Faculté de médecine maïeutique et sciences de la santé
Université de Strasbourg

Détection de la délétion homozygote de *CDKN2A* : quelle technique est la plus pertinente ?

Dr Thibaut Wolf ; Dr Marlène Deschuyter ; Dr Damien Reita ; Dr Erwan Pencreach ; Dr Lucas Geyer ; Martine Muckensturm ; Mathilde Allheilig ; Julie Buffa ; Chinar Salmanova ; Pr Marie-Pierre Chenard ; Pr Natacha Entz-Werlé ; Dr Benoit Lhermitte

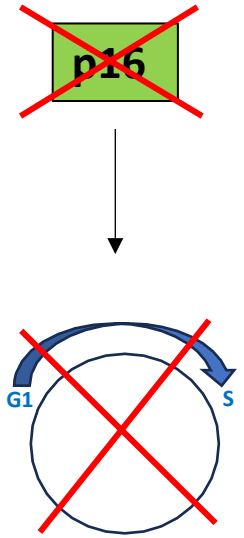
Laboratoire de bioimagerie et pathologies | LBP de l'Université de Strasbourg et du CNRS

cnrs

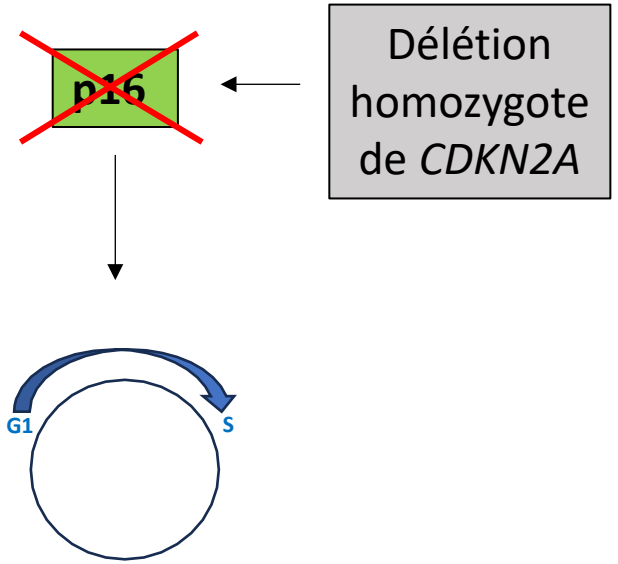
Les Hôpitaux Universitaires de STRASBOURG

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

- *CDKN2A* code pour p16, protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (G1 – S)
- perte d'expression de p16 -> dérégulation du cycle cellulaire



- *CDKN2A* code pour p16, protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (G1 – S)
- perte d'expression de p16 -> dérégulation du cycle cellulaire

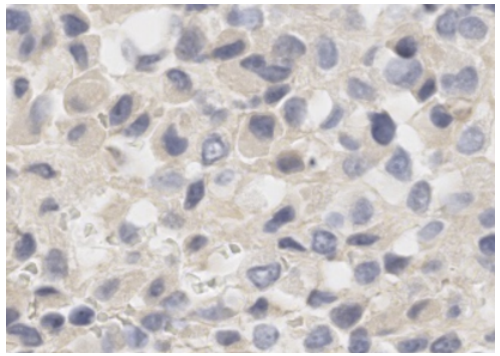


La délétion homozygote de *CDKN2A* dans les tumeurs cérébrales

- Impact pronostique majeur de la délétion homozygote de *CDKN2A*
  - Astrocytomes IDH mutés (Assignation d'un grade OMS 4)

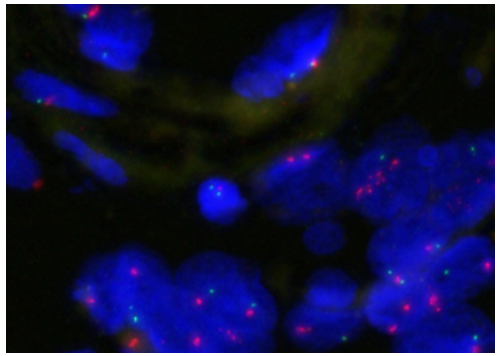
Différentes techniques pouvant détecter la délétion homozygote de *CDKN2A* sont à la disposition du neuropathologiste

