

Année 2020/2021

N°

# Thèse

Pour le

## DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Soumanth THANGUTURI**

Né le 17 Avril 1991 à Vincennes (94)

---

### **L'INVESTIGATION DE L'AXE RB1-SOX2 COMME OUTIL POUR LE DIAGNOSTIC ET LA DETERMINATION DU STATUT VIRAL DES CARCINOMES A CELLULES DE MERKEL**

---

Présentée et soutenue publiquement le **Vendredi 10 Septembre 2021** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Serge GUYETANT, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Mahtab SAMIMI, Dermatologie et Vénérologie, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Marie Christine MACHET, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Bénédicte CORMIER, Anatomie et Cytologie Pathologiques, IHP– Tours

Docteur Thibault KERVARREC, Anatomie et Cytologie Pathologiques, AHU, Faculté de Médecine - Tours



Année 2020/2021

N°

## Thèse

Pour le

### DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Soumanth THANGUTURI**

Né le 17 Avril 1991 à Vincennes (94)

---

### **L'INVESTIGATION DE L'AXE RB1-SOX2 COMME OUTIL POUR LE DIAGNOSTIC ET LA DETERMINATION DU STATUT VIRAL DES CARCINOMES A CELLULES DE MERKEL**

---

Présentée et soutenue publiquement le **Vendredi 10 Septembre 2021** devant un jury composé de :

Président du Jury : Professeur Serge GUYETANT, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Faculté de Médecine – Tours

Membres du Jury :

Professeur Mahtab SAMIMI, Dermatologie et Vénérologie, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Marie Christine MACHET, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine – Tours

Docteur Bénédicte CORMIER, Anatomie et Cytologie Pathologiques, IHP– Tours

Docteur Thibault KERVARREC, Anatomie et Cytologie Pathologiques, AHU, Faculté de Médecine - Tours

UNIVERSITE DE TOURS  
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**DOYEN**

**Pr Patrice DIOT**

**VICE-DOYEN**

**Pr Henri MARRET**

**ASSESSEURS**

**Pr Denis ANGOULVANT, Pédagogie**

**Pr Mathias BUCHLER, Relations internationales**

**Pr Theodora BEJAN-ANGOULVANT, Moyens – relations avec l'Université**

**Pr Clarisse DIBAO-DINA, Médecine générale**

**Pr François MAILLOT, Formation Médicale Continue**

**Pr Patrick VOUREC'H, Recherche**

**RESPONSABLE ADMINISTRATIVE**

**Mme Fanny BOBLETER**

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

**Pr Emile ARON (†) – 1962-1966**

**Directeur de l'Ecole de Médecine – 1947-1962**

**Pr Georges DESBUQUOIS (†) – 1966-1972**

**Pr André GOUAZE (†) – 1972-1994**

**Pr Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004**

**Pr Dominique PERROTIN – 2004-2014**

**PROFESSEURS EMERITES**

**Pr Daniel ALISON**

**Pr Gilles BODY**

**Pr Jacques CHANDENIER**

**Pr Philippe COLOMBAT**

**Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL**

**Pr Pascal DUMONT**

**Pr Dominique GOGA**

**Pr Gérard LORETTE**

**Pr Dominique PERROTIN**

**Pr Roland QUENTIN**

**PROFESSEURS HONORAIRES**

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – P. BARDOS – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – P. COSNAY – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUDEAU – J.L. GUILMOT – O. HAILLOT – N. HUTEN – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – Y. LANSON – O. LE FLOCH – Y. LEBRANCHU – E. LECA – P. LECOMTE – AM. LEHR-DRYLEWICZ – E. LEMARIE – G. LEROY – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAIN – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – D. ROYERE – A. SAINDILLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

---

ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis .....	Cardiologie
APETOH Lionel .....	Immunologie
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique .....	Cardiologie
BAKHOS David .....	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe .....	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Théodora .....	Pharmacologie clinique
BERHOUE Julien.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne .....	Cardiologie
BERNARD Louis .....	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle .....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique .....	Physiologie
BOURGUIGNON Thierry .....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent .....	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe .....	Radiologie et imagerie médicale
DEQUIN Pierre-François.....	Thérapeutique
DESOUBEAUX Guillaume.....	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe .....	Anatomie
DIOT Patrice.....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague .....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....	Médecine intensive – réanimation
FAUCHIER Laurent .....	Cardiologie
FAVARD Luc.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUGERE Bertrand .....	Gériatrie
FOUQUET Bernard.....	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle .....	Anatomie & cytologie pathologiques
GATAULT Philippe.....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe .....	Rhumatologie
GRUEL Yves.....	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine.....	Médecine intensive – réanimation
GUYETANT Serge .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel.....	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier .....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis .....	Radiologie et imagerie médicale
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice .....	Physiologie
LABARTHE François .....	Pédiatrie
LAFFON Marc .....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
LARDY Hubert.....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd.....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique.....	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry.....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel.....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude .....	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent .....	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François .....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain .....	Pneumologie

MARRET Henri .....	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel .....	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent .....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MITANCHEZ Delphine .....	Pédiatrie
MORINIERE Sylvain .....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis .....	Rhumatologie
ODENT Thierry .....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....	Chirurgie digestive
OULDAMER Lobna .....	Gynécologie-obstétrique
PAINTAUD Gilles .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric .....	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Franck .....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean .....	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent .....	Physiologie
REMERAND Francis .....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe .....	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe .....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
RUSCH Emmanuel .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline .....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem .....	Chirurgie digestive
SAMIMI Mahtab .....	Dermatologie-vénéréologie
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....	Biophysique et médecine nucléaire
THOMAS-CASTELNAU Pierre .....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick .....	Génétique
VAILLANT Loïc .....	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane .....	Anatomie
VOURC'H Patrick .....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....	Immunologie
ZEMMOURA Ilyess .....	Neurochirurgie

## **PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE**

DIBAO-DINA Clarisse  
LEBEAU Jean-Pierre

## **PROFESSEURS ASSOCIES**

MALLET Donatien ..... Soins palliatifs  
POTIER Alain ..... Médecine Générale  
ROBERT Jean ..... Médecine Générale

## **PROFESSEUR CERTIFIE DU 2<sup>ND</sup> DEGRE**

MC CARTHY Catherine ..... Anglais

## **MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

AUDEMARD-VERGER Alexandra ..... Médecine interne  
BARBIER Louise ..... Chirurgie digestive  
BINET Aurélien ..... Chirurgie infantile  
BISSON Arnaud ..... Cardiologie (CHRO)  
BRUNAUT Paul ..... Psychiatrie d'adultes, addictologie  
CAILLE Agnès ..... Biostat., informatique médical et technologies de communication  
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo ..... Rhumatologie (au 01/10/2021)  
CLEMENTY Nicolas ..... Cardiologie  
DENIS Frédéric ..... Odontologie  
DOMELIER Anne-Sophie ..... Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière  
DUFOUR Diane ..... Biophysique et médecine nucléaire  
ELKRIEF Laure ..... Hépatologie – gastroentérologie  
FAVRAIS Géraldine ..... Pédiatrie  
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie ..... Anatomie et cytologie pathologiques  
GOUILLEUX Valérie ..... Immunologie  
GUILLON-GRAMMATICO Leslie ..... Epidémiologie, économie de la santé et prévention



HOARAU Cyrille.....	Immunologie
LE GUELLEC Chantal.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEFORT Bruno.....	Pédiatrie
LEGRAS Antoine.....	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien.....	Maladies infectieuses
MACHET Marie-Christine.....	Anatomie et cytologie pathologiques
MOREL Baptiste.....	Radiologie pédiatrique
PARE Arnaud.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
REROLLE Camille.....	Médecine légale
ROUMY Jérôme.....	Biophysique et médecine nucléaire
SAUTENET Bénédicte.....	Thérapeutique
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie.....	Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl.....	Bactériologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

---

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
NICOGLOU Antonine.....	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald.....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile.....	Médecine Générale

## MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

---

BARBEAU Ludivine.....	Médecine Générale
ETTORI-AJASSE Isabelle.....	Médecine Générale
PAUTRAT Maxime.....	Médecine Générale
RUIZ Christophe.....	Médecine Générale
SAMKO Boris.....	Médecine Générale

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRAE

---

BECKER Jérôme.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BOUAKAZ Ayache.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoit.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
DE ROCQUIGNY Hugues.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GILOT Philippe.....	Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282
GOUILLEUX Fabrice.....	Directeur de Recherche CNRS – EA 7501 – ERL CNRS 7001
GOMOT Marie.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LATINUS Marianne.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LE MERREUR Julie.....	Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
MEUNIER Jean-Christophe.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
PAGET Christophe.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
RAOUL William.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR CNRS 1069
SI TAHAR Mustapha.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille.....	Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
WARDAK Claire.....	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

---

### *Pour l'Ecole d'Orthophonie*

DELORE Claire.....	Orthophoniste
GOUIN Jean-Marie.....	Praticien Hospitalier

### *Pour l'Ecole d'Orthoptie*

BOULNOIS Sandrine.....	Orthoptiste
SALAME Najwa.....	Orthoptiste

### *Pour l'Ethique Médicale*

BIRMELE Béatrice.....	Praticien Hospitalier
-----------------------	-----------------------

# SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,  
de mes chers condisciples  
et selon la tradition d'Hippocrate,  
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur  
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,  
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux  
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira  
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas  
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,  
je rendrai à leurs enfants  
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime  
si je suis fidèle à mes promesses.  
Que je sois couvert d'opprobre  
et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.



## **Remerciements**

**À Monsieur le président du jury, le Professeur Serge GUYETANT**, je tiens à vous exprimer mon profond respect et mon extrême gratitude d'avoir accepté de présider ma thèse ainsi que pour votre soutien tout au long de mon internat.

**À Madame le Professeur Mahtab SAMIMI**, pour votre présence honorifique au sein de mon jury. Je vous suis extrêmement reconnaissant de juger ce travail portant sur un de vos domaines de prédilection et d'y avoir grandement contribué en m'apportant votre aide précieuse.

**À Madame le Docteur Marie-Christine MACHET**, je tiens à vous faire part du plus grand respect que j'ai à votre égard et vous remercie pour le soutien que vous m'avez conféré au cours de mon internat. J'ai notamment pris goût à la Dermatopathologie à vos côtés.

**À Madame le Docteur Bénédicte CORMIER**, je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je suis honoré par ta présence en tant que représentante de notre profession d'anatomopathologie dans le cadre de l'exercice libéral. Je suis impatient de démarrer cette première aventure professionnelle à vos côtés pour les prochaines années.

**À Monsieur le Docteur Thibault KERVAREC**, je te remercie sincèrement de m'avoir proposé ce sujet de thèse et de m'avoir encadré avec rigueur à chaque étape de notre étude. Merci de m'avoir éclairé de tes connaissances tout au long de mon internat. Cela a constitué pour moi une grande source d'épanouissement dans l'apprentissage de l'anatomopathologie, et plus particulièrement de la Dermatopathologie.

Je remercie également chaleureusement le **Docteur Anne DE MURET**, pour la transmission de son grand savoir de manière si passionnée et pour la gentillesse qu'elle a constamment eu à mon égard.

Je remercie infiniment le **Professeur Gonzague DE PINIEUX**, pour son enseignement et pour la bienveillance qu'il m'a toujours témoignée.

Je remercie grandement le **Professeur Gaëlle FROMONT**, pour son enseignement enrichissant de la pathologie urologique.

Je remercie sincèrement le **Docteur Flavie ARBION**, pour m'avoir notamment transmis les bases de la pathologie hématologique.

Je remercie le **Docteur Isabelle DE PINIEUX**, pour les contacts professionnels que l'on a eu lors de sa présence hebdomadaire dans le service mais aussi pour les informations et conseils avisés concernant l'activité libérale. Merci d'avoir répondu à mes interrogations me permettant de m'orienter vers cet exercice libéral. Je suis honoré et impatient de rejoindre le laboratoire dans quelques semaines.

Je remercie d'anciens co-internes, devenus aujourd'hui de brillants pathologistes sur qui je prends exemple au quotidien, les Docteurs **Damien SIZARET** et **Matthias TALLEGAS**. Merci les gars, j'ai beaucoup appris à votre contact, j'espère être comme vous quand je serai grand !

Je remercie l'ensemble des médecins pathologistes ayant participé à ma formation, notamment les Docteurs **Fanny DUJARDIN**, **Isabelle ORAIN**, **Jean Frédéric BRUCH**, **Patrick MICHENET**, **Rémy KERDRAON**, **Flore DELALANDE**, **Cendra BARBEY**, **Cécilia ROUSSELOT**, **Corinne ROGEZ**.

Je remercie l'ensemble de **mes co-internes** d'anapath, notamment ceux avec qui j'ai partagé mes semestres d'internat, **Adrien**, **William**, **Alix**, **Jean-Baptiste**, **Mélanie**.

Je remercie **les équipes** d'Anatomie et Cytologie Pathologique avec lesquelles j'ai eu la chance de travailler au cours de mon internat, avec une mention spéciale pour **Tony** et **Naima** à Chartres et pour **Marie**, **Laura**, **Elodie**, **Audrey** et **Bastien** à Tours.

**A mes amis,**

Mes amis de Versailles, avant tout **Alex, Toto** et **Max**, on a débuté ensemble au collège déjà, et même si nous avons choisi des voies différentes, vous m'avez toujours soutenu. Beaucoup de nostalgie quand je repense notamment à lorsque l'on faisait les quatre cents coups pour un simple foot sur le grand stade.

Mes amis de la fac de médecine de Versailles-Saint Quentin, à vous « mes gueules » **Antho, Kev, Navid** et **Seb**, on a bûché ensemble pour ce concours mais ce que je retiens en premier lieu ce sont toutes ces parties de jeux vidéo, ces soirées et ces voyages, desquels sont nés des moments épiques.

Une amie chère, elle aussi issue de la fac de médecine, **Aurélie** (ma grande), merci d'être là, lorsque tout va bien mais aussi dans les moments plus difficiles. Tes conseils valent de l'or pour moi. Je te vois devenir la grande pédopsychiatre que tu rêves d'être et j'en suis fier.

Mon meilleur pote, à toi **Ghislain** (Gigi), toujours là dans les moments cruciaux de ma vie. Il s'en est passé des choses depuis la 2<sup>nd</sup> au lycée Hoche, nous sommes devenus tous les deux papa, mais au fond on reste les deux mêmes sales gosses du début !

Mes amies tourangelles d'adoption, **Romane** (Roro) et **Lisa** (Lili), vous êtes la plus belle rencontre de mon internat. J'espère que l'on continuera longtemps à se voir et que chacun trouvera le poste de ses rêves (dans la région !).

**A ma famille,**

**Maman, Papa**, je ne vous remercierais jamais assez pour votre soutien inconditionnel durant toutes ces années, déjà bien avant le début des études de médecine. Cette réussite c'est avant tout la votre, sans vous je ne serais pas arrivé là. Merci d'avoir été si indulgents, même quand je ne le méritais pas.

**Akhil**, mon petit frère, je suis fier de la personne que tu es devenu. Merci de prendre de mes nouvelles même quand on se voit moins. Merci à ma belle sœur, **Alison**, qui semble prendre si bien soin de toi.

A special thanks to **Doctor Vivek GONUGUNTA** (Ravi uncle), you are the reason of my last minute switch from engineering to medical school, notably by watching you operate in surgery room. You have always been a role model for me.

**Morgane**, mon amour, mon alliée du quotidien depuis toutes ces années, je n'y serais pas arrivé sans toi et ton soutien à toutes épreuves. Je mesure un peu plus chaque jour la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés et j'ai hâte de découvrir ce que nous réserve l'avenir.

**Neela**, ma grande fille (comme j'aime t'appeler) de déjà cinq mois et bientôt six. Tu seras arrivée à temps pour voir papa devenir docteur. Tu es le plus cadeau que la vie m'ait fait et la perspective de te voir grandir jour après jour me comble de bonheur.

## **Abréviations**

ADN : Acide désoxyribonucléique  
AgST : Antigène petit T  
AgLT : Antigène grand T  
ATOH1 : Atonal homolog 1  
BCL2 : B-Cell Leukemia/Lymphoma 2  
CHU : Centre hospitalier universitaire  
CCM : Carcinome à cellules de Merkel  
HPV : Human papillomavirus  
IARC : International Agency for Research on Cancer  
INRA : Institut national de la recherche agronomique  
MCPyV : Polyomavirus à cellules de Merkel  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PAX5 : Paired box 5  
PCR : Polymerase chain reaction  
PDL-1 : Programmed death ligand 1  
PNET : Primitive Neuroectodermal Tumor  
PTEN : Phosphatase And Tensin Homolog  
RB1 : Retinoblastoma 1  
SOX2 : SRY-box transcription factor 2  
STAB2 : Special AT-rich sequence-binding protein 2  
TDT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase  
TMA : Tissue microarray  
TTF-1 : Thyroid Transcription factor 1  
UMR : Unité mixte de recherche  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine



# **Table des matières**

<b>I. Résumé.....</b>	<b>15</b>
<b>II. Abstract .....</b>	<b>16</b>
<b>III. Introduction.....</b>	<b>17</b>
A. Historique .....	17
B. Clinique, épidémiologie et prise en charge.....	18
C. Histologie.....	18
D. Virologie .....	21
<b>IV. Contexte du travail .....</b>	<b>23</b>
<b>V. Investigation of the RB1-SOX2 axis constitutes a tool for diagnosis and viral status determination in Merkel cell carcinoma .....</b>	<b>25</b>
<b>VI. Discussion.....</b>	<b>71</b>
A. L'inactivation de RB1 et la surexpression de SOX2 : des caractéristiques des CCM ayant un intérêt pour le diagnostic et la prise en charge des patients.....	71
B. L'inactivation de RB1 comme évènement précoce nécessaire au développement des CCM.....	72
C. L'inactivation de RB1 dans d'autres tumeurs épithéliales cutanées .....	74
D. Conclusion .....	75
<b>VII. Références.....</b>	<b>76</b>

## I. Résumé

**Introduction:** Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un carcinome neuroendocrine primitif cutané rare et agressif. Dans 80% des cas l'intégration génomique du polyomavirus de Merkel (MCPyV) est observée, tandis que les 20% restant sont viro-négatifs, en lien avec l'exposition UV.

Récemment, il a été démontré que la surexpression de SOX2 induite par l'inactivation de pRB constitue un déterminant majeur du développement des CCM, aussi bien pour les tumeurs viro-négatives que viro-positives.

Ainsi, l'objectif de cette étude a été de déterminer les performances de la perte de l'expression de RB1 et de la surexpression de SOX2, évaluées par étude immunohistochimique, pour le diagnostic de CCM en pratique courante.

**Matériel et Méthodes:** Au total, 196 CCM, 233 tumeurs épithéliales cutanées primitives non-CCM et 70 carcinomes neuroendocrines (CNE) extra-cutanés ont été inclus dans cette étude et intégrés dans un tissu micro array. Les niveaux d'expression de SOX2 et de RB1 ont été évalués dans les 3 cohortes en utilisant un score semi-quantitatif, par deux pathologistes indépendants. Les performances diagnostiques de ces deux marqueurs ont été déterminées en utilisant le rapport de vraisemblance positive (positive likelihood-ratio, LHR+).

**Résultats:** Une expression diffuse et intense de SOX2 n'était que rarement observée parmi les tumeurs cutanées non-CCM (n = 3/193, 2%) alors qu'elle était observée dans la majorité des CCM (n = 165/181, 92%, LHR+ = 58.7). L'expression diffuse de SOX2 était plus fréquemment observée dans les CCM que parmi les CNE extra-cutanés (n = 15/50, 30%, LHR+ = 3.0).

La perte d'expression de RB1 était décelée dans 52 cas de CCM (30%), 22 tumeurs cutanées non-neuroendocrines (12%) et 32 CNE extra-cutanés (63%). Parmi les cas de CCM, la perte de RB1 était mise en évidence dans tous les cas de CCM MCPyV (-), alors que tous les cas de CCM MCPyV (+) exprimaient RB1 (Sensibilité = 100%, Spécificité = 100%).

**Discussion:** SOX2 apparaît comme un marqueur pertinent pour le diagnostic de CCM alors que le type d'expression de RB1 permet de déterminer le statut viral au sein des CCM.

