

Année 2024/2025

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Paul-Louis CHANTREAU

Né le 21 janvier 1996 à Saint-Quentin (02)

CONTRIBUTION DE L'ANALYSE DU PROFIL MUTATIONNEL ET DE LA METHYLATION POUR LE DIAGNOSTIC DES CARCINOMES DE MERKEL

Présentée et soutenue publiquement le mercredi 23 avril 2025 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 Anne TALLET, Biologie Moléculaire, CHU Trousseau – Tours

Directeur de thèse : Docteur Thibault KERVARREC, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine - Tours

Année 2024/2025

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

Paul-Louis CHANTREAU

Né le 21 janvier 1996 à Saint-Quentin (02)

CONTRIBUTION DE L'ANALYSE DU PROFIL MUTATIONNEL ET DE LA METHYLATION POUR LE DIAGNOSTIC DES CARCINOMES DE MERKEL

Présentée et soutenue publiquement le mercredi 23 avril 2025 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 Anne TALLET, Biologie Moléculaire, CHU Trousseau – Tours

Directeur de thèse : Docteur Thibault KERVARREC, Anatomie et Cytologie Pathologiques, MCU-PH, Faculté de Médecine - Tours

UNIVERSITE DE TOURS FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Pr Denis ANGOULVANT

VICE-DOYEN

Pr David BAKHOS

ASSESEURS

Pr Philippe GATAULT, *Pédagogie*

Pr Caroline DIGUISTO, *Relations internationales*

Pr Clarisse DIBAO-DINA, *Médecine générale*

Pr Pierre-Henri DUCLUZEAU, *Formation Médicale Continue*

Pr Hélène BLASCO, *Recherche*

Pr Pauline SAINT-MARTIN, *Vie étudiante*

RESPONSABLE ADMINISTRATIVE

Mme Carole ACCOLAS

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

Pr Patrice DIOT – 2014-2024

PROFESSEURS EMERITES

Pr Daniel ALISON

Pr Gilles BODY

Pr Philippe COLOMBAT

Pr Etienne DANQUECHIN-DORVAL

Pr Patrice DIOT

Pr Luc FAVARD

Pr Bernard FOUQUET

Pr Yves GRUEL

Pr Frédéric PATAT

Pr Loïc VAILLANT

PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – P. ARBEILLE – A. AUDURIER – A. AUTRET – D. BABUTY – C. BARTHELEMY – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – C. BONNARD – P. BONNET – P. BOUGNOUX – P. BURDIN – L. CASTELLANI – J. CHANDENIER – A. CHANTEPIE – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – T. CONSTANS – C. COUET – L. DE LA LANDE DE CALAN – P. DUMONT – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – D. GOGA – 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 – G. LORETTE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – D. PERROTIN – L. POURCELOT – R. QUENTIN – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – A. ROBIER – J.C. ROLLAND – P. ROSSET – D. ROYERE – A. SAINDELLE – E. SALIBA – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – D. SIRINELLI – J. WEILL

AMELOT Aymeric	Neurochirurgie
ANDRES Christian.....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis	Cardiologie
APETOH Lionel.....	Immunologie
AUDEMARD-VERGER Alexandra.....	Médecine interne
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BACLE Guillaume.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BAKHOS David.....	Oto-rhino-laryngologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe.....	Immunologie
BEJAN-ANGOULVANT Theodora.....	Pharmacologie clinique
BERHOUE Julien.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BERNARD Anne.....	Cardiologie
BLANCHARD-LAUMONNIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
BONNET-BRILHAULT Frédérique.....	Physiologie
BOULOUIS Grégoire	Radiologie et imagerie médicale
BOURGUIGNON Thierry	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNAUT Paul	Psychiatrie d'adultes, addictologie
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck.....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CAILLE Agnès	Biostat., informatique médical et technologies de communication
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CORCIA Philippe.....	Neurologie
COTTIER Jean-Philippe.....	Radiologie et imagerie médicale
DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique
DESMIDT Thomas.....	Psychiatrie
DESOUBEUX Guillaume	Parasitologie et mycologie
DESTRIEUX Christophe.....	Anatomie
DI GUISTO Caroline.....	Gynécologie obstétrique
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri.....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
EHRMANN Stephan	Médecine intensive – réanimation
EL HAGE Wissam.....	Psychiatrie adultes
ELKRIEF Laure	Hépatologie – gastroentérologie
ESPITALIER Fabien.....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
FAUCHIER Laurent.....	Cardiologie
FOUGERE Bertrand	Gériatrie
FRANCOIS Patrick.....	Neurochirurgie
GATAULT Philippe	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GUERIF Fabrice.....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUILLON Antoine	Médecine intensive – réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GUYETANT Serge	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
HALIMI Jean-Michel.....	Thérapeutique
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
LE NAIL Louis-Romée	Cancérologie, radiothérapie
LECOMTE Thierry	Gastroentérologie, hépatologie

LEFORT Bruno.....	Pédiatrie
LEGRAS Antoine	Chirurgie thoracique
LEMAIGNEN Adrien	Maladies infectieuses
LESCANNE Emmanuel	Oto-rhino-laryngologie
LEVESQUE Éric	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence
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
MOREL Baptiste.....	Radiologie pédiatrique
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
PARE Arnaud	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
PASI Marco.....	Neurologie
PERROTIN Franck.....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean.....	Ophtalmologie
PLANTIER Laurent.....	Physiologie
REMERAND Francis.....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe.....	Biologie cellulaire
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
SAUTENET-BIGOT Bénédicte.....	Thérapeutique
THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
TOUTAIN Annick	Génétique
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

LIMA MALDONADO Igor.....Anatomie
MALLET Donatien.....Soins palliatifs

PROFESSEUR CERTIFIE DU 2ND DEGRE

MC CARTHY Catherine.....Anglais

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

CANCEL Mathilde	Cancérologie, radiothérapie
CARVAJAL-ALLEGRIA Guillermo.....	Rhumatologie
CHESNAY Adélaïde.....	Parasitologie et mycologie
CLEMENTY Nicolas.....	Cardiologie
DE FREMINVILLE Jean-Baptiste	Cardiologie
DOMELIER Anne-Sophie.....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane	Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et cytologie pathologiques
GARGOT Thomas	Pédopsychiatrie
GOUILLEUX Valérie	Immunologie
HOARAU Cyrille.....	Immunologie
KERVAREC Thibault.....	Anatomie et cytologie pathologiques
KHANNA Raoul Kanav.....	Ophtalmologie
LE GUELLEC Chantal.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
LEDUCQ Sophie	Dermatologie
LEJEUNE Julien	Hématologie, transfusion
MACHET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
MOUMNEH Thomas.....	Médecine d'urgence
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
RAVALET Noémie	Hématologie, transfusion
ROUMY Jérôme.....	Biophysique et médecine nucléaire
STANDLEY-MIQUELESTORENA Elodie.....	Anatomie et cytologie pathologiques
STEFIC Karl.....	Bactériologie
TERNANT David.....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
VAYNE Caroline.....	Hématologie, transfusion
VUILLAUME-WINTER Marie-Laure.....	Génétique

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia.....	Neurosciences
BLANC Romuald	Orthophonie
EL AKIKI Carole.....	Orthophonie
NICOLOU Antonine.....	Philosophie – histoire des sciences et des techniques
PATIENT Romuald	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

AUMARECHAL Alain	Médecine Générale
BARBEAU Ludivine	Médecine Générale
CHAMANT Christelle.....	Médecine Générale
ETTORI Isabelle.....	Médecine Générale
MOLINA Valérie.....	Médecine Générale
PAUTRAT Maxime	Médecine Générale
PHILIPPE Laurence.....	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
BOUTIN Hervé.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
BRIARD Benoît.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
CHALON Sylvie.....	Directrice 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
GILLOT Philippe	Chargé de Recherche Inrae – UMR Inrae 1282
GOMOT Marie	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR Inserm 1100
GUEGUINOU Maxime	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1069
HAASE Georg.....	Chargé de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253
HENRI Sandrine	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
HEUZE-VOURCH Nathalie.....	Directrice de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
LABOUTE Thibaut.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LATINUS Marianne	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253
LAUMONNIER Frédéric.....	Directeur de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253
LE MERRER Julie	Directrice de Recherche CNRS – UMR Inserm 1253
MAMMANO Fabrizio	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1259
PAGET Christophe.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
RAOUL William.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1069
SECHER Thomas.....	Chargé de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SI TAHAR Mustapha.....	Directeur de Recherche Inserm – UMR Inserm 1100
SUREAU Camille	Directrice de Recherche émérite CNRS – UMR Inserm 1259
TANTI Arnaud	Chargé de Recherche Inserm - UMR Inserm 1253
WARDAK Claire	Chargée de Recherche Inserm – UMR Inserm 1253

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'éthique médicale

BIRMELE Béatrice.....Praticien Hospitalier

Pour la médecine manuelle et l'ostéopathie médicale

LAMANDE Marc.....Praticien Hospitalier

Pour l'orthophonie

BATAILLE Magalie.....Orthophoniste
 CLOUTOUR Nathalie Orthophoniste || CORBINEAU Mathilde | Orthophoniste |
HARIVEL OUALLI Ingrid.....	Orthophoniste
IMBERT Mélanie	Orthophoniste
SIZARET Eva	Orthophoniste

Pour l'orthoptie

BOULNOIS Sandrine.....Orthoptiste

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des enseignants et enseignantes
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 aux indigents,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis(e) 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(euse) et reconnaissant(e) envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs parents.

Que les hommes et les femmes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert(e) d'opprobre
et méprisé(e) de mes confrères et consœurs
si j'y manque.

Remerciements

À notre Maître et Président de Jury, Monsieur le Professeur Serge GUYETANT, pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider cette soutenance. Je tiens à vous remercier sincèrement pour l'expertise et le regard critique que vous apportez à ce travail. Vos enseignements, reçus au cours de ma formation, ont été d'une grande valeur et ont grandement contribué à mon évolution.

À notre Maître et Juge, Madame le Professeur Mahtab SAMIMI, je vous adresse mes plus sincères remerciements pour votre présence au sein de ce jury. C'est un privilège que vous ayez accepté de lire et d'évaluer ce travail.

À notre Maître et Juge, Madame le Docteur Anne TALLET, je te remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Je te suis profondément reconnaissant pour l'aide et l'expérience que tu m'as apportées, notamment en biologie moléculaire, et qui ont enrichi ma formation.

À notre Directeur de thèse et Juge, Monsieur le Docteur Thibault KERVARREC pour m'avoir confié ce sujet de thèse et accompagné avec rigueur et bienveillance dans ce projet. Je te remercie de m'avoir encouragé et offert les opportunités de différents projets. Ton engagement et ta détermination sont une source précieuse d'enrichissement et de motivation.

Aux services,

Aux équipes du CHU Bretonneau, notamment le Dr Flavie ARBION, le Dr Cendra BARBEY, le Dr Anne-Marie BERGEMER-FOUQUET, et le Dr Cécilia ROUSSELOT. Je vous remercie pour les nombreux enseignements que j'ai pu recevoir auprès de chacune d'entre vous, pour votre compagnonnage et votre bienveillance, qui ont largement contribué à mon apprentissage. J'adresse également mes remerciements aux secrétaires et techniciennes, dont la disponibilité et l'agréable compagnie m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Aux équipes de l'IHP, le Dr Ilham CHOKRI, le Dr Bénédicte CORMIER, le Dr Clémence FICHET, le Dr Adrien PETEREAU, le Dr Isabelle de PINIEUX, le Dr Soum THANGUTURI. Je vous remercie de m'avoir offert une aussi enrichissante expérience libérale à vos côtés. Particulièrement, je vous remercie Isabelle pour votre temps, votre volonté de transmettre et votre confiance. Adrien, pour nos discussions, digressions, ici et ailleurs.

Aux équipes du CHU d'Orléans, le Dr Mathilde BECMEUR-LEFEBVRE, le Dr Claire BLECHET, le Dr Carole BONNEAU, le Dr Flore DELALANDE, le Dr Myriam EL GANIMESRAR, le Pr Gaëlle FROMONT, le Dr Anne HEITZMANN, le Dr Rémy KERDRAON, le Dr Patrick MICHENET et le Dr Sophie RICHARD. Je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre compagnonnage et toutes les expériences que j'ai pu acquérir à vos côtés. Ce semestre, bien qu'intervenu tôt dans mon internat, s'est avéré décisif pour mon orientation. Mes remerciements s'adressent particulièrement au Dr Patrick MICHENET, dont l'ouverture au dialogue et les conseils éclairés ont largement contribué à mon épanouissement professionnel.

Aux équipes de la PGM C, pour avoir apporté quelques lumières à la pénombre de ma connaissance de la biologie moléculaire. Merci à Christine BONENFANT, pour ta patience et ta bienveillance.

Aux équipes du CHU Trousseau, le Dr Fanny DUJARDIN, le Dr Marie-Christine MACHET, le Dr Elodie MIQUELESTORENA-STANDLEY, le Pr Gonzague de PINIEUX, le Dr Damien SIZARET, le Dr Matthias TALLEGAS. Je vous remercie pour vos enseignements, la disponibilité et les nombreuses expériences que j'ai pu acquérir à vos côtés. Vos conseils avisés et votre accompagnement m'ont permis de développer une approche plus rigoureuse et réfléchie. Je remercie également le Dr Anne de MURET pour sa gentillesse à mon égard. Une pensée particulière pour Audrey, Bastien, Elodie et Marie, qui ont contribué à rendre mes stages agréables.

À ma famille,

À ma Mère,

Les mots sont sans doute les plus difficiles à trouver lorsqu'ils sont les plus importants. Je tiens à exprimer toute ma gratitude pour ton soutien infaillible et ta confiance absolue. Tu as su m'encourager et m'aider à croire en mes capacités. Ton affection et ta présence à mes côtés ont été un moteur essentiel de mon parcours. Merci de m'avoir transmis tes valeurs et de m'avoir guidé avec bienveillance.

À Manou,

Ta présence, ta douceur et ton inébranlable soutien ont toujours été essentiels pour moi. Je te dois une partie de cette réussite, c'est avec une immense affection que je t'associe à cette étape importante de mon parcours.

À Franck et Christine, dont la passion et l'exemple ont marqué mon parcours, ainsi qu'à **Cléo et Justine**, pour votre affection et votre douceur.

À Alexandra et Méric, je me réjouis de vous retrouver pour ces quelques mois à Saint-Pierre. Votre présence et votre affection rendent cette période d'autant plus enrichissante.

À Anne-Laure et Kouba, pour leurs attentions et leur bienveillance, toujours appréciées.

À mon Père et à Éric, qui auraient assurément beaucoup aimé partager ce moment.

À Clotilde,

Mon évidence. Merci pour ta présence, ton soutien et ta compréhension dans tout ce que nous partageons. Ta patience, ta gentillesse et ta douceur sont un réconfort constant, me permettant d'avancer avec sérénité et détermination. Je te suis profondément reconnaissant pour la force que tu m'insuffles et pour tout ce que nous allons encore bâtir ensemble.

À mes amis,

À Paul-Jean,

Nos prénoms singuliers, difficilement dissociables, nous définissent et nous prédestinaient. Je souhaite à quiconque de connaître pareil alignement d'esprit. Je te remercie pour l'amitié si forte que tu me témoignes. Ton esprit et ta vision sont pour moi une source inépuisable de stimulation.

Au Cinq majeur,

Antoine, Benjamin, Jérémy, Lucas. Le groupe dans le groupe. Zéro ombre au tableau, déjà dix ans d'une entente sans faille, et la certitude profonde que l'aventure ne fait que commencer. Vous êtes ceux à qui je peux tout révéler, sans filtre ni réserve. Je vous remercie pour ces moments mémorables et je me réjouis de tout ce qui nous attend encore. Une mention spéciale, pour la postérité, à Antoine pour m'avoir perfusé de ses cours et maintenu à flot jusqu'au rivage de l'externat. À Ben, pour nos tennis de tous temps, au confinement de notre D4.

Aux GHB,

Merci pour tout ce que nous partageons depuis le début de nos études de médecine. De la genèse, à la confrérie, aux changements de villes pour l'internat, rien ne fane. Chacune de nos retrouvailles est un véritable bol d'air qui ne fait que renforcer davantage nos liens.

À Dong Hyun,

Je te remercie pour ton amitié fidèle, pour ces voyages et ce que tu as pu nous transmettre de la culture sud-coréenne.

À Nathan,

L'éloignement a eu raison de la régularité de nos échanges, mais en rien des souvenirs de nos années passées à Amiens, et le brillant de ton analyse. Ma première rencontre à la faculté, dans le mauvais service, au mauvais étage, peut-être même à la mauvaise heure. Évidemment, c'est moi qui m'étais trompé.

À Antoine,

Une rencontre déterminante à bien des égards. Je te remercie de m'avoir rendu la vue sur les qualités de l'anapath à un moment où ma vision était troublée. Amicalement, pour l'interlocuteur et la vivacité d'esprit. Vivacité d'esprit c'est peut-être un peu fort pour le fait de partager les mêmes références et s'en envoyer chaque jour sans exception ? J'assume.

À Jeanne, je te remercie pour ton amitié, notre entente et tout ce que nous partageons. Conserve ce pétillant et cette bonhomie qui te caractérisent si bien.

À Jean-Emmanuel, pour ces deux années partagées d'une gestion juste, équitable et raisonnée du syndicat des internes.

À mes co-internes et amis, Antoine, Aymeric, Benjamin, Caroline, Claire, Cynthia, Etienne, Jean-Baptiste, Kerman, Lola, Mélanie, Nathanaël, Rodolphe, Simon, William, Ysé, et plus particulièrement ceux avec qui j'ai pu partager un semestre, et les journées de frais.

À tous ceux que je n'ai pas cités, qui égayent mon quotidien de leur présence.

