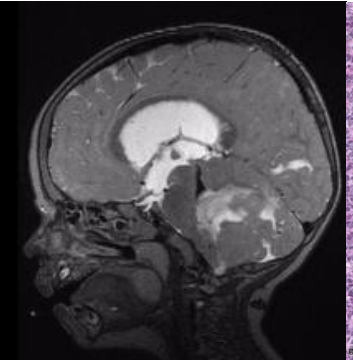
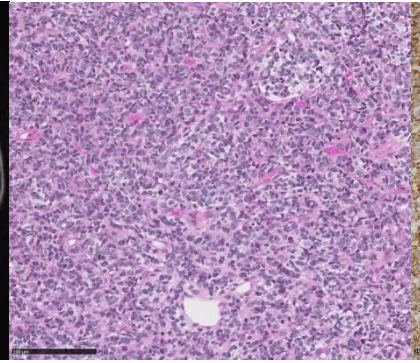
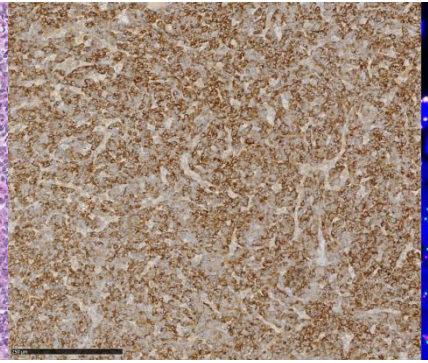
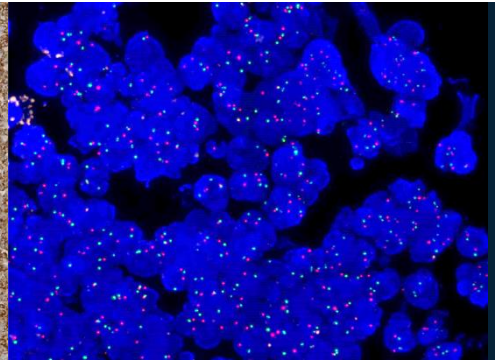
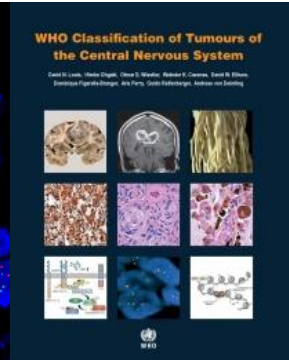






LE SOUS-GROUPAGE MOLÉCULAIRE DES MÉDULLOBLASTOMES PAR IMMUNOHISTOCHIMIE : CONCORDANCE ÉLEVÉE PAR RAPPORT AU MÉTHYLOME MAIS MANQUE DE FIABILITÉ DANS LES TUMEURS À DIFFÉRENCIATIONS DIVERGENTES

A Tauziède-Espariat, S Huybrechts, E Indersie, C Dufour, S Puget, A Chivet, A Roux, M Pagès, A Gareton, F Chrétien, E Lechapt, O Ayrault, P Varlet

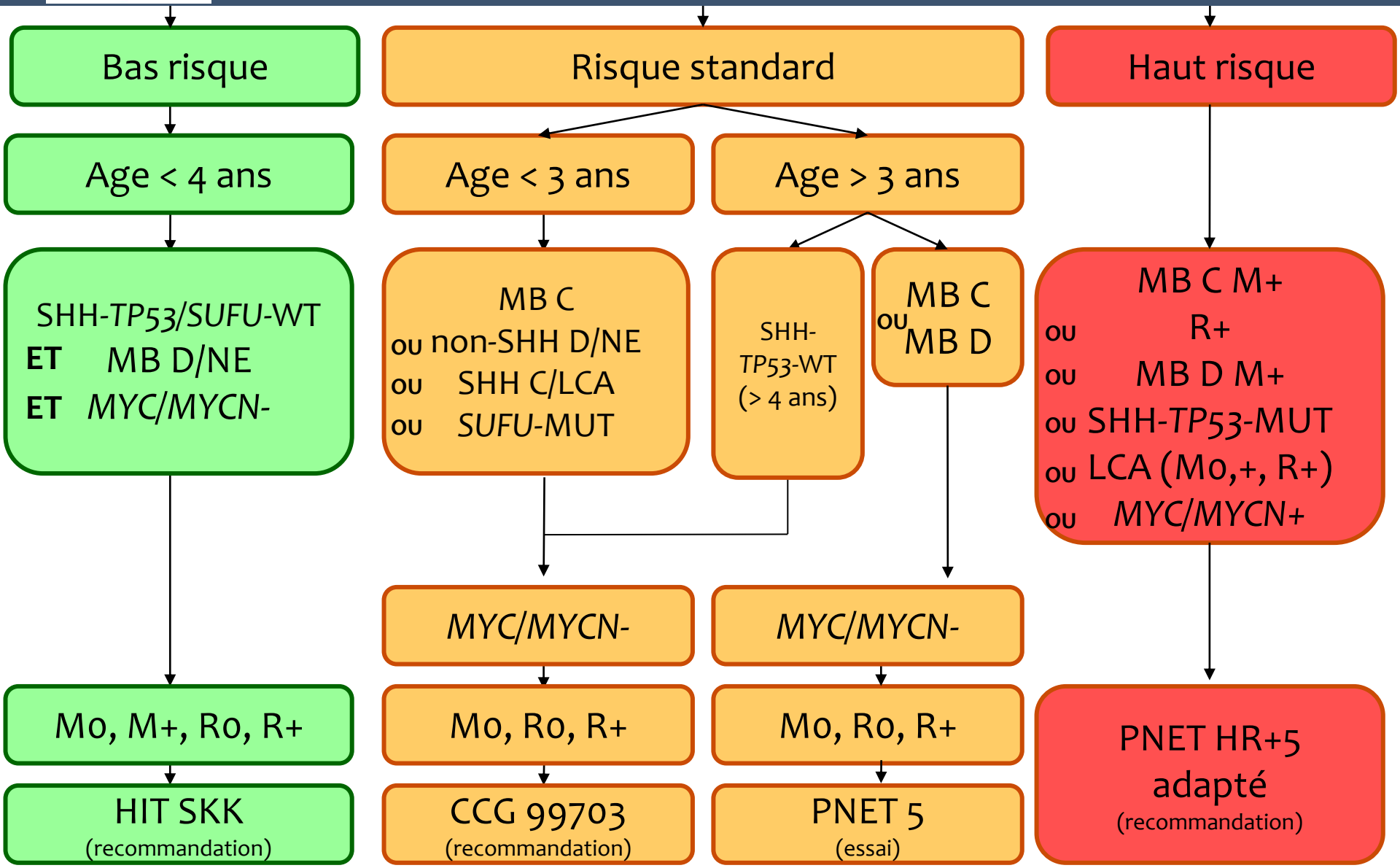
1 DEPARTMENT OF NEUROPATHOLOGY, GHU PARIS-NEUROSCIENCES, SAINTE-ANNE HOSPITAL 75014 PARIS, FRANCE
2 SERVICE NATIONAL D'ONCOLOGIE ET HÉMATOLOGIE PÉDIATRIQUE, CENTRE HOSPITALIER DE LUXEMBOURG, 1210 LUXEMBOURG CITY, LUXEMBOURG
3 INSTITUT CURIE, PSL RESEARCH UNIVERSITY, CNRS UMR, INSERM, 91405 ORSAY, FRANCE
4 UNIVERSITÉ PARIS SUD, UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY, CNRS UMR 3347, INSERM U1021, 91405 ORSAY, FRANCE
5 DEPARTMENT OF PEDIATRIC ONCOLOGY, GUSTAVE ROUSSY INSTITUTE, UNIV. PARIS-SUD, UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY, 94805, VILLEJUIF, FRANCE
6 DEPARTMENT OF PEDIATRIC NEUROSURGERY, NECKER HOSPITAL, APHP, UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES, SORBONNE PARIS CITE, 75015 PARIS, FRANCE
7 DEPARTMENT OF NEUROSURGERY, GHU PARIS-NEUROSCIENCES, SAINTE-ANNE HOSPITAL 75014 PARIS, FRANCE

GHU PARIS PSYCHIATRIE & NEUROSCIENCES · Necker Enfants Malades · institut Curie · Gustave Roussy Cancer Campus Grand Paris · Carrefour Pathologie Digital 2020

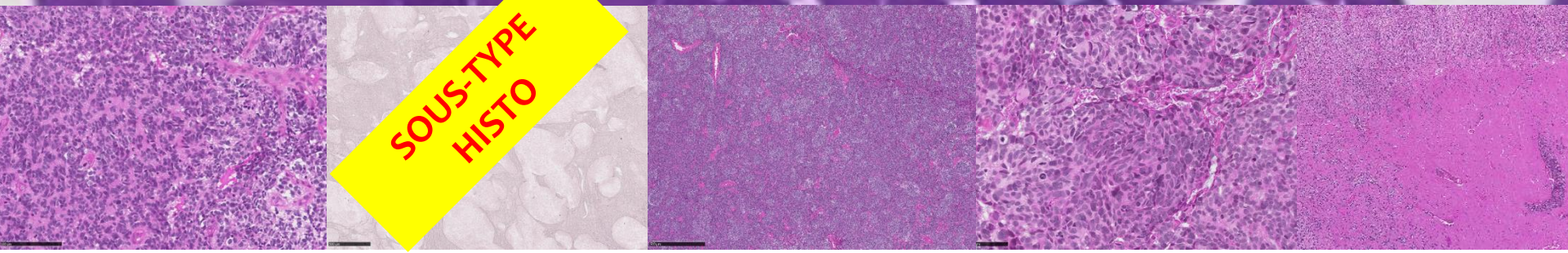
Notion de risque > 5 ans

Bas risque	Risque standard	Haut risque
Age < 16 ans		
WNT **ET** *MYC/MYCN-*	WNT **ET** M0 **ET** age > 16 ans **OU** WNT **ET** M+ **ET** age < 16 ans **OU** SHH-*TP53*-WT **ET** M0R0 **OU** Non-WNT/non-SHH **ET** M0R0	SHH-*TP53*-WT **ET** M+ **OU** Non-WNT/non-SHH **ET** M+ **OU** LCA (M0, M+, R0, R+) **OU** SHH *TP53*-MUT **OU** *MYC/MYCN+*
M0, R0	*MYC/MYCN-* (*Grp 4 M0 R0 Myc pos éligible)	
PNET5 (essai)	PNET5 (essai)	PNET HR+5 (recommandation)

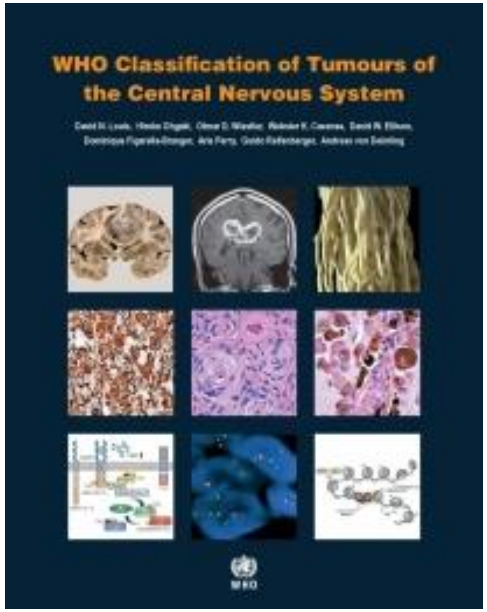
Notion de risque < 5 ans



Notion de « risque »