Immunohistochimie p16

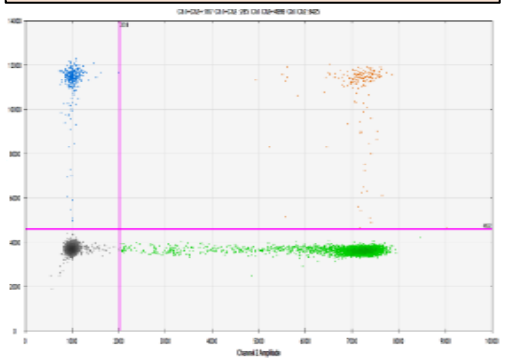


Brcic et al ., 2023
Tanskova et al ., 2023
Lhermitte et al ., 2023

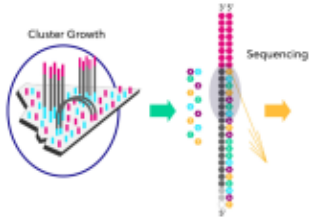
FISH *CDKN2A*



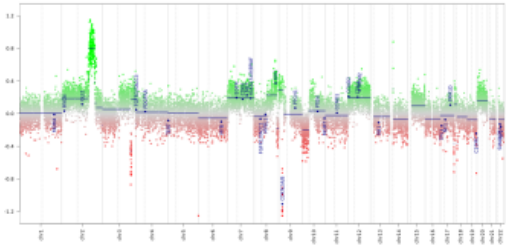
PCR digitale *CDKN2A*



NGS

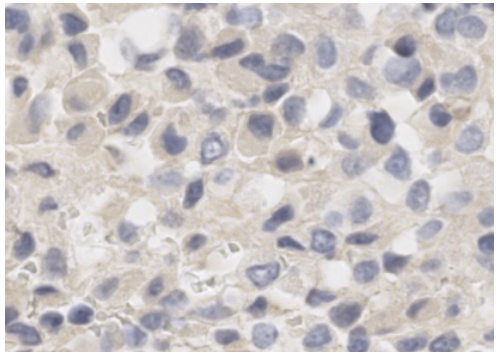


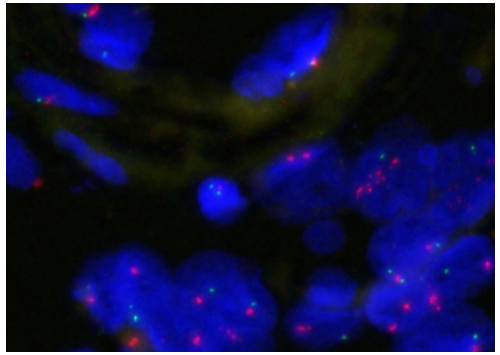
CGH (méthylome)



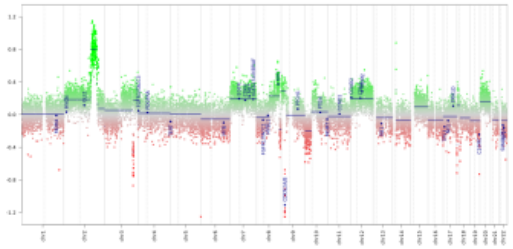
Comparer les performances des différentes techniques histologiques et de biologie moléculaire disponibles pour la détection de la délétion homozygote de *CDKN2A*

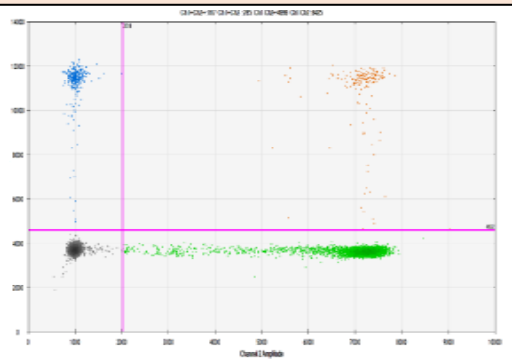
Immunohistochimie p16	FISH *CDKN2A*

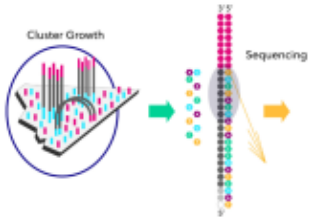




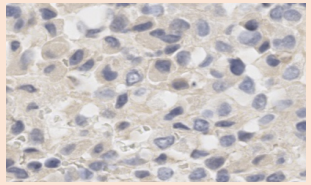
Profil CGH (méthylome)	PCR digitale *CDKN2A*	*NGS*





