HÔPITAUX UNIVERSITAIRES PARIS NORD VAL DE SEINE
Adélaïde-Hautval | Beaujon | Bichat - Claude-Bernard
Bretonneau | Louis-Mourier

Carrefour Pathologie DIGITAL 2020

ANALYSE COMPARATIVE DES PROFILS IMMUNOHISTOCHIMIQUES ET GENETIQUES DES NEOPLASMES NEUROENDOCRINES DE HAUT GRADE PULMONAIRES ET PANCREATIQUES

Ruiqian Chen*, Lacroix Ludovic, Ophélie de Rycke, Caroline Lacombe, Pierre Alexandre Just, Aurélie Cazes, Magali Svrcek, Vincent Thomas de Montpreville, Martine Antoine, Jean Yves Scoazec, Anne Couvelard, Jérôme Cros

Poumon (OMS 2015)

NEN G3
>10 mitoses/2mm²
Nécrose extensive

Bien différencié ? → Carcinome NE de haut grade avec morphologie de carcinoïde ?

Peu différencié → Carcinome NE
- A petites cellules
- À grandes cellules

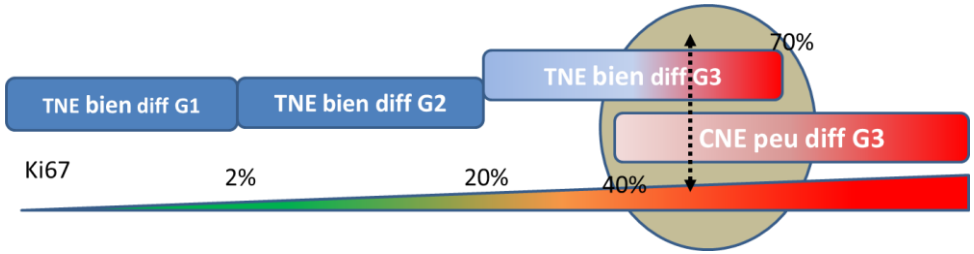
Pancréas (OMS 2019)

NEN G3
>20 mitoses/2mm²
Ki-67 >20%

Bien différencié → Tumeur NE de grade 3

Peu différencié → Carcinome NE
- A petites cellules
- À grandes cellules

Mais …



Zone grise où il peut être difficile de « trancher » concernant la différenciation (biopsie+++)

Tumeur neuroendocrine bien différenciée

Carcinome neuroendocrine peu différencié

Caractéristiques moléculaires des **NEN pulmonaires**

Carcinoïde
- *MEN1* (11-22%)
- *PSIP1, ARID1A, EIF1AX* (13,3%)
- Voie mTOR (11-29%)
- ***TP53/RB1* (6-10%)**

NEC PC
- ***RB1* (65%) *TP53* (90%)**
- **Famille NOTCH (25%)**

NEC GC
- ***RB1* (42%) *TP53* (92%)**
- ***STK11* (30%), *KEAP1* (22%)**
- ***RAS* (10%)**
- ***MEN1, ARID1, MLL1-3***

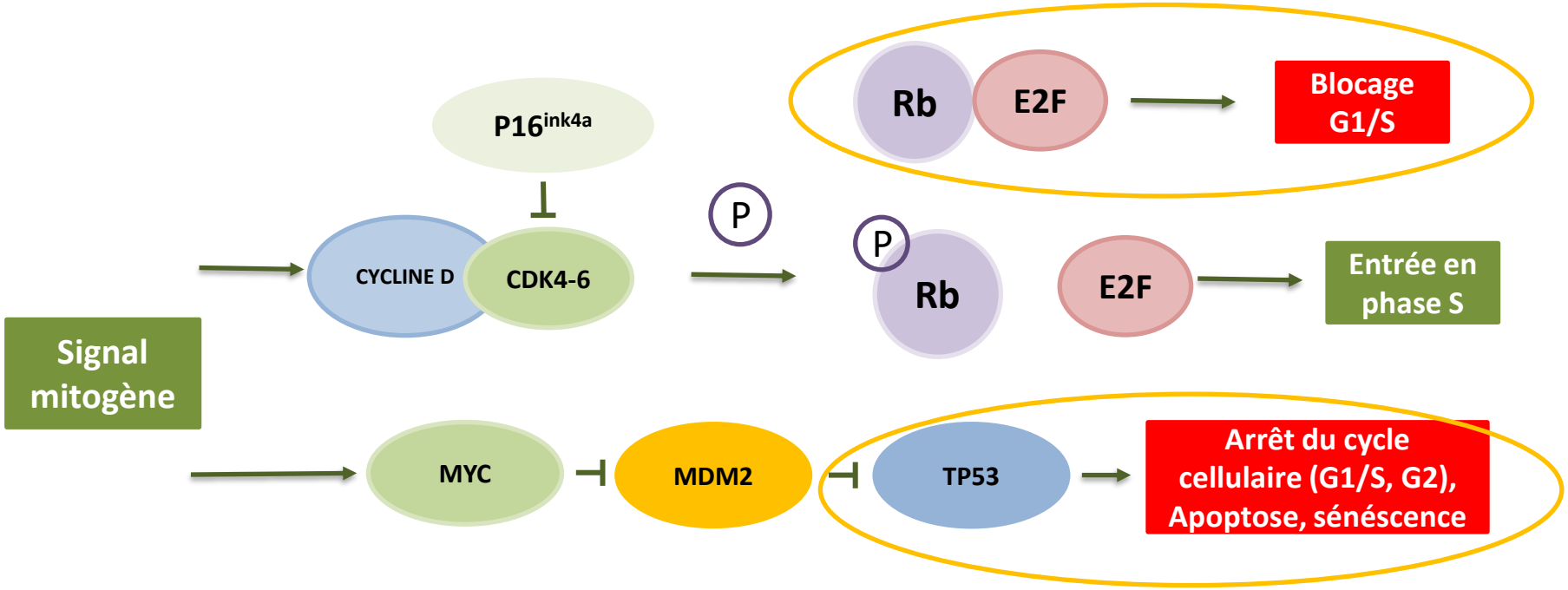
Caractéristiques moléculaires des **NEN pancréatiques**

