



HAL
open science

Génomique intégrée des neuroblastomes olfactifs : implications anatomopathologiques et thérapeutiques

Marion Classe

► To cite this version:

Marion Classe. Génomique intégrée des neuroblastomes olfactifs : implications anatomopathologiques et thérapeutiques. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066459 . tel-01956589

HAL Id: tel-01956589

<https://theses.hal.science/tel-01956589>

Submitted on 16 Dec 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

ED 394 - Ecole Doctorale

Physiologie Physiopathologie et Thérapeutique

UPMC Sorbonne Universités

UMR_S938

Génomique intégrée des neuroblastomes olfactifs : implications anatomopathologiques et thérapeutiques

Par Marion Classe

Thèse de doctorat

Dirigée par le Dr Gabriel Malouf

Présentée et soutenue publiquement le 14 décembre 2017

Devant un jury composé de :

Pr Jean-Yves Scoazec	(PU-PH)	Rapporteur
Pr François Radvanyi	(DMR1)	Rapporteur
Dr Aurélien De Reyniès	(PhD)	Président
Pr Chloé Bertolus	(PU-PH)	Examineur
Pr Bertrand Baujat	(PU-PH)	Examineur
Dr Odile Casiraghi	(Praticien des CLCC)	Examineur



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Remerciements

Ce travail conclut 3 années ardues et pleines de surprises pendant lesquelles j'ai développé mes connaissances dans des domaines variés. De nombreuses personnes ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse, aussi, je tiens à remercier :

Tout d'abord mon directeur de thèse. Gabriel, nous nous sommes lancé dans un projet ambitieux et passionnant que tu as dirigé pendant 3 ans et au cours duquel tu m'as appris à me dépasser. J'ai appris beaucoup de choses et j'ai grandi à ton contact, je te remercie pour tout ça.

Les membres du jury qui ont accepté de se plonger dans mon manuscrit et de le juger. Merci à François Radvanyi et Jean-Yves Scoazec mes rapporteurs, à Aurélien De Reynies qui a accepté de présider le jury, et enfin à Chloé Bertolus, Bertrand Baujat et Odile Casiraghi mes examinateurs.

Le Professeur David Khayat et la fondation AVEC pour le financement de ce projet, sans qui, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Roger Mouawad et Frédérick Allanic qui ont beaucoup contribué à ce travail au sein du laboratoire et m'ont aidé à avancer.

Michel Wassef qui m'a tant appris sur les pathologies passionnantes de la sphère ORL, et sur tant d'autres choses. Tu as représenté mon père spirituel pendant les 3 années que nous avons passées à travailler ensemble et je te remercie profondément pour tout ce que tu m'as apporté.

Toute l'équipe du service d'anatomie pathologique de Lariboisière, aussi bien l'équipe médicale, en particulier Anne Lavergne, Marc Polivka, Homa Adle-Biassette et Anne-Catherine Baglin ; que l'équipe technique et en particulier Isabelle, Aurélie, Pascale, Patrice, Nathalie, Eolia, Agnès, Sandrine, Bernard et Catherine ; les cadres et particulièrement Nicolas ; et enfin toutes les secrétaires.

L'équipe d'ORL de Lariboisière avec qui j'ai eu tant de plaisir à travailler, et surtout Philippe Herman, Benjamin Verillaud et Alice Burgess qui ont activement participé à ce travail.

Mes collègues du CHRU de Lille, et notamment Xavier Leroy et Geoffrey Mortuaire ; d'anatomie pathologique de La Pitié Salpêtrière, en particulier Karima Mokhtari, Franck Bielle et Geneviève Hervé ; et enfin Christophe Letourneau à l'institut Curie.

Xaoping Xu, Hui Yao et Chad J Crighton pour leur aide précieuse en ce qui concerne les analyses bioinformatiques.

Mes collègues d'histologie moléculaire et de sciences translationnelles chez Sanofi, et en particulier Souâd pour son soutien, Raphaël pour ses conseils en numérisation et Luc pour ses conseils informatiques et ses discussions scientifiques passionnantes.

Mes amies pour leur compréhension envers mon indisponibilité chronique qui s'est aggravée ces derniers mois, et tout particulièrement Anne-Sophie, Eve, Stéphanie, Anaïs, Alex, Anne-Laure et Sarah. Une pensée particulière pour Linda qui a partagé ses moments difficiles de thèse avec moi, ses bons conseils et sa bonne humeur italienne lumineuse.

Mes parents pour leur soutien indéfectible et leur optimisme permanent, et mon frère pour son enthousiasme et sa curiosité intellectuelle inépuisable.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Aurélien, mon Prince, qui a parcouru ce marathon à mes côtés sans jamais faillir. Tu as su m'encourager, croire en moi et me soutenir dans mes choix, même dans les moments les plus difficiles. Tu as été ma lumière pendant ces 3 années, pour ça et pour tout le reste, merci.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	3
I. Liste des abréviations	5
II. Introduction générale.....	8
III. Cancers : notions épidémiologiques et rappels historiques.....	9
A. Epidémiologie.....	9
B. Historique	9
IV. Génétique : rappels historiques	11
A. Découverte de l'information génétique	11
B. De la découverte de l'ADN au séquençage à haut débit	11
V. Impact de l'émergence de la génétique sur la compréhension, la classification et le traitement des cancers	14
A. Impact de la génétique sur la compréhension des cancers	14
1. Caractéristiques des cellules cancéreuses	14
2. Caractéristiques des cellules cancéreuses : une cause génétique ?	15
B. Impact de la génétique sur la classification des tumeurs.....	21
C. Impact de la génétique sur la prise en charge thérapeutique des cancers.....	22
VI. Emergence des principales causes du développement des cancers : état des connaissances	24
A. Instabilité génomique	24
B. Epigénétique	25
C. Modifications du métabolisme	30
D. Immunité et microenvironnement tumoral	32
1. L'immunité : Rappels	33
2. L'immunité anti-tumorale	34
3. Immunoediting	36
4. Mécanismes impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses	39
5. Microenvironnement tumoral	40
6. Mécanismes de l'échappement des cellules tumorales face au système immunitaire	40
VII. Vers une approche intégrée globale du cancer.....	43
VIII. Tractus naso-sinusal et tumeurs naso-sinusiennes.....	45
A. Le tractus naso-sinusal.....	45
1. Anatomie.....	45
2. Histologie.....	46
B. L'épithélium olfactif.....	47
1. Histologie.....	47
2. Renouvellement et différenciation.....	48
C. Les tumeurs naso-sinusiennes	52
IX. Les neuroblastomes olfactifs.....	54
A. Epidémiologie et historique.....	54
B. Localisation	54
C. Présentation clinique.....	55
D. Diagnostic.....	55
1. Examen clinique.....	55
2. Imagerie	56
3. Histologie.....	57

4.	Profil immunohistochimique	61
5.	Diagnostics différentiels	63
E.	Classification	64
F.	Histoire naturelle des neuroblastomes olfactifs : état des connaissances.....	67
G.	Stratégies thérapeutiques	67
H.	Evolution clinique et pronostic.....	70
X.	Objectifs du travail	72
A.	Objectifs.....	72
B.	Méthodologie.....	72
XI.	Résultats	73
A.	Analyse intégrée multi-omics des Esthesioneuroblastomes.....	73
1.	Introduction.....	73
2.	Résultats.....	74
3.	Conclusion	79
4.	Article en cours de soumission	80
B.	Evaluer l'intérêt pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et de l'index de prolifération KI67 dans le neuroblastome olfactif	129
1.	Introduction.....	129
2.	Résultats.....	130
3.	Conclusion	131
4.	Article	132
XII.	Discussion	165
A.	Mutations somatiques dans les NBO : des mutations <i>IDH2</i> dans les tumeurs de type basal 165	
B.	Vers une identification de la cellule d'origine des NBO?.....	167
C.	Environnement immunitaire des NBO	170
D.	Outils pronostiques en pratique	171
E.	Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les NBO.....	172
XIII.	Perspectives	174
XIV.	Conclusion.....	176
	Bibliographie.....	178
	Annexes : autre article publié avec l'équipe de recherche pendant la thèse	187
	Table des illustrations.....	196
	Table des tableaux.....	198

I. Liste des abréviations

Ag	Antigène
Ac	Anticorps
ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
AFP	Alpha Fœtaux Protéine
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BCR-ABL	transcrit de fusion entre le gène Breakpoint Cluster Region et le gène Abelson Tyrosine-Protein Kinase 1
BRCA2	Breast And Ovarian Cancer Susceptibility Protein 2
CAMs	Cell-Cell Adhesion Molecules
CDK	Cyclin Dependent Kinase
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	ADN codant
CDs	Cellules Dendritiques
CFR	Cranio Facial Resection
CGI	CG Island (îlotCpG)
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COSMIC	Catalogue of Somatic Mutations in Cancer
CPA	Cellule Présentatrice de l'Antigène
CTK	cytokine
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DNMTs	DNA Methyl Transferases
dNTPs	désoxyribonuclotides
EBV	Epstein-Barr Virus
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Transition Epithélium-Mésenchyme
ENB	Esthesioneuroblastome
EWSR1	Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1
FC	Fold Change
FDR	False Discovery Rate
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded
FGF	Fibroblast Growth Factor

FH	Fumarate Hydratase
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
GBCs	Globose Basal Cells
GLUT1	Glucose Transporter Type 1
GO	Gene Ontology
HBC	Horizontal Basal Cell
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HES (gène)	Hairy and Enhancer of Split
HES (histo)	Hématoxyline Eosine Safran
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HPV	Human papillomavirus
IDH	Isocitrate DésHydrogénase
IDO	indoleamine-2,3dioxygénase
IFN	interferon
IGF1	Insulin Like Growth Factor 1
IGF2	Insulin Like Growth Factor 2
IHC	immunohistochimie
IL	interleukine
Indel	Short insertion or deletion
INP	Immature Neuron Progenitor
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JHDM1	Jumonji C Domain-Containing Histone Demethylase 1
JMJD2	Jumonji Domain Containing 2A (gène <i>KDM4A</i>)
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LcB	Lymphocytes B
LCR	Liquide Céphalo Rachidien
LcT	Lymphocytes T
LINE	Long Interspread Elements
MDM2	Mouse Double Minute 2, Human Homolog Of
MGMT	O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	MisMatch Repair
mRNA	ARNmessenger
MSI	Micro Satellite Instability
NBO	Neuroblastome olfactif
NCAM	Neural Crest Adhesion Molecule

NE	neuroendocrine
NK	Natural Killer
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OSN	Olfactory Sensory Neuron
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor Subunit B
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Subunit B Receptor
RB	retinoblastoma
RNASeq	séquençage ARN
rRNA	ARNribosomal
SDH	Succinate DésHydrogénase
SHH	Sonic HedgeHog
SINE	Short Interspread Elements
SNEC	Sinonasal NeuroEndocrine Carcinoma
SNUC	SinoNasal Undifferentiated Carcinoma
SNV	Single Nucleotid Variant
STD	Déviation standard
TCGA	The Cancer Genome Atlas network
TCR	récepteur des Lymphocytes T
TDM	tomodensitométrie
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TET	Ten-Eleven Translocation
TGF α	Transforming Growth Factor alpha
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Facteur de Nécrose Tumorale alpha
Treg	Lymphocytes T régulateurs
TSS	Transcription Start Site
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	Von Hippel-Lindau
WES	Whole Exome sequencing
WT	Wild Type

II. Introduction générale

Les neuroblastomes olfactifs (NBO), ou esthésioneuroblastomes, sont une entité rare découverte et rapportée en 1924 par une équipe française (Berger et Luc) (1). Ce sont des tumeurs neuro-ectodermiques qui se développeraient à partir des neurones olfactifs de la muqueuse olfactive située à la partie haute des fosses nasales. Étant donné la rareté de cette maladie, leur histoire naturelle et leur caractérisation moléculaire restent mal connues, le plus souvent étudiées sur un faible nombre de cas (2-4).

Plusieurs classifications cliniques et radiologiques des NBO ont été proposées, mais la classification histologique reste la plus utilisée actuellement (5). Cette classification histologique proposée par Hyams en 1988 distingue 4 grades tumoraux. Basée uniquement sur des critères morphologiques, la reproductibilité et la valeur pronostique de cette classification sont parfois discutées. Elle n'a de plus jamais été confrontée à une analyse moléculaire des NBO. Aucune classification moléculaire n'a été rapportée à ce jour. L'évaluation pronostique des NBO est parfois délicate, certaines tumeurs sont de bon pronostic avec un risque de rechute, surtout ganglionnaire, faible et tardif, d'autres sont plus agressives, de haut grade, avec présence de métastases d'emblée, en particulier cérébrales, vertébrales, médullaires, lepto-méningées (6, 7) et un important risque de rechute précoce (8).

Les progrès techniques et une meilleure connaissance générale de la biologie du cancer ont permis le développement de nouveaux outils d'analyse des tumeurs au cours des dernières années. Ces outils permettent de mieux appréhender l'origine du développement des tumeurs, ils ont parfois une valeur pronostique, mais également souvent un potentiel thérapeutique, en guidant le recours à diverses thérapies ciblées. Parmi les domaines qui ont connu un essor important, on peut citer la caractérisation moléculaire des cancers et plus récemment l'étude des interactions entre la tumeur et son microenvironnement.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier la biologie des neuroblastomes olfactifs à l'aide d'une approche intégrée associant une étude moléculaire multi-omics à une étude histologique et immunohistochimique afin d'améliorer les connaissances sur cette maladie orpheline et en améliorer la prise en charge.

III. Cancers : notions épidémiologiques et rappels historiques

A. Epidémiologie

Le cancer, qui constitue la deuxième cause de décès dans le monde, a fait 8,8 millions de morts en 2015 (chiffres OMS, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>). Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Selon les chiffres de l'OMS, en 2012, le nombre de nouveaux cas de cancer s'élevait à 14,1 millions et le nombre de décès par cancer à 8,2 millions. Le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% environ au cours des 2 prochaines décennies. Les projections faites selon les estimations de GLOBOCAN 2012 (9), prévoient que d'ici 2025 le nombre de nouveaux cas de cancers par an devrait atteindre 20 millions en raison de la croissance démographique et du vieillissement de la population.

B. Historique

Le mot cancer tire son origine du mot latin cancer qui signifie « crabe ». Les premières traces connues de lésions cancéreuses remontent aux ossements des grands reptiles de l'ère tertiaire (10). L'examen de momies Égyptiennes (3400 avant l'ère chrétienne) a également révélée plusieurs tumeurs malignes. Les Égyptiens avaient déjà décrits des tumeurs (11), le papyrus Ebers (1600 avant l'ère chrétienne) distinguait même des tumeurs infectieuses qu'il fallait inciser et des tumeurs charnues qu'il fallait réséquer. C'est Hippocrate qui, au IV^e siècle avant notre ère, sera le premier à en répertorier la plupart des symptômes caractéristiques. Il décrit notamment des cancers du sein et de l'utérus, de la peau, de l'estomac ou de la gorge. Il classe les tumeurs en 3 catégories : bénignes, à malignité limitée ou franchement malignes (10). Galien affina cette classification et attribua aux cancers une origine humorale (théorie des humeurs). Il soutenait que l'excès de bile noire était responsable des cancers, et que la mélancolie était un facteur aggravant. Malgré des premières tentatives de compréhension de cette maladie, aucun traitement ne semblait véritablement efficace. Ambroise Paré rapportait que « tout chancre est quasi incurable ou très difficile à guérir ». Selon lui si la tumeur est de petite taille, le mieux est de l'exciser, mais si le mal est trop

avancé ou qu'il frappe au visage, tous conseillent de ne pas y toucher de peur d'en précipiter l'évolution.

La théorie des humeurs sera remise en cause au XVIII^e siècle avec le travail de l'Italien Morgagni qui rapporte les tumeurs à un organe ou à un tissu précis. C'est finalement en 1863 que l'allemand Virchow établira, grâce à l'utilisation du microscope, que le cancer résulte d'une prolifération anarchique de certaines cellules (12). Selon cette approche histologique, le terme cancer désigne l'état pathologique lié à l'apparition et à l'envahissement de cellules atypiques. Stephen Paget, chirurgien anglais, établira en 1889 l'hypothèse du « seed-and-soil » (« graine-sol ») pour expliquer la dissémination métastatique de la maladie (13). C'est finalement Theodor Boveri, biologiste allemand, qui propose en 1914 que le cancer peut être déclenché par des mutations chromosomiques (14).

IV. Génétique : rappels historiques

A. Découverte de l'information génétique

Ce n'est qu'avec l'avènement de la biologie moléculaire au XXe siècle qu'une explication biologique du cancer émerge véritablement. A partir du milieu du XXe siècle, les scientifiques ont commencé à pouvoir véritablement résoudre des problèmes chimiques et biologiques complexes. Oswald Avery a montré en 1944 que l'information cellulaire était transmise non pas par les protéines, mais par l'ADN (15). Son travail a ainsi permis à Watson et Crick de découvrir la structure de l'ADN en 1953 (16) (prix Nobel en 1962). Les travaux de l'équipe de Nirenberg ont ensuite établi en 1961 que l'information génétique était transmise de l'ADN vers l'ARN pour ensuite permettre la synthèse des protéines (17).

B. De la découverte de l'ADN au séquençage à haut débit

Ces découvertes fondamentales ont ouvert la voie à de nombreux champs d'investigation. La transcriptase inverse a été mise en évidence en 1970 grâce aux travaux de Temin, Mizutani et Baltimore (18, 19). Ceci a beaucoup contribué aux avancées dans le domaine de la génétique, et notamment de la génétique des cancers. C'est également en 1970 que les enzymes de restrictions ont été caractérisées (20), ce qui a favorisé la révolution moléculaire, via le séquençage du génome (12). Frederick Sanger et Walter Gilbert obtiennent le prix Nobel de chimie en 1980 pour leurs inventions respectives de techniques de séquençage. Seule celle de Sanger est toujours utilisée actuellement. Des améliorations techniques à la méthode de séquençage développée par Sanger (sur gel avec marqueurs radioactifs) ont permis une automatisation du séquençage par des machines de plus en plus performantes.

L'apparition des séquenceurs capillaires de nouvelle génération, dans les années 1990, a beaucoup amélioré la rapidité de séquençage notamment grâce au remplacement des marqueurs radioactifs par des marqueurs fluorescents.

Les techniques de séquençage dites de « 2^{ième} génération » ont vu le jour à la fin des années 80 (21). La technique de pyroséquençage a été le premier large succès des techniques

de séquençage nouvelle génération. Basée sur la détection de la production de pyrophosphate par chaque nucléotide.

L'amélioration incessante des techniques de séquençage a permis d'obtenir une première version du génome humain en 2001 (22). De nombreuses innovations ont suivi pour nous amener à des techniques permettant actuellement un très haut débit de séquençage atteignant 75 Gigabases/jour (par exemple avec le HiSeq 2000, Illumina)(23) (Figure 1).

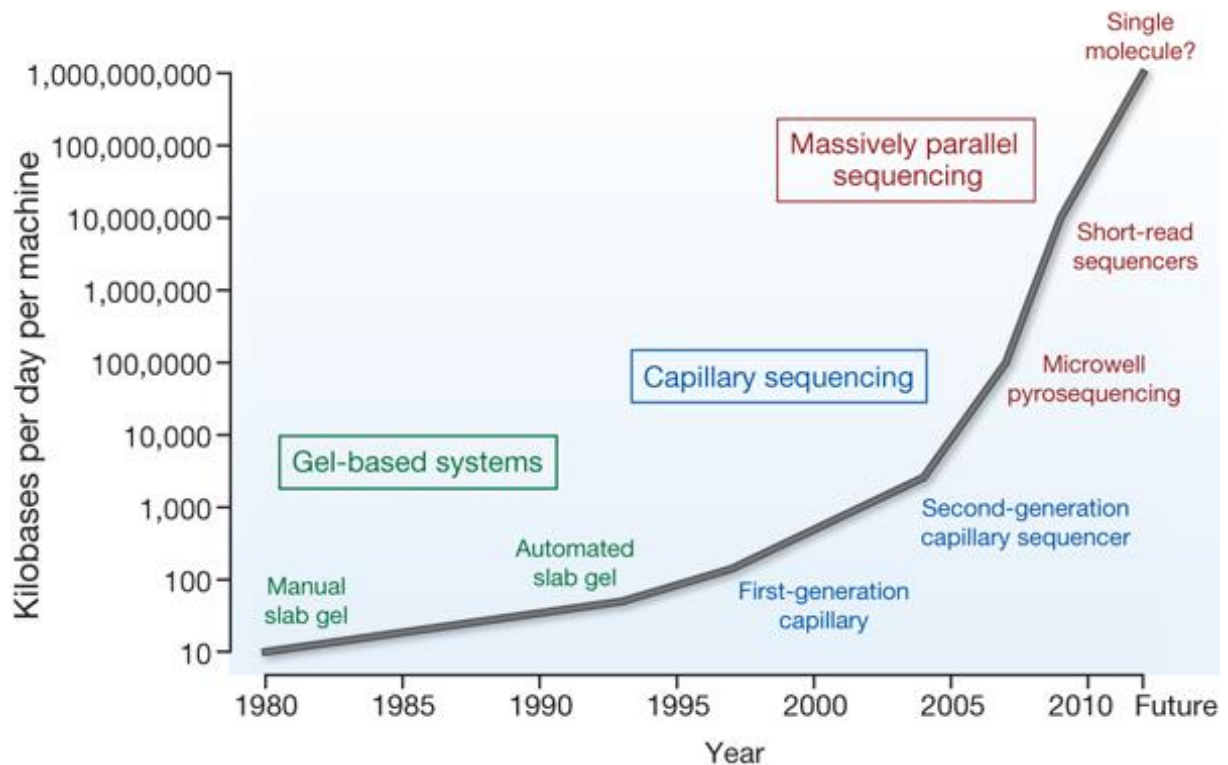


Figure 1 : Improvements in the rate of DNA sequencing over the past 30 years and into the future. MR Stratton *et al.* *Nature* 458, (23)

Ces techniques ont pu voir le jour notamment grâce au développement de l'informatique, car elles génèrent une très grande quantité de données. Les bio-informaticiens sont maintenant des acteurs incontournables des équipes de recherche. Le développement de la bio-informatique a notamment permis un important gain de rapidité. En effet, avec les techniques de séquençage actuelles il est maintenant possible d'étudier dans des délais relativement court, à la fois les altérations génomiques (Whole genome ou whole exome sequencing), les profils d'expression ARN (RNAseq), mais aussi les modifications épigénétiques (ARN non codant, méthylation de l'ADN). Les coûts ont également été beaucoup réduits, ce qui permet d'étendre de plus en plus le nombre de cancers étudiés.

Comme le rappelle Bert Vogelstein dans une revue du paysage génomique des cancers publiée dans *Science* en 2013 (24), au début des années 2000 l'idée même que tous les gènes altérés dans le cancer puissent être identifiés à l'échelon de la paire de base semblait être de la science-fiction. Actuellement de telles analyses à l'échelle du génome sont rendues possibles presque en routine grâce aux progrès technologiques et à la baisse des coûts du séquençage.

Pour comprendre à quel point ces outils ont amélioré la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les cancers, et marqué un tournant dans leur prise en charge, un point est nécessaire sur l'état des connaissances en matière de biologie du cancer, et notamment sur l'apport qu'a eu la génétique dans la compréhension de cette maladie.

V. Impact de l'émergence de la génétique sur la compréhension, la classification et le traitement des cancers

Après un quart de siècle d'avancées rapides, la recherche sur le cancer a généré un ensemble riche et complexe de connaissances qui ont montré que le cancer est une maladie impliquant des changements dynamiques du génome (25). Les fondations ont été établies par la découverte des mutations produisant d'un côté des oncogènes avec un gain dominant de fonction et de l'autre des gènes suppresseurs de tumeur avec une perte récessive de fonction. Il est maintenant bien établi que la tumorigenèse dans les cellules humaines est un processus multi-étapes et que ces étapes reflètent les altérations génomiques qui conduisent la transformation progressive d'une cellule normale vers une cellule hautement maligne. Les études histopathologiques de nombreuses lésions cancéreuses ont mis en évidence l'existence d'états intermédiaires précancéreux où les cellules évoluent progressivement vers un phénotype malin (26). Les observations combinées de cancers humains et de modèles animaux de cancers ont permis de conclure que le développement d'un processus tumoral se fait via un procédé analogue à celui de l'évolution Darwinienne, au cours duquel une succession de changements génétiques conférant chacun un avantage de croissance, amène au final à une conversion progressive d'une cellule normale en une cellule cancéreuse (26, 27).

A. Impact de la génétique sur la compréhension des cancers

1. Caractéristiques des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses présentent une anomalie des processus de régulation de la prolifération et de l'homéostasie. Il existe plus de 100 types de cancer différents qui peuvent être observés dans un organe bien spécifique (25). Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg, après avoir confronté leur expérience sur cette maladie, ont suggéré en 2000, dans une publication devenue une référence mondiale en matière de recherche sur le cancer, que le vaste catalogue des génotypes des cellules cancéreuses est la manifestation de 6 altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne (Figure 2): autosuffisance en signaux de croissance, insensibilité aux signaux

inhibiteurs de croissance, échappement à la mort cellulaire programmée (apoptose), potentiel répliatif illimité, angiogénèse durable et enfin évation tissulaire et métastases (25).

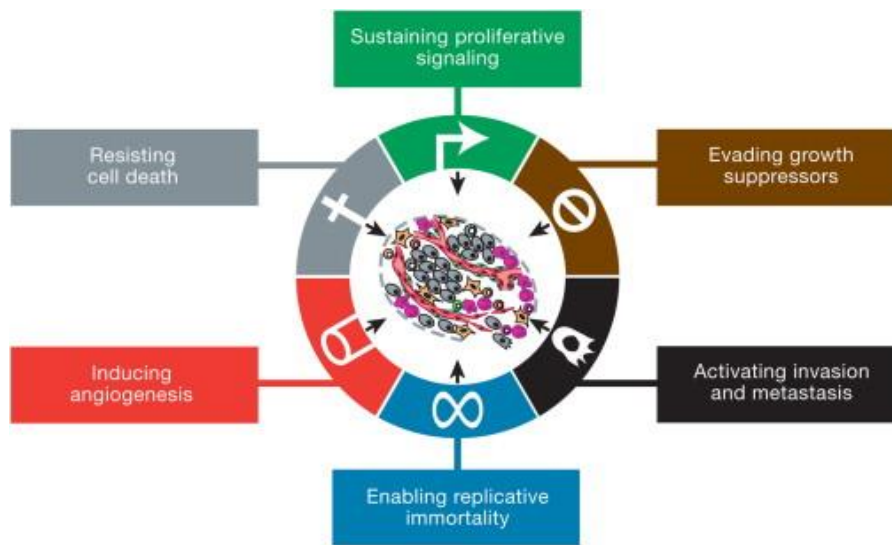


Figure 2 : Acquired capabilities of cancer, extrait de: Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70 (25).

Il a effectivement été mis en évidence dans de nombreux types tumoraux l'existence de mutations au niveau de gènes impliqués dans ces 6 mécanismes décrits.

2. Caractéristiques des cellules cancéreuses : une cause génétique ?

a) Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération

Tout d'abord, la caractéristique la plus parlante, qui a été la première caractérisée, est l'aptitude des cellules tumorales à la répliation illimitée avec la persistance de signaux de prolifération. C'est en observant le comportement des cellules tumorales en culture que les chercheurs ont mis en évidence cette caractéristique. En effet, les cellules normales mises en culture ne se multiplient que si des facteurs de croissance sont apportés dans le milieu. Les cellules cancéreuses montrent une dépendance bien moindre à ces facteurs de croissance pour se multiplier. Il a maintenant été montré dans de nombreux types de cancers que l'autonomie en signaux de croissance peut être obtenue grâce à la production directe de signaux de croissance par les cellules tumorales (c'est par exemple le cas des glioblastomes ou certains sarcomes qui produisent du TGF α ou du PDGF) ou grâce à des mutations de gènes appartenant à la voie de transduction des signaux de croissance, le plus souvent des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase. Les plus connus sont notamment *EGFR (ERBB1)*, *HER2*

(*ERBB2*), *PDGFR* ou encore *KIT*. Un autre moyen, plus complexe, d'obtenir cette autosuffisance est d'activer la cascade intracellulaire en aval du récepteur transmembranaire. C'est l'effet produit par des mutations survenant sur des acteurs de la voie RAS-RAF-MAPK. Des mutations de la voie RAS-RAF ont été observées dans de nombreux types tumoraux, notamment dans les cancers du côlon dont presque la moitié présente des mutations *RAS* (28), ou encore les mélanomes dont une partie présente des mutations *RAF* (29). Les protéines intervenant directement ou indirectement dans les voies de signalisation des signaux de croissance conduisant à l'activation de la prolifération cellulaire sont nombreuses (Figure 3). Différentes anomalies génétiques peuvent modifier leur fonctionnement : l'activation permanente par mutation activatrice (exemple de *K-RAS* dans le côlon) ou par présence d'un transcrit de fusion responsable d'une activation constitutive (exemple de transcrit BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques (30)), la surexpression par augmentation du nombre de copie de gène (par exemple *HER2* dans le sein).

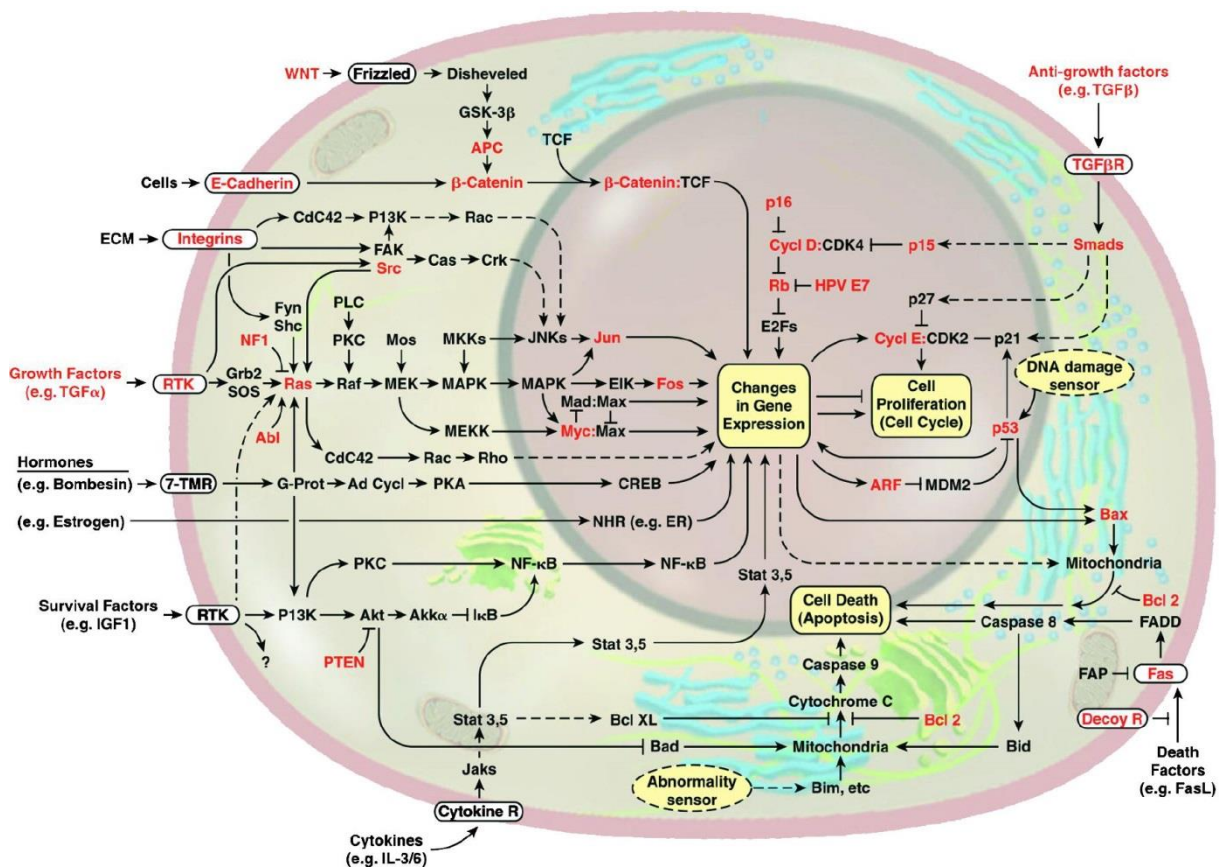


Figure 3 : The Emergent Integrated Circuit of the Cell, extrait de: Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70 (25).

b) Insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance

La deuxième caractéristique majeure des cellules cancéreuses est leur insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance. Les signaux inhibiteurs de croissance peuvent bloquer la prolifération cellulaire de 2 manières : soit en forçant la cellule à passer de la phase active (G1) vers la phase quiescente (G0) du cycle cellulaire pour ensuite pouvoir être réactivée plus tard si besoin dans le tissu ; soit en forçant la cellule à abandonner de manière permanente son potentiel prolifératif en la faisant entrer dans un stade post-mitotique, processus qui est le plus souvent associé à une acquisition des caractères de différenciation spécifique (25). La plupart des acteurs permettant d'échapper aux signaux inhibiteurs de croissance sont ceux du cycle cellulaire impliqués dans le passage du stade G0 au stade G1. Les cellules sont attentives aux signaux extérieurs et, en fonction de ces signaux, la cellule peut entrer en cycle de prolifération, devenir quiescente ou se différencier en entrant en stade post-mitotique. Du point de vue moléculaire, 2 protéines clés sont impliquées, celle du rétinoblastome (RB) et la protéine TP53. En état déphosphorylé, RB séquestre les facteurs de transcriptions de la famille E2F qui sont responsables du contrôle de l'expression des gènes essentiels à la transition G0-G1. La phosphorylation de RB est sous la dépendance des kinases dépendantes de cycline (famille des CDK) qui ont donc également un rôle clé dans l'activation du cycle cellulaire. RB intègre des signaux intra et surtout extra cellulaire pour déclencher ou non la transition G0-G1 (31). TP53 en revanche n'est sensible qu'aux signaux de stress intra cellulaire, et notamment aux signaux de dommage à l'ADN. Elle peut bloquer le cycle temporairement pour tenter de réparer les dommages à l'ADN ou, s'ils sont estimés irréparables, déclencher le processus d'apoptose. RB et TP53 sont des acteurs clés qui interagissent avec des nombreuses autres protéines, et font partie d'un circuit général plus grand où s'observe des redondances. Ainsi, la perte de fonction des seules RB ou TP53 ne suffit pas à provoquer un cancer (32, 33).

Le TGF β est une des molécules les plus connues pour ses effets antiprolifératifs. Son action passe notamment par des phénomènes de phosphorylation/déphosphorylation de RB. Mais le TGF β a d'autres effets sur le destin de la cellule, notamment en pouvant agir sur la protéine c-MYC qui est connue pour son aptitude à empêcher le processus de différenciation cellulaire.

c) Résistance à l'apoptose

Parmi les caractéristiques indispensables au développement des cellules cancéreuses, vient ensuite la résistance à l'apoptose. *TP53* peut participer à cette résistance, notamment en ne déclenchant plus l'apoptose malgré la présence d'altération de l'ADN, mais d'autres acteurs sont souvent impliqués dans ce mécanisme. *BCL2* est l'un d'entre eux. Son rôle oncogénique a été découvert dans les lymphomes B (34). L'expression forcée de *BCL2* peut également être liée à la présence de signaux externe de survie comme IGF1/2 (35).

d) Potentiel répliatif illimité

La cellule tumorale a ensuite besoin d'acquérir un potentiel répliatif illimité. Cette caractéristique fait intervenir plusieurs types de protéine. *TP53* et *RB* y trouvent de nouveau un rôle, mais d'autres acteurs sont nécessaires. Il faut notamment palier le problème du raccourcissement progressif des chromosomes à chaque cycle en veillant à la maintenance des télomères. Le rôle des télomérases est donc crucial pour permettre la prolifération des cellules tumorales (36). Des mutations du promoteur de *TERT* (telomerase reverse transcriptase) ont été rapportées dans des glioblastomes, dans des cancers de la vessie ou encore de la thyroïde (37).

e) Capacité d'angiogénèse

Pour survivre et s'étendre durablement les cellules tumorales ont également besoin de nutriments et donc d'une importante vascularisation. Même si certaines tumeurs trouvent un moyen de survivre en l'absence d'oxygène, notamment en détournant le voie *HIF* comme dans les cancers du reins, les tumeurs ont un important besoin vasculaire pour grossir (38). L'angiogénèse est notamment médiée par le *VEGF* et le *FGF*, qui tous les 2 se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase (39). La présence d'une néo-vascularisation est détectable assez précocement dans la transformation et la progression tumorale (40). La surexpression du *VEGF* ou du *FGF* a été observée dans plusieurs types tumoraux. L'up-régulation du *VEGF* peut être causée par des mutations du gène codant pour *VHL* par exemple (41, 42).

f) Capacité d'invasion et de dissémination métastatique

L'importante vascularisation des tumeurs peut également participer à la dissémination métastatique des cellules cancéreuses. La notion de métastase est connue depuis très

longtemps, mais les mécanismes qui les sous-tendent ne le sont pas encore complètement. Les métastases sont pourtant une des causes principales du décès des patients (43). Plusieurs classes de molécules d'adhésion sont altérées dans les cellules qui possèdent un potentiel invasif, en particulier la famille des CAMs (Cell-Cell Adhesion Molecules), et les intégrines qui permettent aux cellules d'adhérer à la matrice extra cellulaire (44). Dans la famille des CAMs, le rôle de la E-Cadherine et de la N-CAM est maintenant bien connu. L'interaction cellule-cellule via la E-Cadherine est notamment responsable de la production de signaux inhibiteurs de croissance via la voie de la β -caténine (45). N-CAM peut quant à elle subir des modifications d'isoforme passant d'une forme très adhésive à une forme peu adhésive dans les tumeurs de Wilms, les neuroblastomes ou les carcinomes à petites cellules du poumon (46, 47). Parmi les mécanismes impliqués dans la dissémination métastatique des cancers, on trouve le phénomène de transition épithélium-mésenchyme (EMT) qui a été mis en évidence par plusieurs équipes (48-50). Certaines cellules carcinomateuses réussissent à détourner un processus utilisé pendant l'embryogenèse et la réparation des plaies, pour leur permettre de se déplacer. Ces processus nécessitent l'action combinée de facteurs de transcription comme Slug, Snail, Twist et Zeb1/2 avec celles d'enzyme de dégradation de la matrice extra cellulaire (51).

Ces 6 principales caractéristiques nécessaires au développement des cellules tumorales sont bien illustrées par les nombreuses anomalies génétiques qui ont été rapportés dans les différents types de cancer. Parmi les gènes les plus fréquemment mutés dans ces cancers, sont notamment retrouvés, *TP53*, *KRAS*, *APC*, *BRAC2*, *RB1*, *EGFR* ou encore *CDKN2A* (52) (Figure 4)

g) Anomalies moléculaires les plus fréquentes dans les cancers

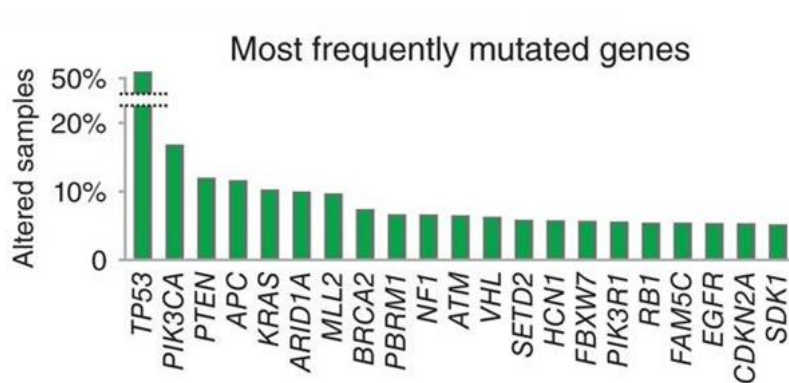


Figure 4 : Gènes les plus fréquemment mutés dans différents type de cancers, selon Ciriello G *et al. Nat Genet.* 2013 (52)

Pour regrouper de façon synthétique les mécanismes survenant par accumulation de modifications génétiques mis en causes dans le cancer, William C. Hahn et Robert A. Weinberg ont proposé une carte calquée sur le modèle d'un plan du métro (Figure 5).

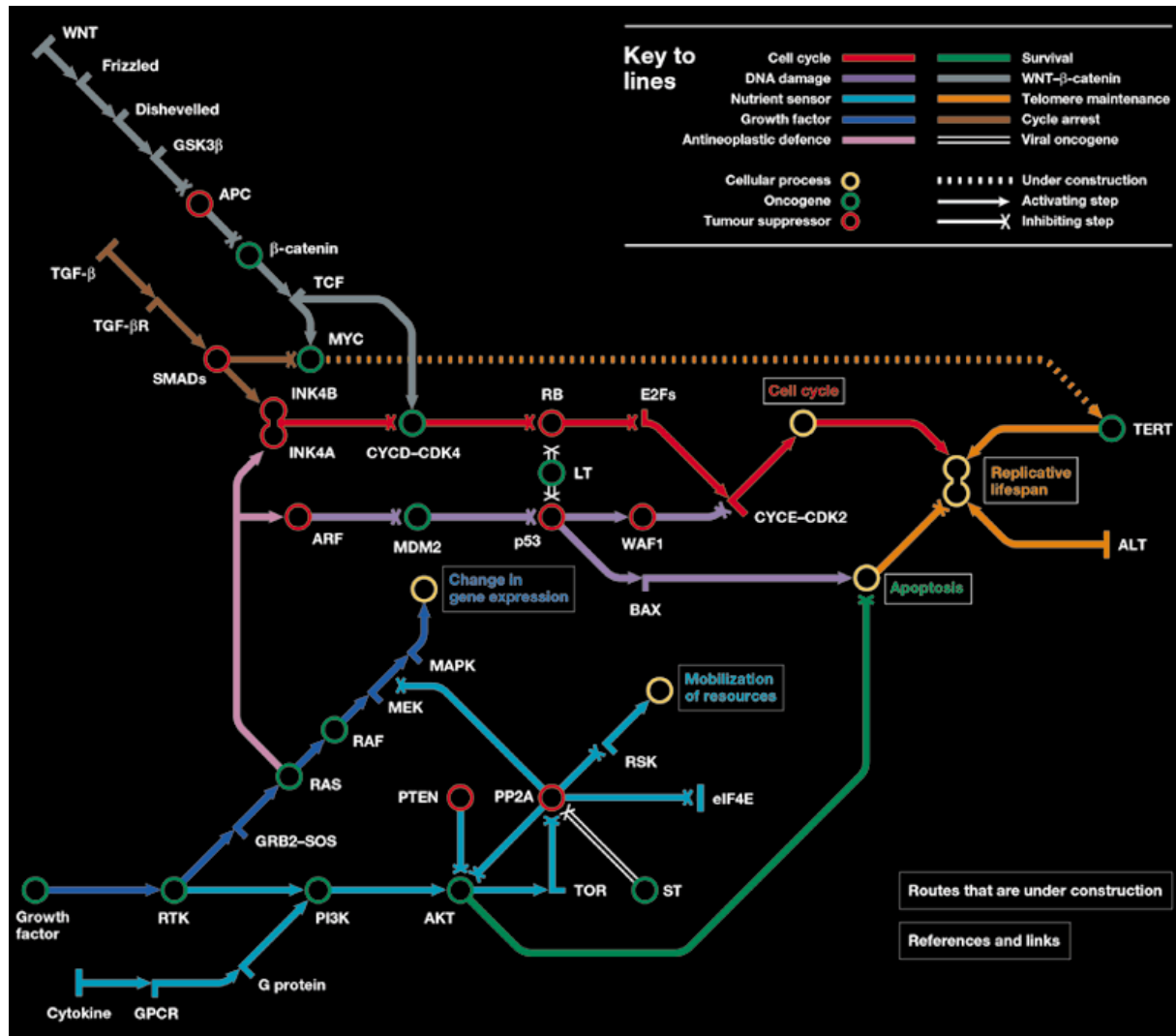


Figure 5 : A subway map of cancer pathway © 2002 Nature Research (<http://www.nature.com/nrc/posters/subpathways/index.html>)

Après un aperçu de l'apport de la génétique dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la transformation cancéreuse des cellules, nous allons voir que la génétique a également permis d'améliorer la classification des tumeurs, notamment en affinant et en complétant les outils diagnostiques des anatomopathologistes.

B. Impact de la génétique sur la classification des tumeurs

L'identification de mutations caractéristiques de certains cancers a permis d'apporter des précisions diagnostiques et les plateformes de biologie moléculaire font désormais partie intégrante du processus diagnostique pour de nombreuses entités tumorales. Pour arriver à un diagnostic précis et adapter la prise en charge du patient, il y a maintenant une étroite collaboration entre pathologistes et biologistes moléculaires.

Le diagnostic des sarcomes a particulièrement été très bouleversé depuis la découverte d'anomalies génétiques caractéristiques de certaines tumeurs, comme par exemple, pour ne citer qu'elles, l'amplification de *MDM2* dans les liposarcomes, les mutations de la β -catéline dans les tumeurs desmoïdes, ou encore les réarrangements *EWSR1* dans les sarcomes d'Ewing. Certains réarrangements géniques permettent également d'arriver au diagnostic de certains carcinomes, voire en sont devenu la condition diagnostique, c'est par exemple le cas des carcinomes du rein à translocation (53). Le diagnostic des gliomes a également été bouleversé par les études moléculaires qui ont permis d'en affiner la classification (54).

Au-delà du simple diagnostic, une classification moléculaire des cancers permet d'identifier certains sous-types plus agressifs au sein d'une même famille de cancers présentant des caractéristiques morphologiques communes. L'étude des profils moléculaires des cancers est d'ailleurs devenue un projet nécessitant une collaboration internationale. Le Cancer Genome Atlas (TCGA) Research Network a été mis en place notamment pour générer un catalogue des anomalies génétiques qui conduisent, ou « drive », la tumorigenèse et permet de mettre en évidence des sous catégories de tumeurs qui présentent des pronostics différents. Grâce aux efforts de ce réseau, et à bien d'autres équipes de recherche dans le monde, le séquençage de nombreux cancers est en train de révolutionner la compréhension, le diagnostic et la prise en charge des cancers les plus fréquents. Le cancer du sein est un exemple intéressant. Etant particulièrement fréquent, il a été étudié très largement. L'association de séquençage ADN, de séquençage ARN et d'analyse de méthylation a permis de mettre en évidence des grands types de cancer du sein : les basal-like, les luminal A, les luminal B et les *HER2* enriched (55). Bien d'autres cancers solides ont bénéficié de ces approches multi-omics avec l'apparition de nouvelles classifications. On peut notamment citer l'exemple des glioblastomes, dont le pronostic est effroyable, mais pour lesquels l'amélioration des connaissances moléculaires permet d'améliorer la prise en charge et

lentement prolonger la survie de certains patients. Il a récemment été mis en évidence qu'à l'intérieur de la grande famille des glioblastomes il existait en fait 4 grands sous-types de tumeurs : classique, mésenchymal, pro-neural et neural (56). Plus récemment ce sont les cancers de la vessie et des voies excrétrices urinaires qui ont bénéficié d'une nouvelle classification moléculaire avec l'émergence de type basal, luminal et P53-like (57-59).

C. Impact de la génétique sur la prise en charge thérapeutique des cancers

L'impact le plus important pour les patients est représenté par le tournant majeur survenu dans la prise en charge thérapeutique des cancers depuis la mise en évidence des anomalies génétiques, responsables du détournement des voies de signalisation par les cellules cancéreuses. L'aire des thérapies ciblées a pris son essor au début des années 2000. En effet, la découverte des principales modifications génétiques qui sous-tendent les perturbations des voies de signalisation nécessaires au développement des cancers, a donné lieu au développement de drogues permettant de cibler ces anomalies. Jusqu'au début des années 2000, les stratégies thérapeutiques s'appuyaient principalement sur la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie dite « conventionnelle », à savoir des molécules ciblant les cellules en phase proliférative via différents mécanismes, étaient disponibles. La radiothérapie, tout comme les chimiothérapies conventionnelles étaient des stratégies déjà basées sur des connaissances poussées de la biologie du cancer, et reposent principalement sur l'idée de détruire les cellules en cycle qui prolifèrent activement. Elles ne s'intéressent donc qu'à la caractéristique de répllication illimitée des cellules cancéreuses. Ces stratégies sont efficaces et continuent à être largement utilisées, mais leur tolérance reste un problème pour les patients. Des molécules ciblant l'angiogenèse ont rapidement montré leur efficacité avec des effets très intéressants observés *in vivo* rapportés dès 1993 (60). Des molécules ciblant les récepteurs hormonaux, puis ciblant des récepteurs à activité tyrosine kinase (impliqués dans les processus de signalisation nécessaires à l'autosuffisance en facteur de croissance) se sont largement développées également, en particulier dans le poumon (anti-EGFR), dans le sein (anti-HER2). Des molécules ciblant les mutations *BRAF* ont également montré leur efficacité dans les mélanomes porteurs de l'anomalie. De nombreuses thérapies ciblées sont désormais utilisées en routine, et ont l'avantage d'être souvent mieux tolérées par les patients. Elles sont en revanche responsables d'une pression de sélection sur les clones tumoraux, ce qui peut faire émerger des résistances à ces thérapies ciblées. Il est donc primordial de

continuer à explorer toutes les voies mises en jeu par les cellules tumorales pour parvenir à leur survie.

VI. Emergence des principales causes du développement des cancers : état des connaissances

A. Instabilité génomique

En 2015 Cristian Tomasetti et Bert Vogelstein ont rapporté dans *Science* le fait que même si une partie des cancers (5 à 10%) était liée à des anomalies génétiques familiales ou à l'exposition à des carcinogènes bien connus comme le tabac ou le virus HPV, l'importante variation de l'incidence des cancers dans les différents types de tissu n'a pas de véritable explication. En s'intéressant à l'effet stochastique associé au nombre de divisions survenant au sein des cellules souches d'un tissu donné, les auteurs suggèrent que le risque de cancer au sein d'un tissu est en fait associé au nombre de divisions qui y survient (61). A chaque division il existe un risque de donner naissance à des mutations, dont certaines pourraient conférer un avantage sélectif à la cellule concernée. Partant de ce constat, les auteurs considèrent qu'à chaque cycle, le risque de voir se glisser une mutation est identique dans tous les types cellulaires, il devrait donc y avoir une corrélation forte entre le nombre de division survenant pendant toute une vie au sein d'une classe de cellule et le risque de développer un cancer dans cet organe pendant une vie. Les auteurs ont effectivement montré l'existence de cette forte corrélation.

Cette idée est séduisante puisque le développement des cancers est majoritairement dû à l'acquisition de modifications génétiques et épigénétiques, comme cela a été montré par de nombreuses études à l'échelle du génome (23, 24, 62). L'instabilité génomique serait donc l'instigateur du processus.

L'impact de l'instabilité génomique est évident dans les cas de cancer familiaux comme par exemple dans les syndromes de Lynch. En effet dans ce spectre pathologique, les patients présentent des anomalies au niveau de certains systèmes de réparation de l'ADN, le « mismatch repair » ou protéines MMR (63), ce qui augmente le nombre de mutations survenant à chaque cycle cellulaire et engendre l'apparition de cancers. Les tumeurs rentrant dans ce spectre mis en évidence par Lynch, sont appelées MSI pour microsatellite instable car les microsatellites sont particulièrement difficiles à répliquer, ce qui est une importante source d'erreurs chez des sujets dont le système de réparation MMR est déficient. Les mutations du

gène *BRCA*, codant pour d'autres protéines de réparation de l'ADN, peuvent elles-aussi être responsables de cancers familiaux, survenant à un âge jeune, au niveau du sein, des trompes ou des ovaires, et sont un exemple de l'importance de l'instabilité génomique dans la survenue des cancers. Cependant, toutes les anomalies de réparation de l'ADN ne sont pas causées par des mutations génétiques. En effet, parmi les cancers présentant un phénotype MSI, certains ne sont pas dus à une mutation familiale des protéines du système MMR entrant dans le cadre des syndromes de Lynch mais correspondent à des cas sporadiques, notamment dus à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* survenant dans un contexte d'hyperméthylation globale des îlots CpG appelé CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) (64). Ces phénomènes d'hyperméthylation, entrent dans le cadre des mécanismes de régulation épigénétique, qui sont de plus en plus mis en cause dans les cancers de par leur lien avec l'instabilité génomique. Hanahan et Weinberg ont d'ailleurs ajouté l'instabilité génomique dans leur mise à jour des Hallmark of cancer en 2011 (31). Elles trouvent leur place parmi les mécanismes impliqués dans l'instabilité génétique.

B. Epigénétique

Toutes les « instructions » nécessaires à la constitution d'un organisme sont codées par son ADN. Les cellules ne vont pas toutes avoir besoin d'exprimer les mêmes gènes en fonction de leur rôle biologique dans l'organisme, aussi, elles acquièrent, notamment au cours de l'embryogenèse, la possibilité d'exprimer ou non certains gènes. Cette fine régulation permet à chaque type cellulaire d'acquérir ses spécificités phénotypiques. Ceci est lié à la régulation de l'accessibilité des facteurs de transcriptions aux gènes, en fonction de l'état de compaction de l'ADN. Ces phénomènes de compaction de l'ADN dépendent de 3 grands phénomènes, regroupés sous le terme d'épigénétique. Le premier phénomène permet de modifier le niveau de compaction de la chromatine grâce aux histones. Le second phénomène régulant l'accessibilité aux gènes implique les ARN non codants. Et enfin, le dernier niveau de régulation se trouve au niveau de l'ADN lui-même : il s'agit de modifications chimiques par méthylation (Figure 6).

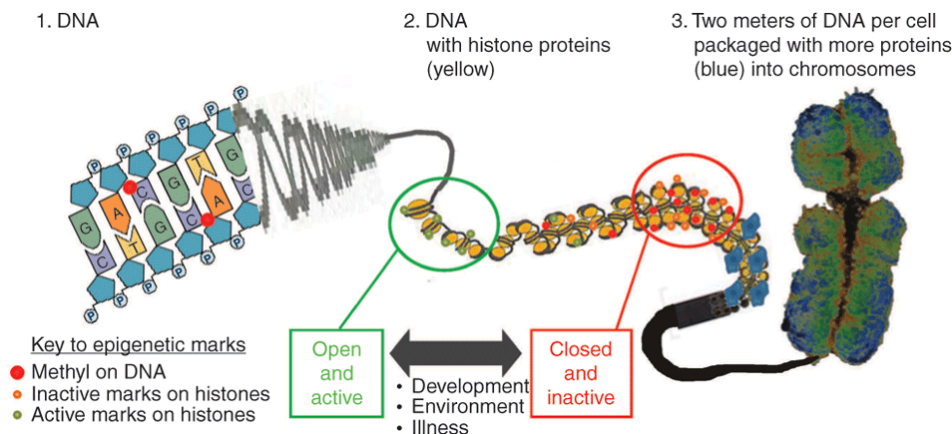


Figure 6 : mécanismes épigénétiques, extrait de Sun C, Burgner DP, Ponsonby A-L, *et al.* (65)

La méthylation de l'ADN a de nombreuses conséquences fonctionnelles, notamment en participant à la stabilisation du génome ou de l'expression des gènes. Il s'agit d'un processus dynamique, complexe, impliquant de nombreuses protéines. La méthylation de l'ADN est une modification chimique qui ne modifie pas le code génétique. Elle correspond à l'ajout d'un groupement méthyle en position 5 d'une cytosine (5mC) en générale incluse dans un dinucléotide CpG (Figure 7).

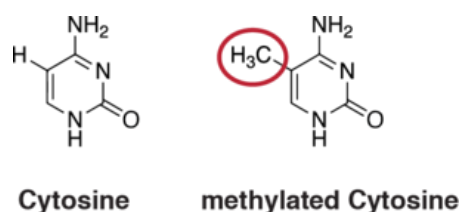


Figure 7 : méthylation d'une cytosine par ajout d'un groupement méthyle en position 5.

On dit classiquement que chez l'Homme, les 5mC représentent environ 1% de l'ensemble des bases et occupent 70 à 80% des dinucléotides (66). Certaines régions sont particulièrement riches en CpG Elles sont appelées îlots CpG ou CpG Islands (CGIs). Elles sont généralement pourvues de 5mC et sont décrites comme des régions de plus de 500pb dont la composition en CpG est supérieure à 55% avec un ratio (CpG observé/CpG attendu) > 0,64. Il est décrit que 50% des CGIs sont situés au niveau des Transcription Start Site (TSS), que 25% sont localisés en intragénique et 25% en zone intergénique (66). Cependant les motifs 5mC sujets à méthylation se trouvent principalement en dehors des CGIs.

Classiquement 2 types de réactions de méthylation de l'ADN sont décrits : les réactions *de novo* et les réactions de maintenance. Les réactions dites de novo, consistent à ajouter un groupement méthyle sur les cytosines des dinucléotides CpG localisés sur les 2 brins d'ADN. Ce type de réaction est principalement à l'origine de l'hyperméthylation observée dans les cancers ou de la reprogrammation épigénétique survenant au cours de l'embryogenèse et de la gamétogenèse (67, 68). Les réactions dites de maintenance consistent à ajouter un groupement méthyle sur la cytosine d'un dinucléotide CpG localisé sur le brin néo-synthétisé de l'ADN et étant en regard d'un dinucléotide CpG méthylé sur le brin parental (suite à la réplication de l'ADN). Les enzymes qui catalysent ces réactions sont des protéines de la famille des méthyltransférases de l'ADN ou DNA Methyl Transferases (DNMTs). La famille des DNMTs comporte 5 membres : DNMT1, DNMT2, DNMT3A et DNMT3B. La protéine DNMT1 est principalement en charge des réactions de maintenance. DNMT2 n'affiche pas d'activité méthyltransférase, son rôle est très discuté. Elle fut nommée ainsi en raison de sa forte homologie de séquence avec les autres méthyltransférase (66). Les DNMT3s sont en charge des réactions *de novo* (69). Elles sont principalement en cause dans les évènements d'hyperméthylation de promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs par exemple. Des phénomènes de déméthylation de l'ADN peuvent aussi survenir, par 2 mécanismes : la déméthylation active et la déméthylation passive. La déméthylation passive est liée à un manque de maintien de la méthylation de l'ADN suite à la réplication. La déméthylation active est indépendante du cycle de réplication de l'ADN et résulte de plusieurs réactions enzymatiques successives faisant notamment intervenir les enzymes de la famille TET.

L'étude de méthylation des cancers a montré que le niveau de méthylation des cancers est différent de celui d'un tissu sain. De manière générale l'ADN des cellules cancéreuses est le siège d'une hypométhylation globale avec une tendance à l'hyperméthylation au niveau des promoteurs (70, 71) (Figure 8).

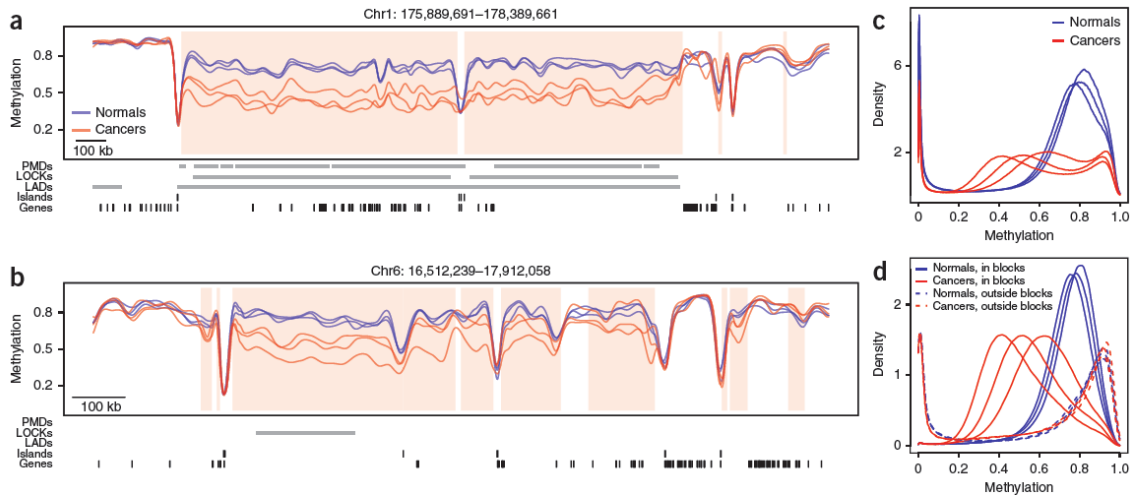


Figure 8 : exemple de larges blocs génomiques hypométhylés dans un cancer du côlon humain, extrait de Hansen KD, Timp W, Bravo HC, *et al*, *Nat Genet* (72)

L'impact fonctionnel n'est pas encore parfaitement élucidé car c'est un domaine d'étude complexe. En effet, les dinucléotides CpG étant répartis sur tout le génome (aussi bien les séquences codantes que non codantes), leur état de méthylation peut avoir un impact sur l'activité de toutes les régions du génome (Figure 9).

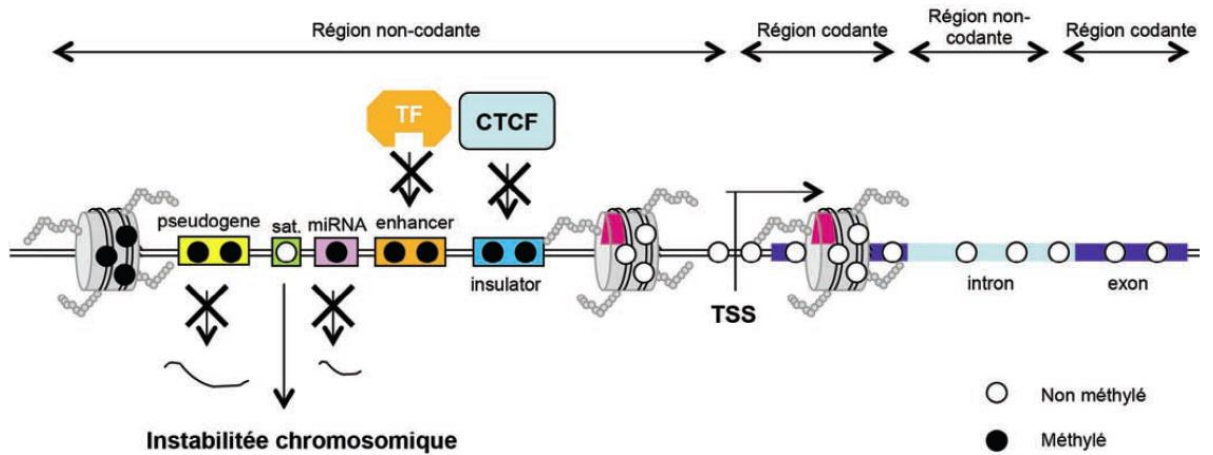


Figure 9 Impact de l'état de méthylation de l'ADN sur l'activité des différentes régions du génome, extrait de Cartron P-F, Pacaud R, Salbert G (66)

Les régions intergéniques représentent 80-90% du génome. Elles comportent notamment les pseudogènes (gène ne codant pas pour une protéine) et des séquences répétées. La méthylation des pseudogènes serait responsable de leur répression (73). En ce qui concerne les séquences répétées, il en existe plusieurs types. Les séquences répétées en

tandem sont fréquentes au niveau des microsatellites. Leur hypométhylation serait impliquée dans le développement et la progression de certains cancers, notamment par perte d'hétérozygotie (74). Les séquences répétées dispersées de l'ADN, les séquences SINE (short interspread elements) et LINE (long interspread elements) seraient, elles, source de perturbations de l'expression des gènes quand elles sont exprimées. Or, il semble que la majorité de ces séquences soit inactivée par méthylation de l'ADN (75). Des travaux montrent également que leur hypométhylation induit leur expression, ce qui conduirait à une instabilité chromosomique source de transformation et/ou de progression tumorale (66, 76-78).

