblastoma non-WNT/non-SHH activated	0.98187	match ●
Medulloblastoma Group 3	0.97398	match ●
MC Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH, Group 3 subtype, subclass II	0.81172	no match ✗
MC Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH, Group 3 subtype, subclass III	0.11502	no match ✗
MC Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH, Group 3 subtype, subclass IV	0.04148	no match ✗
MC Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH, Group 3 subtype, subclass I	0.00576	no match ✗

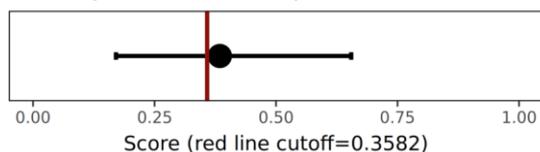
Legend: ✓ Match (score >= 0.9) ✗ No match (score < 0.9): possibly still relevant for low tumor content and low DNA quality cases. ● Match to MC family member (score >= 0.9)

Figure 25 : prédiction du classifieur concernant le diagnostic.

Enfin, il est proposé une prédiction du statut de méthylation du promoteur de MGMT.

MGMT promotor methylation (MGMT-STP27)

MGMT promotor status prediction



Status	Estimated	CI lower	CI upper
methylated	0.38437	0.17057	0.65464

Figure 26 : indication de la méthylation de promoteur de *MGMT*.

Il est important de souligner que les îlots utilisés pour déterminer ce statut ne sont pas les mêmes que ceux utilisés au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de Lille par technique de pyroséquençage.

Dans la pratique, un score $> 0,9$ constitue un « match » et le résultat est interprétable. Dans la littérature, différents cut-offs ont été utilisés pour interpréter un résultat comme significatif, ou du moins comme de confiance, notamment un score supérieur à 0,84.

2.4.2 NGS

Le NGS est une technique permettant le séquençage rapide de l'ADN.

Les étapes nécessaires sont :

- **Extraction** de l'ADN génomique tumoral à l'aide d'un kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen).
- **Séquençage** par PCR multiplex Ampliseq sur Ion S5 XL system (ThermoFisher Scientific).
- **Analyse** sur les logiciels Torren Suite V5.10 (Thermo Fischer Scientific) et Anatol.

Le panel de gènes ainsi que les exons étudiés sont établis par l'équipe de biologiste moléculaire est disponible au laboratoire ainsi que sur les comptes-rendus.

2.4.3 CGH

La CGH est une technique permettant d'identifier les variations du nombre de copies dans l'ADN (amplification, délétion), en hybridant un ADN sain avec un ADN tumoral.

Elle comprend :

- **Extraction** de l'ADN génomique tumoral par kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen)
- **Analyse** sur puce SurePrint G3 Human CGH Microarray Kit, 8x60K (Agilent), résolution de 1 Mb.

2.4.4 Archer

La technique Archer permet la recherche de transcrite de fusion par séquençage d'un panel cible par technique AMP (Anchored Multiplex PCR) (kit Archer Dx FusionPlex) sur Ion S5 system (Thermofisher Scientific) et analyse par le logiciel Archer Analysis v 6.0.3.2.

Plusieurs panels sont disponibles, les gènes concernés et les points de cassures des exons couverts sont accessibles auprès du service de biologie moléculaire (les gènes sont mentionnés à la fin de chaque compte-rendu selon le panel utilisé).

2.4.5 OCA

La technique OCA recherche des variants et gains de copies par séquençage d'un panel de cibles d'intérêt par PCR multiplex AmpliSeq (kit Oncomine Comprehensive AssayV3) sur Ion S5 system (Thermofisher Scientific) et analyse par le logiciel Ion reporter v5.10 (Thermofisher Scientific).

Au jour de la rédaction de la thèse, c'est la version 3 de l'OCA qui était utilisée avec 161 gènes cibles (panel accessible en ligne).

A noter qu'un nouveau panel de séquençage appelé OncoDEEP développé par OncoDNA, contenant plus de 600 gènes, est dorénavant disponible au laboratoire à la fin de rédaction de cette thèse.

Pour d'autres patients, un exome tumoral complet pouvait être séquencé s'il bénéficiait du programme national AURAGEN / SeqOIA.

3 Résultats

Les résultats sont exposés en fonction du diagnostic intégré final, et selon leur ordre d'apparition dans la classification OMS 2021 des tumeurs du SNC.

3.1 Gliomes diffus de l'adulte

Le diagnostic de gliome diffus de l'adulte (astrocytome IDH-muté, oligodendrogliome IDH muté, glioblastome IDH non muté) repose sur un ensemble de critères bien codifiés en 2024 : des critères morphologiques (cytologie gliale astrocytaire, oligodendrogliale), de grading (mitoses, nécrose), immunohistochimique (perte d'*ATRX*, mutation TP53, IDH^{R132H}) et moléculaires (co-délétion 1p/19q, gain du chromosome 7 avec amplification d'*EGFR*, perte du chromosome 10, délétion homozygote de *CDKN2A/B*, mutation du promoteur de *TERT*). Ainsi dans les données qui suivent, nous ne reprenons pas les données moléculaires classiques concordantes avec les diagnostics.

Cette grande catégorie regroupe 55 patients.

Vingt-et-un patients avec une lésion correspondant à un gliome diffus de l'adulte, ont eu un méthylome significatif :

- 11 patients, pour un glioblastome *IDH* non muté,
- 6 patients pour un astrocytome *IDH* muté,
- 4 patients pour un oligodendrogliome *IDH* muté 1p/19q codéléte.

Treize patients avec une lésion correspondant morphologiquement à un gliome diffus de l'adulte ont eu un méthylome à la limite de la significativité entre 0,6 et 0,88, ne remettant pas en cause le diagnostic :

- 9 patients, pour un glioblastome *IDH* non muté, dont 2 avec transcrits inhabituels : *FGFR3::TACC3* et *FGFR3::CGNL1*.
- 3 patients pour un astrocytome *IDH* muté.
- 1 patient pour un oligodendrogliome *IDH* muté 1p/19q codéléte.

Douze patients ont eu un méthylome non significatif :

- 8 patients pour un glioblastome *IDH* non muté
 - ⇒ 7 avec un diagnostic inchangé après le reste des investigations moléculaires.
 - ⇒ 1 avec une mutation *H3F3A* K28M et *PIK3CA* permettant le diagnostic de gliome diffus de la ligne médiane *H3*-altéré.
- 3 patients pour un astrocytome de grade 2 et 3 (avec pour ce dernier mutations *PDGFRA* N659K et *NF1* K1639*), et 1 autre pour un oligodendrogliome de grade 2.

- 1 patient avec une lésion bi-thalamique. A la biopsie, il y avait population gliale modérément atypique de densité modérée, sans pouvoir affirmer un gliome. Le méthylome était non significatif à 0,57 pour un gliome diffus de la ligne médiane H3 altéré *EGFR* altéré. Aucune mutation des histones n'étaient retrouvés en NGS, mais une mutation *PIK3CA* et une duplication dans le gène *EGFR*. La CGH montrait un gain du X. Une mutation C228T était retrouvée dans le promoteur de *TERT*. Le diagnostic final était celui d'un gliome bi-thalamique avec mutation d'*EGFR* sans perte de la triméthylation.

Quatre patients n'ont eu aucun résultat proposé en méthylation, ne changeant pas le diagnostic intégré :

- 2 patients avec un gliome de haut grade, de morphologie et profil IHC d'un gliosarcome,
 - ⇒ 1 avec en CGH un gain du chromosome 7 sans amplification d'*EGFR*, une perte du 10, et une mutation *PTEN* en NGS.
 - ⇒ 1 avec un profil CGH complexe avec entre autre un gain chromosome 7 et perte du 10, amplification du gène *MYCN* et *CDK4*.
- 1 patient avec un astrocytome IDH muté de grade 4, avec délétion biallélique de *CDKN2A/B* en CGH.
- 1 patient avec une tumeur de haut grade, indifférenciée, plus en faveur d'un gliome de haut grade, avec amplification de *MDM2* en CGH et mutation *FGFR1* en NGS, en accord avec un glioblastome IDH non muté histones négatifs.

Trois patients n'ont eu aucun résultat proposé en méthylation, avec des morphologies équivoques :

- 1 patient avec antécédent d'oligodendrogliome de grade 2 2008, présentait en 2023 une tumeur infiltrante à composante gliale prédominante, d'index mitotique faible, mais d'index Ki67 élevé et comportant des altérations endothéliales, avec seulement après bilan moléculaire exhaustif un profil CGH complexe comprenant une délétion homozygote de la région codant *CDKN2A*. Le diagnostic final était gliome diffus IDH non muté H3 non altéré.
- 1 patient avec une tumeur à composante gliale, pléomorphe et xanthélasmiée, d'aspect circonscrit, non typable et non gradable, dont l'aspect histologique évoquait un xanthoastrocytome pléomorphe (PXA). Aucun diagnostic n'était proposé en méthylation. Une mutation du promoteur de *TERT* C228T était retrouvée. Le diagnostic final était celui d'un glioblastome *IDH* non muté.
- 1 patient gliome de haut grade, perdant l'expression d'*ATRX* et comportant des signes d'infiltration du neuropile. Le profil était complexe en CGH, sans délétion de *CDKN2A*. Une mutation TP53 était retrouvée. Le méthylome était non significatif à 0,14 pour un gliome diffus de haut grade de sous-type pédiatrique. En t-Sne, la tumeur se regroupait avec des astrocytomes de haut grade d'aspects piloïde. La conclusion finale était gliome de haut grade IDH non muté, ayant perdu l'expression d'*ATRX*.

Deux patients avec une morphologie que très peu contributive (densité cellulaire peu dense, atypies faibles, infiltration non évidente) et un méthylome non significatif, mais des anomalies génétiques précisant le diagnostic :

- Un avec un score de 0,38 pour un gangliogliome. En CGH était retrouvé un profil complexe avec une perte du 10, un gain du 7p et un gain de la majeure partie du 7q. En NGS une mutation *FGFR3* K650E et *PTEN*.

La conclusion était gliome infiltrant de haut grade *IDH* non muté.

- Un avec un score de 0,41 pour un gliome diffus de haut grade de l'adulte, *IDH* non muté. La FISH *MYB* a mis en évidence un réarrangement du gène. Le transcrit *MYB::PCDHGC3* retrouvait en archer concordait avec la FISH. En NGS était retrouvée une mutation de *ACVR1*, de pathogénie inconnue.

La conclusion était gliome diffus *IDH* non muté avec réarrangement *MYB*.

3.2 Gliomes diffus de sous-type pédiatrique de bas grade et de haut grade

Dix patients étaient suspects morphologiquement de tumeurs pédiatriques de haut grade de type « gliome diffus «H3 altéré » ou « gliome diffus *IDH* non muté H3 non altéré » :

- 9 ont eu un méthylome avec un score significatif.
- 1 seul avait un score non significatif de 0,7 pour un glioblastome *IDH* non muté, mais avec mutation *H3F3A* K28M en NGS confirmant le diagnostic initial.

7 patients avaient une tumeur ou un gliome de haut grade difficile à classer.

- Les 7 ont eu un méthylome significatif pour un « gliome diffus «H3 altéré » ou « gliome diffus *IDH* non muté H3 non altéré ».

Plusieurs cas particuliers :

- 1 patient de 17 ans était porteur d'une tumeur gliale non typable, avec une mutation dans l'exon 20 d'EGFR, sans anomalie CGH. Le méthylome était non significatif avec un score de 0,18 pour un gliome diffus *H3K27* muté, sous type *EGFR* altéré. Après relecture nationale, un t-Sne a été réalisé. La tumeur ne se regroupant pas avec les gliomes diffus de la ligne médiane H3K27, c'est le diagnostic de gliome diffus de haut grade de sous type pédiatrique, non histone, non IDH (équivalent du sous type RTK2 des glioblastomes IDH non mutés) qui a été retenu.
- 1 patient de 17 ans avait un diagnostic de gliome bi-thalamique sans signe d'agressivité morphologiquement. Le méthylome était non significatif à 0,18 pour un gliome diffus de la ligne médiane *H3* altéré et *EGFR* altéré. Il a été retrouvé une insertion dans l'exon 20 de *EGFR* permettant le diagnostic final de gliome diffus de haut grade de sous type pédiatrique.
- 1 patient avec le diagnostic de tumeur glioneuronale possédait des anomalies moléculaires inhabituelles en CGH : un gain du bras court du chromosome 1, gain du chromosome 7 sans amplification de la région contenant le gène *EGFR*, perte du chromosome 10, perte des chromosomes 13 et 15 notamment. A posteriori était retrouvé une perte d'expression en IHC de H3K27me3 et une surexpression d'*EZH1P*. Le méthylome était significatif pour un gliome diffus de la ligne médiane H3K27 altéré.

1 patient était atteint d'une tumeur de bas grade exprimant fortement Olig2, d'aspect nodulaire et susceptible de correspondre à un gliome cortical sous type pédiatrique. Le méthylome était significatif mais pour du tissu cérébral normal du corps calleux. Les autres études moléculaires (NGS, CGH, Archer) n'ont pas permis de préciser le diagnostic non plus.

3.3 Gliomes circonscrits astrocytaires

Douze patients qui étaient atteints de tumeur dont la morphologie évoquait une tumeur gliale circonscrite principalement, ou un gliome pédiatrique diffus de bas grade voire une tumeur glioneuronale, ont eu un méthylome significatif pour un astrocytome pilocytique dont un pilomyxoïde, confirmant ou précisant le diagnostic.

- 8 ont eu un transcrit impliquant *BRAF*.
 - ⇒ 5 avec le transcrit *KIAA1549::BRAF* classiquement décrit.
 - ⇒ 3 ont eu des transcrits plus rares : *FAM131B::BRAF* ; *GNAI1::BRAF* (avec un gain du 7 en CGH) ; *BCR::BRAF* (avec un gain du 5 et 6 en CGH).
- 1 avec une mutation *KRAS* Q61K et un gain des chromosomes 5 et 6 en CGH.
- 1 avec un transcrit *QKI::NTRK2*.
- 1 avec un transcrit *FGFR1::TACC1*.
- 1 avec une duplication en tandem des exons 11-18 du gène *FGFR1*.

Trois patients à la limite de la significativité (score de 0,81 ; 0,83 ; 0,89) :

- 1 avec le transcrit *KIAA1549::BRAF*.
- 1 avec une double mutation *KRAS* G12A et Q22K.
- 1 suspect initialement de possible RGNT avec un transcrit *PID1::BRAF*, sans mutation *PIK3CA*.

Deux patients ont eu un score non significatif pour un astrocytome pilocytique :

- 2 patients porteurs d'une neurofibromatose de type 1 (NF1) atteint d'un astrocytome avec un caractère atypique infiltrant, pouvant être expliqué par la NF1. Les scores de méthylation étaient de 0,55 et 0,31.

Trois patients avec une morphologie évocatrice mais un méthylome non significatif :

- Un patient avec une lésion de bas grade, piloïde, en faveur d'un astrocytome pilocytique sans aucune anomalie moléculaire retrouvée, et un méthylome non significatif à 0,28 schwannome (diagnostic non relevant).
- Un patient avec une tumeur gliale astrocytaire et piloïde, avec fusion *KIAA1549::BRAF*, sans autre anomalie moléculaire retrouvée, dépourvue de signe susceptible d'évoquer une lésion de haut grade. L'échantillon a eu un score non significatif à 0,13 pour un épendymome supratentorial (diagnostic non relevant) du fait possiblement de la faible quantité d'ADN accessible et de la faible concentration des extraits.
- Un patient suspect de PXA de grade 2 avec mutation *BRAF^{V600E}* a eu un score non significatif de 0,52 pour un gangliogliome.

Deux patients ont eu un score de méthylation significatif pour un xanthoastrocytome pléomorphe, 1 patient avec un score non significatif à 0,82 mais ne changeant pas le diagnostic final :

- ⇒ 1 présentait une tumeur infiltrante de haut grade, mutée *BRAF^{V600E}*, comportant des altérations moléculaires communes au glioblastome

épithélioïde et au xanthoastrocytome pléomorphe à savoir en CGH un gain du chromosome 7 sans perte du chromosome 10, une délétion de la région codant *CDKN2A/B* et une mutation du promoteur de *TERT* C228T.

⇒ 1 présentait une tumeur de haut grade, de morphologie en partie épithélioïde, exprimant des marqueurs gliaux, CD34 et *BRAF^{V600E}*, dépourvue d'expression des marqueurs mélaniques, comportant une altération d'H3K27me3 et une mutation du promoteur de *TERT* C228T.

⇒ 1 avec une tumeur gliale ou glioneuronale, de haut grade, associant une mutation *BRAF^{V600E}*, une mutation d'*ATRX*, une délétion homozygote de la région comportant *CDKN2A*.

Deux patients avec une tumeur non typable ni gradable ont eu un méthylome significatif pour un astrocytome de haut grade avec aspects piloïde (HGAP) permettant de poser le diagnostic

Pour 3 patients suspects de tumeur épendymaire, c'est le méthylome qui a permis de poser le diagnostic intégré final :

- 2 astroblastomes *MN1* altéré, associés à une fusion *MN1::BEND2*. La présence du transcrit était confirmée en Archer.
- 1 dont la tumeur se regroupait également de manière significative avec les astroblastomes *MN1::BEND2*. Par RNA seq a été retrouvé un transcrit *MAMLD1::BEND2*. Ce transcrit a été rarement rapporté dans des tumeurs neuro-épithéliales « astroblastoma-like » (40,41).

3.4 Tumeurs glioneuronales et neuronales

Parmi les tumeurs glioneuronales et neuronales de la cohorte, la majorité des diagnostics pré-méthylome étaient des gangliogliomes et des tumeurs circonscrites de bas grades non encore caractérisées au niveau moléculaire. Pour ces tumeurs, l'apport des techniques épigénétiques (méthylome) a été tel ces dernières années, en synergie avec d'autres méthodes de génétique que les situations cliniques individuelles sont variées. 31 patients ont été inclus et se répartissent ainsi.