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

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

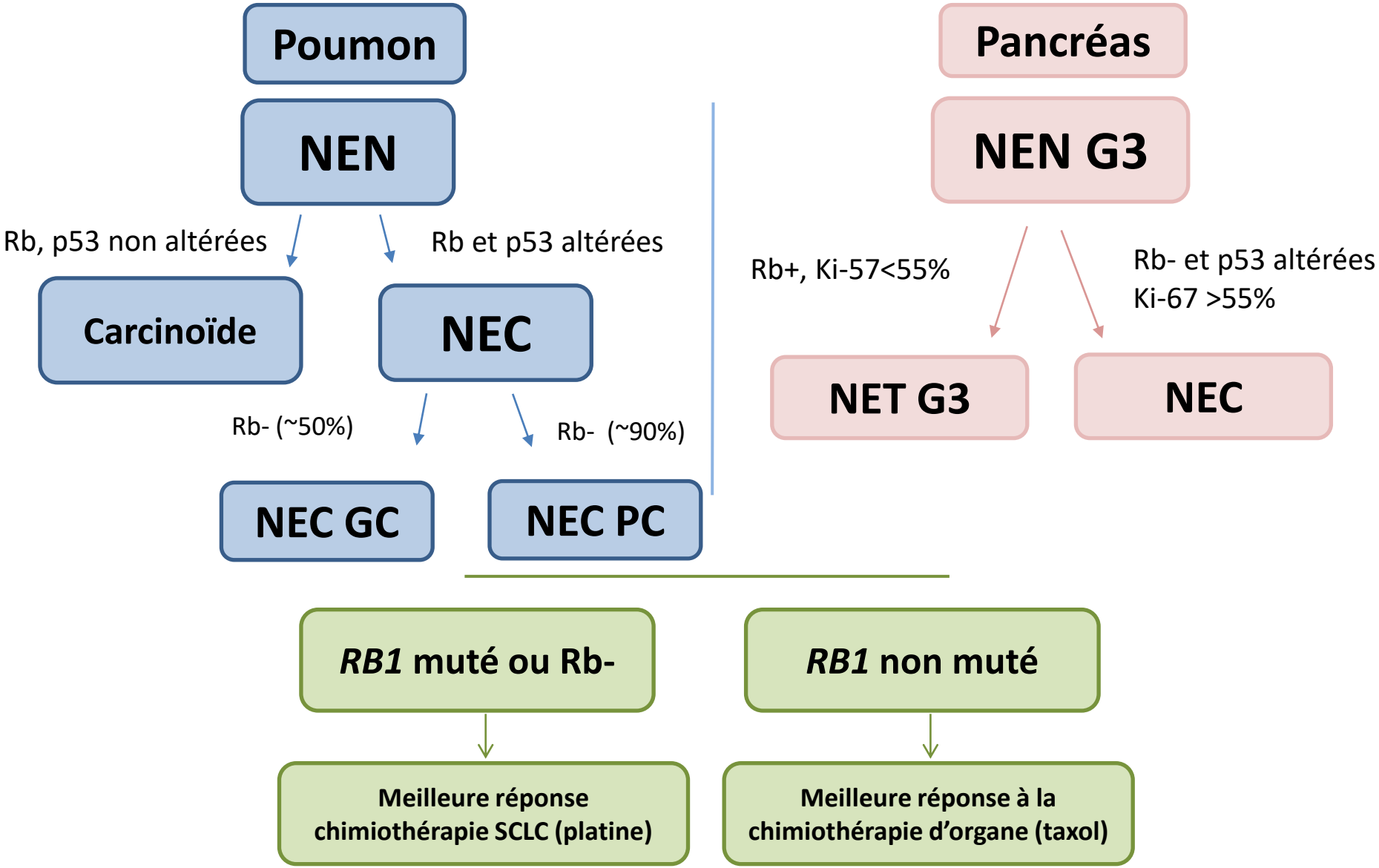
George et al.
Rhekman et al. Simbolo et al.
Scarpa Nature 2017
Tang CCR 2015 / Yachida AJSP 2012

Les biomarqueurs



- Rb et p53: régulateurs négatifs du cycle cellulaire, dont l'absence d'expression est anormale dans les tumeurs proliférantes
- Lorsque Rb est anormalement absente dans les tumeurs proliférantes, p16 est classiquement surexprimée

Intérêts diagnostiques et théranostiques des biomarqueurs



Aujourd'hui, absence de guideline pour évaluation de Rb et de p53

Objectifs

Décrire les différents patterns d'expression immunohistochimique de Rb, p16, p53 des NEN de haut grade pulmonaires et pancréatiques

Tester **la concordance** entre les anomalies moléculaires détectées par NGS et les patterns immunohistochimiques

