Carrefour Pathologie 2018

Place de la pathologie moléculaire dans les lésions neuroendocrines: applications diagnostiques et théranostiques

Jerome Cros
Dpt of Pathology – INSERM U1149
Beaujon Hospital, Paris, France

CRI CENTRE de RECHERCHE sur l'INFLAMMATION

unity Addressing Unmet Needs through Innovation In hepaTology and gastroenterologY

Inserm

HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE Beaujon

Place de la pathologie moléculaire dans les lésions neuroendocrines: applications diagnostiques et théranostiques

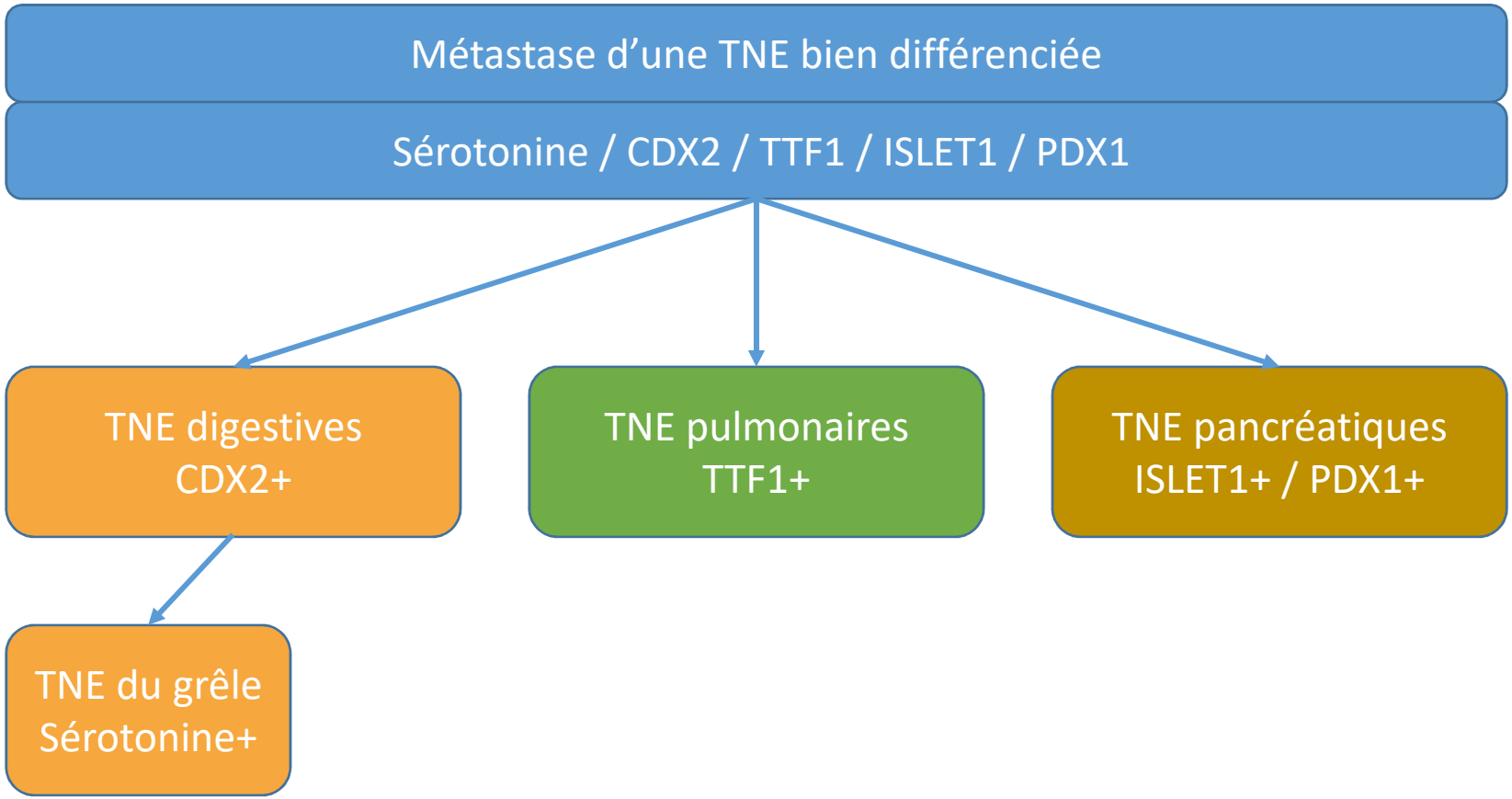
- **Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?**

- **Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine de grade 3 ?**

- **Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques?**

- **Existe-t-il des marqueurs théranostiques?**
  - **instabilité des microsatellites**
  - **MGMT**
  - **Rb**

Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?



Les marqueurs comme TTF1 / ISLET1 / PAX8 n'ont pas de valeur topographiques dans les lésions peu différenciées

Les marqueurs comme TTF1 / ISLET1 / PAX8 n'ont pas de valeur topographiques dans les lésions peu différenciées

Tumeurs primitives (quid des métastases?)

Site	Histologic subtype	% (aTS)			
		CDX2	TTF1	ISL1	PAX8
GEP ($n = 38$)	LCNEC ($n = 32$)	75 (2.9)	13 (0.2)	59 (1.7)	50 (0.8)
	SmCC ($n = 6$)	50 (2.3)	33 (1.7)	83 (3.2)	50 (1.3)
Lung	LCNEC ($n = 16$)	31 (1.0)	56 (**1.9**†)	88 (**2.9**#)	44 (0.8)
($n = 36$)	SmCC ($n = 20$)	15 (0.3)	85 (**3.7**†)	95 (**4.5**#)	50 (1.0)
Total	LCNEC ($n = 48$)	60 (**2.3**‡)	27 (**0.8***)	69 (**2.0***)	48 (0.8)
($n = 74$)	SmCC ($n = 26$)	23 (**0.8**‡)	73 (**3.2***)	92 (**4.2***)	50 (1.0)

Lee *et al., Annals of Diagnostic Pathology* 2018

Les marqueurs comme TTF1 / ISLET1 / PAX8 n'ont pas de valeur topographiques dans les lésions peu différenciées

Tumeurs primitives (quid des métastases?)

Site	Histologic subtype	% (aTS)			
		CDX2	TTF1	ISL1	PAX8
GEP ($n = 38$)	LCNEC ($n = 32$)	75 (2.9)	13 (0.2)	59 (1.7)	50 (0.8)
	SmCC ($n = 6$)	50 (2.3)	33 (1.7)	83 (3.2)	50 (1.3)
Lung	LCNEC ($n = 16$)	31 (1.0)	56 (**1.9**†)	88 (**2.9**#)	44 (0.8)
($n = 36$)	SmCC ($n = 20$)	15 (0.3)	85 (**3.7**†)	95 (**4.5**#)	50 (1.0)
Total	LCNEC ($n = 48$)	60 (**2.3**‡)	27 (**0.8***)	69 (**2.0***)	48 (0.8)
($n = 74$)	SmCC ($n = 26$)	23 (**0.8**‡)	73 (**3.2***)	92 (**4.2***)	50 (1.0)

Lee *et al., Annals of Diagnostic Pathology* 2018

>2/3 des NEC du col utérin sont TTF1+

McCluggage *et al. Am J Surg Pathol* 2010

Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine bien différenciée de primitif inconnu?