Nous faisons le choix de les présenter dans tel ordre :

Morphologiquement défini et significatif au niveau moléculaire :

- 5 patients morphologiquement suspects entre autres de tumeur glioneuronale ont eu un méthylome significatif pour un gangliogliome permettant de préciser le diagnostic. Pour deux d'entre eux un gliome pédiatrique de bas grade, une tumeur glioneuronale polymorphe du sujet jeune (PLNTY) étaient évoqués avant méthylome.
- 2 patients suspects de tumeur neuroépithéliale dysembryoplastique (DNET) ont eu un méthylome significatif confortant le diagnostic. Une double mutation dans *FGFR1* était retrouvée pour un des patients.
- 1 patient avec le diagnostic de gliome cortical diffus de bas grade de type pédiatrique avait un méthylome significatif pour une (DNET).
- 1 patient avec un neurocytome central, d'index Ki67 assez élevé (proche de 7%). Le score de méthylation était significatif à 0,99 pour un neurocytome central.

Morphologiquement défini mais avec étude par méthylation négative :

- 3 patients avec un diagnostic morphologique de gangliogliome, dont l'un avec une mutation *BRAF^{V600E}* ont eu un méthylome soit significatif, soit non significatif pour du « tissu de microenvironnement tumoral », ne changeant pas le diagnostic final.
- 2 patients ont eu un méthylome non significatif mais avec des scores élevés de 0,81 et 0,83 pour un gangliogliome, ainsi que 1 patient sans résultat, ne changeant pas le diagnostic intégré de gangliogliome (le méthylome ne fait pas parti des impératifs pour cette classe de tumeur. Pour ce patient, le séquençage ciblé, le caryotype et l'histologie étaient concordants).
- 2 patients avec une DNET :
 - ⇒ 1 a eu un score non significatif à 0,41 pour une DNET. Un transcrit *FGFR1::TACC1* était retrouvé par technique Archer.
 - ⇒ 1 a eu un score non significatif à 0,80 pour du tissu cérébral normal du corps calleux. En NGS était retrouvée une mutation de *FGFR1* K656E, sans altération en CGH.
- 1 patient de 20 ans avec une tumeur cérébelleuse droite, pouvant correspondre à un gangliogliome. Un transcrit *KIAA1549::BRAF* était retrouvé. Le méthylome était significatif à 0,95 pour du tissu cérébelleux hémisphérique normal. La conclusion finale était tumeur de grade 1 caractérisée par un transcrit de fusion *KIAA1549::BRAF*.

Le diagnostic proposé de gangliogliome était favorisé, sans pouvoir exclure formellement un astrocytome pilocytique.

Morphologiquement non défini clairement mais défini par étude moléculaire :

- 2 patientes avaient une tumeur glioneuronales difficilement classable ont eu un score de méthylation significatif pour un gangliogliome :
 - ⇒ Une avec un transcrit *FGFR2-KIAA1598*, compatible finalement avec le diagnostic de tumeur neuroépithéliale polymorphe de bas grade du jeune enfant (PLNTY).
 - ⇒ Une avec un transcrit particulier *FGFR2::INA*, décrit dans certaines tumeurs glioneuronales de bas grades (42). La conclusion était : tumeur glioneuronale non classable avec transcrit particulier.
- 1 patient présentant une tumeur de l'hémisphère cérébelleux gauche, qui correspondait à une lésion vasculaire capillaire thrombosée et hémorragique pouvant correspondre à un hémangioblastome mais cependant très inhabituel, et dont les diagnostics de tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT) ou une tumeur glioneuronale formant des rosettes (RGNT) étaient soulevés. Deux mutations, dans le gène *FGFR1* (N546K) et *PTPN11* (F71L) étaient retrouvées. Le score de méthylation était significatif à 0,99 pour une RGNT, qui était ainsi le diagnostic retenu.
- 1 patient atteint d'une tumeur circonscrite avec d'abondantes calcifications évoquant un gangliogliome ; la morphologie et l'IHC étaient plus en faveur d'un astrocytome pilocytique. Le méthylome était non significatif à 0,69 pour un astrocytome pilocytique. Un transcrit *FGFR1::TACC1* retrouvé en Archer a permis de préciser le diagnostic en tumeur neuroépithéliale de bas grade, dont

la morphologie et le profil d'expression IHC sont ceux d'un astrocytome pilocytique, caractérisée par une fusion *FGFR1::TACC1*.

Morphologiquement défini, avec la découverte d'un mécanisme moléculaire de poids diagnostic suffisant pour modifier le diagnostic intégré:

- 2 patients avec un diagnostic morphologique compatible avec un gangliogliome ont eu un méthylome avec un score de 0,99 pour un astrocytome pilocytique. Un transcrit *KIAA1549::BRAF* pour l'un et une mutation *BRAF^{V600E}* Le diagnostic final retenu était ainsi celui d'astrocytome pilocytique.
- 1 patient avec une tumeur glioneuronale de bas grade, évoquant un gangliogliome. Le méthylome était significatif pour un astrocytome pilocytique. Une mutation *BRAF^{V600E}* a été retrouvée en NGS. Le diagnostic final retenu était ainsi celui d'astrocytome pilocytique.
- 1 patiente avec une tumeur en faveur d'un gangliogliome avec un score significatif de 0,99 pour un astrocytome pilocytique. Cependant, une duplication en tandem du domaine tyrosine kinase a été retrouvée dans le gène *FGFR1*. La conclusion finale a été : tumeur neuro-épithéliale caractérisée par une altération de *FGFR1*, dont le profil de méthylation correspond à un astrocytome pilocytique.

Morphologiquement défini avec des données épigénétiques de poids diagnostic suffisant pour modifier le diagnostic intégré :

- 1 nouveau-né atteint d'un gangliogliome/astrocytome desmoplasique infantile (GDI/ADI, DIA/DIG dans la littérature anglosaxone). Cette tumeur, d'index

mitotique élevé et de morphologie inhabituelle, a eu un méthylome significatif pour un PXA. Après relecture du Groupe d'étude de Neuropathologie oncologique pédiatrique (GENOP), c'est finalement le diagnostic de gliome circonscrit, desmoplasique, inclassable (NEC) qui a été retenu, sans pouvoir éliminer formellement une DIA en raison de l'âge et de la localisation (fronto-temporale droite).

- 1 patient présentait une lésion cérébelleuse, correspondant à une tumeur glioneuronale de bas grade. L'aspect morphologique était plus en faveur d'une tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT) ne comportant pas de signe d'anaplasie. Le score de méthylation était non significatif, toutefois élevé à 0,84 pour un astrocytome pilocytique infratentorial, *FGFR1* altéré. Par technique Archer, un transcrit *FGFR1::TACC1* était retrouvé. Le diagnostic retenu était ainsi celui d'astrocytome pilocytique.
- 1 patient atteint de gliome diffus de la ligne médiane (médullaire), d'immunophénotype *H3K27* équivoque, s'est regroupé en méthylation avec la classe de tumeur glioneuronale leptoméningée diffuse (DLGNT), grâce à un score de 0,99. Un transcrit *KIAA1549-BRAF* a été retrouvé.

3 patients suspects de gangliogliome avec signes histologiques d'agressivité, et un d'index mitotique élevé ont eu des résultats moléculaires inhabituels :

- ⇒ 1 avec un score de 0,80 en méthylation pour une tumeur neuroépithéliale avec fusion de *PATZ1*. Un transcrit *MN1::PATZ1* a été retrouvé par technique Archer permettant de confirmer le diagnostic.
- ⇒ 1 avec un score de 0,99 pour une tumeur du SNC avec fusion *BCOR/BCORL1*. Un transcrit *PTPRZ1::BRAF* non décrit mais probablement oncogénique était retrouvé.
- ⇒ 1 a eu un score de méthylation significatif pour un astrocytome de haut grade avec aspects piloïdes (HGAP), qui était le diagnostic retenu. Deux mutations oncogéniques, *BRAF^{V600E}* et dans le gène *ATM* étaient retrouvées.

3.5 Tumeurs neuroépithéliales de bas grade

Dix-sept patients avaient une tumeur morphologiquement gliale/glioneuronale de bas grade.

Pour sept patients il y avait des anomalies moléculaires retrouvées mais non décrites classiquement :

⇒ Un seul avec un score de méthylation significatif :

- 1 patient suspect d'astrocytome pilocytique a eu un score de méthylation **significatif** de 0,99 pour une tumeur neuroépithéliale avec fusion de *PATZ1*. Le transcrit *EWSR1::PATZ1* était retrouvé par technique Archer.

⇒ Six autres avec un score de méthylation non significatif :

- 1 patient atteint d'une tumeur d'aspect circonscrit, de morphologie glioneuronale, dépourvue de signe microscopique d'agressivité. Le méthylome était non significatif à 0,47 pour un gliome diffus de haut grade de l'adulte. La seule anomalie moléculaire retrouvée était un transcrit de fusion *EWSR1::PATZ1*

La conclusion était tumeur d'aspect circonscrit, de morphologie glioneuronale, dépourvue de signe microscopique d'agressivité avec un transcrit de fusion *EWSR1::PATZ1*, rapportée dans de rares cas de tumeurs glioneuronales de bas grade.

- 1 patient atteint d'une tumeur gliale/glioneuronale de bas grade partiellement myxoïde, inclassée, avec plusieurs gains chromosomiques en CGH et une mutation ***STK11*** retrouvée en NGS. Le score de méthylation était non significatif à 0,26 pour un astrocytome pilocytique.
- 1 patient suspect de gliome angiocentrique ou de tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale, de morphologie cependant très inhabituelle. Une mutation, rare, de ***PDGFRA N659K*** était retrouvée. Le score de méthylation était non significatif à 0,36 pour un gangliogliome.
- 1 patient de 10 ans, avec une lésion de bas grade, potentiellement un gangliogliome avec une mutation ***TP53***, sans autre altération moléculaire. Le méthylome était non significatif avec un score de 0,24 pour un astrocytome diffus de haut grade IDH non muté. Le diagnostic final retenu après RENOCLIP était celui d'un gliome diffus plutôt de sous-type pédiatrique sans critère d'agressivité histologique avec mutation TP53.
- 1 patient avec une tumeur circonscrite à composante gliale sans aucun signe d'anaplasie. Une **double mutation *PIK3CA, FGFR1*** était retrouvée. La première orientant vers un astrocytome pilocytique, alors que l'association des

deux vers une RGNT. Le méthylome était non significatif à 0,21 pour une DNET. L'évolution clinique avec multiples localisations et un contact ventriculaire orientait vers une RGNT.

- 1 patient suspect de gliome de bas grade/d'astrocytome pilocytique. Un score non significatif en méthylation non significatif de 0,51 pour un gangliogliome. Une **mutation *BRAF* inhabituelle de type c.1795_1797dup (p.Thr599dup)**. Le diagnostic final était celui d'un gliome de bas grade comportant une mutation du gène *BRAF*, sans argument pour une lésion de haut grade (dans la limite du matériel biopsique).

Huit patients morphologiquement définis mais avec méthylome non significatif :

- 1 patient atteint d'une tumeur neuroépithéliale de bas grade sans altération moléculaire retrouvée. Le score de méthylation était non significatif mais proche, à 0,72 pour un astrocytome pilocytique.
- 1 patient avec un gliome dont la morphologie est celle d'un astrocytome pilocytique, cependant non caractérisé en biologie moléculaire, malgré une IHC *BRAF^{V600E}* intense. Le score en méthylome était non significatif à 0,24 pour un astrocytome pilocytique.
- 1 patient avec une tumeur neuro-épithéliale de bas grade (gliome diffus de bas grade MAPKinase altéré) mutée *BRAF^{V600E}* avec un score de méthylation de 0,70 pour un gangliogliome.
- 1 patient avec un gliome de bas grade de sous-type pédiatrique pour lequel aucune altération n'a pu être mise en évidence, et un score non significatif de 0,22 pour du tissu cérébrale hypothalamique.

- 1 patient tumeur glioneuronale de bas grade exprimant *BRAF^{V600E}* et CD34. Il n'y avait aucune anomalie en CGH et la FISH MYB était négative. La morphologie correspond plus à une DNET, mais l'exploration en biologie moléculaire n'a pas pu être complétée (tumeur glioneuronale NOS).
- 1 patient avec tumeur de morphologie gémistocytaire prédominante, d'aspect circonscrit, exprimant des marqueurs gliaux et neuronaux. Le méthylome était non significatif à 0,42 pour un PXA. Une analyse moléculaire extensive réalisée était négative. La conclusion était tumeur gliale NEC.
- 1 patient avec une tumeur de bas grade exprimant des marqueurs gliaux, neuronaux et *BRAF^{V600E}* pouvant correspondre à un gangliogliome ou une tumeur glioneuronale de bas grade avec activation de la voie des MAP kinases. Était retrouvée une mutation *BRAF^{V600E}* en NGS et une codélétion 1p/19q en CGH. Par approche t-SNE, cette tumeur est très proche de la classe de méthylation de tumeurs supratentorielles de type gliomes de bas grade / astrocytomes pilocytiques / gangliogliomes.
- 1 patient avec lésion gliale, dépourvue de signe histologique susceptible d'évoquer une tumeur de haut grade, difficilement classable et gradable. Le méthylome était non significatif à 0,27 pour une tumeur glioneuronale myxoïde, muté *PDGFRA*. La grande classe de méthylation avait un score élevé de 0,80 pour une tumeur gliale/glioneuronale/neuroépithéliales de bas grade. Aucune anomalie n'était retrouvée en NGS, ni en Archer. Le diagnostic final retenue était celui d'une tumeur glioneuronale de bas grade NOS.

Un patient quasi significatif à 0,89 pour une DNET avec de multiples gains chromosomiques en CGH. Pour ce patient, c'est le diagnostic de tumeur neuro-

épithéliale de bas grade NOS qui a été posé. Le diagnostic de DNET aurait été retenu sans équivoque selon la classification de 2016.

Un patient avec une discordance morphologique et moléculaire avec une tumeur glio-neuronale papillaire. Il y avait des gains des chromosomes 5,8,9 et 11 en CGH. Un transcrit de fusion ***FGFR1::TACC1*** en Archer. Le méthylome était significatif à 0,97 pour un astrocytome pilocytique.

3.6 Tumeurs épendymaires

35 patients avaient le diagnostic intégré de tumeur épendymaire avant méthylome.

- 19 patients avaient un méthylome significatif avec score supérieur à 0,9.
- 11 patients avaient un score inférieur à 0,9, dont 4 entre 0,6 et 0,9, et 1 avec un résultat aberrant non pertinent (tumeur gliale de haut grade).
- Pour 4 patients avec diagnostic initial d'épendymome, le diagnostic était reclassé en subépendymome (10% des cas).

Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il pourrait exister une continuité évolutive entre épendymome et subépendymome. La présence d'altérations communes permettrait la clusterisation de cas d'épendymomes du point de vue morphologique en subépendymome du point de vue moléculaire.

- 1 patient avait une tumeur suspecte d'épendymome, avec un score de 0,71 pour le diagnostic de subépendymome. Par FISH, un réarrangement du locus *PLAGL1* permettant le diagnostic de tumeur neuro-épithéliale *PLAGL1* réarrangée, a été retrouvé. La réalisation de la FISH *PLAGL1* a été motivée par un score non significatif à 0,69 en version 12.5 pour une NET-*PLAGL1*. Le RNA seq a retrouvé le transcrit *PLAGL1::MAML2*.

3.7 Tumeurs des plexus choroïdes

Deux patients avec morphologiquement un papillome des plexus choroïdes ont eu des scores significatifs en méthylome pour ce diagnostic.

- 1 avec par ailleurs de multiples gains chromosomiques en CGH.
- 1 atteint cliniquement atteint d'une tétrasomie 9. Cependant, l'étude du profil de méthylation ne permet pas de distinguer une hyperplasie des plexus choroïdes associée à une tétrasomie 9p d'un papillome des plexus choroïdes.

3.8 Tumeurs embryonnaires : les médulloblastomes

Sur 10 diagnostics évoqués, le score calibré était supérieur à 0,9 pour 8 des patients (2 SHH, 2 WNT, 4 non-WNT non-SHH)

- 1 patient n'avait pas de diagnostic proposé par le méthylome (absence de résultat) dans un contexte de récurrence de médulloblastome suivi depuis 2014.
- 1 patient avait une tumeur embryonnaire inclassable. Le méthylome était non significatif à 0,79 pour un neuroblastome *FOXR2* altéré. Le diagnostic intégré après relecture nationale a conduit à une tumeur du système nerveux central avec activation de *FOXR2*. L'immunophénotype et la formule caryotypique en étaient assez typiques.

3.9 Tumeurs embryonnaires : « autres tumeurs embryonnaires du SNC »

Parmi cette sous-catégorie des tumeurs embryonnaires, nous avons 8 patients.

Six patients avaient un diagnostic évoqué initialement de tumeurs embryonnaires: tumeur embryonnaire à rosettes multistratifiées (« ETMR »), tumeur tératoïde/rhabdoïde atypique (« ATRT »), tumeur embryonnaire avec duplication interne en tandem du gène *BCOR*.

Sur ces 6 patients :

- 4 patients ont eu un score de méthylation supérieur à 0,9.
- 2 patients avaient un score élevé mais non significatif strictement, de 0,75 et 0,88 pour le diagnostic d'ETMR et d'ATRT, confortant tout de même le diagnostic.

1 patient avait une tumeur embryonnaire sans plus d'orientation avant le méthylome. Celui-ci a permis de préciser le diagnostic avec un score de 0,99 pour une ETMR.

1 patient avait une tumeur peu différenciée exprimant des marqueurs neuronaux ou neuroendocrines, d'index Ki67 assez élevé, d'allure probablement primitive. Les analyses moléculaires retrouvaient seulement une perte du chromosome 14 en CGH. Aucune mutation ou transcrite de fusion retrouvée. Le méthylome était non significatif à 0,60 pour un adénome pituitaire. Le diagnostic final retenu était donc une tumeur embryonnaire NOS.

3.10 Tumeurs pinéales

Trois patients atteints d'une tumeur du parenchyme pinéale.

Un patient avec morphologiquement une tumeur du parenchyme pinéale de haut grade. Le méthylome était significatif à 0,99 pour un pinéaloblastome, sous-type « miRNA processing altered 1, subclass B ». Le diagnostic final était pinéaloblastome, avec anomalies liées aux miRNA. Il n'y avait pas d'amplification n-myc en FISH, ni de perte de marquage par *RB1* en IHC.

Un patient avec morphologiquement une tumeur du parenchyme pinéale de différenciation intermédiaire. Le méthylome était non significatif, bien qu'élevé, à 0,75 pour un pinéocytome. Une insertion caractéristique des tumeurs du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire était retrouvée par séquençage dans *KBTBD4* (43).