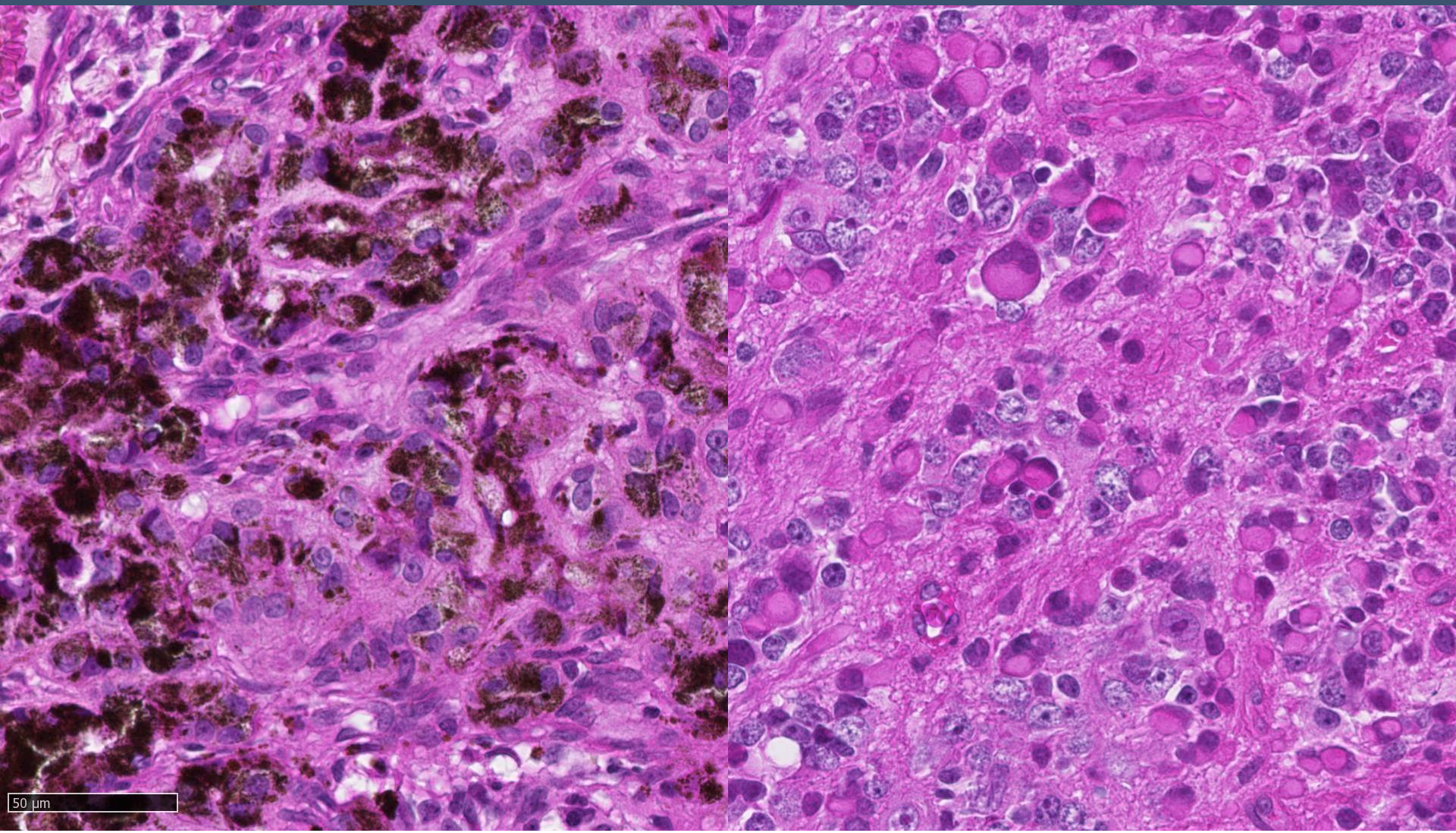


Sous-types histologiques

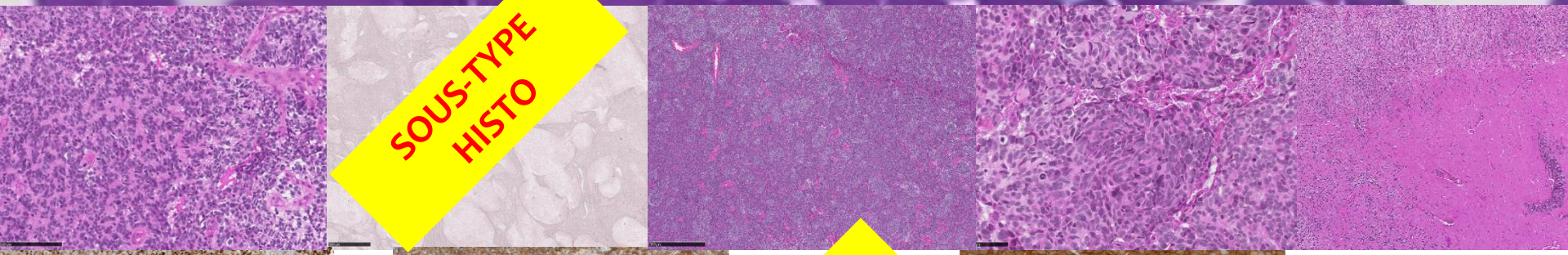


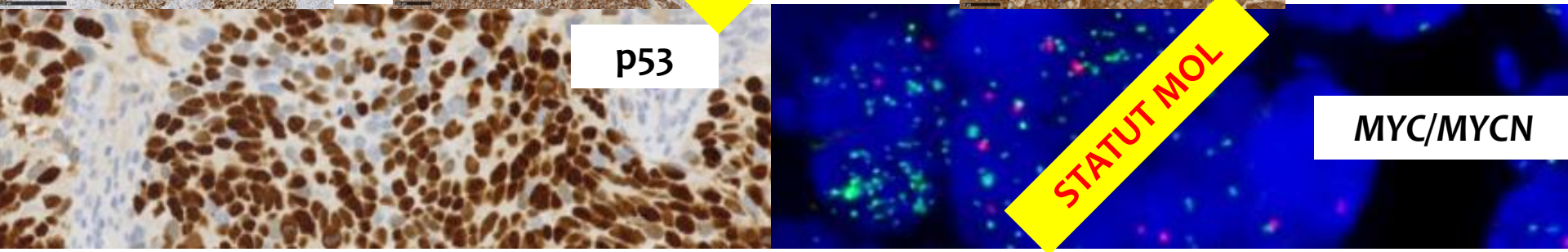
Embryonal tumours	
Medulloblastomas, genetically defined	
Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-mutant	9476/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-wildtype	9471/3
Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Medulloblastoma, group 3	
Medulloblastoma, group 4	
Medulloblastomas, histologically defined	
Medulloblastoma, classic	9470/3
Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Medulloblastoma, NOS	9470/3

Différenciations divergentes

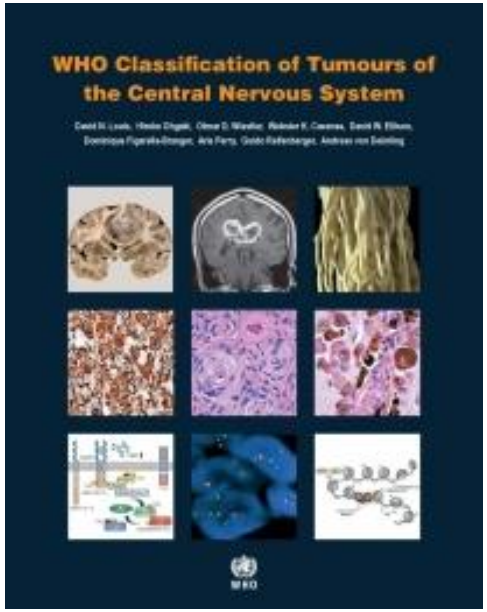


Notion de « risque »





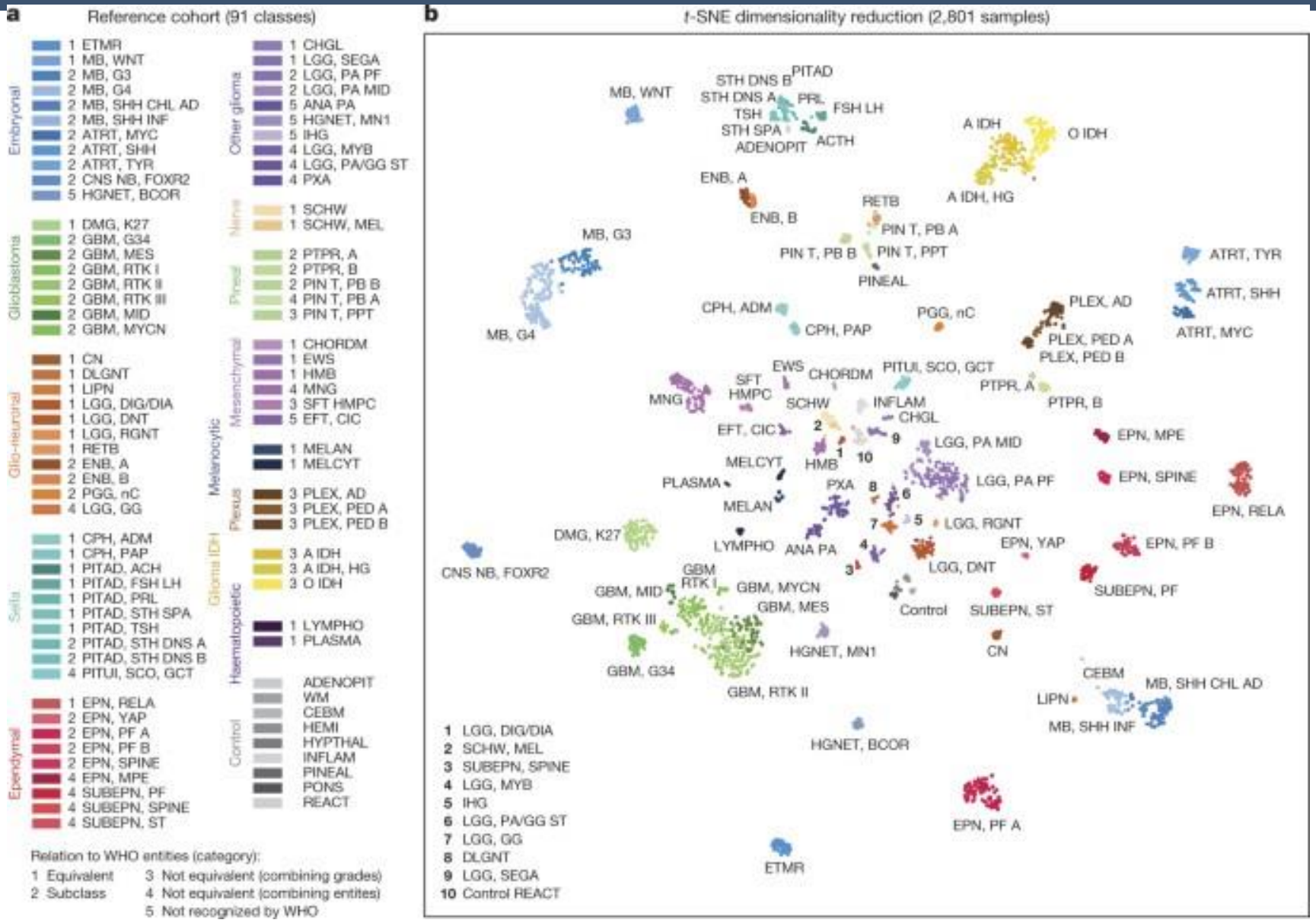
Groupes génétiques



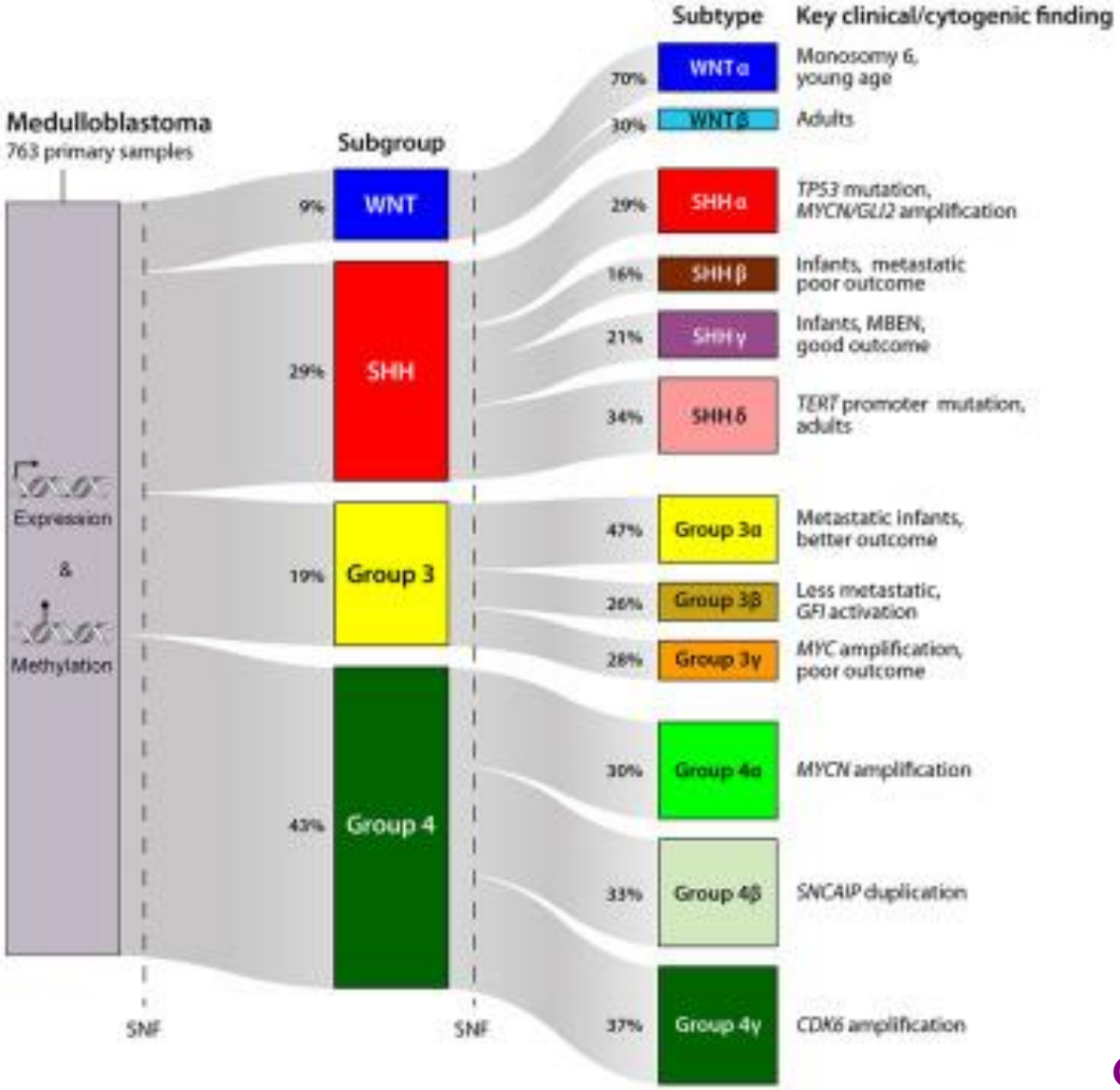
Embryonal tumours	
Medulloblastomas, genetically defined	
Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-mutant	9476/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-wildtype	9471/3
Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Medulloblastoma, group 3	
Medulloblastoma, group 4	
Medulloblastomas, histologically defined	
Medulloblastoma, classic	9470/3
Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Medulloblastoma, NOS	9470/3