TNE bien différenciée

Pancréas (même G3)
- **MEN1 (40-70%)**
- DAXX/ATRX (45%)
- Voie mTOR (11%)
- TP53/RB1 (0%)

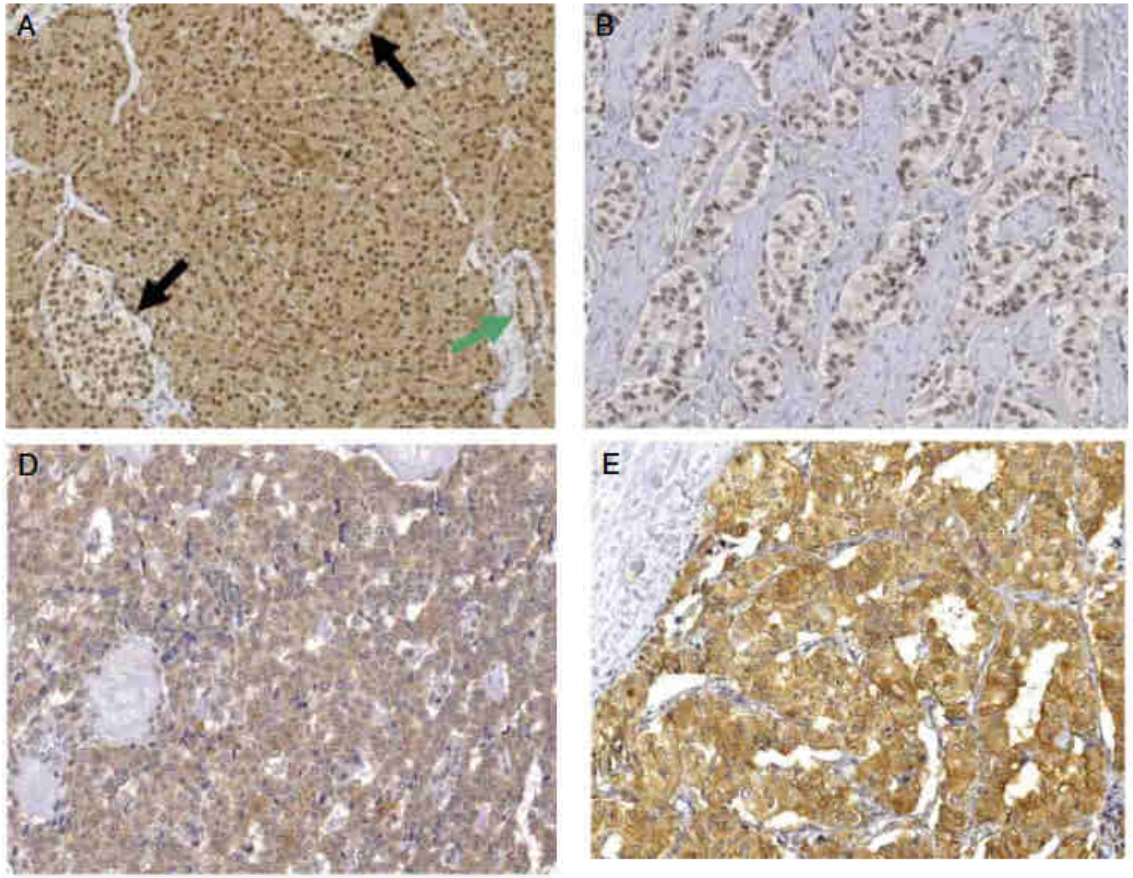
Scarpa Nature 2017

Poumon (carcinoïde atypique)
- **MEN1 (23%)**
- TP53 (11%)
- RB1 (3%)
- SWI/SNF…

Simbolo J Pathol 2016

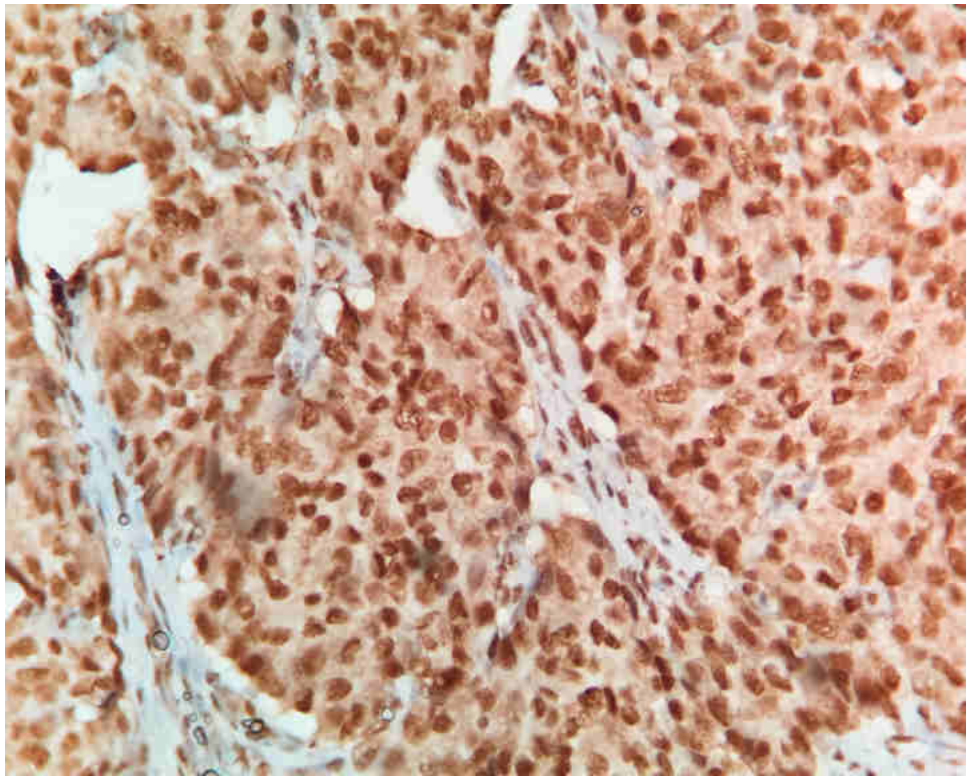
Grêle/Colon/Rectum
- **MEN1 (0%)**
- DAXX/ATRX (0%)
- LOH Chromosome 18 (grêle)
- APC… (colon)

MEN1



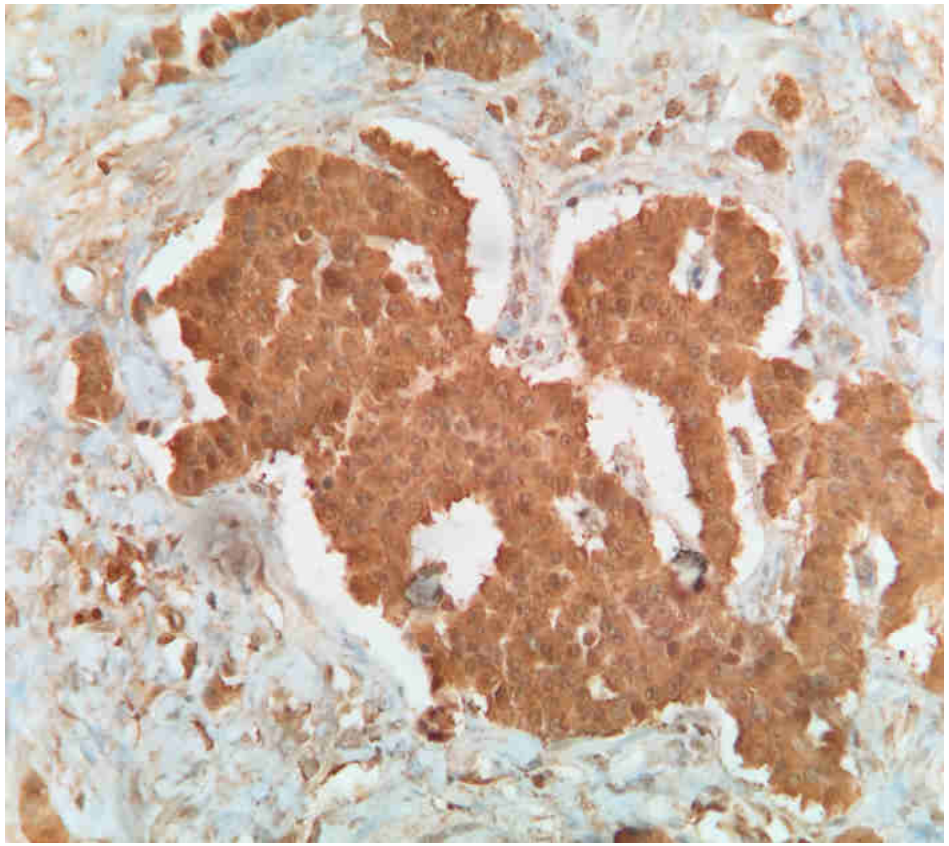
Contrôle interne (cell endothéliales, lymphocytes etc…)

Corbo *et al.* ERC 2010



TNE pancréatique *MENIN* sauvage

TNE pancréatique avec mutation *MENIN*



Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine bien différenciée de primitif inconnu?