Pour ce qui est des gènes, on peut considérer qu'ils se composent de 2 régions, une région promotrice et le corps du gène. La région promotrice est faite d'une partie proximale TSS habituellement peu méthylée ce qui favoriserait la transcription, d'une partie centrale (boîtes BRE et TATA) pauvre en dinucléotides CpG donc peu sujette à la méthylation, et d'une partie distale comportant des enhancers et repressors. Les enhancers et repressors seraient également pauvres en CpG avec des niveaux de méthylation assez variable. Il est actuellement difficile de conclure sur le rôle de la méthylation de ces régions du génome.

Le corps des gènes, quant à lui, est fait d'exons et d'introns. La méthylation de l'exon 1 semble plutôt associée à une répression transcriptionnelle (79). Mais il ne semble pas y avoir de règle générale, car il a été rapporté que la méthylation de l'exon 1 pouvait être associée à l'expression d'un transcrit non-conventionnel et à une isoforme protéique (80). Certains rapportent que l'hypométhylation d'exon peut être associée à une diminution d'expression (81), d'autres que l'hyperméthylation de certains exons serait responsable d'une diminution de leur transcription (82).

Pour ce qui est des introns, il a été récemment rapporté que l'hypométhylation des régions introniques peut conduire à l'exposition d'enhancers et donc à des modifications d'expression des gènes concernés (83). L'hyperméthylation d'intron peut aussi être un processus de régulation. Une étude publiée en 2011 rapporte une importante corrélation entre le niveau de méthylation du corps du gène SF-1 (de l'exon 2 à l'intron 3) dans les cellules du stroma endométrial avec un important niveau d'expression de l'ARN messager SF-1 (84).

Des processus de méthylation jouent donc un rôle clé dans le maintien et la régulation du génome, mais notre compréhension de la relation qui existe entre méthylation et niveau d'expression est encore faible (85). Un dérèglement du niveau de méthylation a été observé

dans de nombreux cancers. Ces modifications de niveau de méthylation peuvent cibler le promoteur de gènes en particulier, comme ceux codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose (86), ou la réparation de l'ADN comme MLH1 ou MGMT. Ils peuvent aussi toucher de nombreux îlots CpG, notamment dans les tumeurs présentant un phénotype CIMP. Ces phénotypes CIMP ont été rapportés dans des cancers du côlon (64), dans des cholangiocarcinomes (87), des paragangliomes (88) ou des gliomes (89). Ces phénotypes CIMP ont particulièrement été observés dans des tumeurs présentant des mutations de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, notamment les gènes de la famille SDH dans les paragangliomes, ou les gènes *IDH* dans les gliomes ou les cholangiocarcinomes. Les modifications du métabolisme cellulaire font effectivement partie des événements mis en cause dans le développement des cancers.

C. Modifications du métabolisme

Les modifications du métabolisme font partie des hallmarks émergentes décrites par Weinberg et Hanahan en 2011 (Figure 10) (31).

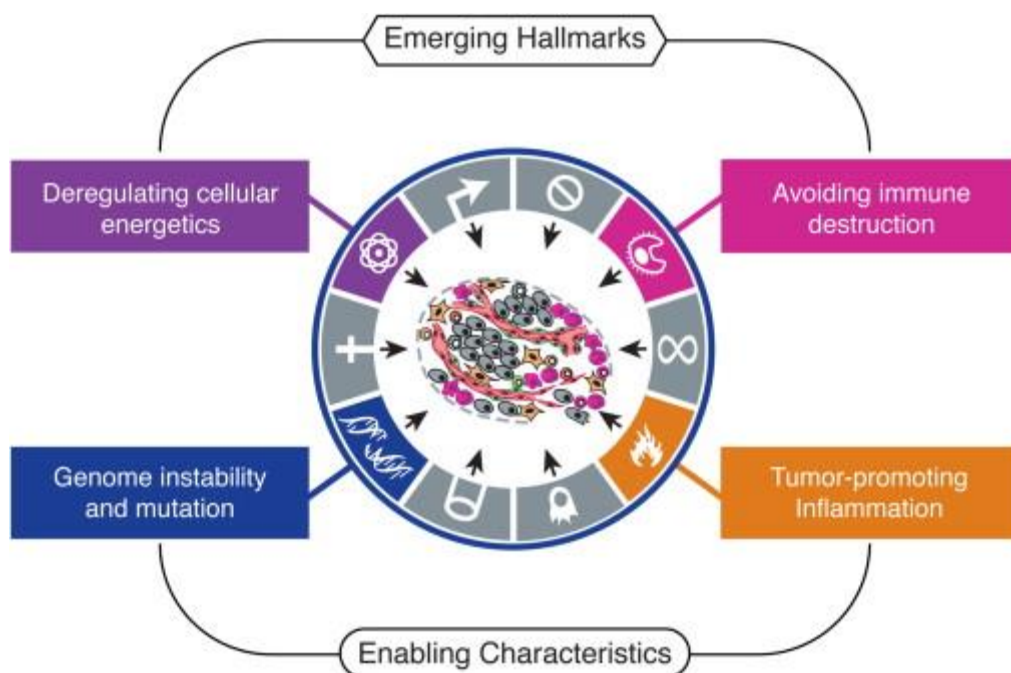


Figure 10 Emerging Hallmarks and Enabling Characteristics, extrait de Hallmarks of cancer: the next generation, Hanahan, D. et Weinberg, R. A, Cell 2011.

La prolifération chronique et non contrôlée des cellules cancéreuses nécessite un ajustement de leur métabolisme pour subvenir à leurs besoins énergétiques. En conditions aérobies les cellules normales utilisent le glucose qu'elles transforment en pyruvate dans le cytoplasme pour ensuite qu'il soit utilisé pour produire de l'énergie par le cycle oxydatif dans les mitochondries (cycle de Krebs). En conditions anaérobies, la voie mitochondriale trop consommatrice d'oxygène est dénigrée et remplacée par la glycolyse. Warburg a décrit la bascule vers le métabolisme anaérobie dans les cellules tumorales même en présence d'oxygène, conduisant à ce que l'on appelle une « glycolyse aérobie » (90, 91). Cette observation est maintenant connue sous le nom d'effet Warburg. D'autres observations ont confirmé la nécessité d'adaptations métaboliques des cellules cancéreuses, notamment la surexpression de transporteurs du glucose comme GLUT1 par certaines tumeurs (92-94). L'importante consommation de glucose par les cellules tumorales est d'ailleurs utilisée en imagerie comme traceur lors des tomographies par émissions de positrons. Plus récemment c'est la découverte de mutations récurrentes des gènes *IDH1* et *IDH2* dans des gliomes, des chondrosarcomes, des leucémies myéloïdes aigües, des cancers de la prostate, des cancers du côlon, des chondrosarcomes ou encore des cholangiocarcinomes (87, 95) qui a apporté de nouveaux arguments pour ces modifications métaboliques indispensables à la croissance tumorale. *IDH1/2* codent pour 2 isoformes de l'isocitrate déshydrogénase et sont impliqués dans le métabolisme aérobie, ils font partie des enzymes nécessaires à la chaîne respiratoire dans les mitochondries (Figure 11). D'autres gènes impliqués dans la chaîne respiratoire des mitochondries présentent des mutations dans certains cancers : les gènes de la famille SDH qui codent pour des isoformes de la succinate déshydrogénase et la Fumarate Hydratase (FH) peuvent être mutés dans la léiomyomatose héréditaire, certains carcinomes rénaux et des paragangliomes (95). Les mutations d'*IDH1/2* sont responsables d'une activation enzymatique avec pour résultat une importante consommation de NADPH et une importante production de D-2HG (D-2 Hydroxyglutarate) (96). La forte concentration en D-2HG a notamment pour conséquence d'inhiber les dioxygénase dépendantes d' α KG (α Ketoglutarate) dont font partie les histones déméthylases JMJD2 et JHDM1 et la DNA déméthylase TET2. Ces mutations IDH ont donc pour conséquence de modifier le métabolisme cellulaire et la régulation épigénétique. Des associations entre mutation SDH et phénotype CIMP ont été montrées dans les paragangliomes (88), les gliomes (89) et les cholangiocarcinomes (87).

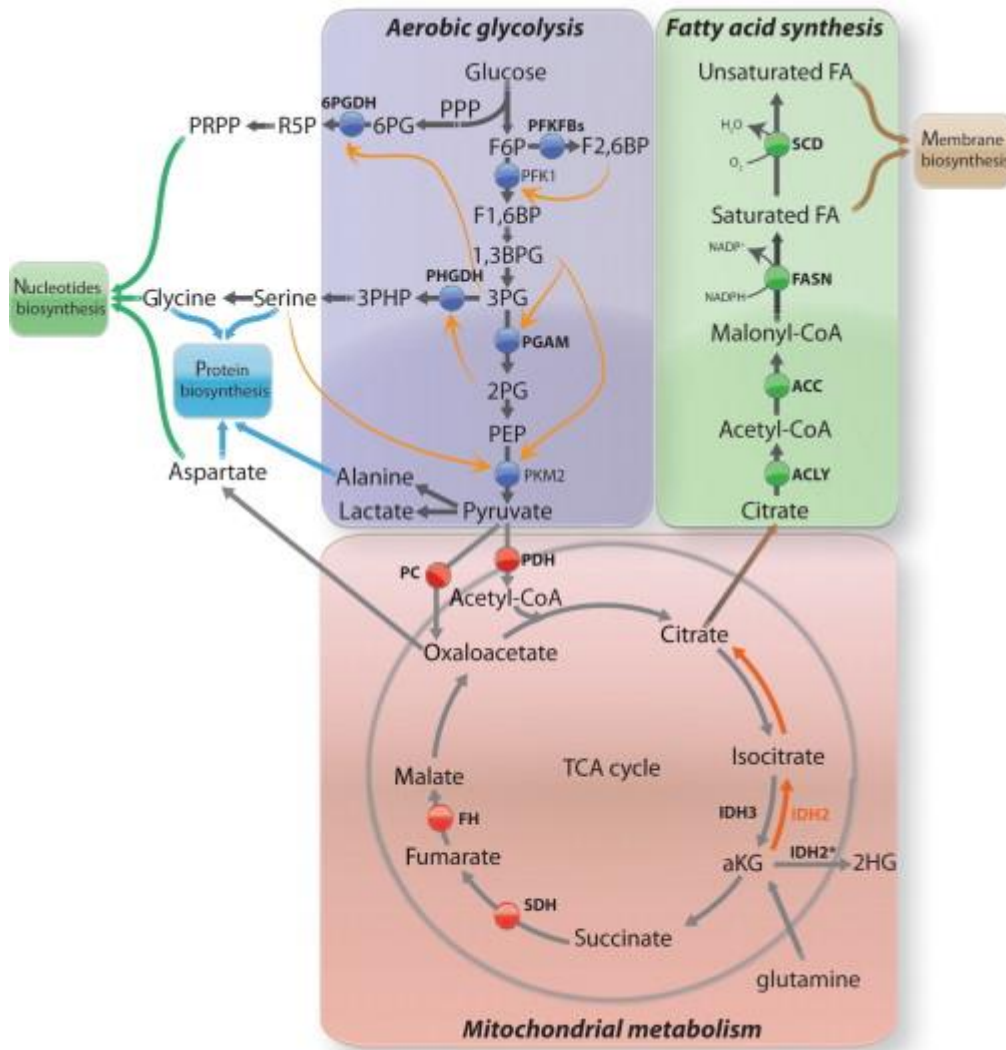


Figure 11 : The metabolic alterations of cancer cells, extrait de Sciacovelli M, Gaude E, Hilvo M, et al (97)

Les différentes altérations moléculaires observées dans les cellules tumorales peuvent donc concourir à différents mécanismes protumoraux en même temps. Mais au-delà de la complexité de ces modifications intracellulaires, il faut également prendre en compte les facteurs extrinsèques à la cellule, qui concourent eux aussi au développement tumoral. La dernière caractéristique récemment reconnue comme indispensable au développement des cellules tumorales est l'échappement au système immunitaire.

D. Immunité et microenvironnement tumoral

Parmi tous les facteurs permettant au cancer de se développer, il est maintenant reconnu que la génétique seule n'explique pas le développement des tumeurs, le métabolisme

et l'échappement au système immunitaire sont décrits depuis 2011 comme les « hallmarks » émergentes du cancer (31) (Figure 10).

Nous approchons maintenant d'une vision holistique du cancer avec une prise en compte des facteurs intrinsèques mais aussi extrinsèques à la tumeur. La capacité naturelle du système immunitaire à reconnaître et éliminer les cellules cancéreuses, ou en voie de transformation tumorale a été postulée au début du XXe siècle (98). Mais déjà en 1863, Virchow évoquait la présence de leucocytes dans les tissus néoplasiques (99) et avait fait la connexion entre inflammation et tumeur. L'évolution de la recherche donne finalement raison à Virchow, puisque le rôle de l'immunité dans le développement et l'évolution des cancers est devenu incontournable. Les résultats cliniques obtenus par les protocoles d'immunothérapie ont amené la revue Science à considérer cette avancée comme le fait scientifique de l'année en 2013 (100).

1. L'immunité : Rappels

Il existe 2 types d'immunité interconnectés: l'immunité innée ou spontanée et l'immunité acquise ou adaptative. L'immunité innée correspond à des moyens de défense spontanés, plus primitifs dans l'évolution, première ligne de défense de l'organisme, représentée principalement par les barrières anatomiques (physiques et chimiques) et des réponses cellulaires. Les barrières physiques sont représentées par les tissus épithéliaux, qui peuvent sécréter des substances acides et/ou antimicrobiennes qui représentent une barrière chimique. Les réponses cellulaires innées sont médiées principalement par les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et le système du complément. La réponse innée est indispensable à la protection contre les infections bactériennes communes. Les macrophages sont capables de reconnaître et de se lier à certains constituants de la membrane bactérienne. La liaison macrophage-bactérie active les macrophages qui vont pouvoir phagocyter le pathogène en cause et s'activer. L'activation des macrophages va entraîner la production de molécules biologiquement actives : les cytokines et les chimiokines. Le relargage de ces molécules est responsable d'inflammation locale et de l'activation du complément. Ces phénomènes inflammatoires comprennent notamment la vasodilatation qui va permettre notamment l'afflux d'autres cellules immunitaires pour aider les macrophages. Les cellules Natural Killer (NK) peuvent également être recrutées lors de la réponse innée et tuer les cellules stressées, altérées ou infectées par un virus. Cette réponse inflammatoire innée est très efficace, très rapide, mais non spécifique et pas toujours suffisante pour éliminer les

organismes infectieux. Elle va permettre le déclenchement de la réponse adaptative, plus longue à se mettre en place, mais beaucoup plus ciblée (101).

L'inflammation locale va en effet augmenter le flux d'Antigènes (Ag) vers les ganglions lymphatiques de drainages du tissu inflammatoire, mais aussi amener vers les organes lymphoïdes les cellules dendritiques (CDs) (macrophages spécialisés dans la présentation antigénique, ou CPA (cellule présentatrice de l'Ag)). Les Ag phagocytés par les CDs pourront activer les lymphocytes et déclencher la réponse adaptative. La réponse adaptative est orchestrée par les lymphocytes B et T, et elle est spécifique d'antigène. Elle doit fonctionner de concert avec l'immunité innée. Cette fine organisation est rendue possible notamment grâce aux cytokines (protéines solubles de type facteurs de croissance) et aux chimiokines (signaux solubles à activité chimioattractante) qui permettent une communication entre les différents acteurs de la réponse immunitaire.

L'immunité adaptative fait intervenir les lymphocytes B (LcB) et les lymphocytes T (LcT). Les LcT représentent l'immunité à médiation cellulaire. Ils sont activés suite à leur interaction avec une CPA. Les LcT matures CD8 naïfs deviennent cytotoxiques suite à l'engagement de leur récepteur de surface appelé le TCR. Les LcT CD4 naïfs deviennent des T helpers suite à l'engagement de leur TCR. Il existe plusieurs sous-types de T Helpers, et l'engagement vers les différents sous-types dépend des signaux que le Lc reçoit des cellules dendritiques. Les LcB, ont de leur côté la charge de l'immunité dite humorale, qui passe par la production d'anticorps (Ac). Les cellules B ayant passé les étapes de sélection avec succès (élimination des cellules autoréactives notamment) migrent vers les organes lymphoïdes où elles vont rencontrer des Ag et s'activer dans les centres germinatifs, notamment grâce au contact avec les CDs et les LcT auxiliaires (T_{FH}). L'activation des cellules B par les cellules T va engendrer une réponse immédiate par différenciation de certaines cellules B en plasmocyte producteur d'Ac spécifiques et également une réponse mémoire (101).

2. L'immunité anti-tumorale

Du point de vue immunologique, les cellules cancéreuses, du fait de leur instabilité génomique et de leurs mutations, peuvent être considérées comme du soi modifié. En effet, les cellules cancéreuses sont le siège de surexpression des certaines protéines ou de l'expression de protéines mutées. Ces protéines vont être à l'origine de peptides présentés à la surface des cellules tumorales, et qui vont être reconnus par le système immunitaire.

Il existe actuellement 4 groupes d'antigènes de tumeurs reconnus (101) :

- Les Ag codés par des gènes spécifiquement surexprimés par les tumeurs
- Les Ag codés par des formes variantes de gènes normaux modifiés par des mutations
- Les Ag qui ne sont normalement exprimés qu'à certaines étapes de la différenciation ou uniquement par certaines lignées.
- Les Ag qui sont surexprimés dans des tumeurs particulières.

Les Ag spécifiques de tumeurs ont une expression restreinte aux cellules tumorales : ils peuvent être utiles pour le diagnostic mais aussi pour le traitement qui peut venir cibler des Ag spécifiques de tumeurs ou qui peut stimuler le système immunitaire. Ces Ag spécifiques de tumeurs sont absents des cellules normales. Ils peuvent provenir de l'apprêtement du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I par des peptides mutés endogènes ou par des peptides issus de l'infection virale des cellules cancéreuses comme par exemple dans les tumeurs EBV ou HPV induites.

Les antigènes associés aux tumeurs, ne sont pas spécifiques aux tumeurs, ils peuvent être exprimés par des cellules normales à certains stades de leur développement. Il s'agit de gènes exprimés pendant le stade de développement fœtal, alors que le système immunitaire n'est pas encore compétent. Lorsqu'une transformation maligne réactive l'expression de ce type de gènes dans une cellule différenciée elle sera reconnue comme du non-soi. Deux exemples de ces gènes appelés onco-fœtaux sont l'alpha fœtaux protéine (AFP) qui peut être exprimée dans des cancers de l'ovaire, du testicule ou du foie, et l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) qui peut être exprimé dans les cancers colorectaux. Ils existent d'autres types d'Ag associés aux tumeurs, notamment certains facteurs de croissances qui sont normalement exprimés à un taux finement régulé dans les cellules normales, et qui se trouvent exprimés dans des proportions très importantes par les cellules cancéreuses. C'est le cas par exemple du récepteur à l'EGF qui, en étant surexprimé, va participer comme nous l'avons vu à l'autonomie de la cellule cancéreuse en signaux de croissances.

La réponse immunitaire anti-tumorale est un sujet de controverse qui a fait rage pendant plus d'un siècle (101). L'association entre cancer et inflammation a été rapportée dès la fin du 19^e siècle notamment par Virchow, mais son rôle pro ou anti-tumoral n'était pas consensuel. Il a maintenant été clairement établi que le système immunitaire joue un rôle

majeur dans l'élimination des cellules cancéreuses. A ce jour, il est proposé 3 mécanismes par lequel le système immunitaire contrôle le cancer (101) :

- En éliminant les virus potentiellement oncogènes
- En éliminant les pathogènes ce qui réduit l'inflammation protumorale
- En identifiant et éliminant directement les cellules tumorales.

Ce dernier mécanisme est appelé immunosurveillance, il fait partie de l'action bénéfique antitumorale du système immunitaire. Cependant l'inflammation chronique peut jouer un rôle néfaste, notamment en étant responsable d'une pression de sélection qui pourrait contribuer à la dispersion et à la survie des cellules tumorales. Des études récentes ont abouti à la formulation d'une nouvelle hypothèse plus nuancée sur l'implication du système immunitaire : il s'agit du concept d'immunoédition, ou immunoediting.

3. Immunoediting

Ce concept a été rapporté par l'équipe de Robert D. Schreiber (102) suite à des expériences qui ont montré que des tumeurs qui s'étaient développées dans un environnement immunodéficient étaient plus immunogéniques que celles apparues dans un environnement immunocompétent (101). De ces observations est née l'idée que seules les cellules tumorales capables d'échapper à la réponse immunitaire survivent, par processus de sélection darwinien.

Les 3 phases proposées par l'équipe de Schreiber sont d'abord une phase d'élimination pendant laquelle le système immunitaire identifie et détruit les cellules cancéreuses nouvellement formées (Figure 12).

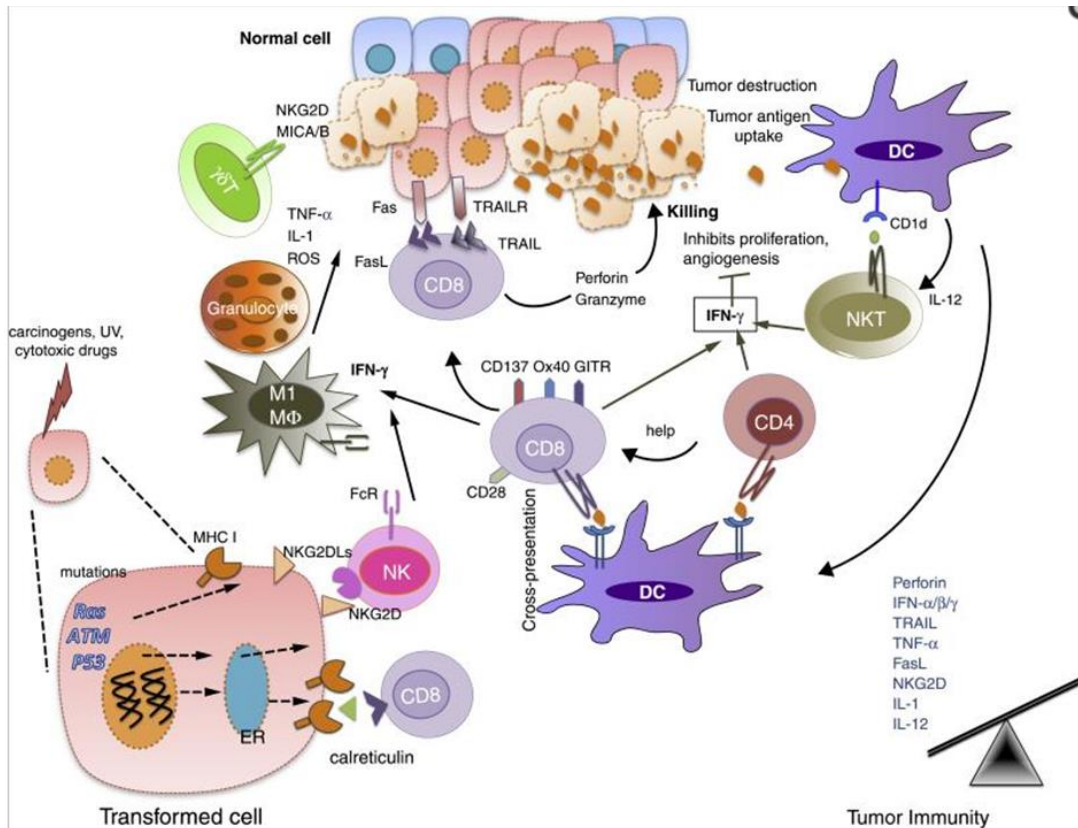


Figure 12 : phase d'élimination où l'immunité innée et adaptative détectent et détruisent ensemble les cellules tumorales avant qu'elles ne deviennent cliniquement décelables. *Extrait de: New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25(102)*

La 2e phase proposée est celle d'équilibre où se met en place un équilibre entre un petit nombre de cellules tumorales qui survivent et celles qui sont détruites (Figure 13).

Enfin la dernière phase correspond à l'échappement. Lors de cette dernière étape cruciale pour le développement de la tumeur, les cellules les plus agressives et les moins immunogéniques se mettent à se multiplier et à se disséminer sans pouvoir être arrêtées par le système immunitaire (Figure 14).

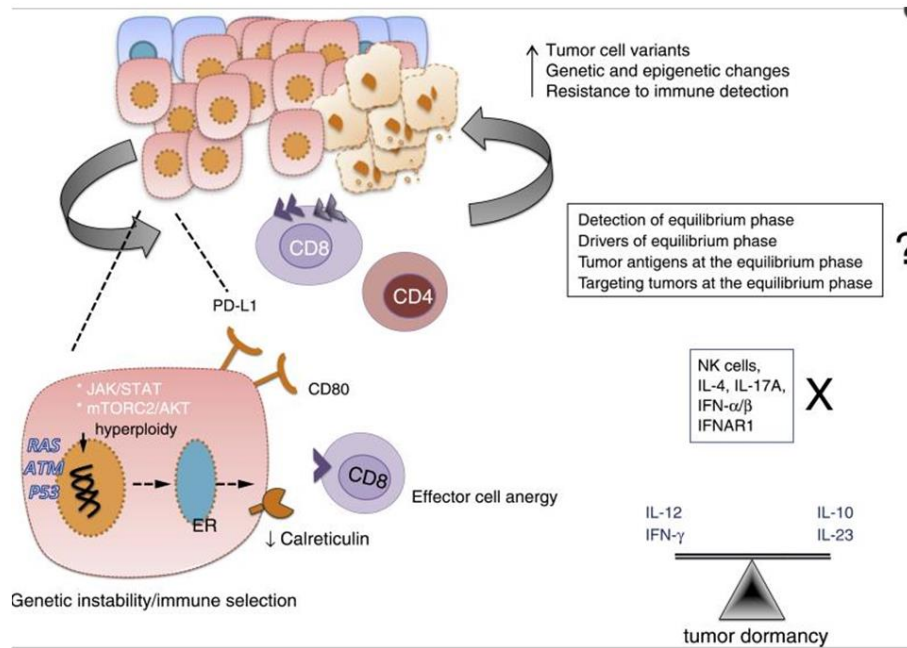


Figure 13 : Phase d'équilibre, le système immunitaire maintient la tumeur à un stade de dormance fonctionnelle. *Extrait de: Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25(102)*

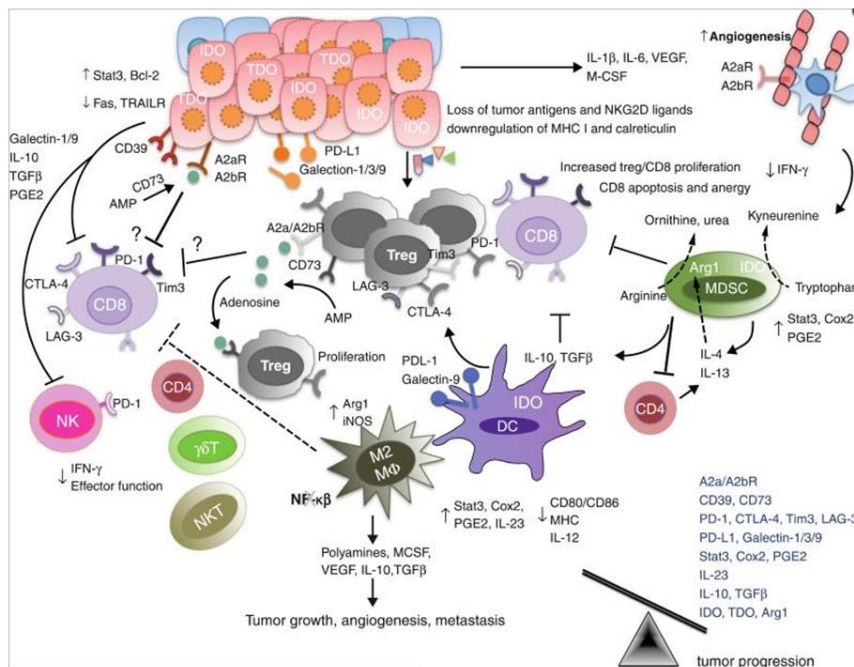


Figure 14 : phase d'échappement où le Système immunitaire échoue à restreindre la croissance tumorale. *Extrait de: Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25*

4. Mécanismes impliqués dans l'élimination des cellules cancéreuses

a) Immunité innée

Tout comme pour la lutte contre les pathogènes, l'immunité innée et l'immunité adaptative sont toutes deux impliquées dans la lutte contre le cancer. Pour l'immunité innée, ce sont les cellules NK qui sont l'acteur principal. En effet les NK sont capables, par un jeu de signaux activateurs et inhibiteurs, de détruire des cellules dont l'expression du CMH est diminuée, ou des cellules stressées délivrant des signaux de « soi altéré » (101). Les NK sont un important acteur précoce de la réponse contre les agents viraux. Ces cellules sont directement cytotoxiques, comme les lymphocytes T (LcT) en libérant des granules cytotoxiques comme la perforine. Les cellules NK libèrent également des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, le TNF- α ou l'IFN- γ . La sécrétion de ces cytokines peut jouer un rôle dans l'activité anti-tumorale car elles favorisent l'induction de la réponse des LcT cytotoxiques par les CD8. Parmi les acteurs de la réponse innée, il semble que les macrophages activés soient eux aussi capables de favoriser la réponse anti-tumorale, notamment en favorisant la réponse médiée par les anticorps et en sécrétant du TNF- α (facteur de nécrose tumorale).

b) Immunité adaptative

Les acteurs de l'immunité adaptative impliqués dans la réponse anti-tumorale font intervenir aussi bien les cellules B que les cellules T. Dans tous les modèles animaux, les antigènes de tumeur peuvent induire une réponse humorale comme une réponse cellulaire. Il a été montré expérimentalement que les tumeurs peuvent induire des réponses T cytotoxiques spécifiques d'Ag de tumeurs présentés par des CMH de classe I exprimés par ces cellules tumorales (rappel : le CMH I est présent sur toute les cellules, il sert à présenter à la membrane des peptides issus du recyclage des protéines internes à la cellule). Les Lc B peuvent de leur côté produire des Ac spécifiques de tumeurs, cependant le rôle des cellules B dans la réponse anti-tumorale n'est pas encore bien caractérisé. Les cytokines et l'ensemble des cellules présentes dans l'environnement direct des cellules tumorales ont un rôle dans la réponse anti-tumorale.

5. Microenvironnement tumoral

Le rôle majeur du microenvironnement tumoral a été montré dans de nombreux types tumoraux. En fonction de sa composition, les interactions des cellules tumorales avec leur environnement peuvent limiter ou au contraire favoriser leur prolifération. Les phénomènes d'inflammation chronique sont plutôt responsables de l'instauration d'un environnement favorable au développement tumoral (101). La réponse inflammatoire provoque du stress cellulaire favorisant la survenue de mutations, elle favorise l'angiogenèse et, par la sécrétion de facteurs de croissances destinées initialement aux cellules inflammatoires, elle peut favoriser la croissance de cellules tumorales qui surexpriment leurs récepteurs aux facteurs de croissance. Le microenvironnement tumoral peut également contenir des facteurs immunosuppresseurs. La présence de TGF- β et l'indoleamine-2,3dioxygénase (IDO) inhibe la réponse de type TH1. L'IL-10 est une autre interleukine immunosuppressive qui peut avoir des propriétés anti-tumorale à un stade précoce mais qui engendre plutôt une progression tumorale à un stade tardif du développement des tumeurs. Le consensus qui semble actuellement ressortir des études chez l'animal est que la présence de Lymphocytes T régulateurs (Treg), de macrophages de type M2 et de Lc TH2 dans le microenvironnement induit plutôt un état d'immunosuppression local qui favorise le développement tumoral. Chez l'homme, les effets exacts de la présence de Treg restent controversés selon les études, certains décrivant leur présence comme un facteur protecteur, la majorité la décrivant plutôt comme un facteur péjoratif (103-106)

6. Mécanismes de l'échappement des cellules tumorales face au système immunitaire

Pour échapper aux différents acteurs du système immunitaire, les cellules tumorales peuvent utiliser différentes stratégies. Elles peuvent diminuer l'apprêtement de leurs Ag internes en diminuant leur expression de CMH I.

L'augmentation des facteurs anti-apoptotiques et l'absence ou l'expression de récepteurs de mort mutés peut conduire à la résistance des cellules tumorales aux signaux de mort cellulaire programmée normalement induit par certaines cellules immunitaires.

Le défaut d'expression des molécules de co-stimulation nécessaires à une activation complète des Lc T peut lui aussi favoriser le développement des cancers. En effet, pour qu'un

Lc T s'active il faut qu'il engage son TCR face à un complexe CMH I-Ag spécifique, mais également qu'il reçoive un signal de co-stimulation en même temps via l'interaction de son récepteur CD28 avec le ligand CD80 ou CD86 (B7) (Figure 15). Les cellules tumorales qui ont réussi à se développer ont plutôt tendance à être moins immunogène, à ne pas exprimer de signaux de co-stimulation et à entraîner la présence d'un nombre insuffisant de CPA. Ceci peut avoir pour conséquence un nombre insuffisant de signaux de co-stimulation et engendrer une anergie clonale des Lc T et une tolérance du système immunitaire envers les cellules tumorales (107).

Enfin, un dernier moyen utilisé par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire est l'expression de molécules immunosuppressives pouvant activer des signaux d'inhibition des LcT. En effet, le système d'activation des Lc doit pouvoir être contrebalancé par des mécanismes de régulation négative de manière physiologique pour maintenir l'homéostasie. Ces mécanismes font appels à des molécules dites de co-inhibition. Les Lc T, une fois activés se mettent à exprimer ces molécules de co-inhibition afin de pouvoir être désactivés une fois leur tâche effectuée (rétrocontrôle négatif). Ce système de signaux co-activateurs et co-inhibiteurs représente un important système de contrôle appelé immune checkpoint. Le principe repose sur l'interaction d'un ligand avec son récepteur (107).

Ces couples ligand-récepteurs appartiennent à 2 grandes familles :

- celle des immunoglobulines qui comprend la famille des B7-CD28 composée de molécules à activité stimulatrice (CD80-CD86/CD28, ICOSL/ICOS) et inhibitrice (CD80-CD86/CTLA4, PDL-1 – PDL-2/PD-1) et d'autres molécules à activité inhibitrice comme TIM3, TIGIT et LAG3.
- celle des TNF-récepteur qui a une action principalement co-stimulatrice (OX40/OX40L, CD40/CD40L, GITR/GITRL, HEVM, CD30L-CD30, 4-1BBL/4-1BB).

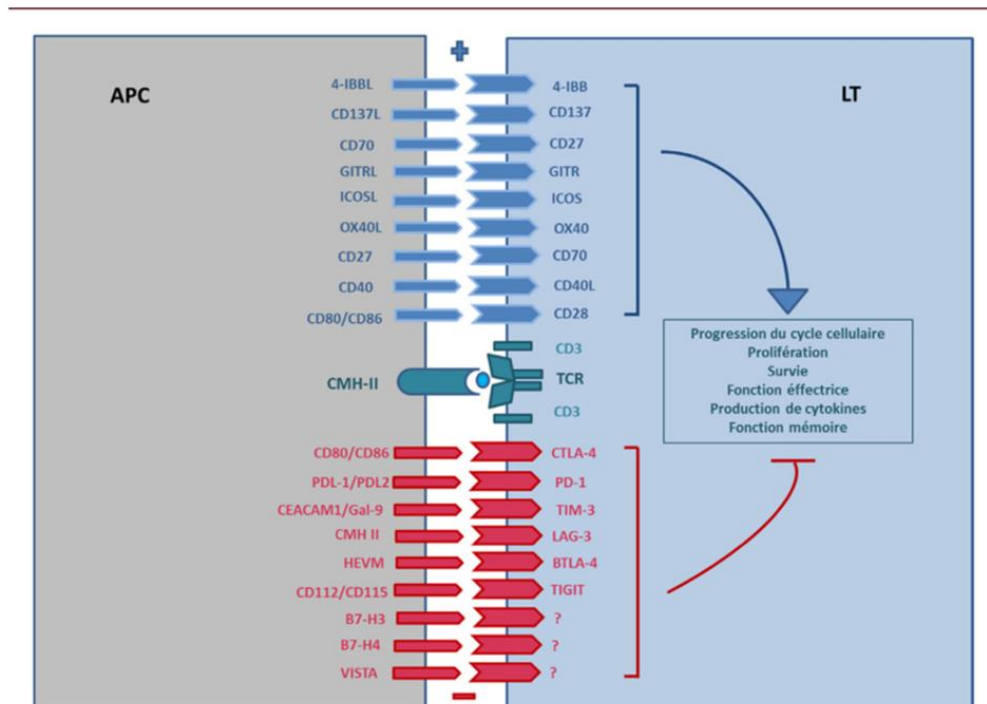


Figure 15 : *facteurs de co-stimulation et de co-inhibition exprimés à la surface des cellules T (tiré de : Granier C, Soumelis V, Mandavit M, et al. (107))*

Ces immune checkpoints sont présents à la surface des LcT mais aussi d'autres cellules immunitaires. Leurs ligands peuvent être exprimés par de nombreux types cellulaires, au premier rang desquels se trouvent les CPA. Le détournement de ce système d'immune checkpoint par certaines cellules tumorales qui se mettent à exprimer des ligands de ces récepteurs de co-inhibition (PDL-1 ou PDL-2 par exemple) leur permet de se protéger de la destruction par les LcT.

La compréhension du rôle majeur du système immunitaire dans la lutte contre le cancer a permis d'ouvrir un champ très large d'investigations thérapeutiques.

VII. Vers une approche intégrée globale du cancer

Grâce aux travaux de chercheurs du monde entier, la recherche sur la biologie du cancer a maintenant intégré de nombreux paramètres aussi bien génétiques, que métaboliques, vasculaires, ou immunitaires pour tendre vers une approche globale de la maladie.

La meilleure compréhension des mécanismes qui sous-tendent et/ou favorisent le cancer a permis le développement de nombreuses approches thérapeutiques (Figure 16). L'approche génétique et la mise en évidence des altérations de la signalisation cellulaire au sein des cellules cancéreuses ont permis le développement de thérapies ciblant les protéines mutées, surexprimées ou des traitement visant l'instabilité génomique. La compréhension des modifications métaboliques a ouvert des voies à des thérapeutiques ciblant notamment la glycolyse. Les importants besoins vasculaires des cellules tumorales peuvent être attaqués par les anti-angiogéniques. La capacité à résister à l'apoptose est également une piste de recherche, et enfin, les thérapies ciblant le système immunitaire sont en pleine explosion.

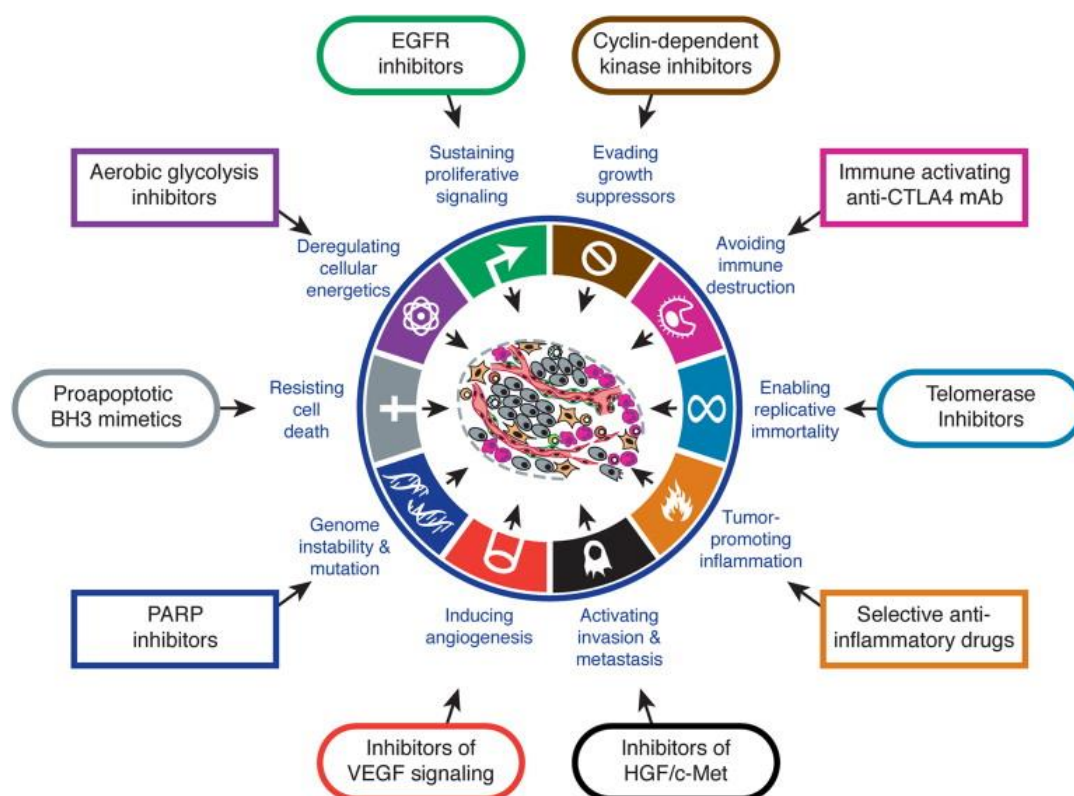


Figure 16 Therapeutic Targeting of the Hallmarks of Cancer, Hanahan, D. et Weinberg, R. A (31) Exemples de thérapie pouvant cibler les différentes Hallmarks des cellules cancéreuses.

Ces nouveaux traitements allongent la survie des patients atteints de cancer, mais peuvent aussi induire des résistances par des phénomènes de pression de sélection. Il est donc primordial d'avoir plusieurs cordes à son arc, de bien connaître la tumeur que l'on veut traiter, d'avoir évalué ses forces et ses faiblesses pour pouvoir utiliser plusieurs lignes de traitement pouvant se compléter les unes les autres, et éventuellement palier les phénomènes de résistance. C'est une approche dite personnalisée du cancer vers laquelle les oncologues tendent actuellement. Et pour cela, il est nécessaire de caractériser les types de cancers de façon globale par des approches intégrées, pour pouvoir ensuite aller chercher les cibles intéressantes à explorer chez le patient.

VIII. Tractus naso-sinusien et tumeurs naso-sinusiennes

A. Le tractus naso-sinusien

1. Anatomie

Le tractus naso-sinusien est une région anatomique complexe (Figure 17) qui comporte les cavités nasales, les sinus paranasaux et la base du crâne.

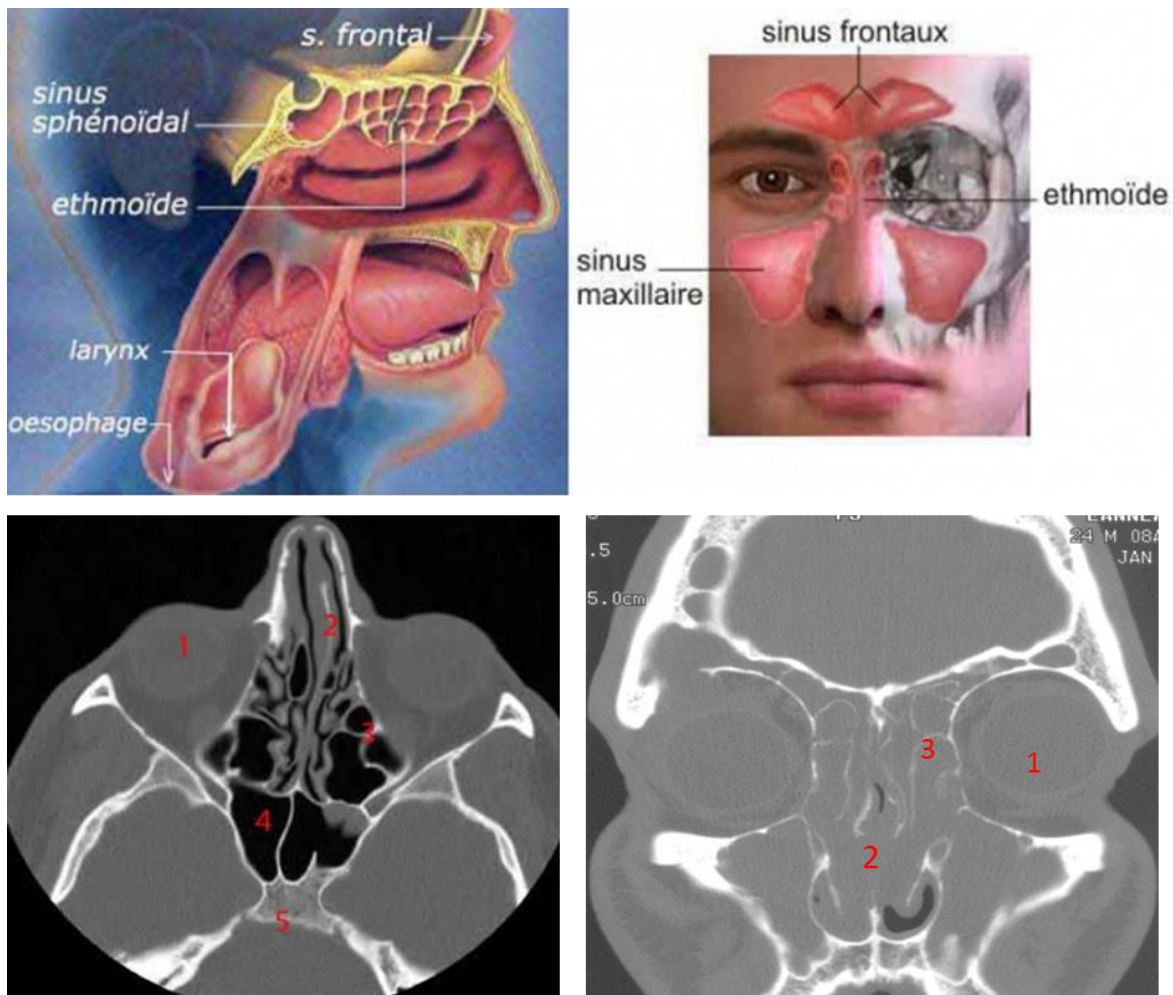


Figure 17 : anatomie de la région naso-sinusienne, (1) globe oculaire, (2) septum, (3) cellules ethmoïdales, (4) sinus sphénoïdal, (5) clivus.

2. Histologie

Sur le plan histologique, le vestibule nasal est fait d'un revêtement cutané et d'une zone transitionnelle vers la muqueuse des fosses nasales. Les fosses nasales sont recouvertes d'épithélium respiratoire reposant sur un chorion où siègent des glandes séromuqueuses et de nombreux plexus veineux. Les sinus sont tapissés de la même muqueuse que celle des fosses nasales mais il n'y a pas de plexus veineux et les glandes se trouvent uniquement près de l'ostium (Figure 18). En profondeur, l'armature des fosses nasales et des sinus est faite d'os et de cartilage.

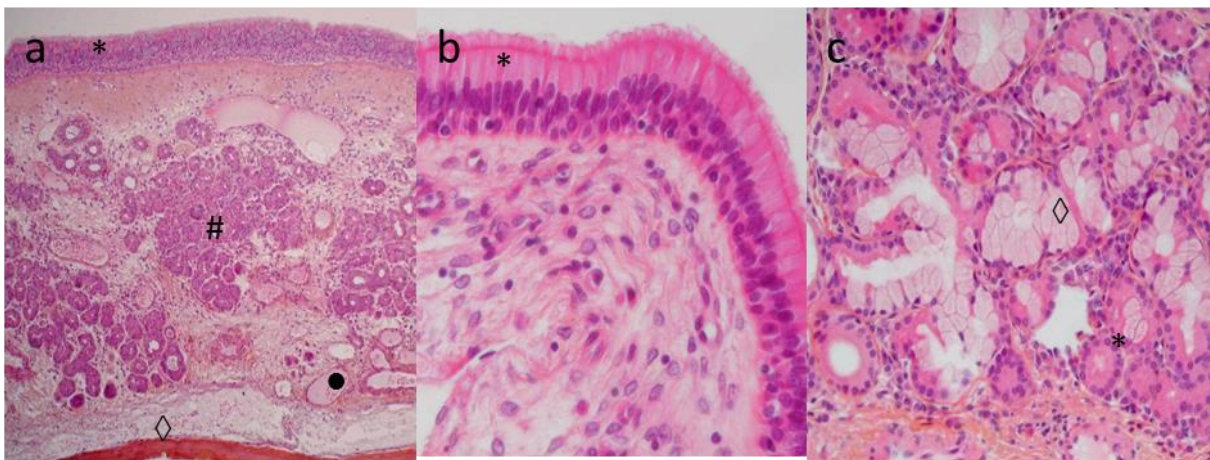


Figure 18 : aspect histologique de la muqueuse naso-sinusienne. (a) HES faible grossissement : épithélium respiratoire (*) reposant sur un chorion comportant de nombreuses glandes séro-muqueuses (#) et des plexus veineux (●). A la partie la plus profonde se trouve l'armature osseuse (◇). (b) HES à fort grossissement : l'épithélium respiratoire est cylindrique cilié. (c) HES à fort grossissement montrant les glandes séro(*)-muqueuse(◇).

A la partie haute des fosses nasales, se trouve la fente olfactive (Figure 19). Elle est bordée de la muqueuse olfactive qui est composée de récepteurs olfactifs enchâssés parmi des cellules de soutien (appelées cellules sustentaculaires). A la partie la plus profonde se trouvent les cellules basales de renouvellement. Le chorion comporte des glandes et des filets nerveux.

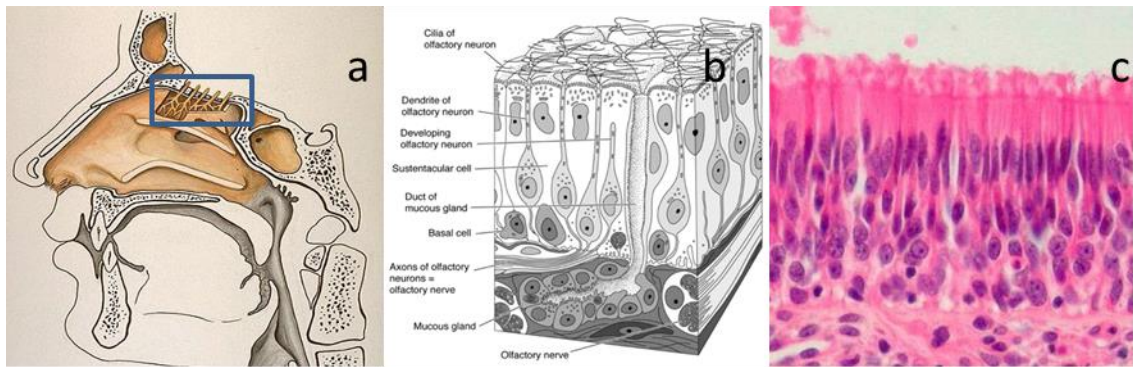


Figure 19 : la muqueuse olfactive. (a) la fente olfactive est située à la partie haute des fosses nasales. (b) schéma représentant les particularités histologiques de la muqueuse olfactive. (c) HES à grossissement moyen montrant les neurones olfactifs enchâssés parmi les cellules ciliées sustentaculaires de soutien.

B. L'épithélium olfactif

1. Histologie

Sur le plan fonctionnel, la muqueuse olfactive a des particularités. Histologiquement elle est faite de plusieurs assises cellulaires dont les rôles ne sont pas encore tous parfaitement élucidés. Plusieurs équipes de recherche travaillent à une meilleure compréhension du fonctionnement de cette muqueuse, et plus particulièrement de son mode de régénération (108-113). Il est actuellement reconnu qu'il existe plusieurs assises de cellules basales, la plus profonde correspondant aux « horizontal basal cells » (HBCs) qui seraient les cellules souches dormantes et ne seraient stimulées qu'en cas d'important dommage tissulaire. Viennent ensuite les « globose basal cells » (GBCs) qui seraient les progéniteurs multipotents donnant naissance à la couche de neurones olfactifs immatures (Figure 20). Et enfin les neurones olfactifs matures et les cellules épithéliales de soutien.

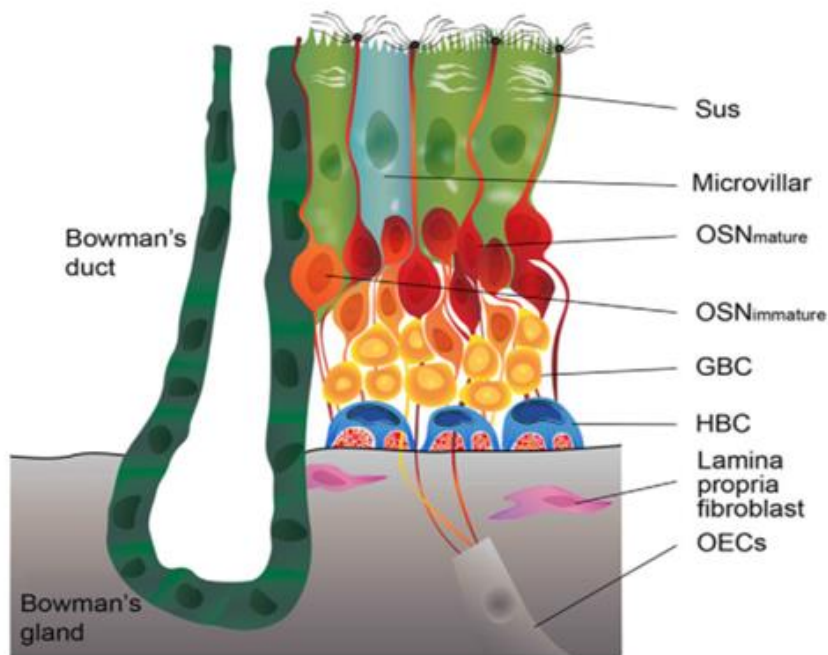


Figure 20 : représentation schématique des principaux constituants cellulaires de l'épithélium olfactif selon Schwob et al (114)

2. Renouveaulement et différenciation

L'épithélium olfactif intéresse de plus en plus la communauté scientifique ces dernières années, particulièrement pour sa capacité singulière à pouvoir renouveler ses neurones tout au long de la vie. L'équipe de James E. Schwob a beaucoup publié sur l'épithélium olfactif (108, 110, 111, 114-117). D'après ses travaux, les GBCs seraient les cellules souches « actives » permettant de renouveler les pertes cellulaires physiologiques, et particulièrement les neurones. En condition physiologique, les GBCs donnent naissance aux progéniteurs neuronaux qui se différencient progressivement en neurones olfactifs matures (Figure 21). Les HBCs, sont complexes, elles expriment de nombreuses caractéristiques morphologiques et moléculaires communes avec les cellules basales d'autres épithélium, y compris de l'épithélium respiratoire (111). Elles expriment en particulier les cytokératines 5 et 14, ICAM-1, certaines intégrines, le récepteur à l'EGF et le facteur de transcription P63. En conditions physiologiques ces cellules sont quiescentes (Ki67 négatives) contrairement aux cellules souches de l'épiderme, des annexes ou de l'épithélium respiratoire. Les HBCs ne deviendraient actives qu'en condition d'important dommages tissulaires.

Pour étudier le renouvellement de l'épithélium olfactif, un modèle murin de dommage olfactif par le méthyl bromure a été généré pour ensuite étudier la régénération post

lésionnelle. Différentes études ont maintenant permis de montrer que suite à un dommage de l'épithélium olfactif, les GBCs sont capables de donner naissance à tout type cellulaire : les neurones olfactifs, les cellules épithéliales de soutien, voire les glandes et canaux excréteurs (Figure 22). Il a même été montré qu'une transplantation de GBCs peut donner naissance à des neurones mais aussi à des cellules non neuronales (115). Dans cette étude, Chen *et al.* montrent que les transplants de GBCs qui ont pris, peuvent donner naissance soit à un mélange de neurones et de cellules épithéliales, soit uniquement à des neurones, soit uniquement à des cellules non neuronales. Les voies de différenciation empruntées par les GBCs sont notamment sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs de transcription. Parmi les principaux facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones olfactifs matures, on trouve notamment *ASCL1*, *NEUROD1* et *NEUROG1*. Les GBCs expriment des niveaux élevés de *SOX2* et *PAX6* (117). Il semble que l'expression de *KIT* soit également primordiale pour maintenir les GBCs en état de progéniteur (111, 118) (Figure 23).

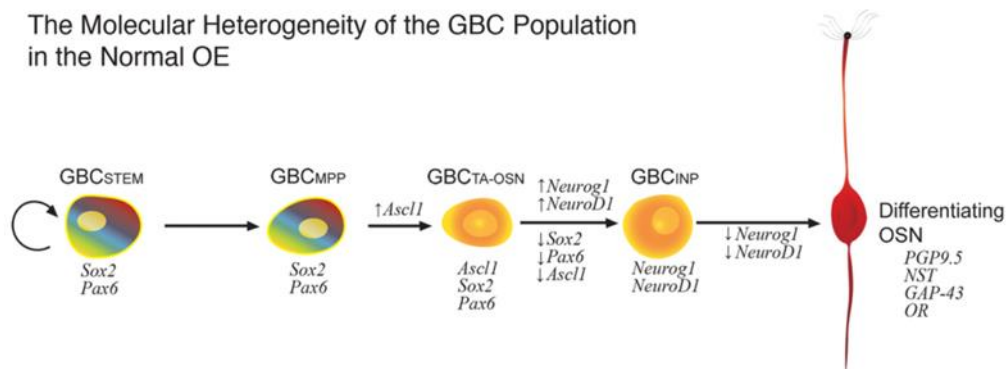


Figure 21 : Diagramme illustrant l'hétérogénéité des GBCs dans l'épithélium olfactif normal et la progression depuis la cellule souche jusqu'au neurone olfactif mature, selon James E. Schwob (114)

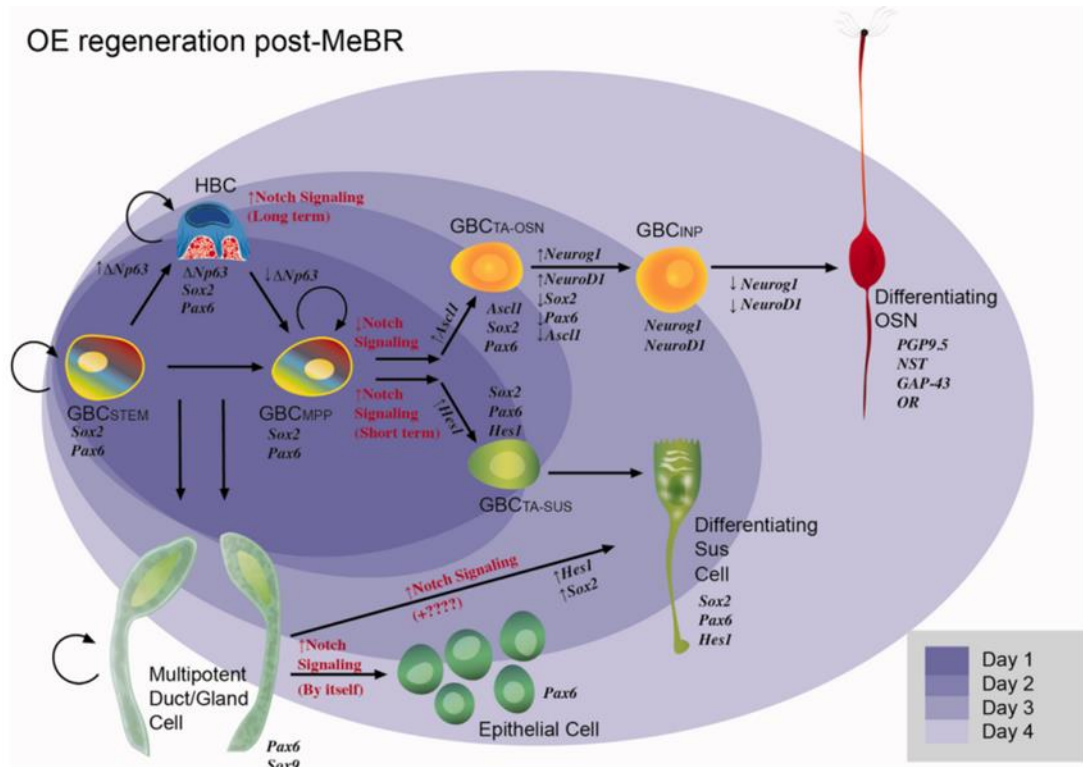


Figure 22 : Diagramme illustrant le processus d'épithéliopoïèse dans l'épithélium olfactif pendant la récupération post lésionnelle suite à une exposition au méthyl bromide selon James E. Schwob (114)

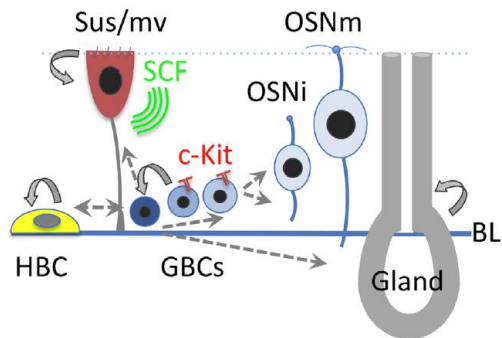


Figure 23 : Diagramme illustrant l'épithélium olfactif adulte et le rôle potentiel des progéniteurs C-KIT positifs dans le maintien neuroépithélial selon Goldstein et al. [J Comp Neurol 2015; 523 :15-31] (118).

De façon intéressante il semble que l'expression d'*ASCL1* soit un évènement précoce dans la voie de différenciation neuronale et qu'elle soit cruciale pour engager les GBCs dans la voie de différenciation vers les neurones olfactif, en amont de *NEUROD1* et *NEUROG1*. L'équipe de Schwob a également rapporté, qu'à l'inverse, l'activation de *NOTCH* dans les

progéniteurs multipotents, en amont d'ASCL1, était responsable de l'expression d'*HES* et de la répression d'*ASCL1*, faisant basculer le progéniteur vers une voie de différenciation non-neuronale (114). Plusieurs équipes ont rapporté l'importance des voies Notch, Wnt et Hedgehog dans la neurogenèse en générale et dans la neurogenèse olfactive en particulier (114, 116). La voie Notch serait plutôt responsable d'une différenciation vers la voie non-neuronale, les cellules sustentaculaires exprimant plutôt NOTCH2. La down-régulation de la voie Notch1-HES1 favoriserait la formation de neurones plutôt que de cellules non-neuronales, son activation favoriserait à l'inverse la formation des cellules non-neuronales de l'épithélium olfactif.

Une étude dédiée à la compréhension des cellules souches olfactives et leur implication dans le renouvellement de l'épithélium olfactif a été très récemment publiée par Fletcher et al. (119). Dans cette étude, le profil transcriptionnel des différentes cellules de renouvellement olfactif a été étudié par une approche de single-cell RNASeq. Le séquençage de 845 cellules provenant d'épithélium olfactif murin a permis de mettre en évidence la présence de 13 populations différentes, provenant toutes des Horizontal basal cells (HBCs). Les données de cette étude confirment notamment ce qui a été montré précédemment par l'équipe de Schwob, à savoir que les mêmes cellules souches peuvent prendre 2 voies de différenciation différentes : l'une correspondant à la lignée neurale au sens large qui donnera naissance aux neurones olfactifs et aux cellules microvilleuses, l'autre correspond à la lignée sustentaculaire. Ce qui a été montré de nouveau grâce à cette approche de single-cell est que l'activation de la voie Wnt est nécessaire et suffisante pour pousser une cellule souche vers la lignée neuronale. Il a également été montré que la lignée sustentaculaire naissait plutôt d'un processus de transdifférenciation à partir de HBC activées, les cellules proliférant activement correspondant plutôt aux GBCs (lignée neuronale) (Figure 24). L'originalité de cette étude a été de montrer les modifications progressives des profils d'expression à mesure que les progéniteurs se différencient, avec notamment une coordination du réseau de facteurs de transcription.