IHC | TRANSCRIPTOME | NANOSTRING | MÉTHYLOME

Méthylome des tumeurs cérébrales



Méthylome des médulloblastomes



Cavalli FMG *et al*. Cancer Cell 2017

Apports du cIMPACT-NOW

Acta Neuropathologica (2018) 135:481–484
https://doi.org/10.1007/s00401-018-1808-0

CORRESPONDENCE

cIMPACT-NOW update 1: Not Otherwise Specified (NOS) and Not Elsewhere Classified (NEC)

David N. Louis[1] · Pieter Wesseling[2,3,4] · Werner Paulus[5] · Caterina Giannini[6] · Tracy T. Batchelor[7] · J. Gregory Cairncross[8] · David Capper[9,10] · Dominique Figarella-Branger[11] · M. Beatriz Lopes[12] · Wolfgang Wick[13] · Martin van den Bent[14]

NOS : Not Otherwise Specified

Sous-groupage histomoléculaire non réalisé ou techniquement mis en échec

NEC : Not Elsewhere Classified

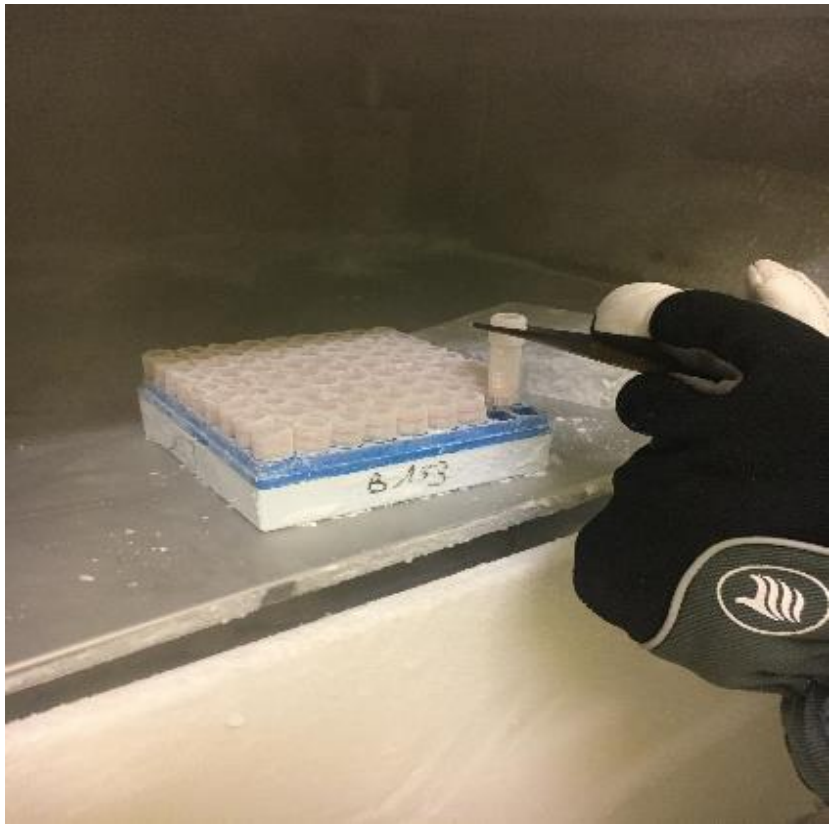
Sous-groupage histomoléculaire réalisé, validé techniquement mais ne permettant pas de conclure

Design de l'étude

COHORTE DE 155 MB

MATÉRIEL FIXÉ ET INCLUS EN PARAFFINE

MATÉRIEL CRYOPRÉSERVÉ



Matériel et méthodes

COHORTE DE 155 MB

MATÉRIEL FIXÉ ET INCLUS EN PARAFFINE

❖ Type histologique

❖ Groupe IHC/moléculaire

IHC sur lames entières

- GAB1
- YAP1
- OTX2
- β-caténine

→ Déterminer le panel le plus performant

MATÉRIEL CRYOPRÉSERVÉ

❖ Groupe moléculaire

➢ Extraction ADN

➢ Analyse du profil de méthylation

https://www.molecularneuropathology.org/mnp

dkfz. UniversitätsKlinikum Heidelberg KiTZ Hopp-Kindertumorzentrum am NCT Heidelberg MolecularNeuropathology.org

Matériel et méthodes

COHORTE DE 155 MB

MATÉRIEL FIXÉ ET INCLUS EN PARAFFINE

- ❖ Type histologique
- ❖ Groupe IHC/moléculaire

IHC sur lames entières

- GAB1
- YAP1
- OTX2
- β-caténine

ANALYSE STAT DE CONCORDANCE

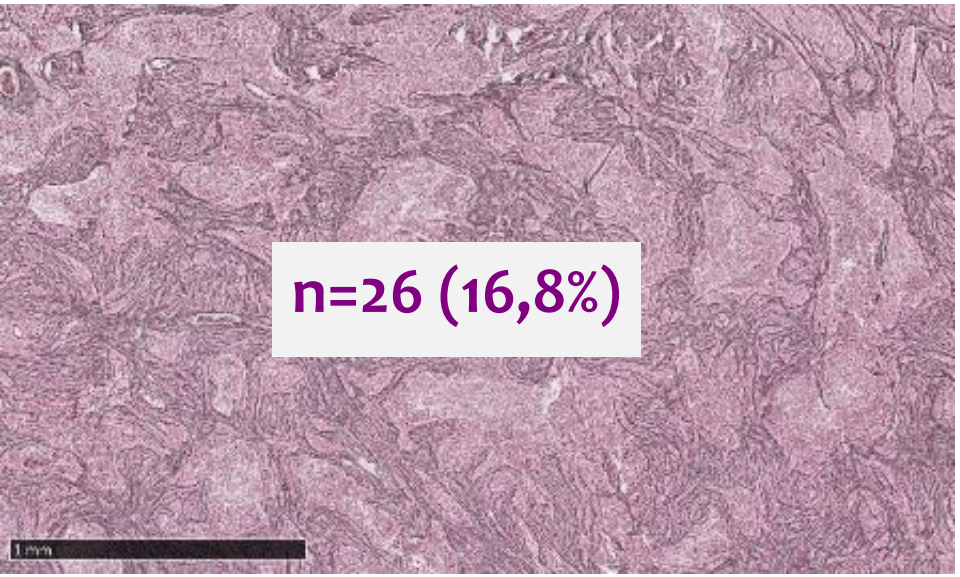
MATÉRIEL CRYOPRÉSERVÉ

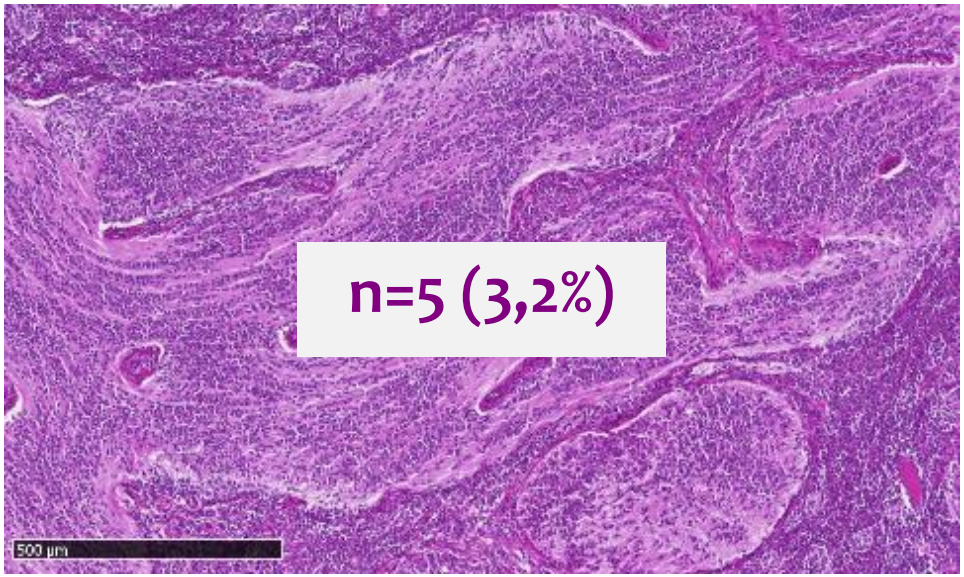
- ❖ Groupe moléculaire
- ➢ Extraction ADN
- ➢ Analyse du profil de méthylation

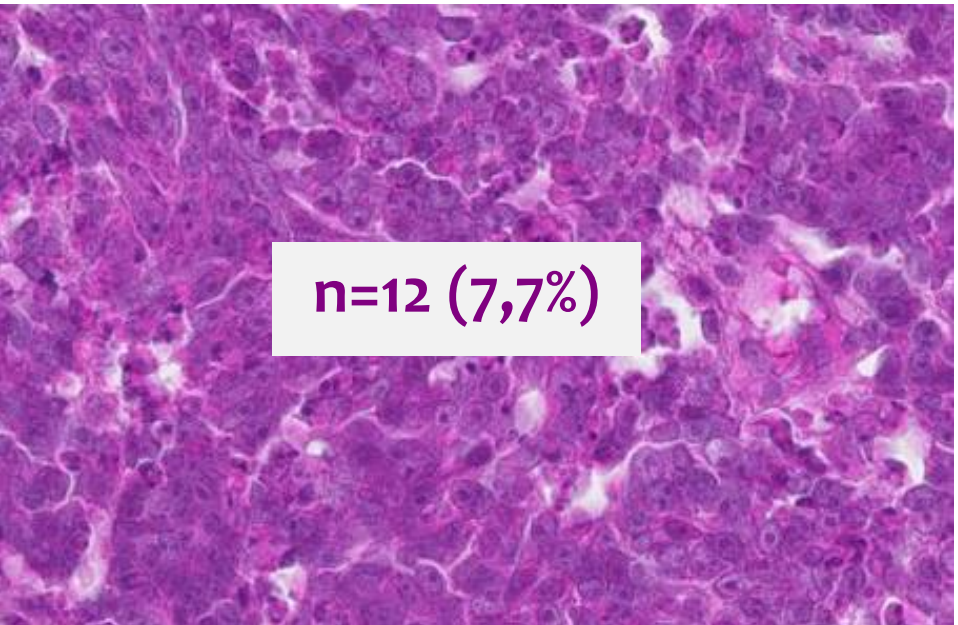
https://www.molecularneuropathology.org/mnp