**Mots clés :** Carcinome à cellules de Merkel, SOX2, RB1, immunohistochimie, Polyomavirus

## II. Abstract

MCC (Merkel cell carcinoma) is an aggressive primary neuroendocrine neoplasm of the skin. In 80% of the MCC cases, integration of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is observed while the remaining 20% are MCPyV-negative with UV-related etiology. Both MCPyV-positive and -negative MCCs – albeit by different mechanisms - are associated with RB1 inactivation leading to overexpression of SOX2, a major contributor to MCC development. Accordingly, SOX2 diffuse expression was recently observed in almost all MCC samples. By contrast, loss of RB1 expression was reported to be restricted to the MCPyV-negative cases.

Thus, the aim of the present study was to assess the performances of SOX2 overexpression and RB1 loss detected by immunohistochemistry to diagnose MCC and determine MCPyV status.

Overall, 196 MCC tumors, 233 non-neuroendocrine skin neoplasms and 70 extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas (NEC) were included in the study. After inclusion in a tissue micro-array, SOX2 and RB1 expression levels were assessed by immunohistochemistry and evaluated by two pathologists using a semi-quantitative score. Diagnostic performances were then determined using the likelihood-ratio (LHR).

SOX2 diffuse expression was observed in more than 90% of the MCC cases (165 of 181 interpretable cases, 92%) and almost never observed in non-neuroendocrine skin epithelial neoplasms (3 of 193 interpretable cases, 2%,  $p < 0.0001$ , LHR+ = 58.7). Furthermore, SOX2 diffuse staining was more frequently observed in MCCs than in extra-cutaneous NECs (15 of 50 interpretable cases, 30%,  $p < 0.0001$ , LHR+ = 3.0).

RB1 expression loss was evidenced in 52 MCC cases (30%), 22 non-neuroendocrine skin tumors (12%) and 32 extra-cutaneous NEC (63%). Importantly, among MCC cases, RB1 loss was detected in all MCPyV(-) MCCs, while MCPyV(+) cases were consistently RB1-positive ( $p < 0.0001$ , Sensitivity = 100%, Specificity = 100%). These results suggest SOX2 to be a relevant diagnostic marker of MCC while RB1 appears as a robust predictor of MCC viral status.

**Key words** : Merkel cell carcinoma, SOX2, RB1 immunohistochemistry, Polyomavirus

### III. Introduction

#### A. Historique

La cellule de Merkel a été initialement identifiée en 1878 par Friedrich Sigmund Merkel, anatomiste et histologiste allemand. Cette cellule se localise au niveau de la basale épidermique et à la partie supérieure (infundibulum) du follicule pileux. Les cellules de Merkel se disposent en éléments isolés et sont parfois regroupées en amas (« touch dome »), notamment en peau acrale où elles sont plus nombreuses. Ces cellules sont en contact étroit avec la portion terminale de fibres nerveuses myélinisées(1). Cette relation étroite avec les terminaisons nerveuses de petit calibre des extrémités a été étayée par étude en microscopie électronique et suggère un rôle de mécanorécepteur des cellules de Merkel(1). En 2010, Van Keymeulen et al.(2) ont démontré que les cellules de Merkel dérivent de progéniteurs kératinocytaires de la basale épidermique suite à un processus de différenciation impliquant le facteur de transcription Atonal homolog 1 (ATOH1) en association avec l'inhibition de la voie Notch.

En 1972, une nouvelle entité décrite comme « carcinome trabéculaire cutané » est rapportée par Toker et al(3). Celle-ci se caractérise comme une prolifération carcinomateuse localisée dans le derme ou l'hypoderme, sans connexion à l'épiderme, composée de travées et de nids de cellules basaloïdes de petite taille. Les études ultrastructurales menées en 1978 mettent en évidence un phénotype proche des cellules de Merkel avec la présence de granules neurosecrétoires dans le cytoplasme des cellules tumorales, conduisant à nommer cette entité « carcinome à cellules de Merkel » (CCM)(4). Mais si des similitudes phénotypiques entre ce carcinome et les cellules de Merkel ont été observées, à ce jour, une relation histogénétique n'a pas pu être prouvée(5).

## **B. Clinique, épidémiologie et prise en charge**

Le CCM est un carcinome cutané rare dont l'incidence, en constante augmentation, est estimée à 0,5 pour 100000 habitants en Europe(6,7). Il survient principalement chez le sujet âgé(8) et l'immunodépression apparaît comme l'un des principaux facteurs de risque(9). La présentation clinique est non spécifique. La tumeur apparaît comme un nodule non douloureux à surface lisse, le plus souvent en zones photoexposées(10). Le diagnostic est souvent réalisé à un stade métastatique (27% de malades sont porteurs de métastases ganglionnaires et 7% présentent des métastases viscérales au moment du diagnostic)(8). Le traitement des formes localisées associe une exérèse chirurgicale à la radiothérapie alors qu'une chimiothérapie à base de sels de platine sera proposée pour les stades avancés(11). L'efficacité des anti-PDL1 (Avelumab) a récemment été mise en évidence(12) et cette molécule possède aujourd'hui l'autorisation de mise sur le marché en seconde ligne dans cette indication en France (commission de la transparence, avis du 18 Mars 2020 – HAS).

## **C. Histologie**

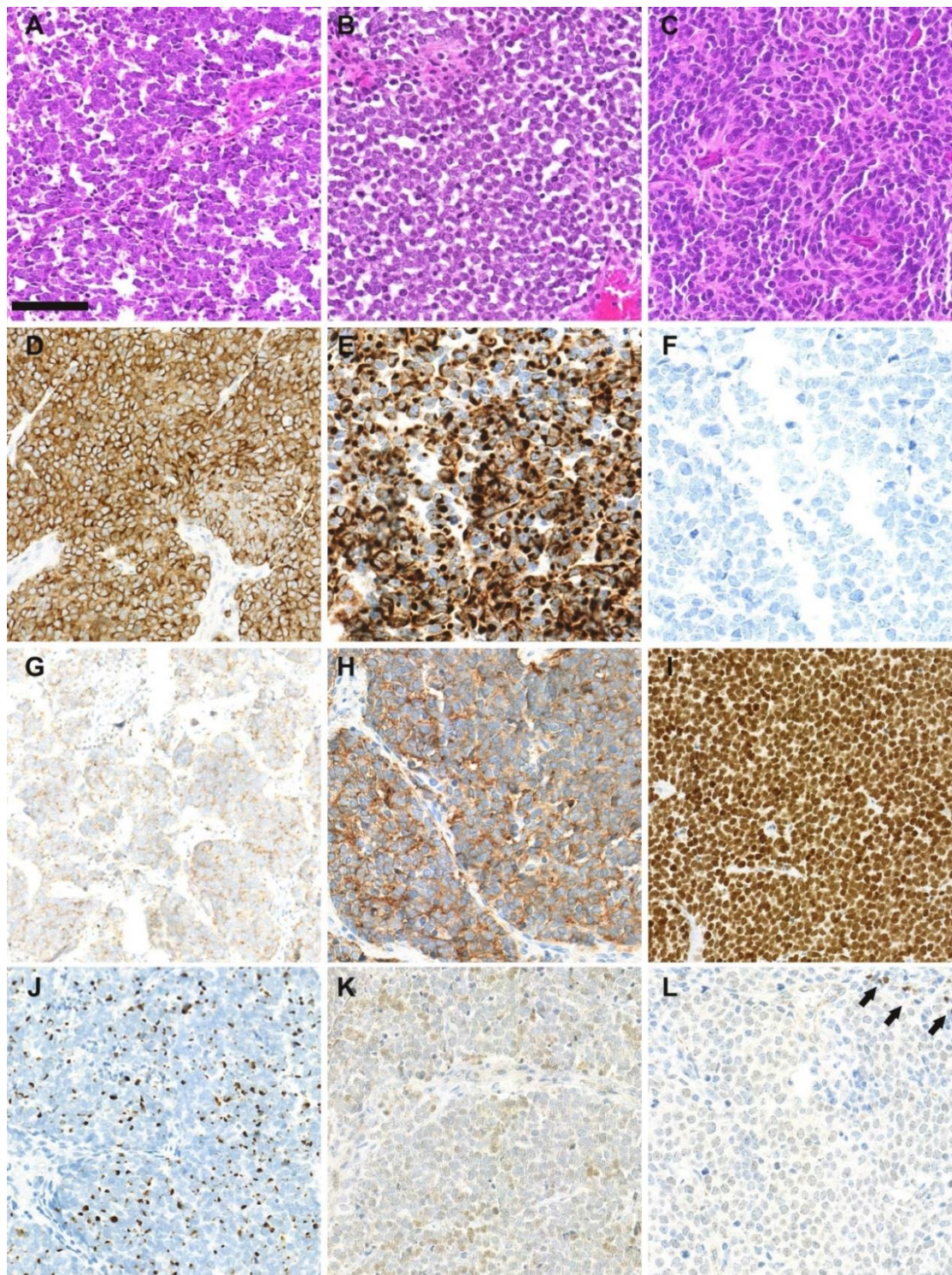
Sous le microscope, le CCM est un carcinome neuroendocrine de haut grade. Il correspond à une prolifération tumorale de siège dermique et/ou hypodermique, le plus souvent sans connexion à l'épiderme(5), dont l'architecture peut-être trabéculaire, solide ou diffuse. Les cellules tumorales sont de taille petite à moyenne, à rapport nucléocytoplasmique élevé et possèdent une chromatine fine dite « poivre et sel » (Figure 1). Des différences morphologiques ont été rapportées entre les CCM viro-positifs et viro-négatifs(13) : les cellules du CCM viro-positif sont dotées de peu de cytoplasme et d'un noyau rond à chromatine poussiéreuse alors que les cellules des CCM viro-négatifs comporte souvent un cytoplasme clair plus abondant et un noyau irrégulier (fusiforme). Le caractère agressif de la tumeur est souvent marqué par la présence d'une nécrose tumorale et de nombreuses figures mitotiques.



Les principaux diagnostics différentiels incluent les différentes tumeurs indifférenciées à petites cellules rondes et bleues. Celles-ci regroupent les hémopathies aiguës (leucémies aiguës) et chroniques (leucémie lymphoïde chronique) ainsi que certains sarcomes (synoviosarcome, rhabdomyosarcome, Primitive Neuroectodermal Tumors (PNET)). A cela, on peut ajouter les carcinomes primitivement cutanés, peu différenciés composés de cellules basaloïdes (carcinome basocellulaire, carcinome épidermoïde peu différencié, carcinome sébacé, porocarcinome etc.). Le mélanome, pouvant prendre des formes diverses et variées, doit être éliminé.

Mais avant tout, le diagnostic différentiel majeur à considérer est la métastase d'un carcinome neuroendocrine d'une origine extra-cutanée. Ainsi, devant toute tumeur cutanée présentant les caractéristiques d'un CCM, l'OMS recommande de réaliser systématiquement une exploration radiologique pulmonaire afin d'éliminer une localisation primitive viscérale(5).

L'étude immunohistochimique révèle une expression par les cellules tumorales du CCM des marqueurs épithéliaux (pancytokératines AE1/AE3), neuroendocrines (chromogranine A, synaptophysine et CD56) et, dans la majorité des cas, de la cytokératine 20 avec un marquage en boule paranucléaire (Figure 1). Récemment, notre équipe et d'autres(14,15) ont identifié deux marqueurs, le Neurofilament et SATB2, dont l'expression immunohistochimique apparaît comme un outil performant pour distinguer un CCM de la métastase d'un carcinome neuroendocrine extra-cutané. Les cellules tumorales n'expriment le plus souvent pas le TTF1, marqueur habituellement positif dans les carcinomes neuroendocrines d'origine pulmonaire. Par ailleurs, la fréquente expression de certains marqueurs lymphoïdes(16) par les cellules tumorales (jusqu'à 100% de positivité avec PAX5 et 72,8% avec Tdt) ne doit pas faire porter à tort le diagnostic d'hémopathie maligne.



**Figure 1** (adaptée de Kervarrec et al 2019 (13)). Caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques du carcinome à cellules de Merkel. (A-C) : coloration HPS. Plaque de cellules tumorales présentant une activité mitotique élevée (barre = 100  $\mu$ m). Alors que les cellules du CCM viro-positifs (A,B) sont dotées de peu de cytoplasme et d'un noyau rond à chromatine poussiéreuse, les cellules des CCM viro-négatifs arborent un cytoplasme clair plus abondant et un noyau irrégulier (C). (D) Expression cytoplasmique de la chromogranine A. (E) expression de la CK20 selon un pattern en dot para nucléaire ; (F) absence d'expression du TTF1 (thyroïde transcription factor-1) ; (G) Expression membranaire de la synaptophysine ; (H) Expression membranaire du CD56 ; (I) expression nucléaire de SATB2 (special AT-rich sequence-binding protein 2) ; (J) expression de neurofilament selon un pattern en dot para nucléaire ; (K) Expression faible de TDT (terminal deoxy nucleotidyl transferase) par les cellules tumorales ; (L) expression faible de PAX5 (paired box 5) par les cellules tumorales en comparaison aux lymphocytes intratumoraux (flèches).

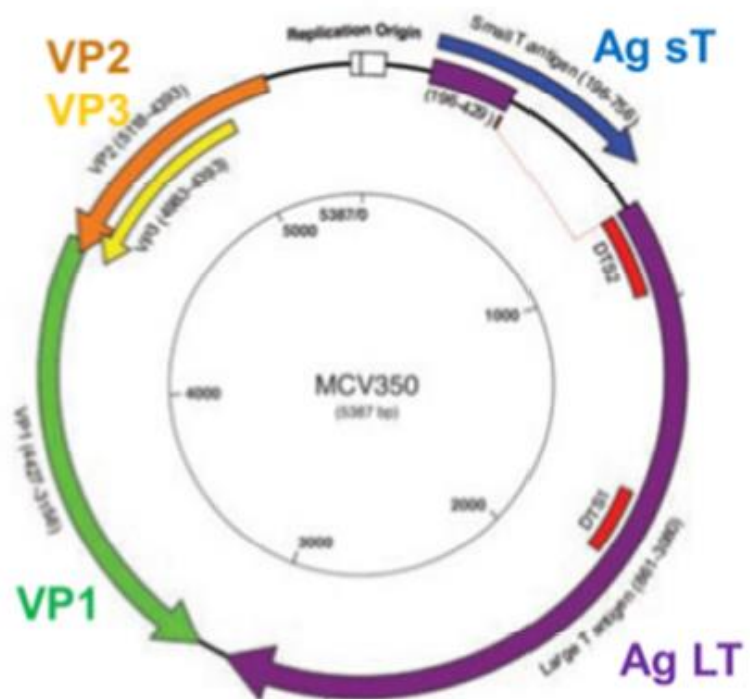
## D. Virologie

La constatation d'une forte prévalence du CCM chez les patients immunodéprimés a permis de suspecter une origine infectieuse de ce cancer. En effet en 2008, une équipe américaine dirigée par Moore(17), met en évidence la séquence d'un virus intégré au sein du génome d'environ 80% des CCM. Ce virus, jusque là encore inconnu, fait partie de la famille des polyomaviridae et a été nommé polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV). Il est considéré par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) comme agent carcinogène 2A. Il s'agit d'un virus à ADN circulaire double brin, non enveloppé, de forme icosaédrique et de symétrie T7. Trois régions s'individualisent au sein de son génome de 52000 paires de bases(17) (Figure 2). La première correspond à une séquence non codante permettant d'initier la réplication (l'origine de réplication). La seconde intéresse les séquences codant les protéines intervenant lors de la phase précoce de l'infection (antigènes petit T (AgsT) et grand T (AgLT)). Enfin, la troisième est constituée des séquences codant les protéines impliquées dans la phase tardive (protéines de capsid, VP1 et VP2).

Au sein de la population générale, ce virus est présent chez plus de 85% des adultes(18,19) chez lesquels il se réplique au sein du derme papillaire sans manifestation pathologique(20). Dans de rares cas, l'exposition solaire et l'immunodépression seraient à l'origine de l'intégration de l'ADN viral au génome du sujet hôte, induisant le processus de carcinogenèse(17). Ce dernier implique des mutations ou délétions du génome viral dans la séquence l'AgLT aboutissant à l'expression de formes tronquées de la protéine(17). Ainsi, au sein de la tumeur, les deux seules protéines exprimées sont l'AgLT(21)sous une forme tronquée et l'AgsT(22), possédant toutes deux un potentiel oncogénique.

Deux sous-groupes sont alors à distinguer, les CCM viro-positifs et les CCM viro-négatifs. Ces derniers seraient secondaires à l'exposition aux ultraviolets, ils présentent une charge mutationnelle très élevée et un pronostic plus péjoratif, bien que ceci soit controversé(23,24).





**Figure 2.** Génome du MCPyV (adapté de Feng et al. 2008)

## IV. Contexte du travail

Suite à la découverte du MCPyV en 2008, une collaboration a été mise en place entre virologues de l'équipe de recherche « Biologie des infections à polyomavirus » (UMR INRA ISP 1282, Université François Rabelais de Tours) dirigée par le Pr Antoine Touzé, les services de Dermatologie et d'Anatomie et cytologie pathologiques du CHU de Tours. Cette collaboration a permis la mise en place d'une collection biologique multicentrique, intégrant une sérothèque et une cohorte historico-prospective de tumeurs incluses en paraffine. Cette cohorte prospective multicentrique, historico-prospective, toujours en cours d'alimentation à l'heure actuelle est composée d'échantillons tumoraux issus de huit centres français (Tours, Orléans, Poitiers, Rennes, Angers, Besançon, Boulogne-Billancourt, Le Mans). Dans un premier temps, les travaux ont porté sur la sérologie avec la mise en évidence d'une sous-population de patients présentant un taux sérique d'anticorps anti-VP1 élevé associé à une meilleure survie(25). Par la suite, le dosage sérique d'anticorps anti AgLT a été identifié comme méthode de suivi des patients(26). Enfin, des travaux de métabolomique tumorale (étude de la vitamine D(27) et de l'expression des récepteurs de la somatostatine(28)) ainsi que sur les interactions du CCM avec le système immunitaire(28) ont été réalisés.

Portant un intérêt grandissant envers la Dermatopathologie au cours de mon internat, suite à l'enseignement enrichissant des dermatopathologistes du service d'anatomie et cytologie pathologique de l'hôpital Trousseau de Tours (Dr Anne de Muret, Dr Marie Christine Machet, Dr Thibault Kervarrec), je me suis vu proposer ce travail par le Dr T. Kervarrec. Cette étude fait suite à deux observations récentes. D'une part, la surexpression de SOX2 induite par l'inactivation de RB1 semble contribuer au développement des CCM, aussi bien pour les tumeurs viro-négatives que viro-positives(29–31); d'autre part, la perte d'expression de RB1 est le résultat de mutations ponctuelles/perde d'hétérozygotie dans les CCM viro-négatifs(32–34) alors qu'elle est secondaire à une séquestration par l'AgLT sans sa destruction dans les CCM viro-positifs(21).



Ainsi, l'objet de cette étude a été d'évaluer par immunohistochimie : 1) les performances de SOX2 comme marqueur diagnostique de CCM, et 2) les performances de RB1 comme prédicteur du statut viral des CCM.

Pour cela, nous avons considéré trois cohortes distinctes : une cohorte de CCM, des tumeurs épithéliales cutanées non CCM, et des carcinomes neuro endocrines extra-cutanées. Les cohortes de CCM et de carcinomes neuroendocrines extra-cutanés étaient préalablement constituées et intégrées dans un TMA. Une partie du travail de ma thèse a été de sélectionner un large panel de tumeurs épithéliales cutanées bénignes et malignes afin de créer une troisième cohorte. Après avoir vérifié l'exactitude du diagnostic posé et envoyé en relecture les cas de diagnostic incertain (cas relus par Dr Marie-Laure Jullie, CHU Bordeaux), nous avons sélectionné les zones d'intérêt pour intégration au sein d'un TMA, fabriqué par une technicienne du service (C. Coco).

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Thibault Kervarrec, en collaboration avec le Professeur Mahtab Samimi pour l'analyse des données cliniques. Il fait actuellement l'objet d'une soumission sous la forme d'un article en anglais dans la revue *Modern Pathology*.