Sélection des cas

- Etude **multicentrique** nationale (Ile de France, Lyon, Tours et Lille)
- **Pièces opératoires** ou **biopsies** des NEN de haut grade pulmonaires et pancréatiques de 1997-2018
- Relecture des lames HES et les lames IHC Ki-67 par Prs Couvelard et Cros
- Construction du tissu microarray pour les pièces opératoires (4 spots sur 2 blocs tumoraux)

Immunohistochimie

Anticorps	Rb	Rb	P16	P53	Ki-67
Clone	4H1	13A10	E6H4	D07	Mib-1
Dilution	1:500	1:100	Prédilué	1:400	1:100
Marque	Cell signaling	Ventana	Ventana	Dako	Dako
Marquage	nucléaire	nucléaire	Nucléaire et cytoplasmique	Nucléaire	nucléaire

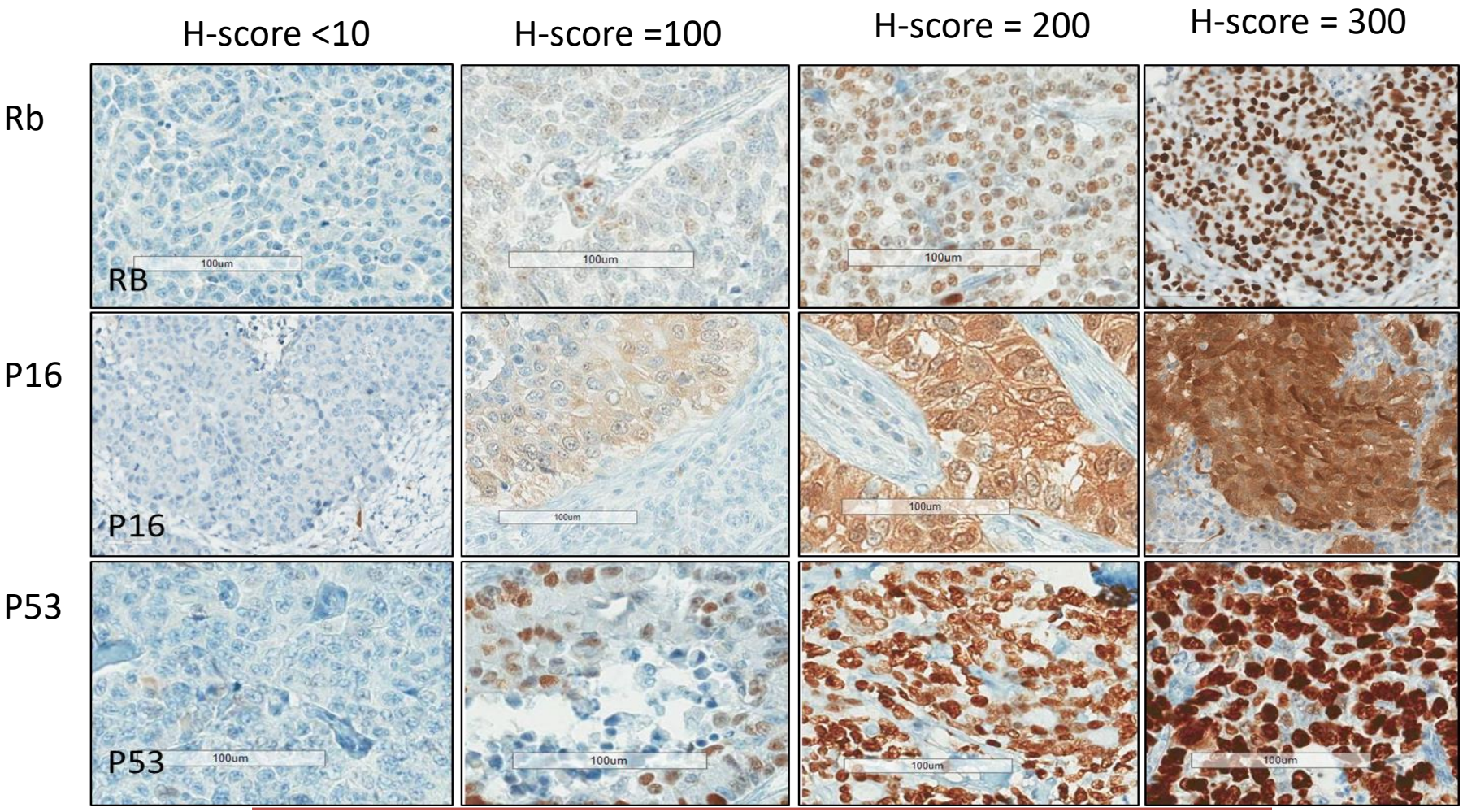
Interprétation IHC Rb, p16, p53 selon approche semi-quantitative (J. Cros et R. CHEN, J-Y. Scoazec)