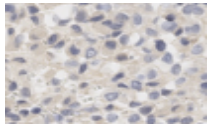


Gliomes ayant bénéficié des 3 techniques d'intérêt au CHU de Strasbourg et d'une immunohistochimie p16 (n = 20)

- Relecture des lames d'immunohistochimie p16
  - 
    Pourcentage de cellules positives (marquage nucléaire et cytoplasmique)
- Relecture des résultats de FISH *CDKN2A*
- Réalisation d'un méthylome
- Réalisation de ddPCR *CDKN2A*

Gliomes ayant bénéficié des 3 techniques d'intérêt au CHU de Strasbourg et d'une immunohistochimie p16 (n = 20)

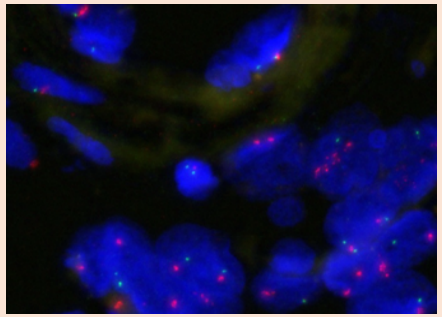
Relecture des lames d'immunohistochimie p16



Pourcentage de cellules positives (marquage nucléaire et cytoplasmique)

Relecture des résultats de FISH *CDKN2A*

Zyto*Light*® SPEC CDKN2A/CEN 9 Dual Color Probe



Délétion :

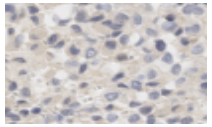
Perte du signal vert avec persistance du signal rouge dans les noyaux tumoraux

Réalisation d'un méthylome

Réalisation de ddPCR *CDKN2A*

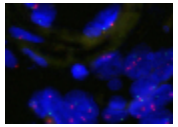
Gliomes ayant bénéficié des 3 techniques d'intérêt au CHU de Strasbourg et d'une immunohistochimie p16 (n = 20)

Relecture des lames d'immunohistochimie p16



Pourcentage de cellules positives (marquage nucléaire et cytoplasmique)

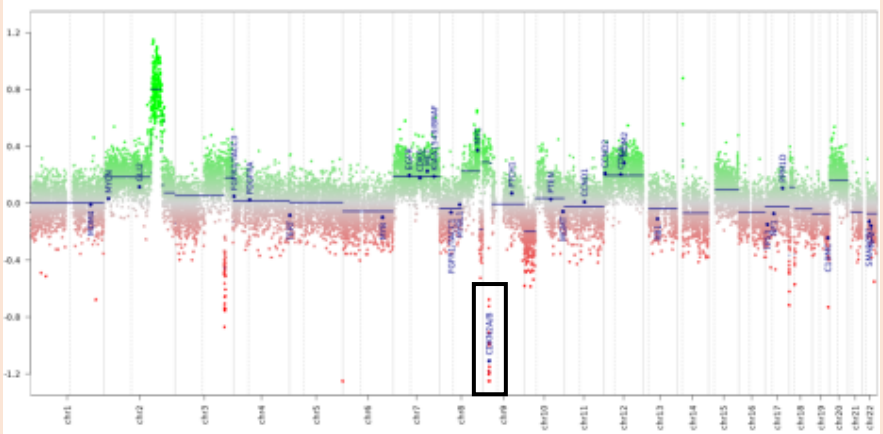
Relecture des résultats de FISH *CDKN2A*



Délétion :