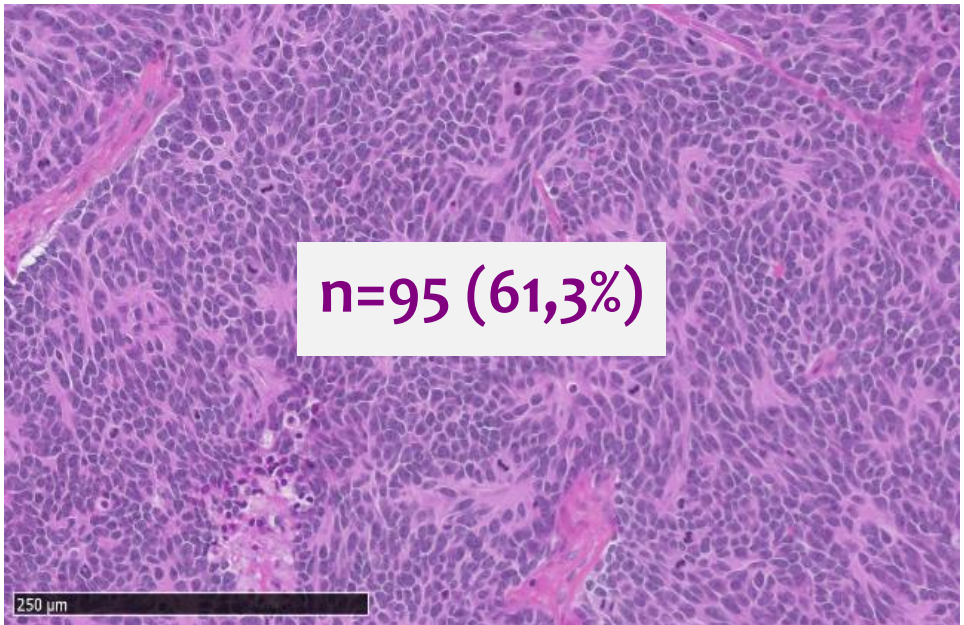
dkfz. UniversitätsKlinikum Heidelberg KiTZ Hopp-Kindertumorzentrum am NCT Heidelberg MolecularNeuropathology.org

Types histopathologiques

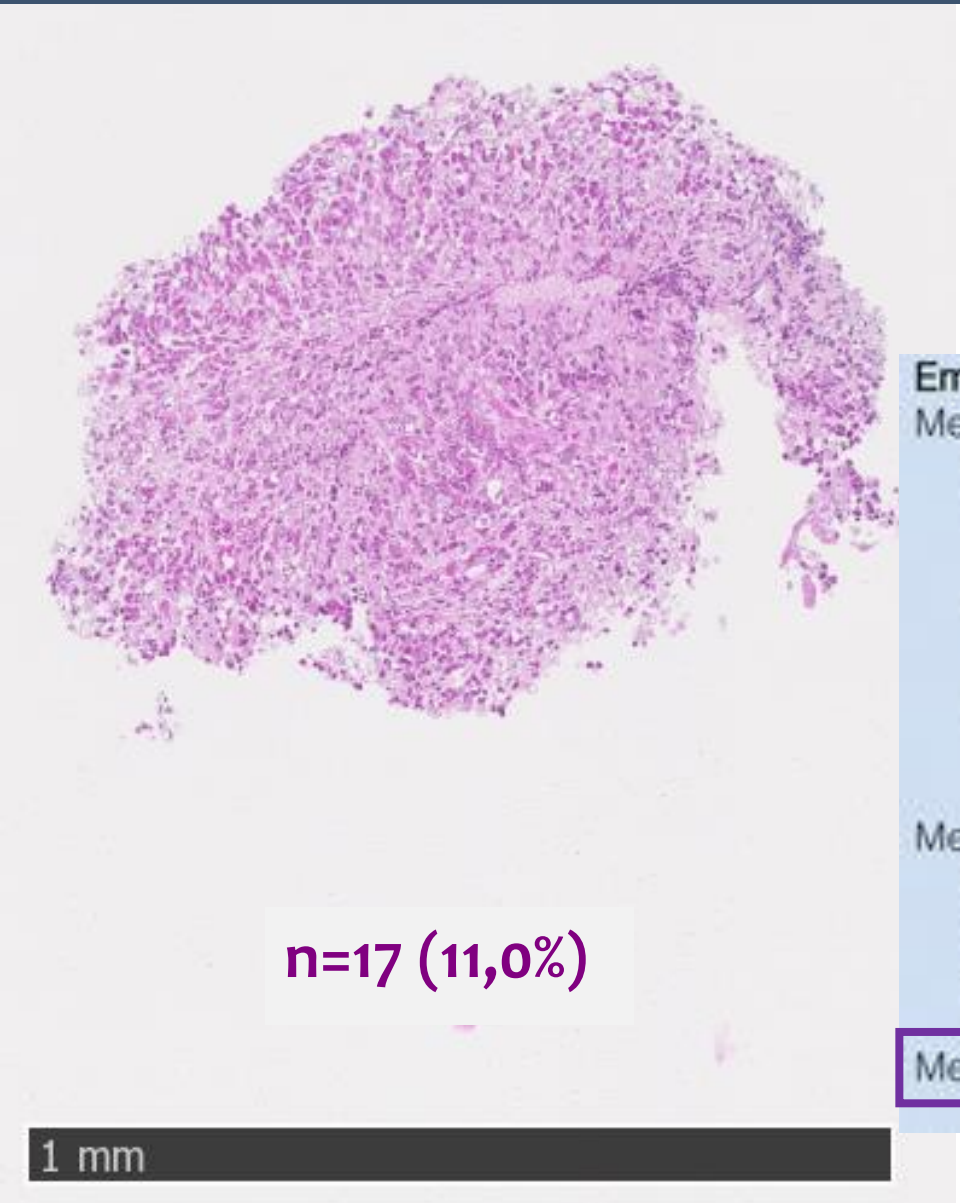




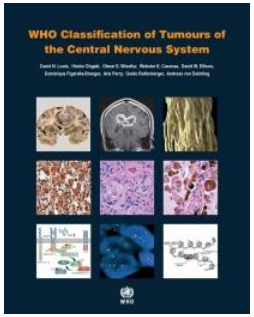




Types histopathologiques

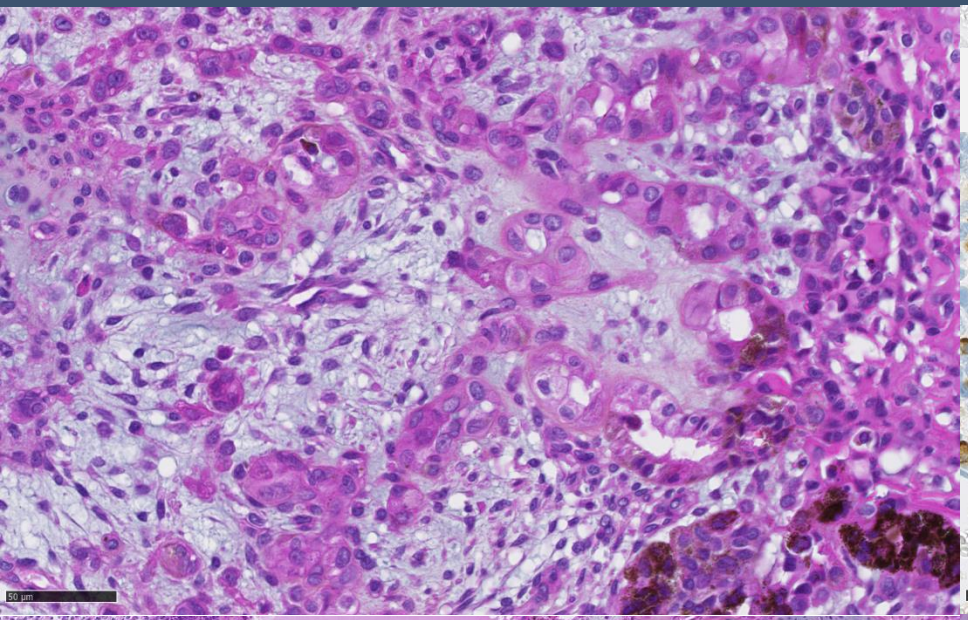


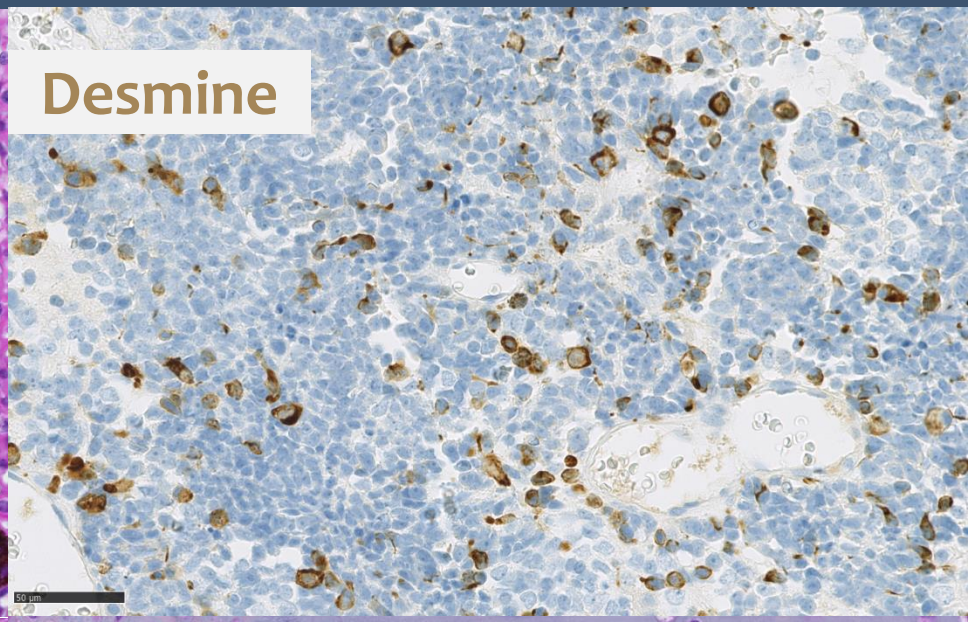
n=17 (11,0%)

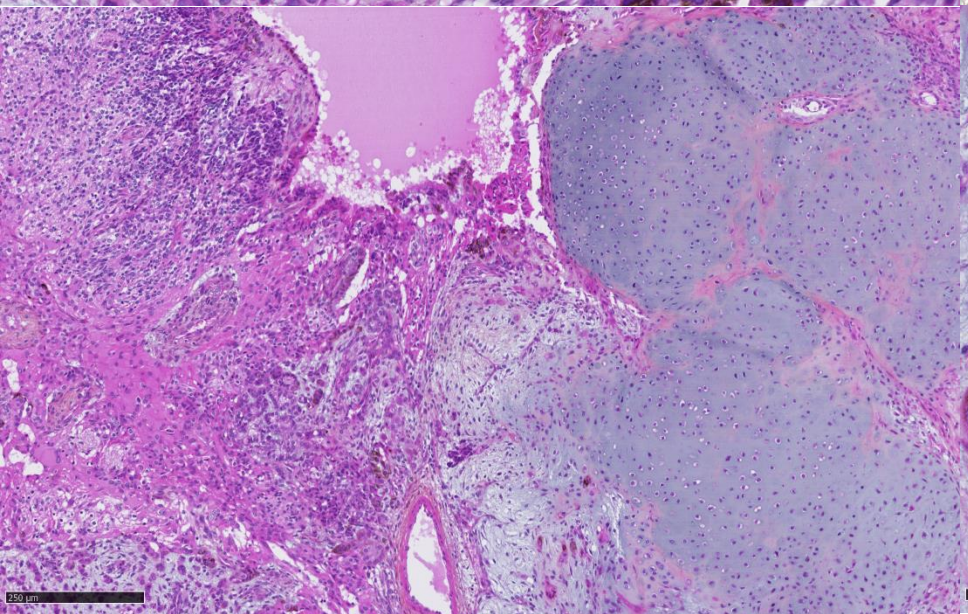


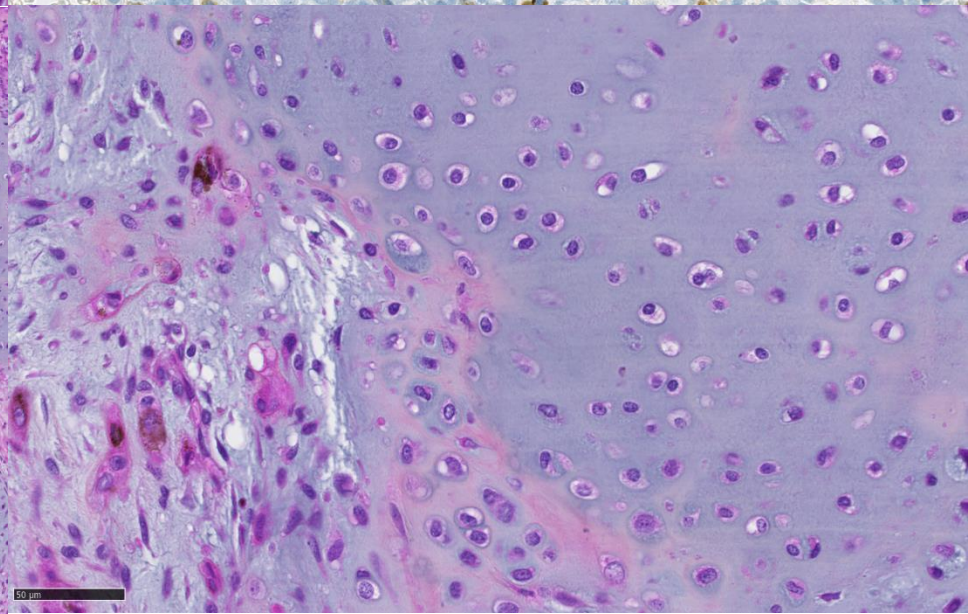
Embryonal tumours	
Medulloblastomas, genetically defined	
Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-mutant	9476/3*
Medulloblastoma, SHH-activated and *TP53*-wildtype	9471/3
Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Medulloblastoma, group 3	
Medulloblastoma, group 4	
Medulloblastomas, histologically defined	
Medulloblastoma, classic	9470/3
Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Medulloblastoma, NOS	9470/3