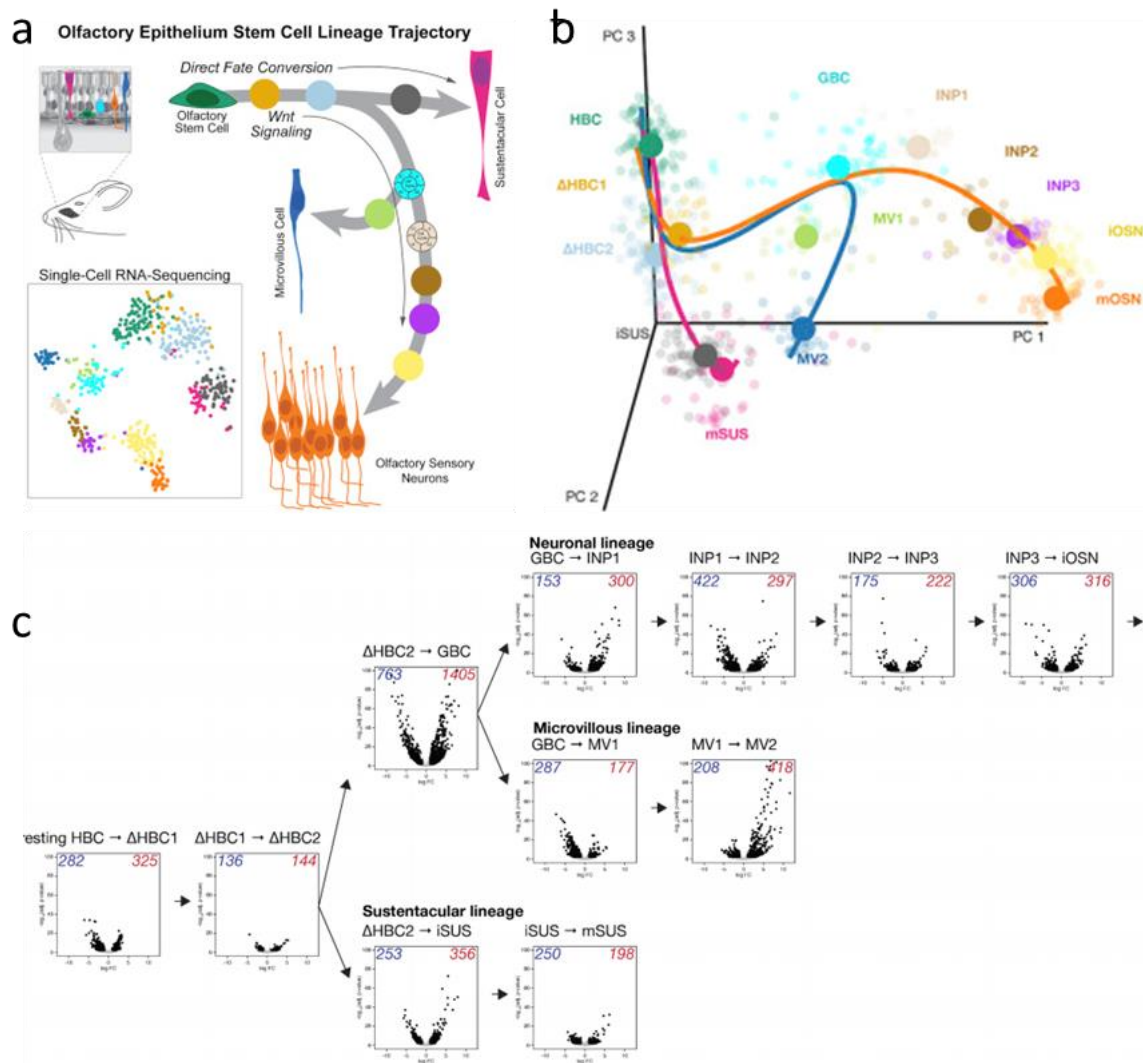


Figure 24 : (a) Graphique représentant schématiquement les trajectoires des lignées de cellules souches olfactives, (b) points de branchement dans les trajectoires de cellules souches olfactives, (c) Volcano plot représentant une carte des trajectoires des différentes lignées issues des cellules souches olfactives. Issu de: Fletcher et al. (119)

C. Les tumeurs naso-sinusiennes

Étant donné la diversité histologique observée dans le tractus naso-sinusal, il n'est pas surprenant qu'une importante variété de tumeurs puisse s'y développer. La dernière classification OMS de 2017 (120) recense 40 types tumoraux différents regroupés en 11 catégories : les carcinomes, les tératocarcinosarcomes, les papillomes, les lésions épithéliales respiratoires, les tumeurs des glandes salivaires, les tumeurs malignes des tissus mous, les

tumeurs des tissus mous borderline ou de bas grade, les tumeurs bénignes des tissus mous, les tumeurs « autres », les tumeurs hémato-lymphoïdes et enfin les tumeurs neuroectodermiques et mélanotiques qui comprennent notamment les neuroblastomes olfactifs (Figure 25).

Parmi les tumeurs malignes, on trouve notamment des carcinomes, des sarcomes, des lymphomes et des tumeurs neuro-ectodermiques/mélaniques. Les entités qui vont nous intéresser le plus, dans le cadre des diagnostics différentiels des neuroblastomes olfactifs, sont les carcinomes neuroendocrines naso-sinusiens (SNEC), les carcinomes naso-sinusiens indifférenciés (SNUC), les rhabdomyosarcomes, les tumeurs neuro-ectodermiques primitives (PNET) avec en particulier le sarcome d’Ewing, et enfin les mélanomes muqueux. Ces entités seront plus amplement développées dans le chapitre concernant les diagnostics différentiels de NBO.

Carcinomas		Borderline/low-grade malignant soft tissue tumours	
Keratinizing squamous cell carcinoma	8071/3	Desmoid-type fibromatosis	8821/1
Non-keratinizing squamous cell carcinoma	8072/3	Sinonasal glomangiopericytoma	9150/1
Spindle cell squamous cell carcinoma	8074/3	Solitary fibrous tumour	8815/1
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3	Epithelioid haemangi endothelioma	9133/3
Sinonasal undifferentiated carcinoma	8020/3		
NUT carcinoma	8023/3*	Benign soft tissue tumours	
Neuroendocrine carcinomas		Leiomyoma	8890/0
Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3	Haemangioma	9120/0
Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3	Schwannoma	9560/0
Adenocarcinomas		Neurofibroma	9540/0
Intestinal-type adenocarcinoma	8144/3		
Non-intestinal-type adenocarcinoma	8140/3	Other tumours	
Teratocarcinosarcoma	9081/3	Meningioma	9530/0
Sinonasal papillomas		Sinonasal ameloblastoma	9310/0
Sinonasal papilloma, inverted type	8121/1	Chondromesenchymal hamartoma	
Sinonasal papilloma, oncocytic type	8121/1	Haematolymphoid tumours	
Sinonasal papilloma, exophytic type	8121/0	Extranodal NK/T-cell lymphoma	9719/3
		Extraosseous plasmacytoma	9734/3
Respiratory epithelial lesions		Neuroectodermal/melanocytic tumours	
Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma		Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumour	9364/3
Seromucinous hamartoma		Olfactory neuroblastoma	9522/3
Salivary gland tumours		Mucosal melanoma	8720/3
Pleomorphic adenoma	8940/0		
Malignant soft tissue tumours			
Fibrosarcoma	8810/3		
Undifferentiated pleomorphic sarcoma	8802/3		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyosarcoma, NOS	8900/3		
Embryonal rhabdomyosarcoma	8910/3		
Alveolar rhabdomyosarcoma	8920/3		
Pleomorphic rhabdomyosarcoma, adult type	8901/3		
Spindle cell rhabdomyosarcoma	8912/3		
Angiosarcoma	9120/3		
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3		
Biphenotypic sinonasal sarcoma	9045/3*		
Synovial sarcoma	9040/3		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) [776A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.
*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O.

Figure 25 : classification OMS 2017 des tumeurs naso-sinusiennes

IX. Les neuroblastomes olfactifs

A. Epidémiologie et historique

Les NBO sont des tumeurs naso-sinusiennes rares, ne représentant qu'environ 3% de l'ensemble des tumeurs naso-sinusiennes. Leur incidence annuelle évaluée à 0,4 par million de personnes (121). Environ 1200 cas ont été décrits (122, 123) depuis leur découverte. Une tendance à l'augmentation de l'incidence a été décrite au cours des 40 dernières années (124) mais il pourrait en fait s'agir d'un biais lié à l'amélioration des techniques de détection de la tumeur. L'âge des patients atteints est très variable, pouvant s'étendre de 2 à 90 ans. Une distribution bimodale de l'âge de cette maladie avait initialement été rapportée, mais les données les plus récentes sont plutôt en faveur d'une distribution égale parmi les âges avec un pic vers les 5^e et 6^e décades. Un sexe ratio d'1,2 homme pour 1 femme est également rapporté. Aucune prédisposition ethnique ou familiale n'a été mise en évidence.

Depuis leur découverte en 1924 par Berger et Luc (1), la compréhension de leur biologie s'est lentement améliorée. Baptisée au départ « esthésioneuroépithéliome olfactif », cette tumeur est maintenant appelée neuroblastome olfactif ou esthésioneuroblastome.

Les NBO se développeraient à partir des cellules basales de réserve de l'épithélium olfactif. Les origines évoquées pour cette tumeur ont été multiples : l'organe voméro-nasal de Jacobson, le ganglion sphéno palatin, la placode olfactive ectodermique, le ganglion de Loci, et le ganglion autonome de la muqueuse nasale (122). La présence de neurofilaments au sein de la tumeur suggère une origine neuronale ou de la crête neurale. Le lien entre épithélium olfactif et NBO a notamment été étayé par l'équipe de Carney *et al.* en 1995 grâce à la mise en évidence de l'expression d'ASCL1 dans 6 NBO (125). Ils ont alors apporté des arguments en faveur de l'hypothèse que les NBO se développeraient à partir des neurones olfactifs immatures.

B. Localisation

La distribution anatomique des NBO est confinée à la lame criblée de l'éthmoïde, le cornet supérieur et la moitié supérieure du septum nasal. Des localisations ectopiques à l'intérieur des sinus para-nasaux ont été rapportées de manière excessivement rare (sauf

récidive locale) et le diagnostic de NBO sans implication de la lame criblée doit rester un diagnostic d'exclusion (126).

C. Présentation clinique

Il n'y a pas de symptôme spécifique du NBO et la présentation est le plus souvent similaire aux autres tumeurs malignes rhinosinusiennes. Les symptômes principaux sont habituellement l'obstruction nasale unilatérale (70%) et l'épistaxis (46%) (123, 127). Les troubles de l'odorat sont peu fréquents, n'apparaissant que chez moins de 5% des patients (126). Des syndromes paranéoplasiques (corticotrope ou SIADH (Sécrétion inapproprié d'hormone antidiurétique)) sont détectés chez 2% des patients. Ces signes aspécifiques retardent souvent le diagnostic, qui est porté en moyenne 6 mois après le début des symptômes.

D. Diagnostic

1. Examen clinique

A l'endoscopie nasale, l'aspect tumoral est celui d'une masse polypoïde molle, à surface lisse, richement vascularisée rouge ou grise (Figure 26).

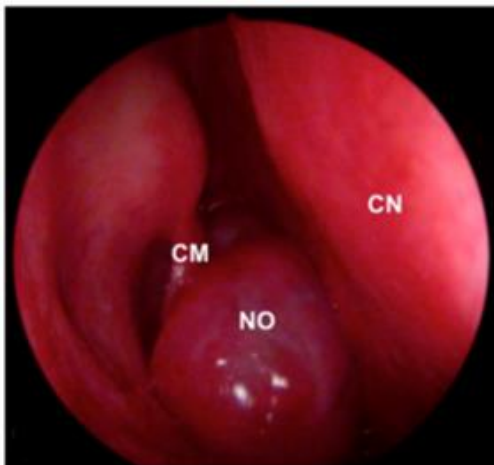


Figure 26 : Aspect macroscopique de NBO (base de données du Pr Herman, Lariboisière-APHP) à l'examen endonasal. NO: neuroblastome olfactif ; CN: cloison nasale ; CM: cornet moyen.

La tumeur siège classiquement au niveau de la fente olfactive mais elle peut s'étendre rapidement à la lame criblée, à l'orbite, à la fosse cérébrale antérieure, au sinus sphénoïdal. Une extension durale et cérébrale est également possible pour les tumeurs volumineuses. Dans 5 à 10% des cas, des adénopathies sont présentes lors du diagnostic initial (128, 129). De la même manière, peu de NBO présentent d'emblée des métastases à distance : seulement 7% au diagnostic initial puis 25% au cours du suivi (130, 131).

2. Imagerie

Comme pour les autres tumeurs des fosses nasales et sinus, le bilan d'extension local repose essentiellement sur l'association de la tomодensitométrie (TDM) en coupes millimétriques sans et avec injection de produit de contraste et de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), avec au minimum des séquences pondérées T1, T2, et T1 avec injection de gadolinium (Figure 27). Il n'y a pas de caractéristiques spécifiques en TDM : le NBO se présente comme une masse tissulaire le plus souvent appendue à la partie haute de la fosse nasale, éventuellement associée à un remodelage ou à une érosion de la lame criblée, du toit de l'ethmoïde, ou de la lame papyracée (132). Des calcifications intra-tumorales peuvent également être observées, notamment dans les cas bien différenciés (133).

L'IRM permet de différencier la tumeur des rétentions sinusiennes et d'apprécier l'envahissement des tissus mous (en particulier de l'orbite, de la dure-mère, des bandelettes olfactives et du parenchyme cérébral) (132). La lésion apparaît habituellement hypointense en séquence pondérée T1, avec un rehaussement net après injection de gadolinium (hors zones de nécroses ou d'hémorragie intratumorale). La lésion est hypointense en séquence pondérée T2 contrastant ainsi avec les rétentions sinusiennes, hyperintenses. Les séquences pondérées T2 avec saturation du signal de la graisse (FAT SAT) sont utiles pour différencier la tumeur de la graisse orbitaire.

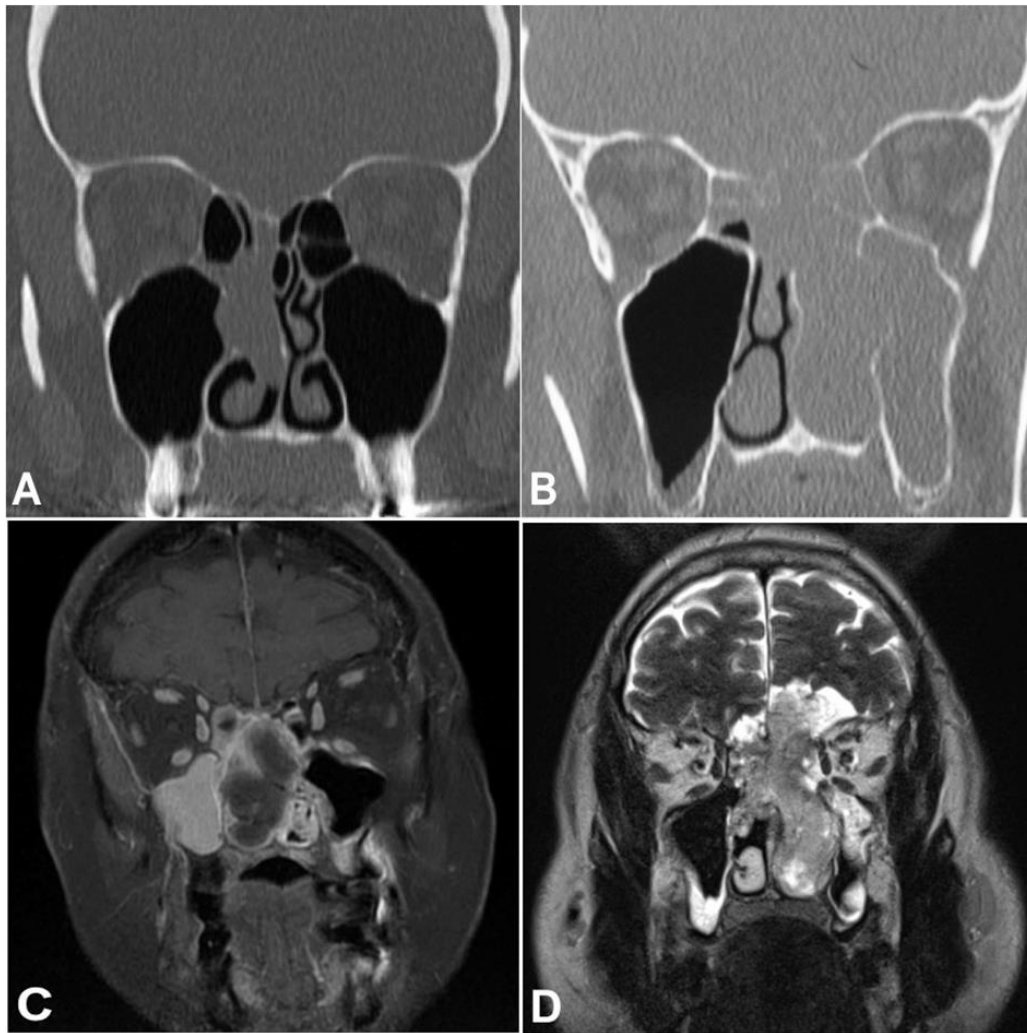


Figure 27 : Images radiologiques de NBO (base de données du Pr Herman, Lariboisière-APHP). (A) TDM en coupe coronale montrant un NBO sans lyse de la lame criblée. (B) TDM en coupe coronale montrant un NBO avec lyse de la lame criblée. (C) IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium en coupe coronale montrant un NBO sans envahissement intradural. (D) TDM en coupe coronale montrant un NBO avec envahissement intradural.

3. Histologie

a) Macroscopie

L'aspect macroscopique est en général celui d'une masse polypoïde, souple, à surface luisante, de couleur rougeâtre, respectant l'épithélium de surface. Cette masse est hypervascularisée. La taille peut varier de moins d'un centimètre à plusieurs centimètres, envahissant la cavité nasale et la cavité intracrânienne.

b) Microscopie

L'aspect microscopique est variable selon le degré de différenciation de la tumeur. Les formes bien différenciées (Figure 28) de bas grade forment le plus souvent des nids ou lobules sous-muqueux, où parfois les cellules tumorales s'organisent en files indiennes au sein d'un stroma fibrillaire contenant de nombreux bouquets vasculaire. Dans ces formes bien différenciées, au sein des lobules tumoraux, peuvent s'observer des rosettes neuroïdes (de type Homer-Wright), dans lesquelles les cellules tumorales se disposent de façon palissadique autour d'une pseudo-lumière contenant un matériel fibrillaire. Les cellules tumorales sont de taille moyenne, d'aspect monomorphe, avec un cytoplasme éosinophile modérément abondant et un noyau arrondi, à chromatine fine d'aspect « poivre et sel » et un nucléole souvent à peine visible. Les mitoses y sont peu fréquentes. La nécrose est absente de ces formes de bas grade. Les lobules tumoraux sont bordés sur leur versant externe d'une assise de cellules endothéliiformes, parfois appelées de type « sustentaculaire » (par analogie aux tumeurs de type paragangliome) faisant l'interface entre la tumeur et le stroma. Ces cellules sont mieux visibles par étude immunohistochimique avec l'anticorps anti protéine S100.

Les NBO de haut grade (Figure 29), moins bien différenciés, ont une architecture souvent moins bien lobulée. Les cellules tumorales y sont plus pléomorphes, avec un noyau plus gros au sein duquel un nucléole est souvent visible. Les rosettes neuroïdes sont rares ou absentes, mais on peut observer des rosettes épithéliales, contenant une lumière centrale véritable (rosette de type Homer-Wright). L'activité mitotique y est plus marquée et de la nécrose est fréquemment observée. Les cellules S100 positives à l'interface tumeur-stroma sont plus rarement observées, voire absentes, dans ces formes de haut grade.

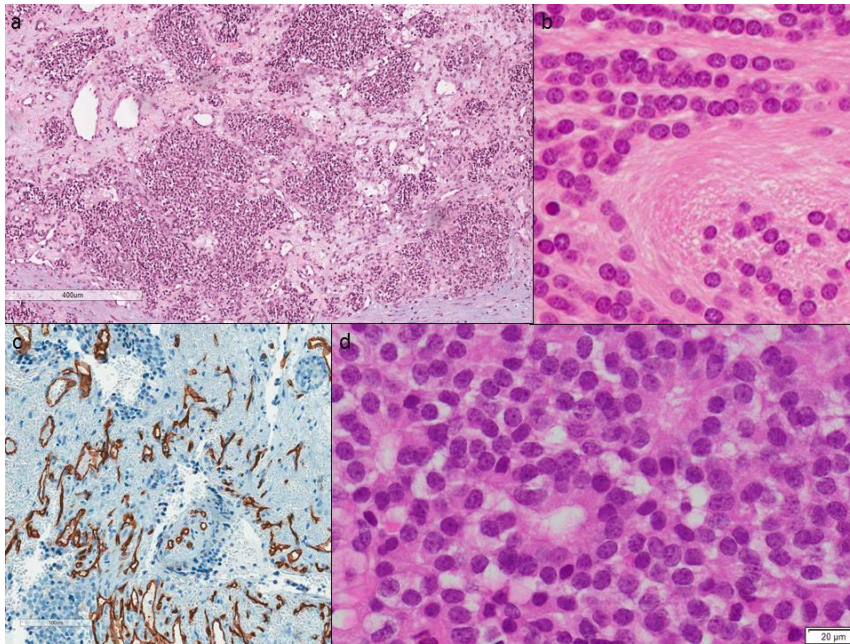


Figure 28 : Colorations par l'HES et IHC CD34 montrant des exemples de NBO bien différenciés avec une architecture lobulée (a) et des cellules de petites tailles formant des files indiennes au sein d'un stroma fibrillaire (b), présence de bouquets vasculaires (c) et présence de rosettes neuroïdes (d).

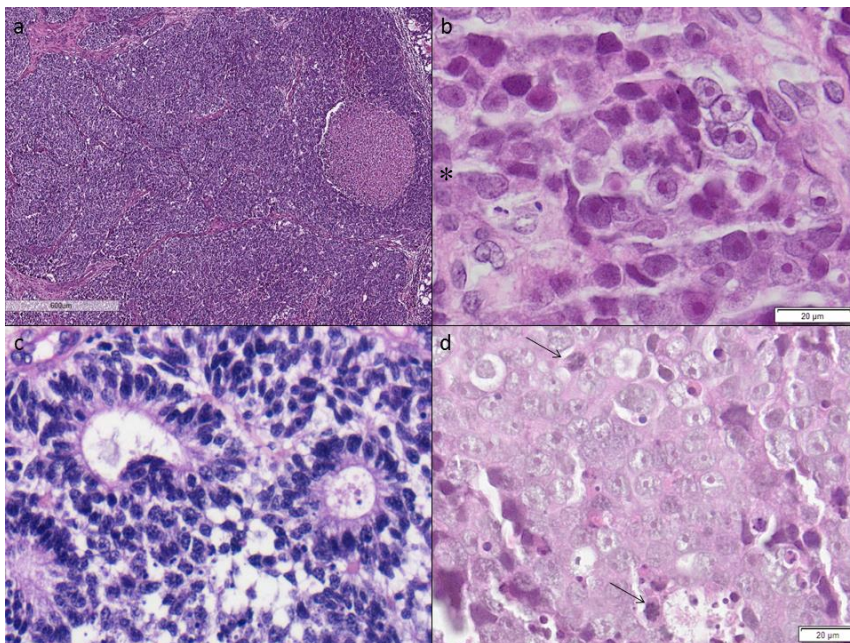


Figure 29 : exemples de NBOs de haut grade, moins bien différenciés. Coloration par l'HES. (a) lobulation peu marquée et présence de nécrose (*), (b) cellules de plus grande taille présentant un nucléole bien visible, (c) des rosettes de type épithélial et (d) activité mitotique marquée.

Le système de grading utilisé de façon universelle pour ces tumeurs est le grade de Hyams, décrit en 1988, et toujours utilisé en l'état (Table 1). Ce grade classe les NBO en 4 grades, en fonction de leur degré de différenciation. Ce dernier est déterminé par des critères purement morphologiques : l'architecture globale, l'activité mitotique, le polymorphisme nucléaire, la présence matrice fibrillaire, de rosettes et de nécrose. En fonction de l'abondance relative de ces paramètres et du degré de lobulation, on classera la tumeur grade I, II, III ou IV allant de la forme la mieux différenciée vers la forme la moins bien différenciée. Selon le grade de Hyams, les formes de grade I-II ont une architecture bien lobulée, elles sont faites de cellules de taille moyenne présentant peu d'atypies cyto-nucléaires, disposées en files indiennes ou en lobules au sein d'un stroma souvent fibrillaire contenant de nombreux vaisseaux qui se regroupent en bouquets vasculaires. Les cellules tumorales s'agencent parfois en rosettes neuroïdes de type Homer Wright, mais les rosettes épithéliales de type Flexner-Winter Steiner sont en règle générale absentes. On trouve souvent des calcifications dans ces formes peu agressives. Les mitoses sont rares et la nécrose absente. Dans les formes de haut grade (grades III et IV), les cellules tumorales sont moins régulières, avec souvent des noyaux irréguliers. La lobulation est moins évidente que dans les bas grades et les cellules tumorales ne s'agencent pas en file indienne. Le stroma fibrillaire est de moins en moins visible à mesure que la tumeur perd en différenciation. Les rosettes que l'on trouvera dans ces formes agressives sont de type épithélial (Flexner Winter Steiner) plutôt que de type neuroïde. Il n'est pas observé de calcifications. L'activité mitotique est beaucoup plus marquée et la nécrose est plus fréquente.

GRADE	I	II	III	IV
Lobulation	++	++	+/-	+/-
Noyaux réguliers	++	+/-	+/-	-
Mitoses	-	+	++	++
Calcifications	+/-	+/-	-	-
Nécrose	-	-	+/-	++
Fond fibrillaire	+++	++	+/-	-
Rosettes Homer Wright	+/-	+/-	-	-
Rosettes Flexner Winter- Steiner	-	-	++	-

Table 1 : Grade histologique de Hyams

Etant purement morphologique, ce système de grading est soumis à des variabilités inter-observateurs. Les grades III étant parfois difficiles à différencier des grades II d'un côté et des grades IV de l'autre.

4. Profil immunohistochimique

Les cellules tumorales ont un phénotype neuro-endocrine (Figure 30), exprimant la synaptophysine, la chromogranine et N-CAM (CD56). Le marquage par les anticorps anti chromogranine et synaptophysine doit être cytoplasmique et d'aspect granuleux. Le marquage obtenu avec l'anticorps CD56 doit être membranaire. Dans environ 1/3 des cas (126) l'expression de cytokératines peut être observée, en générale de façon focale. Les cellules de type sustentaculaire situées à l'interface tumeur-stroma expriment la protéine S100 (Figure 31) et possiblement la GFAP (glial fibrillaire acid protein). L'expression nucléaire de la calrétinine a été décrite (134), mais n'est pas spécifique. L'index de prolifération Ki-67 et l'expression de BCL2 augmentent avec le grade.

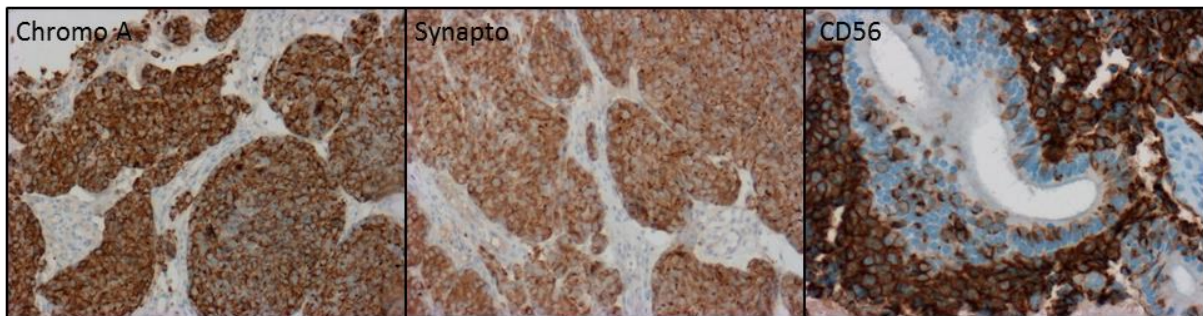


Figure 30 : exemple de l'aspect habituellement observé pour l'expression des marqueurs neuroendocrine : chromogranine A (ChromoA, marquage cytoplasmique granuleux), synaptophysine (synapto, marquage cytoplasmique granuleux), et NCAM (CD56, marquage membranaire).

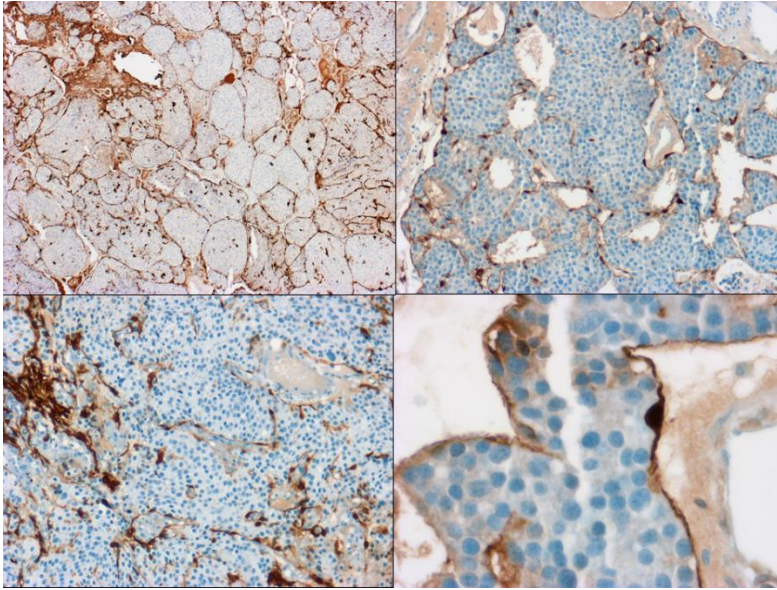


Figure 31 : exemple de différents aspects de cellules S100 + à l'interface tumeur-stroma (en position sustentaculaire).

Les NBO de haut grade ont parfois un profil immunohistochimique atypique, associant l'expression diffuse de cytokératine avec l'expression de marqueurs NE et la persistance de rares cellules S100 à l'interface tumeur-stroma (Figure 32).

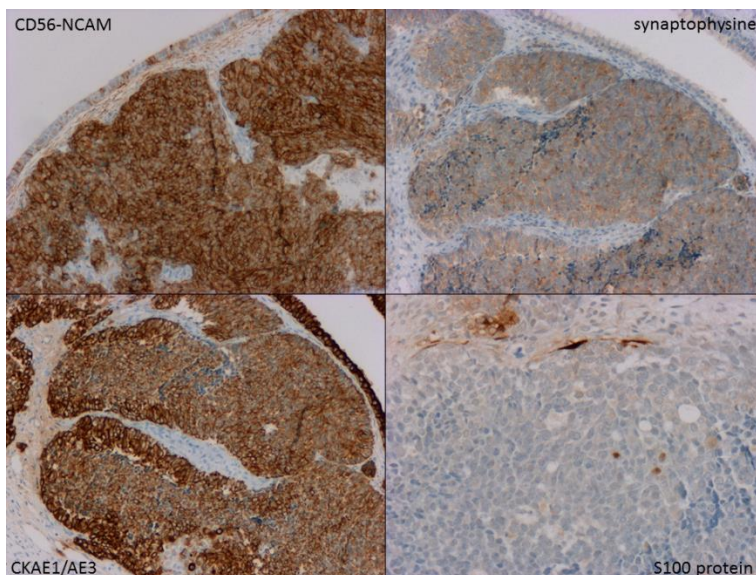


Figure 32 : exemple d'un NBO de haut grade présentant une forte et diffuse expression des marqueurs NE, associée à une expression diffuse de CKAE1/AE3 et à la persistance de rares cellules S100 à l'interface tumeur-stroma.

Les marqueurs négatifs qui sont utiles pour éliminer des diagnostics différentiels sont le CD45RB, le CD99, la P63 et FLI1.

5. Diagnostics différentiels

Les formes de bas grade posent rarement des problèmes diagnostiques pour les pathologistes habitués aux pathologies ORL. En revanche les formes peu différenciées représentent parfois un véritable challenge diagnostique. Les principales entités auxquelles les NBO peu différenciés peuvent ressembler sont les rhabdomyosarcomes, les sarcomes d'Ewing, les mélanomes de forme non pigmentée, les lymphomes, les carcinomes neuro-endocrines naso-sinusiens (SNEC) et les carcinomes indifférenciés naso-sinusiens (SNUC).

Les rhabdomyosarcomes de forme embryonnaire sont les plus fréquents dans les fosses nasales et partagent certains aspects morphologiques avec les NBO, notamment le fait d'être composé de petites cellules rondes. Les rhabdomyosarcomes seront identifiés grâce à leur expression de marqueurs musculaires striés tels que la desmine et la myogénine qui ne seront pas exprimées dans les NBO.

Les sarcomes d'Ewing sont aussi des tumeurs à petites cellules rondes. Ils sont rares dans les localisations ORL et sont plus fréquents chez les enfants et les jeunes adultes. Néanmoins, les NBO pouvant survenir à tout âge, la question du diagnostic différentiel peut parfois se poser. Pour trancher entre les diagnostics de NBO et de sarcomes d'Ewing, le CD99 peut être utile car il est en général positif dans les Ewing et négatifs dans les NBO mais cette expression n'est pas spécifique. Par contre les sarcomes d'Ewing présentent une translocation spécifique, impliquant le plus souvent *EWSR1* avec *FLI1* qui peut être identifiée par hybridation in situ (126).

Les mélanomes peuvent être très trompeurs, notamment dans les formes où les cellules tumorales ne sont pas pigmentées. Ces tumeurs seront identifiables par leur expression de S100, HMB45 et/ou de Melan A qui n'est pas observé dans les NBO.

Les lymphomes seront facilement écartés si l'on recherche l'expression de marqueurs hématopoïétiques tels que le CD45 qui sera positif dans un lymphome et négatif dans un NBO.

Les SNEC et les SNUC sont les diagnostics différentiels les plus difficiles à éliminer. En effet, les SNEC se développent préférentiellement au niveau de l'éthmoïde (126), et surtout ils ont des caractéristiques communes avec les NBO, en particulier, ils expriment par définition les marqueurs neuro-endocrines (NE). Ce qui les différencie des NBO c'est principalement l'absence de cellules S100 à l'interface tumeur-stroma, et l'expression diffuse des cytokératines. Mais, étant donné que certains NBO expriment également les marqueurs NE et qu'1/3 des cas expriment les cytokératines la question est parfois délicate. Le plus souvent les cellules S100 sont moins abondantes dans les formes de HG et l'expression des kératines, même s'il elle n'est en règle générale pas diffuse, peut être trompeuse. Selon l'OMS 2017, l'expression d'ASCL1 (qui est un « master gene » pour la différenciation NE) serait également intéressante à étudier car il serait plus exprimé dans les SNEC que dans les NBO (126).

En ce qui concerne les SNUC, il s'agit d'un diagnostic d'exclusion. Selon la définition de l'OMS 2017 : il s'agit d'un carcinome du tractus naso-sinusal ne présentant aucun signe de différenciation, que ce soit malpighiennes, glandulaire ou autre. L'étiologie de ces tumeurs n'est pas connue.

E. Classification

Il existe 4 classifications pour le NBO : 3 d'entre elles sont fondées sur l'analyse clinique et radiologique des extensions tumorales, et la dernière repose sur des critères histologiques (classification de Hyams). Ces 4 classifications ont été décrites dans l'ordre chronologique suivant :

La classification de Kadish a été la première à paraître en 1976 pour rendre compte de l'extension tumorale, évaluée sur des critères cliniques et scannographiques (135). Modifiée en 1993 par Morita qui ajouta le grade D lors d'une atteinte métastatique (Table 2) (136), elle est fréquemment utilisée même si certains détracteurs la jugent insuffisante (123, 127, 137).

Puis la classification de Hyams a été créée en 1988 (138). Cette dernière se base sur des critères morphologiques et varie de I à IV (Tableau 1). Habituellement, les tumeurs de bas grade correspondent aux grades I et II tandis que les tumeurs de haut grade sont celles de grade III et IV.

Par la suite, la classification TNM élaborée par Dulguerov en 1992 (127) a pour but d'améliorer le grading tumoral en incluant la dissémination ganglionnaire et l'extension à distance (Figure 33, Table 3).

Enfin la classification TNM de l'UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) de 2002 est parfois utilisée pour classer les NBO (139) (Table 4).

A	Tumeur limitée à la cavité nasale
B	Cavité nasale et sinus
C	Extension au-delà vers l'orbite et l'endocrâne
D	Métastases

Table 2 : Classification de Kadish modifiée

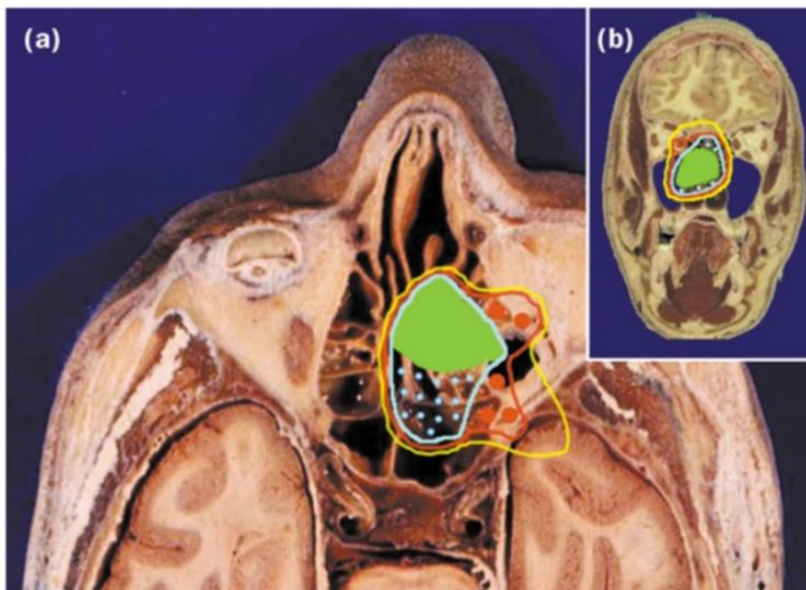


Figure 33 : Représentation graphique de la classification de Dulguerov (127), en coupes axiale (a) et coronale (b) de sujets d'anatomie.

Le stade T1 est représenté en vert, le stade T2 en bleu, T3 en rouge, et T4 en jaune.

Stade	Extension
T1	Limitée à la cavité nasale excluant le sphénoïde
T2	Limitée à la cavité nasale étendue au sphénoïde
T3	Etendue à l'orbite et à l'étage antérieur sans envahissement de la dure mère
T4	Etendue au parenchyme cérébral
N0	Pas de métastases ganglionnaires cervicales
N1	Métastases ganglionnaires cervicales
M0	Pas de métastases à distance
M1	Métastases à distance

Table 3 : Classification TNM de Dulguerov

Stade	Extension
T1	Limitée à une cellule ethmoïdale, avec ou sans lyse osseuse
T2	Limitée à un site naso-ethmoïdal voisin, avec ou sans lyse osseuse
T3	Etendue à la lame papyracée, au plancher de l'orbite, au sinus maxillaire, au palais ou à la lame criblée
T4a	Etendue à l'orbite antérieure, à l'étage antérieur de la base du crâne (extension minimale), au sinus frontal ou sphénoïde, à l'apophyse ptérygoïde ou à la peau
T4b	Etendue au toit de l'orbite, à la méninge ou à l'encéphale, à l'étage moyen de la base du crâne, au clivus, au naso-pharynx, aux nerfs crâniens (autre que le V2)
N0	Pas de métastase ganglionnaire cervicale
N1	Présence d'une adénopathie homolatérale de diamètre inférieur ou égal à 3 centimètres
N2a	Présence d'une adénopathie homolatérale de diamètre entre 3 et 6 cm
N2b	Présence d'adénopathies homolatérales multiples de diamètre inférieur à 6 cm
N2c	Présence d'adénopathies controlatérales ou bilatérales de diamètre inférieur à 6 cm
N3	Présence d'une adénopathie de diamètre supérieur à 6 centimètres
M0	Pas de métastases à distance
M1	Métastases à distance

Table 4 : Classification TNM UICC 2002 des tumeurs des fosses nasales et de l'ethmoïde

F. Histoire naturelle des neuroblastomes olfactifs : état des connaissances

Du fait de leur rareté, les connaissances moléculaires sur les NBO sont restées très limitées. Les principales données moléculaires disponibles portent sur le profil cytogénétique, les gains et pertes chromosomiques (4, 140-143). Les NBO ont un caryotype complexe avec de multiples gains et pertes de matériel répartis sur de nombreux chromosomes, mais toutes les anomalies rapportées ne sont pas cohérentes entre elles.

Il n'y a actuellement aucune donnée moléculaire concernant les NBO dans les bases de données publiques de type TCGA ou cBioPortal. Quelques études se sont intéressées au séquençage de l'ADN (4, 144) et ont notamment mis en évidence des mutations de *TP53* et de *MYC* dans un cas de NBO de haut grade. L'équipe de Gay *et al* a récemment rapporté une étude moléculaire ciblée de 265 gènes dans une série de 41 NBO analysés par le test commercial de « Foundation medicine ». Dans cette étude aucune mutation récurrente n'a été mise en évidence, mais des mutations de *ARID1A*, *ARID2*, *SMARCA4*, *CDKN2A*, *CDKN2C*, *PIK3CA*, *TP53*, *TET2*, *IDH2*, *NRAS* et *CTNNB1* ont été observées (2). Des amplifications *PDGFRB*, *FGFR4* ou *MDM4* ont également été trouvées. Une autre équipe a récemment complété ce travail par un séquençage ciblé de 108 gènes dans 20 NBO. Aucune mutation récurrente n'a été mise en évidence non plus, mais dans cette étude rapporte des amplifications récurrentes des gènes *CCND1* et *FGFR3*, et des mutations des gènes *TP53*, *CDKN2A* et *CTNNB1* entre autres (145).

Ces données suggèrent que, comme d'autres cancers, les NBO présentent des mutations ciblant le cycle cellulaire, l'organisation de la chromatine ou le métabolisme, mais n'ont pas complètement éclairé le développement de cette maladie. Les voies de signalisation impliquées dans la tumorigenèse des NBO n'ont pas été mises en évidence de façon certaine, bien que certains suggèrent l'importance de la voie sonic hedgehog (146, 147).

G. Stratégies thérapeutiques

Il n'y a pas de consensus quant au traitement du NBO mais actuellement la référence est celle d'une chirurgie d'exérèse macroscopique totale et microscopique avec marges de

sécurité, suivie d'une radiothérapie sur le lit tumoral et les premiers relais ganglionnaires en cas de haut grade histologique (148).

La chirurgie de ces tumeurs consiste en une résection cranio-faciale (CFR) pratiquée classiquement par une technique ouverte transcrânienne et transfaciale. Cependant cette technique comporte des risques de pneumatocèle, d'abcès cérébral, de fuite de LCR, d'œdème cérébral, de méningite, d'accident vasculaire cérébral voire de décès. La technique chirurgicale a évolué il y a une quinzaine d'années avec l'avènement de la voie endoscopique endonasale permettant la pratique de CFR endoscopiquement assistée et de résections endoscopiques seules. La technique endoscopique est celle d'une ethmoïdectomie élargie à la base du crâne où la tumeur est réséquée avec la lame criblée, l'apophyse crista galli, la dure-mère et le bulbe olfactif (Figure 34). En cas d'envahissement du sinus frontal, d'extension massive au parenchyme cérébral ou à l'orbite, ou en cas de lyse du squelette antérieur de la face, la technique endoscopique n'est pas retenue (149).

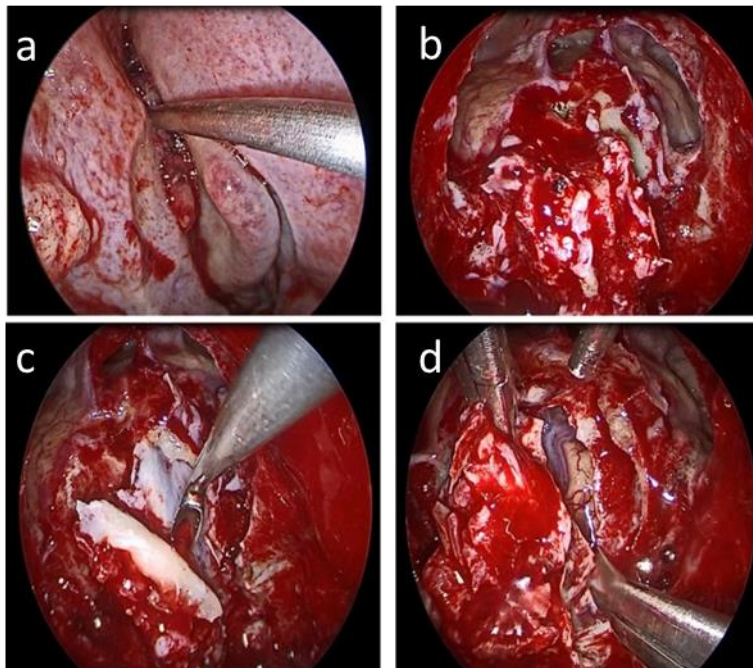


Figure 34 : Synthèse des étapes chirurgicales de l'ethmoïdectomie élargie à la base du crâne par voie endonasale (images du Pr Herman, Lariboisière, APHP)

- (a) visualisation de la tumeur dans la fente olfactive gauche
- (b) exposition de la base du crâne entre les parois internes d'orbite droite et gauche
- (c) résection de la lame criblée gauche et exposition de la dure-mère frontale

(d) ouverture durale avec exposition du gyrus droit du lobe frontal.

La radiothérapie postopératoire vise à limiter le risque de récurrence, d'autant plus que la tumeur n'est pas toujours retirée en monobloc, pouvant rendre les marges chirurgicales incertaines. Les doses varient de 55 Gy à 65 Gy (136, 150, 151).

Dans une méta analyse publiée en 2001 et portant sur 26 études (390 patients), Dulguerov *et al* (123) ont tenté de comparer différents régimes thérapeutiques. La combinaison chirurgie - radiothérapie était associée à une meilleure survie (65%) par rapport à la chirurgie seule (48%), à la combinaison radiothérapie - chimiothérapie (51%) ou au traitement triple chirurgie-radiothérapie-chimiothérapie (47%). Cependant, ces différences n'étaient pas statistiquement significatives, peut-être en raison d'un nombre insuffisant de patients. Par ailleurs, dans une étude rétrospective sur 353 patients traités pour un NBO entre 1973 et 2006 aux Etats-Unis, la radiothérapie adjuvante n'apportait pas de bénéfice en terme de survie par rapport à la chirurgie seule ($p=0.79$) (152)

Pour certains auteurs, un traitement par chirurgie seule ou radiothérapie seule peut se discuter dans certains cas et serait alors à réserver aux petites tumeurs situées sous la lame criblée (131, 153).

Bien que le NBO soit considéré comme une tumeur chimiosensible (154, 155), la place du traitement par chimiothérapie n'est pas déterminée. Un traitement néoadjuvant par chimiothérapie est parfois décidé (153, 155) avec quelques résultats remarquables rapportés (156)

Une chimiothérapie néoadjuvante à base de cisplatine, habituellement associée à de l'étoposide est pratiquée pour les tumeurs au stade avancé, récurrentes ou de haut grade (157-160). D'autres schémas sans platine (irinotecan, docetaxel, doxorubicin, ifosfamide, vincristine) sont également efficaces (161).

Dans leur travail, Montava *et al.* (162) concluent que la chimiothérapie néoadjuvante doit être réalisée en cas de forme tumorale agressive (grade III et IV de Hyams), de métastases cervicales ou à distance, en cas d'invasion intra-durale et de stade T4 de Dulguerov.

Certains ont essayé des traitements anti-angiogéniques (163, 164) avec un certain succès mais ces essais restent anecdotiques. Aucune thérapie ciblée n'est recommandée pour ces tumeurs. Les données moléculaires très récentes ayant mis en évidence quelques anomalies moléculaires ciblables vont peut-être permettre des essais avec des molécules ciblant la voie mTOR, KIT, FGFR3, FGFR4 ou PDGFRB, mais aucune stratégie thérapeutique large ne s'est dessinée pour l'instant.

H. Evolution clinique et pronostic

Le NBO est une tumeur caractérisée par des récurrences locales et régionales fréquentes, survenant parfois au-delà de 10 ans (127, 136, 153) justifiant un suivi clinique et radiologique par IRM, allant de 20 ans de surveillance pour certains auteurs (165) à une surveillance à vie pour d'autres (166). Le taux de récurrences locales varie largement dans la littérature, allant de 16 à 40% (123, 155, 167). Ces variations de résultats pourraient être liées à la présence dans ces études de différents grades tumoraux ou à l'inclusion d'autres types tumoraux de moins bons pronostics. Il semblerait que la récurrence locale soit moins fréquente en cas de combinaison chirurgie-radiothérapie (136, 153, 168). En cas de récurrence locale, un traitement de rattrapage est possible dans 33 à 50% des cas et permet une survie prolongée des patients (169, 170).

La récurrence régionale au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux survient dans environ 20% des cas (123, 171, 172). Selon Banushi *et al.* (173) en 2016, la survenue d'une récurrence ganglionnaire serait un signe annonciateur de récurrence métastatique puisque 50% des patients de l'étude ayant présenté une récurrence ganglionnaire ont développé par la suite des métastases leptoméningées.

Le taux de métastases à distance serait d'environ 25% avec un délai d'apparition variant de 1 à 20 mois (130, 131). Les sites concernés sont multiples : le poumon, le foie, les yeux, la parotide, le système nerveux central, les os, les vertèbres et l'espace épidual.

Le pronostic des NBO est variable : certaines tumeurs sont de bon pronostic avec un faible risque de rechute. D'autres sont agressives, parfois métastatiques d'emblée et ont un plus haut risque de rechute (6-8). La survie globale des patients se situe autour de 70% à 5 ans dans la plupart des études (123, 136, 153).

Les facteurs pronostiques des NBO ne sont pas bien caractérisés, probablement du fait de la rareté de ce type de tumeurs, du manque de grandes séries et de la mauvaise connaissance de la biologie des NBO.

Le grade de Hyams reste sans doute l'outil pronostique le plus utilisé pour prédire l'évolution des tumeurs (5, 174). La plupart des séries récentes ont notamment mis en évidence une association du grade de Hyams avec le pronostic (5, 175-177). Dans une large série portant sur 109 cas de NBO, Van Gompel *et al.* (175) confirment le rôle prépondérant de la classification de Hyams pour prédire l'évolution de ces tumeurs, et ceci particulièrement en association avec la stadification de Kadish. Ils y concluent que l'extension initiale (stade D de Kadish et présence de métastases ganglionnaires) et un grade de Hyams élevé sont les deux principaux facteurs péjoratifs.

La série de 44 patients de l'Institut Gustave Roussy (177) conclut que les NBO de haut grade sont associés au stade T4, à l'extension ganglionnaire, au caractère non résécable de la tumeur et aux métastases leptoméningées, tandis que les tumeurs de bas grade sont associées à des récurrences locorégionales tardives.

Le grade de Hyams présente cependant des limites. Il a été mis au point à partir de l'étude d'un petit groupe de 17 patients. De plus, le matériel utilisé pour certains patients provient d'une période lors de laquelle les SNUC n'étaient pas identifiés (1990) et n'a pas été réévalué depuis. Les départements d'anatomopathologie non spécialisés sont rarement confrontés à cette tumeur rare, et ont tendance à surdiagnostiquer les NBO. C'est ainsi que dans une étude parue en 2002, Cohen *et al* n'ont confirmé que 2 des 12 tumeurs étiquetées NBO après relecture par des anatomopathologistes expérimentés (178).

Enfin, le score de Hyams repose uniquement sur une évaluation morphologique, et aucune étude n'a permis de mettre en évidence de différences entre NBO de bas grade et de haut grade sur le plan moléculaire.

X. Objectifs du travail

A. Objectifs

Les NBOs restent insuffisamment caractérisés, et ce malgré les outils qui sont à présents à la disposition des chercheurs. La biologie de cette maladie rare n'est toujours pas claire et sa cellule d'origine reste hypothétique. Aucun marqueur pronostique fiable n'a été rapporté. Dans l'approche globale actuelle de la cancérologie, une meilleure compréhension des NBOs est nécessaire pour améliorer la prise en charge des patients.

Notre but était donc de réaliser une étude intégrée des neuroblastomes olfactifs en associant une approche moléculaire multi-omics à une étude histologique et immunohistochimique détaillée à partir d'une série de patients suivis cliniquement.

B. Méthodologie

Les méthodes utilisées sont détaillées dans les articles correspondants.

XI. Résultats

A. Analyse intégrée multi-omics des Esthesioneuroblastomes

Nos travaux visant à caractériser les neuroblastomes olfactifs, ou esthésioneuroblastomes, sont exposés dans un article en cours de soumission dans la revue *Cancer Cell*, intitulé : « Integrated Multi-omics Analysis of Esthesioneuroblastomas ».

1. Introduction

Les NBO ou Esthesioneuroblastome (ENB), sont des tumeurs rares de la base du crâne, qui se développent dans les cavités nasales. Elles représentent 3% de l'ensemble des tumeurs naso-sinusiennes avec une incidence de 4 cas pour 10 millions de personnes. Sur le plan histologique, 4 grades ont été décrits, mais le plus souvent ces tumeurs sont regroupées en haut grade et bas grade. Les tumeurs de bas grade sont plutôt responsables de récurrences tardives loco-régionales tandis que dans les formes de haut grade les patients développent plutôt des métastases à distance avec une survie à 2 ans inférieure à 40%. De plus, le traitement optimal n'est toujours déterminé et reste une question en suspens. Plusieurs facteurs pronostiques ont été associés à une évolution péjorative de la maladie, notamment le stade TNM, la présence de métastases ganglionnaires, le grade histologique ou plus récemment les mutations *TP53*. Cependant, la prise en charge de ces formes agressives reste un challenge, il n'y a notamment aucune mutation oncogénique driver « ciblable » sur le plan thérapeutique décrite. Deux articles ont récemment rapporté l'analyse de NBO par séquençage à haut débit ciblé pour un panel de gènes. Bien que des mutations *TP53* aient été identifiées comme les mutations les plus fréquentes dans la première de ces études, aucune mutation récurrente n'a été identifiée dans la seconde. Le paysage moléculaire des esthésioneuroblastomes à l'échelle du génome complet n'est donc toujours pas connu. De plus, aucune étude du transcriptome ou du méthylome n'a été rapportée et aucune classification moléculaire de ces tumeurs n'a été décrite. Le lien ontogénique avec la cellule d'origine reste également inconnu. Considérant cet important manque de données sur les NBOs, nous avons réalisé une étude intégrée d'échantillon d'esthésioneuroblastomes primaires très bien annotés sur le plan clinico-pathologique.

2. Résultats

Nous avons collecté 59 échantillons de NBO issus de 4 centres de pathologies. Ils ont tous été relus par 2 pathologistes spécialisés en pathologie ORL pour confirmation du diagnostic et du grade. En plus des marqueurs neuroendocrines habituellement utilisés pour les diagnostic de ces tumeurs, l'index de prolifération Ki67 a été déterminé et l'expression des cytokératines a été évaluée à l'aide de l'anticorps CKAE1/AE3. Une extraction d'ADN (n=42) et d'ARN (n=21) a été réalisée pour les échantillons congelés. Quand il n'y avait pas de matériel congelé disponible, l'ADN a été extrait à partir de bloc FFPE (n=17). L'ADN constitutionnel correspondant ou du tissu sain a été collecté pour 15 cas. Un séquençage whole exome a été réalisé pour 27 cas au total, incluant un training set pour lesquels le couple tumeur/normal était disponible (n=14) et un set de validation (n=13) pour lesquels seul l'ADN tumoral était disponible. L'ADN extrait pour les échantillons restants a servi pour la validation ciblée. Du RNA sequencing a été réalisé pour 28 échantillons de NBO, 6 cas de carcinomes naso-sinusiens et 4 échantillons de muqueuse sinusienne saine. Une étude du méthylome a été réalisée sur 28 échantillons de NBO à l'aide de la puce Infinium HumanMethylation850®.

Parmi les 59 cas, il y avait 8% de grade I, 38% de grade II, 27% de grade III et 27% de grade IV. Le suivi moyen était de 40 mois et 43 patients étaient toujours vivants aux dernières nouvelles. Le stade clinique n'était pas corrélé à la survie. Un grade de Hyams élevé (III-IV) était associé à une survie plus courte ($p=0.02$).

Parmi les 14 cas ayant été séquencés en whole exome pour le couple normal/tumeur, 634 mutations impliquant 581 gènes différents ont été identifiées. Le taux individuel de mutations variait de 6 à 219 avec une moyenne de 46 et une médiane de 20. Des mutations du gène *IDH2* au niveau du codon 172 ont été identifiées dans 4 cas, associées à des mutations de *TP53* dans 3 cas. Les autres mutations observées étaient impliquées dans différentes voies de signalisation et processus biologiques, notamment le cycle cellulaire (4 cas/14), la régulation de la chromatine (5/14), la réparation de l'ADN (5/14) et la voie de signalisation de carcinomes baso-cellulaires (6/14 : *TP53*, *GLI2*, *FZD9*, *GLI3* and *LEF1*). Parmi les échantillons étudiés, pour 2 cas, l'hétérogénéité intra-tumorale a été évaluée par le séquençage de 2 fragments différents de tumeur primaire. Pour l'un de ces cas, des mutations de *IDH2*, de *TP53* mais aussi de *KIT* et *YWHAE* ont été observées dans les 2 fragments tumoraux, suggérant que ces évènements génétiques devaient être précoces dans le processus de

cancérogène. Le set de validation a permis de mettre en évidence un 5^e cas de mutation *IDH2*, et d'autres mutations de gènes impliqués dans les mêmes fonctions biologiques et voies de signalisations que pour le training set, avec une fréquence assez similaire (cycle cellulaire : 7/13, régulation de chromatine : 9/13), réparation de l'ADN (n=7/13) et voie de signalisation de carcinomes baso-cellulaires : 6/13 (*APC*, *WNT16*, *AXIN1*, *CTNNB1*, *FZD1*, *FZD5*, *FZD7*, *PTCH1*).

Dans une cohorte indépendante de 15 cas, 2 autres mutations du gène *IDH2* (codon 172) ont été trouvées par pyroséquençage, ce qui amène la fréquence de ces mutations à 7 cas sur 52 testés soit 16,7%. Ces mutations *IDH2* n'ont été observées que dans des tumeurs de haut grade (p=0.009). Sur le plan clinico-pathologique, les mutations *IDH2* étaient associées à un index de prolifération Ki67 plus élevé (p<0.0001), une nécrose plus fréquente (p=0.04), une expression plus fréquente des cytokératines (p=0.002) et une expression moins abondante des marqueurs neuroendocrines (chromogranine p=0.02, synaptophysine p=0.002). Le sexe et l'âge n'était pas différent par rapport aux tumeurs *IDH2* sauvage (Wild Type =WT). Il n'y avait pas d'impact sur la survie des mutations *IDH2*.

Sur le plan transcriptionnel, le RNASeq a permis de confirmer que les NBO représentent un pattern d'expression unique, différents des autres types tumoraux. Un clustering non supervisé des données d'expression regroupant 30 types tumoraux dont 29 issus du TCGA et les NBOs de notre cohorte a montré que les NBOs se regroupent notamment avec les gliomes de bas grade, les glioblastomes et surtout avec les paragangliomes. Ensuite, pour établir une classification des sous-groupes de NBOs, un clustering non supervisé a été réalisé uniquement avec les données d'expression de NBO. Il a permis de mettre en évidence 2 sous-types de NBO. L'un des groupes présentait 1220 gènes surexprimés (FC \geq 2; FDR<0.1), l'autre groupe présentait 614 gènes surexprimés. L'analyse de réseaux ontologiques a montré que les gènes surexprimés dans un groupe étaient liés à des fonctions neuronales (neurotransmitter secretion (p=2.8x10⁻¹⁴), nervous system development (p=8.2x10⁻¹⁰), axonogenesis (p=6.4x10⁻⁵) et que ceux surexprimés dans l'autre groupes étaient liés à la prolifération cellulaire et à des fonctions embryonnaires (cell division (p=4.3x10⁻¹⁹), cell proliferation (p=1.05x10⁻⁷), embryonic morphogenesis (p=5.7x10⁻⁵), neural tube closure (p=1.75x10⁻⁴), embryonic cranial skeleton morphogenesis (p=4.03x10⁻⁴). Les différences ontologiques de ces 2 groupes ont été confirmées par un enrichissement en gènes appartenant à des voies de signalisation impliquées dans des fonctions neuronales pour l'un (synaptic

vesicle cycle ($p=1.01 \times 10^{-6}$) and neuroactive ligand-receptor interaction ($p=0.0001$) et au cycle cellulaire et à la voie de signalisation des carcinomes baso-cellulaires pour l'autre (cell cycle ($p=4.6 \times 10^{-5}$) and basal cell carcinoma pathways ($p=0.002$)). Ces 2 sous-groupes ont donc été nommés neural et basal. Sur le plan clinico-pathologique, les tumeurs de type neural étaient bien différenciées avec une expression plus importante de la chromogranine A ($p=0.01$) et de la synaptophysine ($p=0.08$) et une présence plus fréquente de cellules S100 positive à l'interface tumeur/stroma ($p=0.0005$). Ces tumeurs étaient également moins agressives avec une nécrose moins fréquente ($p=0.01$), un nombre de mitoses moins élevé ($p=0.01$) et un index de prolifération Ki67 également moins élevé ($p=0.003$). De façon intéressante l'expression de CKAE1/AE3 n'était observée que dans le type basal.

Nous avons ensuite comparé le profil d'expression des NBO avec celui de différentes lignées cellulaires, cette analyse a montré une corrélation entre plusieurs tumeurs de type neural et des cellules du système nerveux central. Nous avons ensuite étudié la corrélation entre le profil transcriptionnel des NBO et celui des différents types de cellules qui composent la muqueuse olfactive en utilisant les données récemment publiées obtenues à partir du séquençage « single cell » d'épithélium olfactif murin. Cette analyse a suggéré l'existence d'une corrélation entre la moitié des NBO de type basal et les cellules basales de renouvellement de l'épithélium olfactif appelées les GBCs, mais aussi l'existence d'une corrélation entre certaines tumeur de type neural et les neurones olfactifs immatures (INP2,3 et iOSN). Parmi les gènes surexprimés de façon commune entre les GBCs et les NBOs de type basal on trouvait notamment *IDH2*, *KIT*, *NOTCH2*, *MYC*, *MYB*, *GRHL2* and *MKI67*. Parmi les gènes surexprimés de façon commune entre les IPN2, INP3 et les NBOs de type neural on trouvait notamment *NEUROD1*, *UNCX*, *NHLH1*, *CGHA*, *NCAM1*, and *SYP*.