Un patient avec morphologiquement une tumeur du parenchyme pinéal de différenciation intermédiaire. Le méthylome était non significatif à 0,16 pour une tumeur papillaire glioneuronale, avec fusion de *PRKCA*. En CGH, était retrouvée une très probable délétion homozygote *CDKN2A*, avec amplification de *PDGFRA* et *KIT*. C'est le diagnostic de glioblastome IDH non muté qui a été retenu.

3.11 Tumeurs des nerfs crâniens et paravertébraux

- 1 patient atteint d'une neurofibromatose de type 1 avec une tumeur de S3 gauche, correspondant à une tumeur de nature conjonctive, d'aspect monotone, comportant une composante vasculaire très marquée, avec une activité mitotique élevée. Sur la CGH, le profil était complexe avec multiples gains et pertes. Il n'était pas retrouvé de transcrit de fusion ou de mutations. Le méthylome était significatif pour une tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques.
- 1 patient avec une lésion de la racine de C7 avait le diagnostic de neurofibrome dans un contexte de suspicion de neurofibromatose de type 1. Le méthylome était non significatif avec un score de 0,62 pour une tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques.

3.12 Méningiomes

En 2024, le diagnostic de méningiome classique ne nécessite pas d'analyse de profil de méthylation. Il pourrait être intéressant de l'utiliser dans certaines situations : sous-type particulier, atypie, activité mitotique augmentée, Ki67 élevé...

Cinq patients ont été étudiés, les 5 ont eu un méthylome significatif pour le diagnostic de méningiome :

- 1 patient avec un méningiome classique de grade 1 de type transitionnel. « Sous-type bénin » en classe de méthylation.
- 1 patient avec un méningiome méningothélial et microkystique présentant un index de prolifération cellulaire focalement élevé, mais ne réunissant pas les critères suffisants du grade 2. « Sous-type intermédiaire » en classe de méthylation.
- 1 patient avec le diagnostic de méningiome atypique (sur l'infiltration du tissu cérébral et le nombre de mitoses au nombre de 3 par mm², sans anomalie CGH ni mutation du promoteur de *TERT*). Une mutation du gène *AKT1* a été retrouvée en OCA. Il s'est regroupé avec la classe des méningiomes bénins (score de 0,99). Cette mutation est décrite dans certains méningiomes et pourrait faire l'objet de thérapie ciblée (44) (45).
- 1 patient avec un méningiome d'architecture papillaire de manière focale et d'index mitotique élevé, proposé grade 2, s'est regroupé avec le « sous-type bénin » en classe de méthylation.

- 1 patient avec un méningiome comportant un contingent morphologiquement formé de cellules claires, sans perte d'expression de *SMARCE1*, s'est regroupé avec le « sous-type bénin » en classe de méthylation.

3.13 Tumeurs mésoenchymateuses non méningothéliales du SNC

Sur les 8 patients :

- un seul patient avec une tumeur de haut grade inclassable a eu un résultat de méthylome significatif avec un score de 0,99 pour le diagnostic de sarcome réarrangé CIC, permettant d'affirmer le diagnostic. Le séquençage ARN a permis de retrouver le transcrit *ATXN1::DUX4*.

Concernant trois autres dossiers, aucun résultat n'était sorti en méthylome, mais le séquençage ARN a permis de retrouver un transcrit pathologique :

- *IRF2BP2-NTRK1* pour une tumeur indifférenciée maligne exprimant SOX9 et SSTR2A.
- *EWSR1::ATF1* dans un cas et *EWSR1::CREM* dans un autre, les classant formellement en tumeurs mésoenchymateuses intracrâniennes avec fusion de type *FET-CREB* (46).
- 1 patient de 17 ans avec une tumeur du ventricule droit, d'index Ki67 et d'index mitotique élevés non classée. Il y avait de multiples pertes chromosomiques en CGH. Le méthylome était significatif pour un méningiome, « sous-type bénin ». C'est la technique Archer qui a permis de retrouver un transcrit de fusion *EWSR1::ATF1*, permettant de poser le diagnostic de tumeur mésoenchymateuse myxoïde intracrânienne (AFH-like tumor).

- 1 patient avec une lésion de l'angle ponto-cérébelleux, de nature vasculaire très majoritairement veineuse, dont les aspects correspondaient mieux à un angioliéiomyome qu'à une lésion malformative. Aucun résultat n'était proposé en méthylome. Une mutation *PIK3CA* H1047R était retrouvée en NGS. C'est finalement une lésion périvasculaire de type glomangiome qui était évoquée.
- 1 patient avec une lésion paravertébrale en faveur d'une fibromatose profonde. Une mutation de *CTNNB1* était retrouvée concordante avec le diagnostic. Il n'y avait pas de résultat proposé par le méthylome.
- 1 patient avec un antécédent de tumeur de type liposarcome thoracique avec une lésion orbitaire droite. Il s'agissait d'une prolifération tumorale à cellules fusiformes myxoïde maligne difficile à classer, de grade 2 selon la FNCLCC (différenciation 3 ; Mitose : 1 ; nécrose : 1). En séquençage, des mutations de *PIK3CA* et *TP53* étaient retrouvés. Il n'y avait aucun transcrit en archer ainsi qu'aucun résultat en méthylome.

3.14 Tumeurs mélanocytaires

5 échantillons correspondaient à une tumeur mélanocytaire.

- 3 échantillons atteignaient un score calibré de 0,99 pour le diagnostic de mélanocytome en méthylome permettant d'affirmer le diagnostic.

Deux des patients avaient une mutation *GNAQ* Q209L décrites dans les mélanocytomes.

- Pour un 1 patient, suspect de métastase de mélanome malin, le méthylome n'était pas contributif avec un score intermédiaire de 0,64 pour une classe de méthylation de mélanome métastatique. Une mutation *NRAS* Q61R était

retrouvée en NGS, très inhabituelle dans les tumeurs primitives du SNC et de l'uvée.

Le diagnostic final retenu était mélanome malin, dont le caractère primitif ou secondaire ne pouvait être déterminé.

- Pour 1 patient, le diagnostic dont le score calibré était le plus élevé (0,77) était un schwannome mélanotique. Le score ne permettait pas, formellement, d'affirmer le diagnostic, mais ce dernier était retenu, dans le contexte global.

3.15 Tumeurs de la région sellaire

- Une patiente présentant une lésion hypophysaire compatible avec un pituitaryome initialement. Le méthylome ne sortait aucun résultat (quantité d'ADN extrait insuffisante, estimée à 3,9 ng). Après avis et techniques IHC complémentaires, il s'agissait plus probablement d'une tumeur oncocytaires à cellules fusiformes.

3.16 Métastases du SNC

Parmi les patients pour lesquels un diagnostic de méningiome a, à un moment, été évoqué sans certitude par la technique de méthylation, nous revenons sur le cas d'une patiente de 31 ans qui souffrait d'une tumeur du sinus caverneux, pouvant correspondre à un méningiome, une tumeur maligne des gaines nerveuses périphériques (MPNST) plutôt de bas grade, voire un à carcinome. Dans le même temps, des localisations bilatérales ovariennes étaient découvertes, sans primitif évident. La chirurgie ovarienne orientait en première hypothèse vers un carcinome d'origine digestif, et plus particulièrement gastrique.

Les scores des versions désuètes en méthylome de la tumeur cérébrale orientaient vers un méningiome (score de 0,60 en version 11b4 du classifieur). Il n'y avait initialement aucune mutation retrouvée en OCA, aucun transcrite en transcriptome, avec toutefois un clustering avec un groupe de méningiomes anaplasiques basé sur les données d'expression.

Secondairement, un transcrite *RP2::ARHGAP6* était retrouvé dans la tumeur cérébrale, finalement également dans la tumeur ovarienne. Il n'est pas décrit dans la littérature. Plusieurs transcrits impliquant *ARHGAP* ont été décrits dans certains cancers, notamment gastriques (47). Ainsi, l'ensemble était compatible avec une métastase du carcinome d'origine gastrique probable.

Une patiente avec un antécédent de cancer du sein et du poumon présentait une lésion de l'hémisphère cérébelleux gauche correspondant à une tumeur maligne indifférenciée de haut grade à cellules fusiformes peu pléomorphes, avec expression immunohistochimique équivoque de *BCOR*. Les aspects morphologiques et le profil immunohistochimique n'étaient pas en faveur d'une origine carcinomateuse. Le méthylome était non significatif avec un score de 0,54 pour une tumeur maligne de la gaine des nerfs périphériques. Le complément d'analyse moléculaire retrouvant des mutations dans les gènes *BRCA1*, *PTEN*, *TP53*, sans transcrite de fusion et l'agrégation de l'échantillon à proximité de cas de carcinomes mammaires sur les données UMAP a finalement orienté le diagnostic vers une lésion carcinomateuse potentiellement d'origine mammaire (malgré la négativité des cytokératines et les marqueurs d'origine mammaire en immunohistochimie).

3.17 Autres

Quatre patients ayant eu une chirurgie de l'épilepsie :

- 1 patient avec une sclérose marquée, ayant eu un score significatif en méthylome pour du tissu cérébral hémisphérique.
- 2 patients avec une sclérose hippocampique sans résultat sorti en méthylome.
- 1 patient avec une malformation artério-veineuse de l'hippocampe ayant eu un score non significatif en méthylome pour du tissu cérébral hémisphérique.

Patients sans lésion tumorale évidente avec aucun résultat en méthylome :

- 1 patient atteint d'une syringomyélie avec une minime prise de contraste en T2, biopsiée. Cela correspondait à un tissu peu cellulaire exprimant GFAP et très focalement l'EMA pouvant correspondre à la périphérie d'une tumeur, notamment d'un épendymome sans pouvoir l'affirmer. La conclusion était : tissu médullaire dont on ne peut affirmer la nature tumorale.
- 1 patient avec une lésion frontale droite prenant le contraste, avec un antécédent d'épilepsie partielle persistante. Il n'était pas retrouvé d'anomalie moléculaire en NGS ni en Archer. La conclusion était : lésion d'aspect tumorale de bas grade, non classable.

Patients avec lésion tumorale sans diagnostic précis :

- 1 patient avec un antécédent de cancer pulmonaire présentait une lésion pariétale gauche. Il s'agissait d'une tumeur indifférenciée de haut grade, n'exprimant que très focalement EMA et CD138, susceptible de correspondre à une origine épithéliale sans en être spécifique. Il n'y avait pas d'expression des marqueurs habituellement observés dans les carcinomes du poumon. En OCA,

des mutations de *TP53*, *CDKN2A* et *TSC1* étaient retrouvées. Aucun résultat en méthylome.

- 1 patient avec une lésion temporale gauche, qui correspondait à une tumeur exprimant des marqueurs gliaux et neuronaux, d'index Ki67 focalement élevé en l'absence d'autre critère de haut grade. Aucune anomalie n'était retrouvée en NGS ni Archer ainsi qu'aucun résultat en méthylome.

4. A propos d'un patient

Nous rapportons un cas exceptionnel de par la survie prolongée du patient.

4.1 Histoire clinique

Il s'agit d'un patient de 18 ans au début de la maladie en juin 2006, sans antécédent.

Il a consulté pour un tableau d'hypertension intracrânienne d'installation progressive sur 1 mois, avec des symptômes à type de céphalées et vomissements.

Une IRM (imagerie par résonance magnétique) a alors été réalisée et retrouve une lésion hétérogène temporo-pariéto-occipitale droite en partie kystique avec une composante solide charnue insérée à la partie antéro-inférieure du kyste, prenant fortement le produit de contraste, avec présence de calcifications. Un effet de masse sur la corne occipitale du ventricule latéral droit avec minime engagement sous falciforme et temporal droit était noté.

L'hypothèse avancée en premier lieu était un astrocytome pilocytique.

Le premier geste opératoire consistait en une évacuation du kyste. Un bourgeon tumoral était réséqué et adressé au laboratoire d'anatomo-pathologie.

Les suites opératoires étaient marquées par un hématome sous-dural aigu motivant une réintervention. Le patient gardait une quadranopsie inférieure latérale homonyme gauche.

L'IRM de contrôle post-opératoire montrait une volumineuse cavité post opératoire liquidienne sans prise de contraste évoquant un reliquat tumoral, ainsi que quelques remaniements inflammatoire et œdémateux.

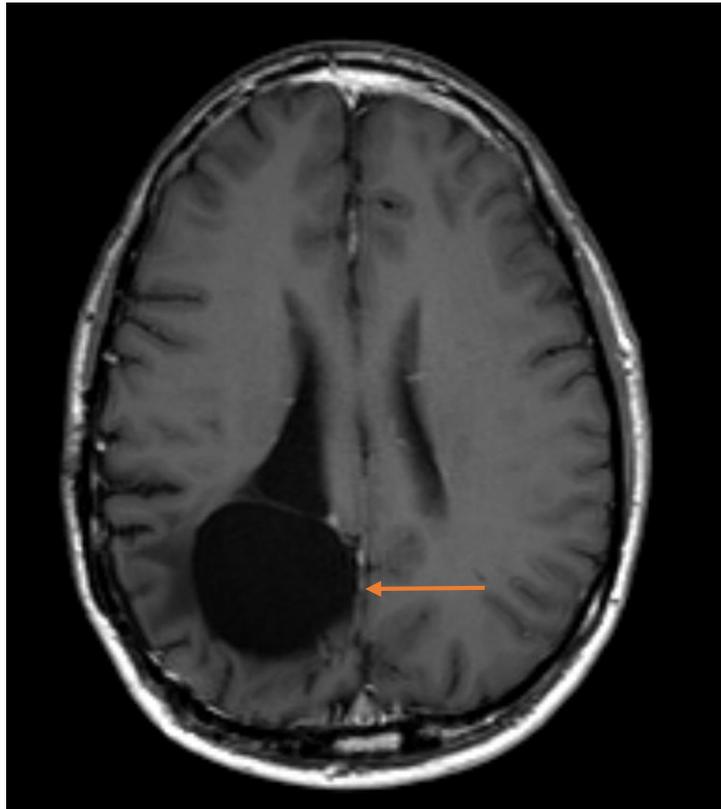


Figure 27 : coupe IRM axiale T1 injectée montrant la cavité opératoire séquellaire (flèche orange) datant de février 2011 (absence d'imagerie antérieure disponible).

En histologie, il s'agissait d'une tumeur organisée en plages de cellules monomorphes, assez bien limitée au cytoplasme faiblement éosinophile. Il y avait par endroit des zones fibrillaires. L'anisocaryose était faible, les noyaux étaient arrondis, la chromatine était légèrement condensée, finement granuleuse, parfois ponctuée d'un nucléole non proéminent. Des vaisseaux étaient ramifiés à paroi épaisse et fibreuse. Il y avait moins d'une mitose pour 10 champs à fort grossissement. Il n'y avait ni nécrose, ni prolifération endothélio-capillaire. Il s'y associait de multiples calcifications.

L'immunohistochimie réalisée démontrait une expression cytoplasmique pour les cellules tumorales de la synaptophysine. L'anticorps anti-GFAP marquait des cellules astrocytaires dispersées dans la lésion.

Il n'y avait pas de codélétion 1p/19q.

Un neurocytome central extraventriculaire était diagnostiqué (grade II, selon la classification OMS en vigueur au moment du diagnostic).

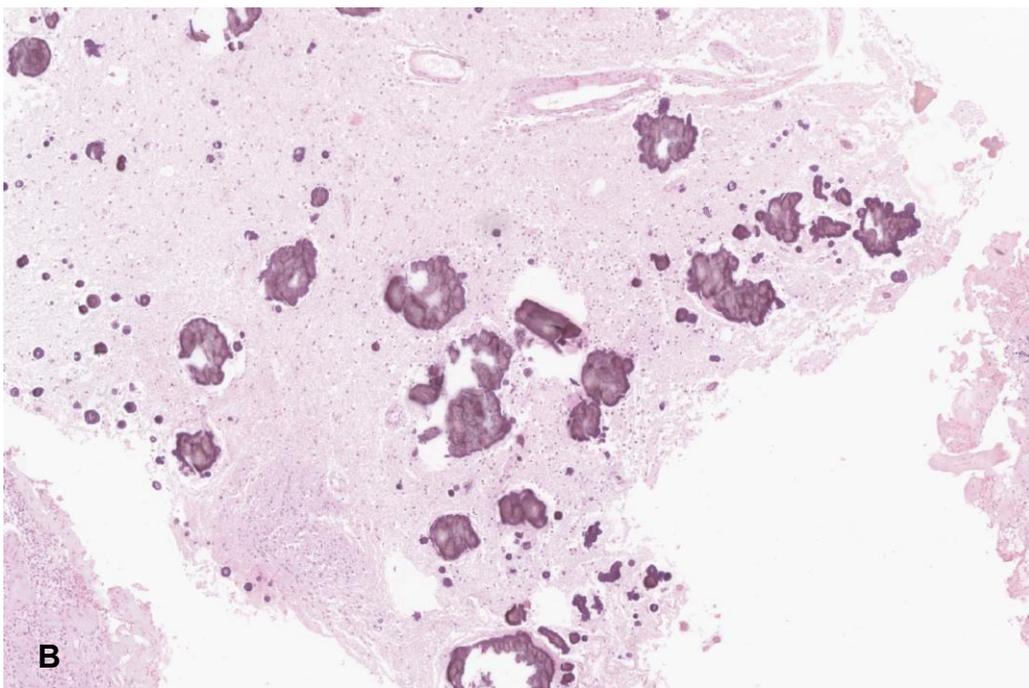
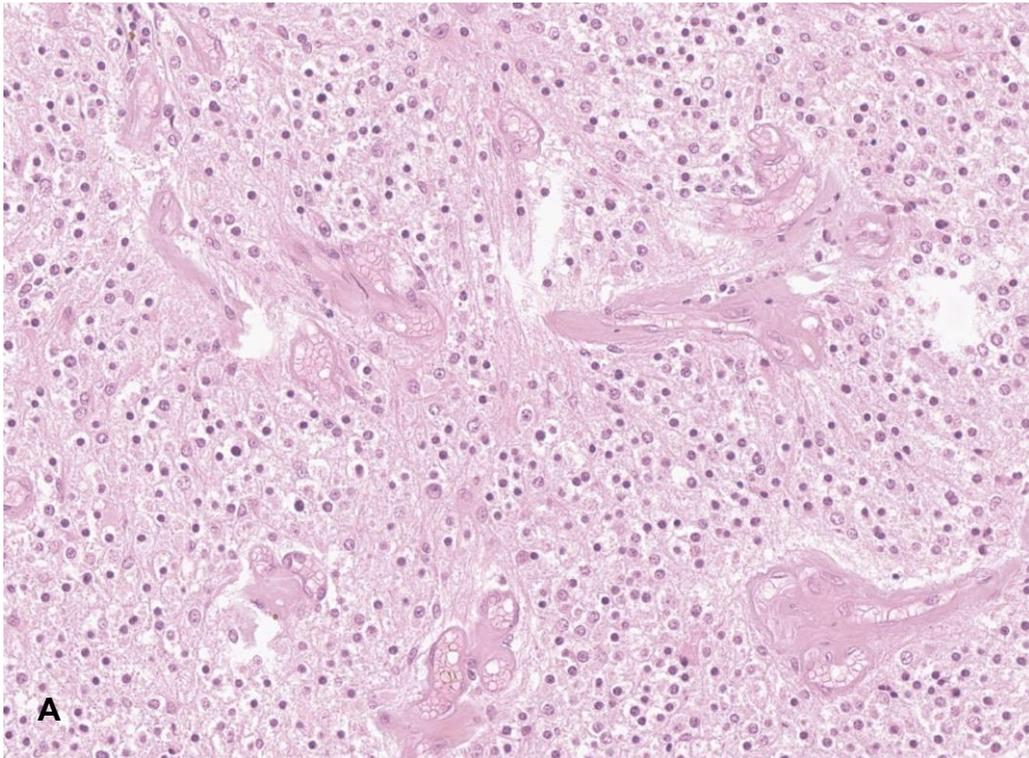


Figure 28 : clichés de la première tumeur opérée en 2006 (HES, grossissement x10)

A : prolifération tumorale constituée de cellules monotonnes à noyau dense, rond et petit sans atypie. Les vaisseaux sont glomérulés, leur paroi est épaissie mais sans prolifération endothélio-capillaire.