Types histopathologiques

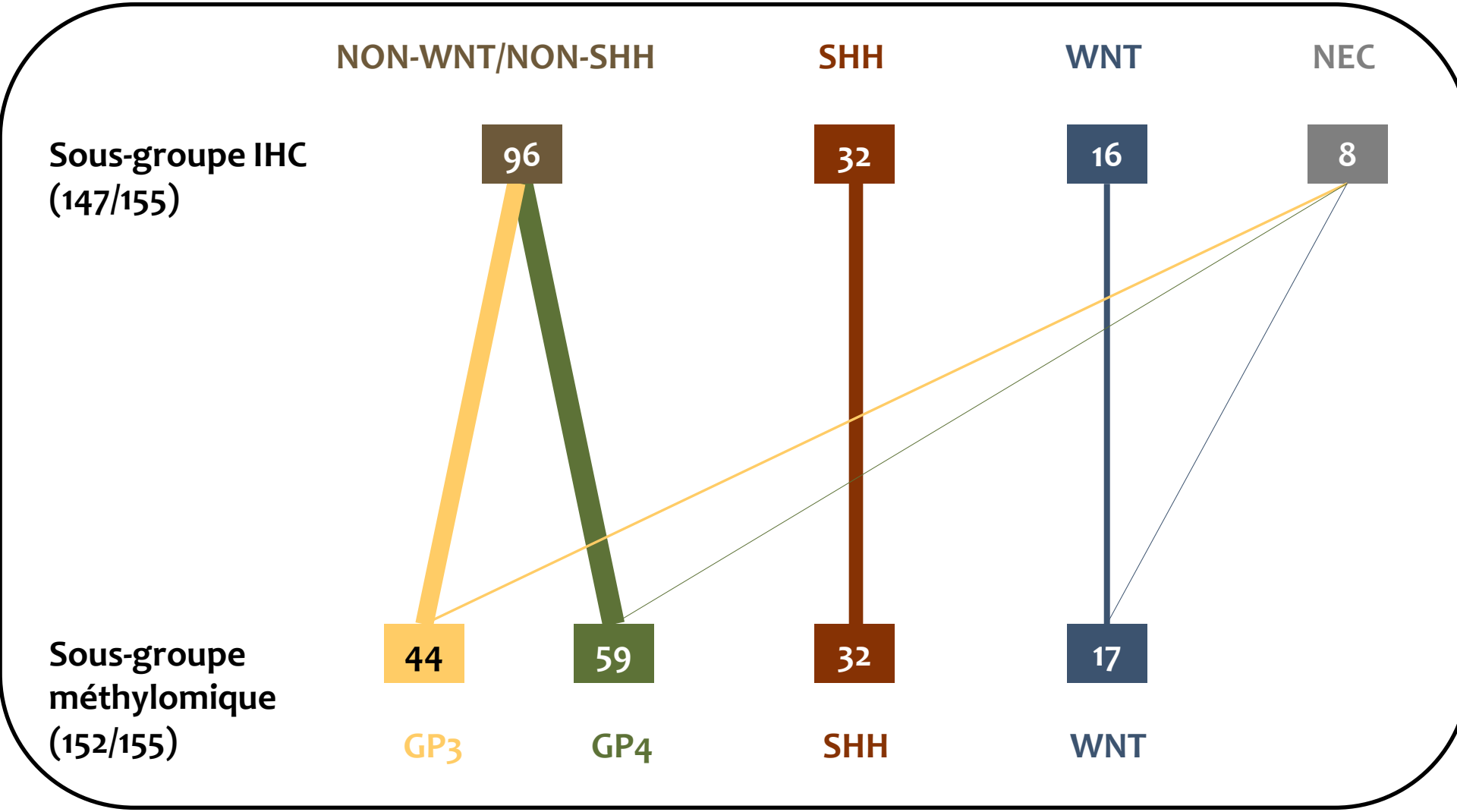




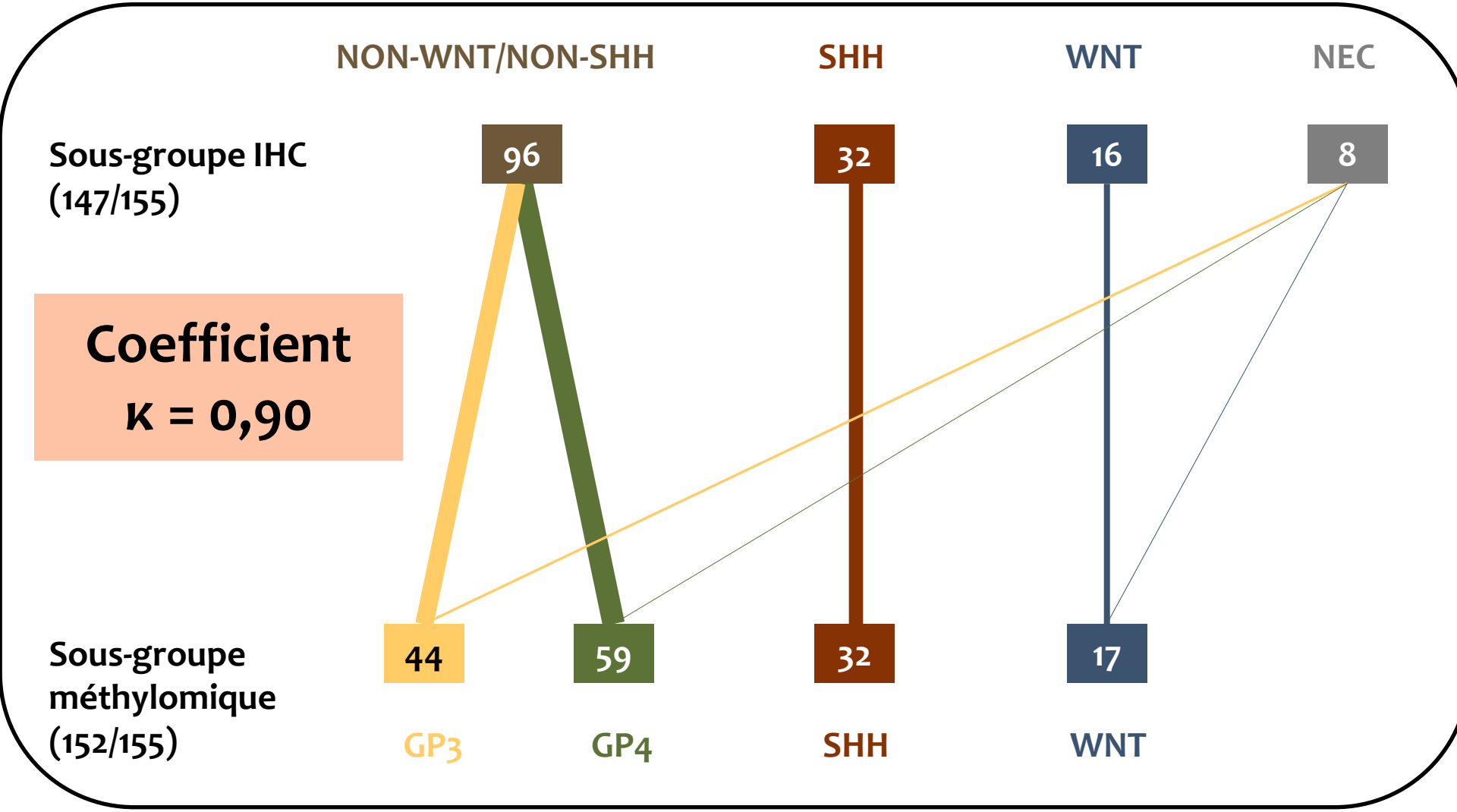




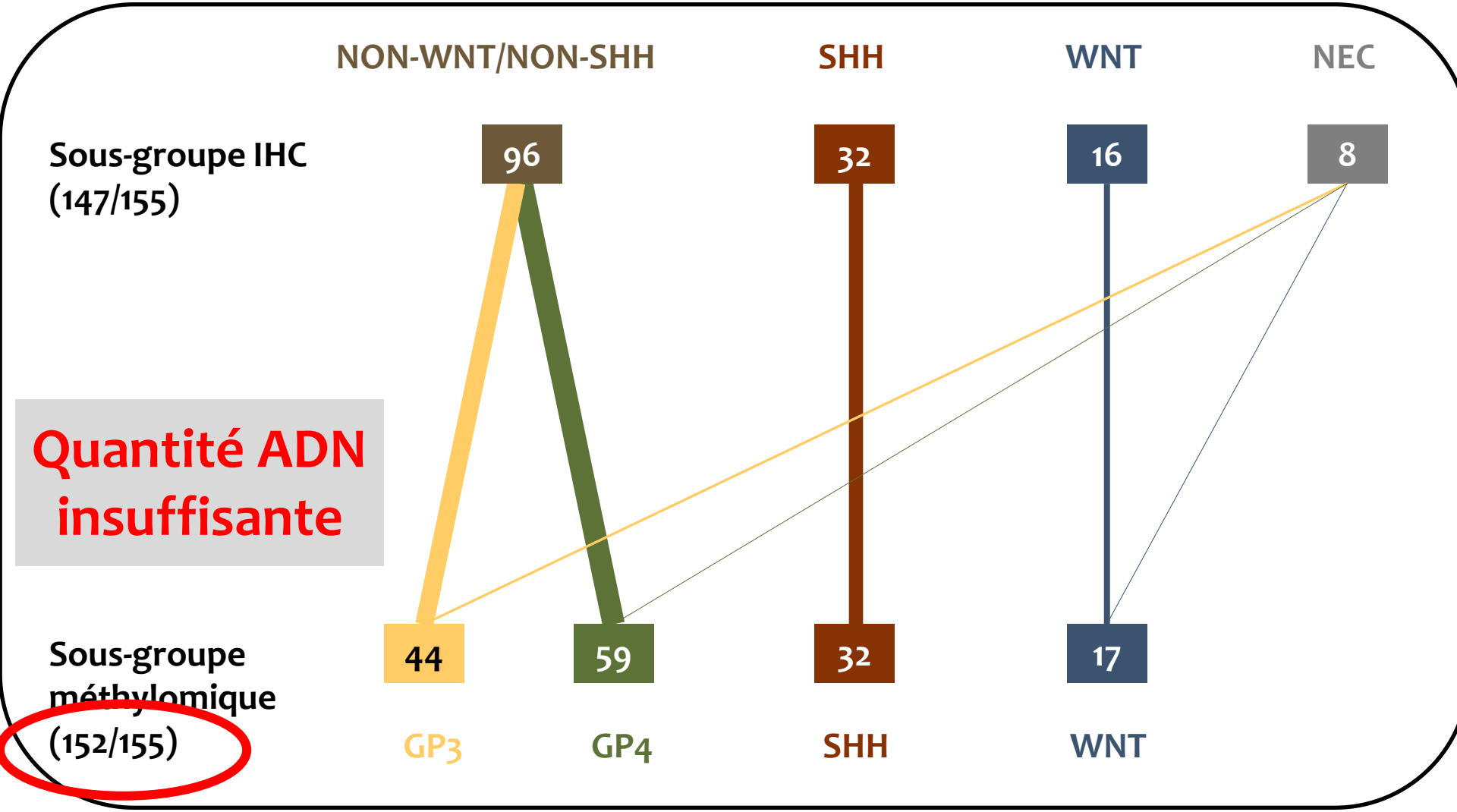
Résultats : Sous-groupages



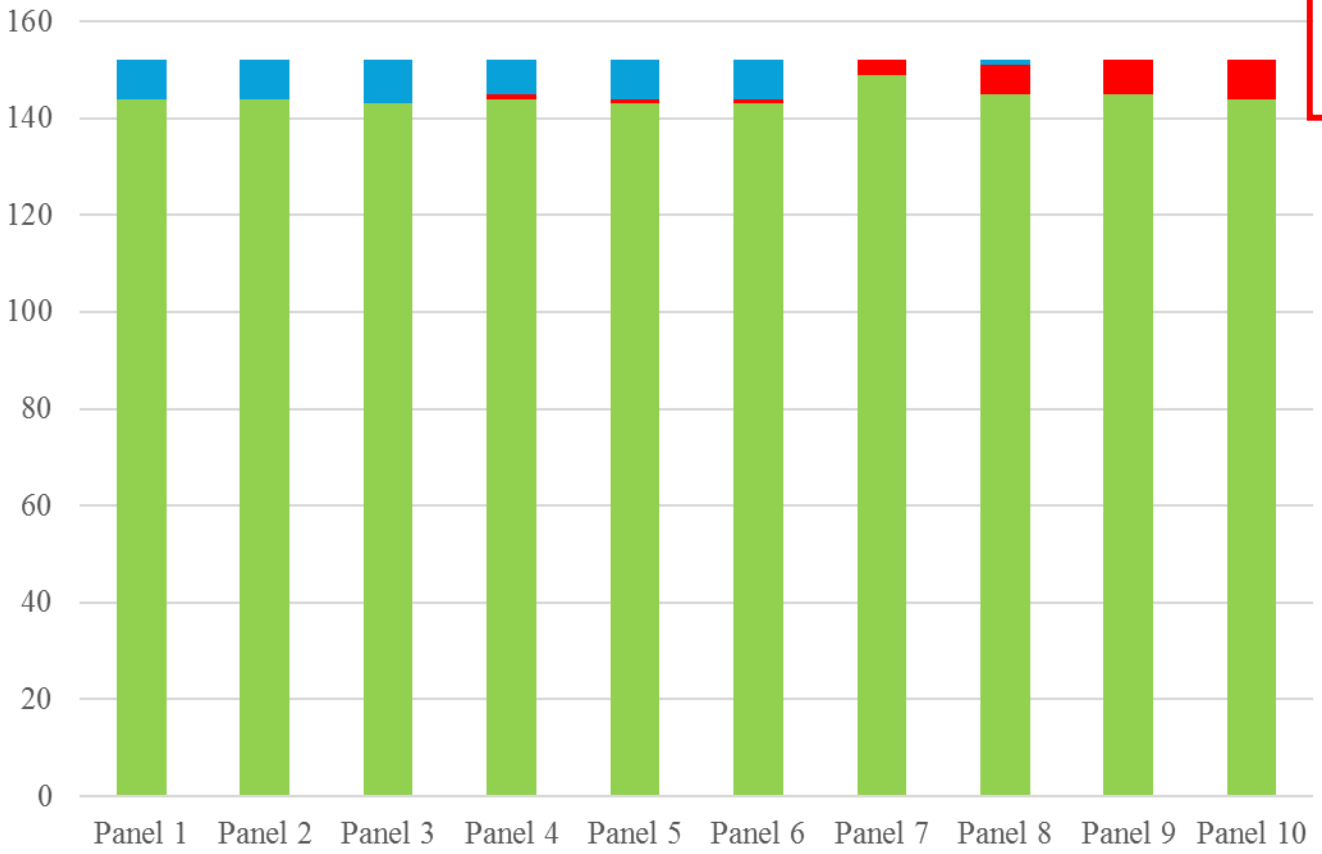
Résultats : Concordance



Résultats : Concordance



Performance des panels IHC



Panel 1: YAP1 + OTX2
Panel 2: GAB1 + YAP1 + OTX2
Panel 3: β-caténine + GAB1 + YAP1 + OTX2
Panel 4: β-caténine + GAB1 + YAP1
Panel 5: β-caténine + YAP1 + OTX2
Panel 6: β-caténine + GAB1 + OTX2
Panel 7: β-caténine + OTX2
Panel 8: GAB1 + YAP1
Panel 9: β-caténine + GAB1
Panel 10: β-caténine + YAP1

Sous-typage correct | Sous-typage erroné | NEC

Méthylome *vs.* IHC

Avantages

- Distinction des groupes 3 et 4
- Distinction de sous-groupes

Inconvénients

- Pas une technique de routine
- Technique onéreuse
- Quantité ADN (450 ng)

Avantages

- Technique économique, rapide
- D'épargne tissulaire
- Petits prélèvements (VCS)

Inconvénients

- Pas de biomarqueur des groupes 3 et 4

Panel IHC pour le sous-groupage

YAP1

GAB1

Filamine A

DKK1

GLI1

KCNA1

SFRP1

β-caténine

NPR3

p75

Kaur K *et al.* J. Neurooncol. 2019

Ellison DW *et al.* Acta Neuropathol. 2011

Pietsch T *et al.* Clin Neuropathol. 2016

D'Arcy CE *et al.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2020

Les attributs des arts