TNE bien différenciée

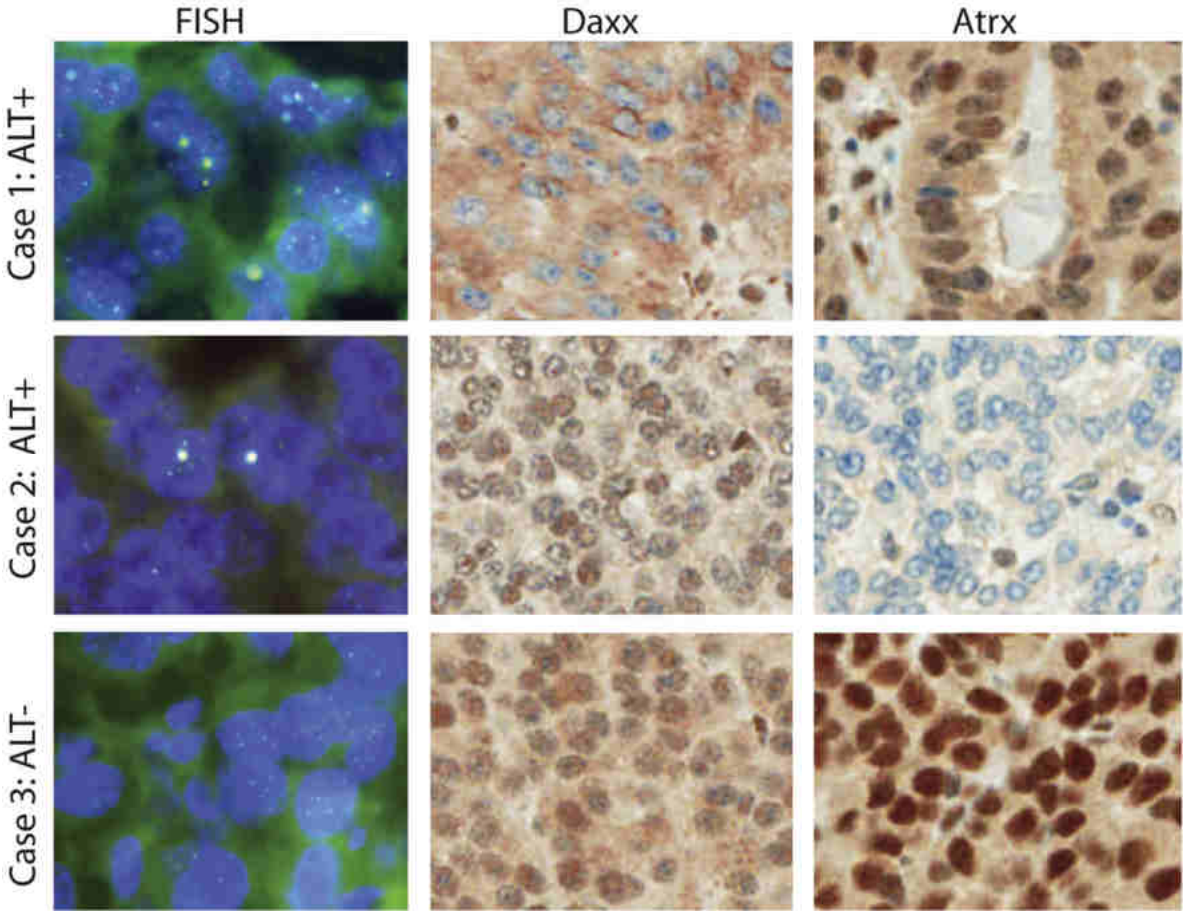
Pancréas (même G3)
- **MEN1 (40-70%)**
- DAXX/ATRX (45%)
- Voie mTOR (11%)
- TP53/RB1 (0%)

Scarpa Nature 2017

Poumon (carcinoïde atypique)
- **MEN1 (23%)**
- TP53 (11%)
- RB1 (3%)
- SWI/SNF…

Simbolo J Pathol 2016

Grêle/Colon/Rectum
- **MEN1 (0%)**
- DAXX/ATRX (0%)
- LOH Chromosome 18 (grêle)
- APC… (colon)



Contrôle interne (cell endothéliales, lymphocytes etc…)

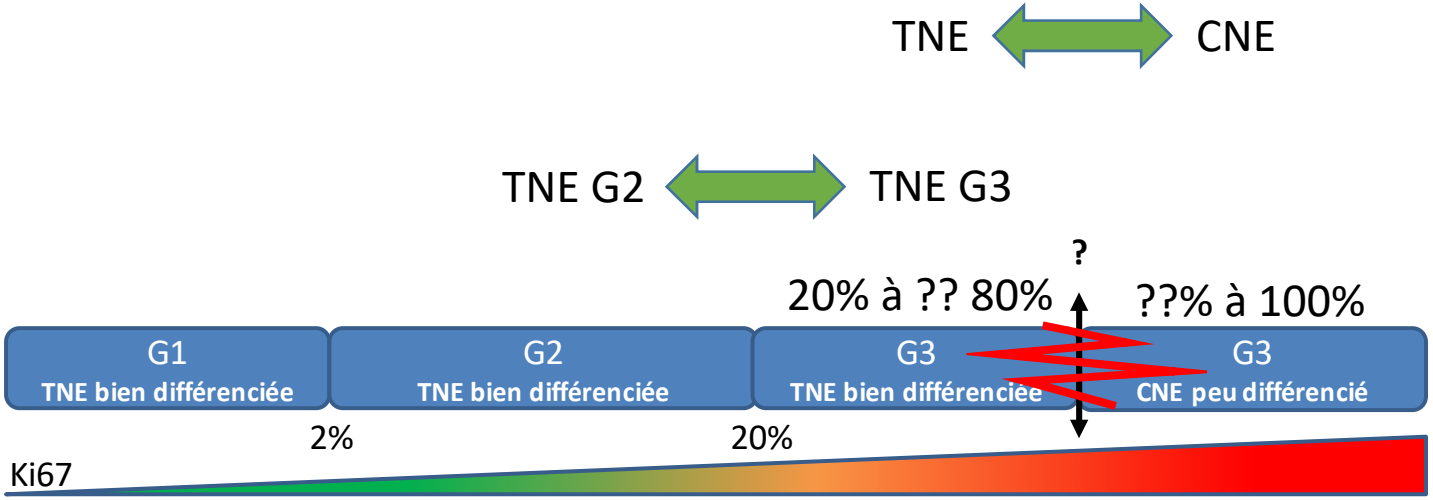
Marinoni *et al. Gastroenterology* 2014

Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine bien différenciée de primitif inconnu?

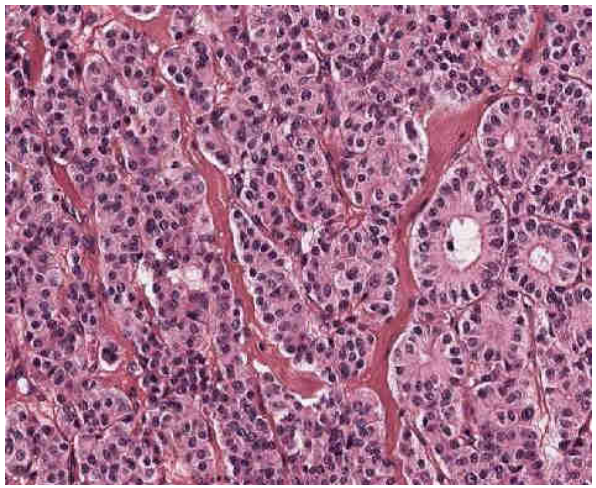
➤ Pour les autres localisations, pas d'anomalie moléculaire « facile » pour le pathologiste

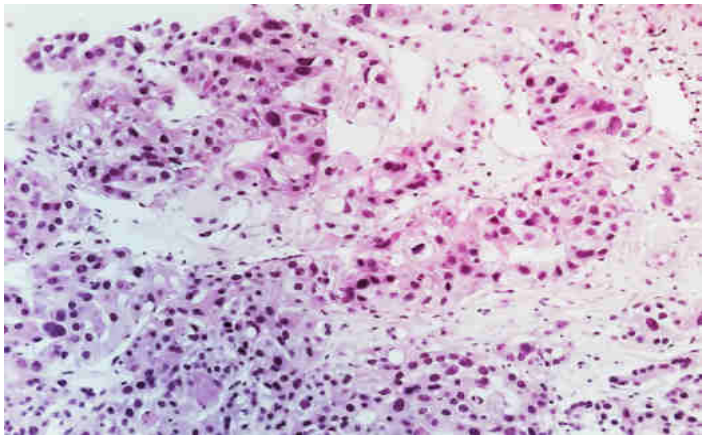
- Délétion chromosome 18 dans les TNE du grêle (spécifique si isolée)
- Mutation de APC dans certaines lésions coliques (IHC non validée)

Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine (pancréatique) de grade 3 ?