- **H score: intensité (0 – 3) x pourcentage cellulaire positif (0 – 100%)**

Analyse génétique (IGR): NGS Oncomine

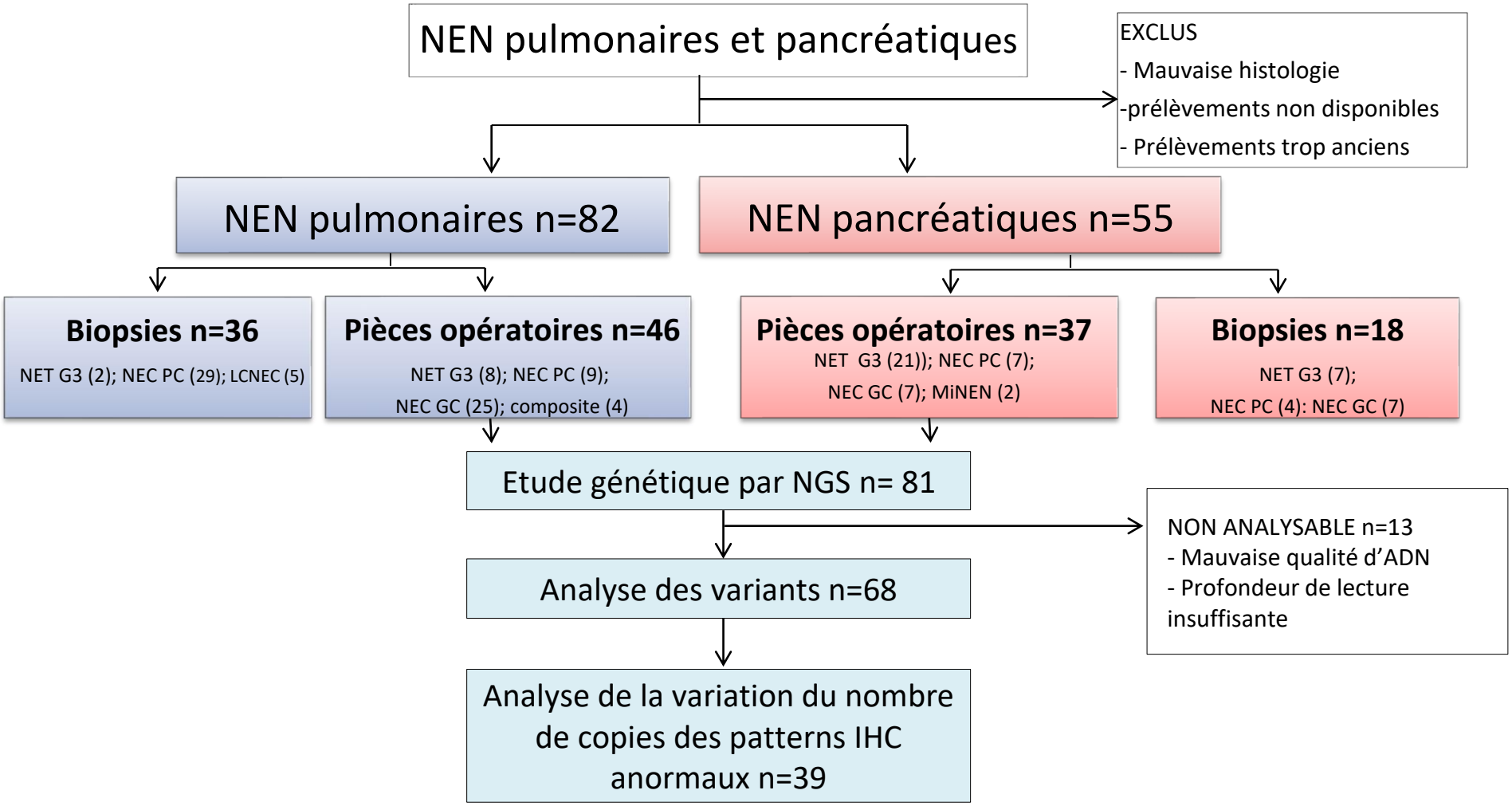
Hybridation in situ en fluorescence (Cochin)

- Sonde Color Dual *CDKN2A*/CEN9



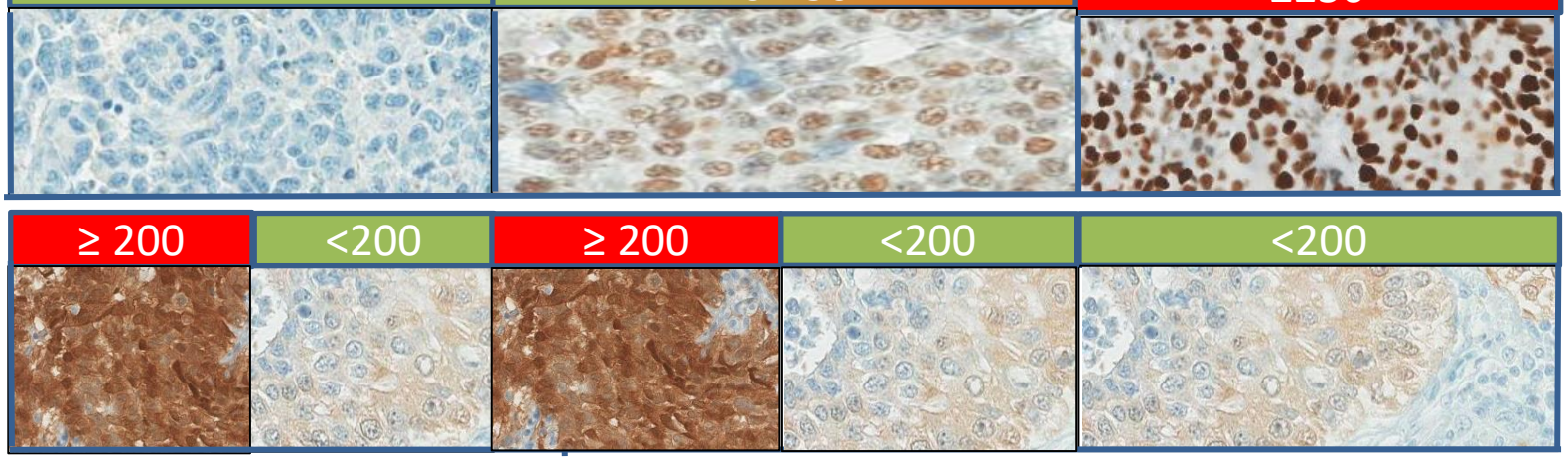
Anticorps	**Rb**	**P16 et P53**
Absence d'expression	<10	<10
hétérogène	10-250	10-200
surexpression	>250	>200