Nous avons ensuite utilisé l'ensemble de nos échantillons étudiés en transcriptomique pour faire un clustering hiérarchique non supervisé basé sur l'expression protéique en utilisant les marquages chromogranine A, S100, Ki67 et CKAE1/AE3. Cette analyse a montré 2 sous-groupes de NBO corrélés avec le clustering transcriptomique ($p=0.002$). Nous avons donc ensuite réalisé un clustering hiérarchique non supervisé en utilisant tous les cas de notre cohorte pour lesquels les marquages chromogranine A, S100, Ki67 et CKAE1/AE3 étaient disponibles et interprétables ($n=51$). Ce clustering a montré 2 groupes cohérents avec la classification neurale (56,9% $n=29$) et basale (43,1% $n=22$). Les caractéristiques clinicopathologiques des 2 clusters étaient similaires à ceux des 2 clusters « neural » et

« basal » obtenus par RNAseq, avec des p-values plus significatives. Un nouvel élément clinique a pu émerger de cette analyse, le cluster de type basal comportait plus d'hommes que de femmes ($p=0.01$). Le cluster basal présentait un taux de mutations plus élevé que le cluster neural ($p=0.02$) et la survie globale était diminuée dans le groupe des tumeurs basales (HR=6,2 CI95% 1.747 to 22.15; $p=0,008$) (survie médiane de dans le groupe basal = 73 mois, non définie dans le groupe neural).

Les différences de phénotypes observées entre ces 2 groupes, avec notamment une ontologie différente, ont soulevé la question de la cellule d'origine. Pour approfondir cette question nous avons ensuite étudié le méthylome de 28 échantillons (correspondant à 27 patients) de NBO à l'aide de la puce Infinium HumanMethylation850®. Nous nous sommes d'abord concentrés sur les îlots CpG en raison de leur signification fonctionnelle et de leur corrélation avec l'initiation de la transcription (179). Un clustering hiérarchique non supervisé réalisé à partir de la M-value des 1000 sondes les plus différentiellement méthylées situées dans les îlots CpG, a mis en évidence 2 clusters cohérents avec notre clustering basé sur l'expression protéique. De façon intéressante, tous les cas mutés *IDH2* étaient regroupés comme cela s'observe dans les tumeurs ayant un phénotype hyperméthylateur, suggérant un phénotype E-CIMP (Esthesioneuroblastoma-CIMP). En utilisant des critères d'analyse stricts (beta-value<0.2 dans un groupe et ≥ 0.5 dans l'autre), 6827 sondes étaient hyperméthylées dans les échantillons E-CIMP contre seulement 7 sondes dans les autres échantillons. L'analyse de réseaux ontologiques a montré que les gènes correspondants à ces sondes hyperméthylées dans les E-CIMP étaient enrichis en fonctions relatives à la régulation positive et négative du promoteur de l'ARN polymérase II, à la régulation de la différenciation neuronale, la transmission synaptique et la voie de signalisation des neuropeptides (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter ($p=1.2 \times 10^{-15}$), negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter ($p=1.7 \times 10^{-9}$), negative regulation of neuron differentiation ($p=8.4 \times 10^{-9}$), chemical synaptic transmission ($p=7.9 \times 10^{-17}$), neuropeptide signaling pathway ($p=9.4 \times 10^{-9}$)).

Ensuite, pour savoir si les changements de méthylation survenaient uniquement dans les îlots CpG ou s'ils étaient plus diffus, nous avons analysé les données selon les annotations génomiques et fonctionnelles des sites CpG. Parmi les sondes présentant un gain de méthylation dans les échantillons mutés *IDH2*, nous avons trouvé un enrichissement en sondes localisées dans l'exon1. L'analyse de réseau ontologique a montré que les gènes

correspondants étaient liés à des fonctions neuronales (chemical synaptic transmission ($p=3.5 \times 10^{-12}$), neuropeptide signaling pathway ($p=6.7 \times 10^{-9}$), nervous system development (1.4×10^{-5}). L'expression moyenne de ces gènes était significativement plus faible dans les échantillons du groupe basal (mean $\log_2FC=-1,19$).

Pour évaluer si les E-CIMP ont un méthylome semblable à celui des glioblastomes (GBM) *IDH* mutant nous avons réalisé un clustering hiérarchique non supervisé des GBM en utilisant la signature des sondes différentiellement méthylées entre les E-CIMP et les autres ENB. De façon intéressante les échantillons G-CIMP se regroupaient selon leur statut *IDH*, suggérant qu'une reprogrammation épigénétique similaire survient dans les tumeurs présentant une mutation *IDH1/2*.

Pour comprendre si les différences de méthylation entre les NBO de type neural et basal étaient liées à l'ontogénie cellulaire, nous avons continué nos analyses en excluant les échantillons CIMP des analyses suivantes. Un clustering non supervisé utilisant les sondes les plus différentiellement méthylées parmi les 22 NBO restant a montré de nouveau l'existence d'un cluster enrichi en NBO de type neural d'un côté et d'un cluster enrichi en NBO de type basal de l'autre. Parmi les 853,307 sites CpG étudiés par la puce, 55.824 (6.54%) étaient différentiellement méthylés entre les groupes neural et basal identifiés ($\Delta\beta$ -value ≥ 0.2 or ≤ -0.2 , Adj-p-value < 0.1). Parmi les sondes présentant un gain de méthylation dans le groupe basal, nous n'avons pas mis en évidence de différence au niveau du contenu en îlots CpG mais nous avons identifié un enrichissement en sondes localisées au niveau des régions 3'UTR et des enhancers.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur les différences de méthylation survenant au niveau des îlots CpG situés dans les promoteurs. En tout, 1377 sondes étaient différentiellement méthylées entre les 2 groupes ($\Delta\beta$ value $=\pm 0,2$, FDR $< 0,1$). Nous avons observé un niveau moyen de méthylation plus élevé dans les échantillons du groupe basal (mean $\beta= 0.38 \pm \text{STD } 0.005$) par rapport au groupe neural (mean $\beta= 0.30 \pm \text{STD } 0.006$) ($p < 0.0001$). De plus, nous avons observé un enrichissement significatif en sondes localisées dans le promoteur ayant un faible niveau de méthylation parmi les échantillons de type neural ($p < 0.0001$). L'analyse des réseaux ontologiques a montré de façon intéressante que ces gènes déméthylés au niveau de leur promoteur dans le groupe neural étaient enrichis en fonctions neuronales (chemical synaptic transmission ($p=6.9 \times 10^{-8}$, FDR $=1.1 \times 10^{-4}$). De façon attendue,

le niveau moyen d'expression de ces gènes était plus élevé dans le groupe neural que dans le groupe basal ($p < 0.0001$).

Enfin, étant donné l'importance croissante de l'immunité anti-tumorale, nous avons étudié les lymphocytes infiltrant les NBO. Nos analyses ont montré que le nombre de TILs CD4 et CD8 était plus élevé dans les tumeurs de type basal. Au niveau de l'expression, il y avait une corrélation positive entre le nombre de cellules T CD8⁺/mm² dans la tumeur et le niveau d'expression du CD8A. Nous avons donc étudié un set de gènes dont la fonction est associée à l'immunité, notamment les gènes témoignant de la cytotoxicité des cellules T (*GZMB, GZMA, GZMH, GZMK, PRF1*), des gènes de chemokines pro-inflammatoires (*CXCL9, CXCL10, CXCL13*), des gènes de la voie de l'interféron γ (*ING, INGR1, INGR2*), de la réponse Th17 (*IL17, IL17R1, IL17RB, IL17RD*) des cellules NK (*KLRK1*), mais aussi des gènes associés aux immunecheckpoints (PD1, PD-L1, PD-L2, *ICOS, CTLA4, TIGIT, LAG3, HAVCR2*), à des facteurs immunosuppresseurs (*CD4, FOXP3, IDO1, TGF β*), aux cellules dendritiques (*CLL13, CCL17, CCL22*) et aux macrophages (*CCL7, CXCL5*). L'expression de ces gènes était augmentée dans une partie des tumeurs de type basal, par rapport aux tumeurs de type neural, ce qui était cohérent avec l'étude immunohistochimique qui montrait un infiltrat de TILs CD4 et CD8 plus important dans les tumeurs de type basal. L'expression de PD-L1 était observée dans plus de 1% des cellules pour 39% des cas. De façon cohérente, cette expression de PD-L1 était plus fréquemment observée dans les tumeurs de type basal, avec une p value à la limite de la significativité ($p=0.06$).

3. Conclusion

Cette étude est la première à décrire une classification moléculaire des esthésioneuroblastomes. Nous avons mis en évidence 2 sous-types de tumeurs, l'un de type basal, agressif, peu différencié, présentant des mutations récurrentes du gène *IDH2* associées à un phénotype CIMP, pouvant également présenter une cooccurrence de mutations *TP53*; l'autre de type neural, bien différencié, moins agressif présentant peu de mutations. Ces 2 phénotypes tumoraux pourraient être liés à une cellule d'origine différente. Il pourrait notamment s'agir d'une cellule plus basale, de type « cellule de renouvellement de l'épithélium olfactif » dans un cas, et d'une cellule plus avancée dans sa différenciation neuronale dans l'autre cas. L'environnement immunitaire diffère également entre ces 2 sous-types tumoraux, avec un infiltrat de TILs plus important dans les tumeurs de type basal et une expression plus fréquente des checkpoints immunitaires.

4. Article en cours de soumission

Integrated Multi-omics Analysis of Esthesioneuroblastomas

Marion Classe^{1#}, Hui Yao^{2#}, Roger Mouawad¹, Chad J. Creighton³, Alice Burgess⁴, Frederick Allanic¹, Michel Wassef⁵, Xavier Leroy⁶, Benjamin Verillaud⁴, Geoffrey Mortuaire⁷, Franck Bielle⁸, Christophe Le Tourneau⁹, David Khayat¹, Xiaoping Su² and Gabriel G. Malouf¹

1 Département of Medical, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Sorbonnes-Universités, University Pierre and Marie Curie, Paris, France

2 Department of Bioinformatics and Computational Biology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA;

3 Dan L. Duncan Comprehensive Cancer Center Division of Biostatistics, Baylor College of Medicine, Houston, TX, 77030, USA.

4 Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Lariboisière Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris-Diderot Paris VII, Paris, France

5 Département of Pathology, Lariboisière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Diderot Paris VII, Paris, France

6 Département of Pathology, CHRU de Lille, Université Lille 2, Lille, France

7 Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, CHRU de Lille, Université Lille 2, Lille, France;

8 Department of Neuropathology Raymond Escourolle, AP-HP, Hôpitaux Universitaires La Pitié Salpêtrière - Charles Foix, Paris, F-75013, France

These authors contributed equally to the work and share the role of first author as first co-authors.

Correspondence: Gabriel.malouf@aphp.fr (G.G.M.) and marionclasse@hotmail.fr (M.C.)

Running title: Integrative analysis of esthesioneuroblastomas Keywords: esthesioneuroblastomas, IDH2, neural, basal, DNA methylation, sequencing, genetics and epigenetics.

Financial support: This work was supported in part by grants from Fondation AVEC and the Genitourinary Cancers Program of the CCSG shared resources, at MD Anderson Cancer Center.

Summary

Esthesioneuroblastoma (ENB) is a rare subtype of cancer arising from the olfactory mucosa, with no established molecular stratification to date. Here, we report the first integrative analysis of low- and high-grade cases and propose a molecular-based classification dissecting ENB in two subtypes namely basal and neural; those subtypes' harbor distinct pathological and immune features as well as divergent clinical outcome and were tightly linked to cell ontogeny of olfactory mucosa. Among basal subgroup, we also uncovered an *IDH2* R172 mutant-enriched subtype (~35%) harboring a CpG Island Methylator Phenotype and reminiscent of *IDH2* mutant gliomas. More broadly, we found that methylome of neural ENB is mainly charted by genome-wide reprogramming leading to loss of methylation in enhancers related to axon guidance genes which were methylated in basal ENB. Our studies reveal insights into the molecular pathogenesis of esthesioneuroblastomas and provide classification information of potential therapeutic relevance.

Highlights

- Transcriptomic and protein-based classification of esthesioneuroblastomas identify 2 subgroups namely neural-like and basal-like, associated with different clinicopathological features and distinct outcome
- ~35% of Basal-like ENB display *IDH2* R172 hotspot mutations which co-occurred with TP53 mutations.
- Esthesioneuroblastomas with *IDH2* mutations harbor a CpG Island Methylator Phenotype (E-CIMP)
- A subset of basal-like ENB displays a high number of intra-tumoral TILs associated with an activation of immune checkpoint inhibitors.

Significance

Using a multi-omics approach, we describe the first integrative analysis of ENBs which we showed to harbor a unique transcription profile across diverse cancer subtypes. We identify two ENB subsets namely neural and basal, characterized by distinct clinicopathological features and linked to different cells of origin composing olfactory mucosa. DNA methylation unraveled broad epigenomic reprogramming between those subgroups basely predominant in enhancers of neuronal genes. Strikingly, basal-like ENBs were enriched for high grade tumors with immune infiltration; in addition, one third harbored *IDH2* R172 hotspot mutations

leading to a CpG Island Methylator Phenotype (E-CIMP) with high similarity with methylome of *IDH1-2* mutant gliomablastomas. These findings open the fields of new therapeutic strategies for this orphan disease.

Introduction

Esthesioneuroblastoma (ENB), also known as olfactory neuroblastoma, is a rare tumor arising in the skull base, developing into the nasal cavities. Annual incidence is estimated at 4 cases per 10 million population and accounts for approximately 3% of all sinonasal tumours (1). At the pathological level, Hyams grading establishes 4 categories associated with outcome, although these tumors are often divided in low- and high- grade (2). Patients with low-grade tumor typically experience late loco-regional recurrence while those with high-grade tumors frequently develop distant metastasis with 2-year survival less than 40% (2). Thus, the optimal management of these tumors remains an unmet medical need.

Several prognostic factors have been described to be associated with poor outcome of patients with ENB including TNM stage, presence of lymph node metastasis, tumor grade and *TP53* mutations. However, management of aggressive disease is currently challenging as there is no targetable oncogenic drivers identified. Recently, two reports analyzed genetics of ENB using next-generation targeted sequencing of panel of cancers genes (3, 4). Although *TP53* mutations were identified as the most frequent mutation in the first one, no gene was found to be frequently mutated in the latter one. Of note, tumor grade was not reported in both studies and several tumors have been pretreated prior to sequencing.

Thus, the genome-wide landscape of ENB remains largely unknown (3, 5-8). In addition, transcriptome and methylome subgroup classifications of these tumors and their link with cell of origin as well as tumor grade and patient's outcome is fully uncovered. Considering this substantial gap of knowledge we performed integrative analysis of primary esthesioneuroblastomas samples very well annotated regarding to their pathological and clinical features.

Results

Samples, Clinical Data, and Analytic Approach

Fifty-nine surgically resected primary esthesioneuroblastomas were collected and re-evaluated histopathologically by 2 Head and Neck pathologists to confirm the diagnosis and establish a consensus Hyams grading (M.W. & M.C). In addition, immunohistochemical

staining for neuroendocrine markers (i.e., chromogranin and synaptophysin), KI67 proliferation index and cytokeratin were performed using whole-slides. When available, DNA (n=42) and RNA (n=21) were extracted from fresh-frozen samples. DNA was extracted from FFPE samples when no frozen material was available (n=17). Matched germline DNA from blood or adjacent normal tissue were also collected in 14 cases. Whole exome sequencing (WES) was performed for a total of 27 cases including a training set of matched tumor/normal samples (n=14) and a validation set of 13 ENB samples without matched normal. DNA extracted from the remaining samples was used for targeted validation. RNA sequencing was performed in a dataset of 18 cases and DNA methylation analysis using Infinium EPIC arrays was done on 27 ENB cases. Detailed clinical and pathologic characteristics of the cohort matched those of the general population of patients with surgically resected ENB (2) (Table S1). The median follow-up of the 59 patients was 79.1 months, and 43 of these were alive at last follow-up. Among the clinical variables, only higher Hyams grade was associated with a significant poor overall survival (HR=0.19; IC95%: 0.06-0.59) (p=0.02) (Figure S1).

Landscape of Genomic Alterations

Among the 14 matched ENB for which we performed paired whole-exome sequencing, 634 somatic mutations implicating 581 different genes were identified. The individual mutation rate was variable, ranging from 6 to 219 per case (median 20). Nonsynonymous single nucleotide variants were the most frequent mutations identified (86%). Hotspot *IDH2* R172 codon (n=4, 28.6%) and *TP53* (n=3; 21.4%) mutations were the most recurrent mutations identified in more than 10% of cases and those co-occurred mutually (p=0.01) (Figure 1A). *TP53* stopgain mutation in ENB-28T was confirmed by IHC showing a loss of expression (Figure S2A). Conversely, the 2 remaining nonsynonymous *TP53* mutations in ENB-59T and ENB-13T were responsible for an overexpression of the protein by immunohistochemistry (Figure S2B-C). Exploring the biological functions to which were related the most relevant mutations, we also identified somatic deleterious mutations in the ATP-dependent chromatin remodeler *CHD7* gene in two samples; of note, *CHD7* is associated with the lineage commitment period in adult neurogenesis and its selective ablation has been shown to impair neural differentiation. We then explored other mutations in SWI/SNF chromatin modifying complex and identified *ARID1A* deleterious mutation complex in one additional case. Finally, including *TP53*, we also identified mutations in genes related to cell cycle and basal cell carcinoma pathways which were altered in 28.6% (n=4) and 42.8% (n=6) of cases, respectively (Figure 1A). For 2 cases, we've been able to analyze intra-tumoral heterogeneity

by sequencing 2 distinct sections from the primary tumor. We found a majority of shared mutations (63% and 90%, respectively) (Figure S3). One of the cases studied (ENB-59) notably displayed *IDH2* and *TP53*, but also *KIT* and *YWHAE* mutations which were all common in both samples, indicating these mutations could be truncal events. Sequencing of an independent dataset of 13 ENB cases for which germline DNA was not available, we identified one additional *IDH2* hotspot mutation case. After filtering for mutations not present in polymorphism or in COSMIC databases, we identified mutations of *CHD6*, a paralog of *CHD7* in three cases. In addition, two ENB samples harbored *ARID1A* mutations. Finally, we observed mutations in genes related to cell cycle, chromatin regulation, DNA repair and basal cell carcinomas pathways with a frequency similar to the training set (Figure S4).

Prevalence and clinicopathological features of *IDH2* mutant subgroup

To explore the prevalence of *IDH2* mutations, pyrosequencing of an independent dataset of 15 ENB cases identified 2 additional cases; thus, *IDH2* R172 mutations were present in a total of 7 out of 42 ENB cases (16.7%) (R172S = 43%, R172T=43%, R172K=14%). Of note, *IDH2* mutations were found exclusively in tumors with higher grade ($p=0.009$) and were characterized by higher Ki67 proliferation index ($p<0.0001$) (Figure 1B-E) and frequent necrosis ($p=0.04$) (Table 1). At the pathological level, *IDH2* mutant tumors harbored higher expression of cytokeratins ($p=0.002$) and lower expression of neuro-endocrine markers chromogranin A ($p=0.02$) and synaptophysin ($p=0.002$) (Figure 1F-H). Age, sex and clinical stage were not different between *IDH2* WT and *IDH2* mutated cases. No difference in overall survival was observed between cases with or without *IDH2* mutations (Figure 1-I).

Subtype transcriptomic classification

We first asked whether ENB displayed a unique gene expression signature as compared to other sinonasal carcinomas and normal mucosa. To do so, we performed an unsupervised hierarchical clustering of gene expression of a dataset comprising 19 ENBs, 6 sinonasal carcinomas and 4 normal mucosa samples. All but one ENB sample (ENB-14T) gathered together indicating that ENB are unique at the transcriptome level (Figure S5A). These results we confirmed using principal component analysis (PCA) (Figure S5B). We then compared ENB expression profile to other type of cancers reported in the TCGA. Interestingly, ENB gathered together and displayed similarities with the expression profile of glioblastomas, low grade gliomas, pheochromocytoma and paragangliomas which all derive from neural crests (Figure S5C).

To establish a subgroup classification of ENB, we thus performed an unsupervised clustering of all ENBs (excluding ENB-14T) revealing two distinct subgroups which we named basal and neural based on gene ontology and functional annotation analysis (Figure 2A). Overall, 1220 genes were upregulated in neural subgroup relative to basal subgroup ($FC \geq 2$; $FDR < 0.1$). Gene ontology analysis reveals enrichment for neuron modules such as neurotransmitter secretion ($p = 2.9 \times 10^{-14}$) and nervous system development ($p = 8.2 \times 10^{-10}$) (Figure 2B). Consistent with these findings, KEGG pathway was enriched for synaptic vesicle cycle ($p = 1.1 \times 10^{-6}$) and neuroactive ligand-receptor interaction ($p = 1.2 \times 10^{-4}$) (Figure 2C). Conversely, 614 genes were overexpressed in basal subgroup relative to neural subgroup, respectively (Fold Change ≥ 2 ; $FDR < 0.1$). Gene Ontology analysis reveals that basal subgroup was enriched for cell division ($p = 4.3 \times 10^{-19}$), cell proliferation ($p = 1.05 \times 10^{-7}$), embryonic morphogenesis ($p = 5.7 \times 10^{-5}$), neural tube closure ($p = 1.75 \times 10^{-4}$) and embryonic cranial skeleton morphogenesis ($p = 4.03 \times 10^{-4}$) (Figure 2B). KEGG pathway analysis was consistent with activation of cell cycle ($p = 4.6 \times 10^{-5}$) and basal cell carcinoma pathways ($p = 0.002$) (Figure 2C).

Associations between two schemes transcriptomic classification and clinicopathological tumor features revealed that ENB related to neural subgroup were often well-differentiated with high expression of the endocrine markers chromogranin ($p = 0.01$) and synaptophysin ($p = 0.08$), presence of S100 sustentacular cells ($p = 0.0005$) and absence of necrosis ($p = 0.01$) (Table S2). In contrast, basal ENB tumors were composed of less differentiated cells, which were often high grade tumors ($p = 0.06$) with high mitotic rate ($p = 0.01$) consistent with increased KI67 proliferation marker ($p = 0.003$). Interestingly the expression of CKAE1/AE3 was observed only in basal-type ENBs ($p = 0.03$).

Distinctive specific tissue types linked to esthesioneuroblastoma subgroups

Molecular differences between the ENB transcriptomic subtypes would provide clues as to the diverse cell of origins underlying these subtypes. To provide further characterization to the widespread gene expression differences observed, we examined the top 700 differential mRNAs, using a public expression dataset from the Fantom consortium of 889 profiles representing various human cell and tissue specimens (Figure 3A). When examining the top 700 differential mRNAs associated with ENB transcriptomic subtypes, neural ENB expression patterns were associated with tissues related to central nervous system (CNS), in contrast to basal ENB subtype (Figure 3A). To infer a link between ENB subtypes and cells composing the olfactory mucosa, we took advantage of transcriptomic profiles generated in

mice olfactory cells and describing 13 putative cells ranging from the more undifferentiated horizontal basal cells (HBC), globose basal cells (GBCs) and immature neuron progenitors type 1 (INP1) to the more mature cells such as the immature neuron progenitors type 2 and 3 (INP2-3) (9). Notably, inter-correlations between those olfactory mucosa cells and ENB profiles identified similarities between a subset of neural ENBs and INP2-3 cells, all having relatively higher chromogranin (*CHGA*), synaptophysin (*SYP*), neural cell adhesion molecule 1 (*NCAMI*) and neuronal differentiation 1 (*NEUROD1*) expression. In contrast, Basal ENBs share more similarities with either HBCs (n=5/9) or with GBCs and INP1 immature cells (n=4/9), all having relatively higher *IDH2*, *NOTCH2*, *MYC*, *MYB*, *GRHL2*, *MKI67* and *KIT* expression (Figure 3B and Figure S6A). Overexpression of *KIT* in basal ENB was confirmed by immunohistochemistry (Figure S6B).

Two subgroups of protein-based clustering

As basal and neural ENB harbored a complete different pattern at both transcriptome and pathological levels, we then decided to perform an unsupervised protein-based clustering of the 18 ENB cases assessed by RNAseq using expression levels of 4 markers significantly different between neural and basal subtypes, namely *CHGA*, *CKAE1/AE3* (keratins), *Ki67* and *S100* protein. Consistent with transcriptome based classification, ENB clustered in two subgroups basal and neural, which were highly correlated with transcriptomic-based clustering (p=0.002) (Figure 4A). We then performed an unsupervised clustering using protein expression in our whole cohort encompassing 51 ENB samples; ENB clustered in two groups consistent with basal (43.1%; n=22) and neural (56.9%; n=29) subtype classification (Figure 4B) (Table 3). Consistent with transcriptomic results, ENB samples belonging to basal subgroup were less differentiated (p<0.0001), had higher tumor grade (p<0.0001) consistent with increased *Ki67* index (p<0.0001) and notably overexpressed cytokeratins (p<0.0001). Conversely, neural ENB samples displayed higher chromogranin and synaptophysin expression (p<0.0001) and were enriched for the presence of *S100* sustentacular cells (p<0.0001) (Table 2). Of note, there was no difference in term of TNM stage between the two subgroups. Puzzlingly, basal-type cluster was enriched in male (p=0.01) (Figure 4C). Importantly, for cases where paired exome-sequencing was performed in tumor and matched normal, basal ENB samples harbored a higher mutation load as compared to neural ENB samples (p=0.02). Finally, patients with basal ENB had a shorter median overall survival of 73 months as compared to neural subgroup (median not reached) (p=0.008) (HR=6.2; CI95%: 1.7- 22.1) (Figure 4D).

E-CIMP in *IDH2* R172 esthesioneuroblastomas

To identify specific and global differences between the genome-wide methylation profiles of ENB subtypes, we analyzed 27 ENB samples (5 of which displayed *IDH2* mutation) using Infinium EPIC arrays. The Illumina EPIC DNA methylation array was chosen because it provides a genome-scale interrogation of ~850.000 probes in human methylome both in CpG islands (CGI) and outside CGI. Firstly, we focused our analysis on CGI because of their functional significance and the strong correlations between CGIs and transcription initiation (10). Hierarchical clustering analysis using M-values of 1000 most differentially methylated probes located in CGI reveals two epi-clusters which highly correlated with our protein-based classification ($p=0.0001$) (Figure 5A). Remarkably, all the *IDH2* mutant cases gathered together consistent with an ENB CpG Island Methylator Phenotype (E-CIMP) reminiscent of CIMP observed in other tumors such as glioblastomas and colon cancers. Overall, using tighter criteria (β -value <0.2 in *IDH2*WT and ≥ 0.5 in *IDH2*Mt), 6827 probes were found to be hypermethylated in E-CIMP, compared to only 7 probes in E-CIMP negative samples. Of note, gene ontology analysis revealed that hypermethylated genes in E-CIMP were enriched for chemical synaptic transmission ($p=7.9 \times 10^{-17}$), negative regulation of neuron differentiation ($p=8.4 \times 10^{-9}$) and neuropeptide signaling pathway ($p=9.4 \times 10^{-9}$), suggesting that *IDH2* mutation inhibits neural differentiation through epigenetic genome-wide reprogramming. To answer the question whether the methylome reprogramming in *IDH2* mutant ENB were only related to CGI, we analyzed enrichment of differentially methylated probes in EPIC according to their CpG genomic and functional annotations. Importantly, no enrichment was observed according to genomic distributions of CpG islands whether in CGI, shores or shelves (Figure 5B). In contrast, according to their functional distribution, we observed enrichment of CpG sites in Exon1 (Fold enrichment of 3.1) (Figure 5B) and this was tightly linked to transcriptional gene silencing (Figure S7). Gene Ontology analysis of methylated genes related to exon 1 were enriched for of chemical synaptic transmission ($p=3.5 \times 10^{-12}$), neuropeptide signaling pathway ($p=6.7 \times 10^{-9}$) and nervous system development (1.4×10^{-5}), consistent with blockade of neuronal differentiation. Finally, to answer the question whether E-CIMP have similar methylome as *IDH1-2* mutant glioblastomas (G-CIMP), supervised clustering using differentially methylated probes between E-CIMP and other ENB samples was performed; notably, G-CIMP samples clustered according to their *IDH1-2* status implying that a similar epigenetic programming occurred in both *IDH1-2* mutant tumors (Figure S8).

Genome-wide epigenetic reprogramming according to esthesioneuroblastoma subtypes

To analyze methylation changes linked to cell ontogeny, we excluded E-CIMP samples from further analysis and performed unsupervised clustering using differentially methylated probes of the remaining ENB samples (n=22) (Fig. 5C). Of note, all basal samples clustered together as compared to neural samples. Overall, 55.824 (6.7%) in autosomal genes were significantly differentially methylated between neural and basal clusters ($\Delta\beta$ -value ≥ 0.2 or ≤ -0.2 , FDR < 0.1); 30.576 (3.6%) and 25.248 (2.9%) probes were hypermethylated and hypomethylated in basal as compared to neural subgroups, respectively. Among the probes which lost methylation in neural as compared to basal ENB subgroup, no enrichment was identified according to genomic distribution of CpG sites. Conversely, we identified a striking enrichment for probes located in enhancers (Figure 5D). Gene Ontology analysis revealed that those enhancers were enriched for signal transduction ($p=2.2 \times 10^{-12}$), platelet activation ($p=1.1 \times 10^{-6}$) and axon guidance ($p=5.2 \times 10^{-6}$). In addition we identified hypermethylation of probes located in 3'UTR in neural as compared to basal. Gene Ontology analysis revealed that those 3'UTRs were enriched for positive (8.8×10^{-6}) and negative (1.2×10^{-5}) regulation of transcription from RNA polymerase II promoter.

We next concentrated on probes located in promoter CGIs because of their known correlation with gene expression. Overall, out of 1.377 probes differentially methylated between ENB subgroups ($\Delta\beta$ -value ≥ 0.2 or ≤ -0.2 , FDR < 0.1), we observed a higher methylation of promoter CGI in basal (mean $\beta=0.38$; STD ± 0.005) as compared to neural subgroup (mean $\beta=0.30$; STD ± 0.006) ($p<0.0001$) (Figure S9A). Notably, we observed significant enrichment for probes with low level methylations (β value < 0.2) in neural as compared to basal ($p<0.0001$) (Figure S9B). Gene ontology enrichment analysis showed that promoter which lost DNA methylation in the neural subgroup as compared to the basal subgroup were related to genes involved in chemical synaptic transmission ($p=6.9 \times 10^{-8}$); furthermore, this was associated with increased of their expression (Figure S9C).

Charting immune tumor profiles

T lymphocyte infiltration has become an inescapable actor of tumor development and dissemination in several malignancies, however its significance in ENB remains unknown. In the aim to investigate immune microenvironment of ENBs, we explored CD4 (+) and CD8 (+) tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in 45 ENBs classified as neural (n=25) or basal (n=17) (classification not available for n=3). We found that mean counts of both CD4+ and

CD8⁺ T cells were significantly higher in basal as compared to neural ENBs ($p=0.007$ and $p<0.0001$, respectively) (Figure 7A-F). Of note, CD8A mRNA expression levels assessed by RNAseq was highly correlated with CD8⁺ TILs (Pearson $r= 0.8$; $p=0.0001$). We then investigated the expression of cytotoxicity markers, inflammatory cytokines and immune checkpoints according to our two subgroups classification. Consistent with CD8 infiltration in basal subgroup, we also identified higher expression levels of cytotoxic cell markers (*GZMA*, *GZMB*), T cell invasion chemokine factors (*CXCL13*, *CXCL10* and *CXCL9*), immune checkpoints (notably PD1 (*PDCD1*) and its ligands PD-L1(*CD274*), PD-L2 (*PDCD1LG2*), *CTLA4*, *ICOS*, TIM3 (*HAVCR2*) and *LAG3*) and suppressive factors (notably *IDO1*, *TGFB*, *IL-10*, *FOXP3*) in this subgroup (Figure 7G). Regarding its druggability, we explored PD-L1 expression levels in our dataset. PD-L1 was expressed by both tumor cells and immune cells, predominantly within tumor areas (Figure 7H). Out of 36 evaluable cases, 14 cases (39%) showed positive staining ($\geq 1\%$) including 9 cases with PD-L1 expression levels ranging from 5-50%. Importantly, 64% of basal ENB showed high PD-L1 expression ($\geq 1\%$) as compared to 27% of neural ENB ($p=0.06$) (Figure 7I).

Discussion

Our integrated, multi-omics investigation into ENBs provides insights that have ontogenic, prognostic, and therapeutic implications. We first investigated the landscape of somatic mutations using whole exome sequencing, which has never been reported in ENB to our knowledge. Indeed, the few studies about ENB molecular anomalies used targeted sequencing (3-5). As in others cancers, we found mutations in genes related to biological pathways essential for cancer cells such as cell cycle, chromatin modifications, or DNA repair. Gay *et al* and de la Vega *et al* also reported mutations in genes implicated in cell cycle, such as *TP53*, or *CDKN2A*. Like us, both studies also report alterations in genes implicated in chromatin remodeling such as *ARID1A*, *SMARCA4*, *KMT2C* or *EZH2*. Interestingly, Gay *et al* also report alterations in genes related to DNA repair, such as *MLH1*. What is new in our study is that we found recurrent *IDH2* mutations possibly co-occurring with *TP53* mutations. In our study, *IDH2* mutated cases displayed an aggressive phenotype, with a high histological grade, a high proliferation index and a poorly differentiated profile. In Gay *et al* series, which found 2 *IDH2* mutated ENBs among the cases studied, interestingly all cases were aggressive ones with an advanced clinical stage. What is more, *TP53* mutations have reported in high grade ENB cases (8), but co-occurrence of *TP53* with *IDH2* mutations cases was not

specifically identified in ENB before. In a mouse model of *IDH1* knock-In, it has been shown that *IDH1* mutation alone in chondrocytes was sufficient to initiate enchondromatosis, but the malignant equivalent (chondrosarcoma) developed only if *TP53* mutations were associated (11). This comforts the probable oncogenic role played by both *IDH2* mutations and the co-occurrence of *IDH2* and *TP53* mutations in basal type ENBs.

We then investigated the expression pattern of ENBs and confirmed the unique expression profile of ENBs compared to other cancers reported in the TCGA. We noticed that ENBs gathered together with gliomas, glioblastomas and most of all with paragangliomas. This is very interesting since paragangliomas derive from neural crest cells (12), and since neural crest cells play a very important role in olfactory mucosa development (13). This could bring new arguments to the hypothesis that ENB develop from cells deriving from neural crests.

We then focused on ENBs and showed that they were divided into two molecular groups, namely neural and basal, whose transcription profile witnesses of a different cell ontogeny. Interestingly, recurrent *IDH2* mutations were restricted to the basal-type group but, as reported in other tumor types (14) we found no impact of *IDH2* mutations on overall survival. We however highlight that Basal-like ENBs displayed a more aggressive phenotype and a poorer survival. The aggressive phenotype of basal type cancers has also been shown in breast cancer (15). In breast carcinomas, even if the definition of basal-like is still debated, it is described that basal-like carcinomas display up to 85% *TP53* alterations, a high Ki67 proliferation index and an expression basal keratins (CK 5/6, CK14 or CK17) (15). In Lazo de la Vega *et al* recent series, one ENB case displaying *TP53* mutation is described (4). Interestingly, this case also overexpressed *KRT14*, a marker known to be pathognomonic of olfactory epithelium Horizontal Basal Cells (9, 16). Moreover, in de la Vega *et al* series, many cases showed an *FGFR3* overexpression, but the *TP53* mutated cases did not. In our series, we did find an overexpression of *FGFR3* (data not shown) in the neural-like group. *FGFR3* overexpression might be restricted to neural-like tumors. This needs to be confirmed in other series. We notably found that basal-like cases expressed more frequently cytokeratins. It is described that some olfactory neuroblastomas can express cytokeratins (17), however, this observation had never found any explanation. Fletcher *et al* very recently described the expression profile of olfactory mucosal cells at the single cell level using a mouse model (9). Using this specific cell signature as a comparison to ENB expression profiles, our data suggest similarities between neural-like tumors and immature olfactory neuron progenitors of olfactory mucosa. Our findings also suggest that some of the basal-like ENBs shared similarities with globose basal cells of olfactory mucosa. Considering these

results and our gene ontology enrichment analysis results, we can make the hypothesis that neural and basal-like ENBs arise from a different cell of origin. It is possible that neural ENBs could develop from immature neuron progenitors already engaged in their differentiation process, whereas basal-type ENBs would arise from basal progenitors not yet engaged in the differentiation process. This could explain a higher Ki67 proliferation index, the lower expression of neuroendocrine markers and the possible expression of cytokeratins in basal-like ENBs. These findings need to be validated by others.

We then investigated ENB's methylome. Using 27 ENB samples, we first identified a CpG Methylator Phenotype (E-CIMP) associated with *IDH2* mutations, as reported in gliomas (18). This had never been reported in esthesioneuroblastomas. Interestingly, when comparing ENB expression profile with other cancers described in the TCGA we found that ENB clustered with both gliomas, glioblastomas and paragangliomas, all of which can display a CIMP (18-20). This could be due to similar oncogenic mechanisms in those tumors. When excluding CIMP cases, our unsupervised clustering was still consistent with our previous results. Indeed, all basal and all neural cases gathered together, confirming their methylation pattern was different. Some studies have described that the cell of origin in cancer could be highlighted using DNA methylation (21, 22). Therefore, finding a different methylation pattern between neural and basal ENBs brought new arguments to support the hypothesis of a different cell of origin underlying the different phenotype of our 2 sub-groups. Among the differentially methylated probes we found enrichment in probes located in the 3'UTR and enhancer regions. This finding is interesting since it has been suggested that 3'UTRs and enhancers played a role in cell differentiation process (23-25).

When focusing on promoter CGI, we found that in neural cases, genes related to neural functions displayed a promoter demethylation, associated with a higher expression level. This was consistent since promoter methylation is most often associated with gene repression (26). Finally we decided to investigate immune microenvironment of ENBs since the role of immunity in cancer development and treatment has become obvious. We found that Basal-like tumors were infiltrated by a greater number of Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) than neural-like ones. This finding is consistent with the higher mutational load displayed by basal-like ENBs. Indeed, an association between mutational load and TILs has been reported in other cancers (27, 28). However, despite a higher density of intratumoral CD8+ T cells, basal-like have a poorer prognosis than neural-like. This could be partly due to an activation of the checkpoint inhibitors and the expression of immunosuppressive factors such as *IDO1* and *TGFβ* in some cases. We notably found a higher number of cases expressing PD-L1 in

basal group than in neural group. The expression of PD-L1 has already been reported in other basal like tumors, notably in breast basal like carcinomas (29). This finding had never been reported in ENBs and opens the field to new therapeutic strategies. We also found a higher density of CD4+ T cells and a higher expression level of *FOXP3* in some basal like ENBs tumors. A high prevalence of Tregs has been reported as a marker of poor prognosis in others cancers (30, 31). This could also participate to the poor prognosis of basal-like ENBs.

In summary, we describe the first multi-omics analysis of esthesioneuroblastomas which allowed us to report the first transcriptomic classification of these rare and poorly understood tumors. Using transcriptome and methylome analyses, our data suggest that neural ENB could originate from olfactory neuron progenitors which could explain their neural phenotype, whereas basal ENB could originate from basal renewing cells of olfactory epithelium which could explain their poorly differentiated phenotype. We highlighted that basal-like ENBs were aggressive tumors with a poorer prognosis than neural-like tumors. However we found that Basal ENBs are enriched in *IDH2* mutations associated with an E-CIMP. Both of these findings can pave the way towards new therapeutic strategies for these rare tumors. Finally we found that basal-like ENBs could also be candidate for immunotherapy since they are highly infiltrated by CD8+ T cells with an expression of some immunecheckpoints.

METHODS

Sample collection and histopathological analysis

Patient samples with confirmed diagnosis of ENB were collected from several pathology departments in France after local committee approval. All cases were reviewed by 2 expert head and neck pathologists who confirmed the diagnosis and reported Hyams grading; in case of discrepancy for the grading between the 2 pathologists, the final grade was reached by consensus. A panel of immunohistochemical markers was performed on FFPE tumor blocks whenever it was possible including neuroendocrine markers chromogranin A, synaptophysin, CD56 (NCAM1) as well as S100 protein, pan-cytokeratin (AE1/AE3) and the proliferation marker Ki67. When necessary, immunohistochemistry for selected markers was performed (i.e. c-KIT, TP53) using the most representative paraffin block. For the cases displaying available cryopreserved material, a frozen section stained by Hematoxylin Eosin (HE) was used to assess tumor purity; only cases with tumor purity greater than 70% were used for nucleic acid extraction.

All patients in the participating centers provided informed written consent for tumor collection and analysis. Clinical data were collected in each participating institution and correlated with pathological and molecular tumor features. The study was approved by the ethical committee of the Pitie-Salpetriere Hospital (IDF-6, Ile de France). The collection and use of tissues followed procedures that are in accordance with the ethical standards formulated in the Declaration of Helsinki.

Nucleic acid extraction

DNA extraction was performed using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA extraction was performed using the RNeasy Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Quality control of extracted nucleic acids was done using Agilent® bioanalyzer.

Whole Exome sequencing and somatic mutation detection

Exome capture was performed using Agilent SureSelect Human All Exon 50 Mb according to the manufacturer's instructions. Briefly, 3 micrograms of DNA from each sample were used to prepare the sequencing library through shearing of the DNA followed by ligation of sequencing adaptors. Whole-exome sequencing was performed, and paired-end sequencing (2 x 76 bp) was carried out using the Illumina HiSeq 2000; the resulting data were analyzed with the Illumina pipeline to generate raw fastq files. The coverage of our germline samples varied between 46x–55x as compared to 95x–120x for tumor samples. The technical details and mutation detection were done according to a pipeline we previously reported (32). In case germinal DNA was not available, comparison was done according to reference genome. We also filtered out all known SNVs/indels in the UCSC dbSNP 135 and 1000 human genome project SNP database, and kept any mutations, which are in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) database curated by Wellcome Trust Sanger Institute. Each somatic mutation or indel was annotated with its functional effect by SIFT to determine whether a mutation candidate was synonymous or nonsynonymous (benign or deleterious).

Validation of *IDH2* mutations

IDH2 R172 mutations were confirmed by both pyrosequencing, as previously described (33). In addition, Immunohistochemistry for *IDH2* was performed on 5- μ m-thick formalin-fixed, paraffin-embedded sections with an antibody specific for the mutant *IDH2* (R132/172) (clone

MsMab-1, Millipore) (All IHC protocols are summarized in table S3). Cytoplasmic staining was interpreted as positive.

RNA sequencing and mapping

Total RNA for each sample was converted into a library of template molecules for sequencing on the Illumina HiSeq 2000 according to the NuGen Ovation RNA-Seq System V2 protocol. In brief, first strand cDNA was synthesized from 100 ng of DNase1-treated total RNA using a mix of DNA/RNA chimeric primers that hybridize to both the 5' portion of the poly (A) sequence and randomly across the transcript. Second strand synthesis produced double-stranded cDNA, which was amplified using single primer isothermal strand-displacement amplification. The resultant cDNA was fragmented to 200 bp (mean fragment size) with the S220 FocusedUltrasonicator (Covaris) and used to make barcoded sequencing libraries on the SPRI-TE Nucleic Acid Extractor (Beckman-Coulter). Libraries were quantitated by qPCR (KAPA Systems), multiplexed and sequenced, 4 samples per lane, on the HiSeq2000 using 75 bp paired-end sequencing. The resulting data were analyzed with the current Illumina pipeline to generate raw fastq files.

Analysis of differentially expressed genes

To perform the normalization and test for differential expression with a negative binomial model between conditions, we chose to use the Bioconductor package DESeq (version 1.11.0). Specifically, for each gene, a generalized linear model (GLM) was fit to compare the expressions of basal and neural ENBs. The Benjamini-Hochberg method was used to control the FDR. The Holm method was applied to calculate the adjusted P-values of pairwise comparisons.

Pathways enrichment analysis

Gene Ontology (GO) enrichment for biological processes and pathways (KEGG) were performed through DAVID Bioinformatics resources database (34) using default setting. Gene ontology terms were considered as statistically significant if fold enrichment ≥ 2 , p-value $< 10^{-3}$ and an FDR < 0.05 were considered statistically significant.

DNA methylation

Global DNA methylation was evaluated using the Infinium HumanMethylation850® (HM850) BeadChip Array. Briefly, genomic DNA (500-1000 ng) was bisulfite converted

using the Zymo EZ DNA methylation kit (Zymo Research, Irvine, CA) according to the manufacturer's recommendations. The amount of bisulfite-converted DNA as well as the completeness of bisulfite conversion for each sample were assessed using a panel of MethyLight-based real-time PCR quality control assays as described previously (35). Bisulfite-converted DNA was then used as a substrate for the Illumina EPIC BeadArrays, as recommended by the manufacturer and first described in (36). Specifically, each sample was whole genome amplified (WGA) and then enzymatically fragmented. Samples were then hybridized overnight to an 8-sample BeadArray, in which the WGA-DNA molecules anneal to locus-specific DNA oligomers linked to individual bead types. After the chemistry steps, BeadArrays were scanned and the raw signal intensities were extracted from the IDAT files using the 'noob' function in the minfi R package. The 'noob' function corrects for background fluorescence intensities and red-green dye-bias as described by Triche et al. (37). The beta (β) value for each probe was calculated as $(M/(M+U))$, in which M and U refer to the (pre-processed) mean methylated and unmethylated probe signal intensities, respectively. Measurements in which the fluorescent intensity was not statistically significantly above background signal (detection p value > 0.05) were removed from the data set.

Analysis of DNA methylation

The moderated t-test in limma package was used to test against the null hypothesis of no difference in methylation between two groups. The negative binomial model in DESeq2 was used to test against the null hypothesis of no difference in gene expression between two groups. The Fisher Exact tests were used to test if the differentially methylated probes are associated with any features, including enhancer, DMR, TFBS and open Chromatin.

The average β value reports a methylation signal ranging from 0 to 1, representing completely unmethylated to completely methylated values, respectively. In addition to β values, we also used M-values in this report ($M\text{-value} = \log(\beta / (1 - \beta))$) because of stronger signals for quantifying methylation levels (38). Hierarchical unsupervised clustering analysis was performed using the Pearson correlation coefficient as the distance metrics and the ward's linkage rule. Firstly, we selected the top 1000 most variable probes located in CGI to perform unsupervised clustering analysis. To avoid bias related to E-CIMP samples, those samples were excluded and unsupervised clustering analysis using the M values of top 5000 most variable probes was performed.

Probes with adjusted p-values <0.05, and $\Delta\beta \geq 0.2$ or ≤ -0.2 were considered statistically significant and differentially methylated between the 2 epi-clusters identified. Regarding

promoter methylation, probes with a β -value ≤ 0.2 were considered unmethylated and those with a β -value ≥ 0.3 were considered methylated. Gene Ontology enrichment analysis was performed using differentially methylated probes using DAVID Bioinformatics resources database. Categories that displayed a fold enrichment ≥ 2 , p-value $< 10^{-3}$ and a FDR < 0.05 were considered as statistically significant.

Immunohistochemistry

All immunohistochemical analyses were made on serial freshly cut 4 μm sections of the selected bloc. Stains were obtained using a Ventana Benchmark automated method for Chromogranin A (clone DAK-A3, Dako), synaptophysin (clone DAK-SYNAP, Dako), CD56 (NCAM1) (Clone 1B6, Novocastra) and S100 protein (Z 0311, polyclonal, Dako). Ki67 proliferation index was studied using the clone MIB1 (Dako). To characterize TILs, whole sections were stained for CD4 (clone SP35 Ventana Medical System) and CD8 (clone 144B Dako). The expression of PD-L1 was investigated using the clone E1L3N (Cell Signaling). For TP53 we used clone DO-7 (Dako) and for KIT we used anti CD117 antibody (clone c-KIT, Dako). Streptavidin-biotin peroxidase detection system (DAB Map detection kit, Ventana, Roche) was used to detect primary antibodies fixation. All IHC protocols for primary antibodies are summarized in supplementary table S3. Quantification of Ki67 index was achieved by counting in hotspots using ImageJ software (counting tool). A minimum of 1000 nuclei was counted to determine the percentage of positive nuclei. To comfort Ki-67 relevance, it was compared to a mitotic count for 10 HPF ($=2,5 \text{ mm}^2$). For the quantification of TILs, slides were digitalized using Aperio AT2 slide scanner (Leica Biosystems). On digitalized slides, hotspot areas were determined at low magnification, then 5 fields of $0.2 \mu\text{m}^2$ were delimited using Aperio Imagescope Software (Leica Biosystems). Lymphocytes were manually counted using ImageJ Aperio Imagescope counting tool. Lymphocytes were counted, blinded to the clinical data, within the stromal area of the tumor and within the tumor lobules themselves. CD4+ cells displaying macrophages features were excluded. PD-L1 expression was evaluated on digital slides, globally without distinction between tumor or immune cells. It was quantified as follow: negative, positive in less than 1% of cells, positive in 1 to 5% of cells, positive in 5 to 50% of cells of positive in more than 50% of cells.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Fisher's exact test for categorical variables and Mann Whitney test for continuous variables. Correlation between 2 continuous parameters was

evaluated by Pearson coefficient when distribution was normal, by Spearman coefficient otherwise. Cumulative survival time was calculated by the Kaplan-Meier method and analyzed by the log-rank test. All statistical tests were two sided and conducted at the significance level of 0.05 using Prism v.7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

References

1. Bell D, Franchi A, Gillison M, et al. Olfactory neuroblastoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis J, Takata T, Slootweg P, editors. Who classification of head and neck tumours (4th edition): IARC (International Agency for Research on Cancer); 2017. p. 57-59.
2. Malouf GG, Casiraghi O, Deutsch E, et al. Low- and high-grade esthesioneuroblastomas display a distinct natural history and outcome. *Eur J Cancer*. 2013;49:1324-1334.
3. Gay LM, Kim S, Fedorchak K, et al. Comprehensive genomic profiling of esthesioneuroblastoma reveals additional treatment options. *Oncologist*. 2017.
4. Lazo de la Vega L, McHugh JB, Cani AK, et al. Comprehensive molecular profiling of olfactory neuroblastoma identifies potentially targetable fgfr3 amplifications. *Mol Cancer Res*. 2017.
5. Czapiewski P, Kunc M, Haybaeck J. Genetic and molecular alterations in olfactory neuroblastoma: Implications for pathogenesis, prognosis and treatment. *Oncotarget*. 2016;7:52584-52596.
6. Bockmuhl U, You X, Pacyna-Gengelbach M, et al. Cgh pattern of esthesioneuroblastoma and their metastases. *Brain Pathol*. 2004;14:158-163.
7. Riazimand SH, Brieger J, Jacob R, et al. Analysis of cytogenetic aberrations in esthesioneuroblastomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;136:53-57.
8. Weiss GJ, Liang WS, Izatt T, et al. Paired tumor and normal whole genome sequencing of metastatic olfactory neuroblastoma. *PLoS One*. 2012;7:e37029.
9. Fletcher RB, Das D, Gadye L, et al. Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell resolution. *Cell Stem Cell*. 2017;20:817-830 e818.
10. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25:1010-1022.
11. Hirata M, Sasaki M, Cairns RA, et al. Mutant idh is sufficient to initiate enchondromatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:2829-2834.
12. Maguire LH, Thomas AR, Goldstein AM. Tumors of the neural crest: Common themes in development and cancer. *Developmental Dynamics*. 2015;244:311-322.
13. Katoh H, Shibata S, Fukuda K, et al. The dual origin of the peripheral olfactory system: Placode and neural crest. *Molecular Brain*. 2011;4:34.

14. Dogan S, Chute DJ, Xu B, et al. Frequent *idh2* r172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas. *J Pathol.* 2017;242:400-408.
15. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: A critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 2011;24:157-167.
16. Schwob JE, Jang W, Holbrook EH, et al. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol.* 2017;525:1034-1054.
17. Bell D FA, Gillison M, Thompson L.D.R, Wenig B.M. Tumours of the nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. In: El-Naggar AK CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editor. *Who classification of head and neck tumours.* 9. 4th ed: IARC; 2017. p. 57-59.
18. Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. *Idh1* mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483:479-483.
19. Letouze E, Martinelli C, Loriot C, et al. *Sdh* mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell.* 2013;23:739-752.
20. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a cpg island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell.* 2010;17:510-522.
21. Rijlaarsdam MA, Tax DM, Gillis AJ, et al. Genome wide DNA methylation profiles provide clues to the origin and pathogenesis of germ cell tumors. *PLoS One.* 2015;10:e0122146.
22. Zhang X, Liu S, Shen C, et al. DNA methylation consistency implicates the primary tumor cell origin of recurrent hepatocellular carcinoma. *Epigenomics.* 2015;7:581-592.
23. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' utr: Translational control and development. 2003;4:626.
24. Nguyen MLT, Jones SA, Prier JE, et al. Transcriptional enhancers in the regulation of t cell differentiation. *Front Immunol.* 2015;6.
25. Ong CT, Corces VG. Enhancers: Emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep.* 2012;13:423-430.
26. Lou S, Lee HM, Qin H, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biol.* 2014;15:408.
27. Basile D, Garattini SK, Bonotto M, et al. Immunotherapy for colorectal cancer: Where are we heading? *Expert Opin Biol Ther.* 2017:1-13.

28. Petitprez F, Vano YA, Becht E, et al. Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother.* 2017.
29. Soliman H, Khalil F, Antonia S. Pd-11 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One.* 2014;9:e88557.
30. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory t cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccines (Basel).* 2016;4.
31. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, et al. Tils in head and neck cancer: Ready for clinical implementation and why (not)? *Head Neck Pathol.* 2016.
32. Malouf GG, Su X, Yao H, et al. Next-generation sequencing of translocation renal cell carcinoma reveals novel rna splicing partners and frequent mutations of chromatin-remodeling genes. *Clin Cancer Res.* 2014;20:4129-4140.
33. Arita H, Narita Y, Matsushita Y, et al. Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of idh1/2 mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32:22-30.
34. da Huang W, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009;37.
35. Campan M, Weisenberger DJ, Trinh B, et al. MethyLight. *Methods Mol Biol.* 2009;507:325-337.
36. Moran S, Arribas C, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 cpg sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics.* 2016;8:389-399.
37. Triche TJ, Jr., Weisenberger DJ, Van Den Berg D, et al. Low-level processing of illumina Infinium DNA methylation beadarrays. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e90.
38. Du P, Zhang X, Huang CC, et al. Comparison of beta-value and m-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:587.

Figure legends

Figure 1: Landscape of somatic mutations in Esthesioneuroblastomas (ENBs) and clinicopathological characteristics of the *IDH2* mutated cases.

(A) The heatmap represents individual mutations in 14 patient samples, color-coded by type of mutation. Up: Histogram shows the number of mutations in each sample. Right: annotation of clinicopathological tumor and patients features. Bottom: Heatmap of clinicopathological tumor and patient features.

(B) Immunohistochemical profile of *IDH2* mutated case showing focal expression of chromogranin A (CHGA), heterogeneous expression of cytokeratins in tumor cells, high Ki67 proliferation index and cytoplasmic expression of the *IDH2* mutant protein.

(C) Immunohistochemical profile of *IDH2* wild type case showing a diffuse granular cytoplasmic expression of CHGA, no expression of cytokeratins, low to moderate Ki67 proliferation index and no expression of the *IDH2* mutant protein.

(D) Stacked bar graph of distribution of *IDH2* mutation according to Hyams grade (Fisher's exact test, $p=0.009$).

(E) Bar graph of average expression level of chromogranin A explored by IHC, showing a significantly higher Ki67 proliferation index in the *IDH2* mutated as compared to *IDH2* wild type ENBs (Mann Whitney test $p<0.0001$).

(F) Bar graph showing a significantly lower expression of CHGA in the *IDH2* mutated as compared to *IDH2* wild type ENBs (Mann Whitney test $p=0.02$).

(G) Bar graph showing a significantly lower expression of synaptophysin in the *IDH2* mutated as compared to *IDH2* wild type ENBs (Mann Whitney test $p=0.002$).

(H) Bar graph showing a significantly higher expression of CKAE1/AE3 in the *IDH2* mutated as compared to *IDH2* wild type ENBs (Mann Whitney test $p=0.002$).

(I) Kaplan-Meier survival curves of overall survival of patients displaying an *IDH2* wild type as compared to *IDH2* mutated ENB showing no difference ($p=0.4$)

Figure 2: Subtypes classification of esthesioneuroblastomas

(A) Unsupervised hierarchical clustering using the top 1500 most variable genes, revealing two subgroups, basal (left) and neural (right). Bottom: clinicopathological tumor characteristics according to the subtype classification

(B) Heatmap depicting genes related to gene ontology terms most significantly enriched in neural as compared to basal ENB subtype.

(C) Heatmap depicting genes related to KEGG pathways which were most significantly enriched between neural and basal ENB subtypes.

Figure 3: Gene signatures distinguishing esthesioneuroblastomas (ENB) transcriptomic subtypes are linked to specific tissue types or cell of origins composing olfactory mucosa

(A) The top set of 700 mRNAs distinguishing between ENB transcriptomic subtypes were examined in the Fantom consortium expression dataset of various cell types or tissues from human specimens (n=850 profiles). For these 700 mRNAs, the differential patterns within ENBs are shown off to the left. Region sharing similarity with ENB subtype-specific signature is highlighted. Membership of the Fantom profiles in general categories of “CNS” (related to central nervous system), “squamous” (including nasal regions, keratin/skin/epidermis) or “immune” (immune cell types or blood or related tissues) is indicated. Up: Average expression similarity correlation (Pearson’s t-statistic) between ENB molecular subtypes (rows) and fantom human cell types or tissues in selected categories (columns).

(B) Heat maps showing inter-sample correlations (yellow, positive) between mRNA profiles of ENB (columns) and mRNA profiles of olfactory mucosa cell types (rows). Abbreviations: Horizontal Basal Cells (HBC); Globose Basal Cells (GBC); Immature Neuron progenitors (INP); immature olfactory sensory neurons (iOSNs); mature olfactory sensory neurons (mOSNs); mature sustentacular cells (mSUS); immature sustentacular cells (iSUS); Microvillous cells (MV).

Figure 4: Protein-based expression clustering of esthesioneuroblastomas (ENB)

(A) Hierarchical unsupervised clustering based on 4 protein markers (Ki67, S100, cytokeratins and chromogranin A) applied to 18 ENB assessed by RNAseq. Each column represents one ENB sample, and each row one protein marker. Upper: Clinicopathological tumors features, *IDH2* status and the mRNA-based classification subtype (Neural or Basal).

(B) Hierarchical unsupervised clustering based on the same 4 protein markers applied to 51 ENB samples with available data. Upper: Clinicopathological tumors features, *IDH2* status and the mRNA-based classification subtype whenever available.

(C) Interval bar graph showing enrichment of males in the basal as compared to neural ENB (Fisher's exact test, p=0.01).

(D) Kaplan-Meier curves showing shorter overall survival for patients with tumors belonging to basal cluster as compared to those belonging to neural cluster (logrank, p=0.008)

Figure 5: Methylation landscape of esthesioneuroblastomas (ENBs) subtypes

(A) Unsupervised hierarchical clustering of ENB samples (n=27) using M-values of 1000 most variable probes in CpG islands. Note that all *IDH2* mutated ENB cases gathered together and display a CpG island methylator phenotype (E-CIMP)

(B) Bar graph showing the enrichment of genomic and functional distribution of differentially methylated probes between *IDH2* mutated and *IDH2* wild type ENBs.

(C) Unsupervised hierarchical clustering of ENB samples without *IDH2* mutations (n=22) according to most variable 5000 probes (using M values). Note that neural and basal ENB samples cluster together.

(D) Bar graph showing the enrichment of genomic and functional distribution of differentially methylated probes between neural and basal ENBs. Note the striking enrichment for enhancers and 3'UTR in probes losing methylation and gaining in neural as compared to basal ENBs.

Figure 6: Immune microenvironment of Esthesioneuroblastomas (ENBs)

(A-B) Immunohistochemical staining (x 20 magnification) of CD4 in neural (A) and basal (B) ENB showing a weak density of CD4+ T cells in neural and a high density of CD4+ T cells in basal ENB.

(C) Box plot of the mean density of CD4+ T cells / mm² according to ENB subtype, showing a greater number of intra-tumoral CD4+ T cells in basal as compared to neural ENBs (Mann-Whitney, p<0.0001) (mean +/- SEM).

(D-E) Immunohistochemical staining (x 20 magnification) of CD8 in neural (D) and basal (E) ENB showing a weak density of CD8+ T cells in neural and a high density of CD8+ T cells in basal ENB.

(F) Box plot of the mean density of CD8+ cells / mm² according to ENB subtype, showing a greater number of intra-tumoral CD8+ T cells in basal as compared to neural ENBs (Mann-Whitney, p<0.0001) (mean +/- SEM).

(G) Heatmap of immune genes in neural and basal ENBs. Note that ENB cases have been ordered according to their CD8+ T Cell count in each subtype. NB: TILs count was not available for ENB-59T case.

(H) Immunohistochemical staining of PD-L1 in a relevant basal type ENB (x20 magnification).

(I) Stacked bar graph of the number of cases showing PD-L1 positive staining ($\geq 1\%$ of positive cells) in neural and basal ENBs (Fisher's exact, p=0.06).

Tables' legends

Table 1: Association between clinicopathologic esthesioneuroblastoma features and IDH2 mutation status.

Table 2: Association between clinicopathologic features of ENB and protein-based classification of ENB subtypes in neural and basal categories.

Supplementary figures

Figure S1: Kaplan-Meier curves for overall survival.

(A) Kaplan-Meier curves for patients overall survival according to Hyams grade (low versus high). Note a longer survival of patients with low grade tumors (grade I-II) as compared to those with high grade tumors (HR= 0.19; CI95%: 0.06-0.59).

(B) Kaplan-Meier curves for patients overall survival according to Dulguerov T stage showing a non-significant longer survival in Dulguerov I-II ENBs than in Dulguerov III-IV cases (logrank test, HR= 0.2347 CI95% 0.06224 to 0.8849).

Figure S2: Immunohistochemical staining features of *TP53* mutated cases.

(A): Immunohistochemical staining features of *TP53* stopgain mutation in ENB-28T responsible for a loss of expression (x20 magnification).

(B): Immunohistochemical staining features of *TP53* mutation R248W in ENB-13T responsible for a diffuse nuclear overexpression (x20 magnification).

(C): Immunohistochemical staining features of *TP53* mutation C135F in ENB-59T responsible for a diffuse nuclear overexpression (x20 magnification).

Figure S3: Phylogenetic tree showing the common shared mutations present in 2 different sections of the primary tumor samples studied (ENB-18T and ENB-59T)

Figure S4: Heatmap of somatic mutations in the validation set of 13 ENBs, grouped by pathways. At the bottom are displayed the clinicopathological tumor characteristics.

Figure S5: Unique profile of esthesioneuroblastomas across cancer subtypes.

(A) Unsupervised hierarchical clustering using the 1500 most highly variable genes between Esthesioneuroblastoma (ENB), Squamous cell carcinoma (SCC), intestinal type adenocarcinoma (ITAC) and healthy sinonasal mucosa.

(B) Principal component analysis using the 1500 most highly variable genes between ENB, SCC, ITAC and healthy sinonasal mucosa.