Contribution of methylation profiling and mutation analysis to the diagnosis of Merkel cell polyomavirus-negative carcinomas

Abréviations

AgLT : Antigène grand T
AgsT : Antigène petit T
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATOH1 : Atonal homolog 1
CCM : Carcinome à cellules de Merkel
CCMSPC : Carcinome à cellules de Merkel sans primitif cutané
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CK : Cytokeratin
CPC : Carcinome pulmonaire à petites cellules
CT : Computed Tomography
FFPE : Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
HAS : Haute Autorité de Santé
HPS : Hématoxyline-Phloxine-Safran
IARC : International Agency for Research on Cancer
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
ISP : Infectiologie et Santé Publique
KMT2A : Lysine Methyltransferase 2A
KMT2D : Lysine Methyltransferase 2D
LNMNEC : Lymph Node Metastasis of Non-cutaneous Neuroendocrine Carcinoma
MCC : Merkel Cell Carcinoma
MCCWOPT : Merkel Cell Carcinoma Without an Identifiable Primary Tumor
MCPyV : Merkel Cell Polyomavirus
NEC : Neuroendocrine Carcinoma
NF1 : Neurofibromin 1
NOTCH1 : Notch receptor 1
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PET : Positron Emission Tomography
PD-1 : Programmed cell death protein 1
PD-L1 : Programmed death-ligand 1
RB1 : Retinoblastoma 1
SATB2 : Special AT-rich sequence-binding protein 2
SCLC : Small Cell Lung Carcinoma
t-SNE : t-distributed Stochastic Neighbor Embedding
Tdt : Terminal deoxynucleotidyl transferase
TP53 : Tumor Protein p53
TTF-1 : Thyroid Transcription Factor 1
UMR : Unité Mixte de Recherche
UV : Ultraviolet
WHO : World Health Organization
WGS : Whole-Genome Sequencing

TABLE DES MATIERES

I-	RÉSUMÉ	18
II-	ABSTRACT	19
III-	INTRODUCTION	20
A-	HISTORIQUE	20
B-	CLINIQUE, EPIDEMIOLOGIE ET PRISE EN CHARGE	21
C-	HISTOLOGIE	21
D-	VIROLOGIE	23
IV-	CONTEXTE DE TRAVAIL	25
V-	METHYLATION PROFILING: A DIAGNOSTIC TOOL FOR THE IDENTIFICATION OF MERKEL CELL CARCINOMA OF THE LYMPH NODE WITHOUT DETECTABLE SKIN PRIMARY TUMOR	27
VI-	ESTABLISHMENT OF A RESTRICTED SEQUENCING PANEL TO DISTINGUISH MERKEL CELL POLYOMAVIRUS-NEGATIVE MERKEL CELL CARCINOMA FROM SMALL CELL CARCINOMA OF THE LUNG	40
VII-	DISCUSSION	71
VIII-	RÉFÉRENCES	74

I- Résumé

Contexte : Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est une tumeur cutanée rare et agressive, principalement associée à l'intégration du polyomavirus de Merkel (MCPyV) dans les cellules tumorales. Le CCM peut se présenter soit comme une tumeur cutanée primitive, soit comme une métastase ganglionnaire sans primitif cutané (CCMSPC). La distinction entre les CCMSPC et les métastases ganglionnaires de carcinomes neuroendocrines extra-cutanés reste particulièrement complexe en pratique quotidienne, en particulier dans les cas viro-négatifs.

Objectif : Ce travail vise à déterminer si le profil de méthylation ou de mutations permet de distinguer les cas de CCMSPC, en particulier les formes viro-négatives, des carcinomes neuroendocrines extra-cutanés.

Méthodes : Les profils de méthylation de 20 cas de CCMSPC, comprenant 5 cas viro-négatifs et 15 cas viro-positifs, issus d'une cohorte multicentrique française, ont été analysés à l'aide de la puce EPIC BeadChip et comparés à 23 CCM cutanés et 37 carcinomes pulmonaires à petites cellules (CPC).

Le profil mutationnel de 43 cas de CCM viro-négatifs, issus d'études antérieures publiées et analysés par séquençage du génome complet, a été extrait des travaux de González-Vela et al., Harms et al., et Goh et al., puis comparé à 110 cas de CPC de l'étude de George et al. Un panel de 35 gènes parmi les plus fréquemment mutés dans le CCM a été étudié.

Résultats : L'analyse de la méthylation (tSNE) a montré que les cas de CCM, y compris les formes ganglionnaires, se regroupaient ensemble, tandis que les CPC constituaient un groupe distinct.

Concernant le profil mutationnel, une fréquence plus élevée de mutations dans les gènes *ATM*, *KMT2A*, *KMT2D*, *NF1* et *NOTCH1* ($p < 0,05$) a été observée dans les CCM viro-négatifs en comparaison aux CPC.

Conclusion : Le profil de méthylation représente un outil diagnostique prometteur pour les CCMSPC. De plus, les CCM et les CPC présentent des profils mutationnels distincts, ce qui pourrait contribuer à l'identification des CCMSPC.

Mots-clés : MCPyV ; Carcinome à cellules de Merkel ; Diagnostic différentiel ; Ganglions lymphatiques ; Métastase ; Carcinome neuroendocrine ; Profil de méthylation ; Séquençage du génome complet.

II- Abstract

Background: Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and aggressive skin tumor mostly related to Merkel cell polyomavirus integration in tumor cells. MCC can present either as a primary cutaneous tumor or as a lymph node metastasis without an identifiable primary skin tumor (MCCWOPT). The distinction between MCCWOPT and lymph node metastases of non-cutaneous neuroendocrine carcinomas remains particularly challenging in daily practice notably in vironegative cases.

Objective: This study aims to determine whether the methylation or mutational profile can distinguish MCCWOPT cases—particularly polyomavirus-negative—from extra-cutaneous neuroendocrine carcinomas.

Methods: Methylation profiles from 20 MCCWOPT cases, including 5 MCPyV-negative and 15 MCPyV-positive cases, extra-cted from a multicenter French cohort were determined using the EPIC BeadChip array and compared to 23 cutaneous MCC and 37 small cell lung carcinomas (SCLC).

The mutation profile of 43 MCPyV-negative MCC cases previously published cases analyzed whole-genome sequencing were extra-cted studies by González-Vela et al., Harms et al., and Goh et al., and compared to 110 SCLC cases from the study by George et al.. A panel of 35 genes among the most frequently mutated in MCC was analyzed.

Results: Methylation (tSNE) analysis demonstrated that MCC cases including MCCWOPT clustered together while small cell neuroendocrine carcinomas formed a distinct group.

Regarding the mutation profile, a higher frequency of mutations in *ATM*, *KMT2A*, *KMT2D*, *NF1*, and *NOTCH1* ($p < 0.05$) genes was detected in MCPyV-negative MCC in comparison to small cell lung carcinomas.

Conclusion: Methylation profiling represents a promising additional tool for the diagnosis of MCCWOPT. MCC and SCLC exhibit distinct mutation profiles that may help for MCCWOPT recognition.

Key words: MCPyV; Merkel cell carcinoma; Differential diagnosis; Lymph nodes; Metastasis; Neuroendocrine carcinoma; Methylation profiling ; Whole Genome Sequencing

III- Introduction

A- Historique

La cellule de Merkel a été décrite pour la première fois en 1878 par Friedrich Sigmund Merkel, anatomiste et histologiste allemand. Elle est située au niveau de la couche basale de l'épiderme ainsi qu'au sein de la portion supérieure du follicule pileux (infundibulum). Ces cellules se présentent sous forme d'éléments isolés ou regroupés en amas, appelés « touch domes », particulièrement abondants au niveau de la peau acrale. Elles établissent un contact étroit avec les terminaisons des fibres nerveuses myélinisées. L'étude de cette relation par microscopie électronique a permis d'étayer leur rôle probable de mécanorécepteurs sensoriels(1).

En 2010, Van Keymeulen et al. ont démontré que les cellules de Merkel dérivent des progéniteurs kératinocytaires de la couche basale épidermique, leur différenciation étant sous le contrôle du facteur de transcription Atonal homolog 1 (ATOH1), en synergie avec l'inhibition de la voie Notch(2).

Toker et al. ont décrit, en 1972, une nouvelle entité tumorale, initialement désignée sous le terme de « carcinome trabéculaire cutané »(3). Celle-ci correspond à une prolifération carcinomateuse localisée dans le derme ou l'hypoderme, dépourvue de connexion avec l'épiderme, et composée de travées et de nids de cellules basaloïdes de petite taille. Les premières études ultrastructurales, réalisées en 1978, ont révélé des caractéristiques évoquant celles des cellules de Merkel, notamment la présence de granules neurosecrétaires dans le cytoplasme des cellules tumorales, conduisant ainsi à la désignation de cette tumeur sous le nom de « carcinome à cellules de Merkel » (CCM)(4). Toutefois, bien que des similitudes phénotypiques aient été mises en évidence entre le CCM et les cellules de Merkel, la relation histogénétique entre ces deux entités demeure non établie(5). Les dernières recherches en ce sens, intégrant les données de méthylation, suggèrent une origine épithéliales, les CCM viro-positifs et viro-négatifs pouvant respectivement dériver de progéniteurs épithéliaux folliculaires et épidermiques distincts(6).

B- Clinique, épidémiologie et prise en charge

Le CCM est une tumeur neuroendocrine cutanée primitive rare, dont l'incidence mondiale est estimée entre 0,1 et 1,6 cas pour 100 000 personnes par an (7), avec environ 300 nouveaux cas recensés chaque année en France(8). L'augmentation progressive de son incidence depuis les années 2000 s'explique notamment par l'amélioration des techniques diagnostiques et le vieillissement de la population. Les principaux facteurs de risque incluent l'âge avancé, l'exposition chronique aux rayonnements ultraviolets et l'immunodépression (9).

Cliniquement, le CCM se présente sous la forme d'un nodule cutané indolore, érythémato-violacé, de croissance rapide, dont la taille peut varier de quelques millimètres à plusieurs centimètres, développé préférentiellement dans les zones photo-exposées(10). Le CCM peut se présenter, dans jusqu'à 15% des cas, comme une atteinte ganglionnaire sans primitif cutané détectable (CCMSPC)(11). Le CCM est souvent diagnostiqué à un stade avancé, avec une atteinte ganglionnaire présente dès le diagnostic dans 27 % des cas et des métastases viscérales dans 7 % des cas(12). Le pronostic du CCM est sombre, avec une survie à cinq ans estimée à 51 % pour les formes localisées, 35 % en cas d'atteinte ganglionnaire et seulement 14 % en présence de métastases à distance(13).

La prise en charge des formes localisées repose sur une exérèse chirurgicale associée selon les cas à une radiothérapie, tandis que les formes métastatiques relèvent en première intention d'une chimiothérapie à base de sels de platine, le plus souvent en combinaison avec l'étoposide(14). L'immunothérapie a émergé comme une option thérapeutique prometteuse, l'efficacité des inhibiteurs de PD-1/PDL-1, notamment l'avelumab, ayant été démontrée(15). Les recommandations européennes et américaines recommandent l'utilisation des inhibiteurs de PD-1/PD-L1 en première ligne pour les patients atteints d'un CCM localement avancé ou métastatique, inopérables ou inéligibles à la radiothérapie (16,17). Néanmoins, en France, l'avelumab est la seule molécule ayant obtenu une autorisation de mise sur le marché en seconde ligne et bénéficiant d'un remboursement dans cette indication (Avis sur les médicaments – 9 novembre 2023 – HAS).

C- Histologie

D'un point de vue histologique, le CCM est un carcinome neuroendocrine de haut grade, caractérisé par une prolifération tumorale siégeant principalement dans le derme et/ou l'hypoderme, le plus souvent sans connexion avec l'épiderme(5). Son architecture tumorale peut adopter une disposition trabéculaire, solide ou diffuse. Les cellules tumorales sont de

petite à moyenne taille, avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé et une chromatine fine, caractéristique en « poivre et sel » (**Figure 1**). Des variations morphologiques ont été décrites entre les CCM viro-positifs et viro-négatifs(18). Les formes viro-positives se distinguent par un cytoplasme peu abondant et un noyau arrondi à la chromatine poussiéreuse. En revanche, les CCM viro-négatifs présentent volontiers un cytoplasme plus abondant, clair, ainsi qu'un noyau irrégulier, parfois fusiforme. L'agressivité de cette tumeur est fréquemment marquée par la présence d'une nécrose tumorale et de nombreuses figures mitotiques.

Le CCM fait partie du spectre des tumeurs à petites cellules rondes et bleues, ses diagnostics différentiels inclut les hémopathies malignes, telles que les leucémies aiguës et la leucémie lymphoïde chronique, ainsi que certains sarcomes, notamment les tumeurs neuroectodermiques primitives, le rhabdomyosarcome et le synoviosarcome. Les tumeurs primitivement cutanées doivent également être éliminées, comme le carcinome basocellulaire, le carcinome sébacé, le carcinome épidermoïde peu différencié. Les formes à petites cellules du mélanome doivent également être envisagées.

Toutefois, la principale difficulté diagnostique repose sur la distinction entre un CCM et une métastase cutanée d'un carcinome neuroendocrine d'origine extra-cutanée. Ainsi, conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), toute tumeur cutanée suspecte de CCM doit faire l'objet d'un bilan d'imagerie, notamment thoracique, afin d'exclure une origine primitive viscérale(5).

L'analyse immunohistochimique confirme la double expression, épithéliale (pancytokératines AE1/AE3) et neuroendocrine (chromogranine A, synaptophysine, CD56) des cellules tumorales du CCM. Dans la majorité des cas, il existe un marquage de la cytokératine 20 en « boules » paranucléaires. Nos équipes ont pu mettre en évidence que SATB2, SOX2 et le Neurofilament, étaient des marquages performants pour distinguer le CCM d'une métastase d'un carcinome neuroendocrine viscéral(19,20). Les cellules n'expriment généralement pas le TTF1, un marqueur classiquement retrouvé dans les carcinomes neuroendocrines d'origine pulmonaire. Par ailleurs, le CCM présente fréquemment un phénotype lymphoïde B, caractérisé par l'expression de marqueurs tels que PAX5 (100 % des cas), Tdt (73 %). Cette positivité ne doit toutefois pas conduire à un diagnostic erroné d'hémopathie maligne(21).

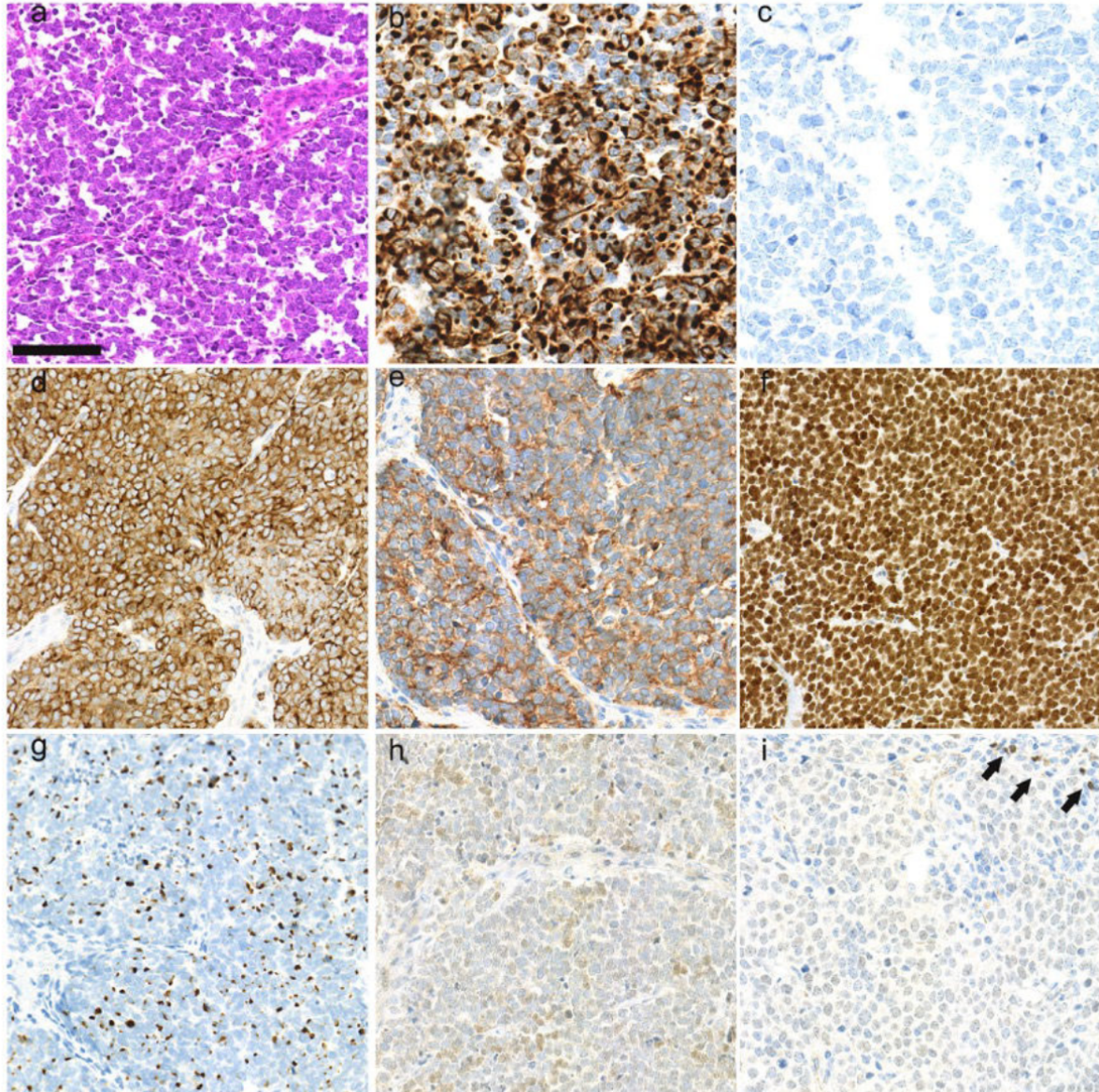


Figure 1 (adaptée de Kervarrec et al 2019 (18)). Caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques du carcinome à cellules de Merkel. (A-C) : coloration HPS. Plaque de cellules tumorales présentant une activité mitotique élevée (barre = 100 µm). Alors que les cellules du CCM viro-positifs (A,B) 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

Une origine infectieuse a été suspectée devant la constatation d'une plus forte prévalence du CCM chez les patients immunodéprimés. En 2008, Feng et al. a identifié la séquence d'un virus intégré au sein du génome d'environ 80 % des CCM.(22) Ce virus,

jusqu'alors inconnu, appartient à la famille des Polyomaviridae et a été nommé polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV). Il est classé comme agent carcinogène de groupe 2A par l'International Agency for Research on Cancer (IARC). Il s'agit d'un virus à ADN double brin circulaire, non enveloppé, de structure icosaédrique et de symétrie T7. Son génome, d'environ 5 200 paires de bases, est organisé en trois régions distinctes (**Figure 2**). La première correspond à une séquence non codante permettant d'initier la réplication. La seconde code les protéines impliquées dans l'initiation du cycle viral, les antigènes petit T (AgST) et grand T (AgLT). La troisième regroupe les séquences codantes impliquées dans la phase tardive, les protéines de la capsid virale, VP1 et VP2.