B : abondance des microcalcifications.

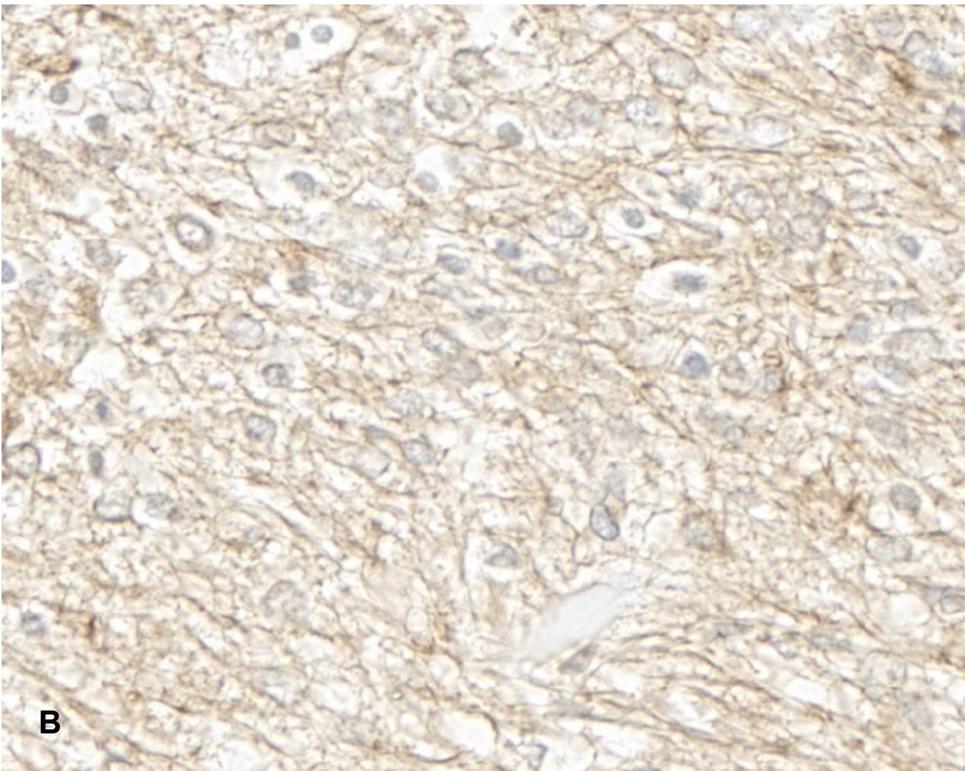
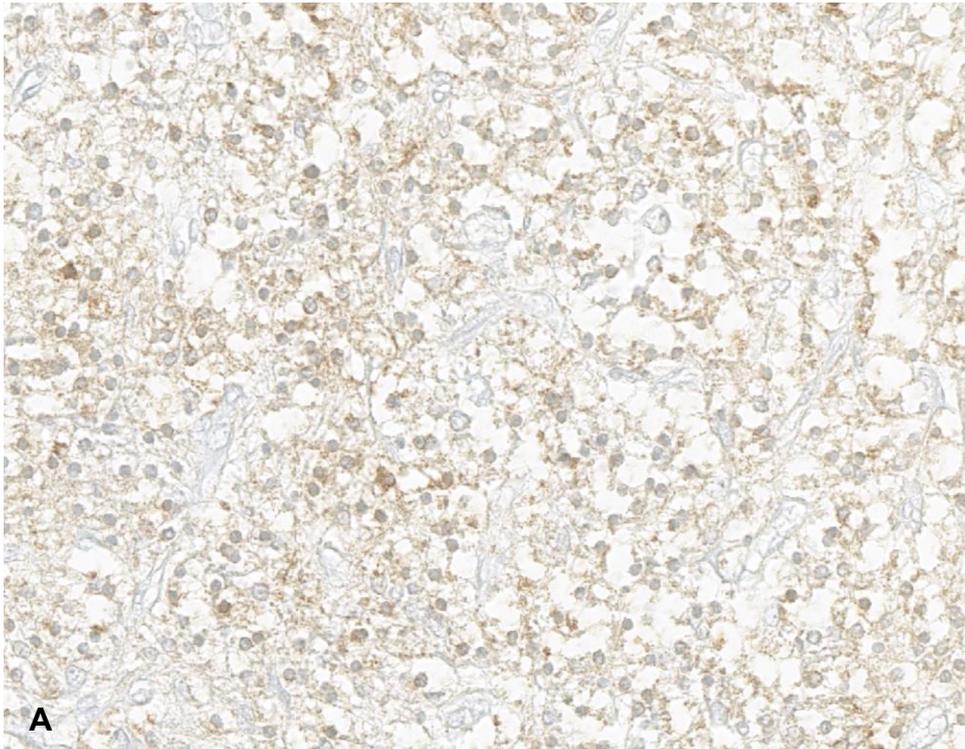


Figure 29 : clichés immunohistochimiques (grossissement x10 et x20)

A : expression cytoplasmique de la synaptophysine par les cellules tumorales.

B : marque des cellules astrocytaires dispersés dans la lésion par l'anticorps anti-GFAP.

Le patient était suivi par des IRM cérébrales régulières progressivement espacées ainsi que des bilans ophtalmologiques complets.

En septembre 2008, soit deux ans après la première chirurgie, le patient a ressenti des troubles visuels de l'œil gauche. Un nouveau bilan ophtalmologique concluait à une quadranopsie latérale homonyme inférieure plus prononcée qu'auparavant d'où la réalisation d'une nouvelle IRM. Celle-ci retrouvait de multiples nodules pariéto-occipitaux droits en parties kystiques, réhaussés après injection au sein de la précédente cavité opératoire.

Une nouvelle chirurgie d'exérèse programmée en février 2009 permettait l'exérèse complète de la récurrence.

L'histologie confirmait la récurrence du neurocytome, grade II OMS.

Un nouvel IRM de contrôle de juin 2010 montrait plusieurs nodules du système ventriculaires (3ème ventricule, ventricule latéral, carrefour), sans lésion médullaire.

Un traitement par radiothérapie, gammaknife et chimiothérapie par témozolomide était introduit.

Le suivi consistait ainsi en la réalisation de d'IRM cérébrale et médullaire et l'ensemble lésionnel était stable jusqu'en 2015.

En 2016, le patient présentait une progression lésionnelle au niveau des parois ventriculaires.

Jusqu'en 2018, le suivi s'est poursuivi devant une évolution lente et stable, mais était notée une augmentation d'une lésion du carrefour ventriculaire gauche (corne occipitale). Elle fut traitée par gamma knife.

En octobre 2020, progression de la maladie. La radiothérapie n'était plus possible en raison des doses cumulées.

Une nouvelle biopsie était proposée mais réfutée en raison des risques déraisonnables et du bénéfice incertain.

Un méthylome et une relecture centralisée par le réseau INCa RENOCLIP-LOC ont été demandés sur la deuxième exérèse de 2009.

Le méthylome était non significatif avec un score à 0,71 pour la catégorie « low grade glioma, desmoplastic infantile astrocytoma / ganglioglioma » sur la version 11b4 disponible à ce moment-là. Par la suite, la 12.5 et 12.8 ne donnaient aucun résultat.

De plus, les compléments d'analyse par NGS, CGH array et Archer étaient négatifs.

La relecture RENOCLIP d'avril 2021 évoquait plutôt devant l'ensemble du tableau, le diagnostic d'une tumeur glioneuronale ou d'un gliome diffus de sous type pédiatrique, associé à une altération de la voie MAP-Kinases, même si elle n'était pas retrouvée.

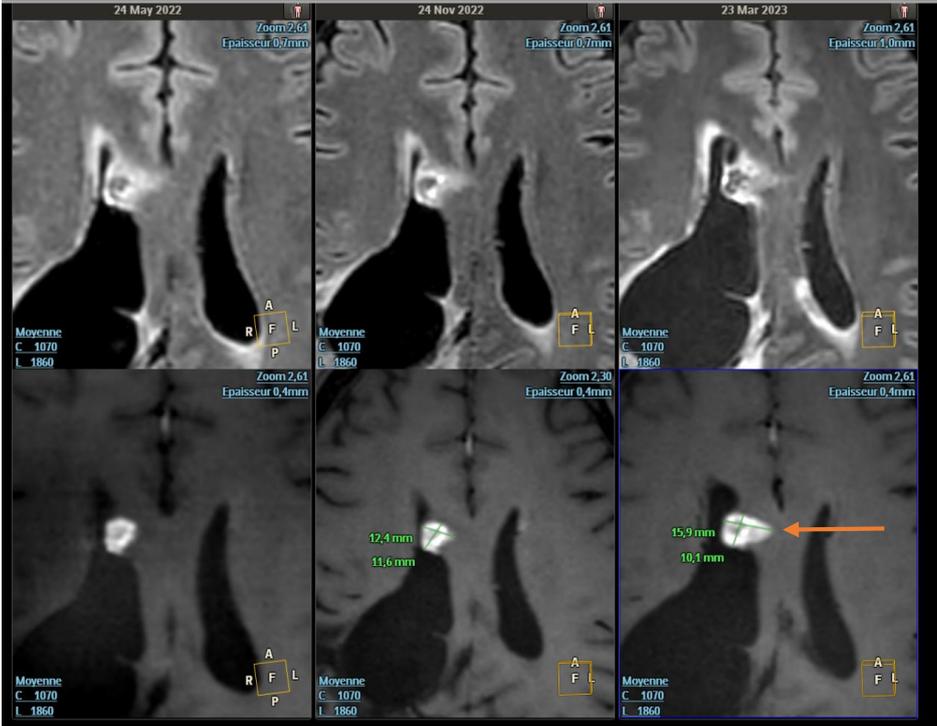
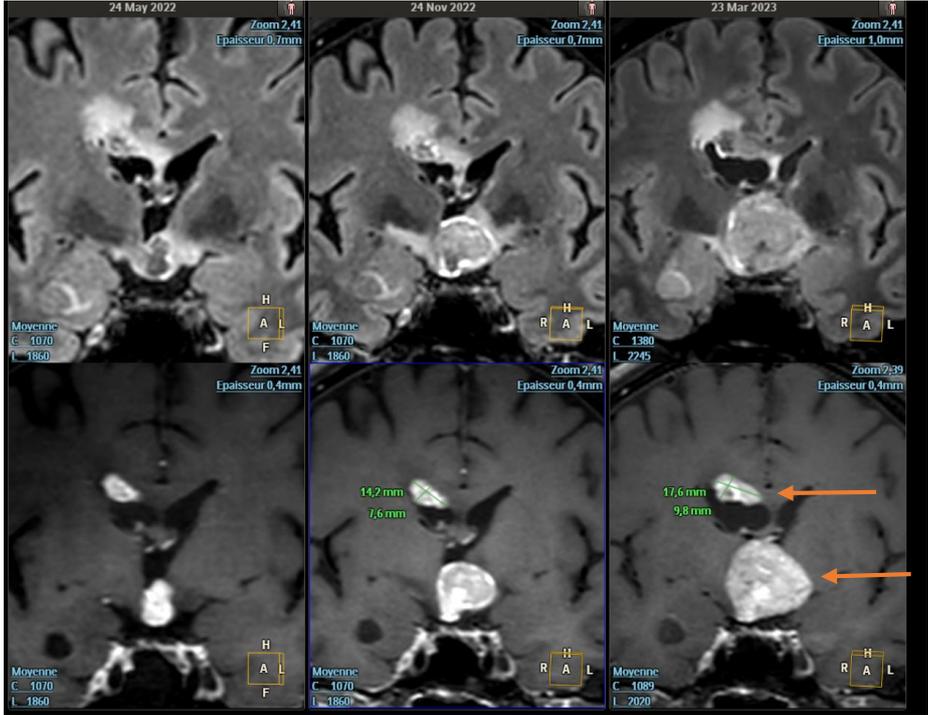
La réserve tissulaire étant épuisée, le patient était en impasse diagnostique.

En décembre 2021 : majoration en taille significative des lésions cérébrales supra et infra tentorielles, motivant l'introduction de Vinblastine début janvier 2022

Diminution de la dose de 20% en mars 2022 pour neuropathie périphérique.

En novembre 2022 : progression lésionnelle. Etait ainsi débuté un traitement par bévacizumab et un sevrage progressif en Vinblastine.

En février - mars 2023, la RCP a acté de nouvelles biopsies stéréotaxiques en raison de la nouvelle progression lésionnelle, notamment d'une lésion du 3^{ème} ventricule mesurant 32 mm et exerçant un effet de masse sur les foramens interventriculaires avec dilatation des ventricules latéraux.



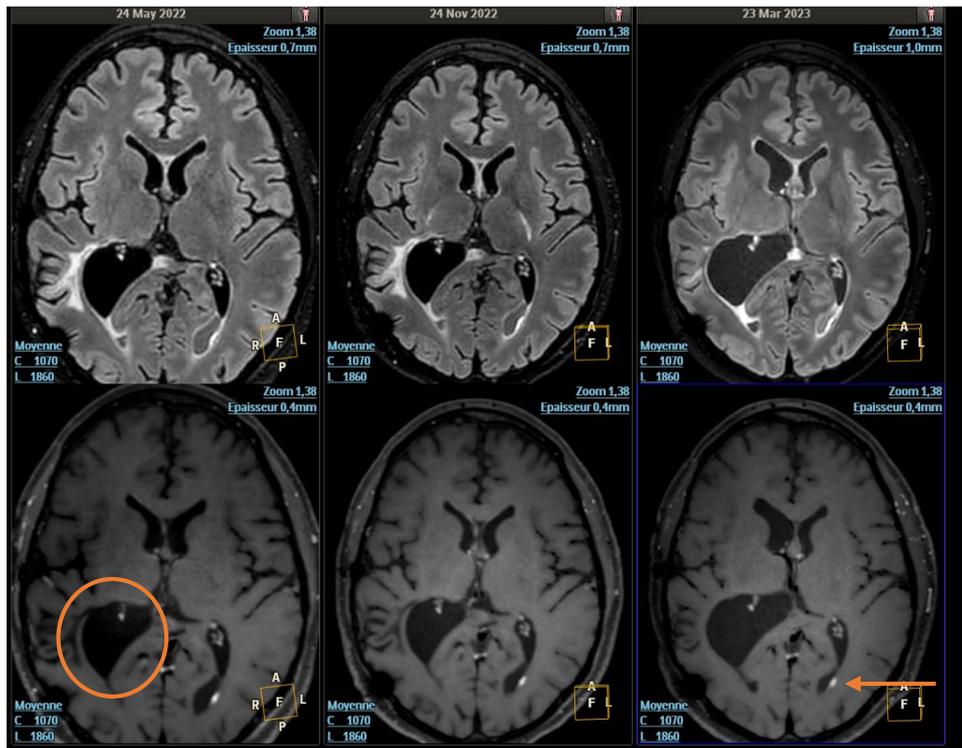


Figure 30 : Coupes frontales et axiales d'IRM de mai 2022 (à gauche), novembre 2022 (au milieu), mars 2023 (à droite). Les flèches orange indiquent les lésions épendymaires. Le rond orange indique la dilatation ventriculaire.

L'histologie des biopsies stéréotaxiques d'avril 2023 retrouvait une prolifération tumorale de densité cellulaire assez élevée, composée de plages de cellules monotones, peu anisocaryotiques, à noyau dense, au cytoplasme clair et bien limité. La prolifération est parsemée d'îlots de neuropile. Les mitoses étaient nombreuses (11/mm²) et il était apparu une prolifération endothélio-capillaire.

En IHC, les cellules étaient marquées par les anticorps anti-synaptophysine, le NeuN. L'anticorps anti-chromogranine était positif sur de rares cellules isolées.

Le marquage par les anticorps anti-GFAP, Olig2, CD34, IDH1^{R132H}, BRAF^{V600E}, P53 étaient négatifs. Il y avait une conservation du marquage nucléaire des cellules tumorales par l'anticorps anti-H3K27me3. Le Ki67 était de 80%.