A. Vallayer-Coster
1769, Paris, Musée du Louvre (détail)

Panel IHC pour le sous-groupage

- 2 Acs : **filamine A** et **β-caténine**

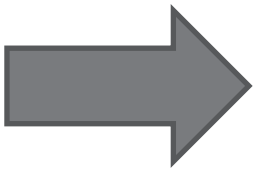
→ spécificité (91,5%) et sensibilité (99,5%) pour les groupes WNT et SHH / Nanostring

D'Arcy CE *et al.* J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2020

- 3 Acs : **YAP1, GAB1** et **β-caténine**

→ coefficient κ /Nanostring = 0,79

Kaur K *et al.* J. Neurooncol. 2019



YAP1 + OTX2

GAB1 + YAP1 + OTX2

Sous-groupage génétique par IHC

β-caténine	GAB1	YAP1	OTX2	Sous-groupe
+	-	+/-	+	WNT
-	-	-	+	NON-WNT/NON-SHH
-	+	+	-	SHH

Sous-groupage génétique par IHC

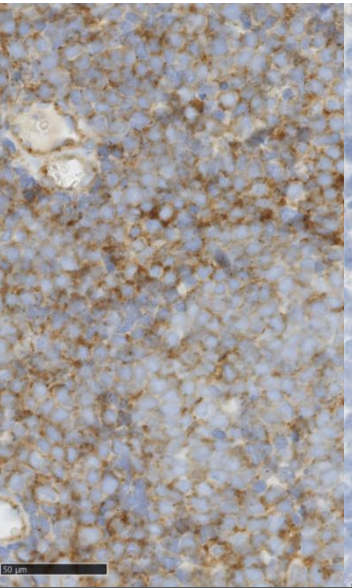
β-caténine	GAB1	YAP1	OTX2	Sous-groupe
+	-	+/-	+	WNT
Nucléaire >30% 16/17	Négatif 17/17	Cytopl./nucl. Diffus > partiel > focal 17/17	Nucléaire Diffus fort 17/17	

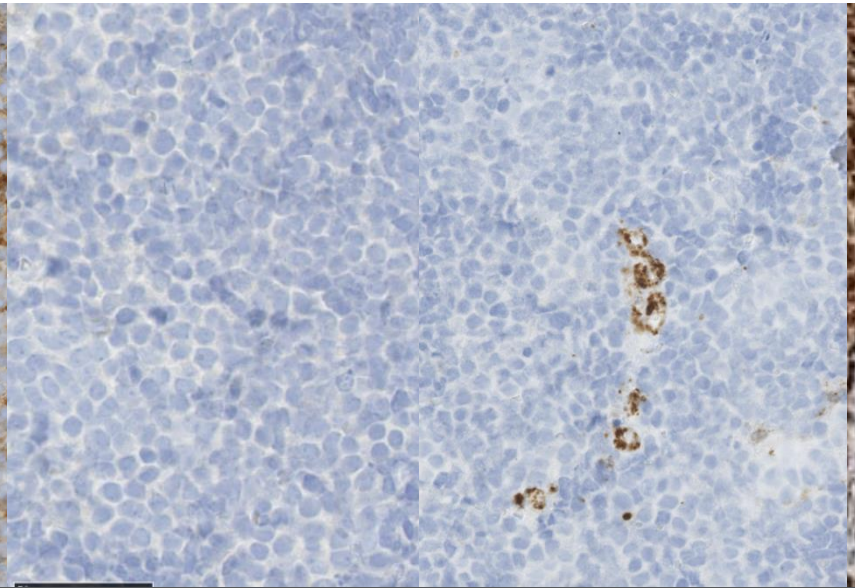
Sous-groupage génétique par IHC

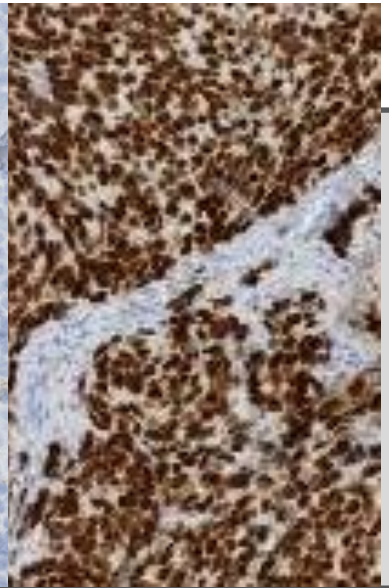
β-caténine	GAB1	YAP1	OTX2	Sous-groupe
-	+	+	-	SHH
33/33	Positif IN 33/33	IN Diffus >>> focal 32/33	Négatif >>> focal faible 33/33	

Sous-groupage génétique par IHC

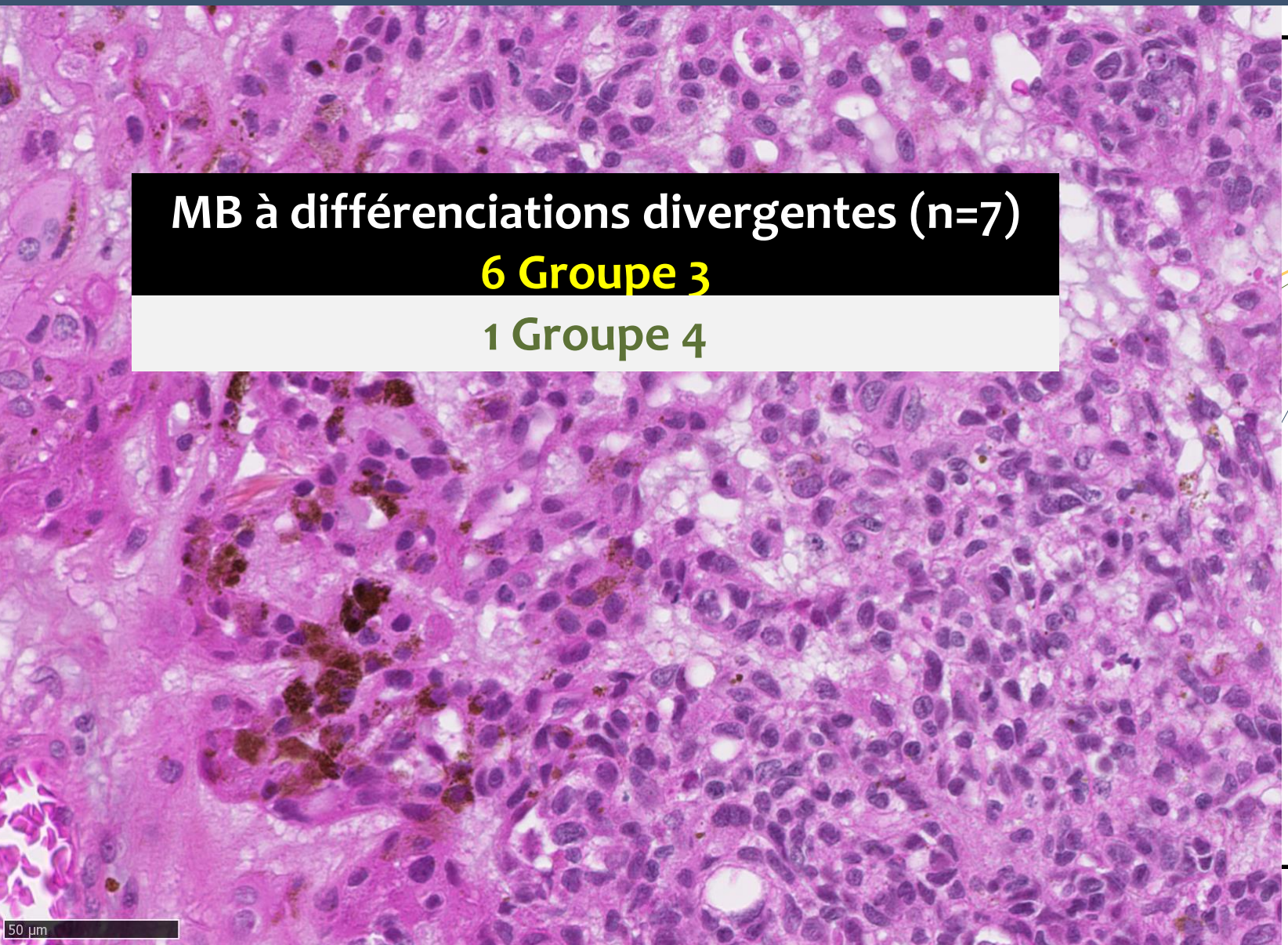
β-caténine	GAB1	YAP1	OTX2	Sous-groupe
Nucléaire 5% 5/98	Négatif 98/98	Négatif 98/98	Fort diffus >>> partiel fort 98/98	NON-WNT/NON-SHH
-	-	-	+	