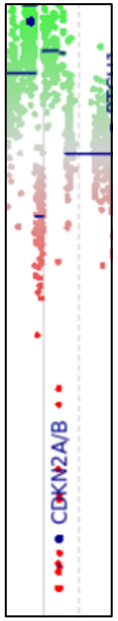
Perte du signal vert avec persistance du signal rouge dans les noyaux tumoraux

Réalisation d'un méthylome



Délétion :

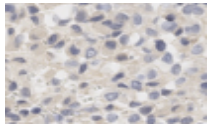
Valeur inférieure à -0,4 (capper et al, 2018)



Réalisation de ddPCR *CDKN2A*

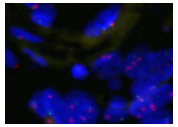
Gliomes ayant bénéficié des 4 techniques d'intérêt au CHU de Strasbourg et d'une immunohistochimie p16 (n = 20)

Relecture des lames d'immunohistochimie p16



Pourcentage de cellules positives (marquage nucléaire et cytoplasmique)

Relecture des résultats de FISH *CDKN2A*



Délétion :

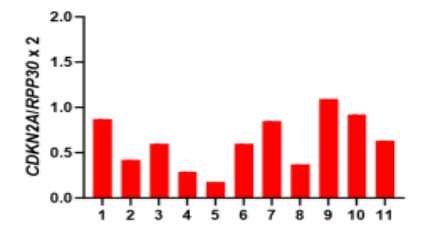
Perte du signal vert avec persistance du signal rouge dans les noyaux tumoraux

Réalisation d'un méthylome

Délétion :

Valeur inférieure à -0,4 (capper et al, 2018)

Réalisation de ddPCR *CDKN2A*

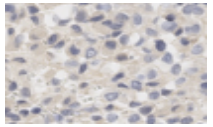


Calcul du ratio *CDKN2A/RPP30* interprété selon la cellularité tumorale (Cheng et al., 2020)

Gliomes ayant bénéficié des 3 techniques d'intérêt au CHU de Strasbourg et d'une immunohistochimie p16 (n = 20)

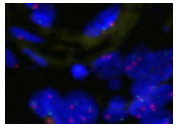
Recueil des résultats de NGS (n = 16)

Relecture des lames d'immunohistochimie p16



Pourcentage de cellules positives (marquage nucléaire et cytoplasmique)

Relecture des résultats de FISH *CDKN2A*



Délétion :

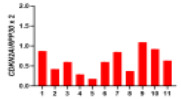
Perte du signal vert avec persistance du signal rouge dans les noyaux tumoraux

Réalisation d'un méthylome

Délétion :

Valeur inférieure à -0,4 (capper et al, 2018)

Réalisation de ddPCR *CDKN2A*



Calcul du ratio *CDKN2A/RPP30* interprété selon la cellularité tumorale

Analyse des résultats :

Immunohistochimie (n = 20) Pourcentage de cellules tumorales positives	**FISH *CDKN2A***	**ddPCR *CDKN2A***	**Méthylome (CGH)**	**NGS**	
9/20 80-100 %	9/9	9/9	9/9	9/9	**Absence de délétion de CDKN2A**
11/20 < 5%	6/11	10/11	10/11	6/7	**Délétion de CDKN2A**

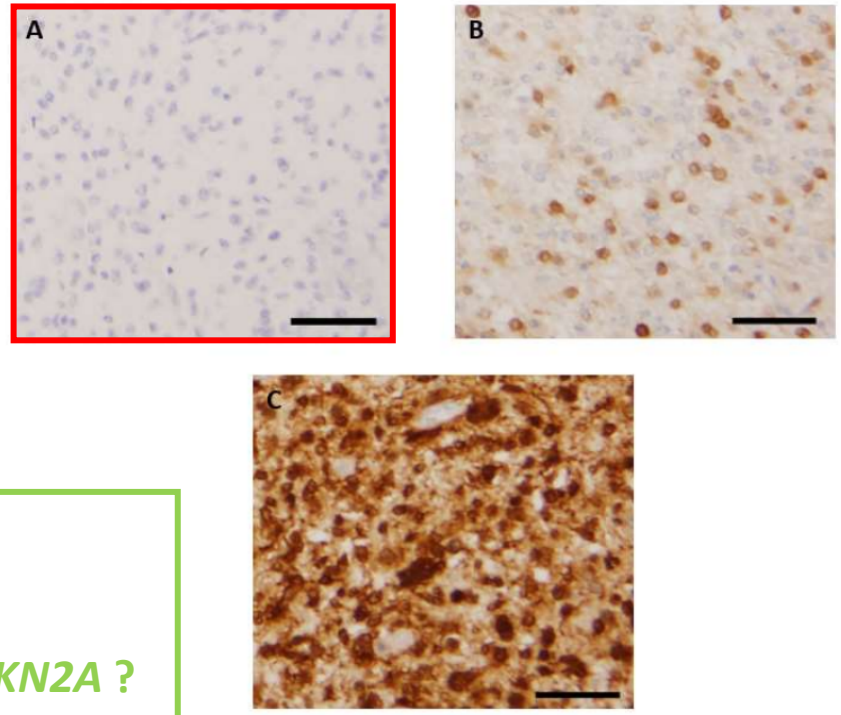
Analyse des résultats :