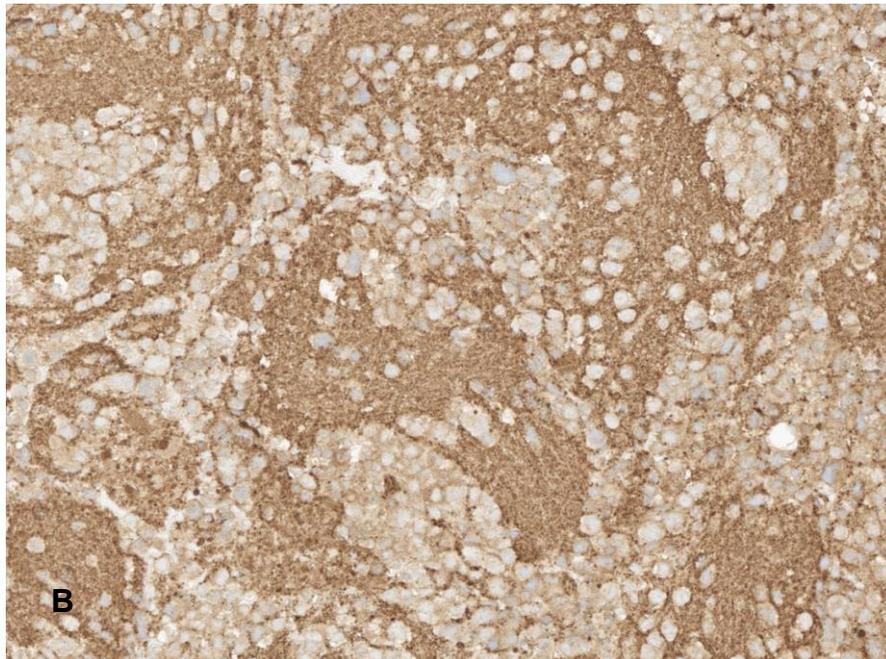
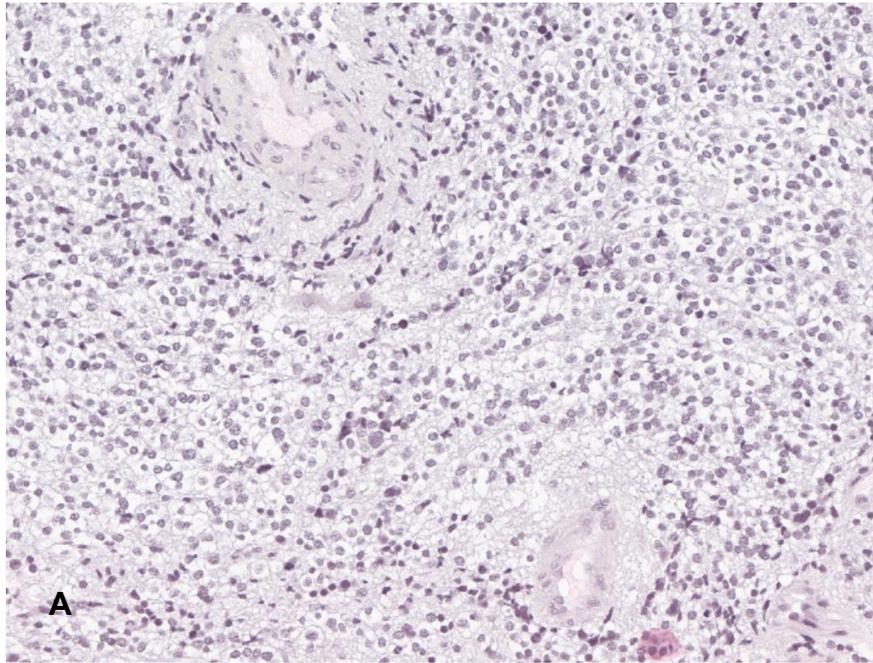


Figure 31 : clichés des biopsies stéréotaxiques d'avril 2023 (HES et IHC, grossissement x10).

A : prolifération tumorale de cellules monotones au cytoplasme clair et au noyau dense, avec une légère anisocaryose.

B : marquage cytoplasmique des cellules tumorales par l'anticorps anti-synaptophysine.

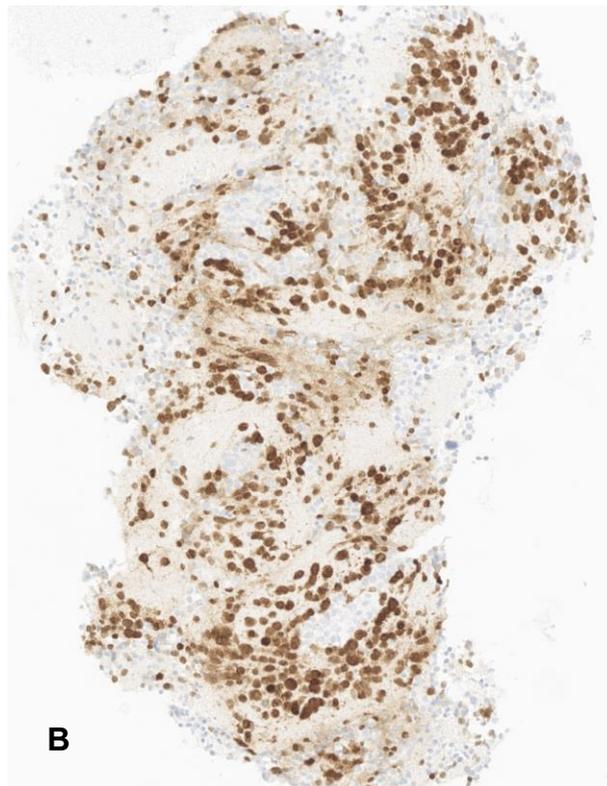
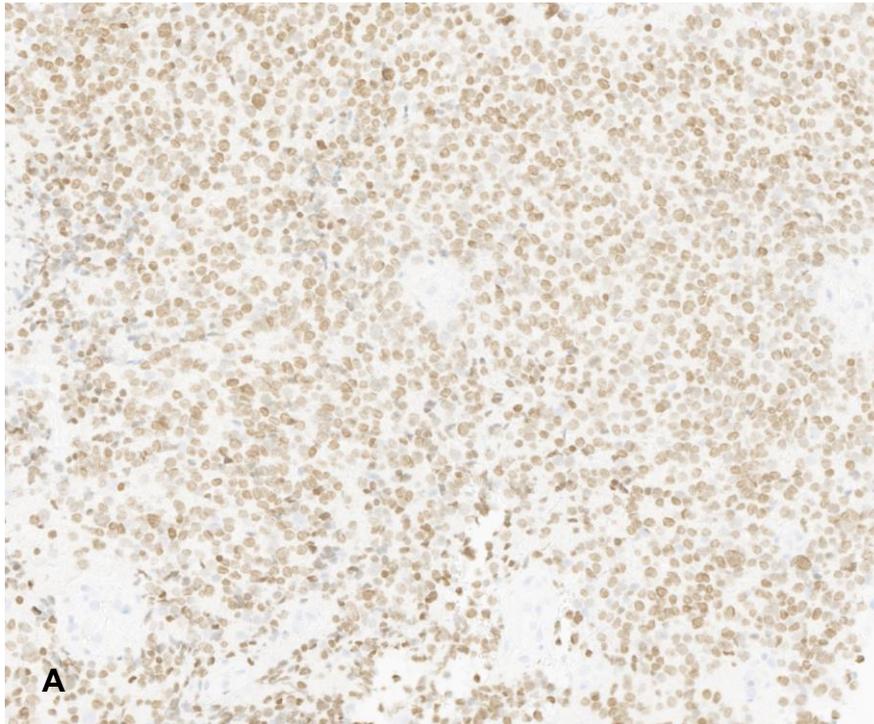


Figure 32 : clichés immunohistochimiques (grossissement x10 et x2,5)

A : marquage nucléaire des cellules tumorales par l'anticorps anti-Olig2

B : marquage nucléaire des cellules tumorales par l'anticorps anti-NeuN.

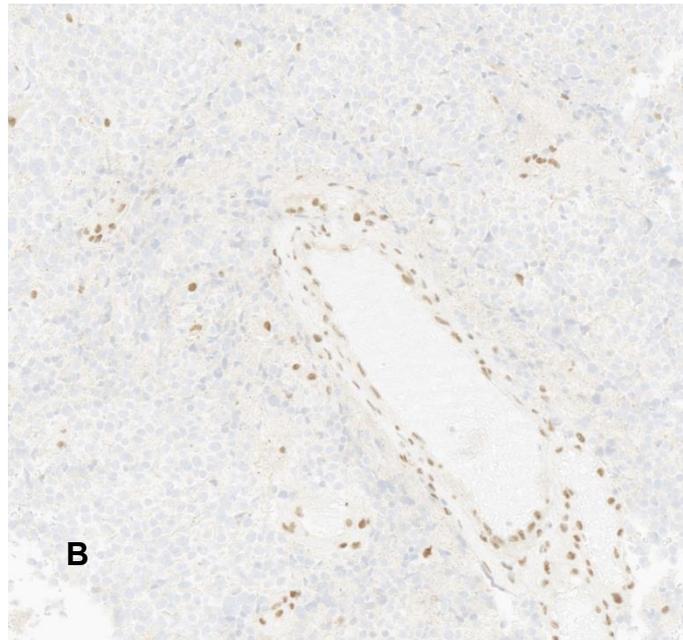
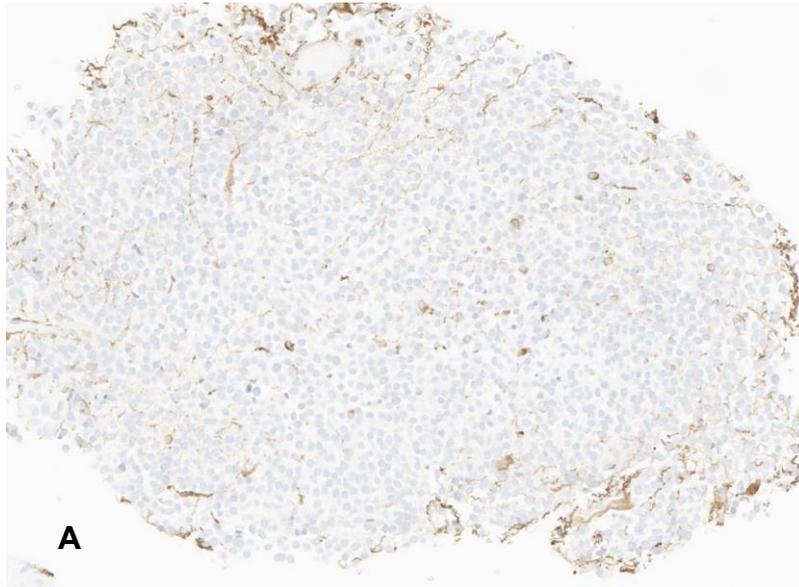


Figure 33 : clichés immunohistochimiques (grossissement x2,5 et x10).

A : marquage par l'anticorps anti-GFAP marquant de rares cellules non tumorales d'aspects gliales.

B : marquage par l'anticorps anti-ATRX montrant une perte d'expression nucléaire des cellules tumorales et un marquage nucléaire conservé par les cellules endothéliales (témoin interne).



Figure 34 : cliché immunohistochimique (grossissement x2,5)

Index de prolifération par le Ki67 montrant un marquage nucléaire d'environ 80% des cellules tumorales.

Il en était conclu une tumeur dont la morphologie et le profil d'expression immunohistochimique sont proches de ceux d'un neurocytome extra-ventriculaire avec néanmoins un index mitotique élevé et une perte d'expression d'ATRX très atypiques qui ne concordent pas avec le diagnostic d'une lésion de bas grade.

Au niveau moléculaire, il n'était pas retrouvé de duplication *FGFR1*.

Un transcrit de fusion *SPECC1L::NTRK2* était mis en évidence, décrit comme oncogénique.

La tumeur se regroupait dans la classe de méthylation des « tumeurs neuro-épithéliale anaplasique avec noyaux condensés » avec un score de calibré de 0,99 en version 12.5 disponible à ce moment.

La version 12.8 classe la tumeur dans « *Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA) (novel)* » avec un score calibré de 0,99.

Classifier prediction (Version 12.8 of the brain classifier; Version: 12.8)

Methylation classes (Highest level >= 0.3, lower levels >= 0.1, all remaining reference groups)	Calibrated score	Interpretation
Adult-type diffuse gliomas	0.99967	match ✓
Diffuse high-grade neuroepithelial tumour [adult-type]	0.99957	match ●
Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (novel)	0.99957	match ●
Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (novel)	0.99957	match ●

Legend: ● Match (score >= 0.9) ✗ No match (score < 0.9); possibly still relevant for low tumor content and low DNA quality cases. ● Match to MC family member (score >= 0.9)

Figure 35 : prédiction du classifieur en version 12.8.

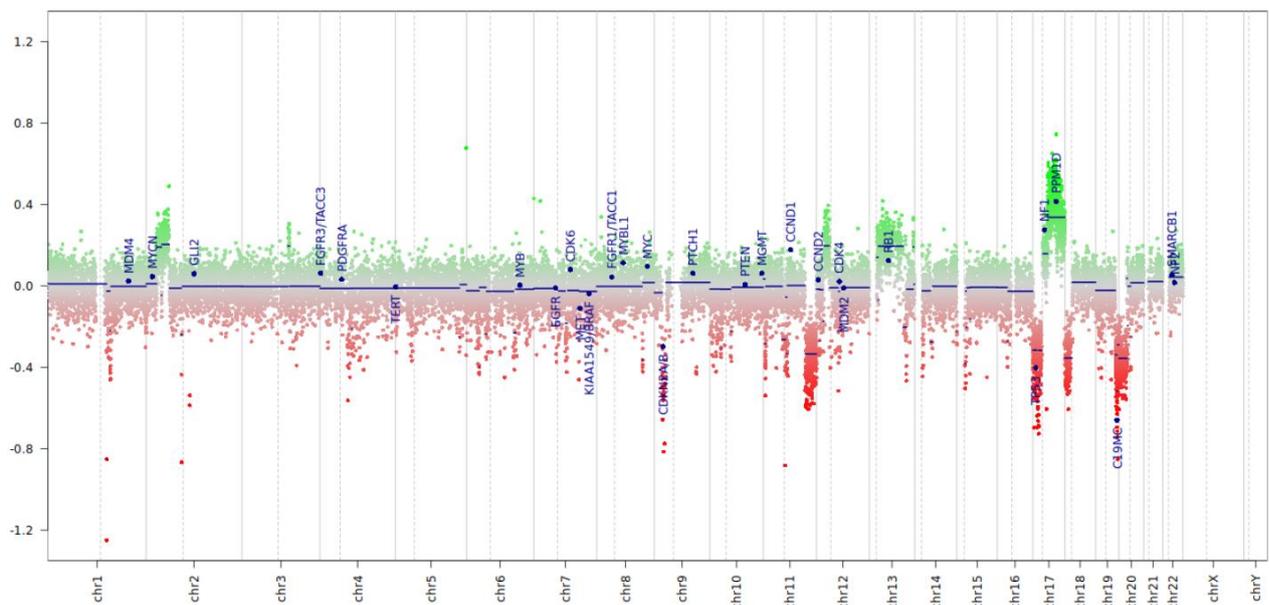


Figure 36 : variations du nombre de copies d'ADN.

A la suite de ce résultat, une nouvelle analyse des données brutes du Archer de l'échantillon de la tumeur de 2009 a permis de retrouver la même fusion

SPECC1L::NTRK2. Celle-ci était présente, mais faiblement, donc filtrée comme non significative.

A la suite de la découverte d'un transcrit de fusion impliquant *NTRK*, une tentative d'inclusion dans l'essai clinique « TAPISTRY » qui vise à évaluer l'efficacité et la tolérance de thérapies ciblées et d'une immunothérapie pour des tumeurs agnostiques caractérisées par un profilage génomique large (cohorte B : entrectinib chez des patients présentant des tumeurs positives pour une fusion *NTRK 1/2/3*).

L'entrectinib est une molécule de type inhibiteur de tyrosine kinase ciblant *NTRK* (neurotrophic tyrosine receptor kinase) (48).

Cependant le patient était inéligible car le transcrit était décrit comme non fonctionnel sans plus d'information.

En considérant la tumeur du patient comme une tumeur glioneuronale de haut grade métastatique, une chimiothérapie par carboplatine étoposide était débutée en juin 2023.

Le patient décédera en août 2023.

4.2 Une nouvelle entité : glioneuronal tumour with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA).

La première description date de 2019 dans un poster rapportant une nouvelle entité de tumeur cérébrale avec fusion de *NTRK* : *anaplastic neuroepithelial tumor with condensed nuclei (ANTCoN)*. Il s'agissait d'un nouveau groupe de tumeurs dont le profil de méthylation formait un cluster séparé qui se distinguait des autres tumeurs déjà décrites (49).

Le GTAKA sera décrit en mars 2023 dans un article publié par le département de neuropathologie d'Heidelberg (50).

La localisation était supratentorielle dans 84% des cas, avec une médiane d'âge au diagnostic de 19 ans.

L'histologie retrouvait une lésion faite de cellule monotone, au noyau rond, condensé, avec un halo clair périnucléaire, une activité mitotique importante ainsi que de la prolifération endothéliocapillaire, accompagnée de cellules ganglionnaires.

En immunohistochimie, les cellules tumorales étaient positives pour la synaptophysine, et Olig2. Le Ki67 étaient d'environ 26%, jusqu'à 65% dans les hotspots.

Sur 20 tumeurs, 16 avaient une perte d'*ATRX*, 16 avaient une fusion impliquant *NTRK1-3*, 11 avaient une délétion homozygote de *CDKN2A/B*.

Les données de survie montraient une survie moyenne sans progression de 12,5 mois.

La durée moyenne de survie était de 30,5 mois.

2 patients, de 16 ans, avaient une tumeur frontale gauche, avec perte d'*ATRX*, et le transcrit de fusion *SPECC1L::NTRK2*, un avait une délétion homozygote de *CDN2A/B*.

1 patient a reçu une thérapie ciblée anti-NTRK par larotrectinib, sans signe de progression à l'IRM sur une durée de 37 mois de suivi (50).

4.3 La fusion *SPECC1L::NTRK2*

Les gènes du neurotrophic tropomyosin-receptor kinase (NTRK) codent pour des récepteurs transmembranaires avec domaine tyrosine kinase (TRK). Les gènes *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* codent pour les récepteurs TRKA, TRKB et TRKC.

La fixation du ligand sur la partie extracellulaire du récepteur entraîne l'activation du domaine kinase, la dimérisation du récepteur TRK puis l'autophosphorylation des tyrosines intracellulaires. Cela active des voies de signalisation intracellulaire par

cascade de phosphorylation (PI3K, MAPK), impliquées dans la croissance, la survie, la migration, et la différenciation cellulaire.