Dans la population générale, plus de 85 % des adultes sont porteurs du MCPyV(23,24), qui se réplique au sein du derme papillaire sans entraîner de manifestation clinique(25). Toutefois, dans certaines conditions, l'exposition aux rayonnements ultraviolets et l'immunodépression pourraient favoriser l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte, déclenchant ainsi le processus de carcinogenèse. Celui-ci repose sur des mutations ou des délétions affectant la séquence de l'AgLT, conduisant à l'expression d'une forme tronquée de cette protéine(22). Dans les cellules tumorales, seules deux protéines virales sont exprimées : l'AgLT tronqué et l'AgST, toutes deux dotées d'un potentiel oncogénique(26,27).

On distingue ainsi deux sous-groupes de CCM : les CCM viro-positifs et les CCM viro-négatifs. Ces derniers, vraisemblablement induits par l'exposition aux ultraviolets, présentent une charge mutationnelle élevée et seraient associés à un pronostic plus défavorable(28).

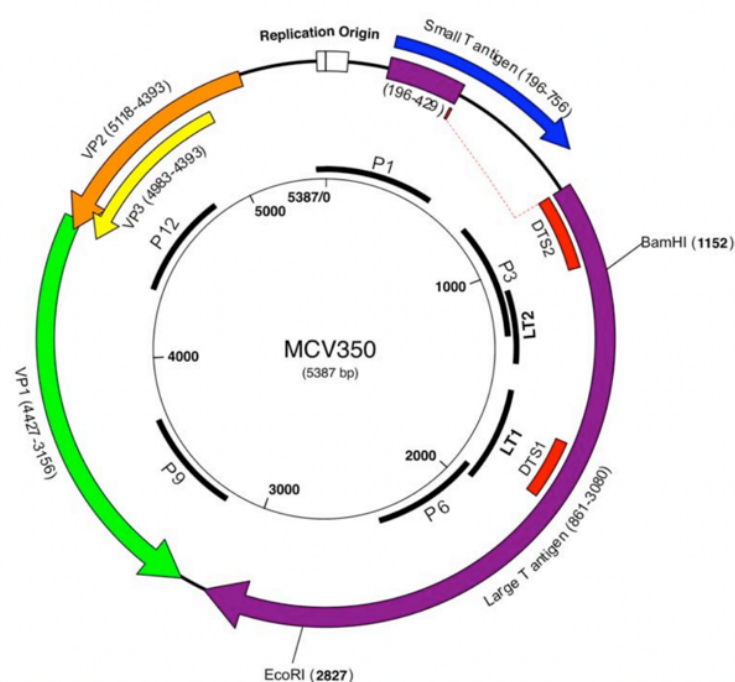


Figure 2 (adaptée de Feng et al. (22)). Génome du MCPyV.

IV- Contexte de travail

À la suite de la découverte du MCPyV en 2008, une collaboration interdisciplinaire s'est mise en place entre les virologues de l'équipe « Biologie des infections à polyomavirus » (UMR INRA ISP 1282, Université François Rabelais de Tours), dirigée par le Pr Antoine Touzé, et les services de Dermatologie ainsi que d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Tours. Cette coopération a permis la constitution d'une collection biologique multicentrique, comprenant une sérothèque ainsi qu'une cohorte historico-prospective de tumeurs fixées en paraffine. Toujours en cours d'enrichissement, cette cohorte regroupe des échantillons tumoraux provenant de huit centres hospitaliers français (Tours, Orléans, Poitiers, Rennes, Angers, Besançon, Boulogne-Billancourt et Le Mans).

Les premiers travaux ont porté sur la sérologie, mettant en évidence une sous-population de patients présentant un taux sérique élevé d'anticorps anti-VP1, associé à une meilleure survie(29). Par la suite, le dosage sérique des anticorps anti-AgLT a été identifié comme un outil pertinent pour le suivi des patients(30). En complément, des études de métabolomique tumorale ont été menées, notamment sur le rôle de la vitamine D(31) et l'expression des récepteurs de la somatostatine, ainsi que des recherches sur les interactions entre le carcinome à cellules de Merkel et le système immunitaire(32).

Plus récemment, nos recherches ont mis en avant l'origine épithéliale des carcinomes de Merkel, qu'ils soient viro-induits ou non(33). Il a également été observé une perte d'expression de YAP1, suggérant son implication dans la transformation tumorale et l'acquisition du phénotype neuroendocrine. Par ailleurs, l'expression élevée d'EZH2 dans ces tumeurs a été mise en évidence, ouvrant ainsi des perspectives thérapeutiques, son inhibition pouvant constituer une cible prometteuse en association avec l'immunothérapie(34).

Ce travail m'a été proposé par le Dr Thibault Kervarrec et s'inscrit dans la continuité de ses recherches visant à mieux caractériser les carcinomes de Merkel viro-négatifs. Nos équipes ont notamment mis au point un outil clinique, histologique et biologique, le score ELECTHIP, destiné à faciliter le diagnostic des carcinomes de Merkel sans primitif cutané(35).

L'objectif de cette thèse a été d'étudier la contribution de deux techniques de biologie moléculaire, l'analyse du profil mutationnel et de méthylation, pour le diagnostic de carcinomes de Merkel, en particulier viro-négatifs.

Dans un premier temps, nous avons étudié le profil de méthylation d'une cohorte de carcinomes de Merkel sans primitif cutané, viro-positifs et négatifs et l'avons comparé à celui

de MCC cutanés et de carcinomes neuroendocrines. Mon travail a consisté à recenser les cas locaux ou issus de demandes d'avis, à constituer les cohortes, et à coordonner la collecte des échantillons et des données cliniques auprès des correspondants, permettant ainsi l'analyse de la méthylation.

Dans un second temps, nous avons mené une étude descriptive visant à comparer le profil mutationnel des carcinomes de Merkel viro-négatifs à celui des carcinomes neuroendocrines, en nous appuyant sur des données issues d'études de séquençage du génome complet. L'analyse s'est concentrée sur un panel des gènes les plus fréquemment mutés dans le carcinome de Merkel. Mon travail a notamment porté sur la classification des variants tumoraux.

Ce travail a été réalisé sous la direction du Dr Thibault Kervarrec, avec le concours du Professeur Andreas Von Deimling et son équipe, Université d'Heidelberg, Allemagne pour la mise à disposition et leurs compétences techniques pour l'analyse de la méthylation de l'ADN tumoral et l'application de l'algorithme t-SNE. Ce travail fait l'objet d'une soumission d'un article dans *Virchow Archiv*. L'étude du profil mutationnel a été également permise grâce à l'aide du Professeur Jaehyuk Choi, Université Northwestern, Chicago, Etats-Unis, et son équipe, particulièrement le Dr Yue Zhang, qui a fourni un accès exhaustif aux données sur les variants tumoraux issues de leur étude.

V- Methylation Profiling: a diagnostic tool for the identification of Merkel Cell Carcinoma of the lymph node without detectable skin primary tumor

Methylation Profiling: a diagnostic tool for the diagnosis of Merkel Cell Carcinoma of the lymph node without detectable skin primary tumor.

Running title: Methylation Profiling in Merkel cell carcinoma of the lymph node

Paul-Louis Chantreau¹ Mahtab Samimi^{2,3}, Matthias Tallegas^{1,4}, Anne Tallet⁴, Serge Guyetant^{1,4,5}, Benjamin Goeppert⁶, Maysa Al-Hussaini⁷, Ferdinand Toberer⁸, Nathalia Giese⁸, Stéphanie Roessler⁸, Andreas von Deimling⁸, Thibault Kervarrec^{1,2,5}

- (1) Department of Pathology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France
- (2) CARADERM network
- (3) Department of Dermatology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France
- (4) Platform of Somatic Tumor Molecular Genetics, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France
- (5) "Biologie des infections à polyomavirus" team, UMR INRA ISP 1282, Université de Tours, 37200 Tours, France
- (6) Institute of Pathology and Neuropathology, RKH Kliniken Ludwigsburg, Ludwigsburg, Germany.
- (7) Department of Pathology and Laboratory Medicine, King Hussein Cancer Center, Amman, Jordan.
- (8) Department of Neuropathology, Institute of Pathology, Ruprecht-Karls-University, Heidelberg, Germany.

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

Sources of support : Illumina grant

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

Corresponding author:

Dr. Thibault Kervarrec

Department of Pathology, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, 37044 TOURS Cedex 09

France. Tel : +33 (2) 47 47 80 69/Fax: +33 (2) 47 47 46 22

Email : thibaultkervarrec@yahoo.fr

Manuscript Word count (Excluding capsule summary, abstract, references, figures, and tables): 1498, Abstract: 143

List of attachments: Table 1; Figure 1

Key words: MCPyV; Merkel cell carcinoma; Differential diagnosis; Lymph nodes; Metastasis; Neuroendocrine carcinoma; Methylation profiling

Abstract

Background:

Merkel cell carcinoma (MCC) is an aggressive tumor mostly related to Merkel cell polyomavirus genomic integration. MCC can present either as a primary cutaneous tumor or as a lymph node metastasis without primary skin tumor (MCCWOPT). The distinction between MCCWOPT and lymph node metastases of non-cutaneous neuroendocrine carcinomas remains challenging. The present study aims to determine whether the methylation profile can distinguish MCCWOPT from lymph node metastases of extracutaneous neuroendocrine carcinomas.

Methods:

Methylation profiles of twenty MCCWOPT were compared to 23 cutaneous MCC, 37 small cell lung carcinomas, 17 and 34 well differentiated neuroendocrine tumors of the ileum and pancreas.

Results:

Among the controls, cutaneous MCC cases formed a cluster distinct from other extracutaneous neuroendocrine tumors. MCCWOPT clustered together with cutaneous MCC cases and seemed to be sorted according to their virus status.

Conclusion:

Methylation profiling represents a promising additional tool for the diagnosis of MCCWOPT.

Abbreviations

- CK: cytokeratin
- CT: computed tomography
- FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded
- LNMNEC: lymph node metastasis from neuroendocrine carcinoma
- MCC: Merkel cell carcinoma
- MCCWOPT: Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor
- MCPyV: Merkel cell polyomavirus
- NEC: neuroendocrine carcinoma
- NEN : neuroendocrine neoplasm
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PET : Positron Emission Tomography
- TTF-1: thyroid transcription factor 1

Introduction

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare skin tumor with poor outcome. The five-year overall survival rate is approximately 40%. It predominantly occurs in white populations and identified risk factors are advanced age, chronic exposure to ultraviolet radiation and immunosuppression(1).

Histologically, this neoplasm is composed of poorly differentiated tumor cells with high nucleocytoplasmic ratio and vesicular so called “salt and pepper” chromatin infiltrating the dermis or subcutaneous tissue. Immunohistochemically, the MCC tumor cells express both epithelial and neuroendocrine markers; thus the main differential diagnosis is metastasis from an extracutaneous high grade neuroendocrine carcinoma(1).

In 2008, Feng et al. identified the integration of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) genome as the main oncogenic driver of most MCC(2). MCPyV DNA genome as well as expression of the virus oncoprotein Large T antigen are detected by PCR and immunohistochemistry respectively in approximately 80% of MCC cases in the northern hemisphere(3). Beside MCPyV-induced tumor, the 20% of MCPyV-negative MCC harbor high tumor mutation burden, frequent *TP53* and *RB1* mutations as well as prominent UV signature(4).

In up to 15% of the cases, MCC appears as a lymph node metastasis without a detectable primary skin tumor (MCCWOPT). In this setting, distinguishing MCCWOPT from a lymph node metastasis of an extracutaneous neuroendocrine carcinoma (LNMNEC) might be a diagnosis challenge but has important implications for evaluation of patient prognosis and therapeutic management(5). In a previous study, our group identified seven criteria (named ELECTHIP criteria) to differentiate these two entities(5), evidence of MCPyV genome or Large T antigen expression in tumor cells being important diagnosis clues.

Methylation profiling represents an innovative approach to tumor classification due to the specificity of epigenetic signatures, which allow for the identification of distinct tumor groups. Methylation at CpG dinucleotides is regarded as a preserved marker of cell identity allowing to identify a cell of origin in tumors and therefore might contribute to an accurate tool for the classification of neoplastic tumor entities(6).

This study aims to determine whether the methylation profile can distinguish MCCWOPT cases, especially polyomavirus-negative tumors from extracutaneous neuroendocrine carcinomas.

Materials and methods

Patients and samples

MCCWOPT cases were selected from a historical and prospective multicentric French cohort of patients diagnosed with MCC between 1998 and 2024 (Local Ethics Committee in Human Research, Tours, France; ID RCB2009-A01056-51). The inclusion criteria for this cohort have been previously described(7). Only cases with available material for molecular analysis were considered for inclusion. Among them, MCCWOPT were identified as previously described(8). Twenty-three cases of cutaneous MCC (including 16 MCPyV-positive and 7 MCPyV-negative cases from the same cohort) randomly selected were included as controls. Thirty-seven cases of small cell neuroendocrine carcinomas, 17 well differentiated neuroendocrine tumors of the ileum and 34 well differentiated neuroendocrine tumors of the pancreas (insulinomas) were extracted from a pathology department's archives (Heidelberg, Germany).

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining for Chromogranin A, Cytokeratin 20, MCPyV TA/LT (AB3, CM2B4, 2T2), Synaptophysin and TTF1 was performed using a BenchMark XT Platform as previously described(9)

Viral status determination

The detection and quantification of Merkel cell polyomavirus DNA were carried out by a biologist (AT) who was blinded to clinical and immunohistochemical data. Genomic DNA was extracted from tissue samples using the Maxwell 16 Instrument (Promega) with the Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega). The LTA_g real-time PCR assay was conducted as previously described(10). Quantification was performed using the Δ Ct method, and results were expressed as the number of MCPyV copies per cell, with a threshold of 1.2 copies per cell serving as the cut-off.

Methylation analysis

Methylation profiling was performed using the methylation EPIC BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA); 300 ng of DNA were processed according to the manufacturer's protocol, as previously described(6). Data were generated at the Department of Neuropathology, University Hospital, Heidelberg. Computational analyses were conducted using R version 4.6.1 (<https://www.R-project.org>). The tSNE plot was generated based on the 10,000 most variable

cytosine–phosphate–guanine (CpG) sites according to standard deviation, with 3,000 iterations and a perplexity parameter set at 10.

Results

Patients' Characteristics

Among the Merkel cell carcinoma (MCC) cohort, 20 cases were considered as MCCWOPT and were included in this study. Characteristics of this population are available in **Table 1**. Briefly these cases showed no evidence of a primary neuroendocrine carcinoma of the skin or from other organs upon a comprehensive work-up, including physical examination of the skin and imaging studies (CT scan and/or 18-FDG-PET scan). The median age was 70.5 years (Q1–Q3: 64–77), 11 were men and 9 were women. The most frequent tumor locations were the groin area (70%) and head and neck (20%). In 90% of cases (n=18/20), the disease was localized, while two patients had metastatic disease at diagnosis, with mediastinal and cervical lymph node involvement, respectively. Follow-up data were available for all cases, with a median follow-up duration of 16.5 months (range: 1–119 months). During this period, one patient experienced local recurrence, five developed distant metastases, and five died from the disease.

Microscopically, all cases exhibited morphological features evocative of high grade neuroendocrine carcinomas. All cases were CK20-positive. Chromogranin A was expressed in 95% (19/20) of cases and synaptophysin in 85% (17/20). Two cases (10%) exhibited weak TTF-1 staining while the other did not express this marker. MCPyV genome was identified by PCR in 15 cases and accordingly large T expression was detected in all of these cases. Among the cohort, 18/20 cases harbored five or more of the ELECTHIP criteria previously described by our group to confirm the diagnosis of MCCWOPT (1, 14 and 3 patients with 5, 6 and 7 criteria respectively)(5).

Methylation profile analysis

To evaluate whether methylation analysis might contribute to the diagnosis of MCCWOPT, methylation profile of our cases was evaluated and compared to a control group consisting in 16 MCPyV-positive cutaneous MCC, 7 MCPyV-negative cutaneous MCC, 37 small cell neuroendocrine carcinomas, 17 and 34 well differentiated neuroendocrine tumors of the ileum and of the pancreas. Methylation profiling was successfully performed for 18 of our cases and tSNE analysis is available in **Figure 1**. (11). Importantly, among the controls, MCC cases formed a cluster distinct from the controls including small cell lung cancers, validating the accuracy of our approach. Interestingly MCPyV-positive cases were close but still distinct from MCPyV-negative cases, as previously described(11). MCCWOPT are located together with cutaneous MCC cases and seemed also to be classified according to their virus status.

Discussion

MCC is currently defined by the WHO classification as a primary neuroendocrine carcinoma of the skin(1). Accordingly, the metastasis of an extracutaneous neuroendocrine carcinoma remains the main differential diagnosis of MCC in current practice. In most of the cases, evaluation of the clinical setting - mainly skin examination and extension work up - as well as immunohistochemical characterization of the tumor allow the distinction between the two tumor entities(9).

Indeed, by contrast to the extracutaneous high grade neuroendocrine carcinomas for which no relevant immunohistochemical marker to predict the tumor origin is currently available, it is well established that Cytokeratin 20 as well as neurofilament and SATB2 expressions are observed in most of the MCC cases and are rarely detected in extracutaneous tumors(9). To note, POU4F3 was recently proposed as an additional relevant MCC marker in this setting(12).

From the molecular point of view, evidence of MCPyV genome as well as detection of large T expression by immunohistochemistry are strong arguments in favor of a cutaneous origin. By contrast, although an UV signature is frequent in MCPyV-negative MCC cases, including MCCWOPT(13), detection of such molecular features requires large panel sequencing not available in most of the centers in current practice. In this context in the present study, we demonstrated that methylation profile analysis could be an effective tool for distinguishing MCCWOPT - including MCPyV-negative cases - from metastatic extracutaneous neuroendocrine carcinomas.

This distinction is crucial for prognosis prediction and treatment. Notably, localized MCCWOPT are treated by lymph node dissection and radiotherapy, whereas patients with lymph node metastasis of extracutaneous neuroendocrine carcinomas receive chemotherapy. Moreover, it has been demonstrated that localized MCCWOPT cases treated by chemotherapy harbor a worse outcome than patients treated by surgery and radiotherapy(14).