Sélection des échantillons



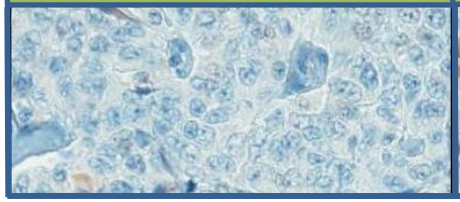
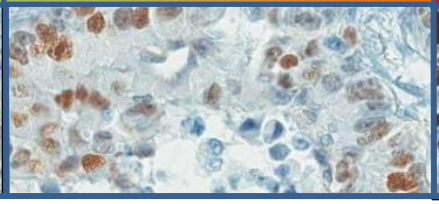
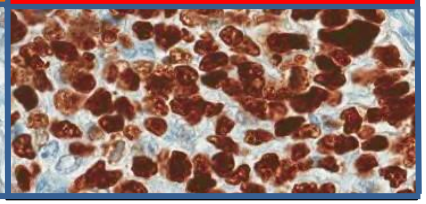
Patterns d'immunohistochimie
Voie Rb/p16

Ki-67	> 20%				
Rb	≤10		10-250		≥250
p16	≥ 200	<200	≥ 200	<200	<200
Pattern IHC	1A	1B	2	4	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation *RB1*	Inactivation *RB1* et *CDKN2A*	Activation de la voie Rb/cycline D1/p16	Voie Rb/cycline D1/p16 intacte	Surexpression de Rb des cellules prolifératives: signification?



Probable perte de contrôle du cycle cellulaire

Patterns d'immunohistochimie p53

Ki-67	> 20%		
p53 IHC	≤10	10-200	≥200
			
Pattern IHC	1	2	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation de *TP53*	*TP53* sauvage	Mutation de *TP53*

Distribution des patterns Rb/p16 selon les types histologiques

Ki-67	> 20%				
Rb	≤10		10-250		≥250
p16	≥ 200	<200	≥ 200	<200	<200
Pattern IHC	1A	1B	2	4	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation *RB1*	Inactivation *RB1* et *CDKN2A*	Activation de la voie Rb/cycline D1/p16	Voie Rb/cycline D1/p16 intacte	Surexpression de Rb des cellules prolifératives: signification?

	TOTAL n=137(Rb) n=136(p53)	POUMON n=82	PANCREAS n=55(Rb) n=54(p53)	NET G3 n=38	NEC PC n=49	NEC GC n=44	Composite MANEC n=6
RB1/P16							
Pattern 1A	**59 (43%)**	**48(59%)**	**11 (20%)**	**2**	**39**	**15**	**3**
Pattern 1B	**5 (4%)**	**3 (4%)**	**2 (4%)**	**0**	**2**	**1**	**2**
Pattern 2	13 (9%)	5 (6%)	8 (14%)	3	6	4	0
Pattern 3	18 (13%)	11 (13%)	7 (13%)	6	0	12	0
Pattern 4	42 (31%)	15 (18%)	27 (49%)	27	2	12	1

Absence d'expression de Rb observée dans 84% des NEC PC et des carcinomes composites, 36% des NEC GC et **7% des NET G3**

Distribution des patterns Rb/p16 selon les types histologiques

Ki-67	> 20%				
Rb	≤10		10-250		≥250
p16	≥ 200	<200	≥ 200	<200	<200
Pattern IHC	1A	1B	2	4	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation *RB1*	Inactivation *RB1* et *CDKN2A*	Activation de la voie Rb/cycline D1/p16	Voie Rb/cycline D1/p16 intacte	Surexpression de Rb des cellules prolifératives: signification?

	TOTAL n=137(Rb) n=136(p53)	POUMON n=82	PANCREAS n=55(Rb) n=54(p53)	NET G3 n=38	NEC PC n=49	NEC GC n=44	Composite MANEC n=6
RB1/P16							
Pattern 1A	59 (43%)	48(59%)	11 (20%)	2	39	15	3
Pattern 1B	5 (4%)	3 (4%)	2 (4%)	0	2	1	2
Pattern 2	**13 (9%)**	**5 (6%)**	**8 (14%)**	**3**	**6**	**4**	**0**
Pattern 3	18 (13%)	11 (13%)	7 (13%)	6	0	12	0
Pattern 4	42 (31%)	15 (18%)	27 (49%)	27	2	12	1

Surexpression isolée de p16, rare, peut intéresser tous les types histologiques

Distribution des patterns Rb/p16 selon les types histologiques

Ki-67	> 20%				
Rb	≤10		10-250		≥250
p16	≥ 200	<200	≥ 200	<200	<200
Pattern IHC	1A	1B	2	4	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation *RB1*	Inactivation *RB1* et *CDKN2A*	Activation de la voie Rb/cycline D1/p16	Voie Rb/cycline D1/p16 intacte	Surexpression de Rb des cellules prolifératives: signification?