**V. Investigation of the RB1-SOX2 axis constitutes a tool for diagnosis and viral status determination in Merkel cell carcinoma**

# Investigation of the RB1-SOX2 axis constitutes a tool for diagnosis and viral status determination in Merkel cell carcinoma

Soumanth Thanguturi<sup>1</sup>, Anne Tallet<sup>2</sup>, Elodie Miquelestorena-Standley<sup>1</sup>, Catherine Coco<sup>1</sup>, Yannick Le Corre<sup>3</sup>, Ewa Hainaut-Wierzbicka<sup>4</sup>, Astrid Blom<sup>5</sup>, Philippe Saiag<sup>5</sup>, Nathalie Beneton<sup>6</sup>, Guido Bens<sup>7</sup>, Charlee Nardin<sup>8</sup>, François Aubin<sup>8</sup>, Monica Dinulescu<sup>9</sup>, Marie-Christine Machet<sup>1</sup>, Roland Houben<sup>10</sup>, David Schrama<sup>10</sup>, Christine Collin<sup>2</sup>, Gaëlle Fromont<sup>1</sup>, Marie-Laure Jullie<sup>11</sup>, Nicolas Macagno<sup>12</sup>, Pauline Gaboriaud<sup>13</sup>, Patricia Berthon<sup>13</sup>, Antoine Touzé<sup>13</sup>, Serge Guyétant<sup>1,13\*</sup>, Mahtab Samimi<sup>13,14\*</sup>, Thibault Kervarrec<sup>1,13\*</sup>

- (1) Department of Pathology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France
- (2) Platform of Somatic Tumor Molecular Genetics, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France
- (3) Dermatology Department, LUNAM Université, CHU Angers, 49933 Angers, France
- (4) Dermatology Department, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France
- (5) Department of General and Oncologic Dermatology, CARADERM network Ambroise-Paré hospital, APHP & Research unit EA 4340, university of Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Paris-Saclay University, 92100, Boulogne-Billancourt France
- (6) Dermatology Department, CHR Le Mans, 194 avenue Rubillard 72037 Le Mans Cedex 09, France
- (7) Dermatology Department, CHR d'Orléans, 14 avenue de l'hôpital, 45100 Orléans, France
- (8) Dermatology Department, Université de Franche Comté, CHU Besançon, EA3181, IFR133, 2 boulevard Fleming 25030 Besançon, France
- (9) Dermatology Department, CHR Rennes, 2 rue Henri le Guilloux 35000 Rennes Cedex, France ; Institut Dermatologique du Grand Ouest (IDGO)
- (10) Department of Dermatology, Venereology and Allergology, University Hospital Würzburg, 97080 Würzburg, Germany
- (11) Département de Pathologie, Université de Bordeaux, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, 33000 Tours, France
- (12) Department of Pathology, APHM, Timone University Hospital, Marseille, France
- (13) "Biologie des infections à polyomavirus" team, UMR INRA ISP 1282, Université de Tours, 37200 Tours, France
- (14) Department of Dermatology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France

\*SG, MS and TK equally contributed.

**Disclosure/Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Sources of support :** La ligue contre le cancer, HUGO Grant (Hôpitaux Universitaires du Grand Ouest).

**Institutional review board:** The local Ethics Committee in Human Research of Tours (France) approved the study (no. ID RCB2009-A01056-51)

**Running Title:** RB1-SOX2 axis in Merkel cell carcinoma

**Manuscript Word count** (Excluding capsule summary, abstract, references, figures, and tables): 4620.

**Abstract Word count :** 300.

**List of attachments:** 3 tables, 3 figures, 11 supplementary data

**Key words :** Merkel cell carcinoma, SOX2, RB1 immunohistochemistry, Polyomavirus

## Abstract

MCC (Merkel cell carcinoma) is an aggressive primary neuroendocrine neoplasm of the skin. In 80% of the MCC cases, integration of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is observed while the remaining 20% are MCPyV-negative with UV-related etiology. Both MCPyV-positive and -negative MCCs – albeit by different mechanisms - are associated with RB1 inactivation leading to overexpression of SOX2, a major contributor to MCC development. Accordingly, SOX2 diffuse expression was recently observed in almost all MCC samples. By contrast, loss of RB1 expression was reported to be restricted to the MCPyV-negative cases. Thus, the aim of the present study was to assess the performances of SOX2 overexpression and RB1 loss detected by immunohistochemistry to diagnose MCC and determine MCPyV status.

Overall, 196 MCC tumors, 233 non-neuroendocrine skin neoplasms and 70 extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas (NEC) were included in the study. After inclusion in a tissue micro-array, SOX2 and RB1 expression levels were assessed by immunohistochemistry and evaluated by two pathologists using a semi-quantitative score. Diagnostic performances were then determined using the likelihood-ratio (LHR).

SOX2 diffuse expression was observed in more than 90% of the MCC cases (165 of 181 interpretable cases, 92%) and almost never observed in non-neuroendocrine skin epithelial neoplasms (3 of 193 interpretable cases, 2%,  $p < 0.0001$ , LHR+ = 58.7). Furthermore, SOX2 diffuse staining was more frequently observed in MCCs than in extra-cutaneous NECs (15 of 50 interpretable cases, 30%,  $p < 0.0001$ , LHR+ = 3.0).

RB1 expression loss was evidenced in 52 MCC cases (30%), 22 non-neuroendocrine skin tumors (12%) and 32 extra-cutaneous NEC (63%). Importantly, among MCC cases, RB1 loss was detected in all MCPyV(-) MCCs, while MCPyV(+) cases were consistently RB1-positive ( $p < 0.0001$ , Sensitivity = 100%, Specificity = 100%). These results suggest SOX2 to be a relevant diagnostic marker of MCC while RB1 appears as a robust predictor of MCC viral status.

## Introduction

MCC (Merkel cell carcinoma) is a rare and aggressive neuroendocrine carcinoma of the skin with a 5-year overall survival rate of 40%<sup>1</sup>. Under the microscope, MCC appears as a poorly differentiated tumor with high grade neuroendocrine carcinoma features. Main differential diagnosis include other basaloid and/or poorly differentiated skin tumors and metastasis from extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas<sup>2-5</sup>. In addition to Cytokeratin 20 (CK20), a panel of immunohistochemical markers may be required for MCC identification notably in difficult to diagnose cases such as MCCs without primary or Cytokeratin 20-non expressing cases<sup>5-7</sup>.

In 2008, Feng et al. identified a polyomavirus integrated in the genome of MCC cells and accordingly named it Merkel cell polyomavirus (MCPyV)<sup>8</sup>. MCPyV Integration is detected in approximately 80% of MCC cases<sup>8</sup> and the expression of the two early phase viral oncoproteins i.e. small T and Large T is regarded as the main oncogenic event triggering oncogenesis of MCPyV-positive MCCs. The remaining 20% of MCC lacking MCPyV integration represent a distinct tumor subset characterized by high tumor mutational burden and prominent UV signature<sup>9-11</sup>. Importantly, inactivation of the same molecular pathways, mainly RB1 and TP53, has been suggested to account for the common phenotype observed in both settings<sup>2</sup>.

While the Merkel cell was for long regarded as the cell of origin of MCCs, it is now acknowledged that similarities between Merkel cells and MCCs are due to phenotypic

changes acquired during MCC oncogenesis<sup>12,13</sup>. Indeed, in MCPyV-positive MCCs, expression of Large T and subsequent RB1 sequestration induce overexpression of ATOH1 (“atonal bHLH transcription factor 1”) and SOX2 (SRY-box transcription factor 2)<sup>12,13</sup>, two critical transcription factors driving Merkel cell differentiation<sup>14,15</sup>. Similarly, inactivating mutations and/or deletion of RB1 resulting in SOX2 overexpression were demonstrated in a large portion of the MCPyV-negative tumors<sup>9,16–19</sup>.

In normal skin, SOX2 expression is limited to Merkel cells and melanocytes<sup>26</sup>. Moreover, only focal SOX2 expression restricted to tumor initiating cells was observed in non-MCC epithelial skin cancers i.e. squamous and basal cell carcinomas<sup>20,21</sup>. By contrast, recent demonstration of diffuse SOX2 positivity in most of the MCC tumors<sup>22</sup> suggests that SOX2 could represent a potential MCC diagnostic marker.

RB1 inactivation was demonstrated as a crucial molecular determinant for both SOX2 overexpression<sup>23,24</sup> and MCC development<sup>25</sup>. Preserved RB1 expression was however reported in virtually all MCC samples by some authors<sup>26</sup>, while others observed loss of RB1 immunohistochemical expression only in a minority of cases, in association with MCPyV-negative status and a poor outcome (57 to 87% of the MCPyV-negative cases)<sup>17,27,28</sup>. Indeed, combination of truncating mutation and loss of heterozygosity has been described to result in RB1 expression loss in MCPyV-negative cases<sup>9,16–18</sup>, while only sequestration of this protein by the Large T without its destruction was observed in MCPyV-positive MCCs<sup>26</sup>. Moreover, RB1 expression loss was further described in non MCC cutaneous neoplasms<sup>29,30</sup>.

Therefore, although not diagnostic for MCC, RB1 immunohistochemical detection might constitute a potential tool for MCPyV status determination.

In this context, the main objective of the present study was to assess the performances 1) of SOX2 immunohistochemistry to distinguish MCCs from other cutaneous tumors and extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas and 2) of RB1 immunohistochemistry to determine MCPyV status using a multimodal approach as a gold standard.



## Methods

### Design and settings

MCC cases were selected from a historical/prospective multicentric French cohort of patients with a diagnosis of MCC established between 1998 and 2020 (Local Ethics Committee in Human Research, Tours, France; no. ID RCB 2009-A01056-51). Inclusion criteria of the cohort were previously described<sup>18, 19</sup>. Briefly, tumors with available formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples were included as MCC cases if they displayed a compatible morphology with the combination of CK20 positivity and at least one neuroendocrine marker (synaptophysin and chromogranin A)<sup>1</sup>. CK20 negative MCCs were also included showing expression of at least two neuroendocrine markers together with the absence of any visceral neuroendocrine carcinoma confirmed by imaging work-up (Computerized tomography scan or 18-Fluorodeoxyglucose-Positron emission tomography scan). Cases of MCC without a skin primary tumor were identified as previously described<sup>20</sup>.

Non MCC primary cutaneous neoplasms (detailed in **Supplementary Table 1**) were extracted from the archives of one pathology department (Tours, France). Squamous cell carcinomas, basal cell carcinomas and various adnexal tumors were selected to constitute a representative set of epithelial skin tumors. All cases were reviewed collegially by at least three pathologists to confirm diagnosis before inclusion (ST, MCM, MLJ,TK).

Extra-cutaneous high grade neuroendocrine carcinomas (detailed in **Supplementary Table 1**) were extracted from the archives of one department of pathology as previously described<sup>16</sup>.

## **Clinical data**

Age, sex and location of the primary tumors were collected from patient files. Regarding MCC cases, American Joint Committee on Cancer stage at the time of diagnosis, immune suppression (HIV infection, organ transplant recipients, hematological malignancies)<sup>22</sup> and follow-up data were also collected.

## **Tissue microarray and immunochemistry**

All cases were included in a tissue microarray. Central intratumor areas without necrosis were selected on hematoxylin phloxin saffron (HPS)-stained sections to exclude non-specific staining. The selected areas were extracted by using a 1-mm tissue core and cores were mounted in triplicate on the tissue microarray by using a semi-motorized tissue array system (MTA booster OI v2.00, Alphelys).

Immunohistochemical staining with Chromogranin A, Cytokeratin 7 (CK7), Cytokeratin 20 (CK20), Insulinoma-associated protein 1 (INSM1), Insulin gene enhancer protein (ISL1), Large T Antigen (CM2B4), Neurofilament (NF), Retinoblastoma 1 (RB1), SRY (Sex determining region Y)-box 2 (SOX2), SATB2, Synaptophysin, P53, and Transcription termination factor 1 (TTF1), was assessed using a BenchMark XT Platform as instructed. Immunohistochemical staining for Ab3 (targeting large T Antigen) was performed manually. Antibodies and dilutions are displayed in **Supplemental Method S1**. To note, CK20, NF and SATB2 expression have been previously reported in this cohort<sup>16</sup> and are included in the present study only for comparison.

### **Interpretation of immunohistochemical staining**

The immunohistochemical stainings were evaluated independently by two pathologists (ST, TK) who were blinded to the clinical data. Discordant cases were secondarily collegially reviewed and ambiguous cases were reviewed on overall slides stainings (n=8). The interpretation of immunohistochemistry (staining categories) was pre-determined as previously described. CK20, NF and RB1 staining were classified binarily as positive or negative<sup>5,17</sup>; SOX2<sup>20,22</sup>, Chromogranin A<sup>31,32</sup>, Synaptophysin<sup>31,32</sup>, SATB2<sup>5</sup>, ISL1<sup>33</sup> and INSM1<sup>31,34</sup> staining were classified by using a semiquantitative score: 0: lack of staining, 1: low/moderate or heterogeneous expression (< 50% of positive cells), 2: intense and diffuse (> 50% of positive cells). A semiquantitative Allred score was used for evaluating CM2B4 (Large T Antigen of MCPyV) and AB3; scores  $\geq 2$  were considered MCPyV-positive tumors, as described<sup>22</sup>.

### **Detection and quantification of Merkel cell polyomavirus DNA by real time PCR**

Detection and quantification of Merkel cell polyomavirus DNA were performed by a biologist (AT) blinded to the clinical and immunohistochemical data. Genomic DNA was isolated from tissue samples by using the Maxwell 16 Instrument (Promega) with the Maxwell 16 formalin-fixed and paraffin-embedded Plus LEV DNA purification kit (Promega). LTA<sub>g</sub> real-time PCR assay was performed as described<sup>25</sup>. The  $\Delta C_t$  method was used for quantification and results expressed as number of Merkel cell polyomavirus copies/cells (cut-off 1.2 copies/cell).

### **Serological assay**

Method of detection of serum antibodies against the MCPyV T antigens, a specific feature of MCPyV(+)-MCC patients, has previously been described<sup>56</sup>. Briefly, a fusion protein composed of amino acids 1–78 of T antigens fused at the C-terminus of glutathione-S-transferase (GST-TAg1–78) was generated and used to coat an ELISA microplate. Human sera were serially diluted threefold and added to the coated wells. A positive titer was defined as a titer  $\geq 1/100$ .

### **Viral status determination: a multimodal approach**

To determine the tumor viral status for MCC cases, we used a multimodal approach adapted from Moshiri et al<sup>32,33</sup> and modified by adding a serological test. A case was considered MCPyV(+) when at least two out of four assays (MCPyV genome detection by real time PCR, immunohistochemical large T detection using CM2B4 and Ab3 antibodies, detection of serum antibodies against T-antigens) were positive. Only cases with available results for the 4 assays were included in the MCPyV-status analysis.

### **Statistical analysis**

Continuous data was described with median (Q1–Q3) and categorical data with number (%) of interpretable cases. Categorical data were compared by two-tailed Fisher's exact test. Due to multiple comparisons,  $P < 0.01$  was considered statistically significant. Diagnostic accuracy

of index tests was determined in accordance with the STARD guidelines<sup>21</sup>. The inclusion criteria described above (Methods section, data and settings criteria) were considered the reference standards for the diagnosis and the multimodal assay was regarded as the reference standard for MCPyV status determination<sup>32,33</sup>. The diagnostic accuracy of index tests was compared with the reference standard by using the positive likelihood ratio as a measure of accuracy combining sensitivity and specificity. Index tests with positive likelihood ratio > 10 were considered efficient<sup>22</sup>. The relationship between patient characteristics and survival (recurrence-free and MCC-specific survival) were analyzed by log-rank tests and presented on Kaplan-Meier curves. Univariate and multivariate Cox proportional-hazards regression was used to estimate hazard ratios (HRs) and 95% confidence intervals (CIs) and identify factors associated with MCC recurrence and death from MCC. Specific deaths were considered events and living patients were censored on the date of last follow-up. Covariates with  $P < 0.1$  on Cox univariate regression analysis were identified as potential prognostic confounders and then included in the multivariate Cox analysis. Statistical analysis involved use of XL-Stat-Life (Addinsoft, Paris, France).  $P < 0.01$  was considered statistically significant.

## Results

### Patient characteristics

196 MCC cases selected between 1998 and 2020 met the inclusion criteria and were included in this study (**Figure 1/Flow Chart**). Median age was 78 years (Q1–Q3: 70-85) and sex ratio was 1.29 (F/M: 105/81). Immunosuppression was identified in 8 % of the cases (n= 13/169 available data). Patients were diagnosed on the basis of the American Joint Committee on Cancer stages with I, II, III, and IV stages in respectively 29, 35, 33 and 3% of the cases. Most common primary tumor sites were head or neck (33%) and lower limbs (30%). Among non MCC tumors, 233 cutaneous tumor cases and 70 extra cutaneous neuroendocrine carcinoma cases were used as control in the present study (**Figure 1/Flow Chart**).

To determine the MCPyV status in MCC tumors, a multimodal approach combining two immunohistochemical Large T detection protocols (using Ab3 and CM2B4 clones), MCPyV genome amplification by real time PCR and circulating T-antigen antibodies detection was used as a reference test as previously described<sup>11</sup>. Using such an approach, immunohistochemical Large T antigen expression, MCPyV genome and circulating T antigens antibodies were detected in 117, 131 and 68 cases respectively (68%, 75% and 45% of interpretable samples). To note, in 3 MCPyV positive cases, an expression of the Large T was observed using the AB3 antibody while CM2B4 remained negative. Subsequent Western blot analysis of one of these cases with available frozen material confirmed that CM2B4 can miss some MCPyV-positive cases (**Supplementary Figure 1**).

Among the 115 cases with available results for the four assays, 29 MCPyV-negative (25%) and 86 MCPyV-positive cases (75%) were identified (**Table 3-Supplementary Table 2**).

**SOX2, is an accurate marker to distinguish MCCs from other cutaneous epithelial tumors.**

To determine whether intense and diffuse SOX2 positivity (score 2) might represent a diagnostic marker to distinguish MCCs from other skin tumors, SOX2 expression was investigated in the MCC cohort and in 233 non MCC skin tumors (**Table 1/Figure 1/Supplementary Figure 2**).

Intense and diffuse SOX2 expression was detected in 92% of the MCC tumors (score 2, n=165/181 interpretable cases) while the few remaining cases displayed heterogeneous/focal positivity (score 1, n=10, 5%) or lack of expression (score 0, n=6, 3%). By contrast, among the 193 non-MCC skin tumor samples with interpretable staining, score 2 SOX2 expression was only observed in 3 cases (2%) including two squamous cell carcinomas and one Bowen's disease. In addition, 33 non-MCC epithelial tumors (17%) were rated with a SOX2 score of 1 demonstrating either focal (3,5% of squamous cell carcinoma (n=2/56)) or patchy expression (14% of basal cell carcinoma (n=5/35), 28% of invasive squamous cell carcinoma (n=16/56), 25% of Bowen's disease (n=4/16) and 75% of trichoblastoma (n=6/8)) (**Supplementary Figure 3**).

Thus, intense and diffuse SOX2 staining appeared as a relevant criterion to distinguish MCC from other epithelial tumors (Sensitivity = 91%, Specificity = 98%, LHR+ = 58.7).

With respect to RB1 staining, it has to be noted that as previously reported<sup>28</sup>, RB1 loss was only observed in a minority of the MCC samples (n=52, 30%) and was further detected in 22 non MCC cutaneous tumor samples including 8% of squamous cell carcinomas (n=4/42), 6%

of basal cell carcinomas (n=2/36), 63% of Bowen's diseases (n=10/16), 100% of sebaceous carcinomas (n=2/2), 11% of hidradenomas (n=1/9), 17% of Paget's disease (n=1/6) and 67% of porocarcinomas (n=2/3) (**Supplementary Table 1**) confirming that RB1 loss alone can not be used as a MCC diagnostic marker (LHR+=2.44 ( 1.5-3.9)).

We then aimed to compare diagnostic performances of SOX2 with previously described MCC markers i.e. Cytokeratin 20 (CK20), Chromogranin A, INSM1, ISL1, Neurofilament (NF), SATB2 and Synaptophysin.