Beside therapeutical management, our results might also contribute to our understanding of MCCWOPT pathogenesis by confirming results published by others(6,15). Indeed, previous detection of either MCPyV integration or mutations related to UV exposure in combinaison with brisk immune response in MCCWOPT (5,9,13) strongly suggests that MCCWOPT cases are actually lymph node metastasis of cutaneous MCC, either too small to be detected or experiencing complete regression. In line with this view, evidence of a common methylation profile between cutaneous and lymph node MCC cases also supports an epithelial origin of all MCC cases. To note, previous investigations by two independent groups of the methylation

profiles of MCPyV-positive and negative MCC cell lines were also in line with the view of a common ancestry for this tumor(6,15).

To conclude, although a validation on an independent cohort including a large number of controls would be required, our results suggest that methylation profile analysis could represent a relevant tool for MCCWOPT tumors including MCPyV-negative cases.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4	Case 5	Case 6	Case 7	Case 8	Case 9	Case 10	Case 11	Case 12	Case 13	Case 14	Case 15	Case 16	Case 17	Case 18	Case 19	Case 20
Clinical features																				
Age (years)	76	84	90	72	74	67	81	55	57	56	82	80	61	65	73	68	69	56	68	73
Sex	F	M	F	M	F	F	F	F	F	M	F	M	M	F	M	M	M	M	M	M
Location	Submandibular	Parotid	Mediastinum	Cervical	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Parotid	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Inguinal	Axillary
Skin Examination	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Extension	18-FDG-PET	18-FDG-PET	18-FDG-PET	18-FDG-PET	CT-scan	18-FDG-PET; CT-scan	18-FDG-PET	18-FDG-PET; CT-scan	18-FDG-PET	18-FDG-PET; Octreoscan	CT-scan	18-FDG-PET	18-FDG-PET; CT-scan	18-FDG-PET; CT-scan	CT-scan	18-FDG-PET	CT-scan	18-FDG-PET; CT-scan	18-FDG-PET	18-FDG-PET; CT-scan
Diagnosis	Localized	Localized	Diffuse	Diffuse	Localized	Localized	Bilateral localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized	Localized
Treatment	Radiotherapy	Surgical treatment	Chemotherapy; Radiotherapy	Chemotherapy	Surgical treatment; Radiotherapy	Surgical treatment; Radiotherapy	Chemotherapy	Surgical treatment	Surgical treatment	Surgical treatment	Radiotherapy	Surgical treatment	Surgical treatment; Radiotherapy	Surgical treatment	Surgical treatment; Radiotherapy	Surgical treatment; Radiotherapy	Surgical treatment; Radiotherapy	Chemotherapy; Radiotherapy	Chemotherapy	Radiotherapy
Follow-up	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis	apoptosis
Recurrence																				
Duration (months)	13	18	26	1	20	37	4	52	7	1	4	8	50	52	20	119	5	34	15	7
Status at last follow-up	Alive	Death	Alive	Alive	Alive	Alive	Death	Alive	Alive	Alive	Death	Alive	Alive	Alive	Death	Alive	Alive	Alive	Death	Alive
Immunohistochemical features	CK20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chromogranin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Synaptophysin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
TTF1	-	-	Weak	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Weak	-	-	-	-	-
AB3 MCPyV	-	NA	NA	NA	-	+	+	+	+	-	+	+	NA	+	NA	+	NA	+	-	-
Virological features																				
PCR	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+, Positive; -, absence; F, female; M, male; NA, not available.

Table 1. Clinical, immunomorphological and virologic features of the MCCWOPT.

Legends

Table 1. Clinical, immunomorphological and virologic features of the MCCWOPT.

+, Positive; –, absence; F, female; M, male; NA, not available.

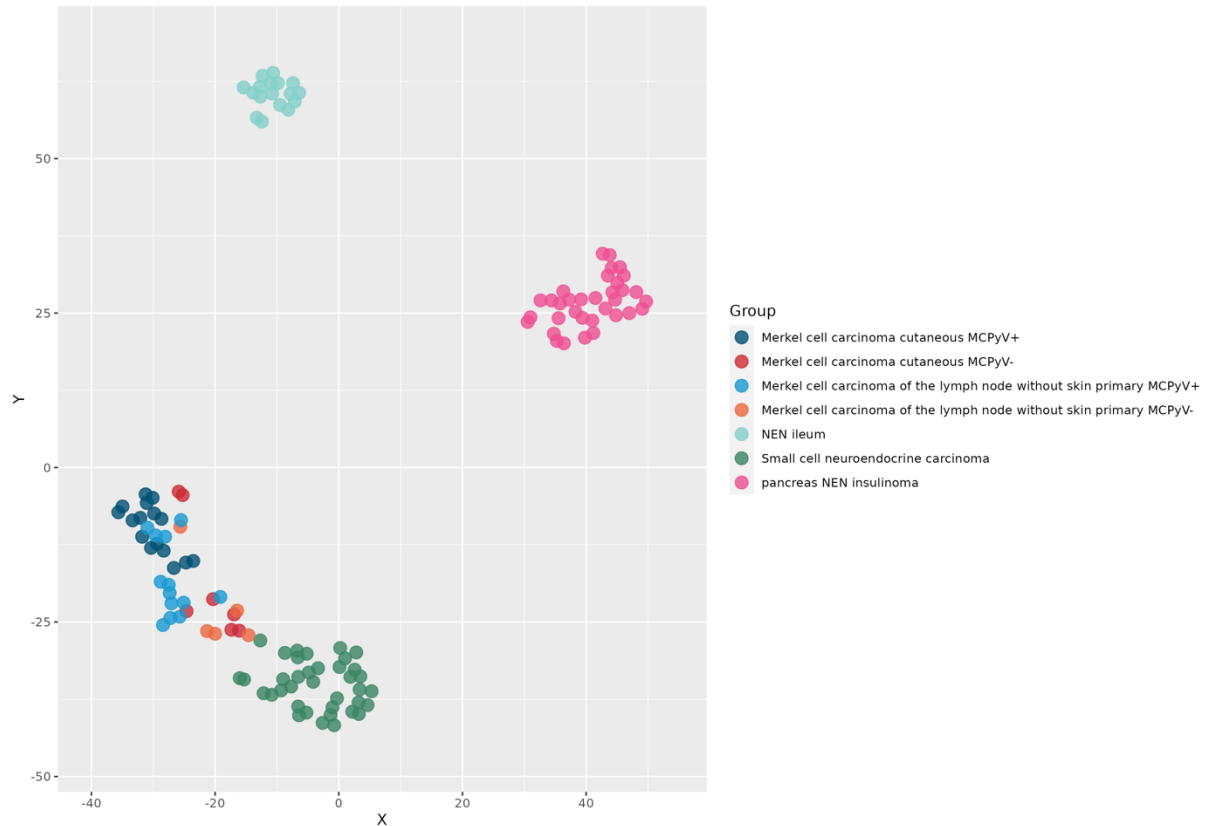


Figure 1. DNA methylation-based classification of MCCWOPT in comparison to cutaneous MCC, small cell lung carcinomas and well differentiated neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. Methylation profiling employing the Methylation EPIC BeadChip was performed with tumor DNA. The results are depicted in unsupervised clustering using t-SNE dimensionality reduction.

References

1. Busam KJ, Scolyer RA, Tetzlaff M, Kervarrec T et al. Merkel cell carcinoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Skin tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; forthcoming. . (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 12). <https://publications.iarc.fr>.
2. 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.
3. Kuwamoto S. Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*. août 2011;42(8):1063-77.
4. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu YM, Dhanasekaran SM, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res*. 15 sept 2015;75(18):3720-7.
5. Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, Le Gouge A, Beby-Defaux A, Le Corre Y, 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*. mai 2018;78(5):964-972.e3.
6. Gravemeyer J, Spassova I, Verhaegen ME, Dlugosz AA, Hoffmann D, Lange A, et al. DNA-methylation patterns imply a common cellular origin of virus- and UV-associated Merkel cell carcinoma. *Oncogene*. janv 2022;41(1):37-45.
7. Kervarrec T, Gaboriaud P, Berthon P, Zaragoza J, Schrama D, Houben R, et al. Merkel cell carcinomas infiltrated with CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome. *J Am Acad Dermatol*. mai 2018;78(5):973-982.e8.
8. de Biase D, Ragazzi M, Asioli S, Eusebi V. Extracutaneous Merkel cell carcinomas harbor polyomavirus DNA. *Hum Pathol*. juill 2012;43(7):980-5.
9. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestre-Storena-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*. avr 2019;32(4):499-510.
10. 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.
11. Gujar H, Mehta A, Li HT, Tsai YC, Qiu X, Weisenberger DJ, et al. Characterizing DNA methylation signatures and their potential functional roles in Merkel cell carcinoma. *Genome Med*. 16 août 2021;13(1):130.
12. Karpinski P, Mendez-Pena JE, Wu CL, Akalin A, Cornejo KM, Hung YP, et al. POU4F3 Is a Sensitive and Specific Marker of Merkel Cell Carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. janv 2025;38(1):100627.
13. Donizy P, Wróblewska JP, Dias-Santagata D, Woznica K, Biecek P, Mochel MC, et al. Merkel Cell Carcinoma of Unknown Primary: Immunohistochemical and Molecular Analyses Reveal Distinct UV-Signature/MCPyV-Negative and High Immunogenicity/MCPyV-Positive Profiles. *Cancers*. 31 mars 2021;13(7):1621.
14. Deneve JL, Messina JL, Marzban SS, Gonzalez RJ, Walls BM, Fisher KJ, et al. Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Ann Surg Oncol*. juill 2012;19(7):2360-6.
15. Harms PW, Verhaegen ME, Vo JN, Tien JC, Pratt D, Su F, et al. Viral Status Predicts the Patterns of Genome Methylation and Decitabine Response in Merkel Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. mars 2022;142(3 Pt A):641-52.

VI- Establishment of a restricted sequencing panel to distinguish Merkel cell polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma from small cell carcinoma of the lung

Establishment of a restricted sequencing panel to distinguish Merkel cell polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma from small cell carcinoma of the lung

Running title: Molecular Profiling of MCPyV-Negative MCC vs SCLC

Paul-Louis Chantreau¹, Paul-Jean Maternowski², Mahtab Samimi^{3,4}, Matthias Tallegas^{1,5}, Anne Tallet⁵, Serge Guyetant^{1,5,6}, Yue Zhang⁷, Jaehyuk Choi⁷, Thibault Kervarrec^{1,3,6}

(1) Department of Pathology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France

(2) Department of Gynecology, Centre Aliénor d'Aquitaine, Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

(3) CARADERM network

(4) Department of Dermatology, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France

(5) Platform of Somatic Tumor Molecular Genetics, Université de Tours, Centre Hospitalier Universitaire de Tours, 37044 Tours, France

(6) "Biologie des infections à polyomavirus" team, UMR INRA ISP 1282, Université de Tours, 37200 Tours, France

(7) Department of Dermatology, Yale School of Medicine, New Haven, CT, USA.

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

Sources of support: none.

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

Corresponding author:

Dr. Thibault Kervarrec

Department of Pathology, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, 37044 TOURS Cedex 09
France. Tel : +33 (2) 47 47 80 69/Fax: +33 (2) 47 47 46 22

Email : thibaultkervarrec@yahoo.fr

Manuscript Word count (Excluding capsule summary, abstract, references, figures, and tables): 1516, Abstract : 232

List of attachments: Tables: 2; Figures: 3; Supplementary files: 2

Key words: MCPyV; Merkel cell carcinoma; Differential diagnosis; Lymph node metastases; Neuroendocrine carcinoma; UV signature; Mutation profiling; Small cell lung carcinoma; Molecular diagnostics; Whole-genome sequencing

Abstract

Background:

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and aggressive neuroendocrine skin tumor associated with poor prognosis. Genomic integration of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is observed in 80% of the cases. Distinguishing MCPyV-negative MCC from extracutaneous neuroendocrine carcinomas, particularly small cell lung carcinoma (SCLC), might be challenging in current practice but is essential for appropriate therapeutic management.

Objective:

We aimed to establish a sequencing panel including a restricted number of genes to distinguish MCPyV-negative MCC from small cell lung carcinoma (SCLC).

Methods:

In this study, we analyzed and compared mutation profiles between MCPyV-negative MCC and SCLC using previously published whole-genome sequencing data. Mutation data for a panel of 35 frequently mutated genes in MCC were extracted and compared from available literature. Mutation types were further classified using genomic databases and validated through internal and external reference databases.

Results:

Our results demonstrated significantly higher mutation frequencies in MCPyV-negative MCC compared to SCLC for genes *ATM* ($p=0.014$), *KMT2A* ($p=0.004$), *KMT2D* ($p=0.001$), *NOTCH1* ($p=0.003$), and *NF1* ($p=0.011$). Although overall mutation frequencies in *RB1* and *TP53* were not significantly different between the two tumor types, UV-associated mutation types (C > T and CC > TT transitions) in these genes were significantly more frequent in MCC (p-values ranging from 0.02 to 10^{-8}). Specifically, CC > TT mutations exhibited a 100% specificity and positive predictive value for MCC diagnosis.

Conclusion:

Mutation profiling in a selected gene panel represents a promising additional tool for the diagnostic of MCPyV-negative MCCWOPT.

Abbreviations

- CK : cytokeratin
- LNMNEC: Lymph Node Metastasis of Non-cutaneous Neuroendocrine Carcinoma
- MCC: Merkel Cell Carcinoma
- MCCWOPT: Merkel Cell Carcinoma Without an Identifiable Primary Tumor
- MCPyV: Merkel Cell Polyomavirus
- NEC : Neuroendocrin carcinoma
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- SCLC: Small Cell Lung Carcinoma
- TTF-1 : Thyroid Transcription Factor 1
- UV: Ultraviolet
- WGS : Whole-genome sequencing

Introduction

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare and aggressive skin tumor characterized by poor prognosis, with a five-year overall survival rate of approximately 40%(1). It predominantly affects Caucasian populations and is associated with several established risk factors, such as advanced age, ultraviolet radiation exposure, and immunosuppression(2). Histologically, MCC presents as a high-grade neuroendocrine carcinoma characterized by small, round, blue cells infiltrating the dermis or subcutaneous tissue. Immunohistochemically, MCC tumor cells express both neuroendocrine and epithelial markers(3).

In 2008, Feng et al. identified the integration of Merkel cell polyomavirus (MCPyV) into tumor cells of most MCC cases(4). MCPyV DNA genome and the expression of the virus Large T antigen are detectable by PCR in approximately 80% of MCC cases(5,6), delineating two distinct molecular subgroups: MCPyV-positive and MCPyV-negative MCC.

Previous studies have demonstrated that MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas exhibit substantial differences in morphological and immunohistochemical profiles(7). While CK20 positivity and TTF-1 negativity are commonly employed markers in routine practice to differentiate MCC from extracutaneous neuroendocrine carcinomas, a higher frequency of “aberrant” immunophenotypes has been reported among MCPyV-negative tumors, complicating the diagnostic process(8–11). In about 15% of cases, MCC can initially presents as lymph node metastases without an identifiable primary skin tumor (MCCWOPT)(12). Histological examination of involved lymph nodes reveals features indistinguishable from metastases of non-cutaneous high-grade neuroendocrine carcinomas (LNMNEC). Differentiating MCCWOPT from lymph node metastases of extracutaneous neuroendocrine carcinomas remains challenging, particularly in MCPyV-negative cases and its therapeutic and prognostic impact is significant(13).

Mutational signatures are distinctive genetic change patterns that link to specific mutagenic factors encountered during a tumor's development. UV light is closely linked to a mutational signature known for its distinct propensity to cause C > T transitions and, to a lesser extent but with higher specificity, CC > TT transitions. MCPyV-negative Merkel cell carcinomas have been shown to exhibit UV mutational signatures which is not the case of neuroendocrine carcinoma. A high mutation burden has also been proved in MCPyV-negative Merkel cell carcinomas(14,15).

We aimed to establish a sequencing panel including a restricted number of genes to distinguish MCPyV-negative MCC from small cell lung carcinoma (SCLC).

Materials and methods

We conducted a comprehensive review of all published cases of MCPyV-negative Merkel cell carcinoma for which whole genome sequencing (WGS) have been made available between 2015 and 2024. Comparative genomic data from small cell lung carcinoma (SCLC) cases were sourced from the study by George et al.(16) (**Supplementary file 1**).

Clinicopathological characteristics of patients were extracted from the respective studies.

We selected a panel of 35 genes (*AKT1*, *APC*, *ARID1A*, *ATM*, *BAP1*, *BRAF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *EGFR*, *EP300*, *ERBB2*, *ERBB3*, *FBXW7*, *HRAS*, *KEAP1*, *KMT2A*, *KMT2C*, *KMT2D*, *MEN1*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NF1*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PTEN*, *RB1*, *SMAD4*, *SMARCA4*, *STK11*, *TP53*), representing the genes most frequently mutated in MCPyV-negative Merkel cell carcinomas and high grade NEC(14,16–22). Mutation data for these genes were extracted from each published study.

Mutations were classified using publicly available genomic databases, including Mobidetails, cBioPortal, and OncoKB, to assess their clinical significance. To minimize the risk of including constitutional alterations, only variants classified as pathogenic or likely pathogenic based on established criteria were selected, to ensure that the alterations were not constitutional. To corroborate our findings, mutation results were cross-referenced with an internal database from the Cancer Genomics Platform at the University Hospital of Tours.

Statistical analyses were performed using the Fisher's exact test to identify non-random differences in mutation frequencies between MCPyV-negative MCC and SCLC cases. A Mann-Whitney U test was performed to compare the number of mutations per patient. A two-sided P-value of < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Forty-three patients with MCPyV-negative MCC and available WGS data were identified from three published studies(14,19,20). Among patients with available clinical data (n=16), the median age was 77 years (Q1-Q3: 68–84), with a 2.2 sex-ratio (11 males and 5 females). For comparison, 110 SCLC patients were included, with a median age of 66 years (Q1-Q3: 59–70), with a 1.75 sex-ratio including 70 males and 40 females (**Table 1**).