Caractérisation des NEC



MB à différenciations divergentes (n=7)

6 Groupe 3

1 Groupe 4

Corrélations histo-moléculaires

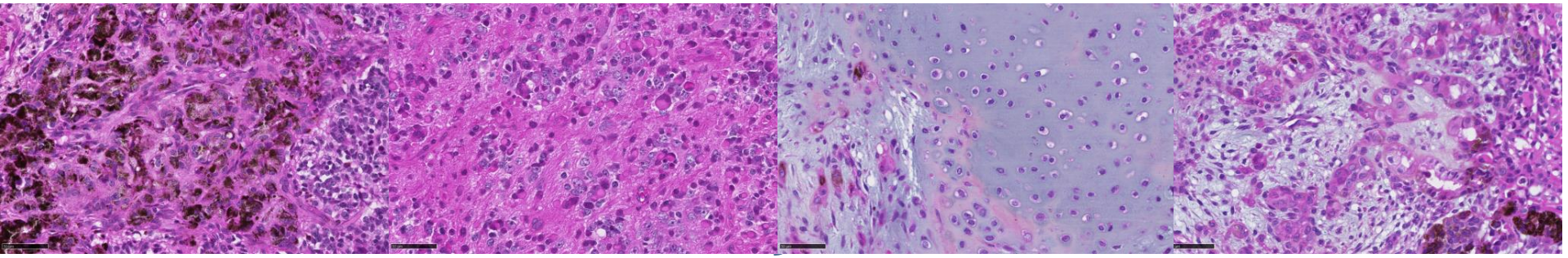
- **L'IHC** n'est **pas un outil performant** dans le sous-typage des MB à différenciations divergentes

Gupta K *et al*. Hum. Pathol. 2018

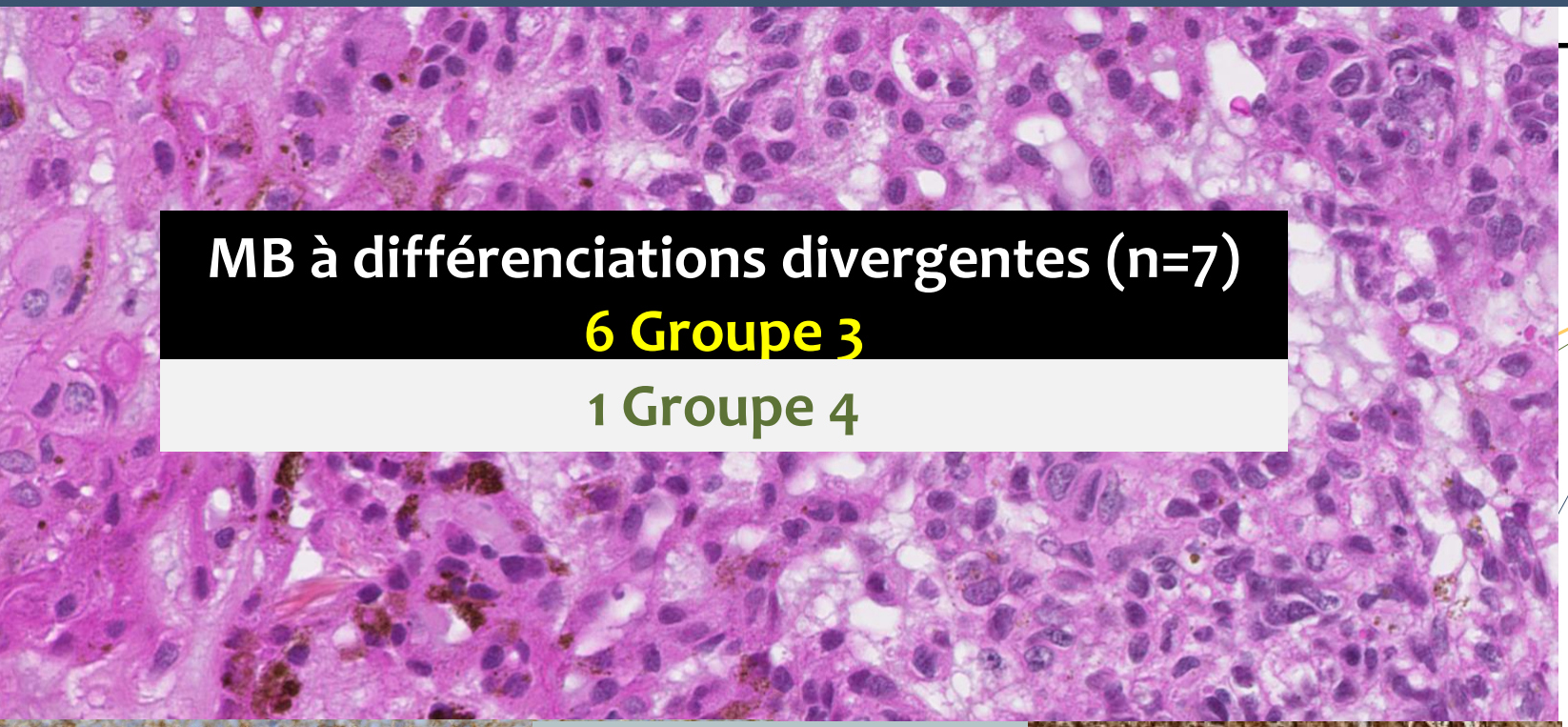
- Prédominance de **Groupes 3** (n=8) >>> Groupe 4 (n=1)

Chua FHZ *et al*. J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas. 2017.

Crawford JR *et al*. BMJ Case Rep. 2015.



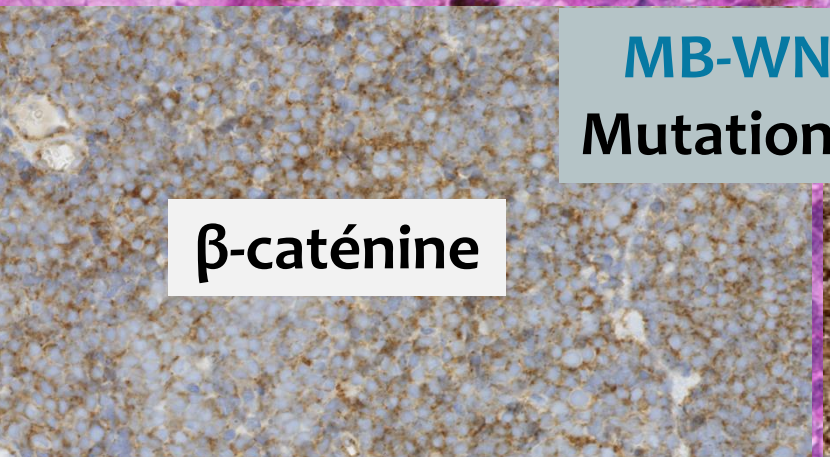
Caractérisation des NEC



MB à différenciations divergentes (n=7)

6 Groupe 3

1 Groupe 4



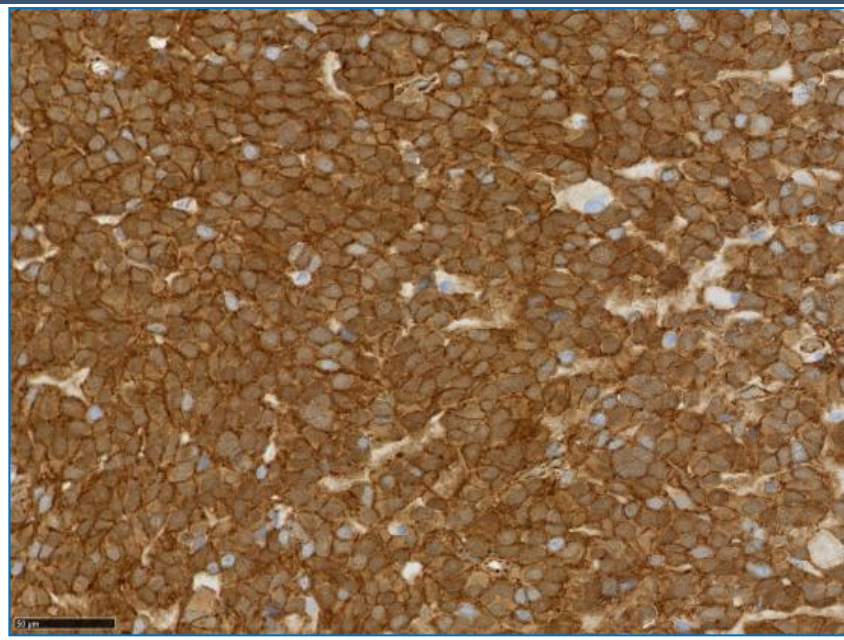
β-caténine

MB-WNT (n=1)

Mutation *CTNNB1*

YAP1

β-caténine : un marqueur délicat



- Pré-analytique
- Automate
- Clone
- Difficultés d'interprétation

Les noyaux sont-ils bleus?

- Seuil de positivité ?

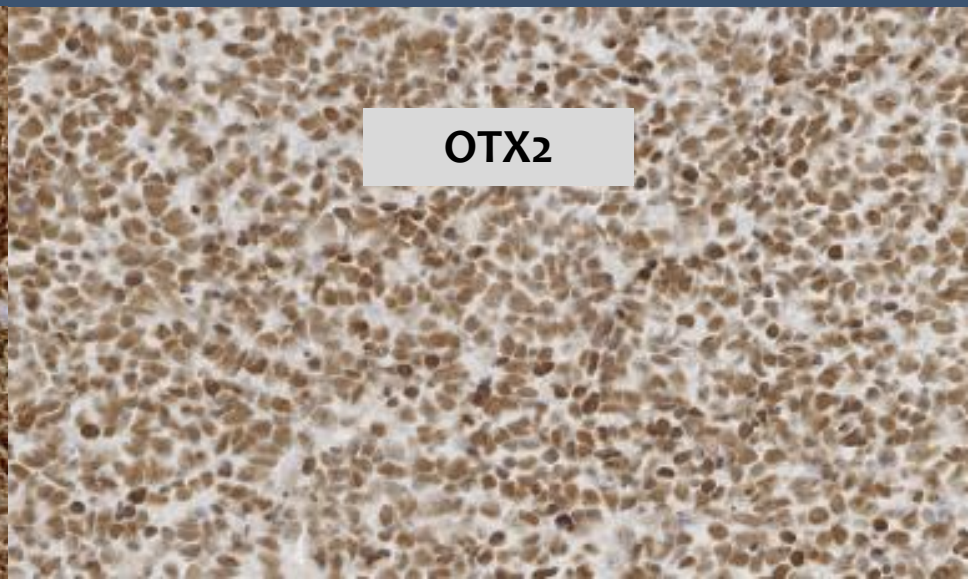
→ 1 % de noyaux positifs?