	TOTAL n=137(Rb) n=136(p53)	POUMON n=82	PANCREAS n=55(Rb) n=54(p53)	NET G3 n=38	NEC PC n=49	NEC GC n=44	Composite MANEC n=6
RB1/P16							
Pattern 1A	59 (43%)	48(59%)	11 (20%)	2	39	15	3
Pattern 1B	5 (4%)	3 (4%)	2 (4%)	0	2	1	2
Pattern 2	13 (9%)	5 (6%)	8 (14%)	3	6	4	0
Pattern 3	**18 (13%)**	**11 (13%)**	**7 (13%)**	**6**	**0**	**12**	**0**
Pattern 4	42 (31%)	15 (18%)	27 (49%)	27	2	12	1

Surexpression de Rb sans surexpression de p16 observée dans les NET et les NEC GC mais pas dans les NEC PC ni dans les composites

Distribution des patterns p53

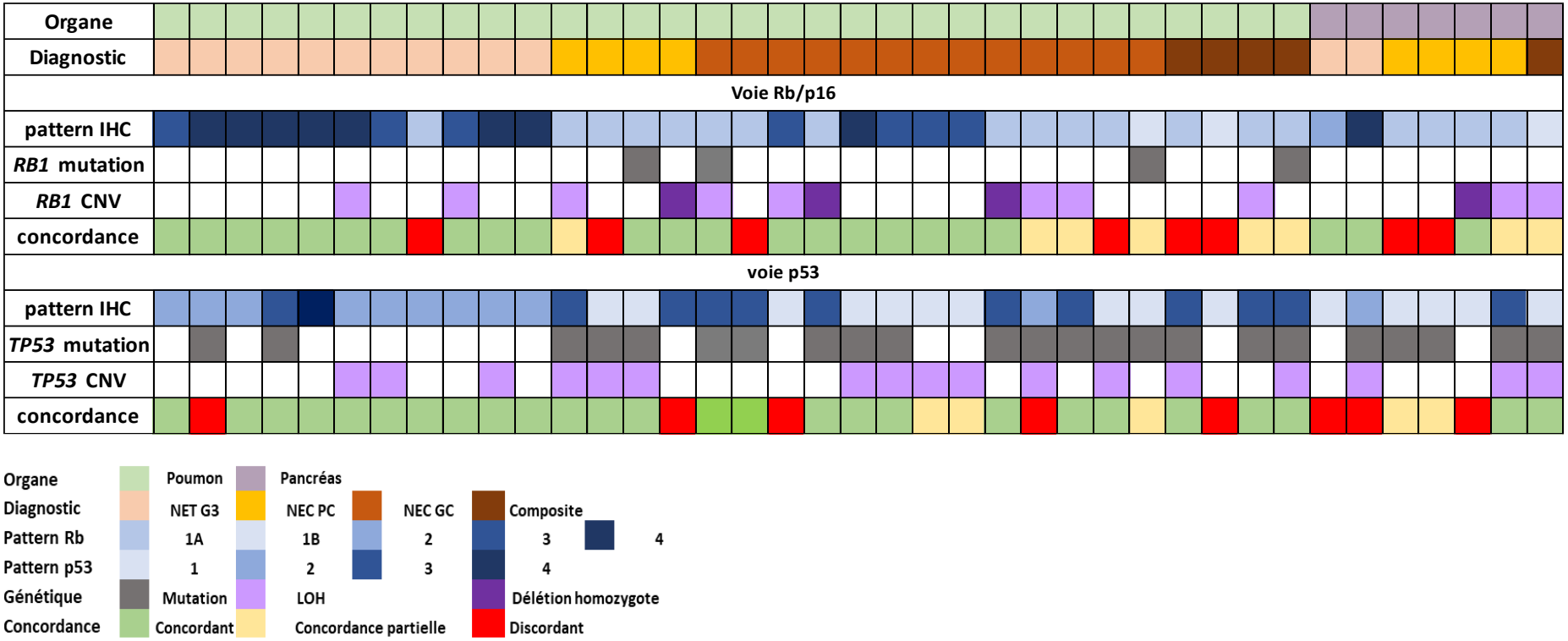
Ki-67	> 20%		
p53 IHC	≤10	10-200	≥200
Pattern IHC	1	2	3
Altérations génétiques supposées	Inactivation de *TP53*	*TP53* sauvage	Mutation de *TP53*

	TOTAL n=137(Rb) n=136(p53)	POUMON n=82	PANCREAS n=55(Rb) n=54(p53)	NET G3 n=38	NEC PC n=49	LCNEC n=44	Composite MANEC n=6
			P53				
Pattern 1	**45 (33%)**	**27 (33%)**	**18 (33%)**	**6**	**22**	**14**	**3**
Pattern 2	48 (35%)	21 (26%)	27 (50%)	30	8	10	0
Pattern 3	**43 (32%)**	**34 (41%)**	**9 (17%)**	**2**	**19**	**19**	**3**

Anomalies d'expression de p53 observées dans 84% des NEC PC, 100% des composites, 75% des NEC GC et **20% des NET G3**

Anomalies simultanées d'expression de Rb et de p53 uniquement observées dans les **NEC** (71% des NEC PC, 30% des NEC GC et 83% des carcinomes composites), mais **pas dans les NET** de grade 3

Corrélation immunohistochimique et génétique



Concordance Rb dans 79% des cas (31/39) k= 0,60, $p=10^{-4}$

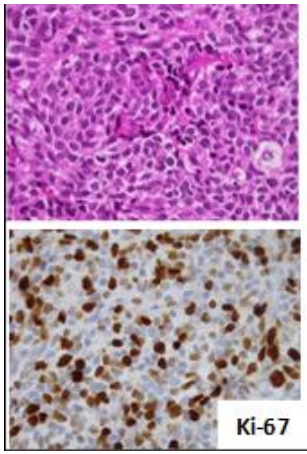
Concordance de p53 dans 79% des cas (31/39) k= 0,54, $p<0,0007$