In total, mutations were identified in 95% (41/43) of MCPyV-negative MCC cases and 94% (103/110) of SCLC cases (**Supplementary file 2**). On average, each patient harbored 3.6 mutations in MCC compared to 2.3 in SCLC ($p = 10^{-4}$). *TP53* (88.4%, and 93.6%; $p = 0.28$, in MCC and SCLC respectively) and *RB1* (62.8% and 75.5%; $p = 0.12$, in MCC and SCLC respectively) were the most common mutated genes in both groups (**Table 2; Figure 1**). In comparison to SCLC, MCPyV-negative MCC cases had higher mutation frequencies in *ATM* (9.3% vs 0%; $p = 0.004$), *KMT2A* (9.3% vs 0%; $p = 0.004$), *KMT2D* (14% vs 0%; $p = 0.001$), *NOTCH1* (23.3% vs 4.5%; $p = 0.003$), and *NF1* (11.6% vs 0.9%; $p = 0.011$). No gene was found to be significantly more frequently mutated in SCLC compared to MCPyV-negative MCC.

Among the mutations detected in the tested gene panel, 79/148 in MCPyV-negative MCC cases were C > T transitions, compared to 47/233 in SCLC cases ($p < 1 \times 10^{-11}$). Similarly, 25/148 detected mutations in MPCyV-negative MCC were CC > TT transitions, whereas no CC > TT mutations were observed among the 233 mutations identified in SCLC cases ($p < 1 \times 10^{-10}$).

More specifically, 16/28 *RB1* mutations identified were C > T transitions among MPCyV-negative MCC cases, whereas among SCLC cases, 19/85 *RB1* mutations were C > T ($p < 10^{-3}$). Similarly, among MCPyV-negative MCC cases, 26/56 *TP53* mutations detected were C > T transitions, while among SCLC cases, 19/106 *TP53* mutations were C > T ($p < 10^{-4}$).

Although the overall frequencies of *RB1* and *TP53* mutations did not significantly differ between SCLC and MCPyV-negative MCC patients, a higher proportion of MCC patients harbored C > T (35% vs. 17%; $p = 0.02$) and CC > TT (9% vs. 0%; $p = 0.006$) mutations in *RB1*, as well as in *TP53* (49% vs. 17%; $p < 10^{-4}$ and 30% vs. 0%; $p < 10^{-7}$, respectively) (**Figure 2 and 3**). Notably, in our study the presence of CC > TT mutations demonstrated a specificity and positive predictive value of 100% for distinguishing MCC from SCLC while the sensitivity was 42%.

In our panel, only 4 out of 110 SCLC patients had two or more C > T mutations, and none had CC > TT mutations. By contrast, we observed that the presence of two or more UV-related mutations (C > T or CC > TT) in specific genes (*ATM*, *KMT2A*, *KMT2D*, *NOTCH1*, *NF1*, *RB1*, and *TP53*) demonstrated a sensitivity of approximately 67.4%, a specificity of 98.2%, a positive predictive value of 93.6%, a negative predictive value of 88.5% and a positive likelihood ratio of 37 for distinguishing MCPyV-negative MCC from SCLC.

Discussion

MCC is classified by the World Health Organization as a primary neuroendocrine carcinoma of the skin(23). Consequently, metastatic extracutaneous neuroendocrine carcinoma remains an essential differential diagnosis in clinical practice. Generally, clinical evaluation, including thorough skin examination, imaging studies, and immunohistochemical analyses, allows accurate differentiation between these entities(7,8,24). However, some cases still remain misclassified, particularly when they exhibit “aberrant” immunohistochemical profiles(9–11).

From a molecular perspective, the presence of the MCPyV genome or expression of the large T antigen strongly supports a cutaneous origin. In contrast, MCPyV-negative MCC, including MCCWOPT, often exhibit UV-related mutation signatures(14,15,19,20). Nevertheless, detecting such signatures typically requires large comprehensive sequencing panels that are not routinely available in most clinical centers.

Our study strengthens the diagnostic potential of specific mutational signatures, highlighting that it is uncommon for patients with SCLC to harbor multiple UV-associated mutations (C > T or CC > TT mutations). Moreover, the presence of certain mutations appears relatively specific to MCPyV-negative MCC compared to SCLC, although their overall frequency remains low. *RB1* and *TP53* are frequently mutated in both tumors, yet the type and number of these mutations differ. By combining these parameters, we demonstrated a robust diagnostic yield.

These findings suggest the feasibility of utilizing a more focused and accessible genetic panel in routine clinical practice. Furthermore, our results indicate the potential for developing a diagnostic algorithm or scoring system combining criteria from the previously described ELECTHIP score(25) with molecular features such as the type, number, and specific gene involvement of mutations. Such an integrated algorithm could significantly improve diagnostic accuracy, particularly in challenging MCCWOPT cases and ultimately impact therapeutic decisions and patient management. MCCWOPT typically requires lymph node dissection and radiotherapy, whereas LNMNEC usually necessitates chemotherapy. Patients with

MCCWOPT receiving chemotherapy have poorer outcomes compared to those undergoing surgical resection followed by radiotherapy(13).

Despite the promising results, the main limitation of our study is the absence of validation in an independent cohort, which is necessary to confirm our findings. Additionally, the relatively small sample size and retrospective nature of the dataset highlight the need for further large-scale validation. Additionally, the mutation data were extracted from different studies with potential methodological heterogeneity. Finally, while we focused on functionally relevant mutations, further prospective studies are required to validate their integration into a standardized diagnostic workflow.

Our study reinforces the diagnostic potential of specific mutational signatures in MCPyV-negative MCC, particularly MCCWOPT, suggesting their practical utility for clinical diagnostics and patient management. Further validation of a simplified molecular panel could facilitate routine clinical application and significantly improve the differentiation and subsequent management of these challenging tumor entities.

Diagnosis	Cohort	Case	Sex	Age	Primary Site	Specimen Type	UICC stage
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	MO_1109	M	58	Head and neck	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	MO_1160	M	66	Unknown	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	MCC_274	M	65	Upper extremity	Primary	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	MCC_456	F	85	Upper extremity	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	MCC_611	M	78	Head and neck	Primary	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	METMCC_603	F	90	Head and neck	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	METMCC_624	M	53	Upper extremity	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Harms et al.	METMCC_627	M	76	Head and neck	Metastasis	-
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	1	M	83	Leg	Primary	IIIA
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	2	M	94	Ear	Primary	IV
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	3	M	74	Nose	Primary	IA
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	M	81	Face	Primary	IIA
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	F	78	Face	Primary	IV
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	F	92	Leg	Primary	IV
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	7	F	75	Face	Primary	IIA
MCPyV-negative MCC	Gonzalez-Vela et al.	13	M	69	Lip	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00022	M	47	Lung	Primary	IIIA
SCLC	George et al.	S00035	F	65	Lung	Primary	IV

SCLC	George et al.	S00050	M	47	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S00339	M	61	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S00356	F	54	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S00472	M	56	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S00501	F	55	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00539	F	66	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00825	M	59	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S00827	M	73	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S00829	M	63	Lung	Primary	IIa
SCLC	George et al.	S00830	F	51	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S00831	M	63	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00832	M	70	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S00833	F	77	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S00837	F	70	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S00838	M	73	Lung	Primary	IIlb
SCLC	George et al.	S00841	M	73	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S00842	M	46	Lung	Primary	IIlb
SCLC	George et al.	S00932	M	69	Lung	Primary	I
SCLC	George et al.	S00933	F	55	Lung	Primary	III
SCLC	George et al.	S00934	F	59	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00935	F	57	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00938	F	58	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00941	F	80	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00944	F	64	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00945	M	83	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S00947	M	71	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S01020	F	33	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S01022	M	78	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S01023	F	70	Lung	Primary	IIlb
SCLC	George et al.	S01170	M	71	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S01297	F	64	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S01366	M	68	Lung	Primary	IIlb
SCLC	George et al.	S01453	M	66	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S01494	F	58	Lung	Primary	IIa
SCLC	George et al.	S01512	M	64	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S01516	F	62	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S01524	M	77	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S01542	F	74	Lung	Primary	Ib

SCLC	George et al.	S01563	M	53	Lung	Primary	NA
SCLC	George et al.	S01578	M	76	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S01728	M	65	Lung	Primary	II
SCLC	George et al.	S01861	M	68	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S01864	M	52	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S01873	M	67	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02065	M	81	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02093	F	63	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02120	M	63	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02139	F	63	Lung	Primary	IIa
SCLC	George et al.	S02194	M	64	Pleura	Metastasis	IV
SCLC	George et al.	S02209	M	83	Lung	Primary	IB
SCLC	George et al.	S02219	M	NA	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02234	M	76	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02237	F	60	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02241	M	61	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02242	M	82	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02243	M	64	Lung	Primary	I
SCLC	George et al.	S02244	M	53	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02245	F	63	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02246	M	68	Lung	Primary	IIa
SCLC	George et al.	S02248	M	67	Lung	Primary	IIa
SCLC	George et al.	S02249	M	74	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02255	F	64	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02256	M	61	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02273	F	58	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02274	F	60	Lung	Primary	I
SCLC	George et al.	S02275	M	72	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S02277	F	67	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02279	M	58	Lung	Primary	IIb
SCLC	George et al.	S02284	M	66	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02285	M	83	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02286	M	68	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02287	M	62	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02289	F	58	Lung	Primary	IIla
SCLC	George et al.	S02290	M	61	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02291	F	65	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02292	M	71	Lung	Primary	IIb

SCLC	George et al.	S02293	M	61	Lung	Primary	Ila
SCLC	George et al.	S02294	F	61	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02295	M	53	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02296	M	70	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02297	M	68	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02299	M	51	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02322	F	70	Lung	Primary	Iib
SCLC	George et al.	S02328	M	63	Lung	Primary	IIib
SCLC	George et al.	S02342	F	75	Lung	Primary	Ila
SCLC	George et al.	S02344	F	70	Lung	Primary	IIib
SCLC	George et al.	S02347	F	67	Lymph node	Metastasis	Ila
SCLC	George et al.	S02348	M	66	Lung	Primary	IIia
SCLC	George et al.	S02350	M	76	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02351	M	57	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02352	M	67	Lung	Primary	Iib
SCLC	George et al.	S02353	M	47	Lung	Primary	IIia
SCLC	George et al.	S02354	M	70	Lung	Primary	IIia
SCLC	George et al.	S02355	M	68	Lung	Primary	IIia
SCLC	George et al.	S02360	M	57	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02375	F	75	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02376	F	57	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02378	F	70	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02382	M	59	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02384	F	69	Lung	Primary	IV
SCLC	George et al.	S02385	F	69	Lymph node	Metastasis	IV
SCLC	George et al.	S02397	F	48	Lung	Primary	Ia
SCLC	George et al.	S02398	M	62	Lung	Primary	Ila
SCLC	George et al.	S02400	M	44	Lung	Primary	Ila
SCLC	George et al.	S02401	M	72	Lung	Primary	IIia
SCLC	George et al.	S02402	M	57	Lung	Primary	Ib
SCLC	George et al.	S02403	M	76	Lung	Primary	Ila
SCLC	George et al.	S02404	M	75	Lung	Primary	Ila

Table 1: Clinicopathological features of MCPyV-negative MCC and SCLC. Informations from Goh et al. were unavailable.

	MCPyV MCC frequency	Positive	Total	SCLC frequency	Positive	Total
AKT1	5%	2	43	0%	0	110
APC	5%	2	43	1%	1	110
ARID1A	0%	0	43	4%	4	110
ATM	9%	4	43	0%	0	110
BAP1	5%	2	43	0%	0	110
BRAF	0%	0	43	1%	1	110
BRCA1	5%	2	43	1%	1	110
BRCA2	2%	1	43	1%	1	110
EGFR	0%	0	43	0%	0	110
EP300	2%	1	43	5%	6	110
ERBB2	2%	1	43	0%	0	110
ERBB3	5%	2	43	0%	0	110
FBXW7	0%	0	43	3%	3	110
HRAS	2%	1	43	0%	0	110
KMT2A	9%	4	43	0%	0	110
KMT2C	5%	2	43	0%	0	110
KMT2D	14%	6	43	0%	0	110
KEAP1	0%	0	43	1%	1	110
MEN1	0%	0	43	0%	0	110
MLH1	2%	1	43	0%	0	110
MSH2	2%	1	43	0%	0	110
MSH6	0%	0	43	1%	1	110
NOTCH1	23%	10	43	5%	5	110
NOTCH2	7%	3	43	3%	3	110
NOTCH3	2%	1	43	4%	4	110
NOTCH4	0%	0	43	0%	0	110
NF1	12%	5	43	1%	1	110
PIK3CA	7%	3	43	2%	2	110
PMS2	0%	0	43	0%	0	110
PTEN	2%	1	43	5%	6	110
RB1	63%	27	43	75%	83	110
SMAD4	0%	0	43	0%	0	110
SMARCA4	0%	0	43	0%	0	110
STK11	0%	0	43	0%	0	110
TP53	88%	38	43	94%	103	110

Table 2: Mutational profile of MCPyV-negative MCC and SCLC.

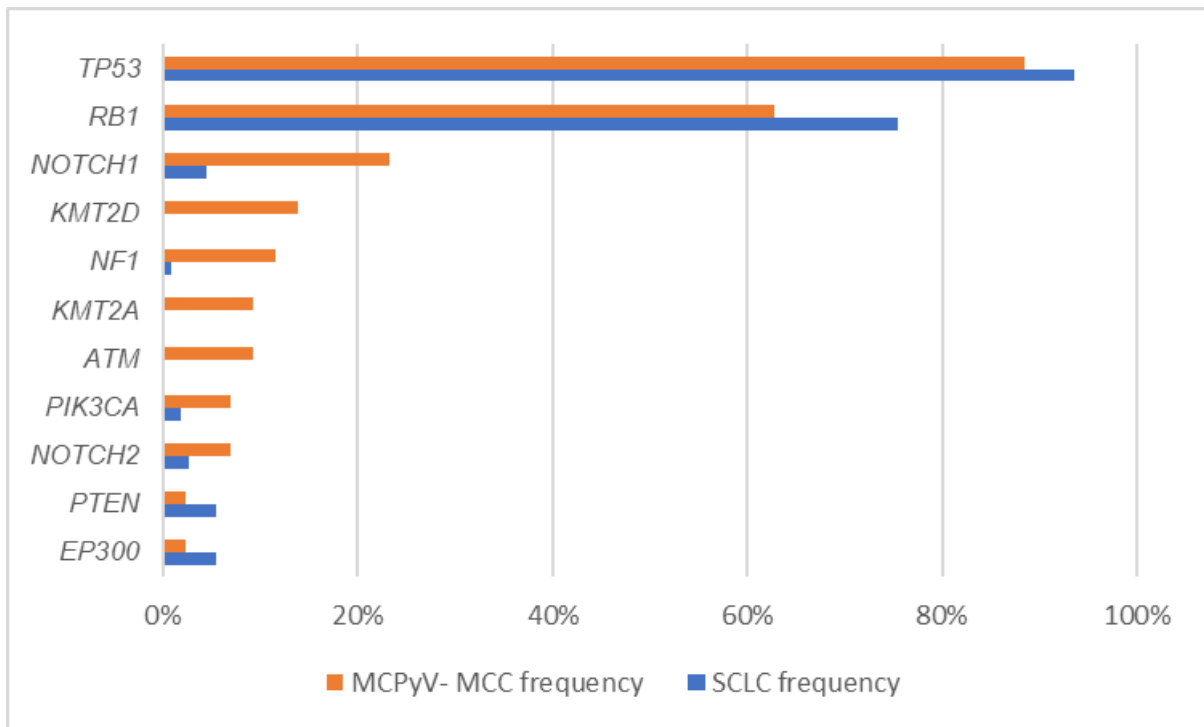


Figure 1: MCPyV-negative MCC and SCLC comparison. Only genes with a mutation frequency greater than 5% are displayed.

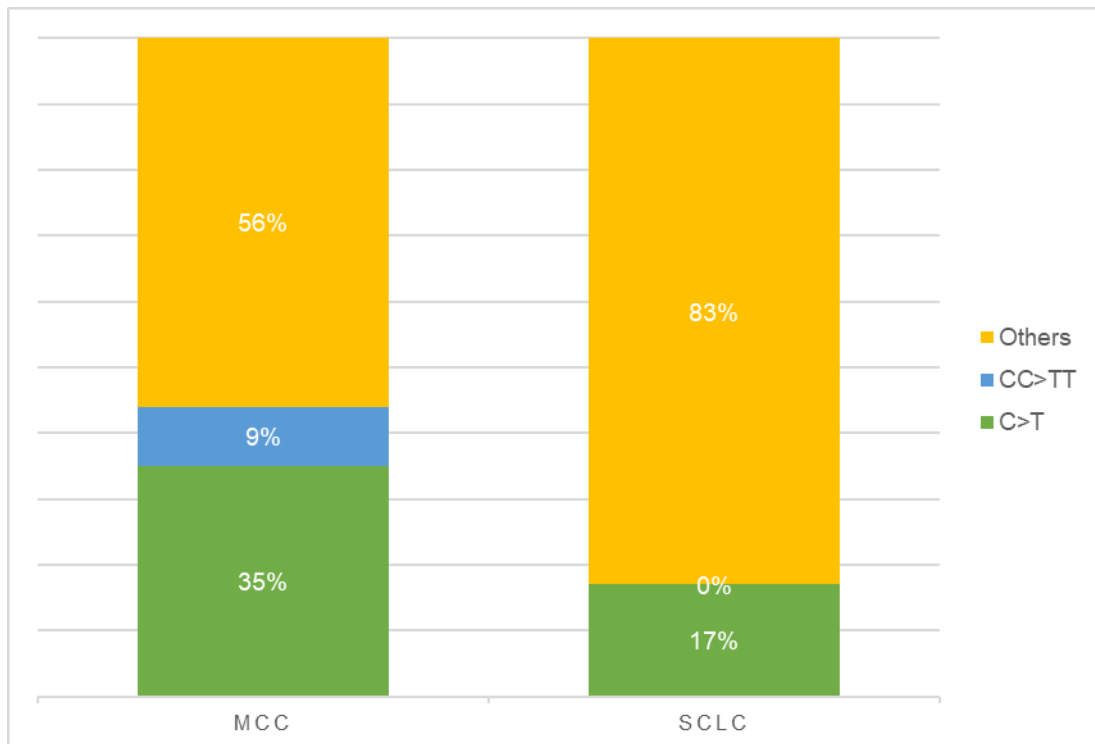


Figure 2: Specific *RB1* mutation types in MCPyV-negative MCC vs. SCLC patients.