→ Faux positifs : non-WNT/non-SHH et SHH

Goschzik T *et al*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2015

D'Arcy CE *et al*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2020

MB-WNT : une solution de recours



Séquençage *CTNNB1*
Nanostring
Méthylome

Conclusion (1)

- **Place du pathologiste** dans la **décision thérapeutique/pronostic**

- **Place de l'IHC** dans la détermination du sous-groupe moléculaire de MB

- **Définition d'un panel IHC minimal (YAP1+OTX2)**

Conclusion (2)

- **Corrélation parfaite** IHC *vs.* **méthylome**

- **Groupage moléculaire : MB à différenciations divergentes**

→ Extension des connaissances moléculaires de ces variants rares

Conclusion (2)

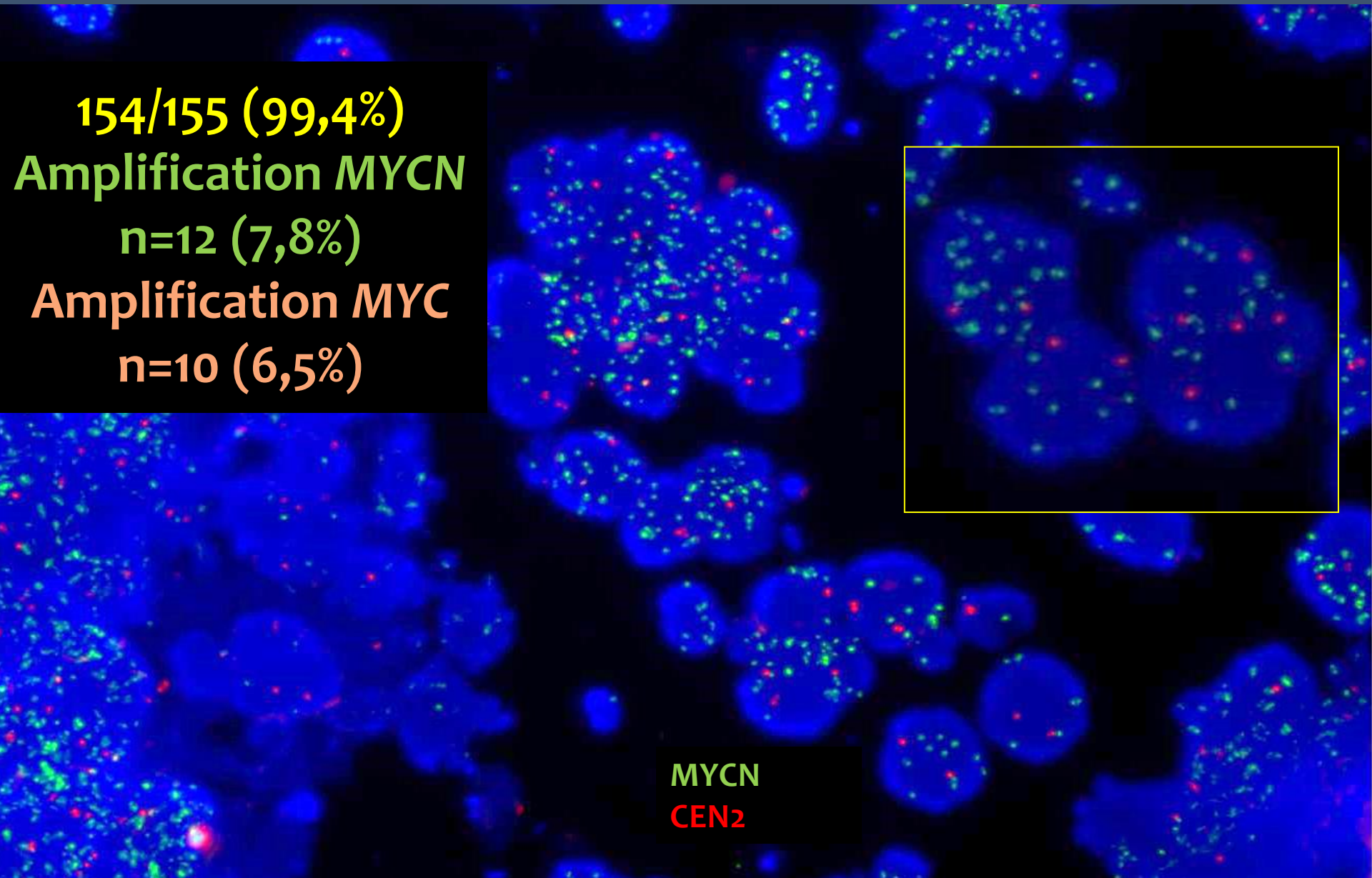
- **Corrélation parfaite** avec le groupage par **méthylome**

- **Groupage moléculaire utile p**
MB à différenciations diverg

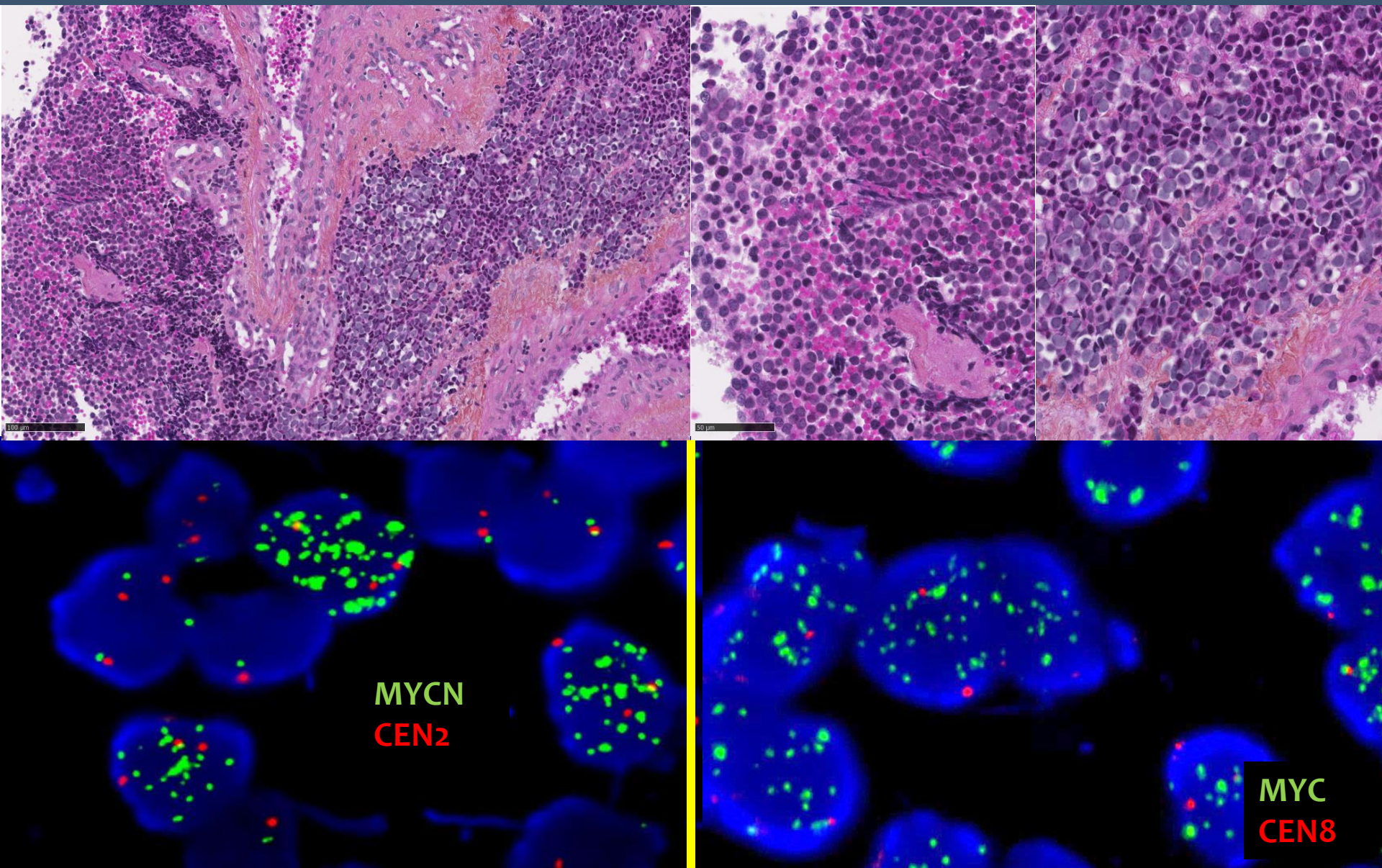
- **Caractérisation moléculaire**
différenciations divergentes

Résultats : Statuts MYC/MYCN

154/155 (99,4%)
Amplification *MYCN*
n=12 (7,8%)
Amplification *MYC*
n=10 (6,5%)



Amplification subclonale (n=2)



Statut *MYC/MYCN*

- **Amplifications** mutuellement **exclusives**

  > 8 signaux > 10% des cellules tumorales

  Pfister S *et al.* J Clin Oncol. 2009

- Groupes **3 (*MYC*, 17 %)** et **4 (*MYCN*, 6,5%)**

  Northcott PA *et al.* J Clin Oncol. 2011

- **Sous-groupe SHH-activé, *TP53*-muté > 3 ans (6,5%)**

  Kool M *et al.* Cancer Cell. 2014

  Northcott PA *et al.* J Clin Oncol. 2011

- Intérêts **pronostique** et **thérapeutique**

Intérêts de la FISH

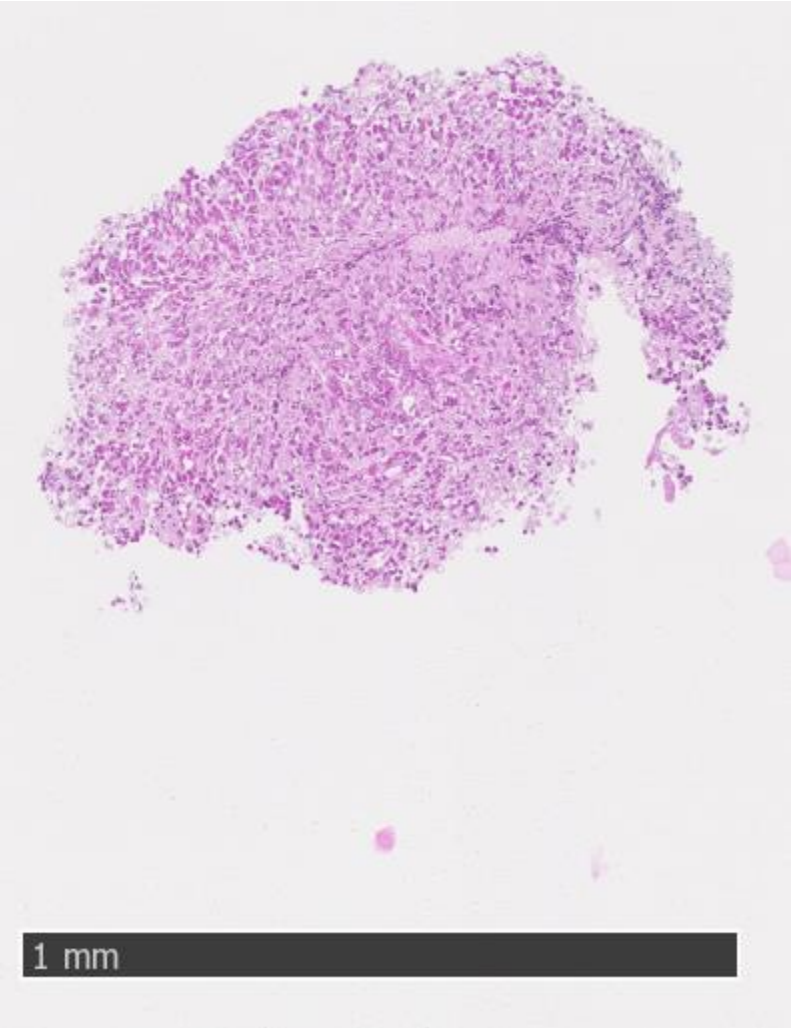
- **Contrôle morphologique**

- **Technique rapide**

→ My = 5,7 jours (n=21)

- **Prélèvements exigus**

- **Hétérogénéité intra-tumorale**



Limites/pièges

- Technique très sensible au **pré-analytique**
- **Artéfacts** d'autofluorescence
- Pièges de la **densité** tumorale

Conclusion (2)

- Questions restant en suspens :
  1. **Définition du contingent anaplasique**
  2. **Pronostic des tumeurs avec amplification hétérogène de MYC/MYCN**

BJC British Journal of Cancer

www.nature.com/bjc

Check for updates

ARTICLE

Genetics and Genomics

Heterogeneous *MYCN* amplification in neuroblastoma: a SIOP Europe Neuroblastoma Study

Ana P. Berbegall[1,2], Dominik Bogen[3], Ulrike Pötschger[4], Klaus Beiske[5], Nick Bown[6], Valérie Combaret[7], Raffaella Defferrari[8], Marta Jeison[9], Katia Mazzocco[8], Luigi Varesio[10], Ales Vicha[11], Shifra Ash[12], Victoria Castel[13], Carole Coze[14], Ruth Ladenstein[4,15], Cormac Owens[16], Vassilios Papadakis[17], Ellen Ruud[18], Gabriele Amann[19], Angela R. Sementa[8], Samuel Navarro[1,2], Peter F. Ambros[3,20], Rosa Noguera[1,2] and Inge M. Ambros[3]