Positivity of CK20, NF and SATB2 was observed in 91% (n=178/195), 80% (n=154/193) and 68% (n=129/189) of MCC samples, while these markers were completely lacking in non MCC cutaneous tumors (Sensitivity = 91%, 80% and 68% respectively, Specificity = 100%) (**Table 1**). Moreover, INSM1 and ISL1, usually positive in neuroendocrine neoplasms, appeared as relevant additional diagnostic markers in this context (LHR+>10), frequently observed in MCCs (n=170/175, 97% and n=173/182, 95% respectively) and very rarely positive in non-MCC cutaneous tumors. INSM1 was detected in one squamous cell carcinoma and ISL1 in one Bowen's disease (**Supplementary Figures 4-5**). Thus, in combination with the three well-established MCC markers i.e. CK20, NF and SATB2, SOX2, INSM1 and ISL1 strongly discriminated MCCs from non-MCC skin tumors. By contrast, Chromogranin A harbored a lower specificity (85%) in this setting with a low positive LHR value (5.6). Indeed, Chromogranin A was detected in 75 % of trichoblastomas (patchy expression) and in 67% (n=32/48) of basal cell carcinoma (weak and heterogeneous expression n=18/32 ; 56%; diffuse and intense staining n=14/32 (44%)).



Since CK20 positivity is the most commonly used marker for MCC diagnosis, additional diagnostic tools will be of particular interest in case of CK20-negative tumors. SOX2 overexpression was observed in 11/12 (92%) CK20-negative MCCs with interpretable SOX2 staining confirming a potential interest of this marker in this setting.

**SOX2 is more frequently expressed in MCCs than in extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas.**

Metastasis of other neuroendocrine carcinomas constitute an additional important differential diagnosis of MCC in the current practice. To further determine if SOX2 could discriminate MCC from metastasis of other neuroendocrine carcinomas, SOX2 expression was evaluated in 70 extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas (**Table 2/ Supplementary Table 1**).

SOX2 diffuse expression was observed in 92% of the MCC cases (n=165/181) and in 30% of extra-cutaneous NECs (n=15/50) ( $p < 0.0001$ ). Diagnostic performances of SOX2 in this setting turned out to be rather poor with a specificity of 70% and a sensitivity of 92% (LHR+ = 3.1). These performances are in the same range than those of INSM1 and ISL1, showing respectively a specificity of 46% and 72% (LHR+ = 1.5 and 3.4, respectively). By contrast, our study confirmed CK20, NF and SATB2 to be highly performant to discriminate MCCs from extra-cutaneous NECs (LHR+ = 14.8 ; 17.1 ; 38.9, respectively)<sup>5</sup>.

To conclude, SOX2 diffuse expression appears as a relevant marker to distinguish MCCs from other cutaneous skin tumors. By contrast, although more frequently observed in MCCs than

in extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas, SOX2 alone harbored a poor diagnostic performance in this setting.

### **RB1 expression is a surrogate marker of MCPyV status in MCC tumors**

To date, a standard reference test for MCPyV detection is still lacking and while immunohistochemical detection of the large T antigen has a modest sensitivity, MCPyV detection by real time PCR might detect episomal forms of the virus. Although controversial<sup>26</sup>, some previous studies demonstrated the association between immunohistochemical detection of RB1 loss and MCPyV-negative status<sup>17,27</sup>. Thus, we sought to determine whether RB1 detection might constitute a surrogate marker to determine MCPyV status in MCCs.

Using multimodal assay as gold standard for MCPyV status determination, RB1 expression was loss in all MCPyV-negative cases and was always preserved in MCPyV-positive cases, conferring to this antibody high sensitivity (100%) and specificity (100%) to determine MCPyV status (non-calculable LHR) (**Table 3/Supplementary Table 2**). Therefore, RB1 displayed at least similar performances than quantitative PCR (Sensitivity = 100%, Specificity = 90%, LHR+ = 9.7) and Ab3 immunohistochemistry detection (Sensitivity = 94%, Specificity = 100%, non-calculable LHR), which were higher than CM2B4 immunohistochemistry (Sensitivity = 70%, Specificity = 100%, non-calculable LHR). This also included detection of serum T-antigen antibodies (Sensitivity = 62%, Specificity = 97%, LHR+ = 17.9) for identification of MCC MCPyV-positive cases, when compared to the reference test by multimodal approach.

Accordingly in our series, Large T antigen expression was never detected by immunohistochemistry in RB1-negative cases (n=0/43, 0% and n=0/42, 0% with CM2B4 and Ab3 clones respectively). In contrast, the presence of virus was commonly detected in RB1-expressing MCC cases (large T antigen expression detection with Ab3 clone n=105/118, 92% and real time PCR n=106/118, 96%) (**Supplementary Table 3**). Blood circulating T antigens were mostly not detected in RB1-negative cases (n=4/37, 10%) whereas frequently detected in RB1-positive cases (n=53/91, 58%). Moreover, RB1-non expressing cases harbored prototypic features of MCPyV(-) MCCs<sup>35,36</sup> when compared to the others (**Supplementary Table 3**), more frequently localized on the head and neck region (p=0.009) and displaying more recurrent expression of TTF1 (n=11/39, 28% vs n=4/106, 4% in RB1-expressing cases MCC) (p<0.0001), Cytokeratin 7 (n=13/38, 40% vs n=6/104, 6%) (p<0.0001) and aberrant expression of TP53 (n=27/38, 71% vs n=3/99, 3%) (p<0.0001) probably reflecting a mutation of this gene.

In conclusion, these results suggest that the large majority of MCPyV-negative tumors in our cohort were associated with a loss of RB1 expression while RB1 was detectable in MCPyV-positive cases.

### **RB1, but not SOX2, is a relevant prognosis marker in MCCs.**

Determination of the MCPyV status might be relevant in current practice due to variations in follow-up strategies<sup>37,38</sup> and prognosis<sup>39,40</sup> between MCPyV-positive and negative tumors.

In our cohort, follow-up data were available for 85 MCC cases. Median duration of follow up was 25 months (ranges 1–265) with 59 recurrences and 50 deaths reported. Univariate

analysis revealed that RB1 loss was associated with an increased risk for both recurrence and specific death ( $p=0.003$  and  $p<0.001$  respectively) as shown in **Supplementary Tables 4 and 5/Figure 3**. Moreover, reduced recurrence free and specific survival was observed in male ( $p=0.045$  and  $p=0.05$ ) and older patients ( $p=0.039$  and  $p=0.003$ ).

Regarding multivariate analysis, covariates identified as potential confounders on cox univariate analysis i.e. age and sex (**Supplementary Table 4**) were included in the multivariate model. This analysis demonstrated that RB1 loss was independently associated with recurrence ( $p=0.032$ ) and specific death age ( $p=0.002$ )(**Supplementary Table 5**) confirming RB1 detection as a relevant prognosis marker.

## **Discussion**

In the present study, investigating SOX2 and RB1 expressions in 196 MCC cases, various primary cutaneous epithelial neoplasms and extra cutaneous neuroendocrine carcinomas, we identified diffuse SOX2 expression as a highly relevant tool to distinguish MCCs from other cutaneous tumors. As a matter of fact, SOX2 score 2 expression was observed in 92% of MCCs and only in 2% of non-MCC skin tumors (LHR+ of 58.7(19.1-180.4)). Furthermore, while SOX2 expression was more frequent in MCCs than in other neuroendocrine carcinomas, using this marker alone as a diagnostic tool appeared of moderate interest in this setting (sensitivity = 92%, specificity = 70% and LHR+= 3.04). Finally, we demonstrated RB1 loss of expression to be a performant surrogate marker to identify MCPyV(-) MCC cases in the current practice (sensitivity = 100%, specificity = 100%). Accordingly, RB1-non-expressing cases were associated with worse outcomes and lacked circulating T antigen antibodies in patient's blood, both features affecting patients management.

SOX2 (SRX-box transcription factor 2) is an intronless gene located on chromosome 3 (3q26.33) and encoding a member of the SRX-related HMG-box (SOX), belonging to the family of transcription factors involved in the regulation of embryonic development and in the determination of cell fate. Physiologically, SOX2 contributes to the pluripotency of embryonic stem cells and is involved in neural crest progenitor development<sup>41,42</sup>. As a matter of fact, experimental ectopic transduction of SOX2 together with 3 additional stem cell factors i.e. OCT3/4, KLF4 and C-MYC allows the dedifferentiation of fibroblasts into induced pluripotent stem cells<sup>43</sup>. In human skin, SOX2 expression is restricted to melanocytic and Merkel cell lineages<sup>41</sup>. Accordingly, in a transgenic mouse model, SOX2 knock-out results in a

remarkable decrease in Merkel cell number suggesting a crucial involvement of *Sox2* in Merkel cell specification<sup>15,44</sup>. Indeed, by binding to the enhancer region of target genes, *Sox2* induces expression of *Atoh1*, the master regulator of Merkel cell differentiation<sup>14</sup> and further activates transcription of *Isl1*, an additional factor contributing to this process<sup>15</sup>. Although being one of the earliest MC markers expressed in MC together with *Atoh1*, *Sox2* is additionally required for MC maturation notably regarding *Krt20* expression<sup>15</sup>.

Importantly, while close phenotypic similarities between MCC and Merkel cells initially led to the conclusion that one derives from the other, this theory is now regarded as doubtful and Merkel cell like features are thought to be acquired during MCC oncogenesis<sup>13,45–48</sup>. Indeed, ectopic expression of MCPyV T antigens in keratinocytes results in Merkel cell-like differentiation processes<sup>22</sup>. Accordingly, ectopic Large T Antigen expression in fibroblasts induced *ATOH1* transcription<sup>12</sup> probably through RB1 inactivation, while T antigens knock out results in reduced *SOX2* expression in MCC cell lines<sup>13</sup>. Therefore, such observations strongly suggested that T antigens in general and Large T especially via RB1 inhibition induce a Merkel cell-like process in tumor cells throughout hijacking the physiological MC differentiation process and activation of the *SOX2* and *ATOH1* genes.

In this context, immunohistochemical detection of the transcription factor network involved in MC differentiation and induced by the MCPyV oncoproteins might represent a relevant tool for MCC diagnosis. While poor performances observed for *ATOH1* immunohistochemical detection on FFPE tissues rules out its use as a diagnosis tool in current practice<sup>5</sup>, widespread expression of *SOX2*<sup>22,41</sup> and *ISL1*<sup>33</sup> in MCCs has already been acknowledged in

the literature. Accordingly, we demonstrated in this study high performances of both markers to distinguish MCCs from other skin tumors (Sensitivity = 91%, Specificity = 98%, LHR+ = 58.7 and Sensitivity = 95%, Specificity = 99%, LHR+ = 84.1). Indeed, while the use of Chromogranin A, Synaptophysin and CD56 is a rule to detect neuroendocrine differentiation in other organs, such markers harbored reduced specificity in the skin. Notably, expression of Chromogranin A and CD56 is observed in a large part of basal cell carcinoma<sup>49,50</sup> as well as in rare sweat glands tumor entities<sup>51-53</sup>. Therefore, the use of SOX2 and ISL1 appeared as relevant tools to identify MCCs in this context. To note, in accordance with previous reports<sup>31,34</sup> the transcription factor INSM1 was identified as the most performant tool to distinguish MCCs from other cutaneous epithelial tumors in our study. However, one squamous cell carcinoma case harbored a diffuse expression of this marker (**Supplementary Figure 5**) demonstrating the interest of an immunohistochemical panel for MCC identification.

Although MCCs must be distinguished from other skin primary tumors<sup>3,7</sup>, the metastasis of an extra cutaneous NEC remains one additional MCC differential diagnosis in the current practice<sup>5</sup>. In a previous study, we identified SATB2 and neurofilament, in addition to the classical MCC marker CK20, as highly relevant tools in this setting<sup>5</sup>. By contrast, although reduced expression frequencies of SOX2 was observed in extra cutaneous NECs in comparison with MCCs, this marker harbored low diagnostic performances in this setting (LHR+ = 3.04). Indeed, SOX2 appears to be involved in the oncogenesis of other extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas including small cell lung cancers and prostatic neuroendocrine carcinomas<sup>23,54,55</sup>. Importantly, as previously described in MCCs, RB1

inactivation appears as a hallmark of small cell lung cancers<sup>56</sup> and contributes to the acquisition of the neuroendocrine phenotype in this setting with SOX2 contributing to this process<sup>55,57</sup>.

RB1 inactivation is a hallmark of both MCPyV-positive and -negative MCC tumors<sup>9-11,25</sup>. Indeed, while inactivating mutation/ loss of heterozygosity are observed in MCPyV-negative cases<sup>9-11,17</sup>, sequestration of RB1 by the large T antigen is crucial for cell proliferation maintenance in MCPyV-positive cases<sup>25,58</sup>. Importantly, large T sequestration inactivates RB1 without the destruction of the protein as confirmed in our study<sup>25</sup>. By contrast, although controversial<sup>26</sup>, loss of RB1 is observed in MCPyV-negative MCCs suggesting RB1 as a potential marker for MCPyV determination status in current practice<sup>28</sup>. Distinction between MCPyV-positive and negative tumors is clinically relevant in daily practice to adapt the follow-up strategy<sup>37,39</sup>. Although controversial<sup>59</sup>, MCPyV-negative cases are probably associated with worse outcomes<sup>39</sup> and therefore require more intensive follow-up<sup>37</sup>. Furthermore, blood detection of circulating T antigens targeting antibodies has been identified as a relevant tool in MCPyV-positive cases<sup>38,60</sup> and is now available in several countries. However, standards for MCPyV determination are not yet well established<sup>61</sup> and while PCR might lack specificity by detecting the wild type episomal form of the virus, immunohistochemistry using the CM2B4 antibody can also lack sensitivity<sup>61,62</sup> as shown in this series. Therefore, in the present paper we showed that RB1 immunohistochemical detection was a relevant tool for MCPyV status determination in MCCs, highly correlating with the outcome and detection of T antigen targeting antibodies in patient's serum. To note, although a perfect association between RB1 loss and MCPyV negative status was



observed in this study, homozygous RB1 deletion has been previously described in one MCPyV-positive case<sup>63</sup>, and we further recently observed one MCPyV-negative MCC tumor with preserved RB1 expression (personal observation).

To conclude, based on recent advances in MCC biology understanding, we identified SOX2 as a relevant MCC diagnosis marker to distinguish MCCs from other epithelial skin tumors. Moreover, immunohistochemical detection of RB1 loss appeared as a valid surrogate immunohistochemical marker to predict the MCPyV status of MCCs.

**Table 1.** Expression of SOX2, RB1 and the established MCC markers Chromogranin A, CK20, INSM1, ISL1, NF, SATB2, Synaptophysin in MCC and non-MCC cutaneous tumors.

Markers	MCC (n=196)	Non-MCC cutaneous tumors (n=233)	p*	ORR (95 CI%)	Se	Sp	LHR(+) (95% CI)
<b>SOX2</b>			<0.0001	621 (178-3884)	91%	98%	58.7 (19.1-180.4)
Negative	6 (3%)	157 (81%)					
Focal (<50% cells)	10 (5%)	33 (17%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	165 (92%)	3 (2%)					
Uninterpretable cases	33	40					
<b>RB1</b>			<0.0001	0.32 (0.17-0.57)	70%	12%	0.8 (0.7-0.9)
<u>Negative</u>	52 (30%)	22 (12%)					
Positive	122 (70%)	161 (88%)					
Uninterpretable cases	40	50					
<b>Chromogranin A</b>			<0.0001	23 (13-43)	80%	85%	5.6 (3.9-8.2)
Negative	7 (4%)	141 (80%)					
Focal (<50% cells)	30 (16%)	11 (6%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	145 (80%)	25 (14%)					
Uninterpretable cases	32	56					
<b>Synaptophysin</b>			<0.0001	156 (64-448)	86%	96%	22.5 (10.8-46.6)
Negative	24 (13%)	175 (96%)					
Focal (<50% cells)	56 (31%)	7 (4%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	99 (55%)	0					
Uninterpretable cases	35	51					
<b>INSM1</b>			<0.0001	714 (118-16384)	81%	99%	141 (20-998)
Negative	5 (3%)	173 (99%)					
Focal (<50% cells)	28 (16%)	0					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	142 (81%)	1 (1%)					
Uninterpretable cases	39	59					
<b>ISL1</b>			<0.0001	1593 (336-16384)	95%	99%	84.1 (21-333)
Negative	5 (2.5%)	168 (95%)					
Focal (<50% cells)	4 (2.5%)	8 (4%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	173 (95%)	1 (1%)					
Uninterpretable cases	32	56					
<b>Cytokeratin 20</b>			<0.0001	-	91%	100%	-
Negative	17 (9%)	175 (100%)					
<u>Positive</u>	178 (91%)	0					
Isolated merkel cells	-	3					
Uninterpretable cases	19	55					
<b>Neurofilament</b>			<0.0001	-	80%	100%	-
Negative	39 (20%)	179 (100%)					
<u>Positive</u>	154 (80%)	0 (0%)					
Uninterpretable cases	21	54					
<b>SATB2</b>			<0.0001	-	68%	100%	-
Negative	24 (13%)	175 (98%)					
Focal (<50% cells)	36 (19%)	3 (2%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	129 (68%)	0					
Uninterpretable cases	25	55					

Results are expressed in number and percentages of interpretable cases. Categories used for sensitivity and specificity calculation are underlined in the table. Positive likelihood ratio could not be determined for CK20, NF and SATB2 expression. CK20 Cytokeratin 20, INSM1 Insulinoma-associated protein 1, ISL1 Insulin gene enhancer protein, NF neurofilament, ORR: Odd ratio RB1 Retinoblastoma 1, SATB2 Special AT-rich sequence-binding protein 2, Se: Sensitivity, Sp: Specificity, SOX2 SRY-box transcription factor 2 \* Fisher's exact test.

**Table 2.** Expression of SOX2, RB1 and the established MCC markers Chromogranin A, CK20, INSM1, ISL1, NF, SATB2, Synaptophysin in MCC and extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas.

Markers	MCC (n=196)	Extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas (n=70)	p*	ORR (95% CI)	Se	Sp	LHR(+) (95% CI)
<b>SOX2</b>			<0.0001	23 (10-57)	92%	70%	3.1 (1.9-4.6)
Negative	6 (3%)	22 (44%)					
Focal (<50% cells)	10 (5%)	13 (26%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	165 (92%)	15 (30%)					
Uninterpretable cases	33	20					
<b>RB1</b>			<0.0001	3.9 (2-8)	70%	63%	1.9 (1.3-2.7)
<u>Negative</u>	52 (30%)	32 (63%)					
Positive	122 (70%)	19 (37%)					
Uninterpretable cases	40	19					
<b>Chromogranin A</b>			<0.0001	4.05 (2-8)	96%	24%	1.3 (1.1-1.5)
Negative	7 (4%)	13 (24%)					
<u>Focal (&lt;50% cells)</u>	30 (6%)	14 (26%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	145 (80%)	26 (50%)					
Uninterpretable cases	32	17					
<b>Synaptophysin</b>			0.81	0.81 (0.25-2.2)	87%	11%	1.0 (0.9-1.1)
Negative	24 (13%)	6 (10%)					
<u>Focal (&lt;50% cells)</u>	56 (31%)	16 (30%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	99 (55%)	32 (60%)					
Uninterpretable cases	35	16					
<b>INSM1</b>			0.014	3.6 (1-7)	81%	46%	1.5 (1.1-1.9)
Negative	5 (3%)	6 (12%)					
<u>Focal (&lt;50% cells)</u>	28 (16%)	16 (33%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	142 (81%)	26 (55%)					
Uninterpretable cases	39	22					
<b>ISL1</b>			<0.0001	48 (18-142)	95%	72%	3.4 (2.1-5.4)
Negative	5 (2,5%)	22 (47%)					
<u>Focal (&lt;50% cells)</u>	4 (2,5%)	12 (26%)					
<u>Diffuse (&gt;50% cells)</u>	173 (95%)	13 (27%)					
Uninterpretable cases	32	23					
<b>Cytokeratin 20</b>			<0.0001	152 (48-659)	91%	94%	14.8 (5.7-38.4)
Negative	17 (9%)	61 (94%)					
<u>Positive</u>	178 (91%)	4 (6%)					
Uninterpretable cases	19	5					
<b>Neurofilament</b>			<0.0001	78 (23-411)	80%	95%	17.1 (5.6-51.5)
Negative	39 (20%)	61 (95%)					
Positive	154 (80%)	3 (5%)					
Uninterpretable cases	21	6					
<b>SATB2</b>			<0.0001	118 (19-4736)	68%	98%	38.9 (5.5-272.1)
Negative	24 (13%)	46 (80%)					
Focal (<50% cells)	36 (19%)	10 (18%)					
<u>Diffuse (&gt;50%)</u>	129 (68%)	1 (2%)					
Uninterpretable cases	25	13					

Results are expressed in percentages of interpretable cases. Categories used for sensitivity and specificity calculation are underlined in the table.