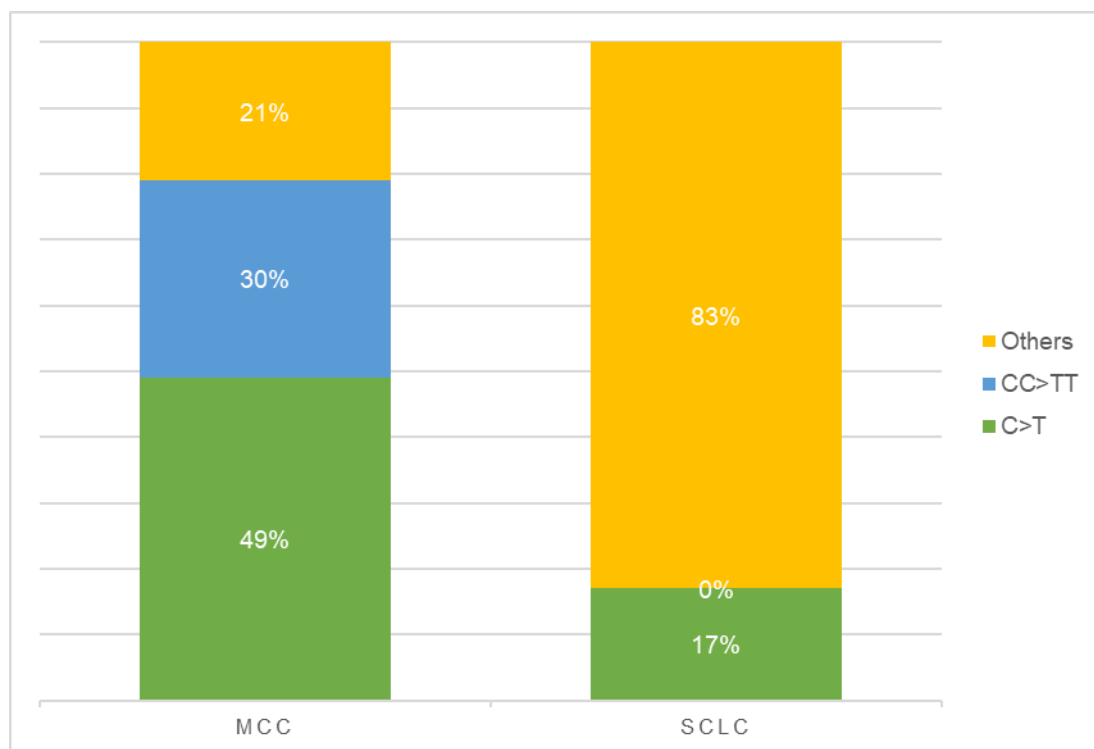


Figure 3: Specific *TP53* mutation types in MCPyV-negative MCC vs. SCLC patients.

References

1. 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.
2. Gauci ML, Aristei C, Becker JC, Blom A, Bataille V, Dreno B, et al. Diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma: European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2022. *Eur J Cancer.* août 2022;171:203-31.
3. LeBoit PE, World Health Organization. Pathology and genetics of skin tumours. Lyon: IARC Press, 2007.
4. 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.
5. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras M, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer.* 15 sept 2009;125(6):1243-9.
6. Kuwamoto S. Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* août 2011;42(8):1063-77.
7. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol.* nov 2019;32(11):1605-16.
8. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-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.* avr 2019;32(4):499-510.
9. Miner AG, Patel RM, Wilson DA, Procop GW, Minca EC, Fullen DR, et al. Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus. *Mod Pathol.* avr 2015;28(4):498-504.
10. Harms PW, Collie AMB, Hovelson DH, Cani AK, Verhaegen ME, Patel RM, et al. Next generation sequencing of Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma reveals ultraviolet-signature mutations and recurrent TP53 and RB1 inactivation. *Mod Pathol.* mars 2016;29(3):240-8.
11. Pasternak S, Carter MD, Ly TY, Doucette S, Walsh NM. Immunohistochemical profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* déc 2018;82:232-8.
12. Fields RC, Busam KJ, Chou JF, Panageas KS, Pulitzer MP, Allen PJ, et al. Five Hundred Patients With Merkel Cell Carcinoma Evaluated at a Single Institution. *Ann Surg.* sept 2011;254(3):465-75.
13. Deneve JL, Messina JL, Marzban SS, Gonzalez RJ, Walls BM, Fisher KJ, et al. Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Ann Surg Oncol.* juill 2012;19(7):2360-6.
14. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu YM, Dhanasekaran SM, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 15 sept 2015;75(18):3720-7.
15. Donizy P, Wróblewska JP, Dias-Santagata D, Woznica K, Biecek P, Mochel MC, et al. Merkel Cell Carcinoma of Unknown Primary: Immunohistochemical and Molecular Analyses Reveal Distinct UV-Signature/MCPyV-Negative and High Immunogenicity/MCPyV-Positive Profiles. *Cancers.* 31 mars 2021;13(7):1621.
16. George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretić L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature.* 6 août 2015;524(7563):47-53.
17. Van Riet J, Van De Werken HJG, Cuppen E, Eskens FALM, Tesselaar M, Van Veenendaal LM, et al. The genomic landscape of 85 advanced neuroendocrine neoplasms reveals subtype-heterogeneity and potential therapeutic targets. *Nat Commun.* 29 juill 2021;12(1):4612.
18. Knepper TC, Montesin M, Russell JS, Sokol ES, Frampton GM, Miller VA, et al. The Genomic Landscape of Merkel Cell Carcinoma and Clinicogenomic Biomarkers of Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy. *Clin Cancer Res.* 1 oct 2019;25(19):5961-71.
19. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 19 janv 2016;7(3):3403-15.
20. González-Vela MDC, Curiel-Olmo S, Derdak S, Beltran S, Santibañez M, Martínez N, et al. Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol.* janv

2017;137(1):197-206.

21. 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.
22. Chang MT, Penson A, Desai NB, Socci ND, Shen R, Seshan VE, et al. Small-Cell Carcinomas of the Bladder and Lung Are Characterized by a Convergent but Distinct Pathogenesis. *Clin Cancer Res*. 15 avr 2018;24(8):1965-73.
23. Busam KJ, Scolyer RA, Tetzlaff M, Kervarrec T et al. Merkel cell carcinoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Skin tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; forthcoming. . (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 12). <https://publications.iarc.fr>.
24. Thanguturi S, Tallet A, Miquelestre-Standley E, Coco C, Le Corre Y, Hainaut-Wierzbicka E, et al. Investigation of the RB1-SOX2 axis constitutes a tool for viral status determination and diagnosis in Merkel cell carcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol*. juin 2022;480(6):1239-54.
25. Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, Le Gouge A, Beby-Defaux A, Le Corre Y, 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*. mai 2018;78(5):964-972.e3.

Supplementary file 1: Methods for sequencing in each studies

Gonzalez-Vela et al.

Exome capture of the FFPE and fresh frozen samples. SureSelect Human All Exon V5 was used for regular genomic DNA, following the manufacturer's instructions (Agilent Technologies), and for FFPE material with minor modifications. In brief, 500- 3000 ng of genomic FFPE DNA was sheared on a Covaris™ E210 to a fragment size of 100-300 bp and size-selected. For samples that yielded fragments that were too small 7 under these conditions, the fragmentation time was subsequently shortened or no fragmentation was performed. Fragmented DNA was end-repaired, adenylated and ligated to sequencing adaptors. The DNA with adaptor-modified ends was pre-capture-amplified with 6-12 PCR cycles, using Herculanase II fusion DNA polymerase, as a function of the initial amount of the material. The PCR product was quality controlled in the 2100 Bioanalyzer with the DNA 7500 assay for the library size range of 200 to 350 bp (Agilent Technologies) and hybridized for 24 h at 65°C (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler). The hybridization mix was washed and the eluate was PCR amplified (16 cycles) to add the index tags using SureSelectXT Indexes for Illumina. The final library size and concentration were determined with the Bioanalyzer 7500 chip. Each library was sequenced using s TruSeq SBS Kit v3-HS (Illumina, Inc.), in pairedend mode with a read length of 2x101 bp. On average, 100x coverage for each sample was generated in a fraction of a HiSeq2000 sequencing lane following the manufacturer's protocol. Image analysis, base calling and quality scoring of the run were processed using the manufacturer's Real Time Analysis software (RTA 1.13.48, HCS 1.5.15.1) and followed by generation of FASTQ sequence files by CASAVA.

Goh et al.

The MCC tumor samples were deidentified formaldehyde fixed paraffin embedded (FFPE) archival specimens. Light microscopic evaluation was performed on a hematoxylin and eosin stained section of each FFPE tumor specimen for assessment of precent tumor nuclei and percent necrosis. Specimens with mixed differentiation, i.e. evidence of squamous and neuroendocrine differentiation, were excluded from the study. 2 mm cores were obtained that harbor > 80% tumor cells. Peripheral blood

mononuclear cells were used as normal controls. Genomic DNA was prepared using standard procedures. Exome capture was performed using the 2.1M NimbleGen exome reagent (Roche Nimblegen, Madison, WI). 75 base paired end sequencing on Illumina 2000 (Illumina, San Diego). Sequences were aligned to human genome build 37 with ELAND (Illumina, San Diego).

Harms et al.

In this study they generated 59 NGS libraries to characterize a total of 16 MCC patients from two different cohorts, namely MiOncoseq index cases and the validation cohort (Supplemental Tables S1 and S2). Exome libraries of tumor and matched normal genomic DNA and tumor RNA were generated using the Illumina TruSeq DNA Sample Prep Kit. RNA-seq libraries were prepared according to Illumina's TruSeq RNA protocol, using 2 ug total RNA. Following standard quality control measures, libraries were analyzed by RNAseq (polyA-transcriptome), exome capture-transcriptome, and/or exome capture-genome sequencing (Supplemental Table S1). Paired-end libraries were sequenced with the Illumina HiSeq 2000. Reads that passed the Illumina BaseCall software chastity filter were used for subsequent analysis. Sequence and alignment quality were assessed by FastQC and the Picard package, respectively.

George et al.

Nucleic acids were extracted from fresh-frozen tissue specimen which were processed to 15–30 sections each of 20 µm thickness at a cryostat maintaining a temperature of –20 °C (Leica). In the case of FFPE samples, 6–10 sections of 10 µm thickness were prepared. DNA was extracted from fresh-frozen tissues, EDTA blood, or FFPE samples using the Gentra Puregene DNA extraction kit (Qiagen) following the protocol of the manufacturer. DNA isolates were hydrated in TE-buffer and confirmed to be of high molecular weight (>10 kb) by agarose gel electrophoresis. Genomic DNA from fresh-frozen samples with evident signs of degradation were excluded from further sequencing studies. All sequencing reactions were performed on an Illumina HiSeq 2000 instrument (Illumina, San Diego, CA, USA). Whole-genome sequencing was performed with DNA extracted from fresh-frozen tumour and normal material. Short insert DNA libraries were prepared with the TruSeq DNA PCRfree sample preparation

kit (Illumina) for paired-end sequencing at a minimum read length of 2×100 bp. Human DNA libraries were sequenced with the aim to obtain a coverage of minimum 30× for both tumour and matched normal. Murine DNA libraries of tumour and matched normal were both sequenced to a coverage of 25×.

Supplementary file 2: Extracted variants

Diagnosis	Cohort	Case	Gene	RefSeq	Coding	Protein	Class
MCC	Goh et al.	MCC02	EGFR	NM_005228.5	c.638T>G	p.I213S	C3
MCC	Goh et al.	MCC02	KMT2A	NM_001197104.2	c.5703G>A	p.W1901*	C4
MCC	Goh et al.	MCC02	TP53	NM_000546.6	c.574C>T	p.Q192*	C5
MCC	Goh et al.	MCC02	TP53	NM_000546.6	c.742_743delinsTT	p.R248L	C4
MCC	Goh et al.	MCC02	RB1	NM_000321.3	c.764del	p.R255Qfs*9	C4
MCC	Goh et al.	MCC02	PIK3CA	NM_006218.4	c.2695C>T	p.R899C	C3
MCC	Goh et al.	MCC02	RB1	NM_000321.3	c.766G>A	p.G256S	C3
MCC	Goh et al.	MCC02	STK11	NM_000455.5	c.445C>T	p.P149S	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	APC	NM_000038.6	c.2714G>A	p.S905N	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	APC	NM_000038.6	c.7618C>T	p.P2540S	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	BRAF	NM_004333.6	c.2120T>A	p.F707Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	BRCA2	NM_000059.4	c.6215C>T	p.S2072F	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	EGFR	NM_005228.5	c.3287_3288delinsTT	p.S1096F	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	NF1	NM_001042492.3	c.4231C>T	p.L1411F	C4
MCC	Goh et al.	MCC03	KMT2A	NM_001197104.2	c.2564C>T	p.P855L	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	KMT2A	NM_001197104.2	c.2807C>T	p.S936F	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	TP53	NM_000546.6	c.574C>T	p.Q192*	C5
MCC	Goh et al.	MCC03	KMT2A	NM_001197104.2	c.3803A>T	p.E1268V	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	NF1	NM_001042492.3	c.430del	p.S144Lfs*21	C4
MCC	Goh et al.	MCC03	KMT2D	NM_003482.4	c.109C>T	p.H37Y	C2
MCC	Goh et al.	MCC03	MSH6	NM_000179.3	c.1168G>C	p.D390H	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	NF1	NM_001042492.3	c.3019C>T	p.H1007Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	NOTCH2	NM_024408.4	c.4112C>T	p.P1371L	C3
MCC	Goh et al.	MCC03	NOTCH3	NM_000435.3	c.4912G>A	p.E1638K	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	AKT1	NM_001382430.1	c.1432G>A	p.G478S	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	APC	NM_000038.6	c.281G>A	p.R94H	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	ARID1A	NM_006015.6	c.1348C>A	p.Q450K	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	BRCA1	NM_007294.4	c.1855C>A	p.H619N	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	KMT2A	NM_001197104.2	c.6575G>T	p.S2192I	C3
MCC	Goh et al.	MCC04	RB1	NM_000321.3	c.609_610delinsTT	p.E204*	C4
MCC	Goh et al.	MCC04	TP53	NM_000546.6	c.535C>T	p.H179Y	C4
MCC	Goh et al.	MCC04	TP53	NM_000546.6	c.528C>G	p.C176W	C4
MCC	Goh et al.	MCC04	NOTCH3	NM_000435.3	c.3455C>A	p.T1152K	C3
MCC	Goh et al.	MCC05	ATM	NM_000051.4	c.5072G>A	p.S1691N	C2
MCC	Goh et al.	MCC05	BRCA2	NM_000059.4	c.9239C>T	p.S3080F	C3
MCC	Goh et al.	MCC05	EP300	NM_001429.4	c.1441C>T	p.P481S	C3
MCC	Goh et al.	MCC05	KMT2C	NM_170606.3	c.12276+2T>A	p.X4092_splice	C3
MCC	Goh et al.	MCC05	RB1	NM_000321.3	c.1547G>A	p.W516*	C4
MCC	Goh et al.	MCC05	TP53	NM_000546.6	c.815T>A	p.V272E	C4
MCC	Goh et al.	MCC05	NOTCH1	NM_017617.5	c.1056_1057delinsTT	p.R353C	C3
MCC	Goh et al.	MCC05	SMARCA4	NM_003072.5	c.829_830delinsTT	p.P277F	C3
MCC	Goh et al.	MCC10	KMT2C	NM_170606.3	c.442_443delinsTT	p.G148L	C3
MCC	Goh et al.	MCC10	BAP1	NM_004656.4	c.2057-2A>T	p.X686_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	KMT2D	NM_003482.4	c.434G>A	p.W145*	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	RB1	NM_000321.3	c.2212-1G>A	p.X738_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	TP53	NM_000546.6	c.560-1_560delinsAA	p.X187_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	NOTCH2	NM_024408.4	c.2366-5_2377del	p.X789_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	TP53	NM_000546.6	c.602T>A	p.L201*	C4
MCC	Goh et al.	MCC10	NOTCH2	NM_024408.4	c.2804G>C	p.C935S	C3
MCC	Goh et al.	MCC10	NOTCH2	NM_024408.4	c.3657C>T	p.G1219=	C2
MCC	Goh et al.	MCC11	APC	NM_000038.6	c.4216C>G	p.Q1406E	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	APC	NM_000038.6	c.4319C>T	p.P1440L	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	BAP1	NM_004656.4	c.134G>A	p.G45E	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	BRCA2	NM_000059.4	c.139G>A	p.A47T	C2
MCC	Goh et al.	MCC11	KMT2C	NM_170606.3	c.14086C>T	p.L4696F	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	KMT2D	NM_003482.4	c.6121C>T	p.R2041C	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	BRCA1	NM_007294.4	c.2728C>T	p.Q910*	C5
MCC	Goh et al.	MCC11	MSH2	NM_000251.3	c.2509C>T	p.P837S	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	NF1	NM_001042492.3	c.3790G>A	p.E1264K	C4
MCC	Goh et al.	MCC11	NF1	NM_001042492.3	c.2699_2700delinsTT	p.S900F	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	NF1	NM_001042492.3	c.3367G>A	p.E1123K	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	RB1	NM_000321.3	c.1128-1_1128delinsAA	p.X376_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC11	TP53	NM_000546.6	c.467G>C	p.R156P	C4
MCC	Goh et al.	MCC11	PIK3CA	NM_006218.4	c.3049G>C	p.D1017H	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	SMAD4	NM_005359.6	c.611C>T	p.S204F	C3
MCC	Goh et al.	MCC11	SMARCA4	NM_003072.5	c.340G>A	p.D114N	C3
MCC	Goh et al.	MCC21	ATM	NM_000051.4	c.3577-7C>T		C2
MCC	Goh et al.	MCC21	EP300	NM_001429.4	c.4895C>G	p.T1632R	C3
MCC	Goh et al.	MCC21	HRAS	NM_005343.4	c.196G>A	p.A66T	C3
MCC	Goh et al.	MCC21	NF1	NM_001042492.3	c.8161-8C>T		C2