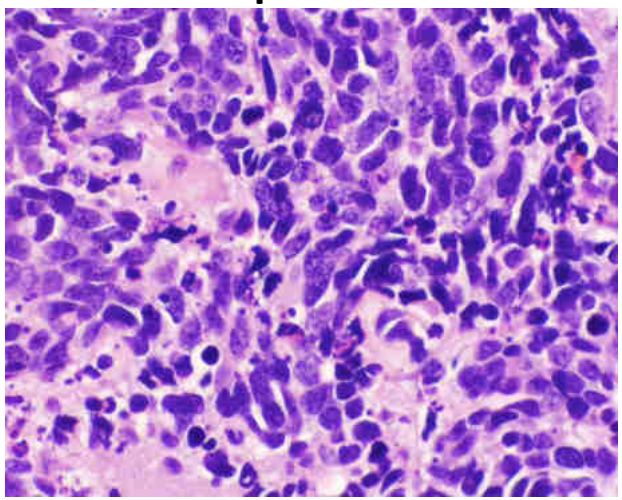
TNE bien différenciée





Pas toujours facile…

CNE peu différencié



Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine (pancréatique) de grade 3 ?

TNE bien différenciée

Pancréas (même G3)

- **MEN1 (40%)**
- **DAXX/ATRX (45%)**
- Voie mTOR (11%)
- **TP53/RB1 (0%)**

Scarpa Nature 2017

Poumon (carcinoïde atypique)

- MEN1 (23%)
- TP53 (11%)
- RB1 (3%)
- SWI/SNF…

Simbolo J Pathol 2016

CNE peu différencié (GC/PC)

Pancréas

- **MEN1 (0%)**
- **DAXX/ATRX (0%)**
- **RB1 (>50%)**
- **TP53 (>50%)**

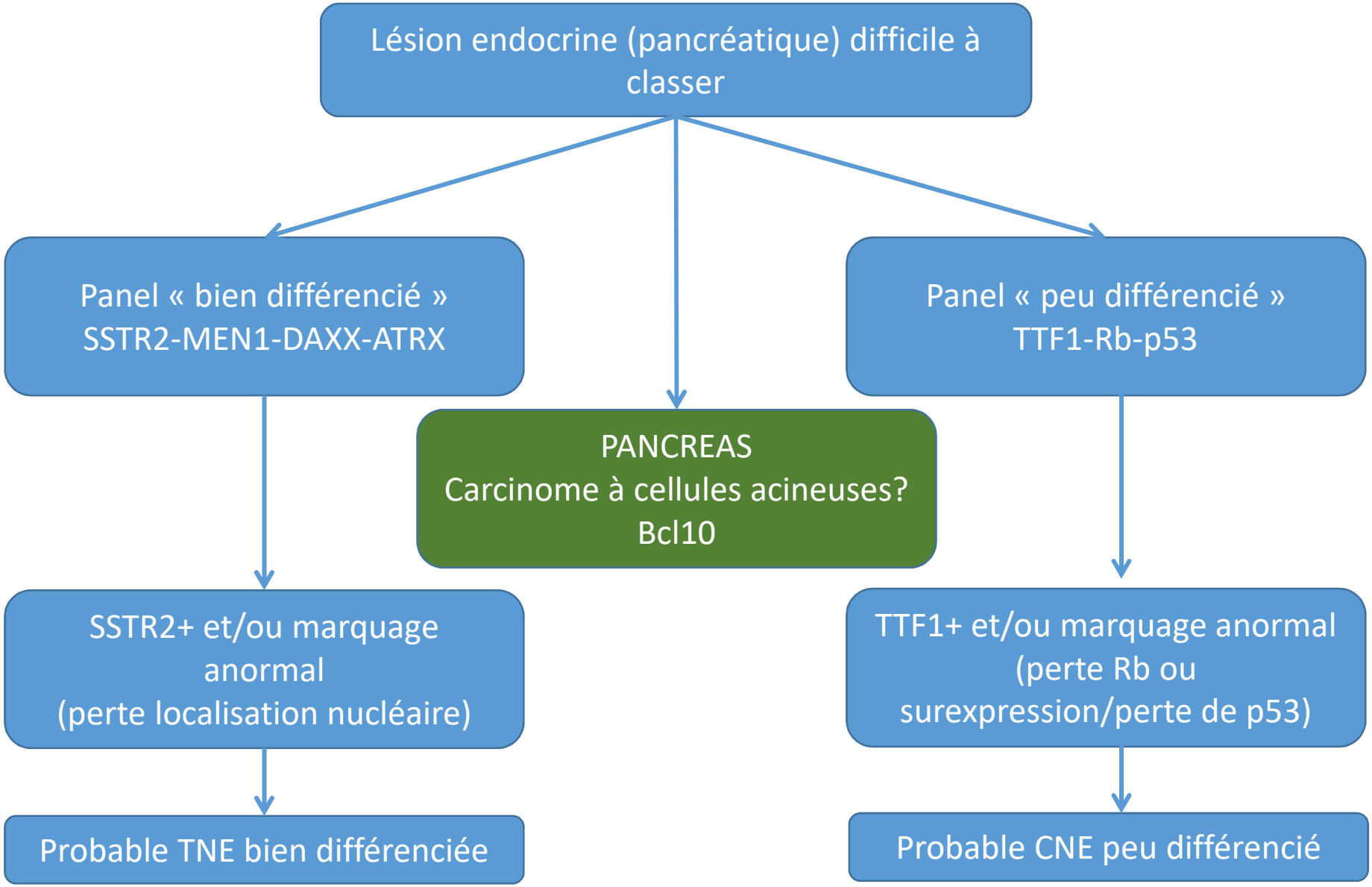
Tang CCR 2015 / Yachida AJSP 2012

Poumon (GC/PC)

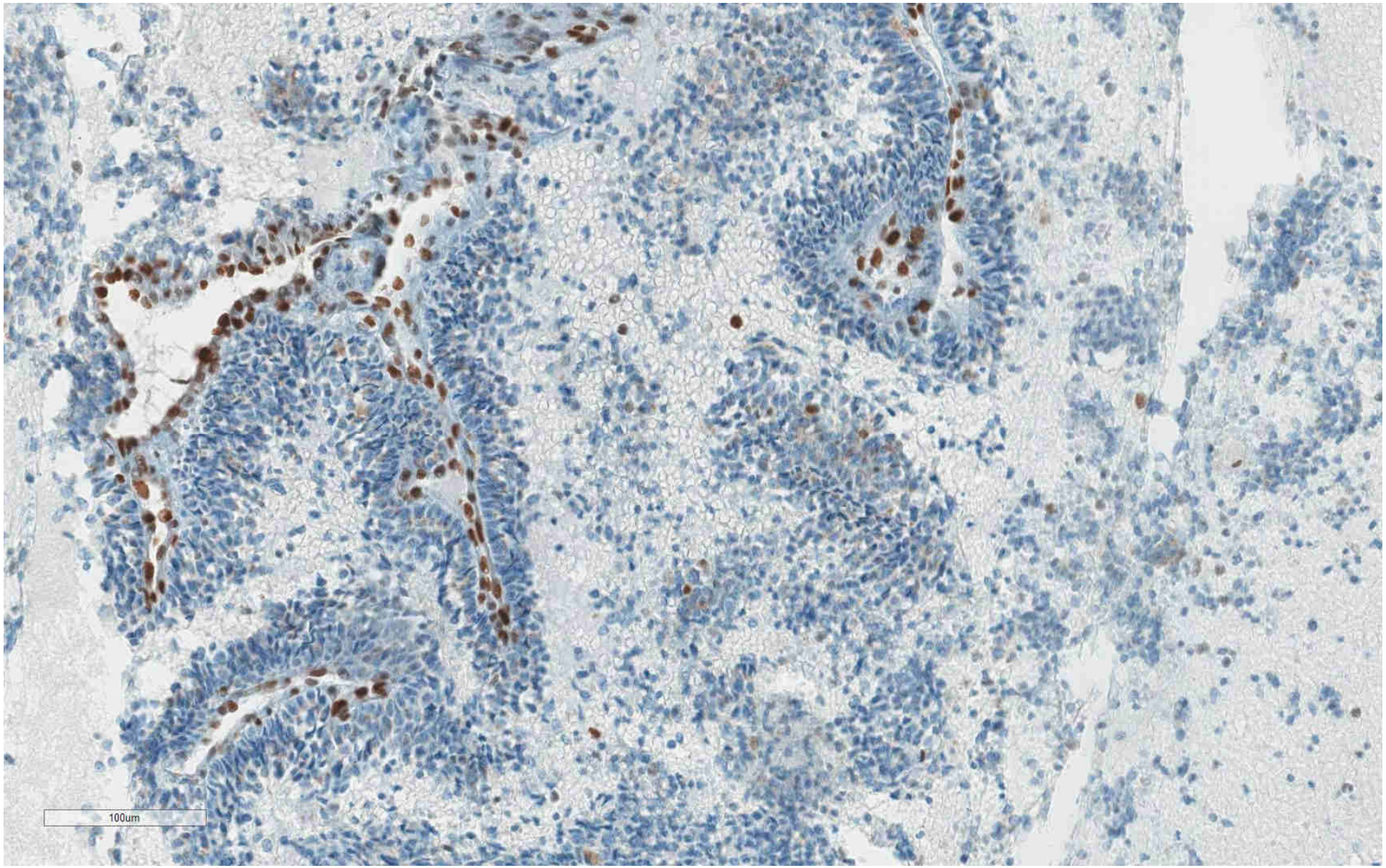
- MEN1 (0%)
- **TP53 (>50%)**
- **RB1 (>50%)**
- SWI/SNF…