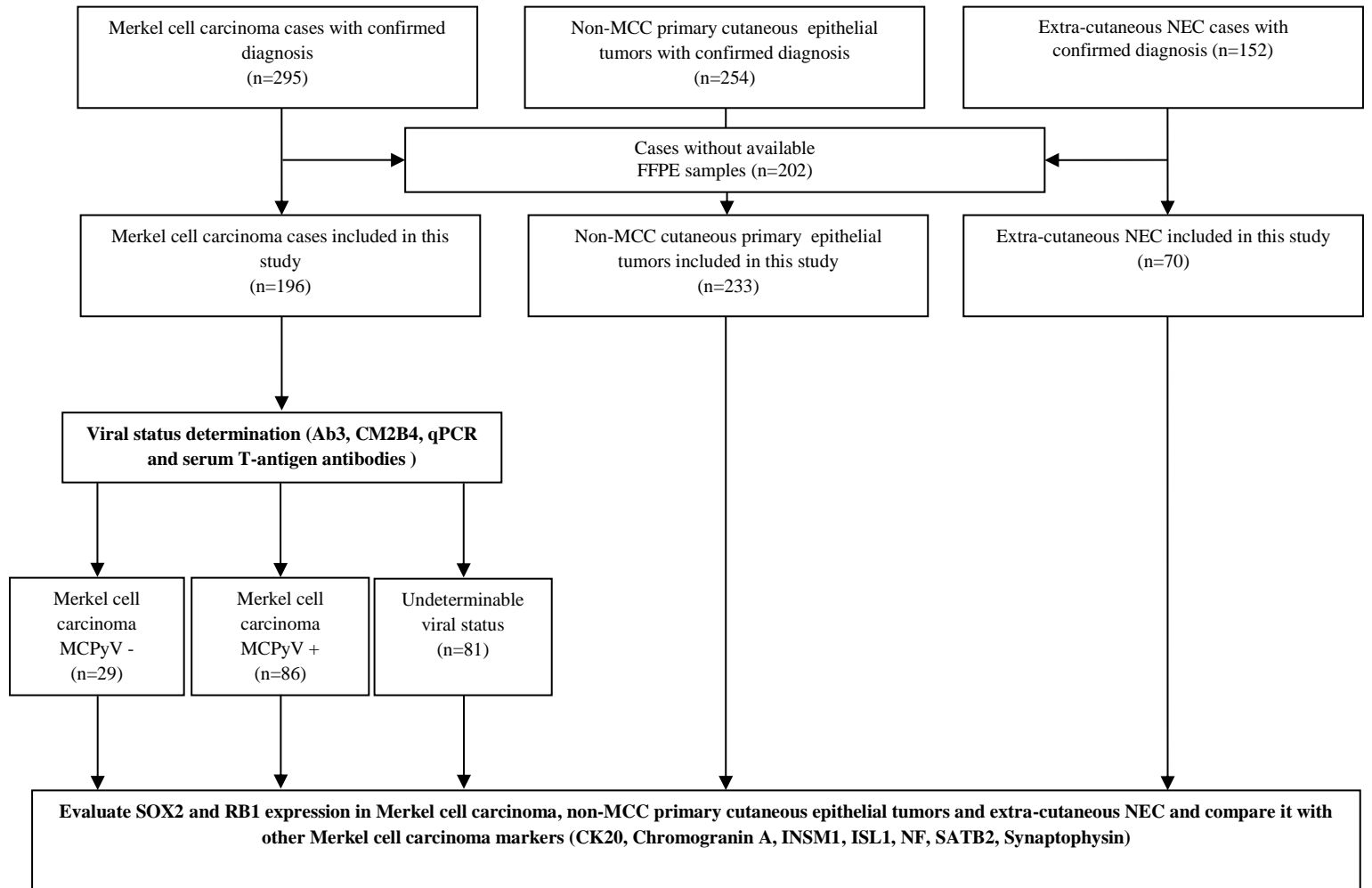
CK20 Cytokeratin 20, INSM1 Insulinoma-associated protein 1, ISL1 Insulin gene enhancer protein, NF neurofilament, ORR: Odd ratio RB1 Retinoblastoma 1, SATB2 Special AT-rich sequence-binding protein 2, Se: Sensitivity, SOX2 SRY-box transcription factor 2, Sp: Specificity. \* Fisher's exact test. Details regarding RB1 and SOX2 expression according to the histologic subtypes are available in Supplementary Table 1.

**Table 3.** Performances of five assays to determine MCPyV status in Merkel cell carcinoma.

	<b>MCPyV-positive (n=86)</b>	<b>MCPyV-Negative (n=29)</b>	<b>Total, n</b>	<b>Se</b>	<b>Sp</b>	<b>LHR</b>
<b>MCPyV genome detection (qPCR)</b>				1.00	0.90	9.7 (3.3-28.2)
Positive	83 (100%)	3 (10%)	83			
Negative	0 (0%)	26 (90%)	32			
Uninterpretable cases	0	0	0			
<b>Large T Antigen detection (CM2B4)</b>				0.70	1.00	-
Positive	60 (70%)	0	60			
Negative	26 (30%)	29 (100%)	55			
Uninterpretable cases	0	0	0			
<b>Large T Antigen detection (Ab3)</b>				0.94	1.00	-
Positive	81 (94%)	0	81			
Negative	5 (6%)	29 (100%)	34			
Uninterpretable cases	0	0	0			
<b>Serology (T antigens antibodies titer)</b>				0.62	0.97	17.9 (2.6-123.5)
<1/100	33 (38%)	28 (97%)	61			
>1/100	53 (62%)	1 (3%)	54			
Uninterpretable cases	0	0	0			
<b>RB1</b>				1.00	1.00	-
Positive	81 (100%)	0	81			
Negative	0	28 (100%)	28			
Uninterpretable cases	5	1	6			

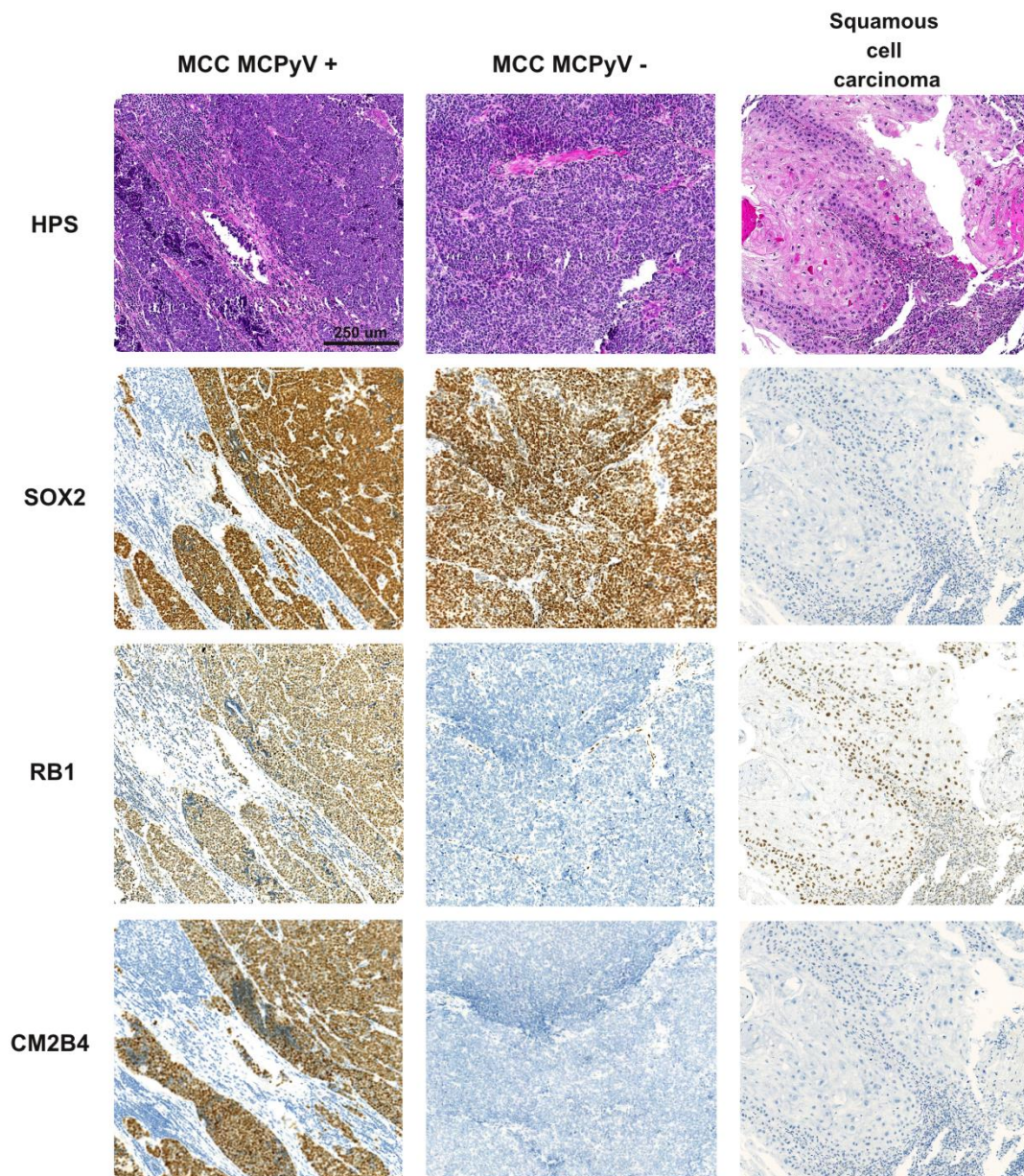
The multimodal approach was used as gold standard. Only cases with results available for the four assays (qPCR, AB3, CM2B4, Serology) were included in this analysis. Results are expressed in number and percentages of interpretable cases. Categories used for sensitivity and specificity calculation are underlined in the table. Positive likelihood ratio could not be determined for RB1. qPCR quantitative polymerase chain reaction, RB1 Retinoblastoma 1, Se: Sensitivity, Sp: Specificity, SOX2 SRY-box transcription factor 2 a Fisher's exact test.

**Figure 1. Flow of cases in the study**



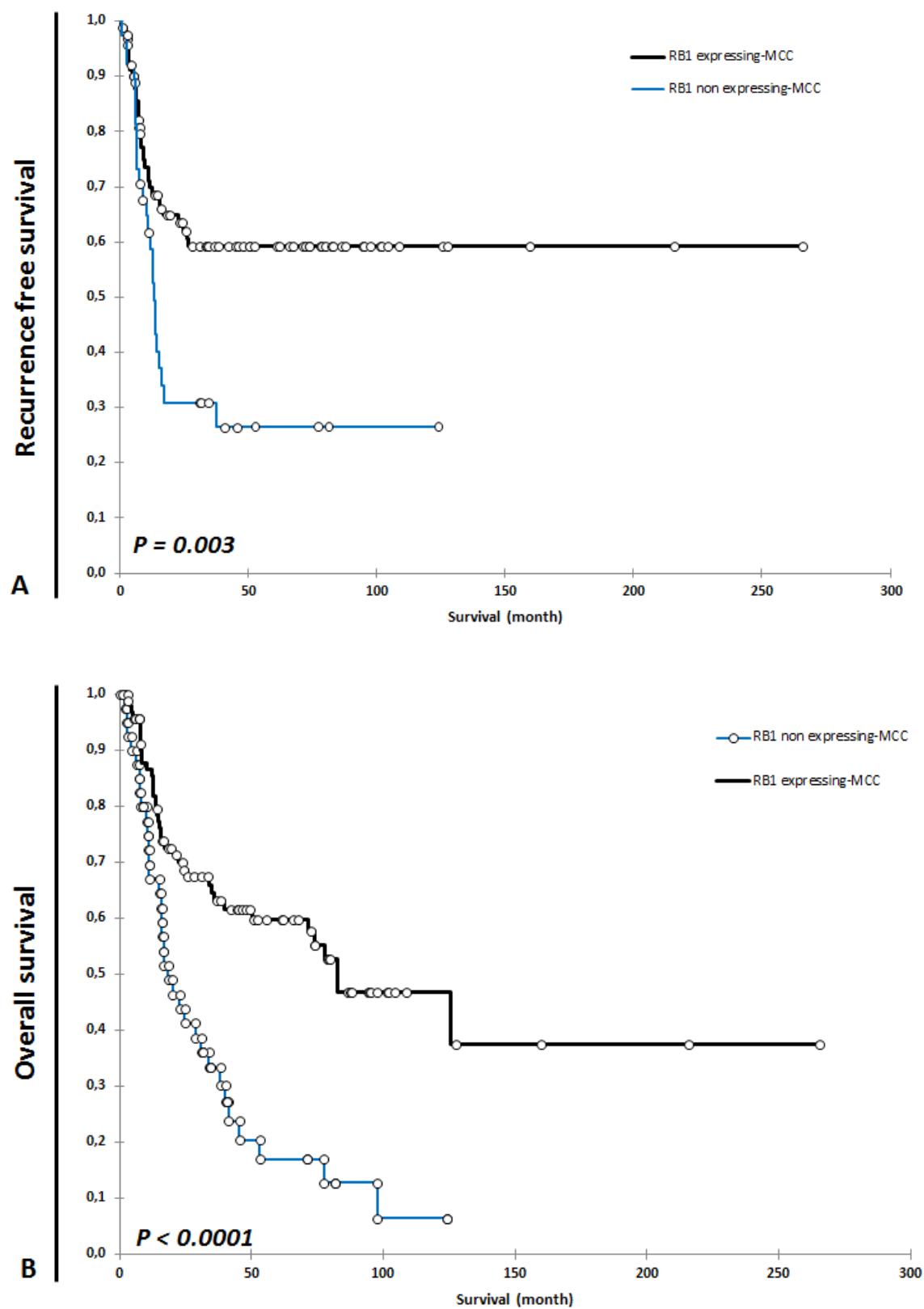
Non MCC skin tumors and extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas cohorts are detailed in Supplementary Table 1. Chromogranin A, Cytokeratin 20 (CK20), Insulinoma-associated protein 1 (INSM1), Insulin gene enhancer protein (ISL1), Neurofilament (NF), SRY-box transcription factor 2 (SOX2), Synaptophysin, Retinoblastoma 1 (RB1). MCPyV : Merkel cell polyomavirus MCC : Merkel cell carcinoma NEC : Neuroendocrine carcinoma qPCR : quantitativ polymerase chain reaction LTA g : large T antigen

**Figure 2.** Representative illustration of SOX2, RB1 and Large T antigen expression in Merkel cell carcinoma and in other cutaneous tumors.



Two Merkel cell carcinoma and a well differentiated squamous cell carcinoma are depicted

**Figure 3.** Kaplan-Meier survival curves in the RB1 expressing- and non expressing-MCC populations.  
**A.** Recurrence-free survival **B.** Overall survival



## **Supplementary Material**

**Supplementary Method Table 1.** Antibodies and dilutions used for immunohistochemistry.

**Supplementary Table 1.** Expression of SOX2 and RB1 characterized by immunohistochemistry in non MCC skin tumors and in extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas.

**Supplementary Table 2.** SOX2 and RB1 expression in MCPyV+ and MCPyV- MCC and their comparison with classical MCC markers.

**Supplementary Table 3.** Clinical, immunohistochemical and virological features of RB1-non expressing and RB1 expressing MCC cases

**Supplementary Table 4.** Univariate Cox analysis.

**Supplementary Table 5.** Multivariate COX analysis

**Supplementary Figure 1.** Immunohistochemical and Western Blot detection of Large T in one out three cases with negative CM2B4 immunostaining but with Ab3 expression.

**Supplementary Figure 2.** Representative illustration of immunostainings in a MCPyV (+) MCC.

**Supplementary Figure 3.** Representative illustration of SOX2 score 1 expression in the non-MCC tumors cohort.

**Supplementary Figure 4.** Representative illustration of ISL1 expression in our cohort.

**Supplementary Figure 5.** Representative illustration of INSM1 expression in our cohort.



**Supplementary Method Table 1.** Antibodies and dilutions used for immunohistochemistry.

Antigen	Clone	Provider	Dilution
Chromogranin A	LK2H10	ZYTOMED	1:400
CK7	M7018	Dako	1:200
CK20	M7019	Dako	1:100
INSM1	A-8	Clinisciences	1:150
ISL1	EP283	BioSB	Prediluted
Large T antigen	CM2B4	Santa Cruz	1:50
Large T antigen	Ab3	Abcam	1:1600
NF	2F11	Dako	1:100
p53	DO-07	Dako	1:50
RB	13A10	Leica	1:50
SATB2	SATBA4B10	Diagomics	1:50
SOX2	SP76	CELL MARQUE	Prediluted
Synaptophysin	DAK-SYNAP	DAKO	1:50
TTF-1	SP141	Roche	Prediluted

CK: cytokeratin, INSM1: Insulinoma-associated protein 1, ISL1: Insulin gene enhancer protein LTag: large T-antigen, NF: neurofilament, RB: Retinoblastoma, SATB2: special AT-rich sequence-binding protein 2, SOX2: SRY-box transcription factor 2, TTF-1: thyroid transcription factor 1

**Supplementary Table 1.** Expression of SOX2 and RB1 characterized by immunohistochemistry in non MCC skin tumors and in extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas.

Non-MCC primary epithelial tumors (n=233)	SOX2 expression				RB1 expression		
	Score 0	Score 1	Score 2	Unavailable data	Loss	Preserved	Unavailable data
<b>Squamous cell carcinoma (n=86)</b>	46 (64%)	23 (32%)	3 (4%)	14	14 (20%)	54 (80%)	18
In situ/ Bowen's disease (n=20)	11 (69%)	4 (25%)	1(6%)	4	10 (63%)	6 (37%)	4
Well differenciaded (n=26)	15 (71%)	4 (19%)	2 (10%)	5	0	22 (100%)	4
Moderately differenciaded (n=12)	6 60%)	4 (40%)	0	2	1 (10%)	9 (90%)	2
Poorly differenciaded (n=28)	14 (56%)	11 (44%)	0	3	3 (15%)	17 (85%)	8
<b>Basal cell carcinoma (n=48)</b>	31 (86%)	5 (14%)	0	12	2 (6%)	34 (94%)	12
Superficial (n=5)	4 (80%)	1 (20%)	0	0	0	5 (100%)	0
Nodular (n=20)	11 (73%)	4 (27%)	0	5	0	15 (100%)	5
Infiltrative (n=22)	15 (100%)	0	0	7	2 (13%)	13 (87%)	7
Sclerodermiform (n=1)	1 (100%)	0	0	0	0	1 (100%)	0
<b>Tumors with follicular differentiation (n=32)</b>							
Trichoblastoma (n=10)	2 (25%)	6 (75%)	0	2	0	8 (100%)	2
Trichoepithelioma (n=7)	7 (100%)	0	0	0	0	7 (100%)	0
Trichilemmoma (n=5)	5 (100%)	0	0	0	0	5 (100%)	0
Proliferating pilar tumor (n=4)	3 (100%)	0	0	1	0	3 (100%)	1
Pilomatrixoma (n=5)	3 (100%)	0	0	2	0	3 (100%)	2
Pilomatrical carcinoma (n=1)	1 (100%)	0	0	0	0	1 (100%)	0
<b>Tumors with sebaceous differentiation (n=11)</b>							
Sebaceous adenoma (n=9)	8 (100%)	0	0	1	0	8 (100%)	1
Sebaceous carcinoma (n=2)	2 (100%)	0	0	0	2 (100%)	0	0
<b>Tumors with eccrine/apocrine differentiation (n=56)</b>							
Hidradenoma (n=10)	9 (100%)	0	0	1	1 (11%)	8 (89%)	1
Spiradenoma (n=11)	10 (100%)	0	0	1	0	10 (100%)	1
Cylindroma (n=2)	2 (100%)	0	0	0	0	2 (100%)	0
Paget's disease (n=6)	6 (100%)	0	0	0	1 (17%)	5 (83%)	0
Poroma (n=12)	10 (100%)	0	0	2	0	10 (100%)	2
Chondroid syringoma (n=3)	2 (100%)	0	0	1	0	2 (100%)	1
Myoepithelioma (n=3)	3 (100%)	0	0	0	0	3 (100%)	0
Porocarcinoma (n=3)	3 (100%)	0	0	0	2 (67%)	1 (33%)	0
Adenoid cystic carcinoma (n=2)	2 (100%)	0	0	0	0	2 (100%)	0
Microcystic sweat gland carcinoma (n=1)	1 (100%)	0	0	0	0	1 (100%)	0
Sweat gland carcinoma NOS (n=3)	1 (100%)	0	0	2	0	1 (100%)	2
<b>Extra-cutaneous NEC (n=70)</b>	SOX2 Expression				RB1 expression		
	Score 0	Score 1	Score 2	Unavailable data	Loss	Preserved	Unavailable data
<b>Large cell neuroendocrine carcinoma (n=36)</b>							
Lung (n=27)	7 (30%)	8 (35%)	8 (35%)	4	23 (92%)	2 (8%)	2
Digestive (n=9)	4 (80%)	1 (20%)	0	4	2 (40%)	3 (60%)	4
<b>Small cell neuroendocrine carcinoma (n=34)</b>							
Lung (n=15)	4 (50%)	2 (25%)	2 (25%)	7	6 (60%)	4 (40%)	5
Digestive (n=8)	2 (50%)	2 (50%)	0	4	0	2 (100%)	6
Lower Gynecologic tract (n=4)	2 (67%)	0	1 (33%)	1	1 (50%)	1 (50%)	2
Urinary tract (n=7)	2 (33%)	0	4 (67%)	2	4 (80%)	1 (20%)	3

**Supplementary Table 2.** SOX2 and RB1 expression in MCPyV+ and MCPyV- MCC and their comparison with classical MCC markers.