Immunohistochimie (n = 20) Pourcentage de cellules tumorales positives	FISH *CDKN2A*	ddPCR *CDKN2A*	Méthylome (CGH)	NGS	
9/20 80-100 %	9/9	9/9	9/9	9/9	Absence de délétion de CDKN2A
11/20 < 5%	6/11	10/11	10/11	6/7	**Délétion de CDKN2A**

=> La sensibilité de la FISH pour détecter une délétion homozygote de *CDKN2A* semble donc sur cette petite série faible

Etude de la corrélation entre les résultats de la FISH et de l'immunohistochimie p16 pour la détection de la délétion homozygote de *CDKN2A* sur une cohorte variée de 173 gliomes :

Proportion non négligeable de cas avec perte d'expression immunohistochimique de p16 sans délétion de *CDKN2A* détectée en FISH (15/56 soit 26% des cas)

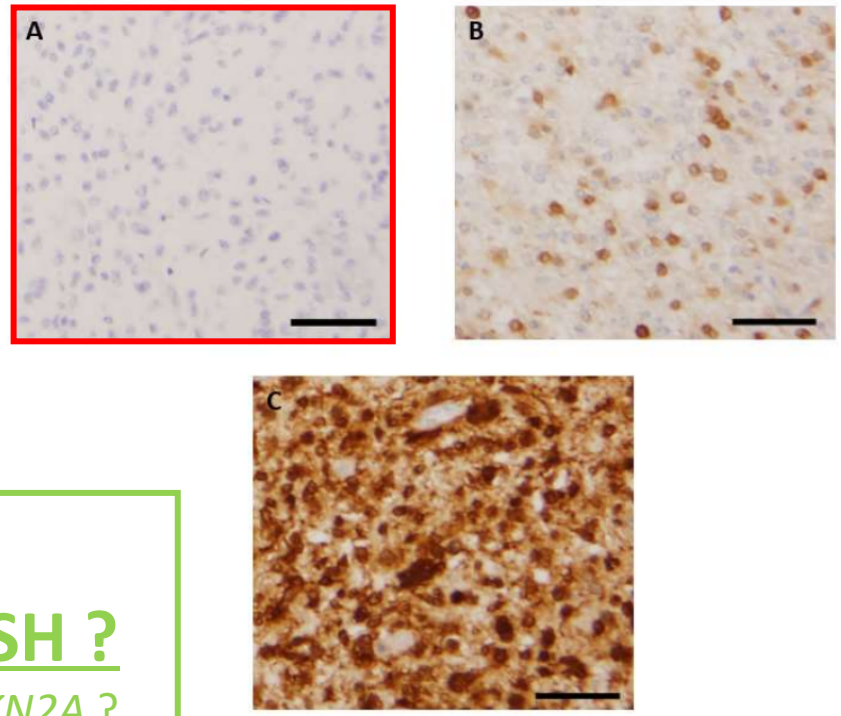


Faible sensibilité de la FISH ?
Autre mécanisme d'inactivation de *CDKN2A* ?