Physiologiquement et à l'âge adulte, ces récepteurs lient des ligands de la famille des neurotrophines.

Des fusions pathologiques entre la partie 3' du gène *NTRK* et la partie 5' d'un gène partenaire aboutissent à la formation de protéine aberrante responsables de l'activation constitutionnelle du récepteur (51).

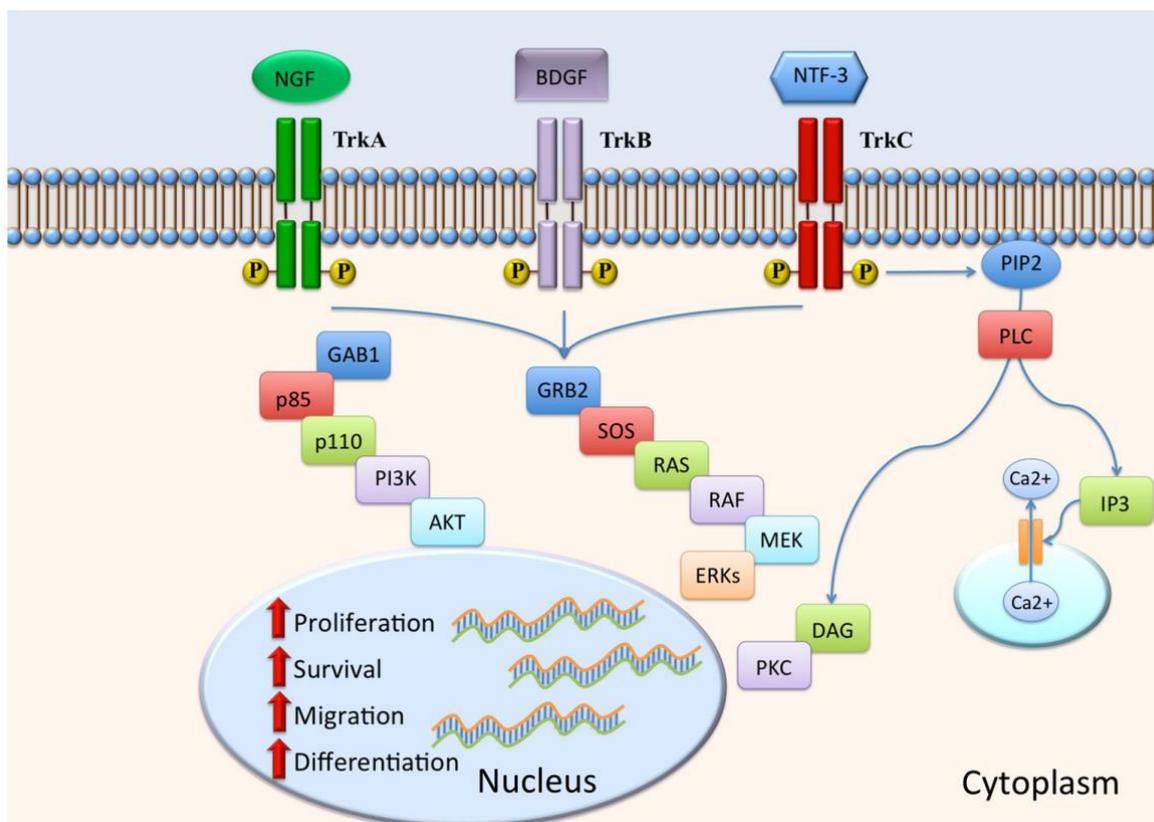


Figure 37 : représentation schématique des récepteurs TRK, des voies de signalisations intracellulaires ainsi que leur conséquences sur le fonctionnement de la cellule (52).

SPECC1L (sperm antigen with calponin homology and coiled-coil domains 1 like) est une protéine du cytosquelette associée aux microtubules impliquée dans la morphogénèse faciale (53).

Les fusions impliquant *SPECC1L* et *NTRK 2* et 3 ont été décrites dans un fibrosarcome infantile et deux tumeurs pédiatriques cérébrales étiquetées astrocytome anaplasique et une tumeur neuroépithéliale de bas grade en 2020 (54), ainsi que dans un cas de sarcome du col de l'utérus publié également en 2020 (55).

Dans notre cas, la fusion implique l'exon 11 de *SPECC1L* et l'exon 16 de *NTRK2*.



Figure 38 : visualisation des données de séquençage de nouvelle génération (Jbrowse 1.11.6). Représentation schématique de la fusion impliquant *SPECC1L* et *NTRK2*.

Obtenue grâce à l'aimable participation du Dr Clotilde DESCARPENTRIES (biologiste moléculaire, CHU de Lille).

5. Discussion

L'utilisation du méthylome dans le département de pathologie du CHU de Lille est une forte plus-value dans le diagnostic intégré des tumeurs du système nerveux central, mais dépendante de la qualité intrinsèque du prélèvement, et de la reproductibilité des phases pré-analytiques, analytiques et post-analytiques.

Dans la littérature, différents résultats avec un impact majeur du méthylome ont été rapportés.

Dans une série d'octobre 2016 à avril 2018 de 502 patients du Centre Médical de Utrecht et du Centre Princesse Maxima d'oncologie pédiatrique (PMC) aux Pays-Bas, sur les tumeurs ayant eu un score de méthylation significatif (66% d'entre elles) (56) :

- 41% ont eu une confirmation diagnostique,
- 13,3% une confirmation et précision du diagnostic,
- 9,8% un nouveau diagnostic,
- 1% un mauvais diagnostic.

33,7% ont eu un score calibré inférieur à 0,9.

A noter que parmi les tumeurs ayant eu un score entre 0,7 et 0,9 :

- 51,7% d'entre elles ont eu une confirmation du diagnostic,
- 5% une confirmation et précision,
- Tandis que 20% ont eu un mauvais diagnostic.

Dans une série de novembre 2015 à novembre 2018 du centre de neuro-oncologie du Princess Margaret à Toronto, sur 1670 diagnostics, 55 tumeurs du SNC étaient de diagnostic difficile (57):

- 24% ont eu un changement de diagnostic,

- 18% ont vu leur grade augmenté,
- 11% ont eu leur statut 1p/19q précisé.

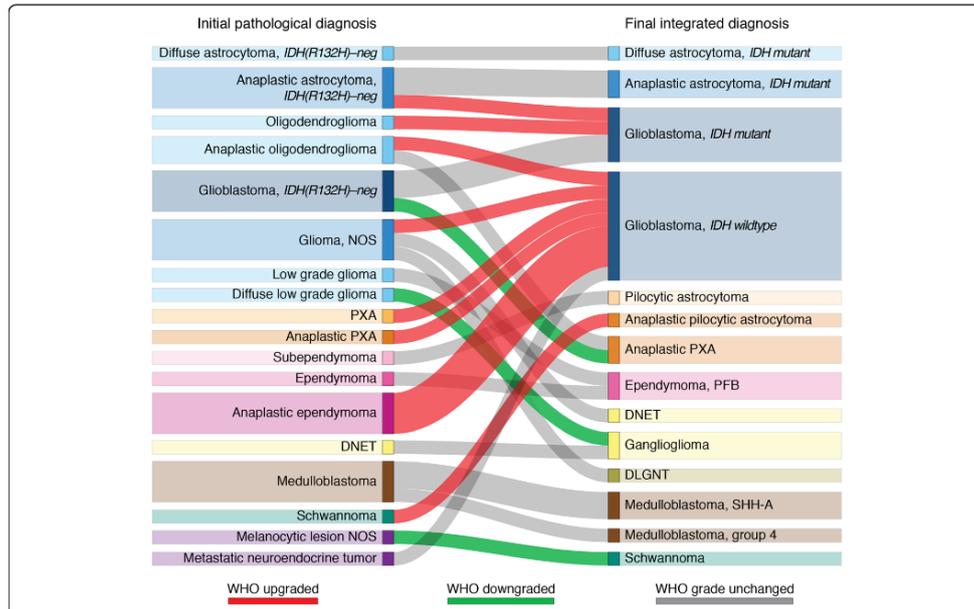


Figure 39 : représentation schématique tirée de la cohorte du centre Princess Margaret sur l'actualisation diagnostique et pronostic post-méthylome. A gauche les tumeurs avant méthylome. A droite après diagnostic intégré. Les courbes intercalées indiquent vers quel diagnostic final le diagnostic initial a été redirigé. La couleur de la courbe indique si le grade a été modifié selon la couleur de la légende. L'épaisseur des rectangles varie selon le nombre de tumeur concerné (57).

Table 3 Diagnostic impacts of methylation profiling

Category		N	%
Diagnostic effect ^e	Change in diagnosis	13	24
	Resolution of differential diagnosis	17	31
	Molecular refinement	16	29
	Diagnostic validation	9	16
WHO grade change ^e	Upgrade	10	18
	Downgrade	3	5
	Assign grade	2	4
	Unchanged	40	73
All molecular refinements ^e	Change in IDH mutation status	9	16
	Final determination of an unclear IDH mutation status	23	42
	Identification of molecular subtype	20	36
	Determination of 1p/19q co-deletion status	6	11

^bn = 47^en = 55

Figure 40 : impact du profil de méthylation sur la cohorte du centre de Neuro-Oncologie Princess Margaret de Toronto. L'encadré rouge précise le pourcentage de patients ayant eu des modifications dans leur diagnostic, grade ou résultat moléculaire (57).

Dans la cohorte du département de neuropathologie du Londons Hospital publié en 2019, 325 cas ont eu un méthylome, 179 ont eu un score > 0,84. Parmi ces cas, 25% ont eu un diagnostic confirmé, 48% précisé, et 25% un autre diagnostic (58).

Dans la cohorte « The AIM BRAIN Project » publié en juin 2023 impliquant 11 centres de cancérologie pédiatriques en Australie et en Nouvelle Zélande, 265 patients pédiatriques ont été inclus. 176 (soit 67%) ont eu un score significatif > 0,9. Sur ces 176 tumeurs, 162 soit 92% avaient un diagnostic concordant à l'histologie (59). A noter que cette étude a été réalisée sur le classifieur 11b4 et 12.5, et que la version 2016 de la classification OMS des tumeurs du SNC était en vigueur.

Dans notre étude, les cas similaires ont été regroupés sur le principe du diagnostic intégré, avec les données histologiques, immunohistochimiques, génétiques et épigénétiques nécessaires au diagnostic final.

Face à l'hétérogénéité des tumeurs, parfois au sein d'une même grande catégorie diagnostique, la quantité de matériel disponible amène à hiérarchiser les analyses moléculaires afin d'épargner la réserve tissulaire : la séquence et le choix des techniques choisies sont personnalisés.

Dans ce but de réserver le prélèvement aux seules analyses nécessaires et suffisantes au diagnostic intégré, des auteurs suggèrent de substituer d'emblée le méthylome à :

- la CGH pour détecter des anomalies chromosomiques (la délétion 1p/19q des oligodendrogliomes, le gain du chromosome 7 et perte 10 des glioblastomes, les amplifications *EGFR*, *PDGFRA*, *C19MC...*),
- le pyroséquençage pour déterminer le statut de méthylation du promoteur de la *MGMT*,
- le NGS pour la mutation *d'IDH*.
- le Archer pour les transcrits spécifiques.

Or :

⇒ Le méthylome prédit une courbe de Copy Number Variation mais celle-ci n'est pas l'équivalent de la CGH, cette dernière détecte les amplifications et délétions grâce à un ADN non tumoral témoin, et permet une analyse plus fine notamment en cas de perte ou gains chromosomiques partiels. Le logiciel d'interprétation utilisé permet d'explorer spécifiquement un gène ou une région chromosomique et d'explorer plus en détails les gains ou pertes chromosomiques.

- ⇒ Les îlots CpG pour déterminer le statut de méthylation du promoteur de la *MGMT* ne sont pas les mêmes par pyroséquençage que par méthylome. C'est par pyroséquençage que les données ont été validées via des études cliniques avec l'établissement d'un seuil de pourcentage de méthylation, permettant d'indiquer ou non le traitement par témozolomide (60) (61).

- ⇒ Le NGS reste le « gold standard » pour rechercher les mutations d'*IDH*, et il permet de détecter des mutations rares ou très rares (n'étant pas détectées par IHC anti-IDH1^{R132H}) méconnues des systèmes de classifications qui sont basés sur des anomalies dont la fréquence a permis de constituer des « clusters » d'effectifs statistiquement significatifs.

- ⇒ La technique Archer qui propose des panels de gènes étendus, ainsi qu'une plateforme internet dédiée à l'interprétation de ces données.

Si nous revenons sur certains diagnostics, en accord avec la classification OMS 2021 et les données de la littérature, l'indication du méthylome lors de la prise en charge par le pathologiste apparaît pertinente dans de multiples situations.

Pour les gliomes diffus de l'adulte, le méthylome a permis d'affirmer le diagnostic pour 21 patients et 12 ont eu un méthylome à la limite de la significativité mais concordant, sur les 55 patients passés. Les autres patients ayant eu un méthylome non significatif ont quand même eu leur diagnostic précisé grâce aux autres techniques moléculaire (telle que la délétion homozygote de *CDKN2A* en CGH par

exemple) en accord avec les recommandations (62) à l'exception de 2 patients qui ont eu un diagnostic final de gliome diffus de haut grade NEC. Ceci en adéquation avec les données de la littérature, notamment pour affiner le grade des astrocytomes, oligodendrogliomes, mais aussi les tumeurs gliales initialement non typables ni gradables (63) (64) (65) (66) . Le méthylome précise des sous-types moléculaire des glioblastomes : RTK 1, 2, mésenchymateux, avec composante neuronale primitive, mais aussi de nouvelles catégories de gliome diffus de haut grade *IDH* non muté : les sous-types E et F (67).

Pour les gliomes diffus de haut grade de sous-type pédiatrique, 9 patients ont un méthylome significatif sur les 10 diagnostics suspectés morphologiquement. Sur 7 patients avec une morphologie de gliome de haut grade difficilement classable, les 7 ont eu un méthylome significatif pour « gliome diffus «H3 altéré » ou « gliome diffus *IDH* non muté H3 non altéré ». Le méthylome permet également d'identifier plus précisément les cas d'altérations d'*EGFR* ou de surexpression d'*EZH1P*, parfois difficilement détectés par séquençage NGS ou par IHC (68) (69).

Pour les gliomes circonscrits astrocytaires, le méthylome a permis d'affiner le diagnostic notamment pour les cas avec morphologie équivoque ou les cas non résolus comme indiqué dans la littérature (70). Sur 28 patients, 11 cas d'astrocytome pilocytique ont été confirmés, et 2 cas non confirmés, mais expliqués par un contexte de NF1 (71) . Grâce au méthylome, 7 patients ont pu être diagnostiqués précisément, en accord avec des données similaires de la littérature : 2 HGAP (72), 3 astroblastomes avec altération de *MN1* (73), et 3 PXA (74).

Concernant les médulloblastomes, le méthylome est essentiel et établi comme critère par l’OMS. Nos données vont dans le même sens et concorde avec la littérature (75), sur les 10 patients de la cohorte 8 patients avaient un diagnostic concordant avec précision de la voie moléculaire impliquée. Les médulloblastomes sont séparées en plusieurs sous-types moléculaires (WNT, SHH, non-WNT/non-SHH) qui interviennent directement dans le choix thérapeutique et le pronostic des patients (76). Il existe par ailleurs 8 sous-classes différentes (I à VIII), établies par le méthylome uniquement (77).

Les tumeurs embryonnaires, impliquant les voies ou des mutations *FOXR2*, *BCOR*, les *ATRT* (qui sont regroupées selon leur voie moléculaires (SHH, TYR, MYC) (78) (79), de même que les *ETMR* (*C19MC* altéré, *DICER1* muté) (80) (81) se sont bien regroupées dans la cohorte, avec sur les 8 patients, 7 ayant eu un méthylome significatif ou quasi-significatif. Ceci concorde avec la littérature avec par exemple une confirmation diagnostique de 65 cas sur 97 cas (dont 85 réellement informatifs) dans une série rétrospective Hong-Kongaise de 1997 à 2017 (utilisant la version 11b4 du classifieur), de tumeurs embryonnaires (82).

Les tumeurs épendymaires, sont également classées selon leurs voies moléculaires (83) : les épendymomes avec fusion de *ZFTA* et *YAP1* en supra-tentorial, les épendymomes PF-A et PF-B en fosse postérieure. Sur nos 35 patients, 19 avaient un résultat significatif, et 4 quasi-significatif. Un article récent, publié en juillet 2023, portant sur une série de cas de 1990 à 2020 réalisée dans sept centres de neuropathologie en Allemagne et un en Suisse, a rapporté un taux de concordance

de 73,5 % pour le diagnostic de tumeur épépendymaire, sur une cohorte de 170 patients (84).

Pour les tumeurs mélanocytaires : la seule morphologie ne suffit pas à déterminer leur origine, l'analyse des mutations (telles que *GNAQ*, *NRAS*, la perte de *BAP1* pour les tumeurs primaires, la mutation *BRAF^{V600E}* pour une partie des tumeurs secondaires) et certaines pertes chromosomiques permettent de distinguer les tumeurs primaires ou secondaires (85), en association au bilan d'extension clinique indispensable. Le méthylome permet de caractériser d'emblée ce caractère primaire ou secondaire. Sur nos 5 patients, 3 ont un méthylome significatif et une origine précisée, 1 à la limite de la significativité. L'importance et la performance du diagnostic intégré est rapporté dans une cohorte de 80 tumeurs mélanocytaires des départements de neuropathologie d'Heidelberg, Bonn et Essen (86).

Une partie des tumeurs neuroépithéliales de bas grade n'a pas eu de score significatif en méthylome. Ceci peut s'expliquer par l'hétérogénéité des altérations génétiques impliquant les voies MAPK et/ou MTOR (87), des transcrits, mutations, (parfois multiples) spécifiques, rares et peu décrits mais retrouvés par technique Archer et NGS (88). Des altérations sont communes entre les entités, par exemple les transcrits impliquant *FGFR1,2,3* (89) mais impliquent des partenaires de fusions non décrits.