Markers	MCPyV(-) MCC (n=29)	MCPyV(+) MCC (n=86)	p <sup>a</sup>
<b>SOX2</b>			0.25
Negative	0	2 (2.5%)	
Focal (<50% cells)	2 (7%)	3 (3.5%)	
Diffuse (>50% cells)	26 (93%)	80 (94%)	
Uninterpretable cases	1	1	
<b>RB1</b>			<0.0001
Negative	28 (100%)	0 (0%)	
Positive	0	81 (100%)	
Uninterpretable cases	1	5	
<b>Chromogranin A</b>			0.19
Negative	2 (7%)	1 (1%)	
Focal (<50% cells)	7 (25%)	15 (17%)	
Diffuse (>50% cells)	19 (68%)	70 (82%)	
Uninterpretable cases	1	0	
<b>Synaptophysin</b>			0.53
Negative	5 (17%)	10 (12%)	
Focal (<50% cells)	10 (34%)	27 (32%)	
Diffuse (>50% cells)	14 (49%)	47 (56%)	
Uninterpretable cases	0	2	
<b>INSM1</b>			0.02
Negative	2 (7%)	0 (0%)	
Focal (<50% cells)	8 (27%)	11 (13%)	
Diffuse (>50% cells)	19 (66%)	72 (87%)	
Uninterpretable cases	0	3	
<b>ISL1</b>			0.05
Negative	1 (3%)	1 (1%)	
Focal (<50% cells)	2 (7%)	0	
Diffuse (>50% cells)	26 (90%)	84 (99%)	
Uninterpretable cases	0	1	
<b>CK20</b>			0.71
Negative	3 (10%)	7 (8%)	
Positive	26 (90%)	77 (92%)	
Uninterpretable cases	0	2	
<b>NF</b>			0.009
Negative	10 (34%)	10 (12%)	
Positive	19 (66%)	75 (88%)	
Uninterpretable cases	0	1	
<b>SATB2</b>			0.02
Negative	6 (21%)	4 (5%)	
Focal (<50% cells)	6 (21%)	11 (13%)	
Diffuse (>50% cells)	17 (58%)	70 (82%)	
Uninterpretable cases	0	1	

Results are expressed in percentages of interpretable cases.

CK20 Cytokeratin 20, INSM1 Insulinoma-associated protein 1, ISL1 Insulin gene enhancer protein, NF neurofilament, RB1 Retinoblastoma 1, SATB2 Special AT-rich sequence-binding protein 2, SOX2 SRY-box transcription factor 2.

<sup>a</sup> Fisher's exact test

**Supplementary Table 3.** Clinical, immunohistochemical and virological features of RB1-non expressing and RB1 expressing MCC cases

	RB1 non expressing- MCC (n=45)	RB1 expressing- MCC (n=118)	p*	Total, n (n=163)
<b>Clinical features</b>				
<b>Age (median, Q1-Q4)</b>	81 (78-87)	76 (68-84)		
<b>Sex (F/M)</b>	25/20 (56%/44%)	64/44 (59%/41%)	0.85	153
Unavailable data		10		10
<b>Anatomic site</b>			0.009	
Head and neck	21 (61%)	25 (29%)		46
Trunk	1 (3%)	3 (3%)		4
Upper limb	4 (12%)	15 (18%)		19
Lower limb	8 (24%)	42 (50%)		50
Unavailable data	11	33		44
<b>AJCC stage</b>			0.76	
I	10 (25%)	24 (24%)		34
II	13 (32%)	40 (40%)		53
III	16 (40%)	31 (31%)		47
IV	1 (3%)	4 (5%)		5
Unavailable data	5	19		24
<b>Immunohistochemical features</b>				
<b>Cytokeratin 20</b>			0.37	
positive	39 (87%)	104 (92%)		143
negative	6 (13%)	9 (8%)		15
Uninterpretable cases	0	5		5
<b>Cytokeratin 7</b>			<0.0001	
positive	13 (40%)	6 (6%)		19
negative	25 (60%)	98 (94%)		123
Uninterpretable cases	7	14		21
<b>TTF1</b>			<0.0001	
positive	11 (28%)	4 (4%)		15
negative	28 (72%)	102 (96%)		130
Uninterpretable cases	6	12		18
<b>TP53</b>			<0.0001	
positive	11 (29%)	96 (97%)		107
negative or overexpressed	27 (71%)	3 (3%)		30
Uninterpretable cases	7	19		26
<b>Virological features</b>				
<b>MCPyV genome detection (qPCR)</b>			<0.0001	
Positive	5 (12%)	106 (96%)		111
Negative	35 (88%)	5 (4%)		40
Uninterpretable cases	5	7		12
<b>Large T Antigen detection (CM2B4)</b>			<0.0001	
positive	0	83 (74%)		83
negative	43 (100%)	28 (26%)		71
Uninterpretable cases	2	7		9
<b>Large T Antigen detection (Ab3)</b>			<0.0001	
positive	0	108 (96%)		108
negative	42 (100%)	6 (4%)		48
Uninterpretable cases	3	4		7
<b>Serology (T Antigen Antibody titer)</b>			<0.0001	
<1/100	33 (90%)	38 (42%)		71
>1/100	4 (10%)	53 (58%)		57
Unavailable data	8	27		35

Results are expressed in percentages of interpretable cases. *AJCC* American Joint Committee on Cancer, *qPCR* quantitative polymerase chain reaction, *RB1* Retinoblastoma 1, *TTF-1* thyroid transcription factor 1

<sup>a</sup> Fisher's exact test

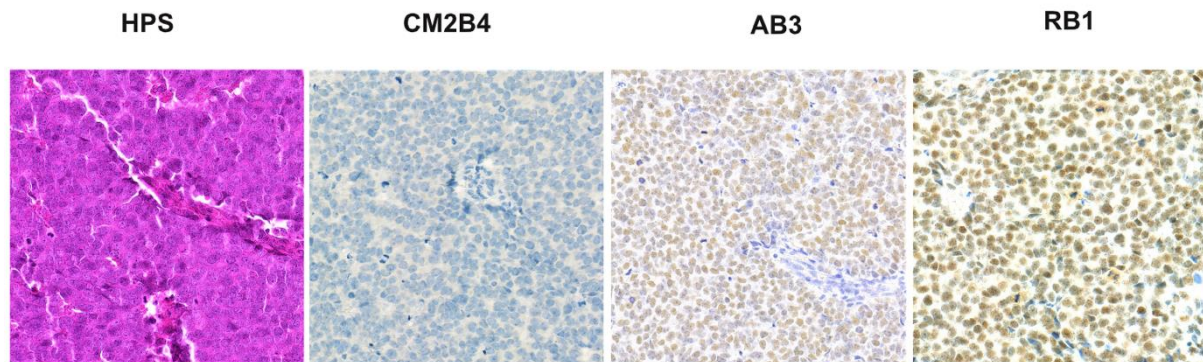
**Supplementary Table 4.** Univariate Cox analysis

Univariate Cox Covariate	Recurrence		Death	
	Adjusted HR 95%	<i>P</i>	Adjusted HR 95%	<i>P</i>
Age, ≥ 78 years vs < 78 years	<b>1.72 (1.03-2.90)</b>	<b>0.039</b>	<b>2.4 (1.34-4.28)</b>	<b>0.003</b>
Sex, male vs female	<b>1.69 (1.01-2.82)</b>	<b>0.045</b>	1.7 (1.01-3.03)	0.05
Performance status, 2-3 vs 0-1	1.3 (0.59-2.98)	0.515	1.8 (0.86-3.935)	0.117
AJCC Stage, 3-4 vs 1-2	0.9 (0.54-1.59)	0.79	1.2(0.70-2.17)	0.469
Immunosuppression, yes vs no	1.2 (0.66-2.35)	0.49	1.7 (0.89-3.26)	0.109
RB1, positive vs negative	<b>0.5 (0-0.786)</b>	<b>0.003</b>	<b>0.356 (0-0.621)</b>	<b>0.0003</b>

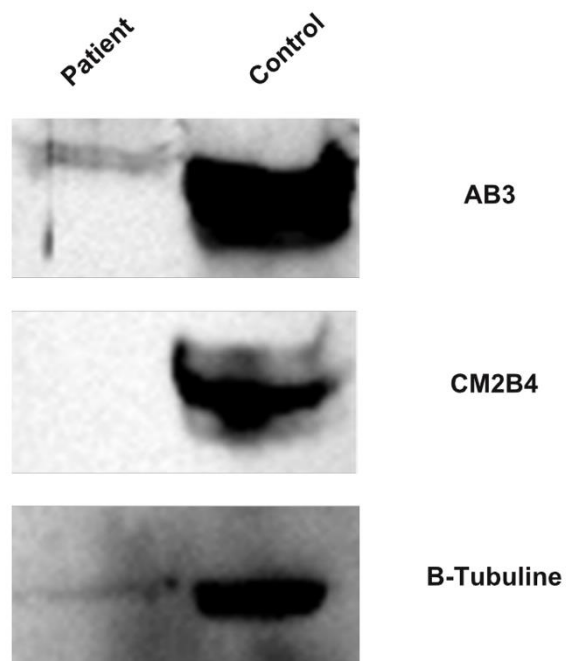
**Supplementary Table 5.** Multivariate COX analysis

Multivariate COX	Recurrence		Death	
	Adjusted HR (95% CI)	<i>P</i>	Adjusted HR (95% CI)	<i>P</i>
Age, ≥ 78 years vs < 78 years	1.66 (0.98-2.79)	0.059	1.56 (0.88-2.75)	<b>0.005</b>
Sex, male vs female	1.53 (0.90-2.59)	0.116	1.56 (0.89-2.75)	0.12
RB1, positive vs negative	<b>0.56 (0-0.95)</b>	<b>0.032</b>	0.42 (0-0.73)	<b>0.002</b>

**A**

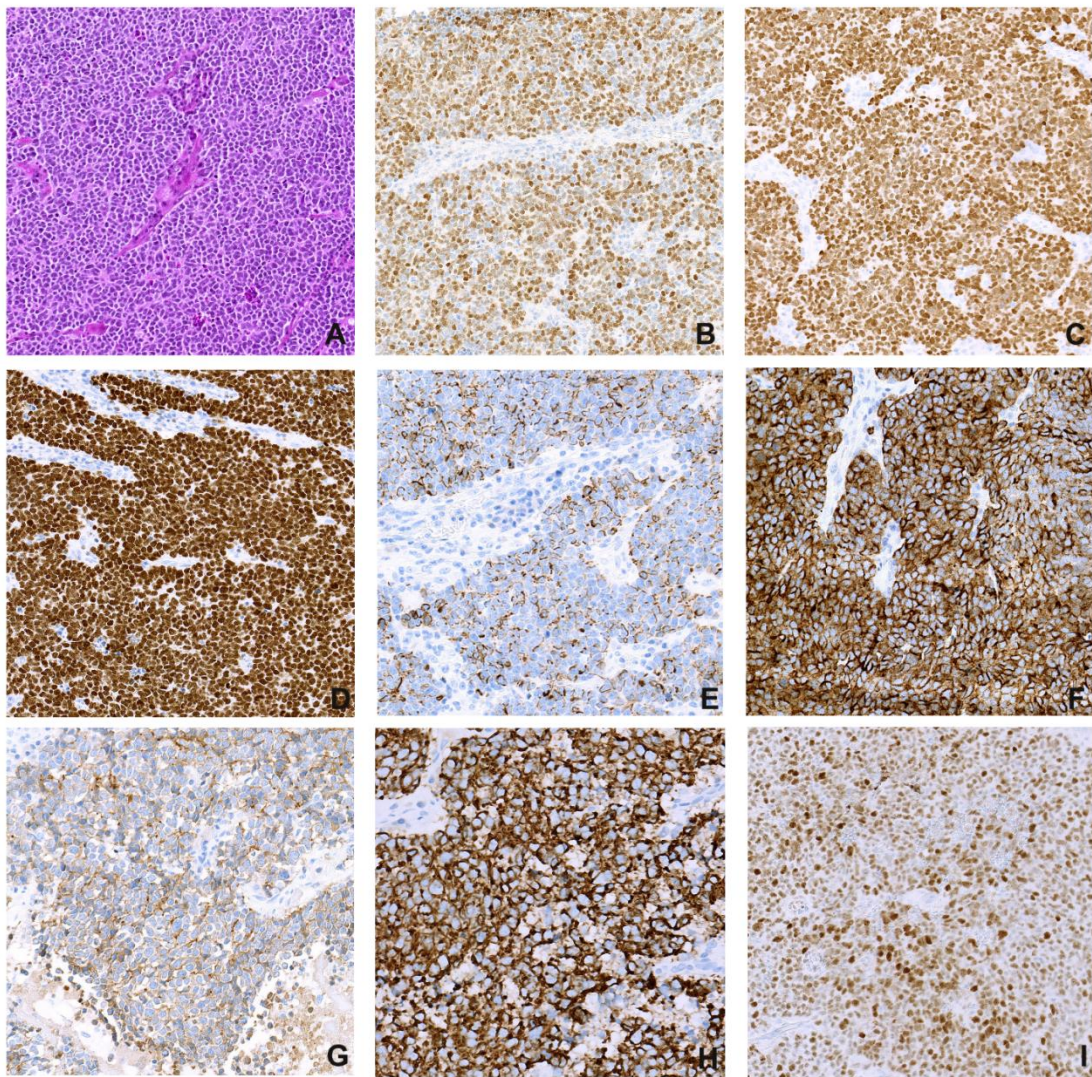


**B**



**Supplementary Figure 1.** Immunohistochemical (**A**) and Western Blot (**B**) detection of Large T in one out three cases with negative CM2B4 immunostaining but with Ab3 expression. **A** Immunohistochemical analysis of large T (Ab3 and CM2B4) and RB1 expression. **B** Western Blot analysis of Large T detection. Control refers to a Peta MCPyV(+) MCC cell lineage.





**Supplementary Figure 2.** Representative illustration of immunostainings in a MCPyV (+) MCC.

**A** HPS **B** INSM1 **C** ISL1 **D** SATB2 **E** NF **F** Chromogranin A **G** Synaptophysin **H** CK20 **I** CM2B4 stainings are depicted.

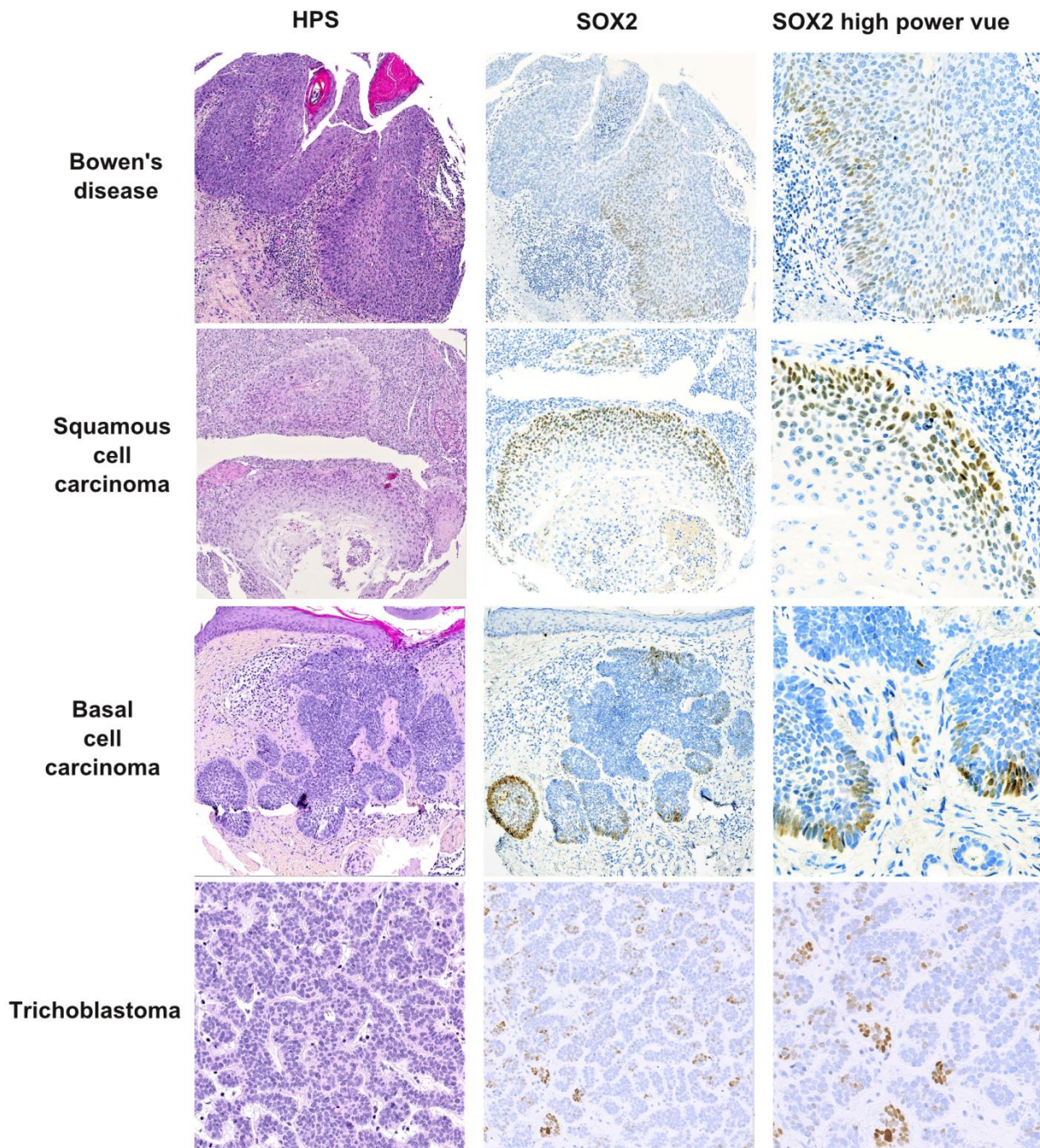
Diffuse intense nuclear INSM1, ISL1 and SATB2 expression was observed.

Diffuse or heterogeneous cytoplasmic Chromogranin A and Synaptophysin expression was evidenced.

Heterogeneous nuclear CM2B4 expression was highlighted.