Lhermitte et al, 2023

Etude de la corrélation entre les résultats de la FISH et de l'immunohistochimie p16 pour la détection de la délétion homozygote de *CDKN2A* sur une cohorte variée de 173 gliomes :

Proportion non négligeable de cas avec perte d'expression immunohistochimique de p16 sans délétion de *CDKN2A* détectée en FISH (15/56 soit 26% des cas)



Faible sensibilité de la FISH ?

Autre mécanisme d'inactivation de *CDKN2A* ?

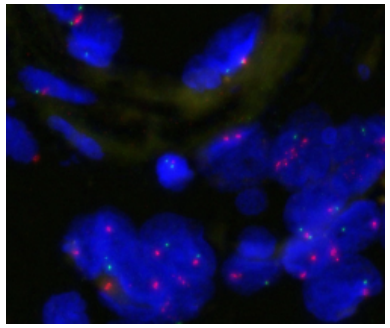
Lhermitte et al, 2023

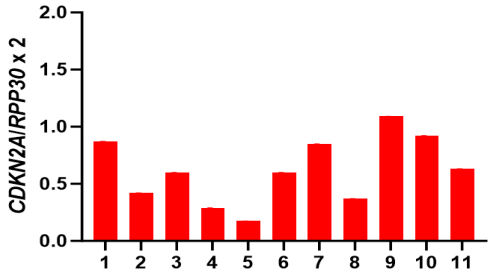
Analyse des résultats :

	FISH *CDKN2A*
Absence de délétion de *CDKN2A*	15/15
Délétion de *CDKN2A*	0/15

	PCR digitale *CDKN2A*
Absence de délétion de *CDKN2A*	6/15
Délétion de *CDKN2A*	9/15

- 60% des cas avec perte d'expression immunohistochimique de p16 sans délétion de *CDKN2A* en FISH présentaient cependant une délétion de *CDKN2A* en ddPCR

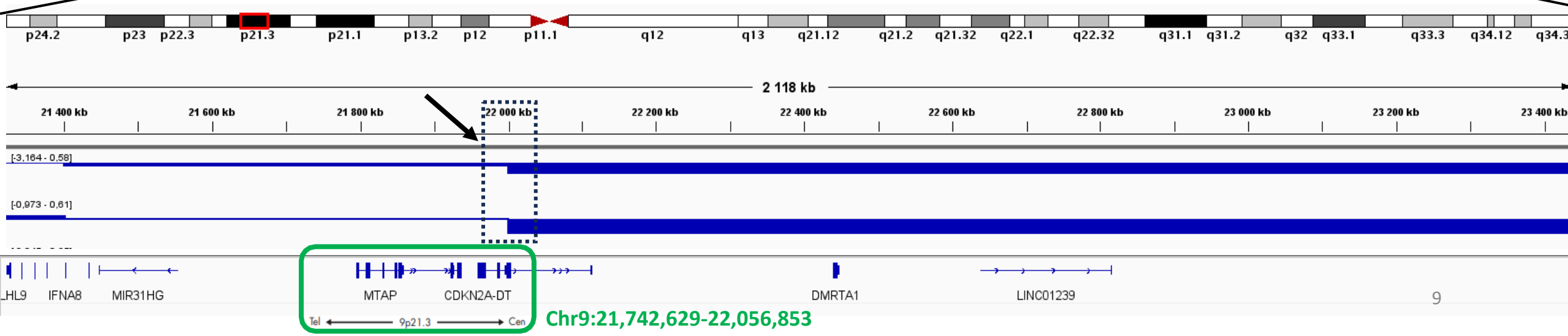




Risque de faux négatifs

Comment expliquer la faible sensibilité de la FISH ?