Pour les diagnostics où le méthylome n'est pas nécessairement indiqué (mentionnés « unresolved lésions » dans l'OMS 2021 pour lésions non résolues), notamment les

tumeurs « non rares », l'utilisation systématique du méthylome est défendue par des auteurs (90). Il n'y a que le méthylome qui permette d'effectuer par exemple le regroupement des glioblastomes RTK I, II, III, pro-neural, mésenchymateux, sous-groupes E et F et des méningiomes bénins 1,2, 3 et intermédiaires A et B ; l'impact de ces sous-catégories reste à prouver (44).

La qualité des analyses moléculaires dépend d'un certain nombre de facteurs intrinsèques au prélèvement, pouvant perturber sa qualité et le résultat définitif.

L'analyse du profil de méthylation requiert une certaine quantité d'ADN, 1000 ng était requis au démarrage de notre étude (ce qui est beaucoup, à titre de comparaison, la CGH en requiert 500 ng pour être optimale), 250 ng sont suffisants dorénavant.

Un matériel d'origine biopsique peut donc être un facteur limitant par sa faible taille et représentativité.

Selon les tumeurs, la présence de nécrose, une faible proportion de cellules tumorales, une population de cellules non tumorales trop importante (inflammatoire lymphocytaire, gliose réactionnelle...) apporterait un matériel génétique proportionnellement non pathologique pouvant altérer le résultat définitif. L'utilisation d'algorithme de déconvolution permet cependant de filtrer les données issues des cellules inflammatoires (19).

De plus, la partie technique de préparation des échantillons est longue (1 semaine complète) et délicate. Elle nécessite des techniciens expérimentés et habitués à ce genre de protocole comportant de multiples étapes, notamment manuelles, nécessitant le maniement de nombreux réactifs, lors de multiples séquences. Il y a ainsi des risques de contamination, de dégradation du matériel, et le contournement

de certaines contraintes de température ou de temps d'incubation précis nuisent à la qualité définitive de l'analyse. La conversion bisulfite qui est une partie centrale est décomposée en de multiples étapes délicates. Elle peut entraîner une dégradation de l'ADN et des erreurs (conversion de cytosines non méthylées en uraciles, conversion partielle des cytosines méthylées...) (91).

En 2024, le méthylome doit toujours être utilisé comme un outil à visée de recherche, comme cela est indiqué sur le site moleculareuropathology.org. Son utilisation répond difficilement aux exigences des normes de qualité propres aux laboratoires de biologie médicale.

Une partie de l'analyse des données brut relève ainsi de la sous-traitance mais sans pouvoir évaluer le sous-traitant, alors que l'OMS prévoit qu'il faut utiliser l'outil à visée diagnostique dans un nombre croissant de cas.

C'est l'université d'Heidelberg qui a la mainmise sur l'algorithme d'utilisation du méthylome et celui-ci n'est pas librement accessible par les autres centres.

Ce sont 10 000 sondes ciblant les cytosines méthylées qui ont été utilisées pour développer le classifieur. Ces sondes ont été sélectionnées comme étant les plus efficaces pour distinguer, classer et séparer les différents groupes de tumeurs dans le modèle de forêt aléatoire (random forest) créé (66).

La question se pose d'une banque de données épigénétiques (type idat) mondiale (tel que la base TCGA aux Etats-Unis (92)), nationale, voire locale, accessible à tous avec une information totalement transparente sur la manière dont sont utilisées les idat et l'algorithme utilisé. Ce n'est pas le cas pour le dkfz : l'origine des quelques

158 000 cas téléchargés dont 118 000 pour mettre à jour le classifieur n'est ni accessible ni analysable en ligne.

La valeur diagnostique de l'analyse par le classifieur varie d'un instant à l'autre : le système est dynamique et en permanence incrémenté de nouvelles tumeurs du monde entier.

A une époque où les techniques de biologie moléculaire deviennent de plus en plus sophistiquées et précises, il est essentiel de réfléchir à leur impact médico-économique. Bien que ces méthodes apportent une précision diagnostique et ouvrent la voie à des traitements personnalisés, leur coût reste non négligeable, que ce soit financier pur mais également en termes de mobilisation des équipes. Il sera donc nécessaire d'évaluer le rapport coût-efficacité de ces technologies et de bien hiérarchiser les demandes, en prenant en compte les bénéfices cliniques qu'elles apportent, notamment en termes de diagnostic plus rapide, de réduction des traitements inappropriés et d'amélioration des résultats thérapeutiques. Cela permettrait d'optimiser les ressources disponibles tout en garantissant un accès équitable à ces innovations pour l'ensemble des patients.

Il faudra ainsi questionner la plus-value d'autres techniques permettant d'analyser la méthylation de l'ADN, tel que le nanopore évoqué au début du manuscrit, développé par Oxford Technologies (93), décrite comme plus rapide et moins coûteuse que la technologie Illumina : elle permet de lire de très longues séquences d'ADN (et donc de s'intéresser à de plus grandes régions du génome), ne nécessite pas de traitement préalable de l'échantillon ni de conversion bisulfite. Elle ne se base pas

sur le séquençage par synthèse mais utilise en temps réel un différentiel de tension au niveau du nanopore dans lequel passe les molécules d'ADN (94).

Le méthylome ouvre des perspectives pour étendre cette technique à d'autres types de tumeurs, comme celles de la peau ou les sarcomes qui ont aussi leur classifieur sur le site molecularneuropathology.org, mais dont l'utilisation est moins répandue qu'en neuropathologie. D'autres applications existent notamment pour les maladies non cancéreuses comme les maladies neurodégénératives et l'épilepsie (95,96).

Il est également pertinent d'explorer l'utilisation d'autres classifieurs, tels que ceux développés en Amérique du Nord, ainsi que des technologies alternatives à la fluorescence, comme le séquençage par nanopore.

La méthylation de l'ADN n'est pas le seul mécanisme épigénétique exploré en neuro-oncologie, il existe aussi l'acétylation (97), l'étude des microRNA (98), mais c'est le seul ayant mené à de tels développements appliqués aux diagnostics quotidiens.

Enfin, ces évolutions interrogent sur la formation des praticiens pathologistes en biologie moléculaire, mathématiques et en bio-informatique.

Bibliographie

1. Gautier Defossez Sandra Le Guyader-Peyrou Zoé Uhry Pascale Grosclaude Marc Colonna Emmanuelle Dantony Patricia Delafosse Florence Molinié Anne-Sophie Woronoff Anne-Marie Bouvier Laurent Remontet Nadine Bossard Alain Monnereau. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 [Internet]. Santé Publique France; 2019. Disponible sur: raumatismes/cancers/cancer-du-sein/documents/rapport-synthese/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018--1-tumeurs-solides-etud
2. Institut National du Cancer. Les cancers en France en 2018 - L'essentiel des faits et chiffres (édition 2019) [Internet]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Les-cancers-en-France-en-2018-L-essentiel-des-faits-et-chiffres-edition-2019>
3. Lapôtre-Ledoux B, Benedicte LL, Dantony E, Grosclaude P, Molinié F, Woronoff AS, et al. // MAIN CANCERS INCIDENCE IN METROPOLITAN FRANCE IN 2023 AND TRENDS SINCE 1990.
4. Panorama des cancers 2023, Institut National du Cancer, Edition 2023.
5. LA LUTTE CONTRE LES CANCERS PÉDIATRIQUES EN FRANCE Enjeux, actions et perspectives - Institut National du Cancer 2023.pdf.
6. Sant M, Minicozzi P, Lagorio S, Børge Johannesen T, Marcos-Gragera R, Francisci S, et al. Survival of European patients with central nervous system tumors. *Int J Cancer*. juill 2012;131(1):173-85.
7. Louis DN, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Ellison DW, Hawkins C, et al. Announcing cIMPACT-NOW: the Consortium to Inform Molecular and Practical Approaches to CNS Tumor Taxonomy. *Acta Neuropathol (Berl)*. janv 2017;133(1):1-3.
8. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021 [cited YYYY Mmm D]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/45>. [Internet]. [cité 14 août 2024]. Disponible sur: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chaptercontent/45/261>
9. Figarella-Branger D, Appay R, Metais A, Tauziède-Espariat A, Colin C, Rousseau A, et al. La classification de l'OMS 2021 des tumeurs du système nerveux central. *Ann Pathol*. oct 2022;42(5):367-82.
10. Uro-Coste PE, Nicaise Y. Le Méthylome est il l'avenir de l'Homme?! - Carrefour Pathologie 2022.
11. Filion G, Defossez PA. Les protéines se liant à l'ADN méthylé : interprètes du code épigénétique. *médecine/sciences*. janv 2004;20(1):7-8.

12. AquaPortail [Internet]. [cité 14 août 2024]. Dinucléotide CpG : définition et explications. Disponible sur: <https://www.aquaportail.com/dictionnaire/definition/15037/dinucleotide-cpg>
13. Jeune ML. Planet-Vie. 2016 [cité 14 août 2024]. Épigénétique et cancer. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/sante/pathologies/epigenetique-et-cancer>
14. calameo.com [Internet]. [cité 14 août 2024]. Science&Santé n°11 - Épigénétique - Comment se joue la partition du génome ? Disponible sur: <https://www.calameo.com/read/005154450735fdb3e0ce>
15. Deltour S, Chopin V, Leprince D. Modifications épigénétiques et cancer. *médecine/sciences*. avr 2005;21(4):405-11.
16. Stirzaker C, Taberlay PC, Statham AL, Clark SJ. Mining cancer methylomes: prospects and challenges. *Trends Genet*. févr 2014;30(2):75-84.
17. 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 (Berl)*. août 2018;136(2):181-210.
18. La méthylation de l'ADN - Labster [Internet]. [cité 14 août 2024]. Disponible sur: <https://theory.labster.com/fr/dna-methylation/>
19. Ferro Dos Santos MR, Giuili E, De Koker A, Everaert C, De Preter K. Computational deconvolution of DNA methylation data from mixed DNA samples. *Brief Bioinform*. 27 mars 2024;25(3):bbae234.
20. Titus AJ, Gallimore RM, Salas LA, Christensen BC. Cell-type deconvolution from DNA methylation: a review of recent applications. *Hum Mol Genet*. 1 oct 2017;26(R2):R216-24.
21. Baylet L. Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse. 2021 [cité 14 août 2024]. Déconvolution: (description de la composition du microenvironnement tumoral) vers la médecine personnalisée. Disponible sur: <https://www.crct-inserm.fr/deconvolution-description-de-la-composition-du-microenvironnement-tumoral-vers-la-medecine-personnalisee/>
22. Gunay D. Random Forest [Internet]. Medium. 2023 [cité 15 août 2024]. Disponible sur: <https://medium.com/@denizgunay/random-forest-af5bde5d7e1e>
23. Hench J, Hultschig C, Brugger J, Mariani L, Guzman R, Soleman J, et al. EpiDiP/NanoDiP: a versatile unsupervised machine learning edge computing platform for epigenomic tumour diagnostics. *Acta Neuropathol Commun*. 4 avr 2024;12(1):51.
24. Alhalabi KT, Stichel D, Sievers P, Peterziel H, Sommerkamp AC, Sturm D, et al. PATZ1 fusions define a novel molecularly distinct neuroepithelial tumor entity with a broad histological spectrum. *Acta Neuropathol (Berl)*. nov 2021;142(5):841-57.
25. Simpson JT, Workman RE, Zuzarte PC, David M, Dursi LJ, Timp W. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing. *Nat Methods*. avr 2017;14(4):407-10.

26. Kuschel LP, Hensch J, Frank S, et al. Robust methylation-based classification of brain tumours using nanopore sequencing. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2023;49(1):e12856. doi:10.1111/nan.12856.
27. Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. Fundamentals of Pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 1 sept 2013;137(9):1296-303.
28. Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;
29. Zhao H, Fang X, Xue B. Four methods to analyze H3K27M mutation in diffuse midline gliomas. *Pathol - Res Pract.* sept 2020;216(9):153065.
30. Pascale VARLET, et al. Diffuse midline glioma, H3 K27-altered. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2021. . (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 6). <https://publications.iarc.fr/601>. In.
31. Nguyen AV, Soto JM, Gonzalez SM, Murillo J, Trumble ER, Shan FY, et al. H3G34-Mutant Gliomas—A Review of Molecular Pathogenesis and Therapeutic Options. *Biomedicines.* 15 juill 2023;11(7):2002.
32. Validation de méthode en génétique somatique, Institut National du Cancer, Septembre 2014.
33. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV”. *Acta Neuropathol (Berl).* nov 2018;136(5):805-10.
34. Sahm F, Schrimpf D, Olar A, Koelsche C, Reuss D, Bissel J, et al. TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma. *J Natl Cancer Inst.* mai 2016;108(5):djv377.
35. Wolter M, Felsberg J, Malzkorn B, Kaulich K, Reifenberger G. Droplet digital PCR-based analyses for robust, rapid, and sensitive molecular diagnostics of gliomas. *Acta Neuropathol Commun.* déc 2022;10(1):42.
36. Abarna R, J R, Chacko G, Pai R. Droplet digital PCR (ddPCR) using FFPE DNA to assess methylation status of *MGMT* gene among patients with *IDH* mutant astrocytoma and *IDH* wild-type glioblastoma. *J Clin Pathol.* déc 2023;76(12):860-4.
37. Ellison DW, Hawkins C, Jones DTW, Onar-Thomas A, Pfister SM, Reifenberger G, et al. cIMPACT-NOW update 4: diffuse gliomas characterized by MYB, MYBL1, or FGFR1 alterations or BRAFV600E mutation. *Acta Neuropathol (Berl).* avr 2019;137(4):683-7.
38. La PCR digitale (dPCR) pour les débutants – QIAGEN [Internet]. [cité 15 août 2024]. Disponible sur: <http://www.qiagen.com/fr/applications/digital-pcr/beginners>

39. NextSeq 550 - Séquenceur de nouvelle génération pour ADN by Illumina, Inc. | MedicalExpo [Internet]. [cité 28 août 2024]. Disponible sur: <https://www.medicalexpo.fr/prod/illumina-inc/product-83632-604905.html>
40. Lehman NL. Early ependymal tumor with MN1-BEND2 fusion: a mostly cerebral tumor of female children with a good prognosis that is distinct from classical astroblastoma. *J Neurooncol.* févr 2023;161(3):425-39.
41. Paediatric astroblastoma-like neuroepithelial tumour of the spinal cord with a MAMLD1-BEND2 rearrangement - Rossi - 2022 - *Neuropathology and Applied Neurobiology* - Wiley Online Library [Internet]. [cité 4 sept 2024]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nan.12814>
42. Jain P, Surrey LF, Straka J, Luo M, Lin F, Harding B, et al. Novel FGFR2-INA fusion identified in two low-grade mixed neuronal-glia tumors drives oncogenesis via MAPK and PI3K/mTOR pathway activation. *Acta Neuropathol (Berl).* juill 2018;136(1):167-9.
43. Lee JC, Mazor T, Lao R, Wan E, Diallo AB, Hill NS, et al. Recurrent KBTBD4 small in-frame insertions and absence of DROSHA deletion or DICER1 mutation differentiate pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation (PPTID) from pineoblastoma. *Acta Neuropathol (Berl).* mai 2019;137(5):851-4.
44. Sahm F, Schrimpf D, Stichel D, Jones DTW, Hielscher T, Schefzyk S, et al. DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* mai 2017;18(5):682-94.
45. John P, Waldt N, Liebich J, Kessler C, Schnabel S, Angenstein F, et al. AKT1E17K-mutated meningioma cell lines respond to treatment with the AKT inhibitor AZD5363. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2022;48(2):e12780.
46. Liu C, Liu Y, Zhao Y, Wei J, Ma Y, Liu Y, et al. Primary Intracranial Mesenchymal Tumor with EWSR1-CREM Gene Fusion: A Case Report and Literature Review. *World Neurosurg.* oct 2020;142:318-24.
47. Zhang WH, Zhang SY, Hou QQ, Qin Y, Chen XZ, Zhou ZG, et al. The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2 sept 2020;10:1214.
48. Cocco E, Scaltriti M, Drilon A. NTRK fusion-positive cancers and TRK inhibitor therapy. 2019;
49. Kirches E, Sahm F, Blücher C, Boeckhoff S, Schüller U, Schittenhelm J, et al. *NEURO-ONCOLOGY* • APRIL 2019.
50. Bogumil H, Sill M, Schrimpf D, Ismer B, Blume C, Rahmzade R, et al. Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA): a molecularly distinct brain tumor type with recurrent NTRK gene fusions. *Acta Neuropathol (Berl).* mai 2023;145(5):667-80.