(C) Unsupervised hierarchical clustering of ENB and 15 tumor subtypes extracted from TCGA database (Adrenocortical carcinoma [ACC], Bladder Urothelial Carcinoma [BLCA], Breast invasive carcinoma [BRCA], Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma [CESC], Colon adenocarcinoma [COAD], Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma [DLBC], Esophageal carcinoma [ESCA], Glioblastoma multiforme [GBM], Head and Neck squamous cell carcinoma [HNSC], Kidney Chromophobe [KICH], Kidney renal clear cell carcinoma [KIRC], Kidney renal papillary cell carcinoma [KIRP], Acute Myeloid Leukemia [LAML], Brain Lower Grade Glioma [LGG], Liver hepatocellular carcinoma [LIHC], Lung adenocarcinoma [LUAD], Lung squamous cell carcinoma [LUSC], Mesothelioma [MESO], Ovarian serous cystadenocarcinoma [OV], Pancreatic adenocarcinoma [PAAD], Pheochromocytoma and Paraganglioma [PCPG], Prostate adenocarcinoma [PRAD], Rectum adenocarcinoma [READ], Sarcoma [SARC], Skin Cutaneous Melanoma [SKCM], Stomach adenocarcinoma [STAD], Thyroid carcinoma [THCA], Uterine Corpus Endometrial Carcinoma [UCEC], Uterine Carcinosarcoma [UCS]). Note that ENB, Glioblastoma and paraganglioma clustered together.

Figure S6: Focus on overexpression of genes differentiating neural from basal ENBs.

(A): Heatmap showing the expression level (z-score) in ENB (columns) of genes (rows) highly expressed in globose basal cells (*IDH2*, *KIT*, *NOTCH2*, *MYC*, *MYB*, *GRHL2* and *MKI67*) and Immature Neuron progenitors (INP2-3) (*NEUROD1*, *UNCX*, *NHLH1*, *CGHA*, *NCAM1*, and *SYP*).

(B) Immunohistochemical staining of c-KIT in a representative basal case showing a diffuse cytoplasmic staining of KIT with a membrane strengthening.

Figure S7: box plot of log expression level of genes displaying Exon1 methylation in *IDH2* mutant as compared to *IDH2* WT ENBs.

Figure S8: Supervised clustering of TCGA Glioblastomas (GBM) samples using the 1500 most differentially methylated probes between *IDH2* mutated and wild type esthesioneuroblastomas. Note that this signature was capable of distinguishing GBM with *IDH1-2* mutations as compared to the remaining cases.

Figure S9: Methylation features of promoters located in CpG Islands (CGIs) according to esthesioneuroblastoma (ENBs) subtypes' classification

(A) Boxplots of mean β value of probes located in promoter CGIs of basal as compared to neural ENBs (Mann-Whitney, $p < 0.0001$).

(B) Stack bar graph of β value of probes differentially methylated between neural and basal ENB.

(C) Bar graph of average expression level of genes with gain or loss of DNA methylation in promoter CGI in basal as compared to neural promoter methylation level showing increased mean expression levels of genes displaying promoter demethylation in neural as compared to basal ENBs.

Supplementary tables:

Table S1: List of clinicopathological features of the 59 esthesioneuroblastoma samples included in the analysis. DOD= dead of disease, AWD= alive with disease, NA= not available

Table S2: Association between clinicopathologic features of ENB and transcriptomic subtypes classification in neural and basal categories.

Table S3: Immunohistochemistry protocols

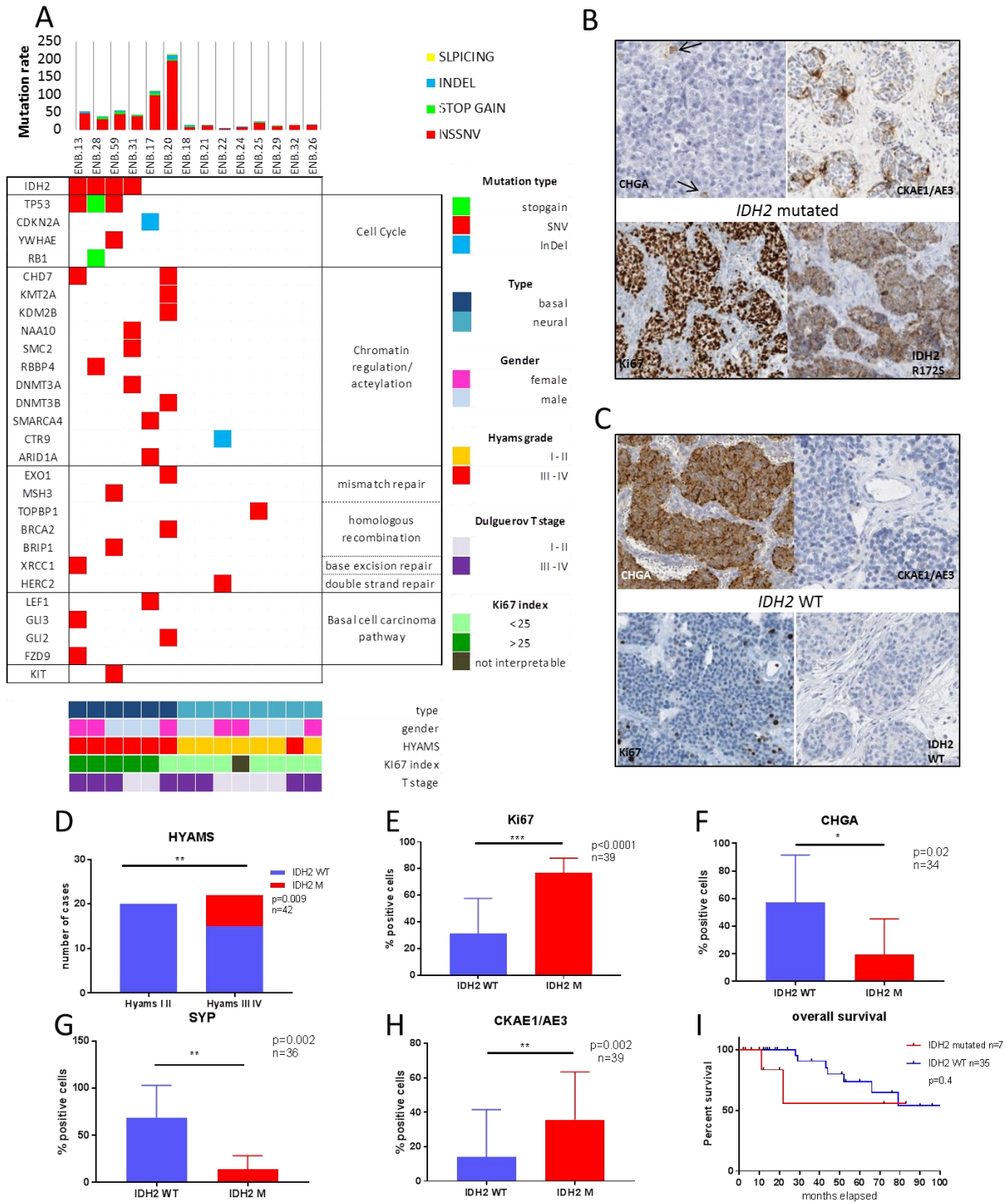


Figure 1

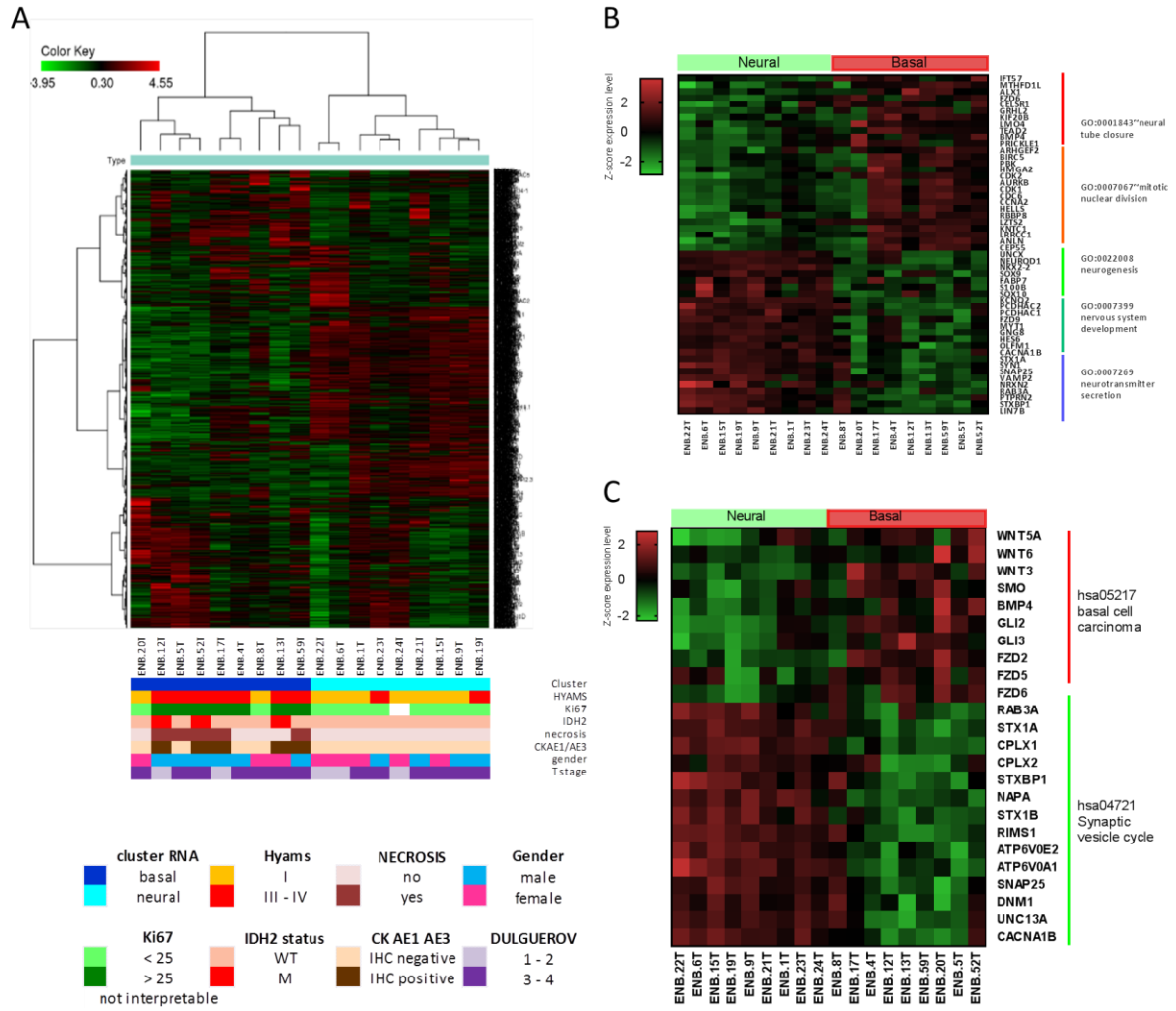


Figure 2

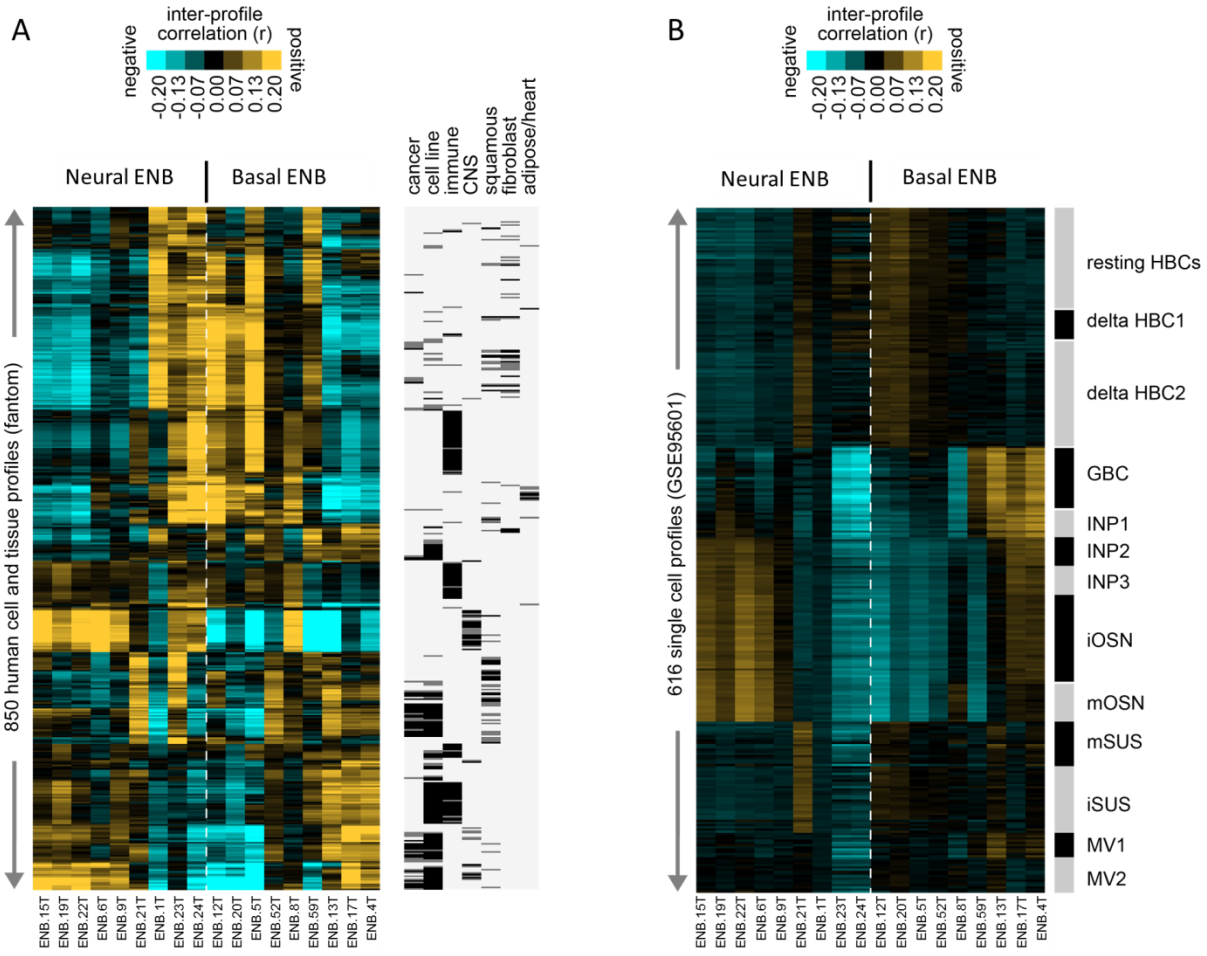


Figure 3

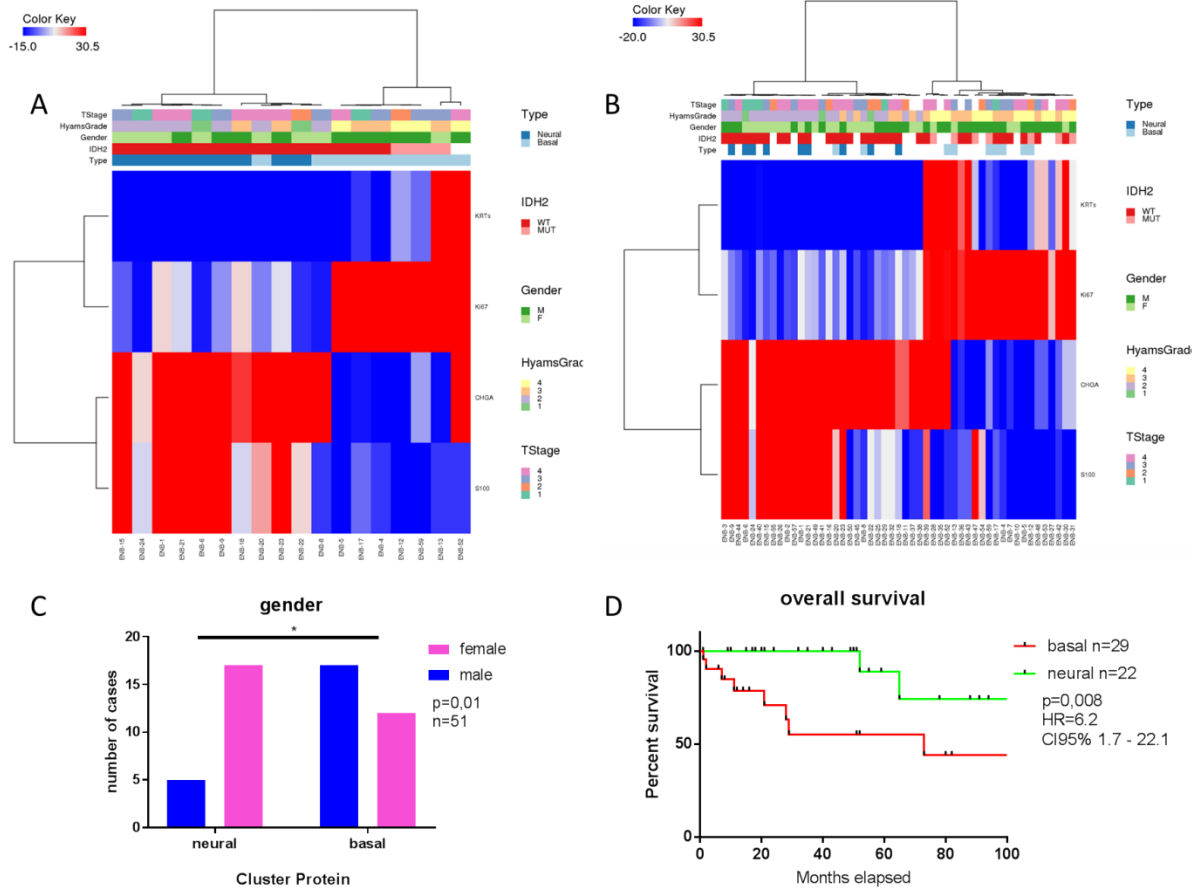


Figure 4

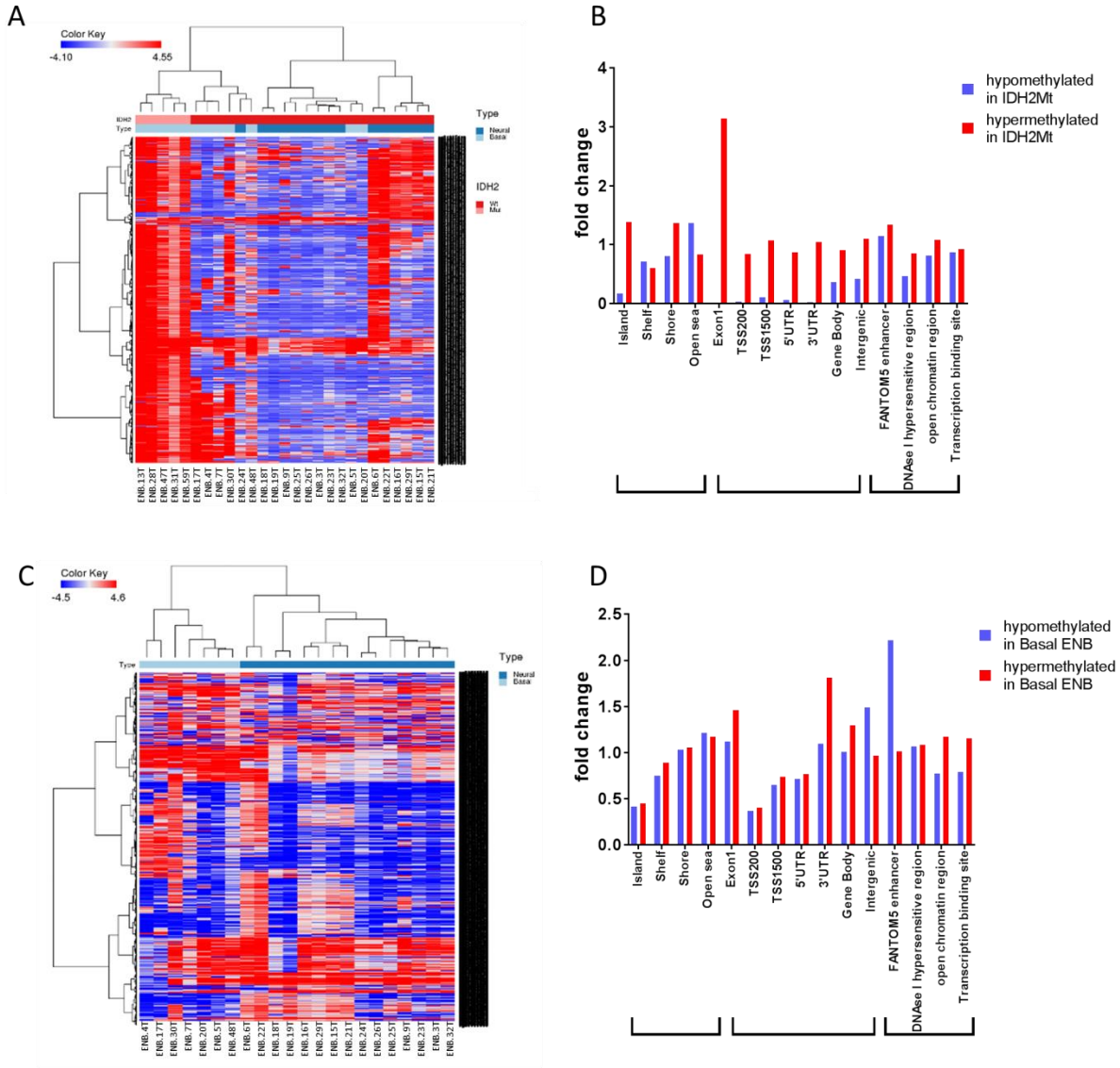


Figure 5

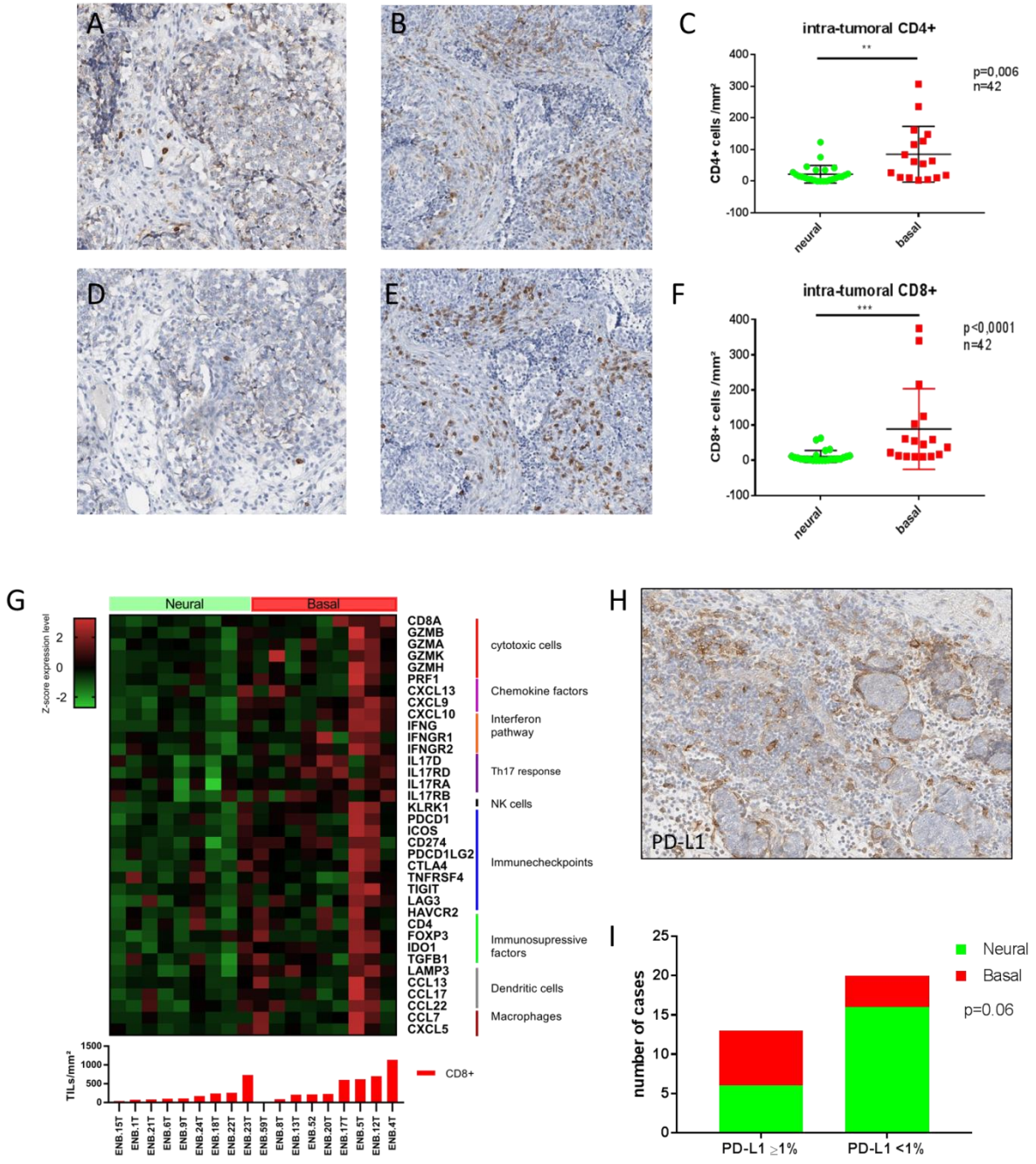


Figure 6

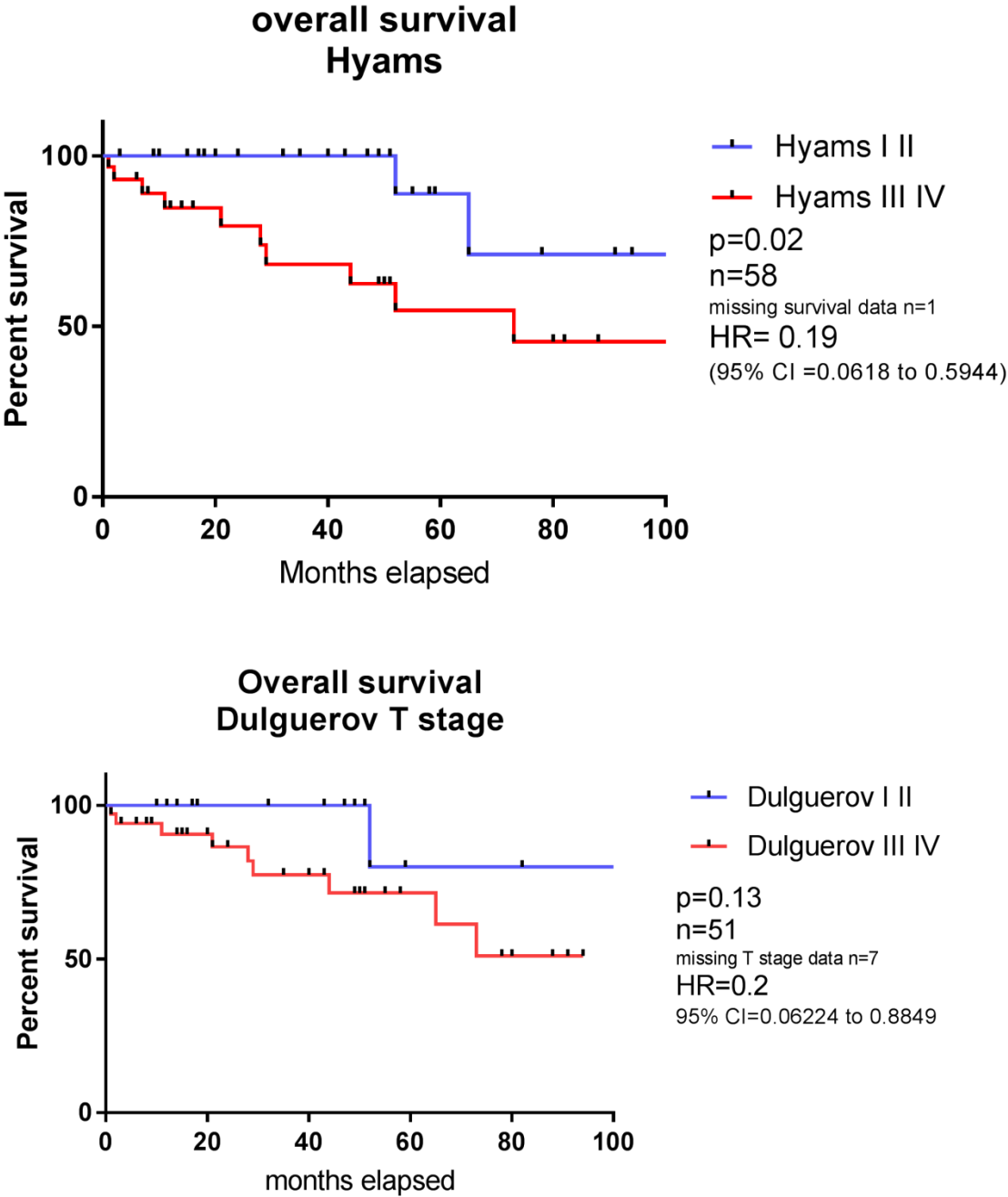


Figure S1

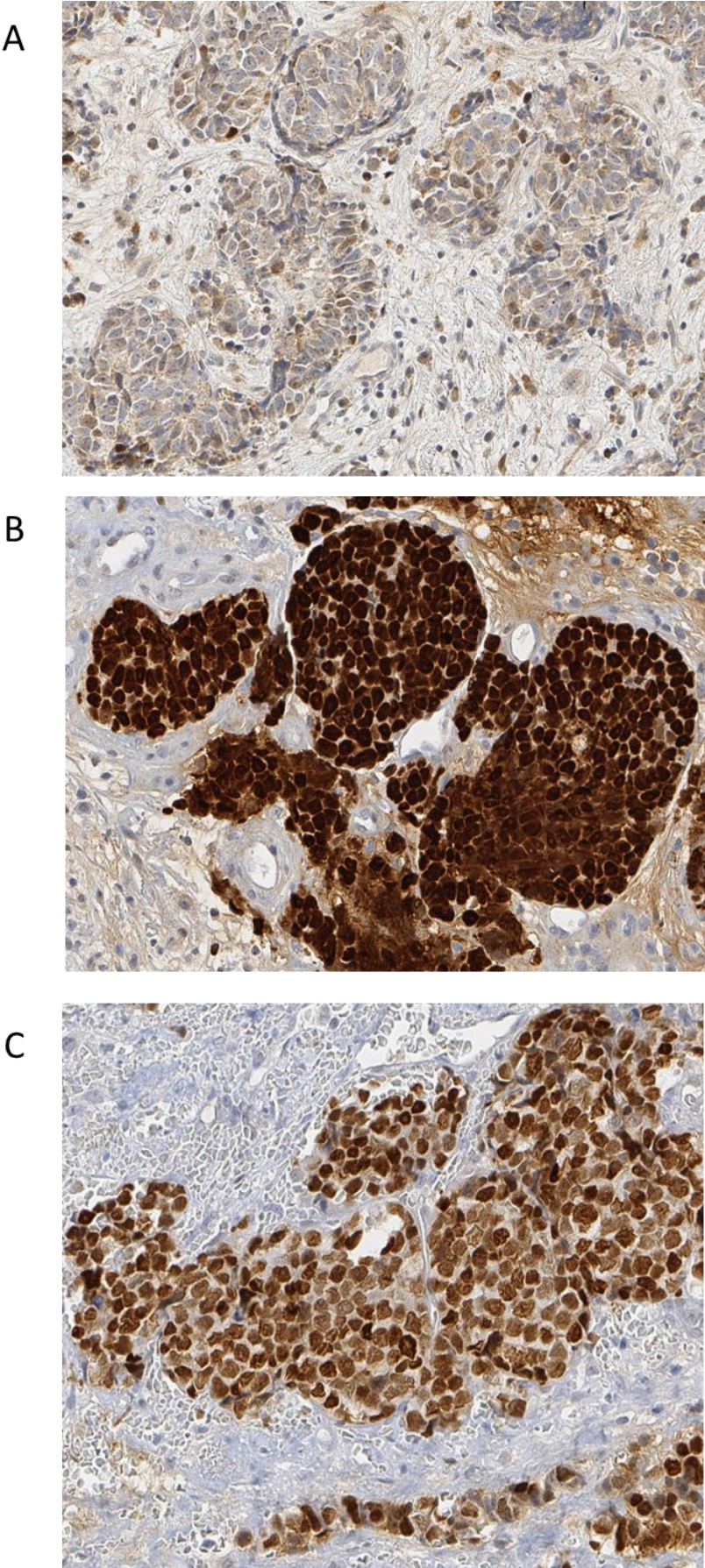


Figure S2

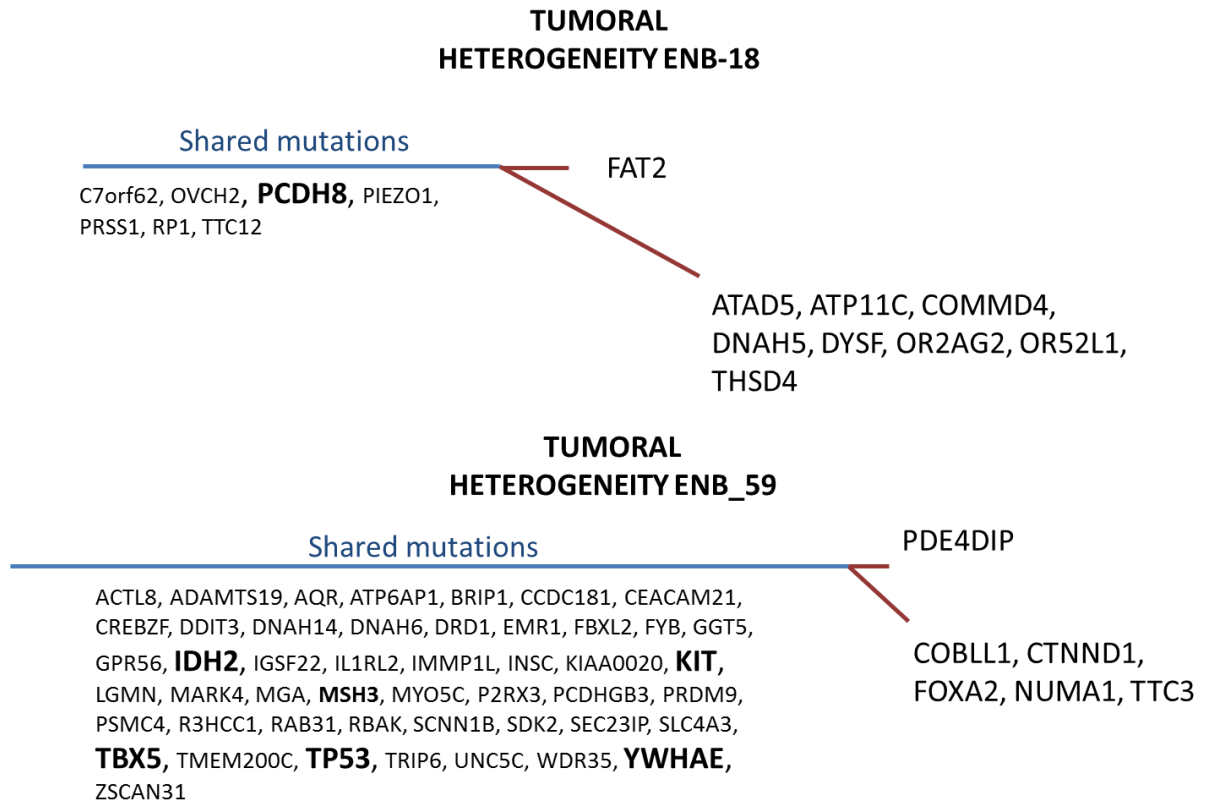


Figure S3

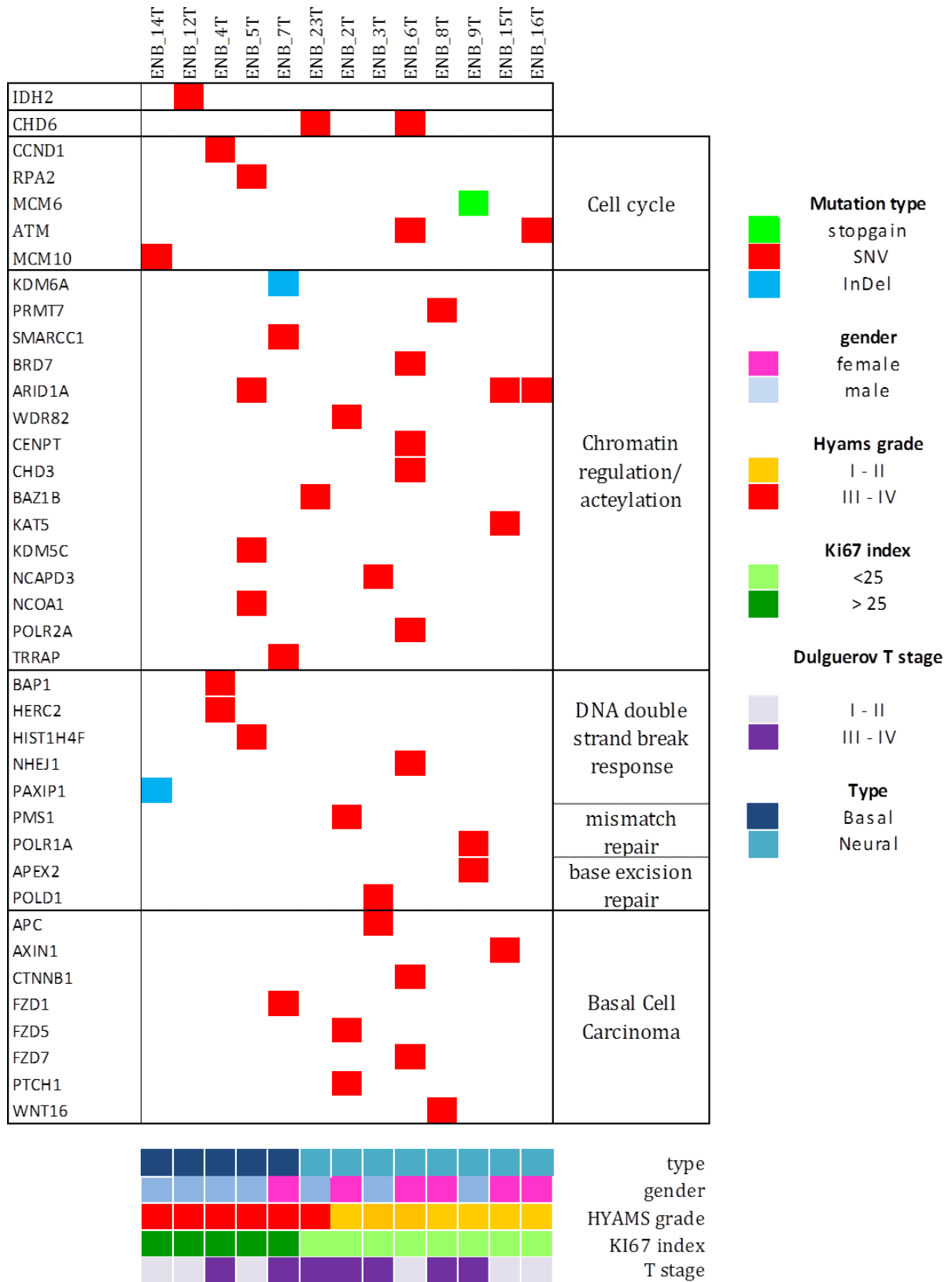


Figure S4

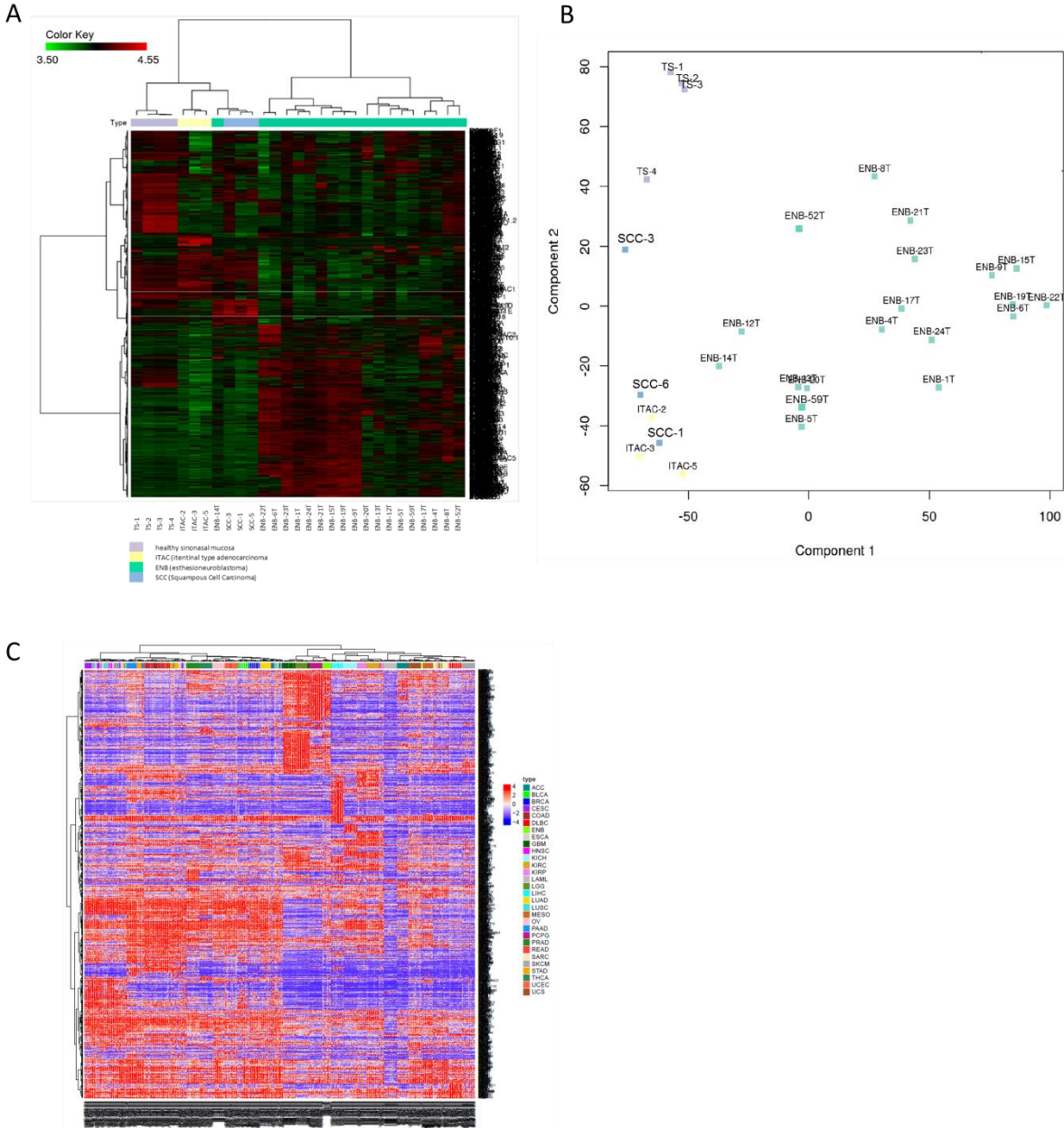


Figure S5

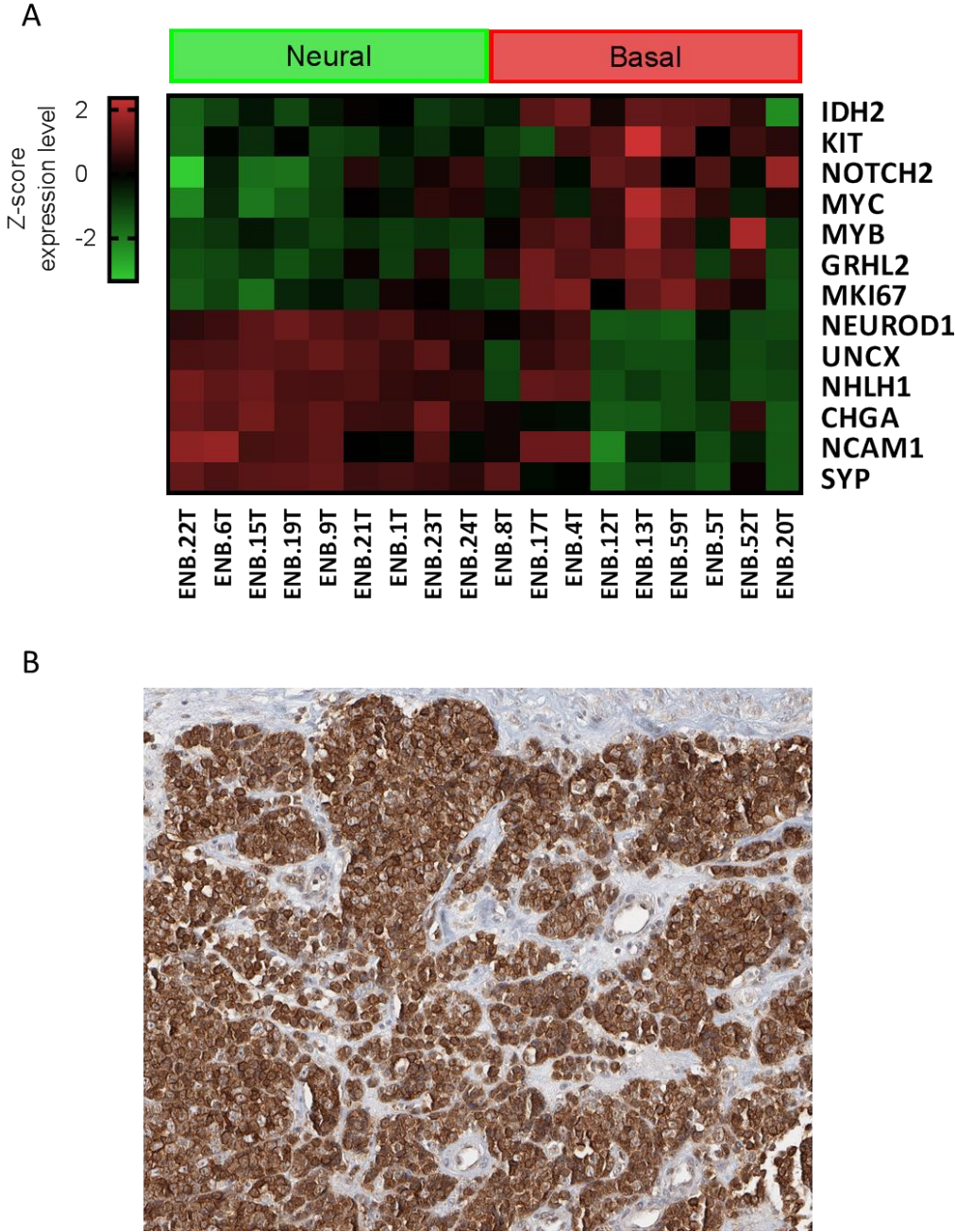


Figure S6

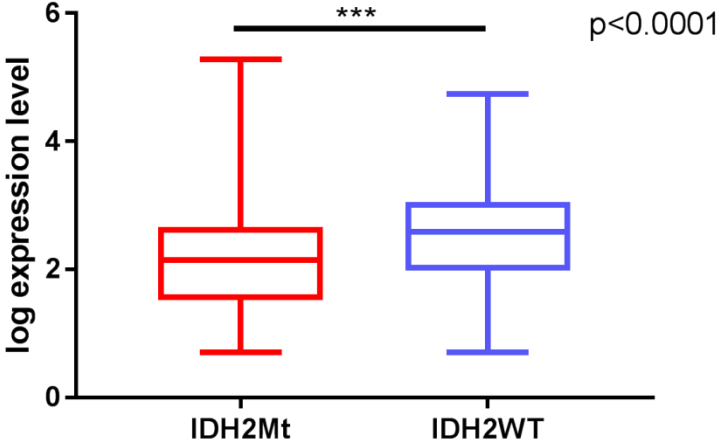


Figure S7

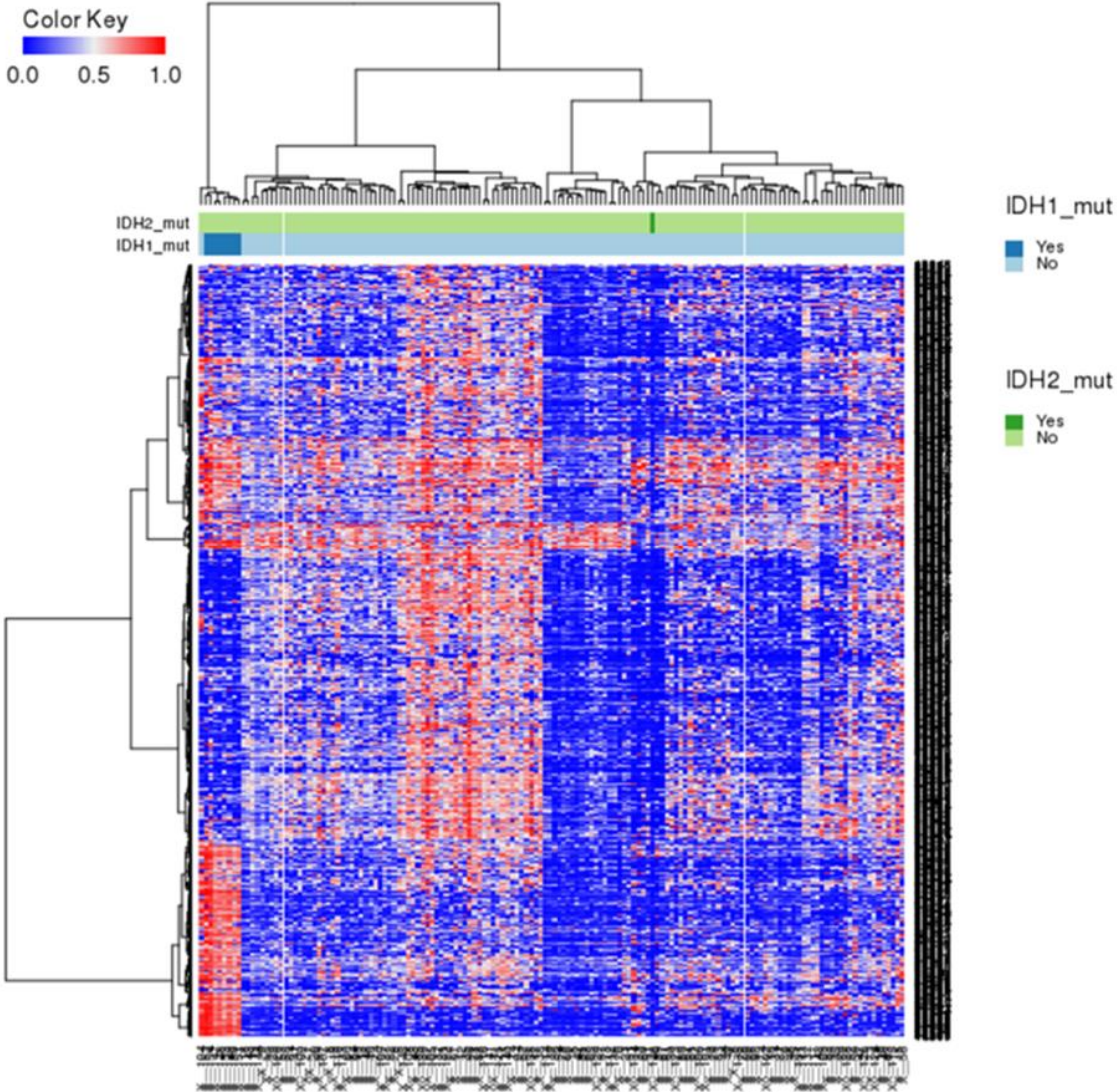


Figure S8

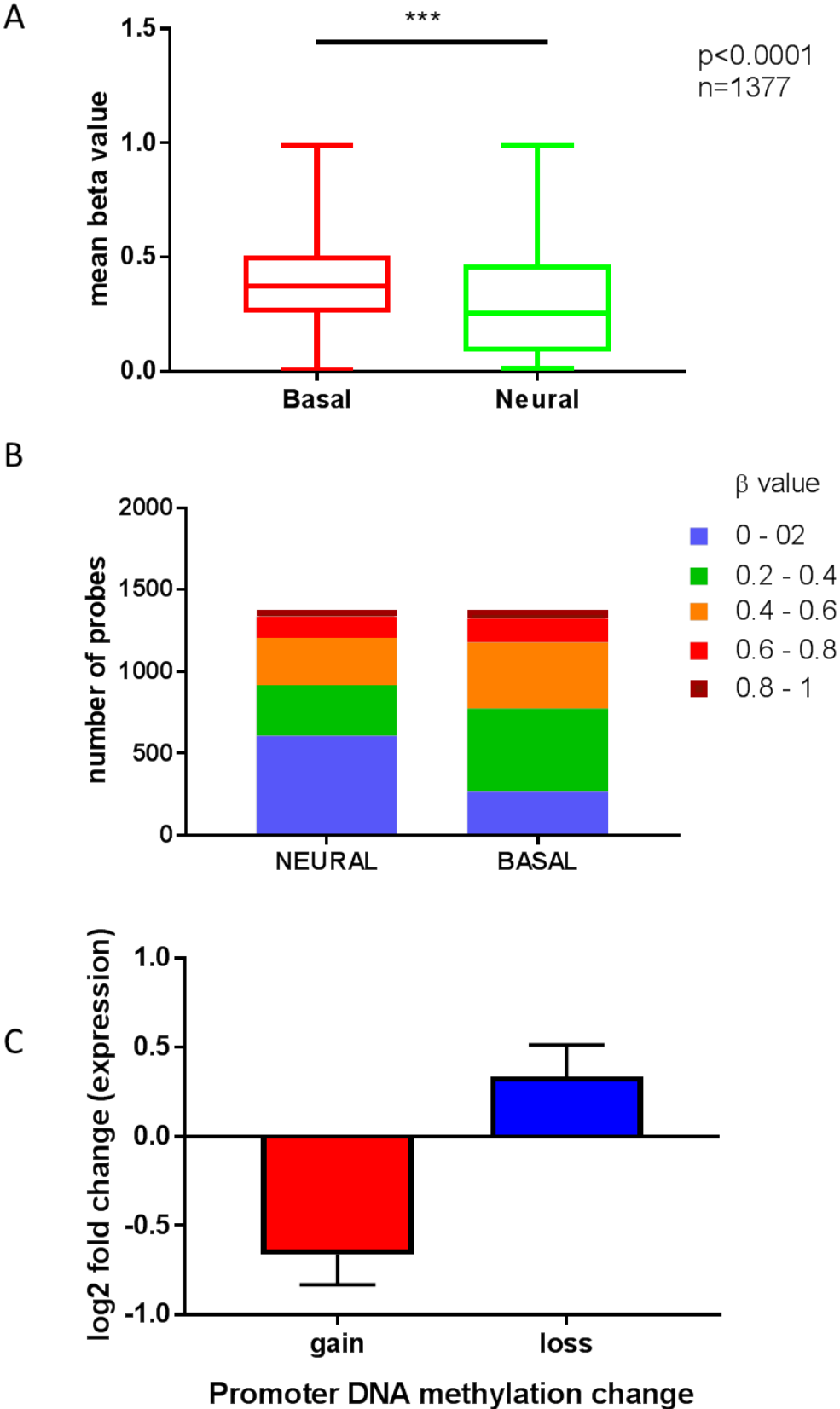


Figure S9

		IDH2 M (n=7)	IDH2 WT (n=35)	p value (test)
age				p=0,2
	mean	47.1 +/- 7.1 (n=7)	55.8 +/- 2.9 (n=35)	
sex				p=0,7
	Male	5	20	
	Female	2	15	
Hyams				p=0,009
	I-II	0	20	
	III-IV	7	15	
Ki67				P<0.0001
	median	80 (n=7)	22.2 (n=32)	
	NA	n=0	n=3	
Mitoses/2.5mm²				p=0,1
	Median +/- MAD	33 +/- 13 (n=6)	7 +/- 6 (n=33)	
	NA	n=1	n=2	
mutation rate				p=0,1
	Median +/- MAD	48.5 +/- 7 (n=4)	15.5 +/- 4.57 (n=10)	
	NA	n=3	n=25	
Necrosis				p=0,04
	No	3	29	
	Yes	4	6	
Chromogranin A (% tumor cells + by IHC)				p=0,02
	Median +/- MAD	12.5 +/- 9.5 (n=6)	75 +/- 15 (n=28)	
	NA	n=1	n=7	
Synaptophysin (% tumor cells + by IHC)				p=0,002
	Median +/- MAD	10 +/- 7.5 (n=6)	80 +/- 17.5 (n=30)	
	NA	n=1	n=5	
S100 sustentacular cells (% + by IHC)				p=0,02
	Median +/- MAD	2.5 +/- 2.5 (n=6)	25 +/- 25 (n=30)	
	NA	n=1	n=5	
CKAE1/AE3 (% tumor cells + by IHC)				p=0,002
	Median +/- MAD	25 +/- 10 (n=7)	0 +/- 0 (n=32)	
	NA	n=0	n=3	
Modified Kadish				P>0,9
	A-B	1	9	
	C-D	5	24	
	NA	n=1	n=2	
T Dulguerov (n=39)				p>0,9
	T1-T2	2	11	
	T3-T4	4	22	
	NA	n=1	n=2	

Table 1

		Neural (n=29)	Basal (n=22)	p value
age				p=0.2
	mean	49.5 +/- 3.07	56 +/- 4.23 (n=22)	
gender				p=0.01
	M	5	17	
	F	17	12	
Ki67				p<0.0001
	mean	13.6 +/- 1.47	65.5 +/- 4.44 (n=22)	
	NA	n=3	n=0	
mitoses /2.5mm² (n=16)				p<0.0001
	mean	5 +/- 0.73	34.9 +/- 3.02 (n=22)	
necrosis				p=0.001
	yes	3	12	
	no	26	10	
mutation rate				p=0.02
	median	15 (n=9)	53 (n=5)	
	NA	n=20	n=17	
Chromogranin A (% tumor cells + by IHC)				p<0.0001
	median	80 +/- 10	5 +/- 5 (n=21)	
	NA	n=1	n=1	
Synaptophysin (% tumor cells + by IHC)				p<0.0001
	median	90 +/- 10	10 +/- 10 (n=20)	
	NA	n=4	n=2	
S100 sustentacular cells (% + by IHC)				p<0.0001
	median	50 +/- 30	5 +/- 5 (n=19)	
	NA	n=2	n=3	
CKAE1/AE3 (% tumor cells + by IHC)				p<0.0001
	median	0 +/- 0 (n=28)	25 +/- 25 (n=21)	
	NA	n=1	n=1	
Hyams				p<0.0001
	I II	24	0	
	III IV	5	22	
Intra-tumoral CD20+ cells/mm²				p=0.7
	median	0 +/- 0 (n=25)	0 +/- 0 (n=17)	
	NA	n=4	n=4	
Intra-tumoral CD4+ cells/mm²				p=0,007
	median	14 +/- 10	62 +/- 51 (n=17)	
	NA	n=4	n=4	
Intra-tumoral CD8+ cells/mm²				p<0.0001
	median	4 +/- 4 (n=25)	45 +/- 34 (n=17)	
	NA	n=4	n=4	
Modified Kadish				p=0.3
	A-B	7	2	
	C-D	14	12	
Dulguerov				p=0,5
	T1-T2	8	3	
	T3-T4	13	11	

Table 2

ID	age	gender	HYAMS grade	necrosis	Ki67	mitoses /2,5mm ²	methylation	PAIRED WES	WES	number of mutations	IDH2 status
ENB-1	36	F	II	no	25	7	no	no	no	NA	WT
ENB-10	67	F	IV	yes	88	15	no	no	no	NA	NA
ENB-11	66	M	II	no	16	8	no	no	no	NA	NA
ENB-12	58	M	IV	yes	83	42	no	no	yes	NA	R172S
ENB-13	41	F	III	no	62	16	yes	yes	yes	53	R172S
ENB-14	80	M	III	no	48	20	no	no	yes	NA	WT
ENB-15	75	F	II	no	8.5	1	yes	no	yes	NA	WT
ENB-16	45	F	II	no	24	3	yes	no	yes	NA	WT
ENB-17	72	M	III	yes	70	42	yes	yes	yes	112	WT
ENB-18	44	M	III	no	25	7	yes	yes	yes	15	WT
ENB-2	78	F	II	no	8.4	7	no	no	yes	NA	WT
ENB-20	55	F	II	no	12	6	yes	yes	yes	219	WT
ENB-21	53	M	II	no	20	3	yes	yes	yes	16	WT
ENB-22	48	F	I	no	4.3	2	yes	yes	yes	6	WT
ENB-23	38	M	III	no	21	14	yes	no	yes	NA	WT
ENB-24	47	F	II	no	NI	2	yes	yes	yes	9	WT
ENB-25	66	M	II	no	15	7	yes	yes	yes	23	WT
ENB-26	66	F	II	no	1.2	1	yes	yes	yes	16	WT
ENB-27	44	M	IV	no	30.5	7	no	no	no	NA	NA
ENB-28	36	F	IV	yes	83	64	yes	yes	yes	39	R172T
ENB-29	44	M	II	no	11.7	6	yes	yes	yes	14	WT
ENB-3	36	M	II	no	23.4	10	yes	no	yes	NA	WT
ENB-30	74	F	IV	no	93	44	yes	no	no	NA	WT
ENB-31	76	M	IV	no	62	32	yes	yes	yes	44	R172T
ENB-32	47	M	III	no	13	5	yes	yes	yes	13	WT
ENB-33	51	M	IV	yes	NI	68	no	no	no	NA	na
ENB-34	50	M	IV	yes	77	57	no	no	no	NA	WT
ENB-35	62	M	IV	yes	54	46	no	no	no	NA	na
ENB-36	57	M	III	no	45	36	no	no	no	NA	WT
ENB-37	29	F	III	yes	NI	10	no	no	no	NA	na
ENB-38	63	F	II	yes	25	13	no	no	no	NA	WT
ENB-39	69	M	III	yes	48	63	no	no	no	NA	WT
ENB-4	61	M	III	no	76	33	yes	no	yes	NA	WT
ENB-40	65	F	II	no	16	10	no	no	no	NA	WT
ENB-41	26	M	I	no	9.5	0	no	no	no	NA	na
ENB-42	16	M	III	no	90	29	no	no	no	NA	R172T
ENB-43	77	M	III	no	54	37	no	no	no	NA	WT
ENB-44	51	M	II	no	9.7	3	no	no	no	NA	WT
ENB-45	35	F	III	yes	8.2	4	no	no	no	NA	NA
ENB-46	55	F	I	no	NI	5	no	no	no	NA	NA
ENB-47	48	M	IV	yes	79.4	34	yes	no	no	NA	R172K
ENB-48	53	M	III	no	75	44	yes	no	no	NA	WT
ENB-49	75	F	II	no	19.4	8	no	no	no	NA	NA
ENB-5	23	M	IV	yes	57	31	yes	no	yes	NA	WT
ENB-50	60	F	II	no	NA	3	no	no	no	NA	WT
ENB-51	20	M	I	no	NA	2	no	no	no	NA	WT
ENB-52	22	M	IV	yes	48.8	23	no	no	no	NA	NA
ENB-53	83	M	IV	yes	80	23	no	no	no	NA	NA
ENB-54	50	M	IV	yes	89	21	no	no	no	NA	NA
ENB-55	44	F	II	no	11	3	no	no	no	NA	NA
ENB-56	59	M	III	NA	55	NA	no	no	no	NA	NA
ENB-57	13	M	II	no	7	0	no	no	no	NA	NA
ENB-58	37	F	II	no	0.5	2	no	no	no	NA	NA
ENB-59	55	M	IV	yes	80	44	yes	yes	yes	59	R172S
ENB-6	19	F	I	no	2.4	0	yes	no	yes	NA	WT
ENB-60	81	M	IV	yes	80	NA	no	no	no	NA	WT
ENB-7	88	F	III	no	55	41	yes	no	yes	NA	WT
ENB-8	56	F	II	no	2.2	2	no	no	yes	NA	WT
ENB-9	55	M	II	no	13.5	0	yes	no	yes	NA	WT