=> La délétion homozygote de *CDKN2A* semble située ici majoritairement en aval de la région ciblée par la sonde de FISH



Chr9:21,742,629-22,056,853

Revue de la littérature

Critère d'étude	Principales publications	Principaux résultats
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et la FISH *CDKN2A*	Satomi et al., 2021 Sasaki et al ., 2022 Maragkou et al ., 2023	Excellente corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la présence d'une délétion de *CDKN2A* en FISH

Revue de la littérature

Critère d'étude	Principales publications	Principaux résultats	
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et la FISH *CDKN2A*	Satomi et al., 2021 Sasaki et al ., 2022 Maragkou et al ., 2023	Excellente corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la présence d'une délétion de *CDKN2A* en FISH	En faveur d'une inadéquation de la région ciblée par la FISH centrée sur *MTAP*
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et le NGS	Broggi et Barresi., 2023	Faible corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la délétion de *CDKN2A* en NGS (sensibilité de 50%)	

Revue de la littérature

Critère d'étude	Principales publications	Principaux résultats
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et la FISH *CDKN2A*	Satomi et al., 2021 Sasaki et al ., 2022 Maragkou et al ., 2023	Excellente corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la présence d'une délétion de *CDKN2A* en FISH
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et le NGS	Broggi et Barresi., 2023	Faible corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la délétion de *CDKN2A* en NGS (sensibilité de 50%)
Performance de sondes de FISH de taille différentes (short vs long)	Oyama et al ., 2021	Détection de délétions supplémentaires avec les sondes courtes

En faveur d'une inadéquation de la région ciblée par la FISH centrée sur *MTAP*

Revue de la littérature

Critère d'étude	Principales publications	Principaux résultats
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et la FISH *CDKN2A*	Satomi et al., 2021 Sasaki et al ., 2022 Maragkou et al ., 2023	Excellente corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la présence d'une délétion de *CDKN2A* en FISH
Corrélation entre l'immunohistochimie MTAP et le NGS	Broggi et Barresi., 2023	Faible corrélation entre la perte d'expression de MTAP et la délétion de *CDKN2A* en NGS (sensibilité de 50%)
Performance de sondes de FISH de taille différentes (short vs long)	Oyama et al ., 2021	Détection de délétions supplémentaires avec les sondes courtes

En faveur d'une inadéquation de la région ciblée par la FISH centrée sur *MTAP*

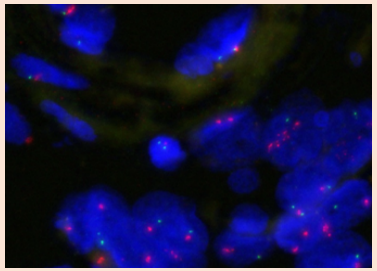
Existe d'il d'autres hypothèses ?		
Performances de la FISH pour la détection de microdélétions (< 200 kb)	Savola et al., 2007	Risque de faux négatifs en cas de microdélétions

Faible sensibilité de la FISH :

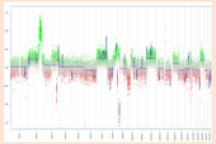
- Probable inadéquation de position de la sonde de FISH
- Micro-délétions non détectables en FISH (Savola et al., 2007)

Immunohistochimie p16

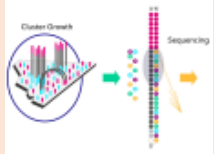
FISH



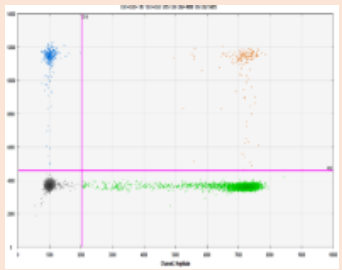
Méthylome



NGS



PCR digitale



Remerciements

Hôpitaux Universitaires de Strasbourg

Département de Pathologie :

Pr Marie-Pierre Chenard, PU-PH et cheffe de service

Dr Benoît LHERMITTE, MCU-PH

L'équipe technique en charge de l'immunohistochimie et de la FISH

Département d'oncobiologie moléculaire des cancers :

Les biologistes : Dr Damien Reita, AHU et Dr Erwan Pencreach, PH

L'équipe technique en charge de la PCR digitale

UMR CNRS 7021 - Université de Strasbourg

Equipe signalisation tumorale et cibles thérapeutiques :

Dr Monique DONTENWILL, Directrice de recherche

Dr Sophie MARTIN, Chargée de recherche

Pr Natacha ENTZ-WERLE, PU-PH

Dr Benoît LHERMITTE, MCU-PH

Dr Damien REITA, AHU

Dr Marlène DESCHUYTER, Post-doctorante

Mme Chinar SALMANLI, Doctorante