Rekhtman CCR 2016

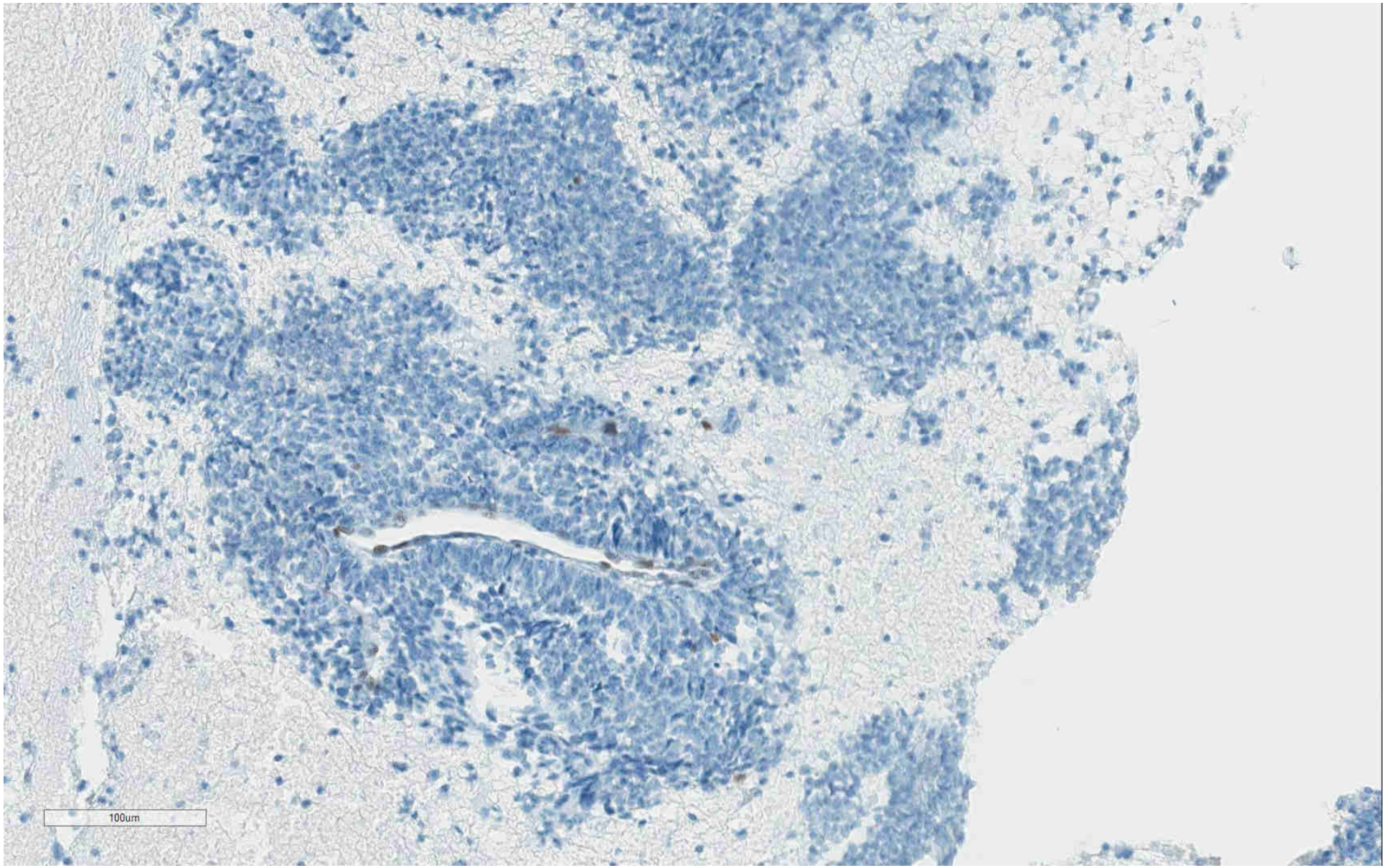
Arbre décisionnel pancréas



CNE avec perte d'expression de Rb (contrôle positif: cellules endothéliales)



CNE avec perte d'expression de p53 (contrôle positif: cellules endothéliales)



Toute lésion neuroendocrine du pancréas bizarre….

- **Morphologie « endocrinoïde » mais inhabituelle**
- **Aspect peu différencié mais Ki-67 bas (20%-40%)**
- **Morphologie difficile à classer (bien/peu différenciée)**

… est un carcinome à cellules acineuses jusqu'à preuve du contraire!

- ➤ **IHC Bcl10**
- ➤ **Les lésions mixtes (neuroendocrine-acineuse) existent = MINEN**

Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques…

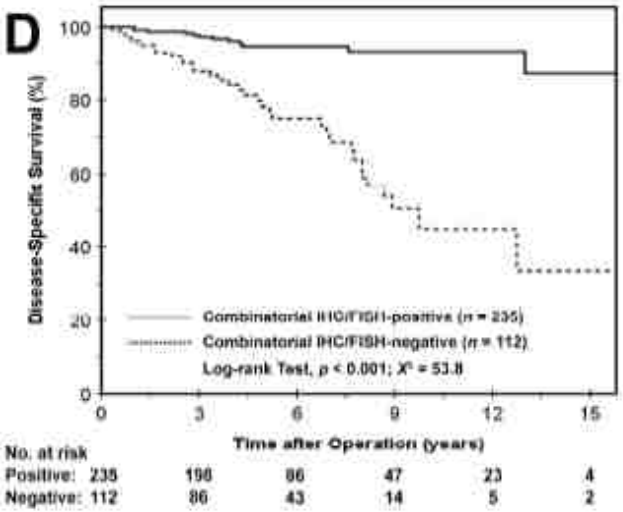
…en dehors du Ki-67 et de la différenciation?

4 immunohistochimies et une FISH pour prédire le pronostic des TNE pancréatiques ?

IHC DAXX/ATXR/ARID1A/H3K26me3 + FISH *CDKN2A*

Table 1. Univariate and multivariate Cox regression analysis for disease-free survival and disease-specific survival.

Patient or Tumor Characteristics	Univariate Cox Regression Analysis				Multivariate Cox Regression Analysis			
	Disease-Free Survival HR (95% CI)	*p*	Disease-Specific Survival HR (95% CI)	*p*	Disease-Free Survival HR (95% CI)	*p*	Disease-Specific Survival HR (95% CI)	*p*
Gender, male vs. female	1.10 (0.61 - 1.99)	0.752	0.94 (0.52 - 1.68)	0.824				
Age, years	**1.03 (1.01 - 1.06)**	**0.008**	**1.03 (1.00 - 1.05)**	**0.038**				
Tumor size, > 2.0 cm vs. ≤ 2.0 cm	**37.79 (5.20 - 274.50)**	**< 0.001**	**27.57 (3.80 - 200.16)**	**0.001**	**10.30 (1.39 - 76.64)**	**0.023**	5.21 (0.69 - 39.62)	0.111
Functional vs. nonfunctional	0.18 (0.02 - 1.28)	0.086	0.58 (0.18 - 1.89)	0.584				
Location, head and uncinate vs. body and tail	1.25 (0.69 - 2.27)	0.459	1.67 (0.93 - 2.99)	0.088				
WHO grade, G2 or G3 vs. G1	**4.74 (2.50 - 8.98)**	**< 0.001**	**5.79 (2.91 - 11.53)**	**< 0.001**	1.54 (0.77 - 3.07)	0.215	2.05 (0.99 - 4.27)	0.054
Lymphovascular invasion, presence vs. absence	**6.60 (3.38 - 12.90)**	**< 0.001**	**11.73 (4.91 - 28.00)**	**< 0.001**				
Perineural invasion, presence vs. absence	**5.43 (2.95 - 9.98)**	**< 0.001**	**4.05 (2.23 - 7.35)**	**< 0.001**				
Tumor stage (pT), pT3 vs. pT1 and pT2	**5.51 (3.01 - 10.08)**	**< 0.001**	**8.60 (4.23 - 17.47)**	**< 0.001**				
Lymph node metastasis, presence vs. absence	**5.31 (2.84 - 9.93)**	**< 0.001**	**5.21 (2.69 - 10.10)**	**< 0.001**	1.56 (0.80 - 3.04)	0.190	**2.12 (1.07 - 4.20)**	**0.031**
Distant metastases at presentation, presence vs. absence			**10.02 (5.43 - 18.49)**	**< 0.001**			**3.64 (1.91 - 6.91)**	**< 0.001**
DAXX/ATRX/H3K36me3/ARID1A/*CDKN2A*, loss/deletion vs. preserved/wild type	**35.45 (13.91 - 90.34)**	**< 0.001**	**9.55 (4.58 - 19.91)**	**< 0.001**	**14.43 (5.37 - 38.75)**	**< 0.001**	**3.12 (1.39 - 7.00)**	**0.030**