ID	RNASeq	cluster RNA all samples (n=29)	cluster RNA ENB (n=18)	cluster protein	cluster methylation based on CGI	cluster methylation based on CGI removing CIMP	CD20 within tumor (cells/mm ²)	CD4 within tumor (cells/mm ²)	CD8 within tumor (cells/mm ²)
ENB-1	yes	2A	C2= neural	neural	NA	NA	0	42	14
ENB-10	no	NA	NA	basal	NA	NA	0	11	11
ENB-11	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	0	3
ENB-12	yes	2B	C1= basal	basal	NA	NA	0	5	13
ENB-13	yes	2B	C1= basal	basal	CIMP	CIMP	0	55	22
ENB-14	yes	1	NA	NA	NA	NA	0	11	0
ENB-15	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	3	21	8
ENB-16	no	NA	NA	neural	neural	neural	0	35	13
ENB-17	yes	2B	C1= basal	basal	basal	basal	8	127	216
ENB-18	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	6	1
ENB-2	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	0	4
ENB-20	yes	2B	C1= basal	neural	basal	basal	4	46	8
ENB-21	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	6	0
ENB-22	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	2	14	11
ENB-23	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	123	58
ENB-24	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	0	0
ENB-25	no	NA	NA	neural	neural	neural	NA	NA	NA
ENB-26	no	NA	NA	neural	neural	neural	1	7	7
ENB-27	no	NA	NA	basal	NA	NA	0	62	59
ENB-28	no	NA	NA	basal	CIMP	CIMP	0	84	17
ENB-29	no	NA	NA	neural	neural	neural	0	4	0
ENB-3	no	NA	NA	neural	neural	neural	8	76	2
ENB-30	no	NA	NA	basal	basal	basal	32	307	340
ENB-31	no	NA	NA	basal	CIMP	CIMP	6	148	55
ENB-32	no	NA	NA	neural	neural	neural	0	23	12
ENB-33	no	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-34	no	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-35	no	NA	NA	basal	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-36	no	NA	NA	basal	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-37	no	NA	NA	neural	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-38	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	0	0
ENB-39	no	NA	NA	basal	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-4	yes	2B	C1= basal	basal	basal	basal	0	162	375
ENB-40	no	NA	NA	neural	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-41	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	10	28
ENB-42	no	NA	NA	basal	NA	NA	3	116	61
ENB-43	no	NA	NA	basal	NA	NA	0	19	11
ENB-44	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	19	3
ENB-45	no	NA	NA	neural	NA	NA	4	16	0
ENB-46	no	NA	NA	NA	NA	NA	0	2	15
ENB-47	no	NA	NA	basal	CIMP	CIMP	NA	NA	NA
ENB-48	no	NA	NA	basal	basal	basal	0	11	125
ENB-49	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	14	4
ENB-5	yes	2B	C1= basal	basal	neural	basal	7	236	103
ENB-50	no	NA	NA	neural	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-51	no	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-52	yes	2B	C1= basal	basal	NA	NA	4	64	37
ENB-53	no	NA	NA	basal	NA	NA	0	3	10
ENB-54	no	NA	NA	basal	NA	NA	0	27	45
ENB-55	no	NA	NA	neural	NA	NA	30	35	3
ENB-56	no	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-57	no	NA	NA	neural	NA	NA	0	14	31
ENB-58	no	NA	NA	NA	NA	NA	64	125	107
ENB-59	yes	2B	C1= basal	basal	CIMP	CIMP	NA	NA	NA
ENB-6	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	11	4
ENB-60	no	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-7	no	NA	NA	basal	basal	basal	0	12	10
ENB-8	yes	2B	C1= basal	neural	NA	NA	28	28	63
ENB-9	yes	2A	C2= neural	neural	neural	neural	0	3	3

ID	PD-L1 global score	S100 IHC (% positive cells)	CKAE1/AE3 KRTs_IHC (% positive cells)	CHGA IHC (% positive cells)	SYP IHC (% positive cells)	NCAM IHC (% positive cells)
ENB-1	0	80	0	70	90	na
ENB-10	NA	0	0	0	0	80
ENB-11	NA	0	0	40	90	na
ENB-12	NA	0	15	0	5	15
ENB-13	NA	5	80	1	na	70
ENB-14	NA	0	60	na	na	60
ENB-15	<1%	70	0	80	80	100
ENB-16	<1%	50	0	80	100	90
ENB-17	<1%	10	5	2	2	40
ENB-18	<1%	20	0	40	80	na
ENB-2	0	90	0	80	80	na
ENB-20	NI	30	0	60	100	100
ENB-21	<1%	100	0	90	95	90
ENB-22	5-50%	25	0	80	90	100
ENB-23	<1%	50	0	90	100	na
ENB-24	NI	20	0	25	60	100
ENB-25	<1%	NA	0	80	80	100
ENB-26	1-5%	80	0	80	100	100
ENB-27	1-5%	0	10	0	0	80
ENB-28	1-5%	0	70	70	40	90
ENB-29	0	25	0	80	90	70
ENB-3	<1%	80	0	50	100	100
ENB-30	5-50%	0	50	20	50	80
ENB-31	5-50%	0	25	20	20	10
ENB-32	<1%	25	0	80	90	90
ENB-33	NA	5	60	na	5	na
ENB-34	NA	0	70	na	0	0
ENB-35	NA	na	70	50	80	na
ENB-36	NA	10	40	5	40	na
ENB-37	NA	5	0	50	60	na
ENB-38	<1%	5	0	90	90	na
ENB-39	NA	40	70	80	na	na
ENB-4	5-50%	5	0	0	10	25
ENB-40	NA	90	1	100	na	na
ENB-41	5-50%	50	0	80	80	na
ENB-42	<1%	5	30	10	10	100
ENB-43	NA	10	50	0	0	10
ENB-44	1-5%	100	0	70	na	100
ENB-45	NA	10	0	100	0	80
ENB-46	NA	80	0	0	10	100
ENB-47	5-50%	60	20	0	10	50
ENB-48	NA	0	30	10	0	40
ENB-49	<1%	80	0	80	70	80
ENB-5	5-50%	0	0	0	30	na
ENB-50	NI	NA	NA	90	90	na
ENB-51	<1%	NA	NA	NA	80	na
ENB-52	NA	5	90	60	60	80
ENB-53	<1%	0	30	10	20	40
ENB-54	NA	30	0	0	0	30
ENB-55	<1%	80	0	90	na	na
ENB-56	<1%	na	0	na	na	na
ENB-57	<1%	100	0	90	90	
ENB-58	5-50%	20	0	NA	NA	NA
ENB-59	NA	na	10	15	0	90
ENB-6	5-50%	100	0	70	80	100
ENB-60	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ENB-7	<1%	na	0	5	15	90
ENB-8	1-5%	5	0	80	100	na
ENB-9	0	80	0	60	80	na

ID	Dulguerov Tstage	RELAPSE	time to relapse (months)	recurrence localization	FOLLOW-UP	Status
ENB-1	4	yes	48	local	65.00	DOD
ENB-10	4	NA			6.00	alive
ENB-11	2	no			52.00	DOD
ENB-12	2	no			139.00	alive
ENB-13	3	no			80.00	alive
ENB-14	3	yes	31, 39, 44	vertebra	44.00	DOD
ENB-15	3	no			78.00	alive
ENB-16	2	no			49.00	alive
ENB-17	1	no			52.00	alive
ENB-18	4	no			50.00	alive
ENB-2	4	no			35.00	alive
ENB-20	4	no			40.00	alive
ENB-21	4	no			15.00	alive
ENB-22	2	no			17.00	alive
ENB-23	4	no			21.00	alive
ENB-24	1	no			10.00	alive
ENB-25	2	no			18.00	alive
ENB-26	4	yes	9	cervical lymph node	9.00	AWD
ENB-27	NA	yes	120, 156	local -orbit	191.00	AWD
ENB-28	4	no			14.00	alive
ENB-29	1	no			10.00	alive
ENB-3	1	no			51.00	alive
ENB-30	4	no			16.00	alive
ENB-31	2	no			12.00	alive
ENB-32	4	no			1.00	alive
ENB-33	NA	NA			0.00	NA
ENB-34	NA	no			52.00	DOD
ENB-35	NA	NA			7.00	DOD
ENB-36	NA	NA			1.00	NA
ENB-37	NA	no			1.00	NA
ENB-38	NA	yes	14, 156, 18	local	182.00	AWD
ENB-39	4	yes			29.00	DOD
ENB-4	3	NA			1.00	alive
ENB-40	1	no			43.00	alive
ENB-41	3	no			55.00	alive
ENB-42	4	yes	15, 22	lepto-meningeal	21.00	DOD
ENB-43	3	no			73.00	DOD
ENB-44	4	yes	72	local	94.00	AWD
ENB-45	3	NA			88.00	alive
ENB-46	4	NA			3.00	NA
ENB-47	NA	NA			6.00	alive
ENB-48	3	no			51.00	alive
ENB-49	4	yes	7	falx cerebri	35.00	AWD
ENB-5	4	yes		vertebra	28.00	DOD
ENB-50	4	no			20.00	alive
ENB-51	1	no			47.00	alive
ENB-52	4	no			2.00	DOD
ENB-53	4	NA			1.00	DOD
ENB-54	2	no			82.00	alive
ENB-55	2	no			32.00	alive
ENB-56	4	yes	12, 24, 72		49.00	alive
ENB-57	3	no			43.00	alive
ENB-58	4	no			58.00	alive
ENB-59	3	NA			11.00	DOD
ENB-6	1	no			59.00	alive
ENB-60	1	no			14.00	alive
ENB-7	3	NA			8.00	alive
ENB-8	3	no			24.00	alive
ENB-9	3	no			91.00	alive

Table S1

		Neural (n=9)	Basal (n=9)	P value
age	mean	46.1 +/- 5.1	49.2 +/- 5.71	p=0.7
sex	M	4	6	p=0.6
	F	5	3	
Ki67	mean	15 +/-3.2	54.6 +/- 9.7	p=0.003
	NA	n=1	n=0	
mitoses /2.5mm²	median	2 +/- 2	27 +/- 13 (n=8)	p=0.01
	NA	n=0	n=1	
necrosis	yes	0	5	p=0.01
	no	9	4	
Chromogranin A (% tumor cells + by IHC)	median	75 +/- 10	5 +/- 2,5	p=0,01
	NA	n=1	n=1	
Synaptophysin (% tumor cells + by IHC)	median	80 +/- 10	20 +/- 19	p=0,08
	NA	n=0	n=1	
S100 sustentacular cells (% + by IHC)	median	70 +/- 30	5 +/- 2,5	p=0,0005
	NA	n=0	n=1	
CKAE1/AE3 (% tumor cells + by IHC)	median	0 +/- 0	5 +/- 5	p=0,03
	NA	n=0	n=0	
Hyams	I II	7	2	p=0.06
	III IV	2	7	
Intra-tumoral CD20+ cells/mm²	median	0+/-0	4+/-4	p=0.04
	NA	n=0	n=1	
Intra-tumoral CD4+ cells/mm²	median	11 +/-8	59,5+/-43	p=0,02
	NA	n=0	n=1	
Intra-tumoral CD8+ cells/mm²	median	4+/-4	50+/-39.5 (n=8)	p=0.004
	NA	n=0	n=1	
Modified Kadish	A-B	2	1	p=0.6
	C-D	7	8	
Dulguerov	T1-T2	3	3	p>0.9
	T3-T4	6	6	

Table S2

Anticorps	manufacturer	Clone	Dilution	Prétraitement	Incubation
CK AE1/AE3	Dako	AE1/AE3	1/50	protease	28'
CD 56 (NCAM)	Novocastra	1B6	1/50	CC1 30'	28'
Chromogranine A	Dako	DAK-A3	1/100	CC1 30'	28'
Synaptophysine	Dako	DAK-SYNAP	1/500	CC1 30'	28'
PS100	Dako	Z 0311 (polyclonal)	1/1000	none	28'
Ki67	Dako	MIB-1	1/50	CC1 30'	28'
P53	Dako	DO-7	1/50	CC1 30'	28'
CD4	Ventana	SP35	Prediluted	CC1 60'	20'
CD8	Dako	144B	1/50	CC1 30'	28'
CD20	Dako	L26	1/200	CC1 30'	28'
CD117	Dako	c-kit	1/50	CC1 30'	28'
P53	Dako	DO-7	1/50	CC1 30'	28'
IDH2	Millipore	M5 Mab1	1/200	CC1 30'	16'

Table S3

B. Evaluer l'intérêt pronostique des lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) et de l'index de prolifération KI67 dans le neuroblastome olfactif

Nos travaux visant à caractériser les neuroblastomes olfactifs, ou esthésioneuroblastomes, sont exposés dans un article soumis dans la revue *American Journal of Surgical Pathology* intitulé : « Evaluating the prognostic potential of the Ki67 index and tumor infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma ».

1. Introduction

Les NBO sont des tumeurs naso-sinusiennes rares pour lesquelles aucun facteur pronostic fiable n'a été validé. Les NBO font partie des tumeurs à petites cellules rondes ou « small round blue cell tumors » souvent rapportées parmi les tumeurs neuroendocrines naso-sinusiennes bien qu'elles soient classées au sein du chapitre des tumeurs neuroectodermiques/mélanique de la dernière classification OMS 2017 des tumeurs naso-sinusiennes. Aucune stratégie diagnostique officielle n'est reconnue. Beaucoup d'équipes orientent les patients vers une chirurgie suivie d'une radiothérapie, mais les tumeurs de haut grade sont parfois difficiles à traiter. Certains proposent une chimiothérapie néo-adjuvante dans ces cas agressifs mais aucun consensus n'existe à ce sujet. Dans ce contexte, les systèmes de classification et de grading prennent une importance particulière dans la décision de stratégie thérapeutique. Plusieurs classifications anatomo-cliniques ont été rapportées, notamment celles de Kadish et de Dulguerov, en revanche un seul système de grading histologique a été rapporté par Hyams. Ce système a pas été décrit en 1988 et n'a pas été mis à jour depuis. Il est notamment basé sur des critères purement morphologiques et plusieurs auteurs ont souligné ses limites. Contrairement aux des tumeurs neuroendocrines pour lesquelles le Ki67 est parfaitement intégré dans le système de grading, aucun marqueur immunohistochimique n'est pris en compte dans le grade de Hyams. Sa valeur pronostique a déjà été soulevée par de rares équipes dans les NBO mais aucun seuil n'a jamais été validé.

D'autre part, l'immunité anti-tumorale est désormais un facteur pronostique reconnu dans de nombreux types tumoraux. Les lymphocytes infiltrant les tumeurs ou « TILs » n'ont jamais été explorés dans les NBO.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier l'index de prolifération Ki67 et les TILs dans les NBO, de les corrélés au grade de Hyams et enfin d'évaluer leur valeur pronostique à partir d'une série rétrospective bi-centrique de 45 patients.

2. Résultats

Parmi les 45 patients inclus dans cette étude l'âge moyen était de 52,3 ans (min 13, max 88). Il y avait une prédominance de stade Kadish C (64,4 %) et Dulguerov T4 (42,2%). La distribution des grades de Hyams montrait une prédominance de grade II (44,4%), suivi d'une proportion similaire de grade III (20%) et IV (22,2%), et quelques grade I (13,4 %). Le suivi moyen était de 42 mois (1-184), 5 patients (11,1%) ont été perdus de vue. Une récurrence a été observée pour 8 cas, soit localement (n=3: orbite, faux du cerveau), soit sous forme de métastase (n=5: ganglion cervical, vertèbre, leptoméniges). Le délai moyen de récurrence était de 57 mois, 1 patient (2,2%) est décédé d'un ostéosarcome radio-induit, 5 patients (11,1%) étaient vivants en récurrence, 28 patients (62,2%) étaient vivants sans maladie.

L'index de prolifération Ki67 variait de 0 à 64, il était significativement plus élevé dans les tumeurs de haut grade (Hyams III-IV) ($p < 0.0001$) et il était significativement corrélé au compte mitotique ($p < 0.0001$). Une courbe de ROC a mis en évidence que le seuil de 22 était le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité. La valeur maximale du Ki67 dans les tumeurs de grade I-II étant de 25, nous avons établi le seuil à 25. Un index de prolifération $Ki67 \geq 25$ était significativement associé à une survie globale moins longue ($p = 0.009$).

Les TILs étaient préférentiellement observés dans le compartiment stromal de la tumeur mais à l'intérieur des compartiments stromal et intra-tumoral le nombre de cellules T CD4+ et CD8+ n'était pas significativement différents ($p = 0.7$). Le nombre de T CD4+ et de T CD8+ était plus élevé dans les tumeurs de haut grade (Hyams I-II) que dans celles de bas grade (Hyams III-IV) ($p = 0.0015$ and $p = 0.043$ respectivement). Le nombre absolu de T CD4+ et de T CD8+ n'était pas associé à une différence de survie mais un ratio CD4/CD8 était significativement associé à une survie plus courte ($p = 0.002$). De plus, le nombre de T CD8+ intra-tumoral était positivement corrélé au Ki67 et au compte mitotique.

L'étude des facteurs pronostiques plus conventionnels dans notre cohorte a montré que seules les marges chirurgicales positives et le grade de Hyams étaient associés à la survie, avec une p-value moins significative.

3. Conclusion

Nous avons montré que l'index de prolifération Ki67 était significativement plus élevé dans les NBO de haut grade et qu'un index $Ki67 \geq 25$ était associé à une moins bonne survie globale. Nous avons également montré que les NBO de haut grade sont plus infiltrés par les TILs CD8+ que les formes de bas grade. Notre travail suggère également que le ratio CD4/CD8 est un facteur pronostique important associé de façon significative à la survie globale. Notre travail confirme donc l'importance du grading histologique et suggère que l'ajout de l'index de prolifération Ki67 au grade de Hyams pourrait sans doute améliorer sa valeur pronostique. Notre étude montre aussi l'importance de la réponse immunitaire anti-tumorale dans les neuroblastomes olfactifs, et suggère qu'une observation attentive des TILs pourrait représenter un outil pronostique non négligeable pour identifier des évolutions cliniques distinctes. Ce travail pourrait ouvrir vers de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'immunothérapie pour un certain nombre de patients.

4. Article

American Journal of Surgical Pathology
Evaluating the prognostic potential of the Ki67 index and tumor infiltrating lymphocytes
in olfactory neuroblastoma
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Evaluating the prognostic potential of the Ki67 index and tumor infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma
Article Type:	Original Article
Keywords:	olfactory neuroblastoma; esthesioneuroblastoma; Ki67; tumor infiltrating lymphocytes
Corresponding Author:	Marion Classe, MD Hopital Lariboisiere Paris, FRANCE
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Hopital Lariboisiere
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Marion Classe, MD
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Marion Classe, MD Alice Burgess, MD Sophie El Zein, MD Michel Wassef, MD Philippe Herman, MD, PhD Geoffrey Mortuaire, MD, PhD Xavier Leroy, MD, PhD Gabriel Malouf, MD, PhD Benjamin Verillaud, MD, PhD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	<p>Abstract: Olfactory neuroblastomas (ONBs) are rare malignant tumors that arise in the nasal vault. Till date, the Hyams grade remains the only widely used histological grading system. However, it is based only on morphologic criteria, and has not been updated since 1988. The objective of this study was to explore the prognostic potential of the Ki67 proliferation index (PI) and tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in ONB. A retrospective study was conducted on a bi-centric series of 45 cases. The Ki67 PI was determined by counting at least 1000 nuclei on whole slides. TILs were evaluated using CD20, CD4 and CD8 immunohistochemical markers on whole slides. In this series, Hyams grade I, II, III, and IV accounted for 13.4%, 44.4%, 20% and 22.2% of all cases, respectively. The Ki67 index ranged from 1 to 93; the Ki67 index was significantly higher in Hyams grade III-IV tumors than in grade I-II tumors ($p < 0.0001$). $Ki67 \geq 25$ was associated with poorer survival ($p = 0.01$). TILs were present in both stromal and intra-tumoral compartments, but were located predominantly in the stromal component of the tumor. The number of intra-tumoral CD8+ cells and CD4+ cells/mm² was greater in high-grade tumors than in low-grade ones ($p = 0.0015$ and $p = 0.043$ respectively). The numbers of T cells and B cells/mm² were not associated with survival, but $CD4/CD8 > 2$ was significantly associated with shorter survival ($p = 0.002$). Our findings suggest that the Ki 67 index and TILs can be taken into account, to add to the prognostic value of the Hyams grade.</p>

Evaluating the prognostic potential of the Ki67 index and tumor infiltrating lymphocytes in olfactory neuroblastoma

Marion Classe, MD*1, Alice Burgess, MD*2, Sophie El Zein, MD3, Michel Wassef, MD3, Philippe Herman, MD, PhD2, Geoffrey Mortuaire, MD, MhD4, Xavier Leroy, MD, PhD6, Gabriel G Malouf, MD, PhD6 , and Benjamin Verillaud, MD, PhD2.

1: Department of Pathology, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Lariboisière Hospital, Paris, France; and Paris Diderot University, Faculty of Medicine, Paris, France; Faculty of Medicine Pierre et Marie Curie, University Paris 6

2: Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Lariboisière Hospital, Paris, France; and Paris Diderot University, Faculty of Medicine, Paris, France;

3: Department of Pathology, Assistance Publique - Hopitaux de Paris, Lariboisière Hospital, Paris, France; and Paris Diderot University, Faculty of Medicine, Paris, France;

4: Department of Otolaryngology - Head and Neck Surgery, University Hospital and Lille 2 Faculty of Medicine, Lille, France

5: Department of Pathology, University Hospital and Lille 2 Faculty of Medicine, Lille, France

6: Department of Medical Oncology, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Sorbonnes-Universités, University Pierre and Marie Curie, Paris, France

* these authors contributed equally to the work

Correspondence:

Marion Classe

Department of Pathology, Lariboisière Hospital

Classe Marion – Thèse de doctorat - 2017

2 rue Ambroise Paré, 75475 Paris Cedex 10, France

Tel : +33 6 20 12 50 16

Fax: +33 1 4995 8536

marionclasse@hotmail.fr

Disclosures: The authors have no conflicts of interest or funding to disclose.

Introduction

Olfactory neuroblastoma (ONB), also known as esthesioneuroblastoma, is a rare malignant tumor arising in the nasal vault. It accounts for 3% of all sinonasal tumors (1), with an annual incidence of 4 cases per 10 million people (2). It is thought to develop in the olfactory neuroepithelium, but its exact cell of origin has not yet been confirmed (3). ONB can occur at any age (2-90 years) and peaks in the fourth and fifth decades of life (4). A slight gender predilection has been described, and a male to female ratio of 1.2:1 was recently reported (1), but no risk factor has been identified. Its clinical presentation has no specificity and like other sinonasal tumors, ONBs are often responsible for nasal obstruction, epistaxis and sometimes anosmia. The histologic features of these tumors are well described now: ONBs are among the “small round blue cell tumors” (5, 6), but their biology is not fully understood. ONBs display a neuro-endocrine immunohistochemical profile, resulting in them being reported in many studies focusing on the neuro-endocrine tumors of the sinonasal region (4, 7). ONBs are classified by the WHO, in the chapter dedicated to neuroectodermal/melanotic tumors, as “round blue cell” tumors (1). There is no consensus on the best treatment strategy for ONB. Low-grade tumors are usually treated with surgery, followed by radiotherapy (8), but high-grade and clinically advanced cases can be difficult to manage (3). In this context, clinical and pathological grading systems are key tools in the discussion of treatment options. Several staging systems have been described (9, 10), the most popular being the Kadish system (first described in 1976, and modified by Morita et al. in 1993 (11)). In contrast, there are very few histological grading systems; in general, there is a lack of histological prognostic markers in the case of ONB. Till date, the only widely used histological grading system is the Hyams grading system. It was established in 1988, and has not been updated since then (12). Although it has been extensively used over the past 30 years (3, 13-15), several authors have underlined its limitations and drawbacks (12, 14). First, it is based on morphological criteria; its reproducibility is, therefore, questionable. Second, it does not integrate any of the immunohistochemical features of tumors, and, finally, it does not address the issue of tumor microenvironment. Among the many potential markers for ONB, the Ki67 proliferation index appears to be of particular interest. The Ki67 index is reproducible and is widely used in the case of neuro-endocrine tumors (16). Its prognostic value has been evaluated for ONBs, in several studies, but no prognostic threshold could be determined, possibly due to a lack of power (limited number of patients) (17, 18).

With regard to tumor microenvironment, the major role of immune responses against cancer cells is now well-recognized (19-21). In particular, it has been shown that tumor infiltrating lymphocytes (TILs) play a specific role in immune response in many cancers, including head and neck cancers (22, 23), and may be used both as prognostic and therapeutic tools. To our knowledge, their role in the case of ONB has never been studied.

The objective of our study was to assess (i) the Ki67 index and TILs in the case of ONB, (ii) the correlation between Ki67, TILs and the Hyams grade and (iii) the prognostic value of Ki67 and TILs, based on a bi-centric retrospective series of 45 patients.

Material and methods

Case selection

All cases of olfactory neuroblastoma, treated between January 2004 and December 2015, at two university hospitals (Lariboisière Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, and Lille University Hospital) were retrospectively retrieved from the databases of the pathology departments. The diagnoses were confirmed in all the cases by a senior head and neck pathologist (Michel Wassef). Patients in whom no clinical data were available or those in whom no biopsy/specimen was available for immunohistochemistry were further excluded from the study. The study was approved by the local ethical committee.

Clinico-pathological analysis

When both the biopsy and surgical specimen were available, biopsy was favored in cases of neo-adjuvant therapy. When several paraffin blocks were available for the same tumor, the most representative block was selected for immunohistochemical analysis. Cases in which the fixative was not formalin, and decalcification had been applied were excluded, to avoid immunohistochemical issues. Clinical data were collected from patients' medical files. The data collected included sex, age at the time of diagnosis, location and local extension of the tumor, Kadish and Dulguerov stage, treatment modalities, time to progression, and time to death.

Ki67 and TIL quantification

All the immunohistochemical analyses were performed on serial freshly cut 4 μm sections of the selected block. Stains were obtained using a Ventana Benchmarck automated method (protocols are summarized in Supplementary Table S1). Ki67 was studied using clone MIB1 (Dako). To characterize the TILs, whole sections were stained for CD20 (clone L26; Dako), CD4 (clone SP35; Ventana Medical System), and CD8 (clone 144B; Dako).

The quantification of the Ki67 index was performed by counting hotspots, using ImageJ software. A minimum of 1,000 nuclei were counted to determine the percentage of positive nuclei. To confirm the relevance of Ki-67, it was compared to a mitotic count for 10 High Power Fields (HPF) ($=2.5 \text{ mm}^2$). For the quantification of TILs, slides were digitalized using an Aperio AT2 slide scanner (Leica Biosystems). On digitalized slides, hotspot areas were determined at low magnification; then, 5 fields of $0.2 \mu\text{m}^2$ were delimited using the Aperio Imagescope Software (Leica Biosystems). A digital capture of each delimited field was made to count lymphocytes manually using the ImageJ software. Lymphocytes were counted, blinded to the clinical data, within the stromal area of the tumor and within the tumor lobules themselves. CD4+ cells displaying macrophagic features were excluded.

Statistics

Statistical analyses were performed using Fisher's exact test for categorical variables and the Mann-Whitney U test for continuous variables (GraphPad Software, Inc). The correlation between 2 continuous parameters was evaluated using the Pearson coefficient, when the distribution was normal, and the Spearman coefficient otherwise. Cumulative survival time was calculated using the Kaplan-Meier method, and analyzed using a log-rank test (GraphPad Software, Inc). $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Clinico-pathologic features

The main clinico-pathological data are summarized in Table 1. Forty-five patients were included. The mean age was 52.3 years (range: 13-88 years). No peak of incidence was observed. The male to female ratio was 0:8. None of the patients had a personal history of cancer. There was a predominance of the Kadish C (64.4%) and Dulguerov T4 (42.2%) stages. The Hyams grade distribution displayed a predominance of grade II (44.4%), followed by approximately the same proportion of grade III (20%) and VI (22.2%), and a few grade I

(13.4 %) cases. Surgery was performed in 84.5% of the cases. Of these, 29% had received neo-adjuvant chemotherapy and 69% had received adjuvant radiotherapy. Fifteen percent of the patients were treated with surgery alone, and 11% were treated only with radiotherapy and/or chemotherapy, without surgery. The mean follow-up was 42 months (1-184), and 5 patients (11.1%) were lost to follow-up. Recurrence was observed in 8 cases, either locally (n=3: orbit, cerebral falx), or as distant metastases (n=5: cervical lymph node, vertebrae, leptomeninges). The mean delay for recurrence was 57 months. At the last follow-up, 6 patients (13.3%) had died of the disease, 1 patient (2.2%) had died of radio-induced osteosarcoma, 5 patients (11.1%) were alive with disease, and 28 patients (62.2%) were alive and free of disease.

Ki67 index

The Ki67 index distribution, according to the Hyams grade, is summarized in Table 2. An example of Ki67 staining in Hyams grade I to grade IV tumors is displayed in Figure 1. The Ki67 index was significantly lower in Hyams I-II cases than in Hyams III-IV cases ($p < 0.0001$) (Figure 2A). A receiver operating characteristic (ROC) curve determined that the best compromise between sensitivity and specificity for the Ki67 index was a threshold < 22 (Supplementary Table S2) with a likelihood ratio of 1.5, and the specificity decreasing on reaching the threshold value of 27. As the highest Ki67 value of Hyams I-II ONBs was 25 (Table 2), the threshold for further analyses was then set at 25. $Ki67 \geq 25$ was associated with shorter survival ($p = 0.008$, Figure 2B). To validate the results obtained with the Ki67 index, a mitotic count distribution was performed as described in the “Materials and Methods” section. The results are summarized in Supplementary Table S3. A strong correlation was observed between mitotic count / 2.5 mm^2 and Ki67 ($p < 0.0001$) (Supplementary Figure S1).

Tumor Infiltrating Lymphocytes

The distribution of TILs is summarized in Table 3 and Figure 3. TILs were observed in both stromal and intra-tumoral compartments, but they were located predominantly in the stromal component of the tumor and rarely infiltrated the tumor cell nests. The median stromal TIL number was 562, and median intra-tumoral TIL number was 35, with the difference being highly significant ($p < 0.0001$, Figure 3A). T cells were more abundant than B cells ($p < 0.0001$, Figure 3B). The total number of T cells varied from 77 to $4114/\text{mm}^2$ (median 520). Among T cells, CD4+ cells were slightly more abundant than CD8+ cells ($p = 0.6$, Figure

3C). Both CD4⁺ and CD8⁺ cells were predominantly found in the stromal compartment ($p < 0.0001$, Figure 3D-E). Within the stromal and intra-tumoral compartments, the number of CD4⁺ and CD8⁺/mm² was not significantly different ($p = 0.7$). B cells (CD20⁺ cells) were also found predominantly in the stromal compartment of the tumor and their number varied from 163 to 1308/mm² (median 79/mm²) ($p < 0.0001$), Figure 3F). We then assessed the association between the distribution of TILs and Hyams grade. Examples of TILs in low and high-grade ONBs are shown in Figures 4A-D. The number of intra-tumoral CD8⁺ cells and CD4⁺ cells/mm² was greater in Hyams III/IV tumors than in grade I/II tumors ($p = 0.0015$ and $p = 0.043$ respectively) (Table 4, Figures 5A-B). The survival data were used to further investigate the prognostic significance of TIL infiltration. The distribution of TILs did not follow a normal distribution (Supplementary Figure S2): the TILs variables were, therefore, classified according to the quartiles. Neither the numbers of T cells (CD4⁺ or CD8⁺) nor the number of B cells/mm² were associated with survival, but CD4/CD8 >2 was significantly associated with shorter survival ($p = 0.002$, Figure 5C). Moreover, the number of intra-tumoral CD8⁺ and CD4⁺ cells was correlated with the Ki67 index ($p = 0.03$ and $p = 0.04$ respectively) and mitotic count ($p = 0.0003$ and $p = 0.05$, respectively) (Figures S3A-B, Table S4). The number of intra-tumoral CD8⁺ T cells was higher in cases with Ki67 ≥ 25 ($p = 0.04$).

Finally, we assessed the association of conventional prognostic markers, such as incomplete resection, Hyams grade, Dulguerov T stage and Kadish stage, with survival. As shown in Figure S4, only surgical margins and the Hyams grade were statistically associated with survival; however, in our series, the difference was less significant than when the CD4/CD8 ratio or Ki67 index was used.

Discussion

ONB is a rare tumor, and few studies have been conducted with large series. There are still no official therapeutic guidelines for the treatment of ONBs. While some studies suggest that the clinical stage is the best prognostic parameter (24), others recommend histological grading (3, 13). It is probable that both clinical stage and histological grade need to be taken into account in the final therapeutic decision. However, the Hyams histological grade is based on purely morphological criteria and its reproducibility is questionable, especially in grade III cases. Malouf et al. suggested that the grade III category be divided into two categories “III-II” and “III-IV” (14). As ONBs share many characteristics with neuroendocrine tumors, and as the Ki67 index is widely used as a prognostic marker in these entities, the idea of adding

the Ki67 index to the Hyams grade is already under consideration by pathologists (17). Singh et al. reported $Ki67 > 25$ to be a significant prognostic marker, among a series of 26 ONBs (18). In our study's 45 cases, 25 was the highest Ki67 index observed among low-grade tumors. We confirmed that $Ki67 \geq 25$ was predictive of poorer survival. This could be the start of an update of the Hyams grading system, if confirmed by others.

The biology of tumors is no longer the only factor to be taken into account in the case of cancers. Tumors' micro-environment, and, especially, the immune environment's impact on therapeutic strategies is important, as shown over the past few years, with the advent of immune modulating therapies (25-27). TILs have been studied in several cancers, but never in the case of olfactory neuroblastoma. Here, for the first time, we describe TILs in this entity. To understand the potential role of TILs in the prognosis of ONBs, we studied the effect of TILs, as well as more conventional and validated prognostic criteria on survival. The number of TILs was variable among the cases (from 37 to 3120 cells/mm² for CD4+), but with a median of 301 CD4+/mm² and 227 CD8+/mm², we showed that some ONBs are significantly infiltrated by immune cells and can be considered "hot" tumors. We found that CD4+ or CD8+ infiltration did not impact survival, but a CD4/CD8 ratio greater than 2 was associated with poorer prognoses. This suggests that the balance between CD4+ and CD8+ T cells is more important than the absolute number of TILs, and that a higher proportion of CD4+ cells than CD8+ cells has a negative impact on general prognoses. The CD4/CD8 ratio has already been reported as a prognostic marker in human papillomavirus (HPV)-related laryngeal squamous cell carcinomas, with the CD4/CD8 ratio being lower in HPV+ than in HPV- cases, denoting that HPV+ cancers are better prognostic markers (28). In our case, at least some of the CD4+ cells composing the infiltrate were likely to be regulatory T cells (Tregs). This could explain the pejorative impact of a high CD4/CD8 ratio. Sato et al. reported that a high CD8+/Tregs ratio was associated with a favorable prognosis in ovarian cancer (29). They noted that the unfavorable effect of CD4+ T cells on prognoses was due to FOXP3+ regulatory T cells. This might be the case for ONBs too. A high prevalence of Tregs has also been reported as a marker of poor prognoses (30, 31), notably in pancreatic ductal adenocarcinoma (32), hepatocellular carcinoma (33, 34) and breast carcinoma (35). The prognostic significance of TILs has now been shown in many cancers, predominantly in colorectal carcinoma (CRC) cases associated with microsatellite instability (MSI) (36). The favorable prognostic impact of immunity in tumors with MSI could be due to a high mutational load (36, 37). Our results show that high-grade ONBs are highly infiltrated by

TILs, and that high-grade tumors display more CD8+ cells ($p=0.015$) and CD4+ cells ($p=0.043$) than low-grade cases. This might be due to the stronger immunogenic profile of high-grade tumors. The mutational landscape of ONBs has never been studied, but it is possible that high-grade tumors display a higher mutational load than low-grade ones.

Unlike T cells, B cells were found to be restricted to the stromal compartment of the tumor. But, despite the reported role of B cells in anti-cancer immune response (38-40), we found no association between B cell infiltration and grade or prognosis, in the case of ONBs. Castino et al. reported that the prognostic influence of B cells was associated with tertiary lymphoid structures (TLS) (38). As most of our samples were obtained from endoscopic surgery, the invasion border was hardly available due to surgical sampling, and we observed no TLS. This might explain why we found no impact of B cells on prognosis, in our samples.

In order to evaluate the effect of TILs and the Ki67 index on survival, we also studied other more conventional prognostic markers on the same cohort. Like in the case of other studies, we found that a high Hyams grade (10, 14, 41) tended to be associated with poorer survival. We also highlighted the pejorative effect of incomplete surgical resection which had, to our knowledge, not been reported before. Recently, in a large series of 187 ONBs, it was reported that, although no standard treatment exists for ONBs, the therapeutic strategy would have an important prognostic role (42). In our series, the therapeutic strategies were not homogeneous; therefore, we did not evaluate the impact of the different treatment combinations.

In summary, we showed that Ki67 proliferation was significantly higher in high-grade ONBs, and that $Ki67 \geq 25$ was associated with poorer survival. We also showed that high-grade ONBs display more intra-tumoral TILs than low-grade ones. Our work suggests that despite $Ki67 \geq 25$ being associated with poorer survival, the most significant histo-prognostic marker in our cohort was the CD4/CD8 ratio. With 45 cases and a mean follow-up of 42 months, even if the therapeutic strategies were not always homogeneous among the patients, this series confirms the importance of histological grading, and suggests that the Ki67 index could be added to the Hyams grade. Our study also shows the importance of immune response in ONBs, suggesting that a mindful evaluation of TILs could prove to be a powerful prognostic tool to identify patients with distinct clinical behaviors and responses to immunotherapeutic strategies.

References

1. Bell D FA, Gillison M, Thompson L.D.R, Wenig B.M. Tumours of the nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. In: El-Naggar AK CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editor. Who classification of head and neck tumours. 9. 4th ed: IARC; 2017. p. 57-59.
2. Thompson LD. Olfactory neuroblastoma. *Head Neck Pathol.* 2009;3:252-259.
3. Saade RE, Hanna EY, Bell D. Prognosis and biology in esthesioneuroblastoma: The emerging role of hyams grading system. *Curr Oncol Rep.* 2015;17:423.
4. Bell D, Hanna EY, Weber RS, et al. Neuroendocrine neoplasms of the sinonasal region. *Head Neck.* 2016;38 Suppl 1:E2259-2266.
5. Faragalla H, Weinreb I. Olfactory neuroblastoma: A review and update. *Adv Anat Pathol.* 2009;16:322-331.
6. Thompson LD. Small round blue cell tumors of the sinonasal tract: A differential diagnosis approach. *Mod Pathol.* 2017;30:S1-S26.
7. Su SY, Bell D, Hanna EY. Esthesioneuroblastoma, neuroendocrine carcinoma, and sinonasal undifferentiated carcinoma: Differentiation in diagnosis and treatment. *Int Arch Otorhinolaryngol.* 2014;18:S149-156.
8. Ow TJ, Bell D, Kupferman ME, et al. Esthesioneuroblastoma. *Neurosurg Clin N Am.* 2013;24:51-65.
9. Dulguerov P, Calcaterra T. Esthesioneuroblastoma: The ucla experience 1970-1990. *Laryngoscope.* 1992;102:843-849.
10. Dulguerov P, Allal AS, Calcaterra TC. Esthesioneuroblastoma: A meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2001;2:683-690.
11. Morita A, Ebersold MJ, Olsen KD, et al. Esthesioneuroblastoma: Prognosis and management. *Neurosurgery.* 1993;32:706-714; discussion 714-705.

12. Gallagher KK, Spector ME, Pepper JP, et al. Esthesioneuroblastoma: Updating histologic grading as it relates to prognosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2014;123:353-358.
13. Bell D, Saade R, Roberts D, et al. Prognostic utility of hyams histological grading and kadish-morita staging systems for esthesioneuroblastoma outcomes. *Head Neck Pathol.* 2015;9:51-59.
14. Malouf GG, Casiraghi O, Deutsch E, et al. Low- and high-grade esthesioneuroblastomas display a distinct natural history and outcome. *Eur J Cancer.* 2013;49:1324-1334.
15. Kaur G, Kane AJ, Sughrue ME, et al. The prognostic implications of hyam's subtype for patients with kadish stage c esthesioneuroblastoma. *J Clin Neurosci.* 2013;20:281-286.
16. Matsukuma K, Olson KA, Gui D, et al. Synaptophysin-ki67 double stain: A novel technique that improves interobserver agreement in the grading of well-differentiated gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Mod Pathol.* 2017;30:620-629.
17. Hirose T, Scheithauer BW, Lopes MB, et al. Olfactory neuroblastoma. An immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric study. *Cancer.* 1995;76:4-19.
18. Singh L, Ranjan R, Madan R, et al. Microvessel density and ki-67 labeling index in esthesioneuroblastoma: Is there a prognostic role? *Ann Diagn Pathol.* 2015;19:391-396.
19. Kirilovsky A, Marliot F, El Sissy C, et al. Rational bases for the use of the immunoscore in routine clinical settings as a prognostic and predictive biomarker in cancer patients. *Int Immunol.* 2016;28:373-382.
20. Mlecnik B, Bindea G, Kirilovsky A, et al. The tumor microenvironment and immunoscore are critical determinants of dissemination to distant metastasis. *Sci Transl Med.* 2016;8:327ra326.
21. Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, et al. Integrative analyses of colorectal cancer show immunoscore is a stronger predictor of patient survival than microsatellite instability. *Immunity.* 2016;44:698-711.

22. Schoenfeld JD. Immunity in head and neck cancer. *Cancer Immunol Res.* 2015;3:12-17.
23. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016;38:1074-1084.
24. Tajudeen BA, Arshi A, Suh JD, et al. Esthesioneuroblastoma: An update on the ucla experience, 2002-2013. *J Neurol Surg B Skull Base.* 2015;76:43-49.
25. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean MC, et al. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016;39:7-13.
26. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12:298-306.
27. Xie X, O'Neill W, Pan Q. Immunotherapy for head and neck cancer: The future of treatment? *Expert Opin Biol Ther.* 2017:1-8.
28. Zhang D, Tang WJ, Tang D, et al. The ratio of cd4/cd8 t-cells in human papillomavirus-positive laryngeal squamous cell carcinoma accounts for improved outcome. *Acta Otolaryngol.* 2016;136:826-833.
29. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial cd8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high cd8+/regulatory t cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18538-18543.
30. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory t cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccines (Basel).* 2016;4.
31. De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, et al. Tils in head and neck cancer: Ready for clinical implementation and why (not)? *Head Neck Pathol.* 2016.
32. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al. Prevalence of foxp3+ regulatory t cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5423-5434.

33. Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased regulatory t cells correlate with cd8 t-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology*. 2007;132:2328-2339.
34. Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory t cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2008;34:173-179.
35. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, et al. Foxp3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27:1746-1752.
36. Basile D, Garattini SK, Bonotto M, et al. Immunotherapy for colorectal cancer: Where are we heading? *Expert Opin Biol Ther*. 2017:1-13.
37. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. Pd-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509-2520.
38. Castino GF, Cortese N, Capretti G, et al. Spatial distribution of b cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1085147.
39. Linnebacher M. Tumor-infiltrating b cells come into vogue. *World J Gastroenterol*. 2013;19:8-11.
40. Knief J, Reddemann K, Petrova E, et al. High density of tumor-infiltrating b-lymphocytes and plasma cells signifies prolonged overall survival in adenocarcinoma of the esophagogastric junction. *Anticancer Res*. 2016;36:5339-5345.
41. Van Gompel JJ, Giannini C, Olsen KD, et al. Long-term outcome of esthesioneuroblastoma: Hyams grade predicts patient survival. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2012;73:331-336.
42. Xiong L, Zeng XL, Guo CK, et al. Optimal treatment and prognostic factors for esthesioneuroblastoma: Retrospective analysis of 187 chinese patients. *BMC Cancer*. 2017;17:254.

Legend to tables and figures

Figure 1: Examples of Ki67 features in the 4 Hyams categories, magnification x 10. (A) grade I ONB, Ki67=2.5 (B) grade II ONB, Ki67=11 (C) grade III ONB, Ki67=55 (D) grade IV ONB, Ki67=89)

Figure 2: Correlation of the Ki67 index with the Hyams grade, and the related survival curve. (A) Boxplot showing that the Ki67 index was significantly lower in Hyams I-II than Hyams III-IV ONBs. (B) Overall survival, according to the Ki67 proliferation index, using 25 as a threshold; Ki67Proliferation Index was not available for 2 patients, n=43.

Figure 3: Boxplots illustrating the distribution of TILs in ONBs. (A) Proportions of TILs in intra-tumoral and stromal compartments. (B) Proportions of T cells and B cells among TILs. (C) Proportions of total CD4+ and total CD8+ among TILs. (D) Distribution of CD8+ cells between stromal and intra-tumoral compartments. (E) Distribution of CD4+ cells between stromal and intra-tumoral compartments. (F) Distribution of B cells between stromal and intra-tumoral compartments.

Figure 4: Immunohistochemical examples of TILs in low and high-grade ONBs. (A-B) High-grade ONB highly infiltrated by TILs, with lymphocytes penetrating the tumor nests; (A) CD4 staining at x 10 magnification; (B) CD8 staining at x 10 magnification; (C-D) Example of a low-grade ONB poorly infiltrated by CD4+ cells (C) and CD8+ cells (D) (C) CD4 staining at x 10 magnification; (D) CD8 staining at x 10 magnification.

Figure 5: Differences in TILs distribution between low and high-grade ONBs, and survival curve, according to the CD4/CD8 ratio. (A) Boxplot of intra-tumoral CD4+ cells between Hyams I-II and Hyams III-IV ONBs showing a significantly larger number of CD4+ T cells in high-grade ONBs (B) Boxplot of intra-tumoral CD8+ cells between Hyams I-II and Hyams III-IV ONBs showing a significantly larger number of CD4+ T cells in high-grade ONBs; (C) Overall survival according to the CD4/CD8 ratio using 2 as a threshold; cases displaying a CD4/CD8>2 had a significantly shorter survival.

Supplementary Figure S1: Point cloud showing the correlation between Ki67PI and the mitotic count in ONBs.

Supplementary Figure S2: Distribution of the CD4/CD8 ratio among the samples. (A) Distribution histogram showing that the distribution does not follow a normal Gaussian law; (B) Distribution histogram in which samples have been ranked from the lowest to the highest; the highest quartile is shown as a red bar.

Supplementary Figure S3: Correlation matrix of the TILs parameters, and Ki67PI and mitotic count. Data are presented as heatmaps, showing the r Spearman coefficient (A) and the corresponding p-values (B).

Supplementary Figure S4: Survival curves according to the different prognostic factors studied. (A) Overall survival according to the Ki67 proliferation index, using 25 as a threshold; cases displaying a $Ki67 \geq 25$ showed a poorer survival; (B) Overall survival according to the CD4/CD8 ratio, Cases with $CD4/CD8 > 2$ had a significantly shorter survival; (C) Overall survival, according to the surgical margins; cases displaying an incomplete resection (R1) had poorer survival compared to cases in which resection was complete (R0); (D) Overall survival, according to the Hyams grade; Hyams I and II cases tended to display a better survival than Hyams III and IV cases but the difference was not significant; (E) Overall survival according to the Dulguerov T stage; no significant difference was observed between Dulguerov I and II cases, and Dulguerov III and IV cases; (F) survival according to the modified Kadish stage; no significant difference was observed between Kadish A and B cases, and Kadish C and D cases.

Table 1: Patients characteristics

Table 2: Distribution of the Ki67 proliferation index between the 4 Hyams categories

Table 3: Distribution of the TILs between the stromal and intra epithelial compartments

Table 4: Stromal and intra-tumoral TILs according to low or high Hyams grade

Table S1: IHC references and protocols

Table S2: Ki67 ROC curve and survival analyses data

Table S3: Descriptive statistics for parameter mitoses /2.5 mm²

Table S4: Correlation matrix corresponding to Figure S2 (TILs parameters, Ki67PI and mitotic count)