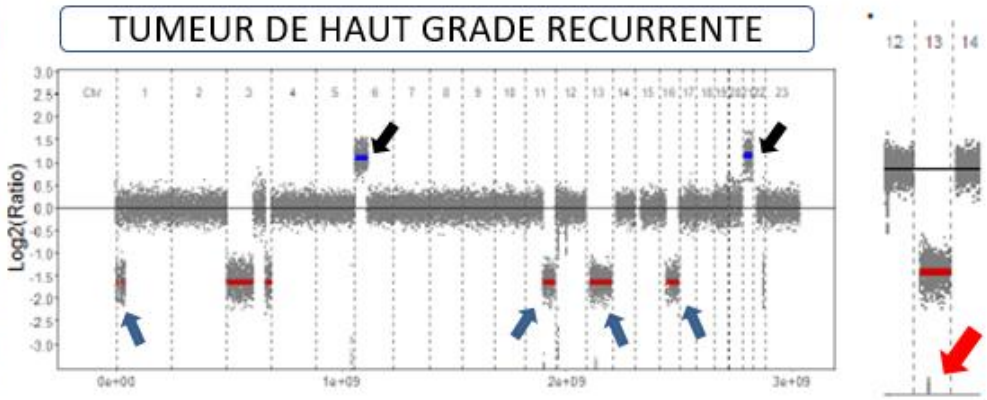
Discordance IHC-génétiques de Rb/p16

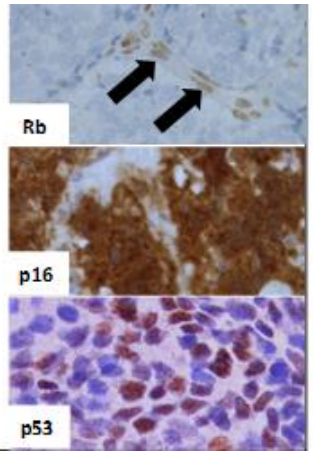
Diagnostic	IHC Rb	IHC p16	Ki-67	Mutation RB1 (VAF)	CNV	Explications possibles
Carcinoïde agressive	0	300	56	-	-	**D'autres mécanismes d'altération de *RB1* : modifications épigénétiques, petites délétions homozygotes**
NEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	95	-	-	
NEC GC	0	300	73	-	-	
NEC GC	0	300	80	-	-	
Composite	0	300	53	-	-	
Composite	0	0	97	*CDKN2A* p.E69* (88%)	Délétion de *CDKN2A* *(FISH)*	mutation et délétion de *CDKN2A*

Discordance IHC-génétique de Rb/p16

Diagnostic	IHC Rb	IHC p16	Ki-67	Mutation RB1 (VAF)	CNV	Explications possibles
Carcinoïde agressive	**0**	**300**	**56**	**-**	**-**	**D'autres mécanismes d'altération de *RB1* : modifications épigénétiques, petites délétions homozygotes**
NEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	95	-	-	
NEC GC	0	300	73	-	-	
NEC GC	0	300	80	-	-	
Composite	0	300	53	-	-	
Composite	0	0	97	*CDKN2A* p.E69* (88%)	Délétion de *CDKN2A* (FISH)	mutation et délétion de *CDKN2A*

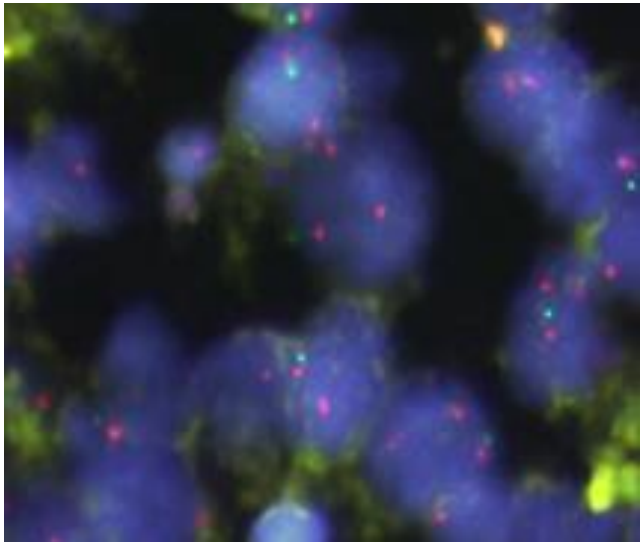






Discordance IHC-génétiques de Rb/p16

Diagnostic	IHC Rb	IHC p16	Ki-67	Mutation	CNV	Explications possibles
Carcinoïde agressive	0	300	56	-	-	D'autres mécanismes d'altération de *RB1* : modifications épigénétiques, petites délétions homozygotes
NEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	70	-	-	
PanNEC PC	0	300	95	-	-	
NEC GC	0	300	73	-	-	
NEC GC	0	300	80	-	-	
Composite	0	300	53	-	-	
Composite	**0**	**0**	**97**	***CDKN2A* p.E69* (88%)**	**Délétion de *CDKN2A* *(FISH)***	**mutation et délétion de *CDKN2A***