Intérêt pour les TNE pancréatiques <2cm?

Roy *et al. Gastroenterology* 2018

Existe-t-il des marqueurs théranostiques?

Dois je systématiquement rechercher une instabilité des microsatellites dans une lésion endocrine?

➤ Demande croissante de recherche d'instabilité des microsatellites (pour traitement par immunothérapie)

➤ Pas d'intérêt pour les tumeurs neuroendocrines **bien différenciées**

- Littérature ancienne hétérogène (0-33% de TNE MSI)

(House MG et al. Surgery. 2003; Mei et al. JCEM 2009; Arnason et al. Arch Pathol Lab Med 2011)

- Etudes récentes de séquençage ne montre pas de TNE bien différenciées MSI-H

(Scarpa et al. Nature 2017; Fernandez Cuesta et al. Nat Commun. 2014)

➤ Intérêt pour les carcinomes neuroendocrines **peu différenciés digestifs**

Dois je systématiquement rechercher une instabilité des microsatellites dans une lésion endocrine?

➤ Intérêt pour les carcinomes neuroendocrines **<u>peu différenciés digestifs</u>**

	MSI 11 cases	MSS 78 cases	Total 89 cases
Gender			
Male	4 (36%)	53 (71%)	57 (66%)
Female	7 (64%)	22 (29%)	29 (34%)
Age (years)			
Average	74	65.1	66.3
Range	61–91	34–93	34–93
Location			
Esophagus	0	6 (7%)	6 (6%)
Stomach	4 (36%)	32 (41%)	36 (41%)
Duodenum	1 (10%)	3 (4%)	4 (5%)
Colon–rectum	6 (54%)	31 (40%)	37 (42%)
Pancreas	0	3 (4%)	3 (3%)
Gallbladder	0	3 (4%)	3 (3%)
Classification			
NEC	7 (64%)	46 (59%)	53 (60%)
MANEC	4 (36%)	32 (41%)	36 (40%)

Recommandations INCa hors ADK colon : IHC+BM+++ (Possible problème avec les microsatellites « colon » pour les autres types de tumeurs)

			IHC				Promoter methylation		
							MS-MLPA		Pyrosequencing
MSI cases	Anatomic site	Type	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2	MLH1	MSH2 MSH6 PMS2	MLH1
Case#25	Stomach	NEC	–	+	+	–	Met	U	31%
Case#31	Stomach	MANEC	–	+	+	–	Met	U	26.5%
Case#40	Stomach	MANEC	–	+	ne	–	Met	U	14%
Case#44	Stomach	NEC	–	+	+	–	Met	U	16.6%
Case#50	Duodenum	NEC	+	–	–	+	U	U	U
Case#58	Colon–rectum	NEC	–	+	+	–	Met	U	ne
Case#62	Colon–rectum	NEC	–	+	+	–	Met	U	ne
Case#63	Colon–rectum	NEC	–	+	+	–	Met	U	12.3%
Case#74	Colon–rectum	NEC	–	+	+	–	Met	U	26.3%
Case#100	Colon–rectum	MANEC	+	+	+	–	U	U	U
Case#101	Colon–rectum	MANEC	–	+	+	–	Met	U	45.9%

ne, not evaluable; Met, methylated; U, unmethylated.

Sahnane *et al.* ERC 2015

Existe-t-il des marqueurs théranostiques?

➤ Tumeurs neuroendocrines <u>bien différenciées</u>

- Analogues de la somastostatine

Expression de SST2R et SST5R suggérée, jamais confirmée.

- **Thérapie ciblées Everolimus**

Activation de la voie mTOR (mutations – IHC) suggérée, jamais confirmée.

- **Thérapie ciblée Sunitinib**

Aucun

- **Radiothérapie interne vectorisée**

Fixation métabolique à l'octréoscan (probable corrélation à l'expression de SST2R mais pathologiste non impliqué)

- **Temozolomide**

Statut MGMT
Expression en IHC (forte = résistance) très débattue. Pas de consensus
Méthylation du promoteur également débattue (seuil 7-8%). Pas de consensus
Etude multicentrique débute sur ce sujet.

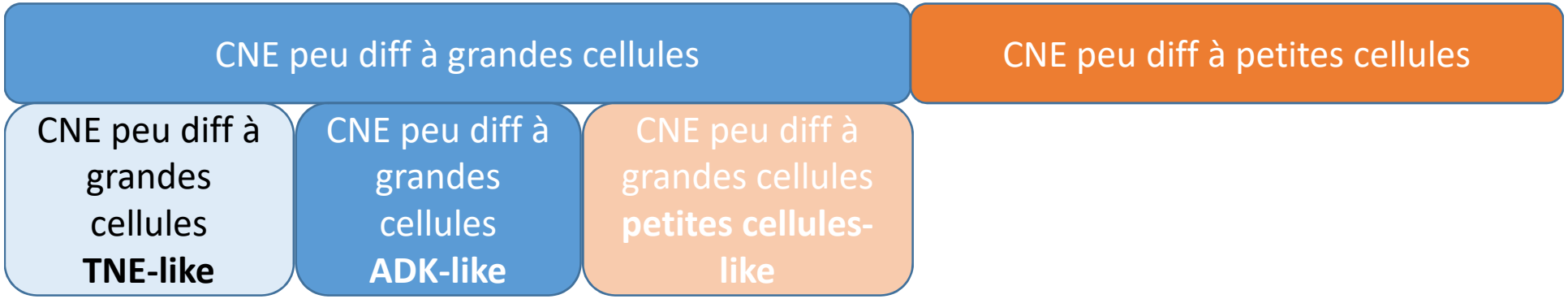
Existe-t-il des marqueurs théranostiques?

➤ **Carcinomes neuroendocrines <u>peu différenciés</u>**

CNE peu diff à grandes cellules	CNE peu diff à petites cellules

Existe-t-il des marqueurs théranostiques?