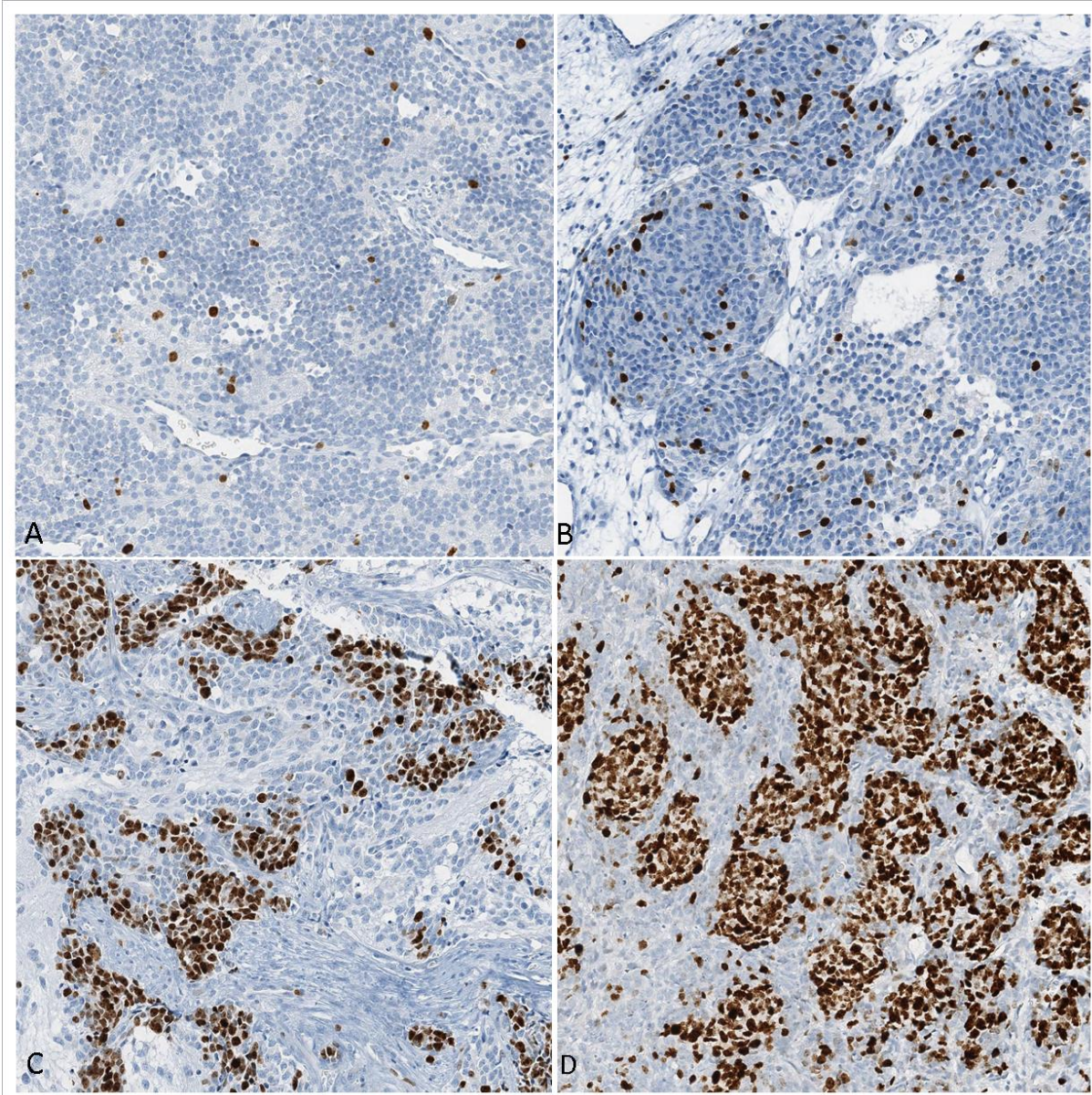


Figure 1

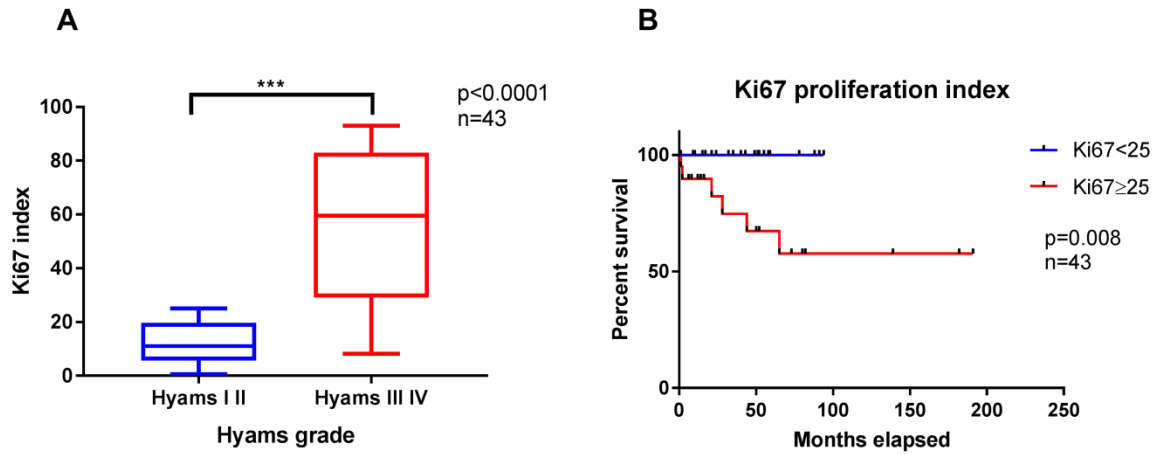


Figure 2

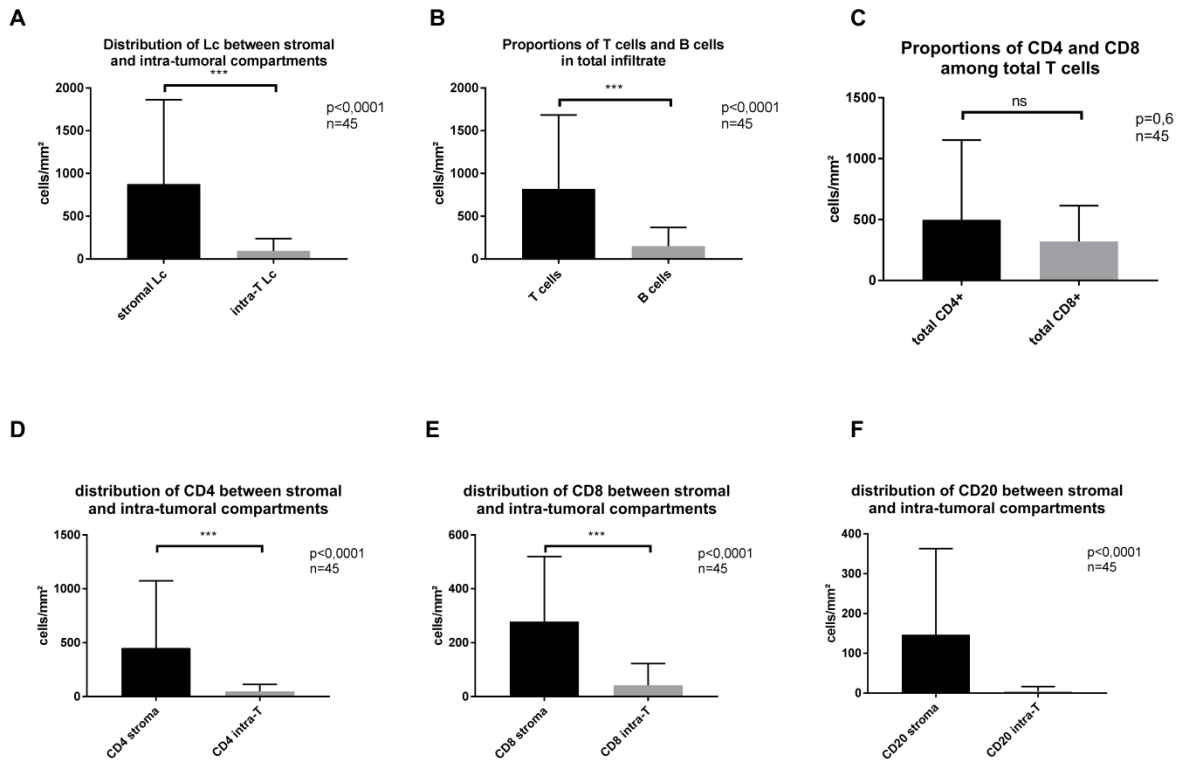


Figure 3

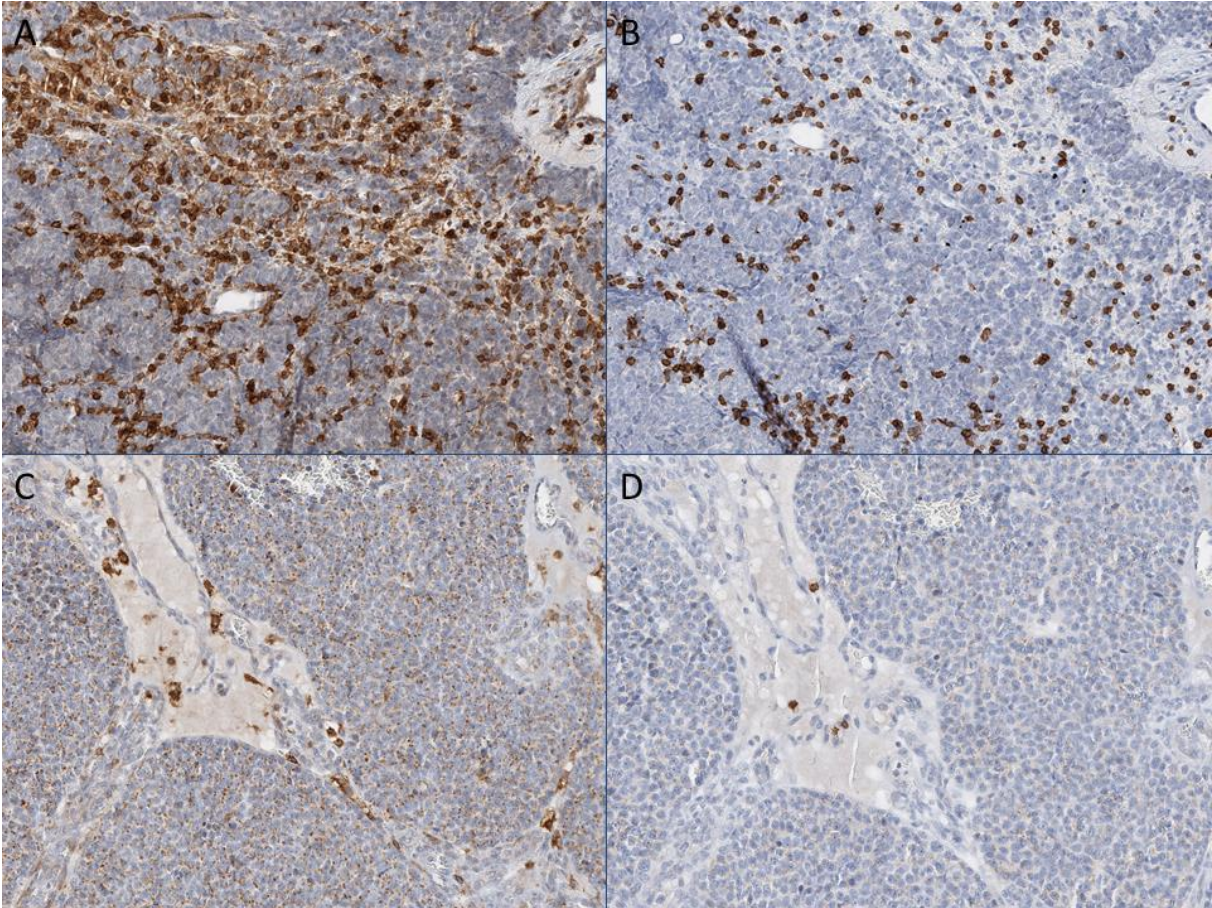


Figure 4

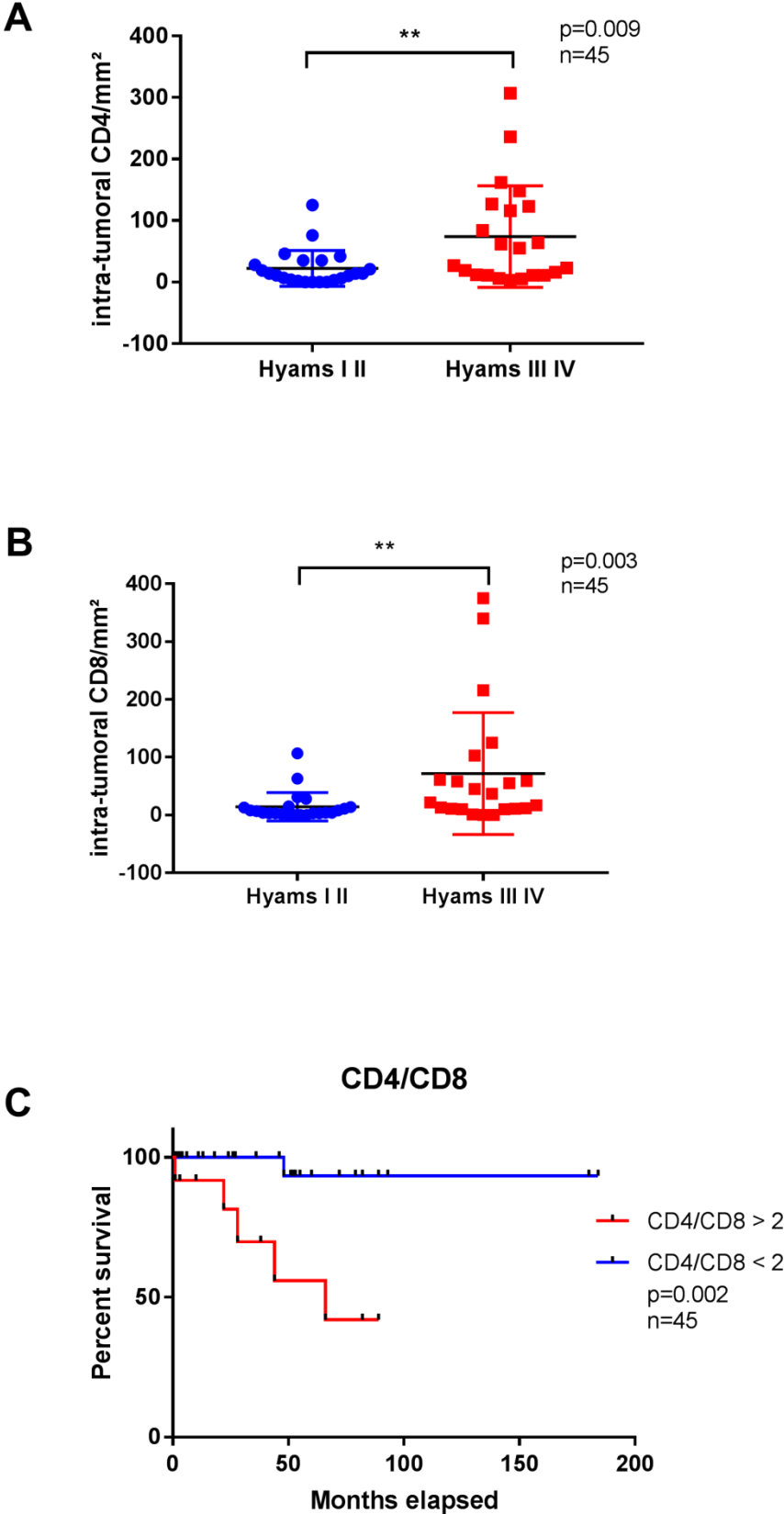


Figure 5

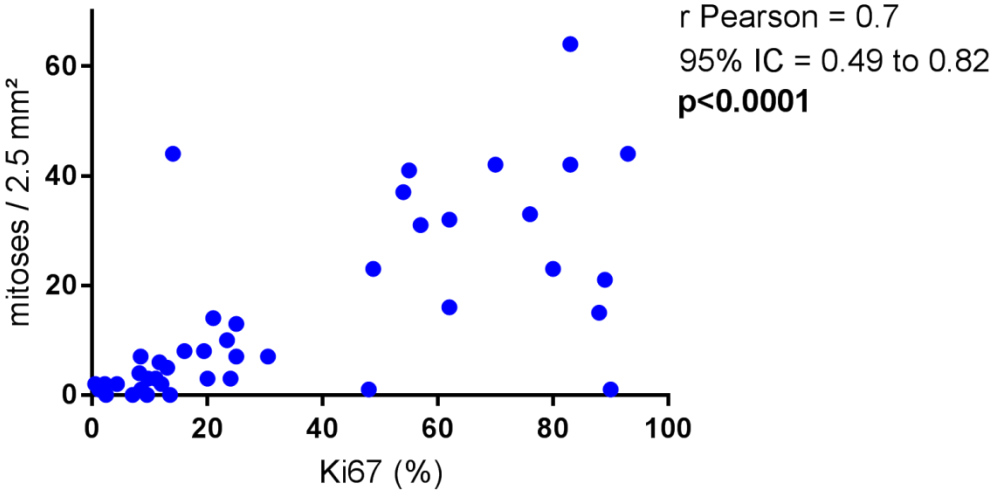


Figure S1

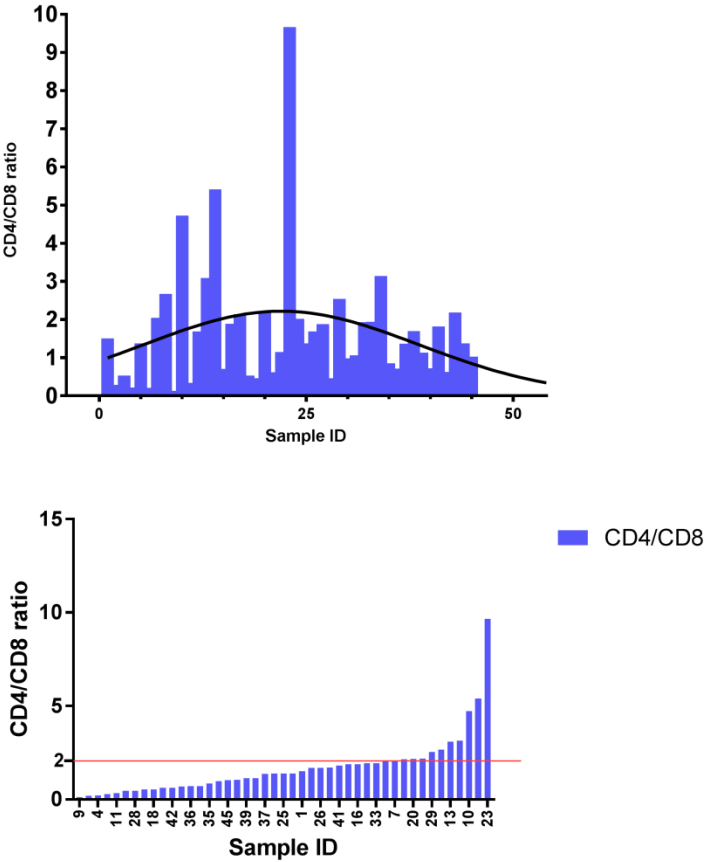


Figure S2

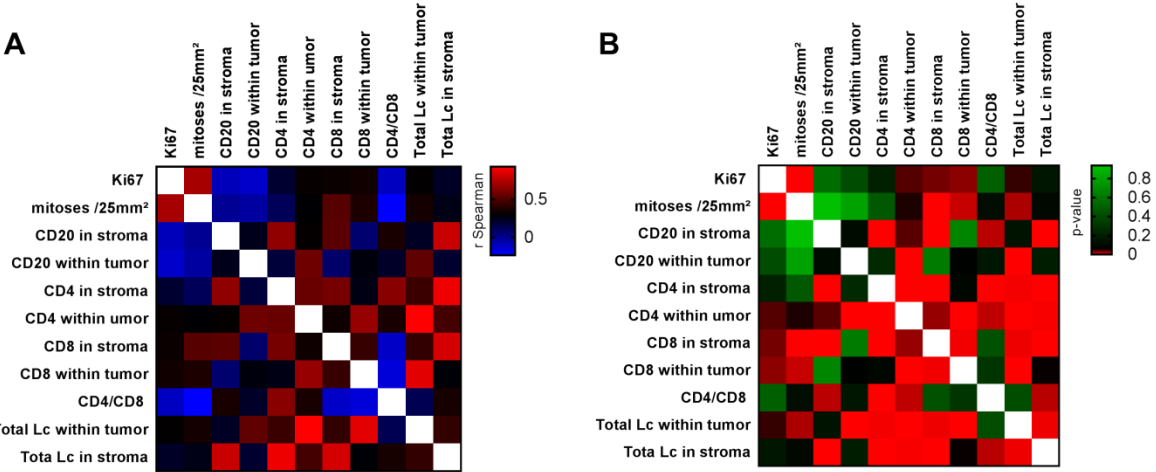


Figure S3

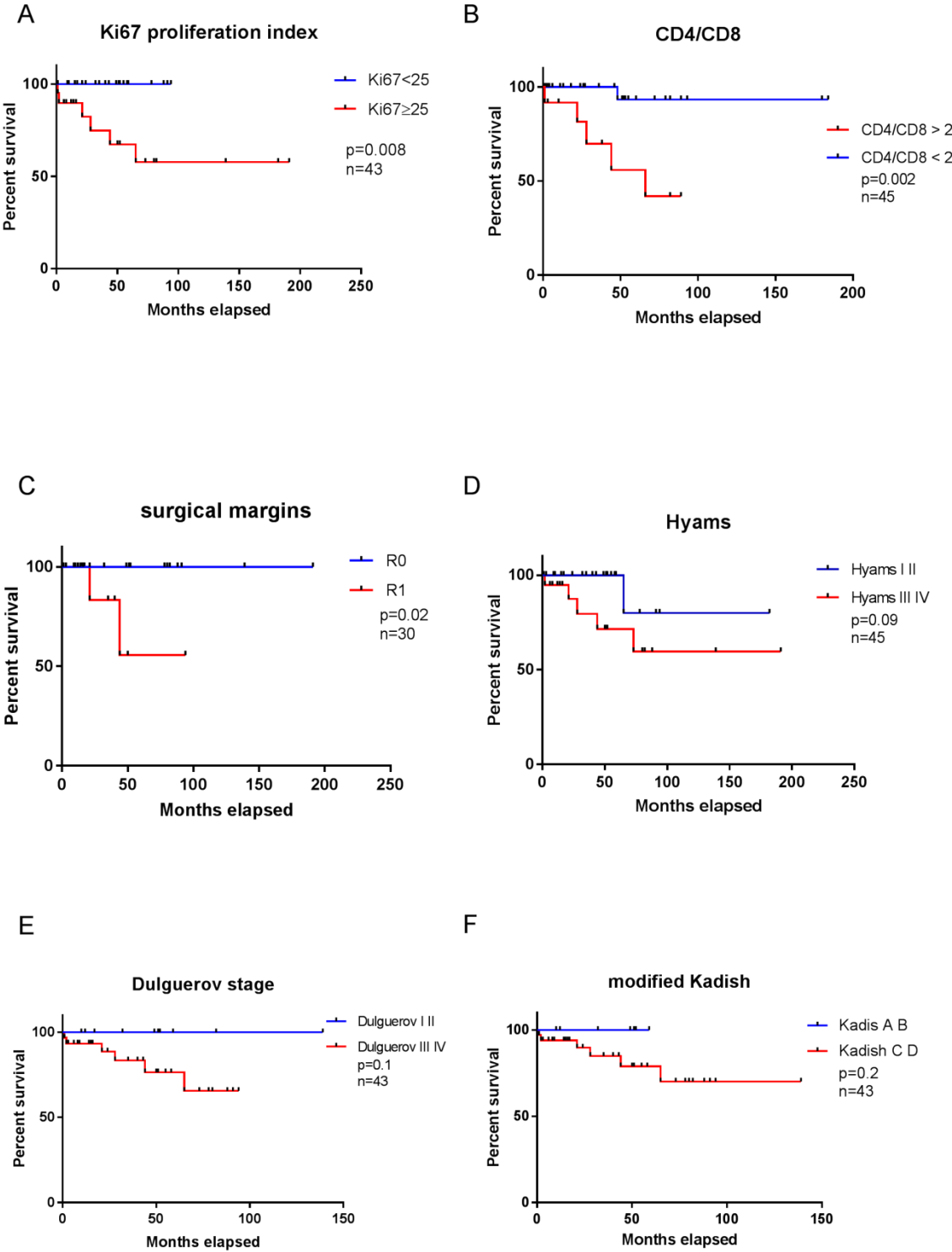


Figure S4

Characteristics	
No. of patients available	45
Age, years	
median	52
range	13-88
Sex (N, %)	
Male	24 (53,3)
Female	21 (46,7)
Modified Kadish (N, %)	
A	1 (2,2)
B	8 (17,8)
C	29 (64,4)
D	4 (8,9)
Unknown	3 (6,7)
Dulguerov T stage (N,%)	
T1	5 (11,1)
T2	7 (15,6)
T3	12 (26,7)
T4	19 (42,2)
Unknown	2 (4,4)
Surgery (N, %)	
Yes, combined with radiotherapy	31 (68,9)
Yes, alone	7 (15,6)
No, chemotherapy and/or radiotherapy alone	5 (11,1)
Unknown	2 (4,4)
Surgical margins (N, %)	
R0	19 (42,2)
R1	11 (24,5)
Rx	15 (33,3)
Hyams grade (N, %)	
I	6 (13,4)
II	20 (44,4)
III	9 (20)
IV	10 (22,2)
Follow-up (months)	
mean	42
range	1-184
Recurrence	
no	32 (71,1)
Yes, local	3 (6,7)
Yes, distant	5 (11,1)
Unkonwn	5 (11,1)
Status	
Alive with no evidence of disease	28 (62,2)
Alive with disease	5 (11,1)
Dead of disease	6 (13,3)
Dead of other cause	1 (2,2)
Unknown	5 (11,1)

Table 1: Patients characteristics

Hyams	Min	Max	Mean	Median	Standard Deviation	1st quartile	3rd quartile
I	2	10	5.4	4.3	3.68	2.4	9.5
II	1	25	13.3	11.9	8.13	8.4	20
III	8	90	44.7	51	27.64	17.5	66
IV	31	93	71.4	81.5	20.75	57	88

Table 2: Distribution of Ki67 proliferation index between the 4 Hyams categories

	Min	Max	Mean	Median	Standard deviation	1 st quartile	3 rd quartile
Stromal CD20+ TILs/mm ²	5	1302	155	79	218	22	208
Intra epithelial CD20+ TILs/mm ²	0	133	7	0	22	0	4
Stromal CD4+ TILs/mm ²	37	2972	459	224	621	105	452
Intra epithelial CD4+ TILs/mm ²	0	415	56	19	85	7	64
Stromal CD8+ TILs/mm ²	21	2096	315	210	362	137	270
Intra epithelial CD8+ TILs/mm ²	0	864	59	11	156	3	45
Global CD20+ TILs/mm ²	5	1308	163	79	223	22	236
Global CD4+ TILs/mm ²	37	3120	515	301	654	132	505
Global CD8+ TILs/mm ²	21	2960	374	227	490	150	340

Table 3: Distribution of TILs between stromal and intra epithelial compartment

	Median (cell/mm ²) +/- MAD		p-value
	Hyams I-II	Hyams III-IV	
Stromal CD20+ TILs	108.5 +/- 96 (n=28)	59 +/- 36 (n=17)	p=0.3430
Intra-tumoral CD20+ TILs	0 +/- 0 (n=28)	0 +/- 0 (n=17)	p=0.7802
Stromal CD4+ TILs	177.5 +/- 116 (n=28)	316 +/- 161 (n=17)	p=0.1466
Intra-tumoral CD4+ TILs	14 +/- 10.5 (n=28)	62 +/- 51 (n=17)	p=0.0068
Stromal CD8+ TILs	171 +/- 82.5 (n=28)	240 +/- 84 (n=17)	p=0.0246
Intra-tumoral CD8+ TILs	5.5 +/- 5.5 (n=28)	37 +/- 26 (n=17)	p=0.0026

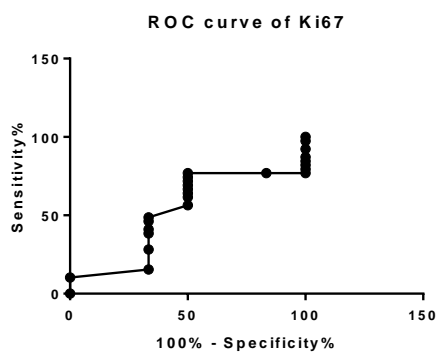
In bold: significant differences; MAD=median absolute deviation

Table 4: Stromal and intra-tumoral TILs according to low or high Hyams Grade

Antibody	Manufacturer	Clone	Dilution	pretreatment	Incubation
Ki67	Dako	MIB-1	1/50	CC1 30'	28'
CD4	Ventana	SP35	Prediluted	CC1 60'	20'
CD8	Dako	144B	1/50	CC1 30'	28'
CD20	Dako	L26	1/200	CC1 30'	28'

Table S1: IHC references and protocols

Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
< 0.5	10.26	2.866% to 24.22%	100	54.07% to 100%	
< 1.5	15.38	5.862% to 30.53%	66.67	22.28% to 95.67%	0.4615
< 2.5	28.21	15% to 44.87%	66.67	22.28% to 95.67%	0.8462
< 3.5	38.46	23.36% to 55.38%	66.67	22.28% to 95.67%	1.154
< 4.5	41.03	25.57% to 57.9%	66.67	22.28% to 95.67%	1.231
< 5.5	46.15	30.09% to 62.82%	66.67	22.28% to 95.67%	1.385
< 6.5	48.72	32.42% to 65.22%	66.67	22.28% to 95.67%	1.462
< 7.5	56.41	39.62% to 72.19%	50	11.81% to 88.19%	1.128
< 9	61.54	44.62% to 76.64%	50	11.81% to 88.19%	1.231
< 11.5	64.1	47.18% to 78.8%	50	11.81% to 88.19%	1.282
< 13.5	66.67	49.78% to 80.91%	50	11.81% to 88.19%	1.333
< 14.5	69.23	52.43% to 82.98%	50	11.81% to 88.19%	1.385
< 15.5	71.79	55.13% to 85%	50	11.81% to 88.19%	1.436
< 18.5	74.36	57.87% to 86.96%	50	11.81% to 88.19%	1.487
< 22	76.92	60.67% to 88.87%	50	11.81% to 88.19%	1.538
< 27	76.92	60.67% to 88.87%	16.67	0.4211% to 64.12%	0.9231
< 31.5	76.92	60.67% to 88.87%	0	0% to 45.93%	0.7692
< 32.5	79.49	63.54% to 90.7%	0	0% to 45.93%	0.7949
< 35	82.05	66.47% to 92.46%	0	0% to 45.93%	0.8205
< 39	84.62	69.47% to 94.14%	0	0% to 45.93%	0.8462
< 41.5	87.18	72.57% to 95.7%	0	0% to 45.93%	0.8718
< 43	92.31	79.13% to 98.38%	0	0% to 45.93%	0.9231
< 54	97.44	86.52% to 99.94%	0	0% to 45.93%	0.9744



	Ki67<25	Ki67≥25
Number of rows	43	43
# of blank lines	20	23
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	23	14
# deaths/events	0	6
Median survival	Undefined	Undefined
Comparison of Survival Curves		
Log-rank (Mantel-Cox) test		
Chi square		6.868
df		1
P value		0.0088
P value summary	**	
Are the survival curves sig different?	Yes	
Gehan-Breslow-Wilcoxon test		
Chi square		6.375
df		1
P value		0.0116
P value summary	*	
Are the survival curves sig different?	Yes	
Median survival		
Ki67<25	Undefined	
Ki67≥25	Undefined	
Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)		
Ratio (and its reciprocal)	A/B	B/A
		0.1142 8.758
95% CI of ratio	0.02253 to 0.5787	1.728 to 44.38
Hazard Ratio (logrank)		
Ratio (and its reciprocal)	A/B	B/A
		0
95% CI of ratio	-1 to -1	-1 to -1

	CD4/CD8>2	CD4/CD8<2
Number of rows	45	45
# of blank lines	33	12
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	7	32
# deaths/events	5	1
Median survival	66	Undefined
Comparison of Survival Curves		
Log-rank (Mantel-Cox) test		
Chi square		9.217
df		1
P value		0.0024
P value summary	**	
Are the survival curves sig different?	Yes	
Gehan-Breslow-Wilcoxon test		
Chi square		9.178
df		1
P value		0.0024
P value summary	**	
Are the survival curves sig different?	Yes	
Median survival		
CD4/CD8 > 2		66
CD4/CD8 < 2	Undefined	
Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)		
Ratio (and its reciprocal)	A/B 16.07 2.676 to 96.53	B/A 0.06223 0.01036 to 0.3737
95% CI of ratio		
Hazard Ratio (logrank)		
Ratio (and its reciprocal)	A/B 12.85 2.163 to 76.32	B/A 0.07784 0.0131 to 0.4624
95% CI of ratio		

	R0	R1
Number of rows	30	30
# of blank lines	9	21
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	21	7
# deaths/events	0	2
Median survival	Undefined	Undefined

Comparison of Survival Curves

Log-rank (Mantel-Cox) test

Chi square		5.62
df		1
P value		0.0178
P value summary	*	
Are the survival curves sig different?	Yes	

Gehan-Breslow-Wilcoxon test

Chi square		5.189
df		1
P value		0.0227
P value summary	*	
Are the survival curves sig different?	Yes	

Median survival

R0	Undefined
R1	Undefined

Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)	0.02185	45.77
95% CI of ratio	0.0009259 to 0.5156	1.94 to 1080

Hazard Ratio (logrank)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)		0
95% CI of ratio	-1 to -1	-1 to -1

	Dulguerov I II III	Dulguerov IV
Number of rows	43	43
# of blank lines	19	24
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	22	15
# deaths/events	2	4
Median survival	Undefined	65

Comparison of Survival Curves

Log-rank (Mantel-Cox) test

Chi square		2.545
df		1
P value		0.1106
P value summary	ns	
Are the survival curves sig different?	No	

Gehan-Breslow-Wilcoxon test

Chi square		2.179
df		1
P value		0.1399
P value summary	ns	
Are the survival curves sig different?	No	

Median survival

Dulguerov I II	Undefined
Dulguerov III IV	Undefined

Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)	0.2384	4.194
95% CI of ratio	0.04097 to 1.388	0.7206 to 24.41

Hazard Ratio (logrank)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)		0
95% CI of ratio	-1 to -1	-1 to -1

	Hyams I II	Hyams III IV	
Number of rows	45	45	
# of blank lines	22	23	
# rows with impossible data	0	0	
# censored subjects	22	17	
# deaths/events	1	5	
Median survival	Undefined	Undefined	
Comparison of Survival Curves			
Log-rank (Mantel-Cox) test			
Chi square		2.954	
df		1	
P value		0.0857	
P value summary	ns		
Are the survival curves sig different?	No		
Gehan-Breslow-Wilcoxon test			
Chi square		4.233	
df		1	
P value		0.0396	
P value summary	*		
Are the survival curves sig different?	Yes		
Median survival			
Hyams I II	Undefined		
Hyams III IV	Undefined		
Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)	A/B	B/A	
Ratio (and its reciprocal)		0.2426	4.123
95% CI of ratio	0.04822 to 1.22	0.8196 to 20.74	
Hazard Ratio (logrank)	A/B	B/A	
Ratio (and its reciprocal)		0.1889	5.292
95% CI of ratio	0.03811 to 0.9368	1.067 to 26.24	

	Kadis A B	Kadish C D
Number of rows	43	43
# of blank lines	34	9
# rows with impossible data	0	0
# censored subjects	9	28
# deaths/events	0	6

Median survival Undefined Undefined

Comparison of Survival Curves

Log-rank (Mantel-Cox) test

Chi square		1.5
df		1
P value		0.2207
P value summary	ns	
Are the survival curves sig different?	No	

Gehan-Breslow-Wilcoxon test

Chi square		1.36
df		1
P value		0.2436
P value summary	ns	
Are the survival curves sig different?	No	

Median survival

Kadis A B	Undefined
Kadish C D	Undefined

Hazard Ratio (Mantel-Haenszel)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)	0.272	3.677
95% CI of ratio	0.03384 to 2.186	0.4575 to 29.55

Hazard Ratio (logrank)

	A/B	B/A
Ratio (and its reciprocal)		0
95% CI of ratio	-1 to -1	-1 to -1

Table S2 Ki67 ROC curve and survival analyses data

Hyams	Mean	Standard Deviation	Minimum	Maximum	Median	Median absolute deviation	First quartile	Third quartile
I	0.7	1.15	0	2	0	0	0	2
II	4.4	3.71	0	13	3	2.5	2	7
III	20.4	17.53	1	44	15	14	4.5	39
IV	30.2	16.44	7	64	27	9	21	42

Table S3: Descriptive statistics for parameter mitoses /2,5mm²

Spearman	Ki67	mitoses /25mm ²	CD20 in stroma	CD20 within tumor	CD4 in stroma	CD4 within tumor	CD8 in stroma	CD8 within tumor	CD4/CD8	Total Lc within tumor	Tota Lc in stroma
Ki67		0.71	-0.09	-0.13	0.20	0.31	0.33	0.34	-0.11	0.30	0.22
mitoses /25mm ²	0.71		-0.01	-0.04	0.11	0.29	0.51	0.37	-0.24	0.35	0.25
CD20 in stroma	-0.09	-0.01		0.24	0.65	0.31	0.52	0.07	0.36	0.22	0.79
CD20 within tumor	-0.13	-0.04	0.24		0.18	0.57	0.08	0.27	0.21	0.53	0.20
CD4 in stroma	0.20	0.11	0.65	0.18		0.56	0.59	0.26	0.63	0.44	0.89
CD4 within tumor	0.31	0.29	0.31	0.57	0.56		0.33	0.67	0.36	0.93	0.47
CD8 in stroma	0.33	0.51	0.52	0.08	0.59	0.33		0.43	-0.12	0.42	0.82
CD8 within tumor	0.34	0.37	0.07	0.27	0.26	0.67	0.43		-0.16	0.86	0.28
CD4/CD8	-0.11	-0.24	0.36	0.21	0.63	0.36	-0.12	-0.16		0.13	0.36
Total Lc within tumor	0.30	0.35	0.22	0.53	0.44	0.93	0.42	0.86	0.13		0.42
Tota Lc in stroma	0.22	0.25	0.79	0.20	0.89	0.47	0.82	0.28	0.36	0.42	

p value	Ki67	mitoses /25mm ²	CD20 in stroma	CD20 within tumor	CD4 in stroma	CD4 within tumor	CD8 in stroma	CD8 within tumor	CD4/CD8	Total Lc within tumor	Tota Lc in stroma
Ki67		0.00	0.55	0.41	0.20	0.04	0.03	0.03	0.50	0.05	0.16
mitoses /25mm ²	0.00		0.94	0.80	0.46	0.05	0.00	0.01	0.12	0.02	0.10
CD20 in stroma	0.55	0.94		0.11	0.00	0.04	0.00	0.67	0.02	0.14	0.00
CD20 within tumor	0.41	0.80	0.11		0.24	0.00	0.62	0.07	0.16	0.00	0.19
CD4 in stroma	0.20	0.46	0.00	0.24		0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00
CD4 within tumor	0.04	0.05	0.04	0.00	0.00		0.02	0.00	0.02	0.00	0.00
CD8 in stroma	0.03	0.00	0.00	0.62	0.00	0.02		0.00	0.43	0.00	0.00
CD8 within tumor	0.03	0.01	0.67	0.07	0.09	0.00	0.00		0.30	0.00	0.06
CD4/CD8	0.50	0.12	0.02	0.16	0.00	0.02	0.43	0.30		0.41	0.02
Total Lc within tumor	0.05	0.02	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.41		0.00
Tota Lc in stroma	0.16	0.10	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00	0.06	0.02	0.00	

Table S4: Correlation matrix corresponding to Figure S2 (TILs parameters, Ki67PI and mitotic count)

XII. Discussion

Ce travail constitue la première étude multi-omics ayant permis de déterminer une classification moléculaire des neuroblastomes olfactifs. Nous avons pu identifier 2 grands types de NBO présentant des caractéristiques phénotypiques et clinicopathologiques différentes, que nous avons appelés le type neural et le type basal. Ces différences pourraient être liées à une cellule d'origine différente au sein de l'épithélium olfactif. Nous avons également identifié des mutations *IDH2* récurrentes possiblement associées à des mutations *TP53* dans une sous-population des NBO de type basal, et la présence d'une densité plus importante de TILs dans le type basal.

A. Mutations somatiques dans les NBO : des mutations *IDH2* dans les tumeurs de type basal

Notre étude est la première à rapporter une analyse par whole exome sequencing sur une large série de NBO. Le taux de mutations des NBO n'a jamais été rapporté à notre connaissance. Nous avons trouvé un taux de mutations variable allant de 6 à 219 avec une moyenne de 46 et une médiane de 20. Nous avons mis en évidence des mutations au niveau de gènes impliqués dans le cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine, la réparation de l'ADN, et au niveau de gènes connus pour être impliqués dans la genèse des carcinomes basocellulaires. Il y a très peu d'études moléculaires sur les NBO, les 2 études déjà rapportés en 2017 ont utilisés le séquençage ciblé de 108 et 265 gènes impliqués dans le cancer (2, 145). Elles ont décrit, comme nous, des altérations somatiques variées impliquant des gènes liés aux mécanismes indispensables au cancer que sont le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'autonomie en signaux de croissances (2, 145). Aucun n'a rapporté de mutations récurrentes. Dans notre série, nous avons identifié des mutations *IDH2* R132 dans 16,7% des cas testés. Dans les glioblastomes la fréquence des mutations *IDH1* est estimée à 12% (180). Des mutations *IDH2* ont maintenant été rapportées dans de nombreux types tumoraux, et notamment dans des gliomes, des leucémies myéloïdes aiguës, des chondrosarcomes ou encore des cholangiocarcinomes. Son rôle oncogénique comme mutation conductrice a été montré dans les gliomes et glioblastomes (181). Dans notre série, nous avons pu évaluer l'hétérogénéité intratumorale pour 2 cas, dont un muté *IDH2*. De façon intéressante, la mutation *IDH2* était observée dans les 2 fragments tumoraux, suggérant qu'il pourrait s'agir

d'un évènement précoce dans la tumorigenèse. Les mutations d'*IDH1/2* sont responsables d'une activation enzymatique avec pour résultat une production de D-2HG (96). La forte concentration en D-2HG (D-2 Hydroxyglutarate) a notamment pour conséquence d'inhiber les dioxygénase dépendantes d' α KG (α Ketoglutarate) dont font partie les histones déméthylases JMJD2 et JHDM1 et la DNA déméthylase TET2. Ces mutations *IDH* provoquent donc une modification du métabolisme cellulaire et de la régulation épigénétique. Des associations entre mutation *SDH/IDH* et phénotype CIMP ont été montrées dans les paragangliomes (88), les gliomes (89) et les cholangiocarcinomes (87). Dans notre série, nous avons également observé un phénotype CIMP dans les tumeurs mutées *IDH2*. Nous élargissons donc le panel de tumeurs CIMP en y ajoutant les esthésioneuroblastomes (E-CIMP). Le rôle oncogénique des mutations *IDH* associées à un phénotype hyperméthylateur a été montré dans plusieurs types tumoraux. Il a été rapporté que le phénotype CIMP était responsable d'un blocage du processus de différenciation, et que les traitements ciblant *IDH2* pouvaient induire la différenciation des cellules tumorales dans des leucémies et des gliomes (182, 183). Ceci est cohérent avec l'observation de mutations *IDH2* uniquement dans des tumeurs naso-sinusiennes peu différenciées. C'est également intéressant à noter, car un processus de maturation post-chimiothérapie néoadjuvante (Cisplatine-Etoposide) a été observé dans un cas muté *IDH2* de notre série (ENB-42, donnée non rapportée).

De façon très intéressante, des mutations *IDH2* ont été rapportées très récemment dans des carcinomes indifférenciés naso-sinusiens (SNUC) (184, 185). Dans ces 2 séries, les cas mutés étaient localisés dans les sinus ethmoïdaux ou sphénoïdaux avec extension à la base du crâne, et certains cas comportaient des cellules tumorales exprimant des marqueurs neuro-endocrines. La définition OMS des SNUC reste floue, il s'agit d'un carcinome du tractus naso-sinusal ne présentant aucun signe de différenciation, que ce soit malpighienne, glandulaire ou autre. L'étiologie de ces tumeurs n'est pas connue. L'existence d'un contingent des cellules exprimant des marqueurs neuroendocrine dans les SNUC rapportés dans ces 2 études pose question. Les anomalies moléculaires identifiées dans la série de Dogan *et al* sont similaires à celles observées dans notre série, avec notamment cooccurrence de mutations *IDH2-TP53*, des mutations *KIT*, *RBI*, *APC*, *ARID1A* ou *BRCA2*, et des amplifications de *MYC*. Les anomalies moléculaire rapportées par Jo *et al* ont également des similitudes avec celles que nous avons trouvées, ciblant notamment *TP53*, *SMARCA4*, *RBI*, *APC* ou encore *ARID1A*. Il est possible que les tumeurs étudiées dans ces 2 séries puissent correspondre à des NBO très peu différenciés, de type basal. On peut également noter que dans la série de Dogan

et al, des mutations *IDH2* ont également été observées dans un adénocarcinome de type non intestinal indifférencié, localisé l'éthmoïde, et dans un cas de carcinome neuroendocrine à grandes cellules. Dans cette étude 4 NBO ont été séquencés et ne présentaient pas de mutations *IDH2* mais il s'agissait de tumeurs bien différenciées avec seulement une tumeur de haut grade. Il faut d'ailleurs noter que quelques cas de NBO mutés *IDH2* et/ou *TP53* ont été rapportés (2, 144, 145). Ceci témoigne du besoin indéniable d'une caractérisation phénotypique large des tumeurs se développant aux dépends des sinus ethmoïdaux et sphénoïdaux. En effet, nous avons établi une classification moléculaire basée sur l'expression d'ARN messagers, qui est tout à fait cohérente avec la classification établie à partir de l'expression protéique. Il serait intéressant d'appliquer ce type d'analyse à toutes les tumeurs peu ou indifférenciées naso-sinusiennes.

B. Vers une identification de la cellule d'origine des NBO?

Un clustering non supervisé basé sur l'expression (ARN messenger) nous a permis de montrer que les NBO constituent une catégorie distincte par rapport à de nombreux autres types tumoraux. De façon intéressante, nous avons montré que le profil ARN des NBO était proche de celui des gliomes et glioblastomes, mais surtout proche de celui des paragangliomes (PGG). Cette information est tout à fait passionnante puisque les paragangliomes partagent des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques indéniables avec les NBO, et en particulier l'expression de marqueurs neuroendocrines et la présence de cellules S100 positives à l'interface tumeur/stroma. Ils ont également comme point commun la présence d'un stroma richement vascularisé avec l'existence de bouquets vasculaires. Au niveau moléculaire, ces 2 types tumoraux peuvent présenter un phénotype CIMP lié à des mutations d'enzymes du cycle de Krebs (famille IDH pour les NBO, famille SDH pour les PGG). La cellule d'origine des PGG est issue des crêtes neurales (186). Il a été rapporté que les cellules des crêtes neurales jouent un rôle important dans le développement du système olfactif, et surtout qu'elles seraient responsables de la capacité singulière de l'épithélium olfactif à la neurogenèse et à la régénération neuronale (187). Tout comme les PGG, les NBO pourraient être issus de cellules des crêtes neurales, ce qui pourrait expliquer leurs points communs.

Au cours de notre travail, nous avons identifié 2 sous-types de NBO que nous avons appelé neural et basal en raison de leur phénotype suite à l'analyse des réseaux ontologiques

des gènes surexprimés dans chaque groupe. Nous avons notamment observé que parmi les gènes surexprimés dans les NBO de type basal, se trouvaient des gènes impliqués dans la voie de signalisation des carcinomes baso cellulaires, et en particulier des acteurs des voies Wnt et SHH. C'est une information intéressante car la voie SHH avait déjà été rapportée comme importante dans le développement des NBO (147) et que la voie Wnt a été rapportée comme nécessaire et suffisante aux cellules basales de l'épithélium olfactif pour prendre la voie de différenciation neuronale (119).

Nous avons ensuite montré l'existence de similitudes entre certains NBO de type neural et les progéniteurs neuronaux et neurones olfactifs immatures (INP2, INP3, iOSN) d'une part, et entre certains NBO de type basal et les cellules basales de renouvellement (GBC) et progéniteurs neuronaux très immatures (INP1) d'autre part. Cette analyse conforte l'hypothèse selon laquelle les NBO se développeraient à partir de l'épithélium olfactif (121). Elle donne également une explication potentielle aux différences phénotypiques parfois marquées au sein d'une même classe tumorale (notamment entre un NBO de grade I et un NBO de grade IV). Elle pose également la question de la cellule d'origine des SNUC ou des SNEC qui se développent au niveau de l'éthmoïde ou de la base du crâne. En effet, selon les études récentes de Schwob *et al*, et de Fletcher *et al*, les cellules de renouvellement de l'épithélium olfactif peuvent donner naissance à tous les types cellulaires qui composent l'épithélium olfactif, à savoir les neurones olfactifs, les cellules épithéliales de soutien, les cellules glandulaires et les cellules microvillosités (111, 119). Si les mêmes progéniteurs peuvent donner naissance à ces cellules épithéliales ou neuronales, il devient possible d'expliquer qu'une tumeur développée à partir de ces cellules totipotentes puisse exprimer aussi bien des marqueurs neuronaux ou neuro-endocrines que des marqueurs épithéliaux comme les cytokératines. Ceci pose la question du diagnostic différentiel entre les NBO de type basal, les SNUC et les SNEC développés aux dépens de l'éthmoïde. Ceci pourrait expliquer pourquoi 2 équipes ont observé des mutations *IDH2* dans des tumeurs identifiées comme des SNUC développées au niveau de la base du crâne. Une large étude moléculaire incluant des SNUC des SNEC et des NBO de haut grade permettraient de vérifier cette hypothèse.

L'étude du méthylome des ENB a permis décrire le phénotype E-CIMP. Nous avons par ailleurs montré que la signature de méthylation des ENB mutés *IDH2* appliquée à des glioblastomes permettait d'identifier et de regrouper les cas mutés *IDH*. Ces résultats

suggèrent l'existence d'une reprogrammation épigénétique similaire dans les tumeurs présentant des mutations *IDH* (188). Notre avons montré que les gènes hyperméthylés au sein des tumeurs E-CIMP étaient notamment impliqués dans des fonctions neuronales. Ceci apporte des arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle le phénotype CIMP est associé à un blocage des processus de différenciation (189). En effet, parmi les sondes hyperméthylées dans les tumeurs E-CIMP nous avons observé un enrichissement en sondes localisée dans l'exon1. La méthylation au niveau de l'exon1 a été rapportée comme associée à une répression transcriptionnelle (79). L'analyse de réseau ontogénique a montré que les gènes présentant une hyperméthylation au niveau de l'exon1 dans les ENB mutés *IDH2* étaient impliqués dans des fonctions neuronales, ce qui est également cohérent avec un blocage de la différenciation neuronale dans les tumeurs E-CIMP.

En excluant les tumeurs E-CIMP pour ne pas biaiser nos analyses, nous avons pu montrer qu'un clustering non supervisé établi à partir des sondes différenciellement méthylées dans les ENB non CIMP donnait un résultat cohérent avec les clustering obtenu à partir des données de RNASeq et d'expression protéique. Parmi les sondes hyperméthylées dans le groupe basal par rapport au groupe neural, nous avons observé un enrichissement en sondes localisées dans les régions 3'UTR. Parmi les sondes hypométhylées dans le groupe basal par rapport au groupe neural nous avons observé un enrichissement en sondes localisées dans les enhancers. Ces observations sont intéressantes car les régions 3'UTR et les enhancers sont impliqués dans les processus de différenciation (190-193). De plus, parmi les sondes différenciellement méthylées entre les 2 groupes au niveau des promoteurs, nous avons notamment mis en évidence un enrichissement en sondes déméthylées dans les promoteurs des tumeurs de type neural. L'analyse de réseau ontologique a montré que les gènes déméthylés dans les promoteurs des tumeurs neurales étaient notamment impliqués dans des fonctions neuronales. Par ailleurs, ces données étaient cohérentes avec notre observation d'une expression moyenne plus élevée de ces gènes déméthylés au niveau de leur promoteur dans le groupe neural. Une corrélation entre le niveau de méthylation et le niveau d'expression reste cependant à établir. Sachant que l'étude du profil de méthylation de l'ADN des cellules cancéreuse est un moyen d'identifier leur cellule d'origine (194, 195), nos données de méthylation confortent l'hypothèse d'une cellule d'origine présentant des caractéristiques neuronales pour les NBO de type neural et d'une cellule d'origine présentant des caractéristiques indifférenciées embryonnaires pour les NBO de type basal.

C. Environnement immunitaire des NBO

Nous avons ensuite exploré l'environnement immunitaire des NBO qui n'a jamais été rapporté à ce jour. Nous avons mis en évidence que certains neuroblastomes olfactifs sont infiltrés par de nombreux lymphocytes, plutôt des lymphocytes T que des B. Nous avons également pu montrer que les TILs pénétrant les lobules tumoraux étaient plus nombreux dans les NBO de type basal que ceux de type neural. Ces données immunohistochimiques nous ont fourni une information spatiale sur l'environnement immunitaire, permettant d'identifier la localisation des lymphocytes. Elles étaient complémentaires et cohérentes avec les données d'expression. Nous avons notamment trouvé une corrélation positive entre la densité de T CD8⁺ intra-tumorale et le niveau d'expression du CD8A. Nous avons donc ensuite évalué l'expression d'autres gènes d'intérêt dans l'immunité anti-tumorale et avons découvert qu'une partie des tumeurs de type basal présentait une expression plus importante de marqueurs cytotoxiques, de chimiokines pro-inflammatoires, de gènes impliqués dans la réponse Th17, de facteurs immunosuppresseurs et d'immunes checkpoints. Ces données sont intéressantes car, bien que n'ayant pu utiliser que peu de cas, nous avons montré que les tumeurs de type basal présentaient un taux de mutations significativement plus élevé que celles de type neural. Ceci pourrait en partie expliquer la présence d'une densité plus importante de TILs dans les NBO de type basal. En effet il est maintenant reconnu que la charge mutationnelle est associée à la composition du microenvironnement tumoral (196-198).

Cependant, malgré une densité plus élevée en T CD8⁺ dans les tumeurs de type basal, ces dernières restent de moins bon pronostic. Cela pourrait être lié à une expression de facteurs immunosuppresseurs, à l'activation des checkpoint immunitaires ou encore à une réponse Th17 dans ces tumeurs. L'impact pronostic péjoratif de la réponse Th17 et des cellules T reg a notamment été montré par plusieurs équipes (199-201). Les cellules Th17 représentent un sous-groupe de T helpers. Elles s'accumuleraient de façon beaucoup plus importantes dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains (202). Leur rôle proinflammatoire et leur implication dans certaines maladies auto-immunes a été montré (203), en revanche, leur rôle bénéfique ou péjoratif dans les cancers reste controversé (204). Il serait intéressant d'approfondir le rôle des cellules Th17 dans les NBO.

Nous avons également observé l'expression de PD-L1 dans certaines tumeurs, cette expression n'était pas restreinte au type basal mais elle était plus fréquente dans les NBO de type basal que dans les NBO de type neural. C'est également dans les NBO de type basal que nous avons observé le plus de TILs. Il a été rapporté dans d'autres types tumoraux, une expression plus marquée de PD-L1 dans les tumeurs présentant une plus forte densité de TILs (205). De façon intéressante, l'expression de PD-L1 a également été rapportée dans un sous-type basal de cancer du sein (206). Une confirmation de ces données est nécessaire sur une série indépendante.

Nous avons également montré au cours de nos travaux qu'un ratio $CD4/CD8 > 2$ était de mauvais pronostic. Ceci soutient l'importance d'un équilibre entre les cellules effectrices et régulatrices dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Il serait intéressant de compléter ces travaux par l'évaluation immunohistochimique d'autres checkpoints immunitaires et par la quantification de la proportion de cellules T régulatrices parmi les cellules T CD4+.

D. Outils pronostiques en pratique

Notre travail sur les NBO a mis en évidence l'existence de 2 grands types de tumeurs présentant des caractéristiques transcriptomiques et clinico-pathologiques différentes. Notre classification moléculaire étant cohérente avec les données d'expression protéique, nous avons pu évaluer l'impact pronostique de cette classification sur 51 cas de NBO. Ces analyses ont montré l'intérêt de notre classification moléculaire en montrant une survie plus prolongée chez les patients atteints par un NBO de type neural par rapport à ceux atteints d'un type basal. Ces résultats restent cependant à confirmer sur d'autres séries, d'autant que la prise en charge thérapeutique n'est pas homogène dans notre série.

Dans ce clustering basé sur l'expression protéique, ont été utilisés des marqueurs employés en routine par les pathologistes, et qui pourraient être applicables en pratique diagnostique. Une étude basée sur le grade de Hyams prenant également en compte le profil immunohistochimique des tumeurs a montré le mauvais pronostic des tumeurs peu différenciées (177) sans pour autant pouvoir suggérer de marqueur fiable et reproductible. Parmi les marqueurs utilisés pour le clustering protéique se trouve l'index de prolifération Ki67. L'index de prolifération Ki67 est un outil largement utilisé dans la classification des tumeurs neuroendocrines (207, 208). Nous avons montré que dans les NBO, le Ki67 était un

outil pronostique intéressant et qu'un seuil de 25 permettrait de prédire une évolution péjorative. Le Ki67 pourrait donc permettre d'identifier les tumeurs à risque.

Certains NBO peuvent avoir une évolution très agressive, nous avons montré que l'identification des TILs avec évaluation du ratio CD4/CD8 pourrait également s'intégrer dans une stratégie d'évaluation pronostique mais également comme outil théranostique. Une validation de ces résultats est nécessaire dans une cohorte indépendante.

E. Vers de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les NBO.

La révolution des traitements personnalisés des cancers est maintenant en plein essor. Dans cette optique, une stratification des patients est indispensable. Notre classification moléculaire des NBO prend tout son intérêt en permettant d'identifier des tumeurs plus ou moins agressives. Le type neural, étant associé à une survie plus prolongée, pourrait être considéré comme une tumeur à risque faible pour lequel la stratégie thérapeutique pourrait se limiter à une association de chirurgie et radiothérapie. Le type basal, étant associé à une moins bonne survie, pourrait être considéré comme une tumeur à risque pour laquelle se justifierait une approche thérapeutique plus agressive, avec notamment l'utilisation de chimiothérapie. Nous avons d'ailleurs mis en évidence des mutations de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, ce qui pourrait participer à la réponse de ces tumeurs aux sels de platines et à la radiothérapie.

La mise en évidence du type basal, permettrait également d'identifier les patients qui bénéficieraient d'une recherche de mutation *IDH2*. La présence de mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* est maintenant devenu une cible thérapeutique (95). Ces mutations constituent donc une ouverture thérapeutique intéressante pour des tumeurs parfois difficiles à traiter. Les mutations *IDH* sont associées à un phénotype hyperméthylateur. Ceci ouvre également vers de nouvelles possibilités thérapeutiques puisque, bien qu'encore émergentes, des recherches sont encore cours pour cibler l'hyperméthylation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (209).

Enfin, nos travaux ont montré que l'immunothérapie pourrait avoir un intérêt dans certains NBO. Nous avons notamment montré que certaines tumeurs de type basal sont particulièrement infiltrées par les TILs et qu'elles expriment plus fréquemment PD-L1. Le ratio CD4/CD8 pourrait également être intéressant pour identifier les cas présentant un

déséquilibre entre régulateurs et effecteurs, et qui, eux aussi, pourraient bénéficier d'un traitement par immunothérapie. Ces données devront être confirmées sur d'autres séries.

XIII. Perspectives

Nous avons décrit la première classification moléculaire des NBO et avons mis en évidence des outils pratiques pour les pathologistes afin de distinguer les NBO de type neural des NBO de type basal. Ces résultats sont à confirmer sur d'autres séries indépendantes. L'utilisation de l'expression des cytokératines, de la protéine S100 et du Ki67 serait notamment à valider en tant qu'outil de classification des tumeurs olfactives sur un set indépendant de NBO.

Nous avons mis en évidence des différences transcriptomiques entre les NBO au niveau des ARN messagers, il serait intéressant de compléter cette étude par une analyse des ARN longs non codants (lncRNA). En effet le profil d'expression des lncRNA serait tissu-spécifique (210) et leur utilité en tant que marqueur pronostique a été montré dans certaines tumeurs (211).

Il serait également intéressant de compléter ce travail par une caractérisation transcriptomique de tumeurs ayant été classées comme SNUC ou SNEC s'étant développée au niveau de l'éthmoïde afin de voir si ces tumeurs ne correspondraient finalement pas, pour certaines d'entre elles, à des NBO de type basal.

L'effet oncogène des mutations *IDH* a été montré sur des modèles de souris présentant un Knock-in (KI) *IDH1* tissu spécifique, notamment pour le tissu hématopoïétique, le cerveau et le cartilage (212). Dans le modèle d'enchondromes causés par des mutations *IDH1*, il a été montré que la mutation *IDH1* seule ne générerait que des tumeurs bénignes, mais l'addition de mutation *TP53* était responsable du développement de chondrosarcomes (212). Ceci est tout à fait intéressant puisque nous avons trouvé une cooccurrence de mutations *IDH2* et *TP53* dans les NBO de type basal. Il serait intéressant de développer un modèle murin *IDH2* KI spécifiquement dans l'épithélium olfactif, avec et sans mutations *TP53* associée, pour confirmer le rôle oncogénique de ces mutations puis pour y évaluer l'efficacité de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Nous avons aussi mis en évidence un phénotype CIMP associé aux mutations *IDH2*. Il serait nécessaire d'explorer le contenu en 5mC des tumeurs *IDH2* mutées par rapport aux WT en étudiant l'expression de 5mC par IHC comme cela a été fait dans d'autres tumeurs (88). Il

serait également intéressant d'étudier l'accumulation de 2HG qui pourrait servir de biomarqueur comme cela a été montré dans les gliomes (213).

Enfin, nous avons caractérisé l'environnement immunitaire des NBO pour la première fois. Nous avons mis en évidence une densité plus importante de TILs dans les tumeurs de type basal, associée à une activation d'immunes checkpoints. Il faudrait élargir l'étude de la texture immunitaire de ces tumeurs en déterminant les proportions de Treg, mais aussi en étudiant l'expression de checkpoints immunitaires autres que PD-L1. En effet, de nouvelles thérapies ciblant d'autres checkpoints sont en cours de développement et pourraient représenter des cibles thérapeutiques supplémentaires dans les NBO de type basal.

XIV. Conclusion

Ce travail s'est efforcé de caractériser les NBO en associant des techniques de WES, de RNASeq, de DNA methylation et d'immunohistochimie. Cette approche multi-omics a tout d'abord permis une meilleure compréhension de la biologie de cette maladie peu connue, en mettant notamment en évidence des arguments moléculaires suggérant que les NBO se développeraient à partir des cellules de renouvellement de l'épithélium olfactif. Elle a également permis l'émergence d'une nouvelle classification des NBO associée à leur pronostic. Les 2 différents types de tumeurs identifiés, à savoir neural et basal, pouvant être potentiellement liés à une cellule d'origine différentes, les uns pouvant se développer à partir de progéniteurs neuronaux à un stade déjà avancé de leur différenciation, les autres pouvant dériver de cellules basales encore peu différenciées. Ces découvertes seront à confirmer par d'autres études.

Notre étude a aussi élargi le paysage des mutations somatiques présentes dans les NBO, en identifiant des mutations impliquées dans le cycle cellulaire, le remodelage de la chromatine, et la réparation de l'ADN. Elle a en particulier montré l'existence de mutations récurrentes du gène *IDH2* dans les tumeurs de type basal, survenant parfois de manière associée aux mutations *TP53*. Ceci ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Par notre étude du méthylome, nous avons pu montrer que les mutations *IDH2* étaient associées à un phénotype hyperméthylateur. Ceci n'avait jamais été rapporté et constitue une également ouverture thérapeutique pour ces tumeurs rares.

Notre travail a également permis de trouver des marqueurs utilisables en pratique clinique pour mieux classer les NBO et identifier les sujet à risque, notamment en étudiant les marqueurs neuroendocrine, l'expression des cytokératines et l'index de prolifération Ki67. L'identification des tumeurs de type basal permettra de rechercher les mutations *IDH2* de façon ciblée, et de manière générale, la meilleure reconnaissance de tumeurs potentiellement agressives permettra d'adapter la prise en charge des patients.

Enfin, ce travail a montré que l'environnement immunitaire des 2 types de NBO était différent, avec une densité plus élevée de TILs dans les NBO de type basal et une activation de l'immunité dans certains NBO de type basal. Il rapporte aussi l'expression de PD-L1 dans une fraction des NBO. Ces 2 découvertes pourraient encourager les cliniciens à essayer des

stratégies basées sur l'immunothérapie dans les cas réfractaires aux traitements conventionnels.

Au total, notre travail a amélioré les connaissances sur la biologie des neuroblastomes olfactifs et, s'il est confirmé sur d'autres séries, permettra une meilleure stratification des patients atteints de neuroblastome olfactif, avec à la clé une amélioration de leur prise en charge thérapeutique.

Bibliographie

1. Berger L, Luc R, Richard D. L'esthesioneuroepitheliome olfactif. *Bulletin de l'Association Française pour l'Étude du Cancer*. 1924;13:410-241.
2. Gay LM, Kim S, Fedorchak K, et al. Comprehensive genomic profiling of esthesioneuroblastoma reveals additional treatment options. *Oncologist*. 2017.
3. Riazimand SH, Brieger J, Jacob R, et al. Analysis of cytogenetic aberrations in esthesioneuroblastomas by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;136:53-57.
4. Weiss GJ, Liang WS, Izatt T, et al. Paired tumor and normal whole genome sequencing of metastatic olfactory neuroblastoma. *PLoS One*. 2012;7:e37029.
5. Bell D, Saade R, Roberts D, et al. Prognostic utility of hyams histological grading and kadish-morita staging systems for esthesioneuroblastoma outcomes. *Head Neck Pathol*. 2015;9:51-59.
6. Shirzadi AS, Drazin DG, Strickland AS, et al. Vertebral column metastases from an esthesioneuroblastoma: Chemotherapy, radiation, and resection for recurrence with 15-year followup. *Case Rep Surg*. 2013;2013:107315.
7. Ow TJ, Hanna EY, Roberts DB, et al. Optimization of long-term outcomes for patients with esthesioneuroblastoma. *Head Neck*. 2014;36:524-530.
8. Michel J, Fakhry N, Santini L, et al. Nasal and paranasal esthesioneuroblastomas: Clinical outcomes. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 2012;129:238-243.
9. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in globocan 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:E359-386.
10. Rey A, Morvan D, Régis D. Dictionnaire culturel en langue française. SNL, LE Robert ed. Paris: Le Robert; 2005. p. 7232.
11. Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J Cancer Sci Ther*. 2009;1:1-4.
12. DeVita VT, Jr., Rosenberg SA. Two hundred years of cancer research. *N Engl J Med*. 2012;366:2207-2214.
13. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev*. 1989;8:98-101.
14. Weinberg RA. In retrospect: The chromosome trail. *Nature*. 2008;453:725-725.
15. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *J Exp Med*. 1944;79:137-158.
16. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953;171:737-738.
17. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in e. Coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1961;47:1588-1602.
18. Temin HM, Mizutani S. Rna-dependent DNA polymerase in virions of rous sarcoma virus. *Nature*. 1970;226:1211-1213.
19. Baltimore D. Rna-dependent DNA polymerase in virions of rna tumour viruses. *Nature*. 1970;226:1209-1211.
20. Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. *J Mol Biol*. 1970;51:379-391.
21. Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem*. 1988;174:423-436.
22. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
23. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature*. 2009;458:719-724.
24. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-1558.
25. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.

26. Foulds L. The experimental study of tumor progression: A review. *Cancer Res.* 1954;14:327-339.
27. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194:23-28.
28. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* 1996;87:159-170.
29. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the braf gene in human cancer. *Nature.* 2002;417:949-954.
30. Nowell PC. The minute chromosome (ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* 1962;8:65-66.
31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell.* 2011;144:646-674.
32. Lipinski MM, Jacks T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene.* 1999;18:7873-7882.
33. Ghebranious N, Donehower LA. Mouse models in tumor suppression. *Oncogene.* 1998;17:3385-3400.
34. Korsmeyer SJ. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:785-807.
35. Hueber AO, Zornig M, Lyon D, et al. Requirement for the cd95 receptor-ligand pathway in c-myc-induced apoptosis. *Science.* 1997;278:1305-1309.
36. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33:787-791.
37. Vinagre J, Almeida A, Populo H, et al. Frequency of tert promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
38. Bouck N, Stellmach V, Hsu SC. How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res.* 1996;69:135-174.
39. Veikkola T, Alitalo K. Vegfs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol.* 1999;9:211-220.
40. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996;86:353-364.
41. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, et al. The tumour suppressor protein vhl targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature.* 1999;399:271-275.
42. Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, et al. Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14:263-277.
43. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet.* 1996;347:1377-1381.
44. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, et al. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev.* 1998;50:197-263.
45. Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule e-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci.* 1999;24:73-76.
46. Johnson JP. Cell adhesion molecules of the immunoglobulin supergene family and their role in malignant transformation and progression to metastatic disease. *Cancer Metastasis Rev.* 1991;10:11-22.
47. Kaiser U, Auerbach B, Oldenburg M. The neural cell adhesion molecule ncam in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 1996;20:389-395.
48. Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: A cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol.* 2009;174:1588-1593.
49. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: Acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9:265-273.
50. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The snail genes as inducers of cell movement and survival: Implications in development and cancer. *Development.* 2005;132:3151-3161.
51. Micalizzi DS, Farabaugh SM, Ford HL. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: Parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2010;15:117-134.
52. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, et al. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nat Genet.* 2013;45:1127-1133.

53. Classe M, Malouf GG, Su X, et al. Incidence, clinicopathological features and fusion transcript landscape of translocation renal cell carcinomas. *Histopathology*. 2017;70:1089-1097.
54. Foote MB, Papadopoulos N, Diaz LA, Jr. Genetic classification of gliomas: Refining histopathology. *Cancer Cell*. 2015;28:9-11.
55. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490:61-70.
56. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in *pdgfra*, *idh1*, *egfr*, and *nf1*. *Cancer Cell*. 2010;17:98-110.
57. Sfakianos JP, Cha EK, Iyer G, et al. Genomic characterization of upper tract urothelial carcinoma. *Eur Urol*. 2015;68:970-977.
58. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, et al. Meta-analysis of the luminal and basal subtypes of bladder cancer and the identification of signature immunohistochemical markers for clinical use. *EBioMedicine*. 2016;12:105-117.
59. Choi W, Ochoa A, McConkey DJ, et al. Genetic alterations in the molecular subtypes of bladder cancer: Illustration in the cancer genome atlas dataset. *Eur Urol*. 2017.
60. Kim KJ, Li B, Winer J, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993;362:841-844.
61. Tomasetti C, Vogelstein B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*. 2015;347:78-81.
62. Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. *Cell*. 2013;153:17-37.
63. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, et al. Milestones of lynch syndrome: 1895-2015. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:181-194.
64. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2073-2087.e2073.
65. Sun C, Burgner DP, Ponsonby A-L, et al. Effects of early-life environment and epigenetics on cardiovascular disease risk in children: Highlighting the role of twin studies. *Pediatr Res*. 2013;73:523-530.
66. Cartron P-F, Pacaud R, Salbert G. Méthylation/déméthylation de l'adn et expression du génome. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2015;2015:37-48.
67. Bourc'his D, Viegas-Pequignot E. Direct analysis of chromosome methylation. *Methods Mol Biol*. 2001;181:229-242.
68. Kaneda M, Okano M, Hata K, et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase *dnmt3a* in paternal and maternal imprinting. *Nature*. 2004;429:900-903.
69. Jeltsch A. Molecular enzymology of mammalian DNA methyltransferases. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;301:203-225.
70. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*. 2004;4:143-153.
71. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008;358:1148-1159.
72. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nat Genet*. 2011;43:768-775.
73. Hesson LB, Packham D, Pontzer E, et al. A reinvestigation of somatic hypermethylation at the pten cpg island in cancer cell lines. *Biol Proced Online*. 2012;14:5.
74. Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, et al. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J Urol*. 2005;173:243-246.
75. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of *iap* endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 1998;20:116-117.
76. Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, et al. Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*. 2003;300:489-492.
77. Hervouet E, Lalier L, Debien E, et al. Disruption of *dnmt1/pcna/uhf1* interactions promotes tumorigenesis from human and mice glial cells. *PLoS One*. 2010;5.
78. Pacaud R, Brocard E, Lalier L, et al. The *dnmt1/pcna/uhf1* disruption induces tumorigenesis characterized by similar genetic and epigenetic signatures. 2014;4:4230.
79. Brenet F, Moh M, Funk P, et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS One*. 2011;6:e14524.

80. Cartron PF, Oliver L, Martin S, et al. The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule bax, baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients. *Hum Mol Genet.* 2002;11:675-687.
81. Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, et al. DNA hypomethylation at the znf206-exon 5 cpg island associated with neuronal differentiation in mice and development of neuroblastoma in humans. *Int J Oncol.* 2012;40:31-39.
82. Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, et al. An alu element-associated hypermethylation variant of the pomc gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet.* 2012;8.
83. Blattler A, Yao L, Witt H, et al. Global loss of DNA methylation uncovers intronic enhancers in genes showing expression changes. *Genome Biol.* 2014;15:469.
84. Xue Q, Zhou YF, Zhu SN, et al. Hypermethylation of the cpg island spanning from exon ii to intron iii is associated with steroidogenic factor 1 expression in stromal cells of endometriosis. *Reprod Sci.* 2011;18:1080-1084.
85. Lou S, Lee HM, Qin H, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. *Genome Biol.* 2014;15:408.
86. Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, et al. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. *Cells.* 2013;2:545-573.
87. Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, et al. Integrative genomic analysis of cholangiocarcinoma identifies distinct idh-mutant molecular profiles. *Cell Rep.* 2017;18:2780-2794.
88. Letouze E, Martinelli C, Loriot C, et al. Sdh mutations establish a hypermethylator phenotype in paraganglioma. *Cancer Cell.* 2013;23:739-752.
89. Turcan S, Rohle D, Goenka A, et al. Idh1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature.* 2012;483:479-483.
90. The metabolism of tumours. Investigations from the kaiser-wilhelm institute for biology, berlin-dahlem. Edited by otto warburg, kaiser-wilhelm institute for biology, berlin-dahlem. Translated from the german edition, with accounts of additional recent researches, by frank dickens, m.A., ph.D., whole-time worker for the medical research council, courtauld institute of biochemistry, middlesex hospital, london. Demy 8vo. Pp. 327 + xxix. Illustrated. 1930. London: Constable & co. Ltd. 40s. Net. *British Journal of Surgery.* 1931;19:168-168.
91. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* 1956;124:269-270.
92. Jones RG, Thompson CB. Tumor suppressors and cell metabolism: A recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 2009;23:537-548.
93. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, et al. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008;7:11-20.
94. Hsu PP, Sabatini DM. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell.* 2008;134:703-707.
95. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, et al. Cancer-associated idh mutations: Biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010;29:6409-6417.
96. Mondesir J, Willekens C, Touat M, et al. Idh1 and idh2 mutations as novel therapeutic targets: Current perspectives. *J Blood Med.* 2016;7:171-180.
97. Sciacovelli M, Gaude E, Hilvo M, et al. The metabolic alterations of cancer cells. *Methods Enzymol.* 2014;542:1-23.
98. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung 1908.
99. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to virchow? *Lancet.* 2001;357:539-545.
100. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy. *Science.* 2013;342:1432-1433.
101. Owen J, Punt J, Stranford S. Immunologie - 7e édition: Le cours de janis kuby avec questions de révision: Dunod; 2014.
102. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014;27:16-25.
103. Chaudhary B, Elkord E. Regulatory t cells in the tumor microenvironment and cancer progression: Role and therapeutic targeting. *Vaccines (Basel).* 2016;4.

104. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, et al. Prevalence of foxp3+ regulatory t cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006;12:5423-5434.
105. Fu J, Xu D, Liu Z, et al. Increased regulatory t cells correlate with cd8 t-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2007;132:2328-2339.
106. Sasaki A, Tanaka F, Mimori K, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory t cells in patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2008;34:173-179.
107. Granier C, Soumelis V, Mandavit M, et al. [the "immune checkpoints", how does it work]. *Ann Pathol.* 2017;37:18-28.
108. Holbrook EH, Wu E, Curry WT, et al. Immunohistochemical characterization of human olfactory tissue. *Laryngoscope.* 2011;121:1687-1701.
109. Im S, Moon C. Transcriptional regulatory network during development in the olfactory epithelium. *BMB Rep.* 2015;48:599-608.
110. Manglapus GL, Youngentob SL, Schwob JE. Expression patterns of basic helix-loop-helix transcription factors define subsets of olfactory progenitor cells. *J Comp Neurol.* 2004;479:216-233.
111. Schwob JE, Jang W, Holbrook EH, et al. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol.* 2017;525:1034-1054.
112. Murray RC, Calof AL. Neuronal regeneration: Lessons from the olfactory system. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10:421-431.
113. Chen M, Tian S, Yang X, et al. Wnt-responsive lgr5(+) globose basal cells function as multipotent olfactory epithelium progenitor cells. *J Neurosci.* 2014;34:8268-8276.
114. Krolewski RC, Packard A, Jang W, et al. Ascl1 (mash1) knockout perturbs differentiation of nonneuronal cells in olfactory epithelium. *PLoS One.* 2012;7:e51737.
115. Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted globose basal cells in olfactory epithelium. *J Comp Neurol.* 2004;469:457-474.
116. Joiner AM, Green WW, McIntyre JC, et al. Primary cilia on horizontal basal cells regulate regeneration of the olfactory epithelium. *J Neurosci.* 2015;35:13761-13772.
117. Packard AI, Lin B, Schwob JE. Sox2 and pax6 play counteracting roles in regulating neurogenesis within the murine olfactory epithelium. *PLoS One.* 2016;11:e0155167.
118. Goldstein BJ, Goss GM, Hatzistergos KE, et al. Adult c-kit(+) progenitor cells are necessary for maintenance and regeneration of olfactory neurons. *J Comp Neurol.* 2015;523:15-31.
119. Fletcher RB, Das D, Gadye L, et al. Deconstructing olfactory stem cell trajectories at single-cell resolution. *Cell Stem Cell.* 2017;20:817-830 e818.
120. El-Naggar AK CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. Who classification of head and neck tumours (4th edition). Iarc: Lyon2017.
121. Bell D, Franchi A, Gillison M, et al. Olfactory neuroblastoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis J, Takata T, Slootweg P, editors. Who classification of head and neck tumours (4th edition): IARC (International Agency for Research on Cancer); 2017. p. 57-59.
122. Broich G, Pagliari A, Ottaviani F. Esthesioneuroblastoma: A general review of the cases published since the discovery of the tumour in 1924. *Anticancer Res.* 1997;17:2683-2706.
123. Dulguerov P, Allal AS, Calcaterra TC. Esthesioneuroblastoma: A meta-analysis and review. *Lancet Oncol.* 2001;2:683-690.
124. Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: A historical analysis of population-based data. *Head Neck.* 2012;34:877-885.
125. Carney ME, O'Reilly RC, Sholevar B, et al. Expression of the human achaete-scute 1 gene in olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma). *J Neurooncol.* 1995;26:35-43.
126. Bell D FA, Gillison M, Thompson L.D.R, Wenig B.M. Tumours of the nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. In: El-Naggar AK CJ, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editor. Who classification of head and neck tumours. 9. 4th ed: IARC; 2017. p. 57-59.
127. Dulguerov P, Calcaterra T. Esthesioneuroblastoma: The ucla experience 1970-1990. *Laryngoscope.* 1992;102:843-849.
128. Jethanamest D, Morris LG, Sikora AG, et al. Esthesioneuroblastoma: A population-based analysis of survival and prognostic factors. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2007;133:276-280.
129. Ferlito A, Rinaldo A, Rhys-Evans PH. Contemporary clinical commentary: Esthesioneuroblastoma: An update on management of the neck. *Laryngoscope.* 2003;113:1935-1938.