FISH *CDKN2A*/CEN9

Discordance IHC-génétique de p53

Diagnostic	IHC p53	Ki-67	Mutation *TP53*(VAF)	CNV	Explications possibles
Carcinoïde Agressive	**40**	**30**	**p.Y163N (53%)**	**-**	**Limite de l'étude immunohistochimique**
PanNET G3	**20**	**27**	**p.R342* (88%)**	**LOH**	
NEC GC	**150**	**70**	**p.R249S (98%)**	**LOH**	
PanNET G3	1	30	-	-	modifications épigénétiques, petites délétions homozygotes
NEC PC	0	95	-	-	
PanNEC PC	0	70	-	-	
NEC GC	0	62	-	-	
Composite	5	97	-	-	

Concordance partielle IHC-génétiques de p53

Diagnostic	IHC p53	Ki-67	Mutation *TP53*(VAF)	CNV	Explications possibles
Carcinoïde Agressive	40	30	p.Y163N (53%)	-	Limite de l'étude immunohistochimique
PanNET G3	20	27	p.R342* (88%)	LOH	
NEC GC	150	70	p.R249S (98%)	LOH	
PanNET G3	**1**	**30**	**-**	**-**	**modifications épigénétiques, petites délétions homozygotes**
NEC PC	**0**	**95**	**-**	**-**	
PanNEC PC	**0**	**70**	**-**	**-**	
NEC GC	**0**	**62**	**-**	**-**	
Composite	**5**	**97**	**-**	**-**	

Interprétation de Rb en fonction de p16 et de Ki-67

- Confirmation d'expression réciproque de Rb et de p16
  - surexpression de p16: phénomène secondaire à la perte de Rb
  - Pattern non spécifique au NEC
  - L'expression de p16 aide à affirmer la perte de Rb, surtout en cas de Ki-67 intermédiaire (30-40%)

- **Perte de Rb sans surexpression de p16**
  - **Significative** si Ki-67 très élevé (seuil à définir)
  - Probable **délétion du gène *CDKN2A*** codant pour p16

- Surexpression de p16 seule
  - Décrite dans les NEC colorectaux
  - Probable altération d'autres gènes de la voie Rb sans altération de *RB1*

- Surexpression de Rb
  - Décrite dans cancers colorectaux et tumeurs de vessie
  - Liée à l'état hyperphosphorylé de Rb? Ou méthylation du corps du gène *RB1*
  - Non surexpression de p16: voie Rb « sous contrôle »
  - Pas d'anomalie moléculaire significative retrouvée dans notre étude

Interprétation de Rb en fonction de p16 et de Ki-67

- Confirmation d'expression réciproque de Rb et de p16
  - surexpression de p16: phénomène secondaire à la perte de Rb
  - L'expression de p16 aide à affirmer la perte de Rb, surtout en cas de Ki-67 intermédiaire (30-40%)
  - Pattern non spécifique au NEC

- Perte simultanée de Rb sans surexpression de p16
  - Significative si Ki-67 très élevé (seuil à définir)
  - Probable délétion du gène CDKN2A codant pour p16

- **Surexpression de p16 seule**
  - Décrite dans les NEC colorectaux
  - Observée dans les NET et NEC de haut grade
  - **Probable altérations d'autres gènes de la voie Rb** sans altération de *RB1*

- **Surexpression de Rb**
  - Décrite dans cancers colorectaux et tumeurs de vessie
  - Liée à **l'état hyperphosphorylé** de Rb? Ou **méthylation** du corps du gène *RB1*
  - Non surexpression de p16: voie Rb « sous contrôle »
  - **Pas d'anomalie moléculaire significative** retrouvée dans notre étude

Interprétation de Rb en fonction de p16 et de Ki-67

- Confirmation d'expression réciproque de Rb et de p16
  - surexpression de p16: phénomène secondaire à la perte de Rb
  - Pattern non spécifique au NEC
  - L'expression de p16 aide à affirmer la perte de Rb, surtout en cas de Ki-67 intermédiaire (30-40%)
- Perte simultanée de Rb et de p16
  - Significative si Ki-67 très élevé (seuil à définir)
  - Probable délétion du gène CDKN2A codant pour p16
- Surexpression de p16 seule
  - Décrite dans les NEC colorectaux
  - Probable altération d'autres gènes de la voie Rb sans altération de *RB1*

- **Surexpression de Rb**
  - Décrite dans cancers colorectaux et tumeurs de vessie
  - Liée à **l'état hyperphosphorylé** de Rb? Ou **méthylation** du corps du gène *RB1*
  - Sans surexpression de p16: voie Rb « sous contrôle »
  - **Pas d'anomalie moléculaire significative** retrouvée dans notre étude

Conclusion et perspective

- Panel Rb/p16/p53 semble être plus sensible que le séquençage en panel
- Adapté en routine
- Patterns anormaux Rb/p16 et p53 non spécifiques des NEC même si beaucoup plus fréquent

→ Compléter par un panel élargi (*MEN1/ATRX/DAXX/TTF1)*

Séquençage
Département de Biopathologie de l'Institut Gustave Roussy
Pr Jean-Yves SCOAZEC
Pr Ludovic LACROIX

FISH
Département de Pathologie de l'hôpital Cochin
Dr Pierre-Alexandre JUST

Collections
CHU Beaujon: Pr Anne COUVELARD, Pr Jérôme CROS
CHU Bichat: Pr Aurélie CAZES, Dr Claire DANEL
CHU Saint Antoine: Pr Magali SVRCEK
CHU Tenon: Dr Martine ANTOINE
Hôpital Marie-Lannelongue: Dr Vincent Thomas DE MONTPREVILLE
Hospices Civils de Lyon: Dr Valérie HERVIEUX
CHU Tours: Pr Serge GUYETANT
CHU Lille: Pr Emmanuelle LETEURTRE