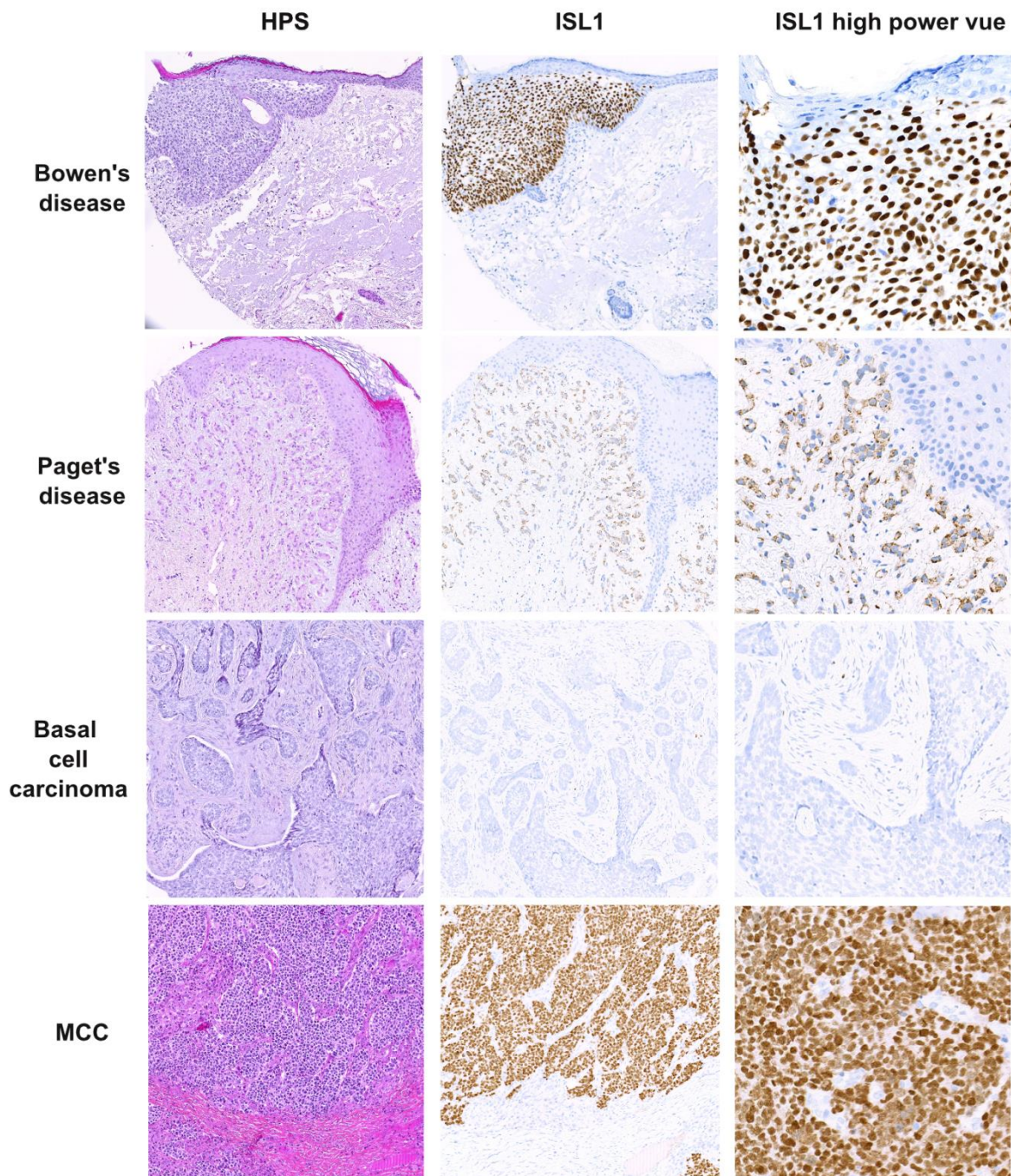
Diffuse dot-like expression Cytokeratin 20 and Neurofilament was detected.





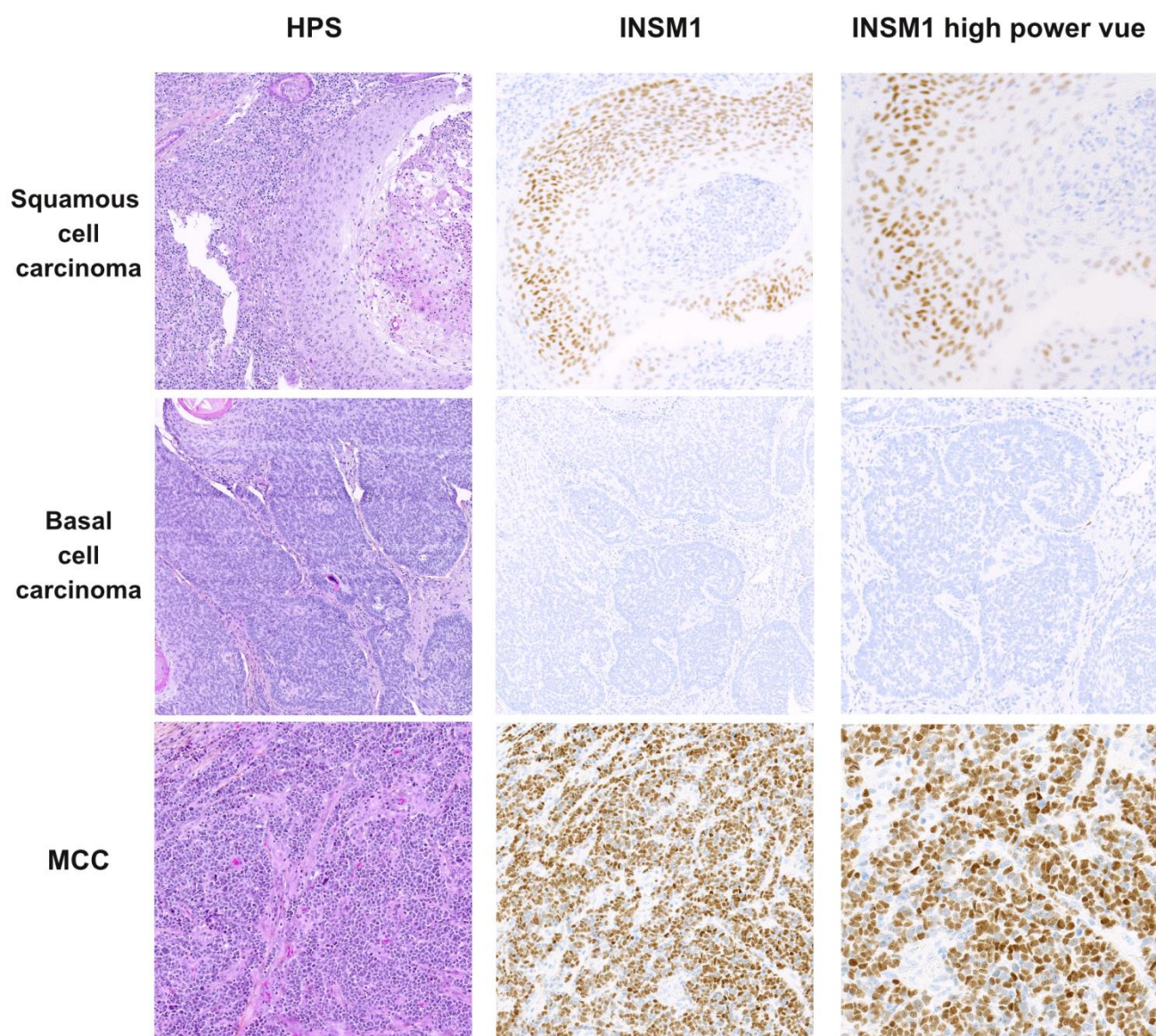
**Supplementary Figure 3.** Representative illustration of SOX2 score 1 expression in the non-MCC tumors. Patchy or focal expression was observed in cases of Bowen's disease, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma and trichoblastoma.





**Supplementary Figure 4.** Representative illustration of ISL1 expression in cutaneous tumors. Diffuse nuclear expression of ISL1 was observed in most MCC cases (bottom line) but almost never in non-MCC tumors (one basal cell carcinoma case) except for one Bowen's disease (top line). Aberrant cytoplasmic staining was observed in a Paget's disease (second from the top line).





**Supplementary Figure 5.** Representative illustration of INSM1 expression in our cohort. Diffuse nuclear INSM1 expression was observed in most MCC cases (bottom line) but almost never in non-MCC tumors (one basal cell carcinoma case) except for one squamous cell carcinoma (top line).

## References

- 1        Becker JC, Stang A, DeCaprio JA, et al. Merkel cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer* 2017;3:17077.
- 2        Harms PW, Harms KL, Moore PS, et al. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15:763–776.
- 3        Stanoszek LM, Wang GY, Harms PW. Histologic Mimics of Basal Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2017;141:1490–1502.
- 4        Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: A review. *J Cutan Pathol* 2021;48:411–421.
- 5        Kervarrec T, Tallet A, Miquelstorena-Standley E, et al. Diagnostic accuracy of a panel of immunohistochemical and molecular markers to distinguish Merkel cell carcinoma from other neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2019;32:499–510.
- 6        Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, et al. Differentiating Merkel cell carcinoma of lymph nodes without a detectable primary skin tumor from other metastatic neuroendocrine carcinomas: The ELECTHIP criteria. *J Am Acad Dermatol* 2018;78:964-972.e3.
- 7        Harms PW. Update on Merkel Cell Carcinoma. *Clin Lab Med* 2017;37:485–501.
- 8        Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008;319:1096–1100.
- 9        Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res* 2015;75:3720–3727.
- 10      Carter MD, Gaston D, Huang W-Y, et al. Genetic Profiles of Different Subsets of Merkel Cell Carcinoma Show Links between Combined and Pure MCPyV-negative Tumors. *Hum Pathol* 2017. doi:10.1016/j.humpath.2017.10.014.
- 11      Starrett GJ, Thakuria M, Chen T, et al. Clinical and molecular characterization of virus-positive and virus-negative Merkel cell carcinoma. *Genome Med* 2020;12:30.
- 12      Fan K, Gravemeyer J, Ritter C, et al. MCPyV Large T antigen induced atonal homolog 1 (ATOH1) is a lineage-dependency oncogene in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2019. doi:10.1016/j.jid.2019.06.135.
- 13      Harold A, Amako Y, Hachisuka J, et al. Conversion of Sox2-dependent Merkel cell carcinoma to a differentiated neuron-like phenotype by T antigen inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019. doi:10.1073/pnas.1907154116.
- 14      Ostrowski SM, Wright MC, Bolock AM, et al. Ectopic Atoh1 expression drives Merkel cell production in embryonic, postnatal and adult mouse epidermis. *Dev Camb Engl* 2015;142:2533–2544.
- 15      Perdigoto CN, Bardot ES, Valdes VJ, et al. Embryonic maturation of epidermal Merkel cells is controlled by a redundant transcription factor network. *Dev Camb Engl* 2014;141:4690–4696.
- 16      Goh G, Walradt T, Markarov V, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget* 2016;7:3403–3415.

- 17 Sahi H, Savola S, Sihto H, et al. RB1 gene in Merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2014;122:1157–1166.
- 18 Cimino PJ, Robirds DH, Tripp SR, et al. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2014;27:1073–1087.
- 19 Kervarrec Thibault, Appenzeller Silke, Samimi Mahatb, et al. Merkel cell polyomavirus-negative -Merkel cell carcinoma originating from in situ squamous cell carcinoma: a keratinocytic tumor with neuroendocrine differentiation. *J. Investig. Dermatol.* Accepted Article.
- 20 Siegle JM, Basin A, Sastre-Perona A, et al. SOX2 is a cancer-specific regulator of tumour initiating potential in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Commun* 2014;5:4511.
- 21 Villada G, Kryvenko ON, Campuzano-Zuluaga G, et al. A Limited Immunohistochemical Panel to Distinguish Basal Cell Carcinoma of Cutaneous Origin From Basaloid Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 2018;26:126–131.
- 22 Kervarrec T, Samimi M, Hesbacher S, et al. Merkel Cell Polyomavirus T Antigens Induce Merkel Cell-Like Differentiation in GLI1-Expressing Epithelial Cells. *Cancers* 2020;12. doi:10.3390/cancers12071989.
- 23 Mu P, Zhang Z, Benelli M, et al. SOX2 promotes lineage plasticity and antiandrogen resistance in TP53- and RB1-deficient prostate cancer. *Science* 2017;355:84–88.
- 24 Ku SY, Rosario S, Wang Y, et al. Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* 2017;355:78–83.
- 25 Houben R, Adam C, Baeurle A, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 2012;130:847–856.
- 26 Houben R, Schrama D, Alb M, et al. Comparable expression and phosphorylation of the retinoblastoma protein in Merkel cell polyoma virus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010;126:796–798.
- 27 Harms PW, Patel RM, Verhaegen ME, et al. Distinct gene expression profiles of viral- and nonviral-associated merkel cell carcinoma revealed by transcriptome analysis. *J Invest Dermatol* 2013;133:936–945.
- 28 Sihto H, Kukko H, Koljonen V, et al. Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2011;17:4806–4813.
- 29 Zahn J, Chan MP, Wang G, et al. Altered Rb, p16, and p53 expression is specific for porocarcinoma relative to poroma. *J Cutan Pathol* 2019;46:659–664.
- 30 Murao K, Kubo Y, Ohtani N, et al. Epigenetic abnormalities in cutaneous squamous cell carcinomas: frequent inactivation of the RB1/p16 and p53 pathways. *Br J Dermatol* 2006;155:999–1005.
- 31 Leblebici C, Yeni B, Savli TC, et al. A new immunohistochemical marker, insulinoma-associated protein 1 (INSM1), for Merkel cell carcinoma: Evaluation of 24 cases. *Ann Diagn Pathol* 2019;40:53–58.
- 32 Daoud MA, Mete O, Al Habeeb A, et al. Neuroendocrine carcinoma of the skin--an updated review. *Semin Diagn Pathol* 2013;30:234–244.

- 33 Agaimy A, Erlenbach-Wünsch K, Konukiewicz B, et al. ISL1 expression is not restricted to pancreatic well-differentiated neuroendocrine neoplasms, but is also commonly found in well and poorly differentiated neuroendocrine neoplasms of extrapancreatic origin. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 2013;26:995–1003.
- 34 Lilo MT, Chen Y, LeBlanc RE. INSM1 Is More Sensitive and Interpretable than Conventional Immunohistochemical Stains Used to Diagnose Merkel Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2018;42:1541–1548.
- 35 Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and -negative Merkel cell carcinoma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 2019.
- 36 Pasternak S, Carter MD, Ly TY, et al. Immunohistochemical profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol* 2018;82:232–238.
- 37 Becker JC, Eigentler T, Frerich B, et al. S2k guidelines for Merkel cell carcinoma (MCC, neuroendocrine carcinoma of the skin) - update 2018. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG* 2019;17:562–576.
- 38 Samimi M, Molet L, Fleury M, et al. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2016;174:813–822.
- 39 Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, et al. Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol* 2017;137:819–827.
- 40 Harms KL, Zhao L, Johnson B, et al. Virus-positive Merkel Cell Carcinoma Is an Independent Prognostic Group with Distinct Predictive Biomarkers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2021;27:2494–2504.
- 41 Laga AC, Lai C-Y, Zhan Q, et al. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and merkel cell biology. *Am J Pathol* 2010;176:903–913.
- 42 Lesko MH, Driskell RR, Kretzschmar K, et al. Sox2 modulates the function of two distinct cell lineages in mouse skin. *Dev Biol* 2013;382:15–26.
- 43 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
- 44 Bardot ES, Valdes VJ, Zhang J, et al. Polycomb subunits Ezh1 and Ezh2 regulate the Merkel cell differentiation program in skin stem cells. *EMBO J* 2013;32:1990–2000.
- 45 Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepenninckx V, et al. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res* 2013;73:4982–4987.
- 46 Kervarrec T, Samimi M, Guyétant S, et al. Histogenesis of Merkel cell carcinoma: a comprehensive review. *Front. Oncol.* 2019.
- 47 Sunshine JC, Jahchan NS, Sage J, et al. Are there multiple cells of origin of Merkel cell carcinoma? *Oncogene* 2018;37:1409–1416.
- 48 Becker JC, Zur Hausen A. Cells of origin in skin cancer. *J Invest Dermatol* 2014;134:2491–2493.
- 49 Houcine Y, Chelly I, Zehani A, et al. Neuroendocrine differentiation in basal cell carcinoma. *J Immunoassay Immunochem* 2017;38:487–493.
- 50 Panse G, McNiff JM, Ko CJ. Basal cell carcinoma: CD56 and cytokeratin 5/6 staining patterns in the differential diagnosis with Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2017;44:553–556.

- 51 Goto K, Anan T, Nakatsuka T, et al. Low-Grade Neuroendocrine Carcinoma of the Skin (Primary Cutaneous Carcinoid Tumor) as a Distinctive Entity of Cutaneous Neuroendocrine Tumors: A Clinicopathologic Study of 3 Cases With Literature Review. *Am J Dermatopathol* 2017;39:250–258.
- 52 Agni M, Raven ML, Bowen RC, et al. An Update on Endocrine Mucin-producing Sweat Gland Carcinoma: Clinicopathologic Study of 63 Cases and Comparative Analysis. *Am J Surg Pathol* 2020;44:1005–1016.
- 53 Ronen S, Aguilera-Barrantes I, Giorgadze T, et al. Polymorphous Sweat Gland Carcinoma: An Immunohistochemical and Molecular Study. *Am J Dermatopathol* 2018;40:580–587.
- 54 Park K-S, Liang M-C, Raiser DM, et al. Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle Georget Tex* 2011;10:2806–2815.
- 55 Park JW, Lee JK, Sheu KM, et al. Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. *Science* 2018;362:91–95.
- 56 George J, Lim JS, Jang SJ, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature* 2015;524:47–53.
- 57 Borromeo MD, Savage TK, Kollipara RK, et al. ASCL1 and NEUROD1 Reveal Heterogeneity in Pulmonary Neuroendocrine Tumors and Regulate Distinct Genetic Programs. *Cell Rep* 2016;16:1259–1272.
- 58 Houben R, Angermeyer S, Haferkamp S, et al. Characterization of functional domains in the Merkel cell polyoma virus Large T antigen. *Int J Cancer* 2015;136:E290-300.
- 59 Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2011;131:1631–1638.
- 60 Paulson KG, Carter JJ, Johnson LG, et al. Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res* 2010;70:8388–8397.
- 61 Eid M, Nguyen J, Brownell I. Seeking Standards for the Detection of Merkel Cell Polyomavirus and its Clinical Significance. *J Invest Dermatol* 2017;137:797–799.
- 62 Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest* 2012;122:4645–4653.
- 63 Hesbacher S, Pfitzer L, Wiedorfer K, et al. RB1 is the crucial target of the Merkel cell polyomavirus Large T antigen in Merkel cell carcinoma cells. *Oncotarget* 2016;7:32956–32968.

## VI. Discussion

### A. L'inactivation de RB1 et la surexpression de SOX2 : des caractéristiques des CCM ayant un intérêt pour le diagnostic et la prise en charge des patients

Le CCM est un cancer de la peau rare et agressif avec une survie à 5 ans estimée à 40%(35). L'intérêt de la communauté scientifique pour cette tumeur s'est considérablement accru au cours des dernières années du fait de la découverte en 2008 de l'intégration du MCPyV au sein du génome des cellules tumorales. En effet l'intégration génomique du MCPyV est observée dans environ 80% des cas alors que les 20% restant sont induits par les UV. Les ressemblances phénotypiques entre ces deux sous groupes de CCM sont probablement liées à l'inactivation des mêmes voies moléculaires, intéressant principalement TP53 et RB1(36). Toutefois, les mécanismes menant à l'inactivation de RB1 diffèrent dans ces deux sous-groupes. Au sein des CCM viro-positifs, la protéine RB est séquestrée par le grand T, ainsi inactivée sans être dégradée(21). Concernant les CCM viro-négatifs, RB1 est inactivé par mutation/perde d'hétérozygotie, conduisant à la perte d'expression de la protéine(32,33,37).

Récemment Harold et al(31) ont démontré que l'inactivation de l'antigène grand T conduit à une réduction de l'expression de SOX2 dans des lignées cellulaires de CCM. En effet, lorsque des cellules de CCM MCPyV(+) sont mises en cultures avec des kératinocytes, il est observé une conversion vers un phénotype neuronal et une perte d'expression des facteurs de transcription ATOH1 et SOX2, deux facteurs à l'origine de la différenciation des CCM. De manière similaire, l'inhibition de SOX2 induit cette même conversion phénotypique. Cela suggère que l'activation de SOX2 (et l'activation subséquente d'ATOH1) joue un rôle crucial dans l'acquisition du phénotype de Merkel.