130. Rimmer J, Lund VJ, Beale T, et al. Olfactory neuroblastoma: A 35-year experience and suggested follow-up protocol. *Laryngoscope*. 2014;124:1542-1549.
131. Koka VN, Julieron M, Bourhis J, et al. Aesthesioneuroblastoma. *J Laryngol Otol*. 1998;112:628-633.
132. Dublin AB, Bobinski M. Imaging characteristics of olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma). *J Neurol Surg B Skull Base*. 2016;77:1-5.
133. Manelfe C, Bonafe A, Fabre P, et al. Computed tomography in olfactory neuroblastoma: One case of esthesioneuroepithelioma and four cases of esthesioneuroblastoma. *J Comput Assist Tomogr*. 1978;2:412-420.
134. Wooff JC, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, et al. Calretinin staining facilitates differentiation of olfactory neuroblastoma from other small round blue cell tumors in the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*. 2011;35:1786-1793.
135. Kadish S, Goodman M, Wang CC. Olfactory neuroblastoma. A clinical analysis of 17 cases. *Cancer*. 1976;37:1571-1576.
136. Morita A, Ebersold MJ, Olsen KD, et al. Esthesioneuroblastoma: Prognosis and management. *Neurosurgery*. 1993;32:706-714; discussion 714-705.
137. Bachar G, Goldstein DP, Shah M, et al. Esthesioneuroblastoma: The princess margaret hospital experience. *Head Neck*. 2008;30:1607-1614.
138. Hyams VJ, Batsakis JG, Michaels L. Tumors of the upper respiratory tract and ear. Atlas tumor pathol. fascicle 25: Washington DC : Armed Forces Institute of pathology; 1988. p. 240-248.
139. Sobin LH, Wittekind C. Uicc tnm classification of malignant tumours. 6th ed2002.
140. Bockmuhl U, You X, Pacyna-Gengelbach M, et al. Cgh pattern of esthesioneuroblastoma and their metastases. *Brain Pathol*. 2004;14:158-163.
141. Holland H, Koschny R, Krupp W, et al. Comprehensive cytogenetic characterization of an esthesioneuroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;173:89-96.
142. Szymas J, Wolf G, Kowalczyk D, et al. Olfactory neuroblastoma: Detection of genomic imbalances by comparative genomic hybridization. *Acta Neurochir (Wien)*. 1997;139:839-844.
143. Guled M, Myllykangas S, Frierson HF, Jr., et al. Array comparative genomic hybridization analysis of olfactory neuroblastoma. *Mod Pathol*. 2008;21:770-778.
144. Czapiewski P, Kunc M, Haybaeck J. Genetic and molecular alterations in olfactory neuroblastoma: Implications for pathogenesis, prognosis and treatment. *Oncotarget*. 2016;7:52584-52596.
145. Lazo de la Vega L, McHugh JB, Cani AK, et al. Comprehensive molecular profiling of olfactory neuroblastoma identifies potentially targetable fgfr3 amplifications. *Mol Cancer Res*. 2017.
146. Mao L, Xia YP, Zhou YN, et al. A critical role of sonic hedgehog signaling in maintaining the tumorigenicity of neuroblastoma cells. *Cancer Sci*. 2009;100:1848-1855.
147. Mao L, Xia YP, Zhou YN, et al. Activation of sonic hedgehog signaling pathway in olfactory neuroblastoma. *Oncology*. 2009;77:231-243.
148. Rares RdEFsICO. Recommandation pour la pratique clinique - tumeurs malignes primitives des fosses nasales et des sinus. juillet 2009.
149. Carta F, Kania R, Sauvaget E, et al. Endoscopy skull-base resection for ethmoid adenocarcinoma and olfactory neuroblastoma. *Rhinology*. 2011;49:74-79.
150. Resto VA, Eisele DW, Forastiere A, et al. Esthesioneuroblastoma: The johns hopkins experience. *Head Neck*. 2000;22:550-558.
151. Slevin NJ, Irwin CJ, Banerjee SS, et al. Olfactory neural tumours--the role of external beam radiotherapy. *J Laryngol Otol*. 1996;110:1012-1016.
152. Villano JL, Bressler L, Propp JM, et al. Descriptive epidemiology of selected olfactory tumors. *J Neurooncol*. 2010;100:73-80.
153. Eden BV, Debo RF, Larner JM, et al. Esthesioneuroblastoma. Long-term outcome and patterns of failure--the university of virginia experience. *Cancer*. 1994;73:2556-2562.
154. Sheehan JM, Sheehan JP, Jane JA, Sr., et al. Chemotherapy for esthesioneuroblastomas. *Neurosurg Clin N Am*. 2000;11:693-701.
155. Bhattacharyya N, Thornton AF, Joseph MP, et al. Successful treatment of esthesioneuroblastoma and neuroendocrine carcinoma with combined chemotherapy and proton radiation. Results in 9 cases. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:34-40.

156. Polonowski JM, Brasnu D, Roux FX, et al. Esthesioneuroblastoma. Complete tumor response after induction chemotherapy. *Ear Nose Throat J*. 1990;69:743-746.
157. Kane AJ, Sughrue ME, Rutkowski MJ, et al. Posttreatment prognosis of patients with esthesioneuroblastoma. *J Neurosurg*. 2010;113:340-351.
158. McElroy EA, Jr., Buckner JC, Lewis JE. Chemotherapy for advanced esthesioneuroblastoma: The mayo clinic experience. *Neurosurgery*. 1998;42:1023-1027; discussion 1027-1028.
159. Jiang GY, Li FC, Chen WK, et al. Therapy and prognosis of intracranial invasive olfactory neuroblastoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011;145:951-955.
160. Chamberlain MC. Treatment of intracranial metastatic esthesioneuroblastoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:357-358.
161. Kiyota N, Tahara M, Fujii S, et al. Nonplatinum-based chemotherapy with irinotecan plus docetaxel for advanced or metastatic olfactory neuroblastoma: A retrospective analysis of 12 cases. *Cancer*. 2008;112:885-891.
162. Montava M, Verillaud B, Kania R, et al. Critical analysis of recurrences of esthesioneuroblastomas: Can we prevent them? *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2014;271:3215-3222.
163. Dunbar EM, Pumphrey PK, Bidari S. Unexpectedly durable palliation of metastatic olfactory neuroblastoma using anti-angiogenic therapy with bevacizumab. *Rare Tumors*. 2012;4:e33.
164. Preusser M, Hutterer M, Sohm M, et al. Disease stabilization of progressive olfactory neuroblastoma (esthesioneuroblastoma) under treatment with sunitinib mesylate. *J Neurooncol*. 2010;97:305-308.
165. de Gabory L, Abdulkhaleq HM, Darrouzet V, et al. Long-term results of 28 esthesioneuroblastomas managed over 35 years. *Head Neck*. 2011;33:82-86.
166. Girod D, Hanna E, Marentette L. Esthesioneuroblastoma. *Head Neck*. 2001;23:500-505.
167. Dias FL, Sa GM, Lima RA, et al. Patterns of failure and outcome in esthesioneuroblastoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;129:1186-1192.
168. Hirose T, Scheithauer BW, Lopes MB, et al. Olfactory neuroblastoma. An immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric study. *Cancer*. 1995;76:4-19.
169. Simon JH, Zhen W, McCulloch TM, et al. Esthesioneuroblastoma: The university of iowa experience 1978-1998. *Laryngoscope*. 2001;111:488-493.
170. Bradley PJ, Jones NS, Robertson I. Diagnosis and management of esthesioneuroblastoma. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003;11:112-118.
171. Rinaldo A, Ferlito A, Shaha AR, et al. Esthesioneuroblastoma and cervical lymph node metastases: Clinical and therapeutic implications. *Acta Otolaryngol*. 2002;122:215-221.
172. Gore MR, Zanation AM. Salvage treatment of late neck metastasis in esthesioneuroblastoma: A meta-analysis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135:1030-1034.
173. Banuchi VE, Dooley L, Lee NY, et al. Patterns of regional and distant metastasis in esthesioneuroblastoma. *Laryngoscope*. 2016.
174. Saade RE, Hanna EY, Bell D. Prognosis and biology in esthesioneuroblastoma: The emerging role of hyams grading system. *Curr Oncol Rep*. 2015;17:423.
175. Van Gompel JJ, Giannini C, Olsen KD, et al. Long-term outcome of esthesioneuroblastoma: Hyams grade predicts patient survival. *J Neurol Surg B Skull Base*. 2012;73:331-336.
176. Kaur G, Kane AJ, Sughrue ME, et al. The prognostic implications of hyam's subtype for patients with kadish stage c esthesioneuroblastoma. *J Clin Neurosci*. 2013;20:281-286.
177. Malouf GG, Casiraghi O, Deutsch E, et al. Low- and high-grade esthesioneuroblastomas display a distinct natural history and outcome. *Eur J Cancer*. 2013;49:1324-1334.
178. Cohen ZR, Marmor E, Fuller GN, et al. Misdiagnosis of olfactory neuroblastoma. *Neurosurg Focus*. 2002;12:e3.
179. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25:1010-1022.
180. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, et al. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet*. 2013;14:703-718.
181. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. Idh mutation in glioma: New insights and promises for the future. *JAMA Neurol*. 2014;71:1319-1325.
182. Wang F, Travins J, DeLaBarre B, et al. Targeted inhibition of mutant idh2 in leukemia cells induces cellular differentiation. *Science*. 2013;340:622-626.

183. Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, et al. An inhibitor of mutant *idh1* delays growth and promotes differentiation of glioma cells. *Science*. 2013;340:626-630.
184. Jo VY, Chau NG, Hornick JL, et al. Recurrent *idh2* r172x mutations in sinonasal undifferentiated carcinoma. *Mod Pathol*. 2017;30:650-659.
185. Dogan S, Chute DJ, Xu B, et al. Frequent *idh2* r172 mutations in undifferentiated and poorly-differentiated sinonasal carcinomas. *J Pathol*. 2017;242:400-408.
186. Maguire LH, Thomas AR, Goldstein AM. Tumors of the neural crest: Common themes in development and cancer. *Developmental Dynamics*. 2015;244:311-322.
187. Katoh H, Shibata S, Fukuda K, et al. The dual origin of the peripheral olfactory system: Placode and neural crest. *Molecular Brain*. 2011;4:34.
188. Goding CR, Pei D, Lu X. Cancer: Pathological nuclear reprogramming? *Nat Rev Cancer*. 2014;14:568-573.
189. Lu C, Venneti S, Akalin A, et al. Induction of sarcomas by mutant *idh2*. *Genes Dev*. 2013;27:1986-1998.
190. Ong CT, Corces VG. Enhancers: Emerging roles in cell fate specification. *EMBO Rep*. 2012;13:423-430.
191. Nguyen MLT, Jones SA, Prier JE, et al. Transcriptional enhancers in the regulation of t cell differentiation. *Front Immunol*. 2015;6.
192. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3' utr: Translational control and development. 2003;4:626.
193. de Moor CH, Meijer H, Lissenden S. Mechanisms of translational control by the 3' utr in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16:49-58.
194. Rijlaarsdam MA, Tax DM, Gillis AJ, et al. Genome wide DNA methylation profiles provide clues to the origin and pathogenesis of germ cell tumors. *PLoS One*. 2015;10:e0122146.
195. Zhang X, Liu S, Shen C, et al. DNA methylation consistency implicates the primary tumor cell origin of recurrent hepatocellular carcinoma. *Epigenomics*. 2015;7:581-592.
196. Petitprez F, Vano YA, Becht E, et al. Transcriptomic analysis of the tumor microenvironment to guide prognosis and immunotherapies. *Cancer Immunol Immunother*. 2017.
197. Basile D, Garattini SK, Bonotto M, et al. Immunotherapy for colorectal cancer: Where are we heading? *Expert Opin Biol Ther*. 2017:1-13.
198. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. Pd-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med*. 2015;372:2509-2520.
199. Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune contexture, immunoscore, and malignant cell molecular subgroups for prognostic and theranostic classifications of cancers. *Adv Immunol*. 2016;130:95-190.
200. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:298-306.
201. Becht E, Giraldo NA, Dieu-Nosjean MC, et al. Cancer immune contexture and immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:7-13.
202. Guery L, Hugues S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity. *Biomed Res Int*. 2015;2015:314620.
203. Korn T, Bettelli E, Oukka M, et al. Il-17 and th17 cells. *Annual Review of Immunology*. 2009;27:485-517.
204. Zou W, Restifo NP. T(h)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:248-256.
205. Schultheis AM, Scheel AH, Ozretic L, et al. Pd-11 expression in small cell neuroendocrine carcinomas. *Eur J Cancer*. 2015;51:421-426.
206. Soliman H, Khalil F, Antonia S. Pd-11 expression is increased in a subset of basal type breast cancer cells. *PLoS One*. 2014;9:e88557.
207. Rindi G, Klersy C, Inzani F, et al. Grading the neuroendocrine tumors of the lung: An evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21:1-16.
208. Matsukuma K, Olson KA, Gui D, et al. Synaptophysin-ki67 double stain: A novel technique that improves interobserver agreement in the grading of well-differentiated gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Mod Pathol*. 2017;30:620-629.

209. Ramos M-P, Wijetunga NA, McLellan AS, et al. DNA demethylation by 5-aza-2'-deoxycytidine is imprinted, targeted to euchromatin, and has limited transcriptional consequences. *Epigenetics & Chromatin*. 2015;8:11.
210. Diederichs S. The four dimensions of noncoding rna conservation. *Trends Genet*. 2014;30:121-123.
211. Lv L, Wei M, Lin P, et al. Integrated mrna and lncrna expression profiling for exploring metastatic biomarkers of human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Am J Cancer Res*. 2017;7:688-699.
212. Hirata M, Sasaki M, Cairns RA, et al. Mutant idh is sufficient to initiate enchondromatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:2829-2834.
213. Verma G, Mohan S, Nasrallah MLP, et al. Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate in idh-mutated gliomas using two-dimensional localized correlation spectroscopy (2d l-cosy) at 7 tesla. *J Transl Med*. 2016;14.

Annexes : autre article publié avec l'équipe de recherche pendant la thèse

Histopathology

Histopathology 2017, 70, 1089–1097. DOI: 10.1111/his.13167

Incidence, clinicopathological features and fusion transcript landscape of translocation renal cell carcinomas

Marion Classe,^{1*}  Gabriel G Malouf,^{2,*} Xiaoping Su,³ Hui Yao,³ Erika J Thompson,⁴ Denaha J Doss,⁴ Valérie Grégoire,⁵ Julien Lenobin,⁶  Jean-Christophe Fantoni,⁶ Hélène Sudour-Bonnange,⁷  David Khayat,² Sébastien Aubert,⁵ Nizar M Tannir⁸ & Xavier Leroy⁵
¹Département de Pathologie, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, ²Département d'Oncologie Médicale, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Institut Universitaire de Cancérologie GRC5, Paris, France, ³Department of Bioinformatics and Computational Biology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, ⁴Department of Genetics, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, ⁵Département de Pathologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, ⁶Département d'Urologie, Centre Hospitalier Régional Universitaire, ⁷Unité d'Oncologie Pédiatrique, Centre Anti Cancéreux Oscar Lambret, Lille, France, and ⁸Department of Genitourinary Medical Oncology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA

Date of submission 12 November 2016
Accepted for publication 16 January 2017
Published online Article Accepted 28 January 2017

Classe M, Malouf G G, Su X, Yao H, Thompson E J, Doss D J, Grégoire V, Lenobin J, Fantoni J-C, Sudour-Bonnange H, Khayat D, Aubert S, Tannir N M & Leroy X
(2017) *Histopathology* 70, 1089–1097. DOI: 10.1111/his.13167

Incidence, clinicopathological features and fusion transcript landscape of translocation renal cell carcinomas

Aims: Translocation renal cell carcinoma (tRCC) is a rare subtype of kidney tumour characterized by translocations involving the transcription factor *TFE3* or *TFEB*. tRCC was introduced into the World Health Organization classification in 2004, but much is still unknown about the natural history, clinicopathological features and outcomes of the disease. The aim of this study was to describe the landscape of fusion transcript in a large single-institution series of fluorescence *in-situ* hybridization (FISH)-confirmed tRCCs and then to compare it to morphological and clinical data.
Methods and results: Paired-end RNA sequencing was performed within a prospective database of the Department of Pathology, Centre Hospitalier Régional Universitaire (Lille, France). The diagnosis of tRCC was confirmed by FISH. Among a total of 1130

identified renal cell carcinomas, 21 cases (1.9%) showed rearrangement of the *TFE3* ($n = 20$) or (*TFEB*) ($n = 1$) gene. Median patient age was 31 years (range = 15–47), and the female-to-male ratio was 6:1. Five different *TFE3* fusion transcripts were identified; the most frequent *TFE3* partners were *PRCC* ($n = 4$) and *SFPQ* ($n = 4$). The other partners involved were *ASPCR1* ($n = 1$) and *MED15* ($n = 1$) genes as well as a novel *TFE3* partner, *GRIPAP1*.
Conclusions: We identified a new fusion partner, *GRIPAP1*. The prognostic role of transcript type could not be determined because our number of cases was too small. Four patients (19%) died of the disease, all of which presented with a lymph node involvement at diagnosis. We confirm that tRCC can be an aggressive tumour, especially those of advanced clinical stage.

Keywords: RNA sequencing, *TFE3*, translocation renal cell carcinoma, *Xp11.2*

Addresses for correspondence: Marion Classe, Département de Pathologie, Hôpital Lariboisière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, 75010 Paris, France. e-mail: marionclasse@hotmail.fr; and Gabriel Malouf, Département d'Oncologie Médicale, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Institut Universitaire de Cancérologie GRC5, Université Paris 6, 75006 Paris, France. e-mail: gabriel.malouf@gmail.com

*These authors contributed equally to this work.

© 2017 John Wiley & Sons Ltd

Introduction

Translocation renal cell carcinoma (tRCC) is a rare subtype of renal cell carcinoma (RCC) that was recognized by the World Health Organization for the first time in its classification of renal tumours in 2004.¹ These tumours are defined by translocations involving transcription factor binding to IGHM enhancer 3 (*TFE3*) or transcription factor EB (*TFEB*) with different partners.² They are seen more frequently in children and young adults,^{3–5} and represent the predominant form of RCC in children.⁶ The incidence in adults varies by series, reported as 0.9% by Sukov *et al*,⁷ 1.6% by Komai *et al*,⁸ and 5% by Zhong *et al*.⁹ This difference probably reflects the challenge in diagnosis of this rare and diverse subtype.¹⁰ Histologically, tRCCs comprise a heterogeneous group of papillary tumours; some cases share morphological similarities with papillary RCC, with conventional clear cell RCC (ccRCC)¹¹ and even perivascular epithelioid cell tumour or melanoma.¹² In the ccRCC data set of The Cancer Genome Atlas (TCGA) project, 1.7% of cases were related to *TFE3/TFEB* translocation.¹³ In the papillary RCC database of the TCGA project, 5% were related to *TFE3/TFEB* translocation.¹⁴

Historically, immunohistochemical (IHC) analysis with a *TFE3* or *TFEB* antibody was used most frequently to confirm the diagnosis.^{15–21} However, in many laboratories IHC alone cannot be trusted for this diagnosis, because the rates of false-positive and -negative results with IHC are higher than expected.^{9,22} Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) has become the standard, using break-apart assays that allow detection of *TFE3/TFEB* breakpoints.⁹

So far, eight different fusion partners for *TFE3* have now been described:^{10,23,24} *ASPSCR1*, *SFPQ*, *CLTC*, *PRCC*, *NONO*, *LUC7L3*, *KHSRP* and *PARP14*.^{2,5} *TFEB* has now two described partners: *MALAT1* and *KHBRBS2*.²⁴ *ASPSCR1* and *PRCC* are reported as the most frequent partners.^{26,27} Prognostic factors are still debated, some suggesting a worse prognosis in adults, others showing that prognosis can also be poor in children.⁶ Recent studies found that, compared to other forms of RCC, *Xp11.2* tRCC has a worse prognosis in young adults.²⁸ *TFE3-ASPSCR1* fusions have been associated with a more aggressive course,²⁷ but it is still unclear whether the fusion partner plays a prognostic role. Studies involving relatively large numbers of molecularly proven cases collected from a single institution are missing.²⁹ Our purpose was therefore to describe the landscape of fusion transcript in a large single-institution series of

FISH-confirmed tRCCs and then to confront morphological, clinical and molecular data.

Using a retrospective series of suspected tRCC, we used RNA sequencing (RNASeq) to determine the fusion partners in cases we were able to confirm by FISH and for which cryopreserved material was available. Finally, we correlated the identified fusion partners with clinicopathological features.

Material and methods

All RCC cases diagnosed between January 2003 and December 2013 were retrieved from the archives of the Department of Pathology, Centre Hospitalier Régional Universitaire (Lille, France). Among these, cases suspected of being tRCC were selected. After a morphological analysis achieved by two pathologists (M.C., X.L.) the most representative block was selected for IHC and FISH analyses. Clinical data, when available, were obtained from patient medical records.

IHC studies were conducted on formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE) using goat polyclonal anti-human *TFE3* (1:300; sc-5958) or goat polyclonal anti-human *TFEB* antibody (1:100; sc-11004; both Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) [automated technique, using Ventana BenchMark XT, diaminobenzidine (DAB)-peroxidase method, incubation with primary antibody: 30 min]. Staining was accepted as positive only if it was nuclear. The percentage of stained cells and the intensity of the staining were evaluated, respectively, as <5, 5–50 or >50% and weak (+), moderate (++) or intense (+++).

A dual-colour, break-apart FISH assay was performed on the FFPE tissues coming from the same blocks used for IHC. Slides were deparaffinized and pretreated with a kit from Dako (Carpenteria, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. *TFE3* probe used was the Zytovision SPEC dual-color break-apart *TFE3* CE IVD (Z2109-200; Zytolight, Bremerhaven, Germany). The *TFEB* probe used was the dual-color break-apart *TFEB* (TFEBBA-20-DRGR; Empire Genomics, Buffalo, NY, USA). Ten microlitres of probe were deposited. Denaturation was achieved for 10 min at 75°C, followed by incubation for 16 h at 37°C. Slides were analysed with an Olympus BX61 (Olympus Optical Co Ltd, Tokyo, Japan) fluorescence microscope. Areas of interest were identified at low magnification ($\times 10$) and analysed at high magnification ($\times 60$ and $\times 100$). Interpretation of intact or split signals was based on generally accepted guidelines. A minimum of 100 nuclei was studied. The presence of

a rearrangement was validated when at least 15 tumour cells showed a split signal.

Total RNA was extracted from the available cryopreserved samples, as described previously,²⁴ and its quantity and integrity measured on a 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA for each sample was converted into a library of template molecules for RNA sequencing (RNAseq) on the HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA), according to the Ovation RNA-Seq System V2 protocol (NuGEN, San Carlos, CA, USA). After quality control, reads were mapped and aligned to the UCSC hg19 version of the reference genome, as described previously.²⁴ Fusions were detected by using a modified version of VirusSeq that implements a greedy algorithm with a robust statistical model.²⁴ An *in-silico* sequence was generated for each fusion transcript candidate by using the consensus of reads within discordant read clusters to facilitate polymerase chain reaction (PCR) primer design and thus speed PCR validation.²⁴ Identified fusion transcripts were validated using PCR custom primers for amplification. Sanger sequencing was performed on a 3730xl DNA Analyzer using BigDye Terminator version 3 chemistry (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Fusion sequences were verified by using BLAST (US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) and SeqScape Software version 2.5 (Applied Biosystems).²⁴

Results

A total of 1130 cases of RCC were identified in the database. Among those, 26 (2.3%) cases were considered suspect for being tRCC, based on clinical and morphological features and positive TFE3/TFEB immunostaining (25 cases positive for TFE3, one for TFEB). All TFE3-positive cases showed >5% stained cells (19 cases >50%, six cases <50% of stained cells). Staining intensity was weak in seven cases, moderate in nine cases and intense in nine cases. All 26 cases were subjected to FISH. Of those, 21 cases (80.8%) were confirmed to harbour a *TFE3* ($n = 20$) or *TFEB* ($n = 1$) rearrangement. Thus, among all RCCs, the estimated incidence of tRCC in our cohort was at least 1.8%. Clinicopathological features of FISH-confirmed cases are summarized in Table 1 (in Table S1 for FISH negative cases). Median tumour size was 4.7 cm (range = 2–19 cm). Most cases displayed at least one component with papillary architecture (Figure 1A). Six (30%) cases had entirely solid architecture. Tumour cells were large, mostly with a clear or weakly eosinophilic cytoplasm (Figure 1B,C), although some

were strongly eosinophilic (Figure 1D). Nuclei displayed at least foci of major nuclear atypia, such as crumpled features, 'pseudo chromophobe-like' or grooves, heterogeneous chromatin and easily visible nucleoli (Figure 1E). Some intranuclear cytoplasmic inclusions were seen (Figure 1F). There was remarkable intratumoral heterogeneity, with areas of moderately atypical cells and other areas displaying major nuclear atypia. None of the tumours had an identifiable sarcomatoid component. Psammoma bodies were seen in 12 cases (57%). Necrosis was noted in six cases (28%), being extensive in three.

Median patient age was 31 years (range: 15 = 47); two patients (9.5%) were younger than 18 years at diagnosis, while four patients (19%) were aged 40 years or older. We observed a large female predominance, with a female/male ratio of 6:1. Five patients (26.3%) had lymph node involvement at diagnosis. Three patients (14.3%) had visceral metastatic disease at diagnosis. Four patients (19%) died of the disease.

Cryopreserved material was available for 15 of the 21 molecularly confirmed tRCCs. We obtained RNA of good quality for 12 of these 15 cases. Of those, fusion transcripts were detected successfully in 11 of 12 cases (Table 1). Among the five fusion transcripts identified, four were previously known, involving *PRCC* ($n = 4$), *SFPQ* ($n = 4$), *ASPCR1* ($n = 1$) and *MED15* ($n = 1$) genes (Figure 2A). We also identified a novel *TFE3* partner, the *GRIPAPI* gene (Figure 2B). Fusion transcripts were confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by Sanger sequencing (Table S2) in all but two cases (cases 3 and 7) (Figure 3). Found fusion breakpoints found were identical to those reported previously³⁰ (Table 2).

In our comparison of the clinicopathological features of the cases with the most frequent fusion transcript partners (*PRCC* and *SFPQ*), we found no significant difference in age at diagnosis ($P = 0.56$), sex ($P = 0.46$) or American Joint Committee on Cancer stage (0.36). No difference in overall survival was observed between patients whose tumour harboured *PRCC* and those whose tumour harboured *SFPQ* ($P = 0.3$). The cases involving *MED15* and *GRIPAPI* had no distinctive features. Among the four cases displaying a metastatic disease, the fusion transcript was highlighted in two cases involving, respectively, *PRCC* and *ASPCR1*.

Discussion

In this study, we report what is, to our knowledge, the largest cohort of tRCC cases from a single

Table 1. Clinicopathological features of confirmed translocation renal cell carcinomas

Case	Age (years)	Sex	Tumour size (cm)	TNM	IHC	FISH	Tumour architecture	Partner RNA Seq	Mitotic count	Follow-up (months)
1	25	F	19	pT3a N2 M1	5-50% +	+	Mixed	NA	7	24 DOD
2	22	F	3.8	pT1a N1 M0	>50% +++	+	Solid	0	0	114 DF
3	30	F	2.8	pT1a N0 M0	>50% +++	+	Papillary	PRCC	0	100 DF
4	24	F	6	pT1b N0 M0	5-50% +	+	Papillary	PRCC	0	100 DF
5	16	M	3	pT1a N0 M0	>50% ++	+	Mixed	SFPQ	0	84 DF
6	22	M	5	T3a N2 M1	>50% +++	+	Papillary	PRCC	9	55 DOD
7	30	F	2	pT1a N0 M0	>50% +++	+	Mixed	PRCC	1	88 DF
8	44	F	4.5	pT1b N1 M0	>50% +++	+	Solid	NA	6	24 DOD
9	45	F	2	pT1a N0 M0	>50% +++	+	Solid	SFPQ	0	72 DF
10	40	F	2.2	pT1a N0 M0	>50% ++	+	Cystic + papillary	GRIPAP1	2	72 DF
11	27	F	12	pT2b N0 M0	>50% ++	+	Cystic papillary	SFPQ	0	66 DF
12	31	F	3.7	pT1a N0 M0	>50% + to ++	+	Mixed with cystic areas	NA	0	NA
13	31	F	4.5	pT1b N0 M0	>50% +	+	Cystic papillary	NA	0	NA
14	47	M	6	pT1b N0 M0	>50% ++	+	Mixed	SFPQ	1	37 DF
15	15	F	7.7	pT2a N2 M1	>50% +	+	Papillary	ASPSCR1	8	46 DOD
16	34	F	9.5	pT2a N0 M0	>50% ++	+	Mixed + cystic	MED15	0	48 DF
17	30	F	4	pT1a N0 M0	>50% +++	+	Mixed	NA	0	47 DF
18	32	F	NA	NA	0 (TFEB+)	+	Mixed	NA	0	26 DF
19	33	F	7.5	pT2a N0 M0	5-50% +	+	Mixed	NA	0	22 DF
20	36	F	7	pT1b N0 M0	>50% +++	+	Solid	NA	0	26 DF
21	38	F	19	pT3b N0 M0	5-50% +	+	Mixed	NA	0	24 AD

NA, Not available; DOD, Dead of disease; DF, Disease free; AD, Alive with disease; IHC, Immunohistochemistry; FISH, Fluorescence *in-situ* hybridization; TNM, Tumour-node-metastasis. Bold: TNM stage and follow-up of dead patients.

institution with an extensive analysis of the fusion transcripts involved. We highlighted a new fusion transcript, confirmed the challenge in making tRCC diagnosis and tried to explore potential links between morphology, type of transcript, age and clinical outcome.

The incidence of tRCC was 1.8% of our entire population of RCC patients, a figure that is higher than those reported by some series⁷ and consistent with those reported by others.^{8,29} It is important to note that our population might be underestimated, because not all our RCC cases were tested by FISH. Interestingly, our tRCC cohort was comprised mainly of young adults; only four of the patients were older

than 40 years. Lim *et al.* recently reported a similar total number of cases with a lower incidence of tRCC (0.7%) and older patients, but their diagnoses were made only by IHC.³¹ Like others before us,⁹ we identified false-positive cases by IHC. We also found two cases in which IHC staining was very weak and heterogeneous, while FISH was positive. However, we did not use TFE3 antibody in the conditions described initially by Argani *et al.*, our incubation time being shorter and our technique being automated. Differences in specificity between manual and automated staining have been demonstrated previously.³²

In our analysis, five of the 26 suspected cases turned out to be negative (19%) when checked by

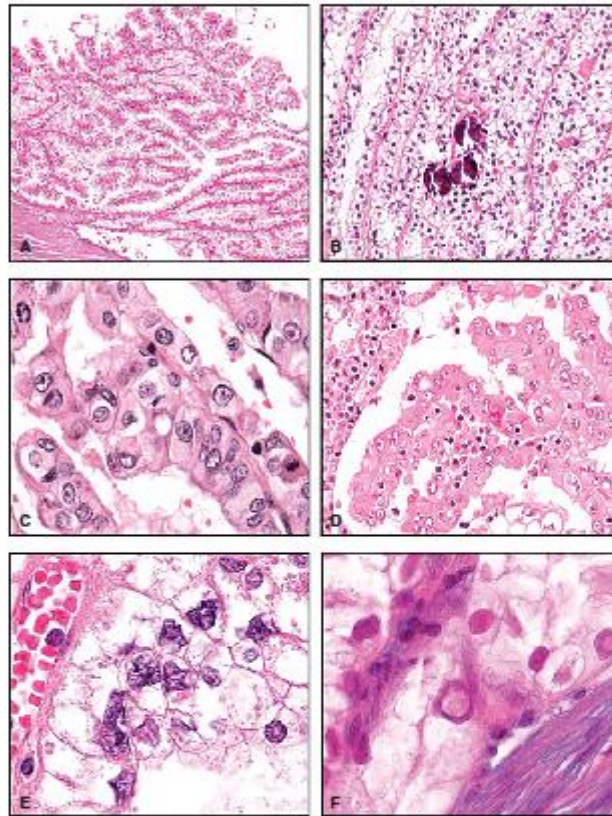


Figure 1. Different histopathological features of translocation renal cell carcinoma (tRCC), haematoxylin and eosin (H&E): papillary architecture (A), clear cells and calcifications (B), weakly eosinophilic cytoplasm and readily identifiable nucleoli (C), oncocytic component (D), nuclear atypia (E) and intranuclear inclusion (F).

FISH. This false-positive rate, while far lower than the 80% reported by Klatté *et al.*,⁵ is still substantial. This confirms, as described by Argani *et al.*,³³ that a molecular study is highly recommended to make an accurate tRCC diagnosis. FISH is extremely efficient^{9,34} and, unlike PCR, which requires that the fusion partner be known, it might also detect rare transcripts. However, a recent discovery highlighted a circumstance where IHC TFE3 is more efficient in detecting tRCC than FISH.³⁵ In this observation, authors report a case of chromosome inversion resulting in an RBM10–TFE3 fusion, which is hard to detect by FISH, but where IHC was positive. This favours a diagnostic strategy where both IHC and molecular techniques are useful and complementary.

In our series, *PRCC* and *SFPQ* were the most frequent fusion partners of *TFE3*, and our finding of

only one *ASPCCR1* fusion partner contrasts with previous data suggesting that *ASPCCR1* might be the most frequent partner of *TFE3*.^{26,27}

Using RNAseq, we identified fusion partners in 11 of the 12 cases for which good-quality RNA was extracted. However, we were not able to confirm the presence of the fusion transcript by RT-PCR in two cases. Intratumoral heterogeneity has not been studied in tRCC, which might explain why three of the cases identified by FISH could not be confirmed by RT-PCR. Cells displaying a *TFE3* rearrangement might sometimes be a minor clone. Nevertheless, RNAseq allowed us to discover a new *TFE3* fusion partner: *GRIPAP1*. *GRIPAP1* belongs to the GRIP-associated proteins and encodes a guanine nucleotide exchange factor for the Ras family of small G proteins (RasGEF). Another recently described partner is the

1094 M Classe *et al*

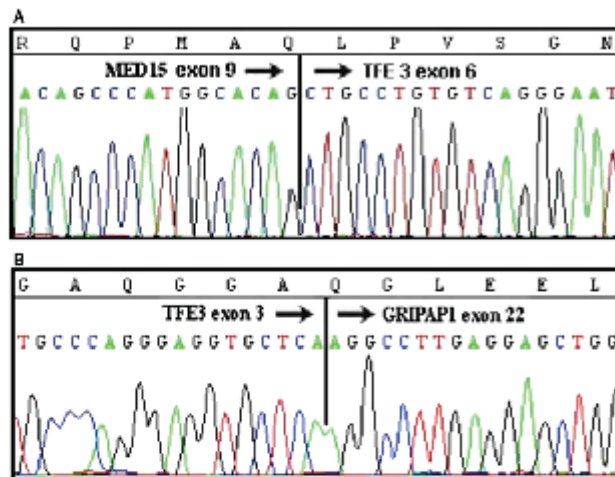


Figure 2. Confirmation of new fusion transcripts by Sanger sequencing: fusion of *MED15* with *TFE3* (A), fusion of *GRIPAP1* with *TFE3* (B).

MED15 gene, which encodes a subunit of the multi-protein complexes PC2 and ARC/DRIP, and may function as a transcriptional coactivator in RNA polymerase II transcription. It is known to be involved in castration-resistant prostate cancer.³⁶ Recently *MED12*, another member of the MED gene family, was also identified as a gene whose mutation is important in RCC.³⁷ This may support the hypothesis that the fusion transcript in tRCC plays a role in its carcinogenesis.

The prognostic role of the fusion partner has been suggested,^{8,20,27,38,39} but the recent study by Ellis *et al*²⁷ found no statistical link. What was suggested in their study is that prognosis is linked to age or stage at presentation, but that *ASPSRC1-TFE3* tRCC is more likely to present at an advanced stage. Interestingly, our only *ASPSRC1-TFE3* case presented at stage pT2N2M1 and had an aggressive evolution. Among the four *PRCC-TFE3* cases, three presented at stage pT1N0M0 and one at pT3N2M1 (who died of the disease). The *SFPQ*, *GRIPAP1* and *MED15-TFE3* cases were all stage pT1 or pT2, NOM0, and are all disease-free. These results might support Ellis *et al.*'s²⁷ conclusion, that *ASPSRC1* and *PRCC-TFE3* cases might present at higher stages, with an important prognostic impact, but the data available are too scant to highlight a significant link between fusion partner and tumour aggressiveness.

Some believe that age is a prognostic factor, suggesting that prognosis is better in children. A recent study favours the hypothesis that evolution can be indolent in paediatric cases if no visceral metastases develop.

Our youngest patient (case 15, our only previously reported case⁴⁰) was aged 15 years at diagnosis; she presented with lymph node and visceral metastases and died within 2 years. The only other adolescent was aged 16 years; she presented with localized disease and is disease-free after 84 months of follow-up. Although our series includes no children younger than 15 years, it is possible that prognosis might differ between patients younger than 15 and those aged 15 and older, who should be considered young adults.

We finally returned to microscopic features. Like others previously, we found that tRCCs could be papillary, solid or both, with the possible presence of psammoma bodies.^{5,9,11,16,17,20,38,41,42} What is important to note is that in two cases, the cytoplasm was composed exclusively of eosinophilic cells and this oncocytic feature is deceptive because, associated with papillary architecture, it may lead to the diagnosis of type 2 papillary RCC. Argani *et al* recently described a typical subnuclear vacuolization arising among *SFPQ-TFE3* tRCCs³³ but, with only four cases of *SFPQ-TFE3* cases and four cases displaying the *PRCC-TFE3* transcript, we were not able to highlight any recurrent feature characteristic of one type of transcript. In this study, Argani *et al.* also showed differential cathepsin K immunoreactivity based on different fusion partners, suggesting biological differences. This has also been reported by Martignoni *et al.*,⁴³ but in our study we did not evaluate cathepsin K expression.

In conclusion, our work highlighted *GRIPAP1* as a new fusion partner and confirmed the importance of combining morphology, immunohistochemistry and

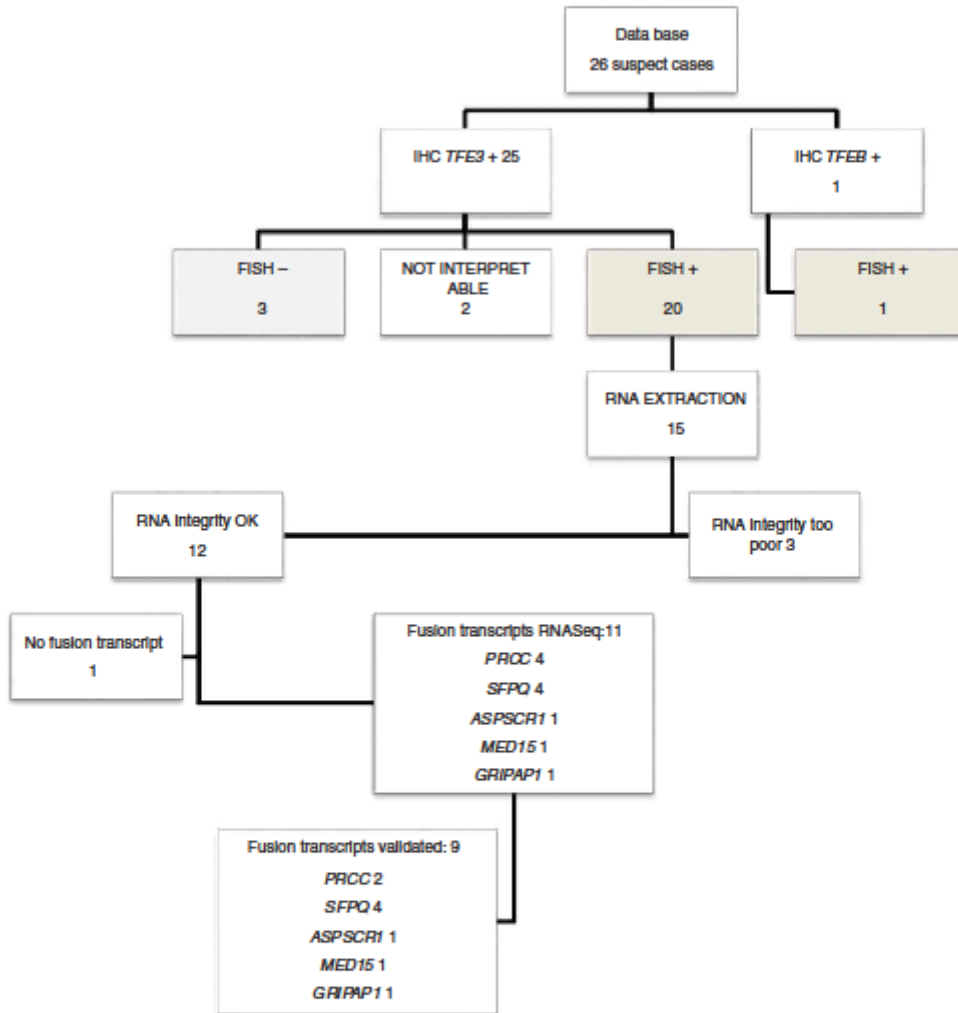


Figure 3. Flowchart from suspicion to diagnosis. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

molecular techniques to confirm a diagnosis of tRCC. We also confirm an incidence of tRCC between 1% and 5% with, in our series, 19% of our patients aged 40 years or older at diagnosis. Our data could not show any association between fusion transcript or age and prognosis in tRCC, but the number of cases in our series is too low to draw firm conclusions.

Ethics statement

The study was performed according to the Declaration of Helsinki. The procedures were approved by the scientific committee of the local Tumor Bank (Lille, CS-TMT-109, 11/12/2012). As it was a

1096 M Classe et al

Table 2. *TFE3* gene fusions

Case	Fusion transcript subtype	<i>TFE3</i> breakpoint	Partner breakpoint
15	<i>ASPSR1-TFE3</i>	Exon 6	Exon 7
4	<i>PRCC-TFE3</i> type 1	Exon 4	Exon 1
6	<i>PRCC-TFE3</i> type 2	Exon 6	Exon 1
9, 11, 14	<i>SFPQ-TFE3</i> type 1	Exon 6	Exon 9
5	<i>SFPQ-TFE3</i> type 2	Exon 5	Exon 9
16	<i>MED15-TFE3</i>	Exon 6	Exon 9
10	<i>GRIPAP1-TFE3</i>	Exon 3	Exon 22

retrospective study using pre-existing specimen, written consent was not required.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

- Lopes-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of adults. *Eur. Urol.* 2006; 49: 798–805.
- Argani P. M1T family translocation renal cell carcinoma. *Semin. Diagn. Pathol.* 2015; 32: 103–113.
- Argani P, Ladanyi M. Translocation carcinomas of the kidney. *Clin. Lab. Med.* 2005; 25: 363–378.
- Ross H, Argani P. Xp11 translocation renal cell carcinoma. *Pathology* 2010; 42: 369–373.
- Klatte T, Streubel B, Wrba F et al. Renal cell carcinoma associated with transcription factor E3 expression and Xp11.2 translocation: incidence, characteristics, and prognosis. *Am. J. Clin. Pathol.* 2012; 137: 761–768.
- Song HC, Sun N, Zhang WP et al. Biological characteristics of pediatric renal cell carcinoma associated with Xp11.2 translocations/*TFE3* gene fusions. *J. Pediatr. Surg.* 2014; 49: 539–542.
- Sukov WR, Hodge JC, Lohse CM et al. *TFE3* rearrangements in adult renal cell carcinoma: clinical and pathologic features with outcome in a large series of consecutively treated patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36: 663–670.
- Komat Y, Fujitwara M, Fujii Y et al. Adult Xp11 translocation renal cell carcinoma diagnosed by cytogenetics and immunohistochemistry. *Clin. Oncol. Res.* 2009; 15: 1170–1176.
- Zhong M, De Angelo P, Osborne I et al. Translocation renal cell carcinomas in adults: a single-institution experience. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012; 36: 654–662.
- Magers MJ, Udager AM, Mehra R. M1T Family translocation-associated renal cell carcinoma: a contemporary update with emphasis on morphologic, immunophenotypic, and molecular mimics. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2015; 139: 1224–1233.
- Argani P, Antonescu CR, Illei PB et al. Primary renal neoplasms with the *ASPL-TFE3* gene fusion of alveolar soft part

sarcoma: a distinctive tumor entity previously included among renal cell carcinomas of children and adolescents. *Am. J. Pathol.* 2001; 159: 179–192.

- Argani P, Aulmann S, Karanjawala Z et al. Melanotic Xp11 translocation renal cancers: a distinctive neoplasm with overlapping features of PEComa, carcinoma, and melanoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 2009; 33: 609–619.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Creighton CJ, Morgan M, Gunaratne PH et al. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013; 499: 43–49.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ et al. Comprehensive molecular characterization of papillary renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374: 135–145.
- Argani P, Lal P, Hutchinson B et al. Aberrant nuclear immunoreactivity for *TFE3* in neoplasms with *TFE3* gene fusions: a sensitive and specific immunohistochemical assay. *Am. J. Surg. Pathol.* 2003; 27: 750–761.
- Camparo P, Vasilu V, Molinie V et al. Renal translocation carcinoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and gene expression profiling analysis of 31 cases with a review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 2008; 32: 656–670.
- Gaillot-Durand I, Chevaller M, Colombel M et al. Diagnosis of Xp11 translocation renal cell carcinomas in adult patients under 50 years: interest and pitfalls of automated immunohistochemical detection of *TFE3* protein. *Pathol. Res. Pract.* 2013; 209: 83–89.
- Mir MC, Trilla E, de Torres IM et al. Altered transcription factor E3 expression in unclassified adult renal cell carcinoma indicates adverse pathological features and poor outcome. *BJU Int* 2011; 108: E71–E76.
- Malouf GG, Camparo P, Molinie V et al. Transcription factor E3 and transcription factor EB renal cell carcinomas: clinical features, biological behavior and prognostic factors. *J. Urol.* 2011; 185: 24–29.
- Argani P, Hicks J, De Marzo AM et al. Xp11 translocation renal cell carcinoma (RCC): extended immunohistochemical profile emphasizing novel RCC markers. *Am. J. Surg. Pathol.* 2010; 34: 1295–1303.
- Argani P, Lae M, Hutchinson B et al. Renal carcinomas with the t(6:11)(p21;q12): clinicopathologic features and demonstration of the specific alpha-*TFEB* gene fusion by immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. *Am. J. Surg. Pathol.* 2005; 29: 230–240.
- Green WM, Yonescu R, Monsberger I et al. Utilization of a *TFE3* break-apart FISH assay in a renal tumor consultation service. *Am. J. Surg. Pathol.* 2013; 37: 1150–1163.
- Smith NR, Illei PB, Allaf M et al. t(6:11) renal cell carcinoma (RCC): expanded immunohistochemical profile emphasizing novel RCC markers and report of 10 new genetically confirmed cases. *Am. J. Surg. Pathol.* 2014; 38: 604–614.
- Malouf GG, Su X, Yao H et al. Next-generation sequencing of translocation renal cell carcinoma reveals novel RNA splicing partners and frequent mutations of chromatin-remodeling genes. *Clin. Oncol. Res.* 2014; 20: 4129–4140.
- Huang W, Goldfischer M, Babyeva S et al. Identification of a novel *PARP14-TFE3* gene fusion from 10-year-old FPPP tissue by RNA-seq. *Genes Chromosom. Cancer* 2015; doi:10.1002/gcc.22261 [Epub ahead of print].
- Macher-Goeppinger S, Roth W, Wagener N et al. Molecular heterogeneity of *TFE3* activation in renal cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2012; 25: 308–315.

27. Ellis CL, Hble JN, Subhawong AP *et al*. Clinical heterogeneity of Xp11 translocation renal cell carcinoma: impact of fusion subtype, age, and stage. *Mod Pathol*. 2014; 27: 875–886.
28. Xu L, Yang R, Gan W *et al*. Xp11.2 translocation renal cell carcinomas in young adults. *BMC Urol*. 2015; 15: 57.
29. He J, Chen X, Gan W *et al*. Renal cell carcinoma associated with Xp11.2 translocation/TFEB gene fusions: clinical experience and literature review. *Future Oncol*. 2015; 11: 343–352.
30. Kauffman BC, Ricketts CJ, Rais-Bahrani S *et al*. Molecular genetics and cellular features of TFEB and TFEBB fusion kidney cancers. *Nat Rev Urol*. 2014; 11: 465–475.
31. Lim B, You D, Jeong IG *et al*. Clinicopathological features of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma. *Korean J Urol*. 2015; 56: 212–217.
32. Argani P, Aulmann S, Illei PB *et al*. A distinctive subset of PBComas harbors TFEB3 gene fusions. *Am J Surg Pathol*. 2010; 34: 1395–1406.
33. Argani P, Zhong M, Reuter VE *et al*. TFEB3-fusion variant analysis defines specific clinicopathologic associations among Xp11 translocation cancers. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40: 723–737.
34. Argani P, Yonescu R, Morsberger L *et al*. Molecular confirmation of t(6;1)(p21;q12) renal cell carcinoma in archival paraffin-embedded material using a break-apart TFEB FISH assay expands its clinicopathologic spectrum. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36: 1516–1526.
35. Just PA, Letourneur P, Poulquien C *et al*. Identification by FFPPE RNA-Seq of a new recurrent inversion leading to RBM10–TFEB3 fusion in renal cell carcinoma with subtle TFEB3 break-apart FISH pattern. *Genes Chromosomes Cancer* 2016; 55: 541–548.
36. Shaikhbrahim Z, Menon R, Braun M *et al*. MED15, encoding a subunit of the mediator complex, is overexpressed at high frequency in castration-resistant prostate cancer. *Int J Cancer* 2014; 135: 19–26.
37. Arai R, Sakamoto H, Ichikawa H *et al*. Multilayer-omics analysis of renal cell carcinoma, including the whole exome, methylome and transcriptome. *Int J Cancer* 2014; 135: 1330–1342.
38. Argani P, Antonescu CR, Couturier J *et al*. PRCC-TFEB3 renal carcinomas: morphologic, immunohistochemical, ultrastructural, and molecular analysis of an entity associated with the t(X;1)(p11.2;q21). *Am J Surg Pathol*. 2002; 26: 1553–1566.
39. Argani P, Ladanyi M. The evolving story of renal translocation carcinomas. *Am J Clin Pathol*. 2006; 126: 332–334.
40. Sudour-Bonnange H, Leroy X, Chauvet MP *et al*. Cutaneous metastases during an aggressive course of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma in a teenager. *Pediatr Blood Oncol* 2014; 61: 1698–1700.
41. Sukov WR, Hodge JC, Lohse CM *et al*. ALK alterations in adult renal cell carcinoma: frequency, clinicopathologic features and outcome in a large series of consecutively treated patients. *Mod Pathol*. 2012; 25: 1516–1525.
42. Argani P, Olgac S, Tickoo SK *et al*. Xp11 translocation renal cell carcinoma in adults: expanded clinical, pathologic, and genetic spectrum. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31: 1149–1160.
43. Martignoni G, Gobbo S, Camparo P *et al*. Differential expression of cathepsin K in neoplasms harboring TFEB3 gene fusions. *Mod Pathol*. 2011; 24: 1313–1319.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Summary of the 5 cases suspected of being tRCC for which FISH invalidated diagnosis.

Table S2. Primers used for validation of fusion transcripts.

Table des illustrations

Figure 1 : Improvements in the rate of DNA sequencing over the past 30 years and into the future. MR Stratton <i>et al. Nature</i> 458, (22).....	12
Figure 2 : Acquired capabilities of cancer, extrait de: Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. <i>Cell</i> . 2000;100(1):57-70 (24).....	15
Figure 3 : The Emergent Integrated Circuit of the Cell, extrait de: Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. <i>Cell</i> . 2000;100(1):57-70 (24).....	16
Figure 4 : Gènes les plus fréquemment mutés dans différents type de cancers, selon Ciriello G <i>et al. Nat Genet</i> . 2013 (51).....	20
Figure 5 : A subway map of cancer pathway © 2002 Nature Research (http://www.nature.com/nrc/posters/subpathways/index.html)	20
Figure 6 : mécanismes épigénétiques, extrait de Sun C, Burgner DP, Ponsonby A-L, <i>et al.</i> (64)	26
Figure 7 : méthylation d'une cytosine par ajout d'un groupement méthyl en position 5.	26
Figure 8 : exemple de larges blocs génomiques hypométhylés dans un cancer du côlon humain, extrait de Hansen KD, Timp W, Bravo HC, <i>et al, Nat Genet</i> (71)	28
Figure 9 Impact de l'état de méthylation de l'ADN sur l'activité des différentes régions du génome, extrait de Cartron P-F, Pacaud R, Salbert G (65)	28
Figure 10 Emerging Hallmarks and Enabling Characteristics, extrait de Hallmarks of cancer: the next generation, Hanahan, D. et Weinberg, R. A, <i>Cell</i> 2011.	30
Figure 11 : The metabolic alterations of cancer cells, extrait de Sciacovelli M, Gaude E, Hilvo M, <i>et al</i> (96).....	32
Figure 12 : phase d'élimination où l'immunité innée et adaptative détectent et détruisent ensemble les cellules tumorales avant qu'elles ne deviennent cliniquement décelables. <i>Extrait de: New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25(101)</i>	37
Figure 13 : Phase d'équilibre, le système immunitaire maintient la tumeur à un stade de dormance fonctionnelle. <i>Extrait de: Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25(101)</i>	38
Figure 14 : phase d'échappement où le Système immunitaire échoue à restreindre la croissance tumorale. <i>Extrait de: Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, et al. Curr Opin Immunol. 2014;27:16-25</i>	38
Figure 15 : <i>facteurs de co-stimulation et de co-inhibition exprimés à la surface des cellules T (tiré de : Granier C, Soumelis V, Mandaviti M, et al. (106))</i>	42
Figure 16 Therapeutic Targeting of the Hallmarks of Cancer, Hanahan, D. et Weinberg, R. A (30) Exemples de thérapie pouvant cibler les différentes Hallmarks des cellules cancéreuses.	43
Figure 17 : anatomie de la région naso-sinusienne, (1) globe oculaire, (2) septum, (3) cellules ethmoïdales, (4) sinus sphénoïdal, (5) clivus.	45
Figure 18 : aspect histologique de la muqueuse naso-sinusienne. (a) HES faible grossissement : épithélium respiratoire (*) reposant sur un chorion comportant de nombreuses glandes séro-muqueuses (#) et des plexus veineux (●). A la partie la plus profonde se trouve l'armature osseuse (◇). (b) HES à fort grossissement : l'épithélium respiratoire est cylindrique cilié. (c) HES à fort grossissement montrant les glandes séro(*)-muqueuse(◇).	46
Figure 19 : la muqueuse olfactive. (a) la fente olfactive est située à la partie haute des fosses nasales. (b) schéma représentant les particularités histologiques de la muqueuse olfactive. (c)	

HES à grossissement moyen montrant les neurones olfactifs enchâssés parmi les cellules ciliées sustentaculaires de soutien.	47
Figure 20 : représentation schématique des principaux constituants cellulaires de l'épithélium olfactif selon Schwob et al (113).....	48
Figure 21 : Diagramme illustrant l'hétérogénéité des GBCs dans l'épithélium olfactif normal et la progression depuis la cellule souche jusqu'au neurone olfactif mature, selon James E. Schwob (113)	49
Figure 22 : Diagramme illustrant le processus d'épithéliopoïèse dans l'épithélium olfactif pendant la récupération post lésionnelle suite à une exposition au methyl bromide selon James E. Schwob (113).....	50
Figure 23 : Diagramme illustrant l'épithélium olfactif adulte et le rôle potentiel des progéniteurs C-KIT positifs dans le maintien neuroépithélial selon Goldstein et al. [J Comp Neurol 2015; 523 :15-31] (117).	50
Figure 24 : (a) Graphique représentant schématiquement les trajectoires des lignées de cellules souches olfactives, (b) points de branchement dans les trajectoires de cellules souches olfactives, (c) Volcano plot représentant une carte des trajectoires des différentes lignées issues des cellules souches olfactives. Issu de: Fletcher et al. (118).....	52
Figure 25 : classification OMS 2017 des tumeurs naso-sinusiennes	53
Figure 26 : Aspect macroscopique de NBO (base de données du Pr Herman, Lariboisière-APHP) à l'examen endonasal. NO: neuroblastome olfactif ; CN: cloison nasale ; CM: cornet moyen.	55
Figure 27 : Images radiologiques de NBO (base de données du Pr Herman, Lariboisière-APHP). (A) TDM en coupe coronale montrant un NBO sans lyse de la lame criblée. (B) TDM en coupe coronale montrant un NBO avec lyse de la lame criblée. (C) IRM en séquence T1 avec injection de gadolinium en coupe coronale montrant un NBO sans envahissement intradural. (D) TDM en coupe coronale montrant un NBO avec envahissement intradural. ..	57
Figure 28 : Colorations par l'HES et IHC CD34 montrant des exemples de NBO bien différenciés avec une architecture lobulée (a) et des cellules de petites tailles formant des files indiennes au sein d'un stroma fibrillaire (b), présence de bouquets vasculaires (c) et présence de rosettes neuroïdes (d).....	59
Figure 29 : exemples de NBOs de haut grade, moins bien différenciés. Coloration par l'HES. (a) lobulation peu marquée et présence de nécrose (*), (b) cellules de plus grande taille présentant un nucléole bien visible, (c) des rosettes de type épithélial et (d) activité mitotique marquée.	59
Figure 30 : exemple de l'aspect habituellement observé pour l'expression des marqueurs neuroendocrine : chromogranine A (ChromoA, marquage cytoplasmique granuleux), synaptophysine (synapto, marquage cytoplasmique granuleux), et NCAM (CD56, marquage membranaire).	61
Figure 31 : exemple de différents aspects de cellules S100 + à l'interface tumeur-stroma (en position sustentaculaire).	62
Figure 32 : exemple d'un NBO de haut grade présentant un forte et diffuse expression des marqueurs NE, associé à une expression de diffuse de CKAE1/AE3 et à la persistance de rares cellules S100 à l'interface tumeur-stroma.	62
Figure 33 : Représentation graphique de la classification de Dulguerov (127), en coupes axiale (a) et coronale (b) de sujets d'anatomie.....	65
Figure 34 : Synthèse des étapes chirurgicales de l'ethmoïdectomie élargie à la base du crâne par voie endonasale (images du Pr Herman, Lariboisière, APHP)	68

Table des tableaux

Table 1 : Grade histologique de Hyams	60
Table 2 : Classification de Kadish modifiée	65
Table 3 : Classification TNM de Dulguerov	66
Table 4 : Classification TNM UICC 2002 des tumeurs des fosses nasales et de l'ethmoïde ...	66

Résumé:

Les neuroblastomes olfactifs (NBOs) sont des tumeurs rares de la base du crâne. Les outils de classification de ces tumeurs sont actuellement insuffisants, il n'existe notamment aucune classification moléculaire des NBO. Les données de la littérature concernant leur origine, l'existence de cibles moléculaires thérapeutiques ou leur environnement immunitaire étant rares, la biologie de ses tumeurs est mal connue. Nos travaux se sont appuyés sur l'analyse des exomes, du transcriptome, du méthylome et des caractéristiques histopathologiques et immunitaires d'une série de 59 NBOs bien annotés cliniquement. Nous avons mis en évidence l'existence de 2 sous-types de NBO présentant un profil d'expression et un profil anatomo-clinique différent. Le type neural, correspond à une tumeur bien différenciée, peu agressive, présentant des caractéristiques plutôt neuronales et partageant des caractéristiques phénotypiques avec les progéniteurs directs de neurones olfactifs. Le type basal correspond à une tumeur moins différenciée, plus agressive, ayant des caractéristiques plutôt embryonnaires, partageant des caractéristiques phénotypiques avec les cellules basales de renouvellement de l'épithélium olfactif. Nous avons mis en évidence que la charge mutationnelle était plus élevée dans le type basal, avec notamment des mutations *IDH2* R172 récurrentes, associées à un phénotype CpG Island Methylator (CIMP). Nous avons également montré que les NBOs de type basal étaient infiltrés par un nombre plus important de lymphocytes T avec, dans certaines tumeurs, une expression plus marquée de checkpoints immunitaires et de facteurs immunosuppresseurs. Ce travail ouvre la perspective d'une classification moléculaire permettant de mieux stratifier les patients et ouvre également le champ de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ces tumeurs rares.

Mots clés: [neuroblastome olfactif, esthésioneuroblastome, *IDH2*, RNASeq, méthylation, neural, basal]

[Integrated Genomics of Olfactory Neuroblastoma: pathological and therapeutic implications]

Abstract:

Olfactory neuroblastomas (ONBs) are rare tumors arising in the skull base. Classification tools are poor, notably; no molecular classification of ONB has been reported. Literature data about their cell of origin, the existence of molecular therapeutic targets or their immune environment being scarce, the biology of these tumors is still poorly understood. Our work was based on exome, transcriptome and methylome analysis, but also on histopathological and immune characteristics of a series of 59 clinically well annotated ONBs. We highlighted 2 sub-types of ONB showing different expression and clinicopathologic patterns. The neural type is a well differentiated, poorly aggressive tumor which shows neurons characteristics and shares phenotypic similarities with olfactory neuron progenitors. The basal type is a less differentiated tumor, displaying an aggressive phenotype, with embryonic phenotypical characteristics, which shares similarities with basal renewing cells of the olfactory epithelium. We showed that the mutational load was higher in basal tumors, with notably recurrent *IDH2* R172 mutations associated with a CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). We also showed that basal type ONBs were infiltrated by a greater number of T cells with, in some cases, a higher expression of immune checkpoints and immunosuppressive factors. This work paves the way towards a new molecular classification which will allow a better stratification of patients and will open the field of new therapeutic strategies for this rare tumor.

Keywords: [olfactory neuroblastoma, esthesioneuroblastoma, *IDH2*, RNASeq, methylation, neural, basal]