➤ **Carcinomes neuroendocrines <u>peu différenciés</u>**

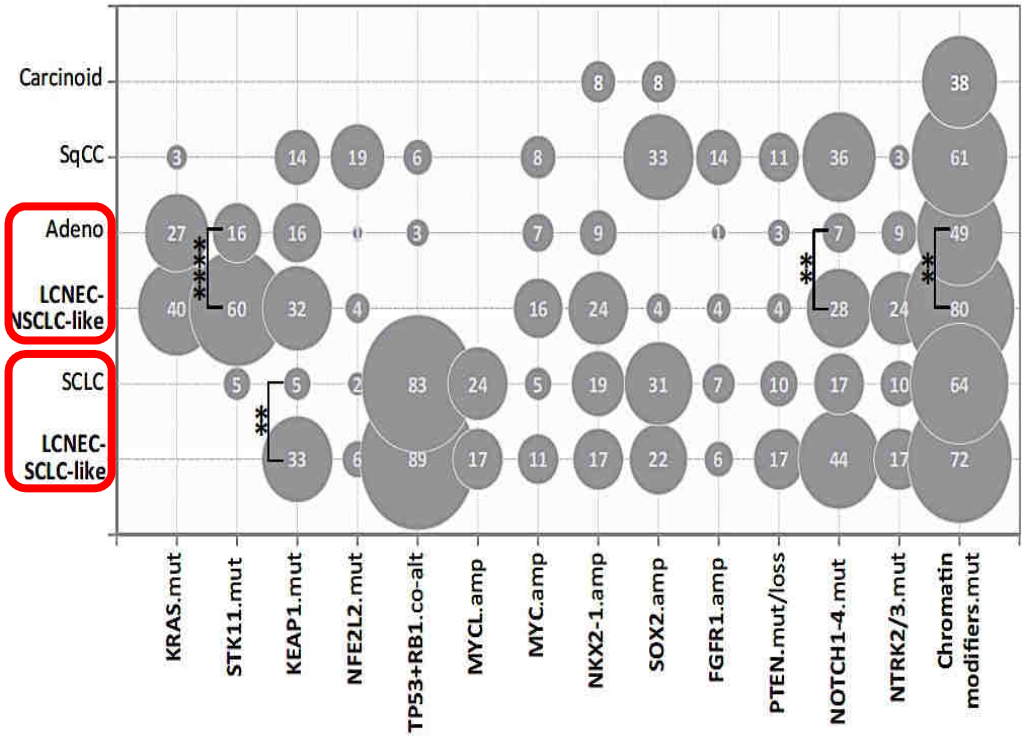


Etudes rétrospectives avec relativement beaucoup de cas dans le poumon++++

Transposition au pancréas probablement vraie mais à confirmer+++

Existe-t-il des marqueurs théranostiques?

➤ Carcinomes neuroendocrines <u>peu différenciés</u>



45 LC-NEC

	18 « SCLC-like » *RB1*^{m}/*TP53*^{m}	25 « NSCLC-like » *RB1*^{wt} or *TP53*^{wt}	
STK11 mut	0	15 (60%)	<0.0001
STK11 mut/loss	0	18 (72%)	<0.0001
KRAS mut	0	10 (40%)	0.0024
STK11 mut/loss or *KRAS* mut	0	21 (84%)	<0.0001
KEAP1-NFE2L2 mut/loss	7 (39%)	9 (36%)	ns

mutations « ADK-like »

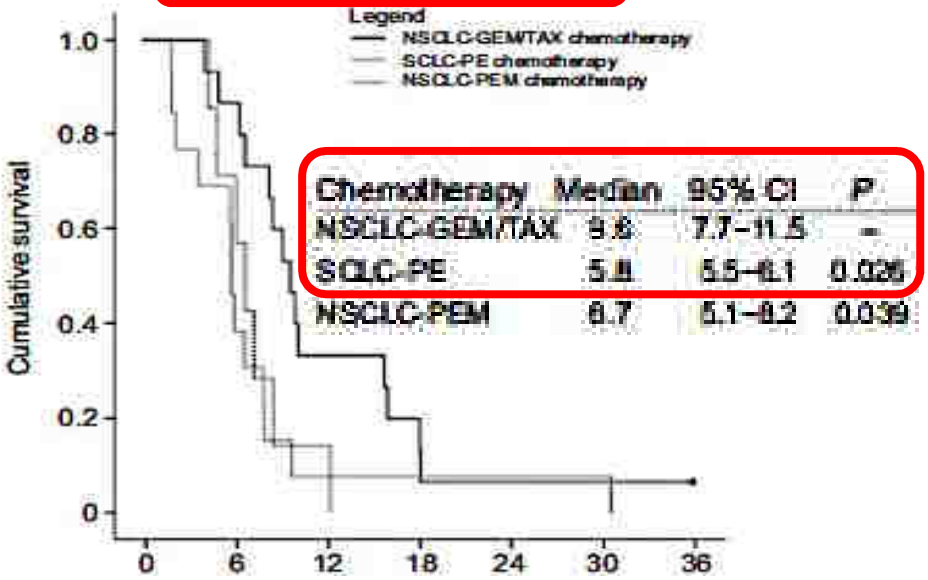
Rekhtman *et al.*, Clin Cancer Res 2017

Molecular Subtypes of Pulmonary Large-cell Neuroendocrine Carcinoma Predict Chemotherapy Treatment Outcome

Jules L. Derks[1], Noémie Leblay[2], Erik Thunnissen[3], Robert Jan van Suylen

mutation *RB1*
→ sensibilité aux platines

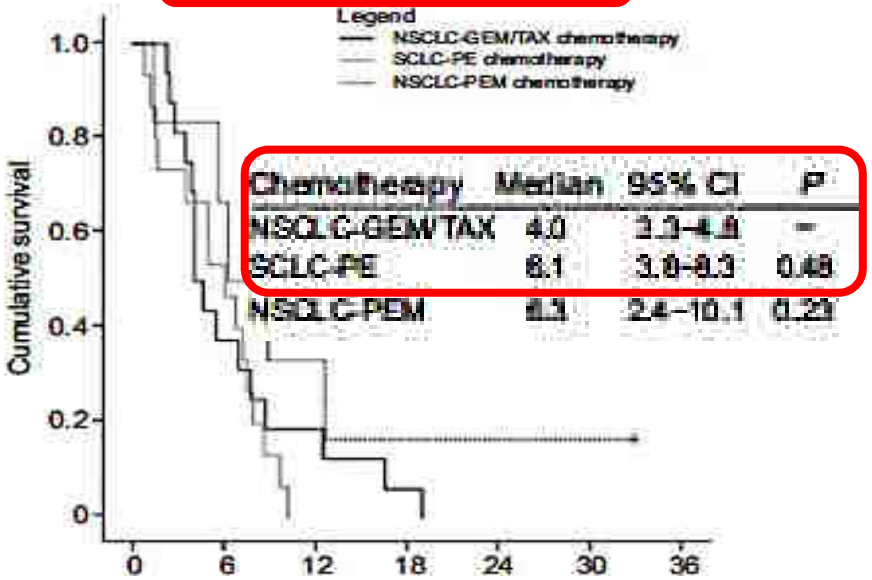
A *RB1* wild-type status LCNEC



Chemotherapy	Median	95% CI	P
NSCLC-GEM/TAX	9.8	7.7–11.5	–
SCLC-PE	5.8	5.5–6.1	0.026
NSCLC-PEM	6.7	5.1–8.2	0.039

B *RB1* mutated LCNEC

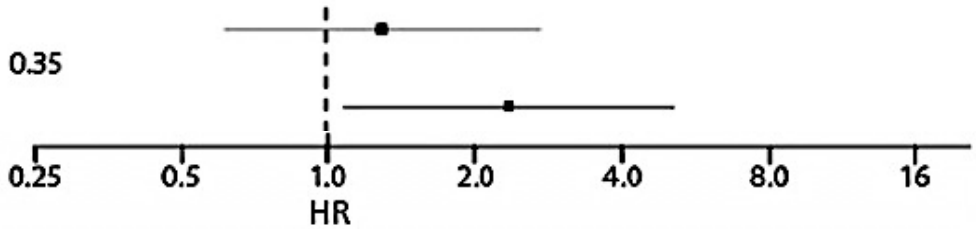
47% pop.



Chemotherapy	Median	95% CI	P
NSCLC-GEM/TAX	4.0	2.3–4.8	–
SCLC-PE	6.1	3.8–8.3	0.48
NSCLC-PEM	6.3	2.4–10.1	0.23

Cox-regression analysis and test for interaction for mutation status, type of chemotherapy treatment related to overall survival

Variable	NSCLC GEM/TAX (n)	SCLC PE (n)	Hazards ratio (95% CI)[a]	Interaction *P*-value[b]
RB1-mutated	16	15	1.31 (0.62–2.77)	0.35
RB1 wild-type	15	13	2.37 (1.09–5.19)	