51. Ouali K, Pellat A, Cohen R, Svrcek M, Penault-Llorca F, André T. Fusions NTRK : une nouvelle piste dans les cancers digestifs ? Bull Cancer (Paris). avr 2020;107(4):447-57.
52. Ricciuti B, Brambilla M, Metro G, Baglivo S, Matocci R, Pirro M, et al. Targeting NTRK fusion in non-small cell lung cancer: rationale and clinical evidence. Med Oncol. juin 2017;34(6):105.
53. Saadi I, Goering JP, Hufft-Martinez BM, Tran PV. SPECC1L: a cytoskeletal protein that regulates embryonic tissue dynamics. Biochem Soc Trans. 28 juin 2023;51(3):949-58.
54. Khuong-Quang DA, Brown LM, Wong M, Mayoh C, Sexton-Oates A, Kumar A, et al. Recurrent *SPECC1L-NTRK* fusions in pediatric sarcoma and brain tumors. Mol Case Stud. déc 2020;6(6):a005710.
55. Rabban JT, Devine WP, Sangoi AR, Poder L, Alvarez E, Davis JL, et al. *NTRK* fusion cervical sarcoma: a report of three cases, emphasising morphological and immunohistochemical distinction from other uterine sarcomas, including adenocarcinoma. Histopathology. juill 2020;77(1):100-11.
56. Priesterbach-Ackley LP, Boldt HB, Petersen JK, Bervoets N, Scheie D, Ulhøi BP, et al. Brain tumour diagnostics using a DNA methylation-based classifier as a diagnostic support tool. Neuropathol Appl Neurobiol. août 2020;46(5):478-92.
57. Karimi S, Zuccato JA, Mamatjan Y, Mansouri S, Suppiah S, Nassiri F, et al. The central nervous system tumor methylation classifier changes neuro-oncology practice for challenging brain tumor diagnoses and directly impacts patient care. Clin Epigenetics. déc 2019;11(1):185.
58. Jaunmuktane Z, Capper D, Jones DTW, Schrimpf D, Sill M, Dutt M, et al. Methylation array profiling of adult brain tumours: diagnostic outcomes in a large, single centre. Acta Neuropathol Commun. déc 2019;7(1):24.
59. White CL, Kinross KM, Moore MK, Rasouli E, Strong R, Jones JM, et al. Implementation of DNA Methylation Array Profiling in Pediatric Central Nervous System Tumors. J Mol Diagn. oct 2023;25(10):709-28.
60. Stupp R, Weller M, Belanger K, Bogdahn U, Ludwin SK, Lacombe D, et al. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. N Engl J Med. 2005;
61. McAleenan A, Kelly C, Spiga F, Kernohan A, Cheng HY, Dawson S, et al. Prognostic value of test(s) for O6-methylguanine–DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation for predicting overall survival in people with glioblastoma treated with temozolomide. Cochrane Gynaecological, Neuro-oncology and Orphan Cancer Group, éditeur. Cochrane Database Syst Rev [Internet]. 12 mars 2021 [cité 4 oct 2024];2021(3). Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD013316.pub2>
62. Brat DJ, Aldape K, Colman H, Holland EC, Louis DN, Jenkins RB, et al. cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for “Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype,

- with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV". *Acta Neuropathol (Berl)*. nov 2018;136(5):805-10.
63. Wenger A, Carén H. Methylation Profiling in Diffuse Gliomas: Diagnostic Value and Considerations. *Cancers*. 18 nov 2022;14(22):5679.
 64. Aoki K, Natsume A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol*. avr 2019;36(2):84-91.
 65. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, et al. Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell*. janv 2016;164(3):550-63.
 66. Capper D, Jones DTW, Sill M, Hovestadt V, Schrimpf D, Sturm D, et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature*. 22 mars 2018;555(7697):469-74.
 67. Muench A, Teichmann D, Spille D, Kuzman P, Perez E, May SA, et al. A Novel Type of IDH-wildtype Glioma Characterized by Gliomatosis Cerebri-like Growth Pattern, TERT Promoter Mutation, and Distinct Epigenetic Profile. *Am J Surg Pathol*. déc 2023;47(12):1364-75.
 68. Sievers P, Sill M, Schrimpf D, Stichel D, Reuss DE, Sturm D, et al. A subset of pediatric-type thalamic gliomas share a distinct DNA methylation profile, H3K27me3 loss and frequent alteration of *EGFR*. *Neuro-Oncol*. 30 janv 2021;23(1):34-43.
 69. Bender K, Kahn J, Perez E, Ehret F, Roohani S, Capper D, et al. Diffuse paediatric-type high-grade glioma, H3-wildtype and IDH-wildtype: case series of a new entity. *Brain Tumor Pathol*. oct 2023;40(4):204-14.
 70. Rudà R, Capper D, Waldman AD, Pallud J, Minniti G, Kaley TJ, et al. EANO - EURACAN - SNO Guidelines on circumscribed astrocytic gliomas, glioneuronal, and neuronal tumors. *Neuro-Oncol*. 1 déc 2022;24(12):2015-34.
 71. D'Angelo F, Ceccarelli M, Tala, Garofano L, Zhang J, Frattini V, et al. The molecular landscape of glioma in patients with Neurofibromatosis 1. *Nat Med*. janv 2019;25(1):176-87.
 72. Reinhardt A, Stichel D, Schrimpf D, Sahm F, Korshunov A, Reuss DE, et al. Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. *Acta Neuropathol (Berl)*. août 2018;136(2):273-91.
 73. Petruzzellis G, Alessi I, Colafati GS, Diomedi-Camassei F, Ciolfi A, Pedace L, et al. Role of DNA Methylation Profile in Diagnosing Astroblastoma: A Case Report and Literature Review. *Front Genet*. 30 avr 2019;10:391.

74. Ebrahimi A, Korshunov A, Reifenberger G, Capper D, Felsberg J, Trisolini E, et al. Pleomorphic xanthoastrocytoma is a heterogeneous entity with pTERT mutations prognosticating shorter survival. *Acta Neuropathol Commun.* déc 2022;10(1):5.
75. Schwalbe EC, Williamson D, Lindsey JC, Hamilton D, Ryan SL, Megahed H, et al. DNA methylation profiling of medulloblastoma allows robust subclassification and improved outcome prediction using formalin-fixed biopsies. *Acta Neuropathol (Berl).* mars 2013;125(3):359-71.
76. Prados MD. Current Strategies for Management of Medulloblastoma. *Diagnostics.* 8 août 2023;13(16):2622.
77. Alharbi M, Mobark N, Bashawri Y, Abu Safieh L, Allowayn A, Aljelaify R, et al. Methylation Profiling of Medulloblastoma in a Clinical Setting Permits Sub-classification and Reveals New Outcome Predictions. *Front Neurol.* 20 mars 2020;11:167.
78. Hasselblatt M, Thomas C, Nemes K, Monoranu C -M., Riemenschneider MJ, Koch A, et al. Tyrosinase immunohistochemistry can be employed for the diagnosis of atypical teratoid/rhabdoid tumours of the tyrosinase subgroup (ATRT-TYR). *Neuropathol Appl Neurobiol.* févr 2020;46(2):186-9.
79. Torchia J, Picard D, Lafay-Cousin L, Hawkins CE, Kim SK, Letourneau L, et al. Molecular subgroups of atypical teratoid rhabdoid tumours in children: an integrated genomic and clinicopathological analysis. *Lancet Oncol.* mai 2015;16(5):569-82.
80. Pei YC, Huang GH, Yao XH, Bian XW, Li F, Xiang Y, et al. Embryonal tumor with multilayered rosettes, C19MC-altered (ETMR): a newly defined pediatric brain tumor.
81. Uro-Coste E, Masliah-Planchon J, Siegfried A, Blanluet M, Lambo S, Kool M, et al. ETMR-like infantile cerebellar embryonal tumors in the extended morphologic spectrum of DICER1-related tumors. *Acta Neuropathol (Berl).* janv 2019;137(1):175-7.
82. Tam OCH, Ho RSL, Chan S, Li KKW, Lam TL, Cheung ETY, et al. Genome-Wide DNA Methylation Profiling as Frontline Diagnostics for Central Nervous System Embryonal Tumors in Hong Kong. *Cancers.* 7 oct 2023;15(19):4880.
83. Träger M, Schweizer L, Pérez E, Schmid S, Hain EG, Dittmayer C, et al. Adult intracranial ependymoma—relevance of DNA methylation profiling for diagnosis, prognosis, and treatment. *Neuro-Oncol.* 6 juill 2023;25(7):1286-98.
84. Träger M, Schweizer L, Pérez E, Schmid S, Hain EG, Dittmayer C, et al. Adult intracranial ependymoma—relevance of DNA methylation profiling for diagnosis, prognosis, and treatment. *Neuro-Oncol.* 6 juill 2023;25(7):1286-98.
85. Küsters-Vandeveldel HVN, Küsters B, Van Engen-van Grunsven ACH, Groenen PJTA, Wesseling P, Blokx WAM. Primary Melanocytic Tumors of the Central Nervous System: a Review with Focus on Molecular Aspects. *Brain Pathol.* mars 2015;25(2):209-26.

86. Griewank KG, Koelsche C, Van De Nes JAP, Schrimpf D, Gessi M, Möller I, et al. Integrated Genomic Classification of Melanocytic Tumors of the Central Nervous System Using Mutation Analysis, Copy Number Alterations, and DNA Methylation Profiling. *Clin Cancer Res.* 15 sept 2018;24(18):4494-504.
87. Listernick R, Charrow J, Gutmann DH. Intracranial gliomas in neurofibromatosis type 1. *Am J Med Genet.* 26 mars 1999;89(1):38-44.
88. Ryall S, Zapotocky M, Fukuoka K, Nobre L, Guerreiro Stucklin A, Bennett J, et al. Integrated Molecular and Clinical Analysis of 1,000 Pediatric Low-Grade Gliomas. *Cancer Cell.* avr 2020;37(4):569-583.e5.
89. Lucas CHG, Gupta R, Doo P, Lee JC, Cadwell CR, Ramani B, et al. Comprehensive analysis of diverse low-grade neuroepithelial tumors with FGFR1 alterations reveals a distinct molecular signature of rosette-forming glioneuronal tumor. *Acta Neuropathol Commun.* déc 2020;8(1):151.
90. Galbraith K, Vasudevaraja V, Serrano J, Shen G, Tran I, Abdallat N, et al. Clinical utility of whole-genome DNA methylation profiling as a primary molecular diagnostic assay for central nervous system tumors—A prospective study and guidelines for clinical testing. *Neuro-Oncol Adv.* 1 janv 2023;5(1):vdad076.
91. Patterson K, Molloy L, Qu W, Clark S. DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *J Vis Exp.* 21 oct 2011;(56):3170.
92. The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) - NCI [Internet]. 2022 [cité 5 oct 2024]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>
93. Oxford Nanopore Technologies [Internet]. [cité 5 oct 2024]. Epigenetics and methylation analysis. Disponible sur: <https://nanoporetech.com/applications/investigations/epigenetics-and-methylation-analysis>
94. Montel F. Séquençage de l'ADN par nanopores: Résultats et perspectives. *médecine/sciences.* févr 2018;34(2):161-5.
95. Berger TC, Taubøll E, Heuser K. The potential role of DNA methylation as preventive treatment target of epileptogenesis. *Front Cell Neurosci.* 22 juill 2022;16:931356.
96. Kaur G, Rathod SSS, Ghoneim MM, Alshehri S, Ahmad J, Mishra A, et al. DNA Methylation: A Promising Approach in Management of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Biology.* 7 janv 2022;11(1):90.
97. Lucio-Eterovic AK, Cortez MA, Valera ET, Motta FJ, Queiroz RG, Machado HR, et al. Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas. *BMC Cancer.* déc 2008;8(1):243.

98. Sufianov A, Begliarzade S, Ilyasova T, Xu X, Beylerli O. MicroRNAs as potential diagnostic markers of glial brain tumors. *Non-Coding RNA Res.* déc 2022;7(4):242-7.

Age au diagnostic	Sexe	Localisation	HE-SIHC	CGH	MSI/CA	Archive	Synthes pré-méthylome	VIZ 8 Methylation Class	Diagnostic final
1									
227	37 H	Proximal ventricule gauche	Tumeur anévrictale, exprimant des marqueurs musculaires, non classable et non gradable à ce stade.	/		EMSN/CPBM	/	/	tumeur mésoenchymateuse myxoides
228	32 F	Quatrième ventricule	papillome des plexus choroïdes	Gain des chromosomes 7, 9, 11, 12, 16, 18, 20, 21			/	Match 0,99 Choroid plexus papilloma, and/or subtype (novel)	papillome des plexus choroïdes L'étude du profil de méthylation ne permet pas de distinguer une hyperplasie des plexus choroïdes d'un papillome des plexus choroïdes
229	6 H	Plexus choroïde	Papillome des plexus choroïdes				/	Match 0,99 Proliferation, subtypes mRNA processing altered 1, subtypes B (novel)	Prinoblastome, avec anomalies liées aux miRNA
230	11 F	Précède	Tumeur du parenchyme périél de haut grade				/	No match 0,75 Proliferation	Tumeur du parenchyme périél de haut grade à différenciation intermédiaire, grade 2-3 selon OMS 2021
231	36 F	Précède	Tumeur du parenchyme périél de différenciation intermédiaire		HER2+		/	No match 0,16 Proliferation No match 0,27 Mitochondrial dysfunction No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Glioblastome IDH sauvage dont le profil génomique est comparable sous groupe plexus choroïde Plexus choroïde, d'index Ki67 focallement élevé en l'absence d'autre critère de haut grade. A l'issue de l'étude moléculaire, cette lésion est suspectée de correspondre à une tumeur
232	51 H	Epilepsie	Tumeur exprimant des marqueurs gliaux et neuronaux; d'index Ki67 focallement élevé en plexus choroïde	Intéressante différenciation morphologique, signal d'EMSA 8,11			/	No match 0,16 Proliferation No match 0,27 Mitochondrial dysfunction No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Glioblastome IDH sauvage dont le profil génomique est comparable sous groupe plexus choroïde Plexus choroïde, d'index Ki67 focallement élevé en l'absence d'autre critère de haut grade. A l'issue de l'étude moléculaire, cette lésion est suspectée de correspondre à une tumeur
233	59 F	Précède	Tumeur exprimant des marqueurs gliaux et neuronaux; d'index Ki67 focallement élevé en plexus choroïde				/	No match 0,16 Proliferation No match 0,27 Mitochondrial dysfunction No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Glioblastome IDH sauvage dont le profil génomique est comparable sous groupe plexus choroïde Plexus choroïde, d'index Ki67 focallement élevé en l'absence d'autre critère de haut grade. A l'issue de l'étude moléculaire, cette lésion est suspectée de correspondre à une tumeur
234	24 F	Dorsale	Fibromatose profonde		CDKN2A, TP53		/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Fibromatose profonde
235	30 F	Intrachaire date	Prolifération tumorale à cellules fusiformes myxoides maligne difficile à classer, de grade 2 selon la FNCLCC	Profil similaire	PTEN, TP53, BRCA1		/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Lésion de type plexus choroïde évolutive d'un gliomangiome
236	39 H	Angle postéro-cérébelleux	Lésion gliale, découverte de signe histologique verticille hélico-gauche		PTEN, TP53, BRCA1		/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Lésion gliale, découverte de signe histologique verticille hélico-gauche
237	76 F	gauche	Lésion gliale, découverte de signe histologique verticille hélico-gauche				/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Lésion gliale, découverte de signe histologique verticille hélico-gauche
238	33 F	hypophysaire	phéochromocytome				/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Tumeur oncocytique à cellules fusiformes
239	67 H	Pariétal gauche	Tumeur indifférenciée de haut grade, d'origine que très focallement EMA et CD38, susceptibles de correspondre à une origine épithéliale.		CDKN2A, TP53, BRCA1		/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Tumeur indifférenciée de haut grade, d'origine que très focallement EMA et CD38, susceptibles de correspondre à une origine épithéliale.
240	39 H	Intraduraux L2-L3	Tissu peu cellulaire exprimant GFAP et très focallement EMA, peuvent correspondre à la périphérie d'une tumeur, notamment d'un gliomangiome sans pouvoir l'affirmer.				/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	Tissu médullaire dont on ne peut affirmer la nature tumorale
241	32 F	Foréal droit	lésion d'aspect tumoral de bas grade, non classable				/	No match 0,27 Mitochondrial dysfunction	lésion d'aspect tumoral de bas grade, non classable
242	55 F	Poliostéose hypophysaire	Mélanome aréolo-veineux de l'hypophyse.				/	No match 0,32 Central tissue, cerebral hemispheres	Mélanome aréolo-veineux de l'hypophyse.
243	41 F	Hypophysaire	névrome hypophysaire marqué				/	Match 0,98 Central tissue, cerebral hemispheres	Sclérose hypophysaire marquée
244	45 H	Hypophysaire gauche	sclérose hypophysaire				/	No match 0,32 Central tissue, cerebral hemispheres	Sclérose hypophysaire
245	41 F	Temporal droit	Sclérose hypophysaire				/	No match 0,32 Central tissue, cerebral hemispheres	Sclérose hypophysaire
246	32 H	Intraventriculaire et subventriculaire	Neurocytome			SECC/UMTR2	/	No match 0,32 Central tissue, cerebral hemispheres	Neurocytome

AUTEUR : Nom : OUANOUNOU

Prénom : Michaël

Date de soutenance : Jeudi 24 octobre 2024

Titre de la thèse : Étude du profil de méthylation de l'ADN dans les tumeurs du système nerveux central. Retour sur 30 mois d'expérience au CHU de Lille.

Thèse - Médecine - Lille 2024

Cadre de classement : Anatomie et cytologie pathologiques

DES + FST/option : Anatomie et cytologie pathologiques

Mots-clés : méthylome, SNC, tumeurs, épigénétique.

Résumé :

Contexte :

Le diagnostic des tumeurs du système nerveux central est en constante évolution et l'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis une meilleure compréhension des processus de cancérogénèse et ainsi des mises à jour régulières de la classification de ces tumeurs.

Depuis 2018, le Département de Neuropathologie d'Heidelberg en Allemagne a établi un « classifieur » basé sur l'analyse de modifications épigénétiques en l'occurrence la méthylation des cytosines grâce à la technologie *Illumina*.

Méthode :

Tout patient pour lequel a été réalisé un méthylome dans le cadre du diagnostic de sa tumeur entre le 1^{er} décembre 2020 et le 15 juin 2023 a été inclus rétrospectivement. La série a été bornée arbitrairement à 245 patients. Les patients ont été recensés à partir des archives du laboratoire d'oncologie moléculaire regroupant tous les méthylomes réalisés. Tout patient ayant eu un méthylome était inclus, sans critère d'exclusion.

Résultats :

Nous mettons en avant l'importance du méthylome dans le diagnostic intégré des tumeurs du SNC, notamment les gliomes diffus de l'adulte, les tumeurs gliales astrocytaires circonscrites et les tumeurs glioneuronales. Par ailleurs, nous soulignons l'utilité spécifique du méthylome pour certaines tumeurs, telles que les gliomes diffus de haut grade de sous-type pédiatrique, les tumeurs embryonnaires, épendymaires et mélanocytaires, qui sont classées selon leurs voies moléculaires, conformément aux recommandations de l'OMS. Le méthylome met en exergue des cas exceptionnels auparavant méconnus. Nous rapportons en exemple un cas de *Glioneuronal tumor with ATRX alteration, kinase fusion and anaplastic features (GTAKA)*.

Conclusions :

Le méthylome est une technique innovante développée par les biologistes moléculaires au profit des patients et de tous les acteurs impliqués dans leur prise en charge (notamment neurochirurgiens, pathologistes, neuro-oncologues), qui joue un rôle clé dans le diagnostic intégré des tumeurs du SNC. En offrant une meilleure compréhension et une caractérisation plus précise des tumeurs, il contribue au traitement optimal et personnalisé pour chaque patient.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE

Assesseurs : Monsieur le Docteur Jean-Baptiste GIBIER

Madame le Docteur Marie CSANYI-BASTIEN

Madame le Docteur Fabienne ESCANDE

Madame le Docteur Apolline MONFILLIETTE-DJELAD

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude-Alain MAURAGE