Dans ce contexte, notre hypothèse de travail était que l'inactivation de RB1 induit la surexpression de SOX2, aussi bien dans les CCM viro-positifs(29–31) que viro-négatifs. Ainsi, notre étude démontre que SOX2 est un marqueur diagnostique pertinent de CCM permettant de discriminer ces derniers des autres tumeurs épithéliales cutanées alors que l'expression de RB1 est corrélée au statut viral et, par conséquent, à leur pronostic. En effet,



bien que ceci soit controversé(24), les CCM MCPyV(-) sont associés à un moins bon pronostic et nécessitent donc un suivi plus rapproché(38). Cependant, les méthodes de référence pour la détermination du statut viral des CCM ne sont pas clairement établies(39). En effet, la PCR peut manquer de spécificité car détectant la forme épisomale du virus et l'étude immunohistochimique avec CM2B4 manque de sensibilité(39,40), comme nous l'avons observé dans cette étude. De plus, ces méthodes de détection du polyomavirus de Merkel nécessitent des outils réservés aux centres spécialisés (PCR quantitative, étude immunohistochimique de détection du grand T avec les anticorps anti-CM2B4 et AB3). RB1 apparaît donc comme un marqueur de substitution solide du statut viral des CCM, fiable et facilement utilisable en routine.

## **B. L'inactivation de RB1 comme évènement précoce nécessaire au développement des CCM**

L'identification de la cellule à l'origine du carcinome de Merkel est une question de recherche prioritaire dans notre domaine, ayant pour but de permettre l'établissement de modèles animaux potentiellement utilisables pour développer de nouvelles options thérapeutiques(36). Dans ce contexte, l'étude des CCM composites associant un CCM viro-négatif à une composante non CCM, le plus souvent de type carcinome épidermoïde, a récemment permis de démontrer une origine kératinocytaire de certains CCM MCPyV(-). En effet, les deux contingents tumoraux de ces tumeurs composites sont caractérisés par un profil mutationnel similaire (charge mutationnelle élevée) et une signature UV prédominante, suggérant une origine commune(37). De manière plus spécifique, notre équipe (Kervarrec et al. 2021, article accepté dans le Journal of investigative Dermatology) en appliquant un séquençage complet de l'exome des deux contingents tumoraux a pu confirmer la relation clonale entre ces deux composantes. De plus, nous avons pu démontrer qu'une inactivation de RB1 et une surexpression de SOX2 étaient retrouvées de manière presque constante au sein de ces tumeurs. A contrario, en comparant les données génomiques des carcinomes épidermoïdes et des CCM viro-négatifs publiées dans la littérature, nous avons observé que l'inactivation de RB1 est une caractéristique retrouvée très fréquemment dans les CCM et seulement dans une minorité de carcinomes

épidermoïdes (26 mutations/43 dans les cas de MCC (60%) vs 20 mutations/98 des cas de carcinomes épidermoïdes (20%);  $p=3.10^{-5}$ ). Il apparaît donc que l'inactivation de *RB1* et la surexpression consécutive de *SOX2* sont des événements obligatoires mais non suffisants pour la progression vers le CCM. En effet ces CCM composites présentent également des mutations de *p53* dans les deux composantes. Ainsi, l'émergence de CCM à partir d'un progéniteur kératinocytaire serait dû à la combinaison d'altérations des gènes *RB1* et *p53*. De manière analogue, cette même combinaison a été retrouvée dans la quasi-totalité des carcinomes à petites cellules du poumon(41), et l'utilisation de modèles murins a démontré que ce « double hit » (inactivation de *RB1* et de *p53*) contribue à l'acquisition d'un phénotype neuroendocrine. Plus récemment, Park et al.(42) ont démontré dans un modèle expérimental murin que la combinaison de cinq événements oncogéniques (inactivation de *p53* et *RB1* et surexpression de *MYC*, *BCL2* et myristoylated *AKT1* (simulant une perte de fonction de *PTEN*) permettait la reprogrammation de cellules épithéliales prostatiques et pulmonaires en carcinome à petites cellules. Ceci suggère qu'une combinaison d'anomalies génétiques spécifiques permettrait le développement de carcinomes neuroendocrines à petites cellules.

Par ailleurs, l'inactivation de *p53* et *RB1*, les mutations de *PTEN*(43), l'expression de *BCL2*(44) et l'amplification de *MYC*(45), sont des événements préalablement rapportés dans la littérature comme étant fréquents dans les CCM.

Il serait donc particulièrement intéressant de poursuivre les investigations dans ce sens et d'évaluer l'expression de ces driver oncogéniques au sein de larges cohortes de CCM, en réalisant par exemple, comme nous l'avons fait pour *RB1* et *SOX2*, une étude comparative immunohistochimique sur TMA.

### C. L'inactivation de RB1 dans d'autres tumeurs épithéliales cutanées

Les carcinomes épidermoïdes cutanés sont caractérisés par une charge mutationnelle élevée. La fréquence des altérations de RB1 dans ces tumeurs n'est que peu documentée dans la littérature. Selon les séries existantes, les altérations de RB1 sont rapportées dans 16 à 50%(46–49) des carcinomes épidermoïdes. Récemment, l'équipe de Harms(50) a mis en évidence un sous-groupe de carcinomes épidermoïdes cutanés avec mutations de RB1- plus enclin à former des lésions in situ et plus agressives lorsque se développe un carcinome invasif (localement agressives et métastatiques).

La perte d'expression de RB1 est décrite dans 17 à 60%(51–53) des porocarcinomes et semble participer à la tumorigenèse(53). Par ailleurs, conjointement aux altérations de p16 et p53, l'inactivation de RB1 semble restreinte aux porocarcinomes, lorsque comparée à l'expression de ce marqueur dans une population de poromes(51).

Les carcinomes sébacés, en particulier développés aux dépens des annexes oculaires et palpébrales, présentent des altérations fréquentes de RB1, observées dans 39 à 70% selon les séries(54–57). L'inactivation de RB1, de manière conjointe aux altérations de P53, est rapportée comme véritable driver oncogénique et permet de distinguer deux populations de carcinomes sébacés oculaires : l'une caractérisée par ces mutations et affectant des patients âgés, l'autre, dépourvue de ces mutations, survenant chez des patients plus jeunes et en lien avec une infection à HPV (human papillomavirus) de haut grade(56,57).

Il est à noter que ces lésions sont toutes décrites comme potentiels précurseurs de CCM(58–61).

## **D. Conclusion**

En accord avec les dernières découvertes concernant la biologie des CCM, notre étude a permis d'identifier SOX2 comme un marqueur diagnostique pertinent permettant de distinguer un CCM d'une autre tumeur épithéliale cutanée. De plus, la détection de la perte de RB1 par étude immunohistochimique apparaît comme un marqueur de substitution pour la détermination du statut viral des CCM, fiable et accessible en routine.

## VII. Références

1. Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his « Merkel cell », morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* mars 2003;271(1):225-39.
2. Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol.* 5 oct 2009;187(1):91-100.
3. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol.* janv 1972;105(1):107-10.
4. Tang CK, Toker C. Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. *Cancer.* nov 1978;42(5):2311-21.
5. LeBoit P. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. *Pathology and genetics of skin tumours: [... reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference in Lyon, France, September 22 - 25, 2003].*
6. Fitzgerald TL, Dennis S, Kachare SD, Vohra NA, Wong JH, Zervos EE. Dramatic Increase in the Incidence and Mortality from Merkel Cell Carcinoma in the United States. *Am Surg.* août 2015;81(8):802-6.
7. Reichgelt BA, Visser O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* mars 2011;47(4):579-85.
8. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol.* nov 2010;63(5):751-61.
9. Asgari MM, Sokil MM, Warton EM, Iyer J, Paulson KG, Nghiem P. Effect of host, tumor, diagnostic, and treatment variables on outcomes in a large cohort with Merkel cell carcinoma. *JAMA Dermatol.* juill 2014;150(7):716-23.
10. Samimi M, Touzé A. Merkel cell carcinoma: The first human cancer shown to be associated with a polyomavirus. *Presse Medicale Paris Fr* 1983. déc 2014;43(12 Pt 2):e405-411.
11. Boccara O, Girard C, Mortier L, Bens G, Saiag P, Guillot B, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma - Cutaneous Oncology Group of the French Society of Dermatology. *Eur J Dermatol EJD.* juin 2012;22(3):375-9.
12. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* oct 2016;17(10):1374-85.
13. Kervarrec T, Samimi M, Guyétant S, Sarma B, Chéret J, Blanchard E, et al. Histogenesis of Merkel Cell Carcinoma: A Comprehensive Review. *Front Oncol.* 2019;9:451.
14. Kervarrec T, Tallet A, Miquelstorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Diagnostic accuracy of a panel of immunohistochemical and molecular markers to distinguish Merkel cell carcinoma from other neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* avr 2019;32(4):499-510.
15. Walsh NM, Cerroni L. Merkel cell carcinoma: A review. *J Cutan Pathol.* mars 2021;48(3):411-21.
16. Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel E-J, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res.* 15 août 2013;73(16):4982-7.
17. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 22 févr 2008;319(5866):1096-100.
18. Martel-Jantin C, Pedergrana V, Nicol JTJ, Leblond V, Trégouët D-A, Tortevoie P, et al. Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* sept 2013;58(1):288-91.

19. Nicol JTJ, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, et al. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol*. mars 2013;20(3):363-8.
20. Liu W, Yang R, Payne AS, Schowalter RM, Spurgeon ME, Lambert PF, et al. Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe*. 8 juin 2016;19(6):775-87.
21. Houben R, Adam C, Baeurle A, Hesbacher S, Grimm J, Angermeyer S, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer*. 15 févr 2012;130(4):847-56.
22. Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, Eberl M, Wilbert DM, Meireles J, et al. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Initiates Merkel Cell Carcinoma-like Tumor Development in Mice. *Cancer Res*. 15 juin 2017;77(12):3151-7.
23. Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, et al. Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol*. 2017;137(4):819-27.
24. Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. août 2011;131(8):1631-8.
25. Touzé A, Le Bidre E, Laude H, Fleury MJJ, Cazal R, Arnold F, et al. High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 avr 2011;29(12):1612-9.
26. Samimi M, Molet L, Fleury M, Laude H, Carlotti A, Gardair C, et al. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol*. avr 2016;174(4):813-22.
27. Samimi M, Touzé A, Laude H, Le Bidre E, Arnold F, Carpentier A, et al. Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. mars 2014;28(3):298-308.
28. Gardair C, Samimi M, Touzé A, Coursaget P, Lorette G, Caille A, et al. Somatostatin Receptors 2A and 5 Are Expressed in Merkel Cell Carcinoma with No Association with Disease Severity. *Neuroendocrinology*. 2015;101(3):223-35.
29. Perdigoto CN, Bardot ES, Valdes VJ, Santoriello FJ, Ezhkova E. Embryonic maturation of epidermal Merkel cells is controlled by a redundant transcription factor network. *Dev Camb Engl*. déc 2014;141(24):4690-6.
30. Ostrowski SM, Wright MC, Bolock AM, Geng X, Maricich SM. Ectopic Atoh1 expression drives Merkel cell production in embryonic, postnatal and adult mouse epidermis. *Dev Camb Engl*. 15 juill 2015;142(14):2533-44.
31. Harold A, Amako Y, Hachisuka J, Bai Y, Li MY, Kubat L, et al. Conversion of Sox2-dependent Merkel cell carcinoma to a differentiated neuron-like phenotype by T antigen inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 oct 2019;116(40):20104-14.
32. Harms PW, Patel RM, Verhaegen ME, Giordano TJ, Nash KT, Johnson CN, et al. Distinct gene expression profiles of viral- and nonviral-associated merkel cell carcinoma revealed by transcriptome analysis. *J Invest Dermatol*. avr 2013;133(4):936-45.
33. Sahi H, Savola S, Sihto H, Koljonen V, Bohling T, Knuutila S. RB1 gene in Merkel cell carcinoma: hypermethylation in all tumors and concurrent heterozygous deletions in the polyomavirus-negative subgroup. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. déc 2014;122(12):1157-66.
34. Cimino PJ, Robirds DH, Tripp SR, Pfeifer JD, Abel HJ, Duncavage EJ. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. août 2014;27(8):1073-87.

35. Becker JC, Stang A, DeCaprio JA, Cerroni L, Lebbé C, Veness M, et al. Merkel cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primer*. 26 oct 2017;3:17077.
36. Harms PW, Harms KL, Moore PS, DeCaprio JA, Nghiem P, Wong MKK, et al. The biology and treatment of Merkel cell carcinoma: current understanding and research priorities. *Nat Rev Clin Oncol*. déc 2018;15(12):763-76.
37. Carter MD, Gaston D, Huang W-Y, Greer WL, Pasternak S, Ly TY, et al. Genetic profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma show links between combined and pure MCPyV-negative tumors. *Hum Pathol*. janv 2018;71:117-25.
38. Becker JC, Eigentler T, Frerich B, Gambichler T, Grabbe S, Höller U, et al. S2k guidelines for Merkel cell carcinoma (MCC, neuroendocrine carcinoma of the skin) - update 2018. *J Dtsch Dermatol Ges J Ger Soc Dermatol JDDG*. mai 2019;17(5):562-76.
39. Eid M, Nguyen J, Brownell I. Seeking Standards for the Detection of Merkel Cell Polyomavirus and its Clinical Significance. *J Invest Dermatol*. 2017;137(4):797-9.
40. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest*. déc 2012;122(12):4645-53.
41. Su S, Zou J-J, Zeng Y-Y, Cen W-C, Zhou W, Liu Y, et al. Tumor Mutational Burden and Genomic Alterations in Chinese Small Cell Lung Cancer Measured by Whole-Exome Sequencing. *BioMed Res Int*. 2019;2019:6096350.
42. Park JW, Lee JK, Sheu KM, Wang L, Balanis NG, Nguyen K, et al. Reprogramming normal human epithelial tissues to a common, lethal neuroendocrine cancer lineage. *Science*. 5 oct 2018;362(6410):91-5.
43. Van Gele M, Leonard JH, Van Roy N, Cook AL, De Paepe A, Speleman F. Frequent allelic loss at 10q23 but low incidence of PTEN mutations in Merkel cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1 mai 2001;92(3):409-13.
44. Vujic I, Marker M, Posch C, Mühlehner D, Monshi B, Breier F, et al. Merkel cell carcinoma: mitoses, expression of Ki-67 and bcl-2 correlate with disease progression. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. mars 2015;29(3):542-8.
45. DeCaprio JA. Molecular Pathogenesis of Merkel Cell Carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 24 janv 2021;16:69-91.
46. Zilberg C, Lee MW, Yu B, Ashford B, Kraitsek S, Ranson M, et al. Analysis of clinically relevant somatic mutations in high-risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. févr 2018;31(2):275-87.
47. Campos MA, Lopes JM, Soares P. The genetics of cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Eur J Dermatol EJD*. 1 oct 2018;28(5):597-605.
48. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 mars 2015;21(6):1447-56.
49. Bito T, Ueda M, Ahmed NU, Nagano T, Ichihashi M. Cyclin D and retinoblastoma gene product expression in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in relation to p53 expression. *J Cutan Pathol*. oct 1995;22(5):427-34.
50. Lazo de la Vega L, Bick N, Hu K, Rahrig SE, Silva CD, Matayoshi S, et al. Invasive squamous cell carcinomas and precursor lesions on UV-exposed epithelia demonstrate concordant genomic complexity in driver genes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. nov 2020;33(11):2280-94.
51. Zahn J, Chan MP, Wang G, Patel RM, Andea AA, Bresler SC, et al. Altered Rb, p16, and p53 expression is specific for porocarcinoma relative to poroma. *J Cutan Pathol*. sept 2019;46(9):659-64.
52. Bosic M, Kirchner M, Brasanac D, Leichsenring J, Lier A, Volckmar A-L, et al. Targeted molecular profiling reveals genetic heterogeneity of poromas and porocarcinomas. *Pathology (Phila)*. avr 2018;50(3):327-32.

53. Harms PW, Hovelson DH, Cani AK, Omata K, Haller MJ, Wang ML, et al. Porocarcinomas harbor recurrent HRAS-activating mutations and tumor suppressor inactivating mutations. *Hum Pathol.* mai 2016;51:25-31.
54. North JP. Molecular Genetics of Sebaceous Neoplasia. *Surg Pathol Clin.* juin 2021;14(2):273-84.
55. Xu S, Moss TJ, Laura Rubin M, Ning J, Eterovic K, Yu H, et al. Whole-exome sequencing for ocular adnexal sebaceous carcinoma suggests PCDH15 as a novel mutation associated with metastasis. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* juill 2020;33(7):1256-63.
56. Bao Y, Selfridge JE, Wang J, Zhao Y, Cui J, Guda K, et al. Mutations in TP53, ZNF750, and RB1 typify ocular sebaceous carcinoma. *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao.* 20 juin 2019;46(6):315-8.
57. Tetzlaff MT, Curry JL, Ning J, Sagiv O, Kandl TL, Peng B, et al. Distinct Biological Types of Ocular Adnexal Sebaceous Carcinoma: HPV-Driven and Virus-Negative Tumors Arise through Nonoverlapping Molecular-Genetic Alterations. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 févr 2019;25(4):1280-90.
58. Walsh NM. Primary neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma of the skin: morphologic diversity and implications thereof. *Hum Pathol.* juill 2001;32(7):680-9.
59. Ogawa T, Donizy P, Wu C-L, Cornejo KM, Rys J, Hoang MP. Morphologic Diversity of Merkel Cell Carcinoma. *Am J Dermatopathol.* sept 2020;42(9):629-40.
60. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, et al. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for Merkel cell polyomavirus. *Histopathology.* avr 2013;62(5):711-22.
61. Hayashi D, Kusutani N, Sowa-Osako J, Kamo R, Hayashi E, Ohsawa M, et al. Combined Merkel cell carcinoma and sebaceous carcinoma in the eyelid with cervical lymph node metastasis of both components. *J Dermatol [Internet].* avr 2021 [cité 24 août 2021];48(4). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1346-8138.15780>



**Vu, le Directeur de Thèse**

A handwritten signature in dark ink, consisting of a stylized oval shape followed by a long, thin horizontal stroke.

**Vu, le Doyen  
De la Faculté de Médecine de  
Tours, le**



## THANGUTURI Soumanth

82 pages – 9 tableaux – 10 figures

### Résumé :

**Introduction :** Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un carcinome neuroendocrine primitif cutané rare et agressif. Dans 80% des cas l'intégration génomique du polyomavirus de Merkel (MCPyV) est observée, tandis que les 20% restant sont viro-négatifs, en lien avec l'exposition UV. Récemment, il a été démontré que la surexpression de SOX2 induite par l'inactivation de RB constitue un déterminant majeur du développement des CCM, aussi bien pour les tumeurs viro-négatives que viro-positives. Ainsi, l'objectif de cette étude a été de déterminer les performances de la perte de l'expression de RB1 et de la surexpression de SOX2, évalués par étude immunohistochimique, pour le diagnostic de CCM en pratique courante.

**Matériel et Méthodes :** Au total, 196 CCM, 233 tumeurs épithéliales cutanées primitives non-CCM et 70 carcinomes neuroendocrines (CNE) extra-cutanés ont été inclus dans cette étude et intégrés dans un tissu micro array. Les niveaux d'expression de SOX2 et de RB1 ont été évalués dans les 3 cohortes en utilisant un score semi-quantitatif, par deux pathologistes indépendants. Les performances diagnostiques de ces deux marqueurs ont été déterminés en utilisant le rapport de vraisemblance positive (positive likelihood-ratio, LHR+).

**Résultats :** Une expression diffuse et intense de SOX2 n'était que rarement observée parmi les tumeurs cutanées non-CCM (n = 3/193, 2%) alors qu'elle était observée dans la majorité des CCM (n = 165/181, 92%, LHR+ = 58.7). L'expression diffuse de SOX2 était plus fréquemment observée dans les CCM que parmi les CNE extra-cutanés (n = 15/50, 30%, LHR+ = 3.0). La perte d'expression de RB1 était décelée dans 52 cas de CCM (30%), 22 tumeurs cutanées non-neuroendocrines (12%) et 32 CNE extra-cutanés (63%). Parmi les cas de CCM, la perte de RB1 était mise en évidence dans tous les cas de CCM MCPyV (-), alors que tous les de CCM MCPyV (+) exprimaient RB1 (Sensibilité = 100%, Spécificité = 100%).

**Discussion :** SOX2 apparait comme un marqueur pertinent pour le diagnostic de CCM alors que RB1 permet de déterminer le statut viral au sein des CCM.

**Mots clés :** Carcinome à cellules de Merkel, SOX2, RB1, immunohistochimie, Polyomavirus

### Jury :

Président du Jury : Professeur Serge GUYETANT

Directeur de thèse : Docteur Thibault Kervarrec

Membres du Jury : Professeur Mahtab SAMIMI  
Docteur Marie Christine MACHET  
Docteur Bénédicte CORMIER

Date de soutenance : 10 Septembre 2021