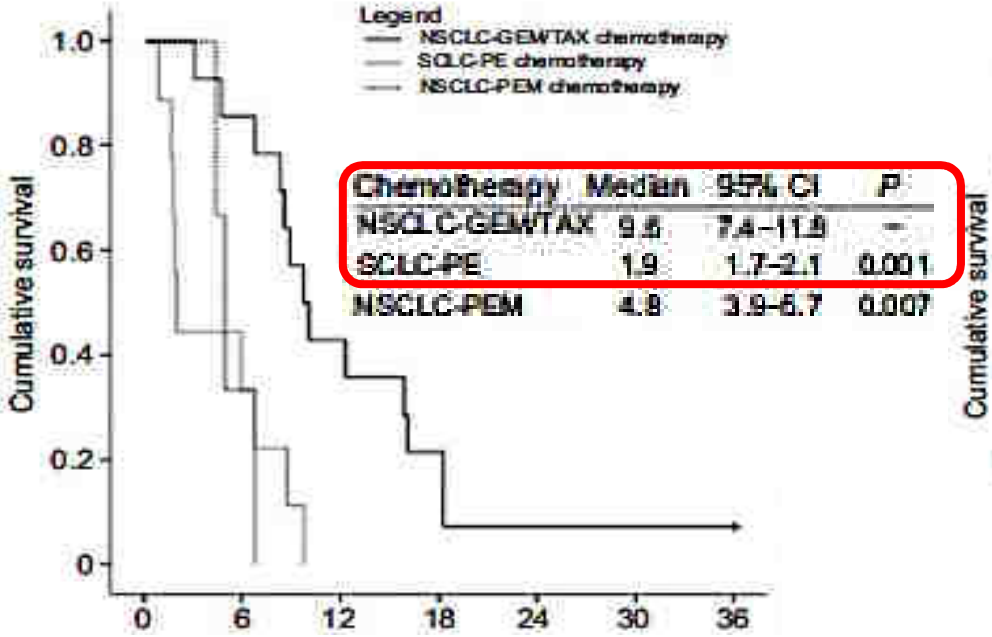
Molecular Subtypes of Pulmonary Large-cell Neuroendocrine Carcinoma Predict Chemotherapy Treatment Outcome

Jules L. Derks[1], Noémie Leblay[2], Erik Thunnissen[3], Robert Jan van Suylen

faible expression RB1 → sensibilité aux platines

92% des *RB1*^{m} ont H-score = 0
RB1^{wt}: H-score médian = 50

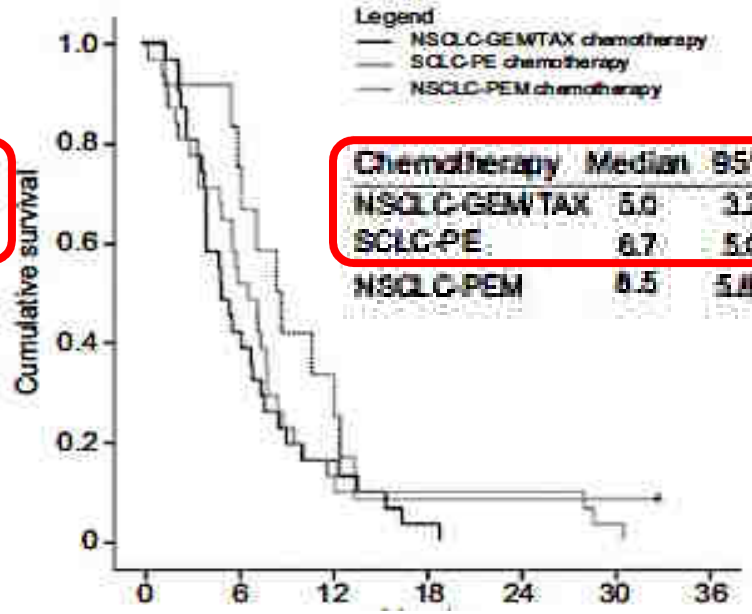
LCNEC with RB1 H-score ≥ 50



Chemotherapy	Median	95% CI	P
NSCLC-GEM/TAX	9.6	7.4–11.9	–
SCLC-PE	1.9	1.7–2.1	0.001
NSCLC-PEM	4.8	3.9–6.7	0.007

LCNEC with RBI H-score < 50

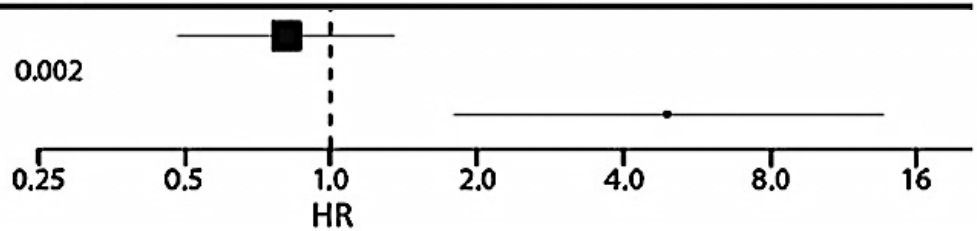
72% pop.



Chemotherapy	Median	95% CI	P
NSCLC-GEM/TAX	5.0	3.2–6.9	–
SCLC-PE	6.7	5.0–8.5	0.42
NSCLC-PEM	8.5	5.8–11.2	0.13

Cox-regression analysis and test for interaction for mutation status, type of chemotherapy treatment related to overall survival

Variable	NSCLC GEM/TAX (n)	SCLC PE (n)	Hazards ratio (95% CI)[a]	Interaction *P*-value[b]
RB1 (<50 H-score)	31	31	0.81 (0.48–1.36)	0.002
RB1 (>= 50 H-score)	14	9	4.96 (1.79–13.74)	



Rb Loss and *KRAS* Mutation Are Predictors of the Response to Platinum-Based Chemotherapy in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm with Grade 3: A Japanese Multicenter Pancreatic NEN-G3 Study

	median Ki67	Rb loss	*KRAS* mutation	RR to 1st platinum	median OS
G3-NET (n=21)	29%	0	0	0/8	41.8
G3-NEC (n=49)	80%	55%	49%	19/31 (61%)	8.5
LC-NEC (n=31)	70%	47%	48%	4/9 (44%)	6.2
SC-NEC (n=18)	85%	59%	50%	15/22 (68%)	11.3

Table 5. Predictive factors for first-line platinum-based regimen

All PanNEN-G3	OR (95% CI)	*P*
Loss of Rb immunolabeling	16.5 (2.69–101.33)	0.002
KRAS mutation	7.5 (1.49–37.65)	0.014
Ki67-LI > 55%	10.7 (1.84–62.5)	0.008
Loss of Rb or *KRAS* mutation	9.28 (1.98–43.4)	0.005
Only NEC-G3	**OR (95% CI)**	***P***
Loss of Rb immunolabeling	7.7 (1.16–51.1)	0.035
KRAS mutation	3.49 (0.64–19.2)	0.149
Ki67-LI > 55%	2.14 (0.25–18.5)	0.488
Loss of Rb or *KRAS* mutation	3.57 (0.66–19.3)	0.140

Hijioka *et al*, *Clin Cancer Res* 2017

Conclusion

- **Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?**
    - **Outre les marqueurs classique CDX2/TTF1/ISLET1…, les anomalies de marquage DAXX/ATRX/MEN1 peuvent orienter vers une origine pancréatique**

- **Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine de grade 3 ?**

- **Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques?**

- **Existe-t-il des marqueurs théranostiques?**
    - **instabilité des microsatellites**
    - **MGMT**
    - **Rb**

Conclusion

- Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?

- **Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine de grade 3 ?**
    - **oui surtout dans les lésions pancréatiques**
    - **Anomalie marquage DAXX/ATRX/MEN1 et/ou SSTR2+ = TNE bien différenciée**
    - **Anomalie marquage Rb/p53 et/ou TTF1+= CNE peu différencié + probable**

- Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques?

- Existe-t-il des marqueurs théranostiques?
    - instabilité des microsatellites
    - MGMT
    - Rb

Conclusion

- Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?

- Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine de grade 3 ?

- **Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques?**
  - **Panel IHC DAXX/ATXR/ARID1A/H3K26me3 + FISH *CDKN2A* dans les TNE pancréatiques**

- Existe-t-il des marqueurs théranostiques?
  - instabilité des microsatellites
  - MGMT
  - Rb

Conclusion

- Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une métastase neuroendocrine de primitif inconnu?

- Les anomalies moléculaires peuvent elles m'être utile devant une lésion neuroendocrine de grade 3 ?

- Il y a t il de nouveaux marqueurs pronostiques?

- **Existe-t-il des marqueurs théranostiques?**
  - **Instabilité des microsatellites**
    - **Intérêt dans les CNE peu différenciés digestifs - à la demande du clinicien**
  - **MGMT**
    - **Statut MGMT dans les TNE bien différenciées pancréatiques – A confirmer**
  - **Rb**
    - **Statut Rb dans les CNE peu différenciés (surtout grandes cellules) - A confirmer**

Carrefour Pathologie 2018

Place de la pathologie moléculaire dans les lésions neuroendocrines: applications diagnostiques et théranostiques

Jerome Cros
Dpt of Pathology – INSERM U1149
Beaujon Hospital, Paris, France

CRI CENTRE de RECHERCHE sur l'INFLAMMATION

unity Addressing Unmet Needs through Innovation In hepaTology and gastroenterologY

Inserm

HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE Beaujon