MCC	Goh et al.	MCC21	RB1	NM_000321.3	c.1499-1_1499delinsAA	p.X500_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC21	TP53	NM_000546.6	c.741_742delinsTT	p.R248W	C4
MCC	Goh et al.	MCC21	NOTCH1	NM_017617.5	c.3681_3682delinsTT	p.P1228S	C3
MCC	Goh et al.	MCC22	APC	NM_000038.6	c.2300A>C	p.Q767P	C3
MCC	Goh et al.	MCC22	ATM	NM_000051.4	c.730G>T	p.A244S	C3
MCC	Goh et al.	MCC22	BRCA2	NM_000059.4	c.243C>A	p.F81L	C3
MCC	Goh et al.	MCC22	EP300	NM_001429.4	c.4617+8C>G		C2
MCC	Goh et al.	MCC22	KMT2A	NM_001197104.2	c.10621C>T	p.P3541S	C2
MCC	Goh et al.	MCC22	KMT2A	NM_001197104.2	c.2986dup	p.S996Fs*2	C4
MCC	Goh et al.	MCC22	MLH1	NM_001370259.2	c.1975C>T	p.R659*	C5
MCC	Goh et al.	MCC22	NF1	NM_001042492.3	c.2033del	p.P678Rfs*10	C4
MCC	Goh et al.	MCC22	RB1	NM_000321.3	c.2548C>T	p.Q850*	C5
MCC	Goh et al.	MCC22	TP53	NM_000546.6	c.1023_1024delinsTT	p.R342*	C5
MCC	Goh et al.	MCC22	TP53	NM_000546.6	c.375_375+1delinsAA	p.X125_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	ERBB3	NM_001982.4	c.974G>A	p.G325E	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	KEAP1	NM_203500.2	c.989C>T	p.T330I	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	KMT2A	NM_001197104.2	c.1259G>A	p.R420Q	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	KMT2A	NM_001197104.2	c.6668C>T	p.S2223F	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	KMT2A	NM_001197104.2	c.7627A>G	p.K2543E	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	KMT2D	NM_003482.4	c.7876C>T	p.P2626S	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH1	NM_017617.5	c.5701G>A	p.E1901K	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH2	NM_024408.4	c.6028-1_6028delinsAA	p.X2010_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	KMT2D	NM_003482.4	c.401-1G>A	p.X134_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH1	NM_017617.5	c.6083-1_6083delinsAA	p.X2028_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	TP53	NM_000546.6	c.201_220del	p.E68Pfs*74	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	TP53	NM_000546.6	c.93del	p.L32Cfs*12	C4
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH2	NM_024408.4	c.4412C>T	p.P1471L	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH3	NM_000435.3	c.3400G>A	p.G1134R	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH3	NM_000435.3	c.6716C>T	p.P2239L	C3
MCC	Goh et al.	MCC26	NOTCH4	NM_004557.4	c.2107G>A	p.G703R	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	BRCA2	NM_000059.4	c.5375C>T	p.S1792F	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	BRCA2	NM_000059.4	c.8312C>T	p.P2771L	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	MSH6	NM_000179.3	c.2491C>T	p.P831S	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	NOTCH1	NM_017617.5	c.1057C>G	p.R353G	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	NOTCH1	NM_017617.5	c.4234T>C	p.Y1412H	C3
MCC	Goh et al.	MCC27	MSH2	NM_000251.3	c.547C>T	p.Q183*	C5
MCC	Goh et al.	MCC27	NOTCH1	NM_017617.5	c.370del	p.E124Sfs*153	C4
MCC	Goh et al.	MCC27	TP53	NM_000546.6	c.589G>A	p.V197M	C4
MCC	Goh et al.	MCC27	TP53	NM_000546.6	c.742C>T	p.R248W	C5
MCC	Goh et al.	MCC27	TP53	NM_000546.6	c.832_833delinsTT	p.P278F	C4
MCC	Goh et al.	MCC27	NOTCH3	NM_000435.3	c.2416C>G	p.R806G	C3
MCC	Goh et al.	MCC28	BAP1	NM_004656.4	c.580G>A	p.G194R	C3
MCC	Goh et al.	MCC28	EGFR	NM_005228.5	c.2944C>T	p.Q982*	C3
MCC	Goh et al.	MCC28	KMT2D	NM_003482.4	c.16418T>A	p.I5473N	C3
MCC	Goh et al.	MCC28	NF1	NM_001042492.3	c.2376_2391del	p.N793Kfs*23	C4
MCC	Goh et al.	MCC28	KMT2A	NM_001197104.2	c.7144C>T	p.R2382*	C4
MCC	Goh et al.	MCC28	RB1	NM_000321.3	c.1499-1G>A	p.X500_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC28	TP53	NM_000546.6	c.832_833delinsTT	p.P278F	C4
MCC	Goh et al.	MCC29	AKT1	NM_001382430.1	c.967G>A	p.D323N	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	BAP1	NM_004656.4	c.1300G>C	p.D434H	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	BRAF	NM_004333.6	c.350T>G	p.M117R	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	EGFR	NM_005228.5	c.152T>A	p.L51H	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	EP300	NM_001429.4	c.7022C>T	p.S2341F	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	ERBB3	NM_001982.4	c.2878G>C	p.E960Q	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	KMT2A	NM_001197104.2	c.3896C>T	p.S1299F	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	KMT2C	NM_170606.3	c.11588C>T	p.P3863L	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	KMT2D	NM_003482.4	c.12550G>A	p.G4184S	C2
MCC	Goh et al.	MCC29	NOTCH2	NM_024408.4	c.3679G>A	p.D1227N	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	NOTCH3	NM_000435.3	c.5767G>A	p.E1923K	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	NOTCH3	NM_000435.3	c.5914-5C>G		C3
MCC	Goh et al.	MCC29	APC	NM_000038.6	c.6014C>G	p.S2005*	C4
MCC	Goh et al.	MCC29	PIK3CA	NM_006218.4	c.1624G>A	p.E542K	C5
MCC	Goh et al.	MCC29	RB1	NM_000321.3	c.1696-1G>A	p.X566_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC29	TP53	NM_000546.6	c.1024C>T	p.R342*	C5
MCC	Goh et al.	MCC29	TP53	NM_000546.6	c.833C>T	p.P278L	C4
MCC	Goh et al.	MCC29	RB1	NM_000321.3	c.1615G>C	p.E539Q	C3
MCC	Goh et al.	MCC29	TP53	NM_000546.6	c.101C>T	p.P34L	C3
MCC	Goh et al.	MCC31	NOTCH3	NM_000435.3	c.472G>A	p.D158N	C3
MCC	Goh et al.	MCC31	TP53	NM_000546.6	c.811G>A	p.E271K	C4
MCC	Goh et al.	MCC31	RB1	NM_000321.3	c.940-6_940-3del		C3
MCC	Goh et al.	MCC32	BRCA1	NM_007294.4	c.1274C>T	p.S425F	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	EGFR	NM_005228.5	c.924_925delinsTT	p.R309*	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	EP300	NM_001429.4	c.1607C>T	p.A536V	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	KMT2C	NM_170606.3	c.13180C>T	p.P4394S	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	KMT2C	NM_170606.3	c.1495_1496delinsTT	p.P499L	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	NF1	NM_001042492.3	c.3092T>A	p.F1031Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	PMS2	NM_000535.7	c.1697C>T	p.P566L	C3
MCC	Goh et al.	MCC32	PTEN	NM_000314.8	c.1030A>T	p.K344*	C4

MCC	Goh et al.	MCC32	RB1	NM_000321.3	c.1187del	p.P396Lfs*5	C4
MCC	Goh et al.	MCC32	NOTCH1	NM_017617.5	c.1093C>T	p.R365C	C4
MCC	Goh et al.	MCC32	TP53	NM_000546.6	c.375_375+1delinsAA	p.X125_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC32	TP53	NM_000546.6	c.742C>T	p.R248W	C5
MCC	Goh et al.	MCC33	NOTCH2	NM_024408.4	c.1147C>T	p.P383S	C3
MCC	Goh et al.	MCC33	NOTCH3	NM_000435.3	c.478G>T	p.D160Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC33	NOTCH3	NM_000435.3	c.487C>T	p.R163W	C3
MCC	Goh et al.	MCC33	NOTCH1	NM_017617.5	c.5509C>T	p.Q1837*	C4
MCC	Goh et al.	MCC33	RB1	NM_000321.3	c.1411C>T	p.Q471*	C5
MCC	Goh et al.	MCC33	TP53	NM_000546.6	c.741_742delinsTT	p.R248W	C5
MCC	Goh et al.	MCC34	ATM	NM_000051.4	c.8443G>A	p.E2815K	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	BRCA1	NM_007294.4	c.3632C>T	p.S1211F	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	BRCA2	NM_000059.4	c.4529C>T	p.P1510L	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	EP300	NM_001429.4	c.2788C>T	p.P930S	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	KMT2C	NM_170606.3	c.14588A>G	p.E4863G	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	KMT2C	NM_170606.3	c.7312C>T	p.P2438S	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	KMT2D	NM_003482.4	c.3368C>T	p.A1123V	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	NF1	NM_001042492.3	c.5740A>T	p.T1914S	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	NOTCH2	NM_024408.4	c.2182C>T	p.P728S	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	RB1	NM_000321.3	c.1346G>A	p.G449E	C3
MCC	Goh et al.	MCC34	BRCA2	NM_000059.4	c.4518_4519delinsTT	p.Q1507*	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	ERBB3	NM_001982.4	c.1330C>T	p.R444*	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	NOTCH1	NM_017617.5	c.4663G>T	p.E1555*	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	RB1	NM_000321.3	c.983del	p.N328Lfs*4	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	ATM	NM_000051.4	c.6923_6924delinsTT	p.A2308V	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	KMT2D	NM_003482.4	c.1285C>T	p.Q429*	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	KMT2D	NM_003482.4	c.7228C>T	p.R2410*	C5
MCC	Goh et al.	MCC34	NF1	NM_001042492.3	c.3655G>A	p.G1219R	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	NOTCH1	NM_017617.5	c.6101G>A	p.W2034*	C4
MCC	Goh et al.	MCC34	TP53	NM_000546.6	c.724T>C	p.C242R	C4
MCC	Goh et al.	MCC35	BRCA1	NM_007294.4	c.1090C>T	p.P364S	C3
MCC	Goh et al.	MCC35	KMT2D	NM_003482.4	c.8012G>A	p.G2671D	C3
MCC	Goh et al.	MCC35	NOTCH3	NM_000435.3	c.6108_6109delinsTT	p.H2037Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC35	AKT1	NM_001382430.1	c.484G>A	p.G162S	C4
MCC	Goh et al.	MCC35	TP53	NM_000546.6	c.741_742delinsTT	p.R248W	C5
MCC	Goh et al.	MCC36	EP300	NM_001429.4	c.4148C>T	p.S1383F	C3
MCC	Goh et al.	MCC36	KMT2C	NM_170606.3	c.13751G>A	p.R4584Q	C3
MCC	Goh et al.	MCC36	KMT2D	NM_003482.4	c.13629C>A	p.D4543E	C3
MCC	Goh et al.	MCC36	NF1	NM_001042492.3	c.7886A>T	p.Y2629F	C3
MCC	Goh et al.	MCC36	KMT2C	NM_170606.3	c.6609T>G	p.Y2203*	C4
MCC	Goh et al.	MCC36	RB1	NM_000321.3	c.1351_1360del	p.R451Tfs*3	C4
MCC	Goh et al.	MCC36	KMT2D	NM_003482.4	c.15286C>T	p.Q5096*	C4
MCC	Goh et al.	MCC36	TP53	NM_000546.6	c.375+1G>A	p.X125_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC37	ERBB3	NM_001982.4	c.3334G>T	p.V1112L	C3
MCC	Goh et al.	MCC37	KMT2A	NM_001197104.2	c.1339_1340delinsTT	p.P447L	C3
MCC	Goh et al.	MCC37	KMT2A	NM_001197104.2	c.3778G>A	p.E1260K	C3
MCC	Goh et al.	MCC37	NOTCH1	NM_017617.5	c.5891C>G	p.P1964R	C3
MCC	Goh et al.	MCC37	NOTCH2	NM_024408.4	c.3584C>T	p.P1195L	C3
MCC	Goh et al.	MCC37	RB1	NM_000321.3	c.1510C>T	p.Q504*	C5
MCC	Goh et al.	MCC37	TP53	NM_000546.6	c.1041del	p.L348Wfs*22	C4
MCC	Goh et al.	MCC37	TP53	NM_000546.6	c.94del	p.L32Cfs*12	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	ARID1A	NM_006015.6	c.3157C>T	p.R1053C	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	BRCA2	NM_000059.4	c.129T>A	p.N43K	C2
MCC	Goh et al.	MCC39	BRCA2	NM_000059.4	c.7594C>T	p.P2532S	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	KMT2A	NM_001197104.2	c.739G>A	p.G247R	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	KMT2C	NM_170606.3	c.14344G>A	p.G4782R	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	KMT2C	NM_170606.3	c.6277C>T	p.P2093S	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	KMT2D	NM_003482.4	c.14623A>G	p.I4875V	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	NOTCH3	NM_000435.3	c.361G>A	p.D121N	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	RB1	NM_000321.3	c.234_235delinsAA	p.W78_E79delins*ns*	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	SMARCA4	NM_003072.5	c.3992_3993delinsTT	p.P1331L	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	SMARCA4	NM_003072.5	c.932C>T	p.P311L	C3
MCC	Goh et al.	MCC39	BAP1	NM_004656.4	c.2104C>T	p.Q702*	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	ERBB2	NM_004448.4	c.2308-1G>A	p.X770_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	HRAS	NM_005343.4	c.34G>A	p.G12S	C5
MCC	Goh et al.	MCC39	NOTCH1	NM_017617.5	c.2027del	p.N676Tfs*96	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	NOTCH1	NM_017617.5	c.5651del	p.P1884Rfs*3	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	RB1	NM_000321.3	c.1333-2A>G	p.X445_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC39	ATM	NM_000051.4	c.5188C>T	p.R1730*	C5
MCC	Goh et al.	MCC39	KMT2D	NM_003482.4	c.2371C>T	p.Q791*	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	TP53	NM_000546.6	c.1040_1041delinsTA	p.A347V	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	TP53	NM_000546.6	c.375G>A	p.T125=	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	TP53	NM_000546.6	c.572C>T	p.P191L	C4
MCC	Goh et al.	MCC39	TP53	NM_000546.6	c.832C>T	p.P278S	C4
MCC	Goh et al.	MCC42	TP53	NM_000546.6	c.396G>T	p.K132N	C4
MCC	Goh et al.	MCC43	ERBB2	NM_004448.4	c.1738-5C>T		C2
MCC	Goh et al.	MCC43	NOTCH4	NM_004557.4	c.822G>T	p.E274D	C3
MCC	Goh et al.	MCC43	PMS2	NM_000535.7	c.721C>T	p.P241S	C3
MCC	Goh et al.	MCC43	RB1	NM_000321.3	c.2535_2536delinsTT	p.Q846*	C4
MCC	Goh et al.	MCC43	TP53	NM_000546.6	c.856G>A	p.E286K	C4

MCC	Goh et al.	MCC44	ARID1A	NM_006015.6	c.1894C>T	p.L632F	C2
MCC	Goh et al.	MCC44	ATM	NM_000051.4	c.186-4G>A		C2
MCC	Goh et al.	MCC44	BRCA2	NM_000059.4	c.8084C>T	p.S2695L	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	ERBB2	NM_004448.4	c.1519G>A	p.E507K	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	ERBB2	NM_004448.4	c.262C>G	p.H88D	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	ERBB3	NM_001982.4	c.1843G>A	p.E615K	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	FBXW7	NM_001349798.2	c.1084G>A	p.D362N	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	KMT2C	NM_170606.3	c.13751G>T	p.R4584L	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	KMT2D	NM_003482.4	c.13018C>T	p.H4340Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	MEN1	NM_001370259.2	c.113_114delinsAT	p.S38Y	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	NF1	NM_001042492.3	c.587-4C>T		C3
MCC	Goh et al.	MCC44	NOTCH3	NM_000435.3	c.5083G>A	p.E1695K	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	NOTCH3	NM_000435.3	c.5089G>A	p.V1697M	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	SMAD4	NM_005359.6	c.1140-6C>T		C2
MCC	Goh et al.	MCC44	SMARCA4	NM_003072.5	c.1932G>C	p.E644D	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	SMARCA4	NM_003072.5	c.323_324delinsTT	p.P108L	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	SMARCA4	NM_003072.5	c.3850G>A	p.D1284N	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	SMARCA4	NM_003072.5	c.4221G>C	p.K1407N	C3
MCC	Goh et al.	MCC44	ERBB3	NM_001982.4	c.2552C>A	p.A851E	C4
MCC	Goh et al.	MCC44	NOTCH2	NM_024408.4	c.5214-1G>C	p.X1738_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC44	NOTCH1	NM_017617.5	c.1216G>A	p.G406S	C4
MCC	Goh et al.	MCC44	TP53	NM_000546.6	c.843_844delinsTT	p.R282W	C4
MCC	Goh et al.	MCC47	APC	NM_000038.6	c.3625G>A	p.E1209K	C3
MCC	Goh et al.	MCC47	BRCA2	NM_000059.4	c.68-6A>T		C2
MCC	Goh et al.	MCC47	ERBB3	NM_001982.4	c.2062G>A	p.E688K	C3
MCC	Goh et al.	MCC47	NOTCH1	NM_017617.5	c.3781_3782delinsAA	p.G1261N	C3
MCC	Goh et al.	MCC47	NOTCH4	NM_004557.4	c.146G>A	p.G49E	C3
MCC	Goh et al.	MCC47	PTEN	NM_000314.8	c.611C>T	p.P204L	C3
MCC	Goh et al.	MCC47	HRAS	NM_005343.4	c.34_35delinsAA	p.G12N	C4
					c.1128-		
MCC	Goh et al.	MCC47	RB1	NM_000321.3	1_1128delinsAA	p.X376_splice	C5
MCC	Goh et al.	MCC47	TP53	NM_000546.6	c.839G>A	p.R280K	C5
MCC	Goh et al.	MCC48	AKT1	NM_001382430.1	c.433G>C	p.V145L	C3
MCC	Goh et al.	MCC48	ARID1A	NM_006015.6	c.3605G>A	p.R1202Q	C2
MCC	Goh et al.	MCC48	EP300	NM_001429.4	c.3226C>T	p.R1076C	C3
MCC	Goh et al.	MCC48	NOTCH3	NM_000435.3	c.3197G>A	p.S1066N	C3
MCC	Goh et al.	MCC48	RB1	NM_000321.3	c.871G>T	p.V291F	C3
MCC	Goh et al.	MCC48	SMARCA4	NM_003072.5	c.1165_1166delinsTT	p.P389F	C3
MCC	Goh et al.	MCC48	RB1	NM_000321.3	c.870dup	p.V291Cfs*19	C4
MCC	Goh et al.	MCC48	TP53	NM_000546.6	c.839G>A	p.R280K	C5
MCC	Goh et al.	MCC48	TP53	NM_000546.6	c.856G>A	p.E286K	C4
MCC	Goh et al.	MCC54	BRCA1	NM_007294.4	c.1675G>A	p.G559S	C3
MCC	Goh et al.	MCC54	BRCA1	NM_007294.4	c.3910G>A	p.E1304K	C3
MCC	Goh et al.	MCC54	KMT2A	NM_001197104.2	c.890T>C	p.V297A	C3
MCC	Goh et al.	MCC54	NOTCH1	NM_017617.5	c.6229G>A	p.A2077T	C2
MCC	Goh et al.	MCC54	AKT1	NM_001382430.1	c.48_49delinsAA	p.E17K	C5
MCC	Goh et al.	MCC54	RB1	NM_000321.3	c.1741G>T	p.G581*	C4
MCC	Goh et al.	MCC54	TP53	NM_000546.6	c.375_375+1delinsAA	p.X125_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC54	TP53	NM_000546.6	c.534_535delinsTT	p.H179Y	C4
MCC	Goh et al.	MCC56	BRAF	NM_004333.6	c.1964C>T	p.P655L	C3
MCC	Goh et al.	MCC56	PIK3CA	NM_006218.4	c.1351_1352delinsAA	p.G451K	C3
MCC	Goh et al.	MCC56	BRCA1	NM_007294.4	c.4824del	p.E1609Nfs*24	C4
MCC	Goh et al.	MCC56	PIK3CA	NM_006218.4	c.3012G>A	p.M1004I	C4
MCC	Goh et al.	MCC56	NOTCH1	NM_017617.5	c.1393G>A	p.A465T	C4
					c.2467_2467+1delins		
MCC	Goh et al.	MCC56	NOTCH1	NM_017617.5	AA	p.X823_splice	C4
MCC	Goh et al.	MCC56	RB1	NM_000321.3	c.1183C>T	p.Q395*	C5
MCC	Goh et al.	MCC56	RB1	NM_000321.3	c.862-1G>A	p.X288_splice	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	1	TP53	NM_000546.6	c.892G>T	p.E298*	C5
MCC	Gonzalez-Vela et al.	1	SMARCA4	NM_003072.5	c.4699G>A	p.E1567K	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	1	STK11	NM_000455.5	c.421G>C	p.D141H	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	2	EP300	NM_001429.4	c.4505C>T	p.P1502L	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	2	TP53	NM_000546.6	c.518T>G	p.V173G	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	APC	NM_001127510.3	c.6053C>T	p.P2018L	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	RB1	NM_000321.3	c.2536C>T	p.Q846*	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	TP53	NM_000546.6	c.574C>T	p.Q192*	C5
MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	NOTCH2	NM_001200001.2	c.1148C>T	p.P383L	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	4	RB1	NM_000321.3	c.1543C>T	p.P515S	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	ARID1A	NM_006015.6	c.4852C>T	p.P1618S	C3

MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	RB1	NM_000321.3	c.585G>A	p.W195*	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	TP53	NM_000546.6	c.839G>A	p.R280K	C5
MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	EP300	NM_001429.4	c.3259C>T	p.P1087S	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	RB1	NM_000321.3	c.1988A>T	p.N663I	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	5	TP53	NM_000546.6	c.139C>T	p.H47Y	C1
MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	APC	NM_001127510.3	c.7835G>A	p.W2612*	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	TP53	NM_000546.6	c.836G>A	p.G279E	C4
MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	BRCA1	NM_007294.3	c.11C>G	p.S4C	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	MEN1	NM_130804.3	c.1475C>T	p.S492F	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	6	MEN1	NM_130804.3	c.1725C>G	p.I575M	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	7	NOTCH1	NM_017617.5	c.5732C>G	p.S1911C	C3
MCC	Gonzalez-Vela et al.	7	NOTCH1	NM_017617.5	c.596T>C	p.V199A	C3
MCC	Harms et al.	MCC_274	ATM	NM_000051.4	c.3703C>T	p.P1235S	C3
MCC	Harms et al.	MCC_274	ATM	NM_000051.4	c.1945G>T	p.E649*	C4
MCC	Harms et al.	MCC_274	TP53	NM_000546.6	c.1023_1024delinsTT	p.R342*	C5
MCC	Harms et al.	MCC_274	NOTCH3	NM_000435.3	c.3083G>A	p.W1028*	C4
MCC	Harms et al.	MCC_274	BRCA2	NM_000059.4	c.8456A>T	p.D2819V	C3
MCC	Harms et al.	MCC_274	TP53	NM_000546.6	c.592G>T	p.E198*	C5
MCC	Harms et al.	MCC_274	KMT2A	NM_001197104.2	c.2333C>T	p.S778F	C3
MCC	Harms et al.	MCC_274	NOTCH1	NM_017617.5	c.2756G>A	p.G919E	C3
MCC	Harms et al.	MCC_611	TP53	NM_000546.6	c.637C>T	p.R213*	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_603	ERBB3	NM_001982.4	c.3512C>T	p.S1171F	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_603	NOTCH1	NM_017617.5	c.1904G>A	p.G635E	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_603	NOTCH1	NM_017617.5	c.2015G>A	p.G672E	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_603	NOTCH1	NM_017617.5	c.2587G>A	p.G863R	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_603	KMT2D	NM_003482.4	c.10018C>T	p.Q3340*	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_624	KMT2C	NM_170606.3	c.851G>A	p.R284Q	C2
MCC	Harms et al.	MET_MCC_624	NOTCH2	NM_024408.4	c.8C>T	p.A3V	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_624	RB1	NM_000321.3	c.2359C>T	p.R787*	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_624	TP53	NM_000546.6	c.637C>T	p.R213*	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	BRAF	NM_004333.6	c.1016C>T	p.S339F	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	FBXW7	NM_001349798.2	c.1385C>A	p.S462Y	C2
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	KMT2A	NM_001197104.2	c.9419C>T	p.P3140L	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	NOTCH4	NM_004557.4	c.1825_1826delinsCA	p.G609Q	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	RB1	NM_000321.3	c.585G>A	p.W195*	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	TP53	NM_000546.6	c.835G>A	p.G279R	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_627	TP53	NM_000546.6	c.827C>A	p.A276D	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	ARID1A	NM_006015.6	c.2107_2108delinsTT	p.P703F	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	KMT2D	NM_003482.4	c.1465C>A	p.L489M	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	NF1	NM_001042492.3	c.505G>A	p.E169K	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	NF1	NM_001042492.3	c.6572C>T	p.S2191F	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	NOTCH2	NM_024408.4	c.2113C>T	p.R705C	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	SMARCA4	NM_003072.5	c.2357_2358delinsTA	p.T786I	C3
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	RB1	NM_000321.3	c.940-1G>A	p.X314_splice	C4
MCC	Harms et al.	MET_MCC_862	TP53	NM_000546.6	c.637C>T	p.R213*	C4

MCC	Harms et al.	MET_MCC 862	TP53	NM_000546.6	c.836G>A	p.G279E	C4
MCC	Harms et al.	METMCC_ 627	ATM	NM_000051.4	c.2023_2041del	p.Q675fs	C4
MCC	Harms et al.	METMCC_ 682	NOTCH2	NM_024408.4	c.61G>A	p.A21T	C1
MCC	Harms et al.	METMCC_ 682	NOTCH2	NM_024408.4	c.8C>T	p.A3V	C3
MCC	Harms et al.	METMCC_ 682	PIK3CA	NM_006218.4	c.331A>G	p.K111E	C5
MCC	Harms et al.	MO_1109	KEAP1	NM_012289.4	c.1691G>A	p.G564E	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH1	NM_017617.5	c.6391_6392delinsAA	p.G2131N	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH2	NM_024408.4	c.1792_1793delinsAA		C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH2	NM_024408.4	c.2069C>T	p.P690L	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH3	NM_000435.3	c.3610G>A	p.A1204T	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH4	NM_004557.4	c.5535_5536delinsAA	p.V1846M	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	PIK3CA	NM_006218.4	c.716T>G	p.L239R	C3
MCC	Harms et al.	MO_1109	KMT2C	NM_170606.3	c.58G>T	p.E20*	C4
MCC	Harms et al.	MO_1109	NOTCH1	NM_017617.5	c.5767C>T	p.Q1923*	C4
MCC	Harms et al.	MO_1109	RB1	NM_000321.3	c.940-1G>A	p.X314_splice	C4
MCC	Harms et al.	MO_1109	TP53	NM_000546.6	c.796_797delinsAA	p.G266K	C4
MCC	Harms et al.	MO_1160	SMARCA4	NM_003072.5	c.2933G>A	p.R978Q	C3
MCC	Harms et al.	MO_1160	MSH2	NM_000251.3	c.2005+1G>A		C5
MCC	Harms et al.	MO_1160	PIK3CA	NM_006218.4	c.1091G>A	p.G364E	C4
MCC	Harms et al.	MO_1160	PIK3CA	NM_006218.4	c.1633G>A	p.E545K	C5
MCC	Harms et al.	MO_1160	KMT2A	NM_001197104.2	c.2233C>T	p.R745*	C4
MCC	Harms et al.	MO_1160	NOTCH1	NM_017617.5	c.1576C>T	p.Q526*	C4
MCC	Harms et al.	MO_1160	RB1	NM_000321.3	c.2536C>T	p.Q846*	C4
MCC	Harms et al.	MO_1160	TP53	NM_000546.6	c.832C>T	p.P278S	C4
SCLC	George et al.	S00022	RB1	NM_000321.3	c.1183C>T	p.Q395*	C5
SCLC	George et al.	S00022	TP53	NM_000546.6	c.97-2A>T	p.X32_splice	C5
SCLC	George et al.	S00035	RB1	NM_000321.3	c.380G>A	p.S127N	C4
SCLC	George et al.	S00035	TP53	NM_000546.6	c.733G>T	p.G245C	C5
SCLC	George et al.	S00050	TP53	NM_000546.6	c.743G>A	p.R248Q	C5
SCLC	George et al.	S00050	RB1	NM_000321.3	c.964G>T	p.E322*	C5
SCLC	George et al.	S00339	NF1	NM_001042492	c.5492G>T	p.W1831L	C3
SCLC	George et al.	S00339	TP53	NM_000546.6	c.644G>T	p.S215I	C5
SCLC	George et al.	S00356	RB1	NM_000321.3	c.1961-1del	p.X653_splice	C4
SCLC	George et al.	S00356	TP53	NM_000546.6	c.701A>G	p.Y234C	C5
SCLC	George et al.	S00472	EP300	NM_001429.4	c.4453C>G	p.X1484_splice	C4
SCLC	George et al.	S00472	ERBB2	NM_004448.4	c.1931C>T	p.A644V	C3
SCLC	George et al.	S00472	RB1	NM_000321.3	c.584delG	p.W195fs	C4
SCLC	George et al.	S00472	TP53	NM_000546.6	c.745A>T	p.R249W	C4
SCLC	George et al.	S00501	ARID1A	NM_006015.6	c.3977_3978insGCA	p.P1326delinsP	C4
SCLC	George et al.	S00501	BRCA2	NM_000059.4	c.10243del	p.K3415fs	C4
SCLC	George et al.	S00501	ERBB3	NM_001982.4	c.991T>C	p.C331R	C4
SCLC	George et al.	S00501	NOTCH1	NM_017617.5	c.1915G>A	p.E639K	C3
SCLC	George et al.	S00501	RB1	NM_000321.3	c.1362C>G	p.Y454*	C5
SCLC	George et al.	S00501	TP53	NM_000546.6	c.472C>G	p.R158G	C4
SCLC	George et al.	S00539	NF1	NM_001042492	c.103A>G	p.S35G	C3
SCLC	George et al.	S00539	RB1	NM_000321.3	c.841C>A	p.H281N	C3
SCLC	George et al.	S00539	RB1	NM_000321.3	c.833_836delGTAA	p.C278fs	C4
SCLC	George et al.	S00539	TP53	NM_000546.6	c.994-2A>G	p.X331_splice	C5
SCLC	George et al.	S00825	RB1	NM_000321.3	c.361C>T	p.Q121*	C5
SCLC	George et al.	S00825	TP53	NM_000546.6	c.783-1G>A	p.X261_splice	C5
SCLC	George et al.	S00825	NOTCH1	NM_017617.5	c.1199G>T	p.C400F	C3
SCLC	George et al.	S00827	RB1	NM_000321.3	c.1570_1578delAAG		C4
SCLC	George et al.	S00827	TP53	NM_000546.6	CCTTT	p.K526fs	C4
SCLC	George et al.	S00829	NOTCH2	NM_024408.4	c.352_353insA	p.T118fs	C4
SCLC	George et al.	S00829	PTEN	NM_000314.8	c.5333C>G	p.S1778*	C5
SCLC	George et al.	S00829	SMARCA4	NM_001128849	c.892C>T	p.Q298*	C5
SCLC	George et al.	S00829	TP53	NM_000546.6	c.1506G>T	p.K502N	C3
SCLC	George et al.	S00830	EP300	NM_001429.4	c.796G>T	p.G266*	C5
SCLC	George et al.	S00830	RB1	NM_000321.3	c.3857A>G	p.N1286S	C4
SCLC	George et al.	S00831	TP53	NM_000321.3	c.403_404insT	p.L135fs	C4
SCLC	George et al.	S00831	TP53	NM_000546.6	c.641A>G	p.H214R	C5
SCLC	George et al.	S00832	ARID1A	NM_006015.6	c.4750C>T	p.Q1584*	C4
SCLC	George et al.	S00832	NOTCH2	NM_024408.4	c.6418C>T	p.Q2140*	C5
SCLC	George et al.	S00832	RB1	NM_000321.3	c.1842_1843insA	p.K615fs	C4
SCLC	George et al.	S00832	TP53	NM_000546.6	c.919+1G>T	p.X306_splice	C4
SCLC	George et al.	S00833	EGFR	NM_005228.5	c.1927A>G	p.L643V	C3
SCLC	George et al.	S00833	PTEN	NM_000314.8	c.494G>A	p.G165E	C5
SCLC	George et al.	S00833	RB1	NM_000321.3	c.114delC	p.G38fs	C4
SCLC	George et al.	S00833	TP53	NM_000546.6	c.482C>A	p.A161D	C4
SCLC	George et al.	S00837	NOTCH3	NM_000435.3	c.3106C>T	p.R1036*	C4
SCLC	George et al.	S00838	RB1	NM_000321.3	c.1700C>T	p.S567L	C4
SCLC	George et al.	S00838	TP53	NM_000546.6	c.375_G>T	p.T125T	C5
SCLC	George et al.	S00841	TP53	NM_000546.6	c.730G>T	p.G244C	C5
SCLC	George et al.	S00841	TP53	NM_000546.6	c.824delG	p.C275fs	C4
SCLC	George et al.	S00842	PIK3CA	NM_006218.4	c.2849A>C	p.E950A	C4

SCLC	George et al.	S02385	EP300	NM_001429.4	c.5462G>T	p.R1821L	C3
SCLC	George et al.	S02385	RB1	NM_000321.3	c.1333C>T	p.R445*	C5
SCLC	George et al.	S02385	TP53	NM_000546.6	c.355del	p.A119fs.	C4
SCLC	George et al.	S02397	RB1	NM_000321.3	c.1617A>C	p.E539D	C3
SCLC	George et al.	S02397	TP53	NM_000546.6	c.536C>T	p.H140R	C4
SCLC	George et al.	S02398	RB1	NM_000321.3	c.2323delA	p.R775fs	C4
SCLC	George et al.	S02398	TP53	NM_000546.6	c.536C>T	p.H140R	C4
SCLC	George et al.	S02400	TP53	NM_000546.6	c.994-2A>G	p.X331_splice	C5
SCLC	George et al.	S02401	APC	NM_001127510	c.4660_4661insA	p.E1554fs	C4
SCLC	George et al.	S02401	PTEN	NM_000314.8	c.379G>T	p.G127*	C5
SCLC	George et al.	S02401	RB1	NM_000321.3	c.2104C>T	p.Q702*	C5
SCLC	George et al.	S02401	TP53	NM_000546.6	c.535C>T	p.H179Y	C5
SCLC	George et al.	S02402	TP53	NM_000546.6	c.818G>A	p.R273H	C5
SCLC	George et al.	S02403	RB1	NM_000321.3	c.2206C>T	p.Q736*	C5
SCLC	George et al.	S02403	TP53	NM_000546.6	c.743_757del	p.R248fs.	C4
SCLC	George et al.	S02404	NF1	NM_001042492	c.416C>A	p.S139Y	C3
SCLC	George et al.	S02404	RB1	NM_000321.3	c.265-1G>T	p.X88_splice	C4
SCLC	George et al.	S02404	TP53	NM_000546.6	c.1024C>T	p.R342*	C5

VII- Discussion

Le CCM est actuellement défini par la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé comme un carcinome neuroendocrine primaire de la peau(36). Par conséquent, la métastase d'un carcinome neuroendocrine extra-cutané constitue le principal diagnostic différentiel du CCM en pratique clinique. Dans la majorité des cas, l'évaluation clinique, comprenant principalement un examen dermatologique et un bilan d'extension, ainsi que la caractérisation immunohistochimique de la tumeur permettent de distinguer ces deux entités tumorales(19,20,37). Cependant, certains cas restent encore mal classés, en particulier lorsqu'ils présentent des profils immunohistochimiques « aberrants »(38–40).

En effet, contrairement aux carcinomes neuroendocrines extra-cutanés de haut grade, pour lesquels aucun marqueur immunohistochimique pertinent permettant de prédire l'origine tumorale n'est actuellement disponible, il est bien établi que l'expression de la cytokératine 20, du neurofilament et de SATB2 est observée dans la majorité des MCC et rarement détectée dans les tumeurs extra-cutanées(19). Il est à noter que POU4F3 a récemment été mis en évidence comme un marqueur supplémentaire pertinent du CCM dans ce contexte(41).

D'un point de vue moléculaire, la mise en évidence du génome du polyomavirus de Merkel (MCPyV) ainsi que la détection de l'expression de l'antigène LT par immunohistochimie constituent des arguments forts en faveur d'une origine cutanée(42–45). En revanche, bien qu'une signature mutationnelle associée aux UV soit fréquente dans les CCM viro-négatifs, y compris les CCMSPC(46), la détection de telles caractéristiques moléculaires nécessite un séquençage d'un panel large qui n'est pas disponible en routine actuellement dans la plupart des centres.

Dans ce contexte, notre travail a démontré que l'analyse du profil de méthylation pourrait être un outil efficace pour distinguer les CCMSPC – y compris les cas viro-négatifs – des métastases de carcinomes neuroendocrines extra-cutanés. Cette distinction est essentielle pour le pronostic et la prise en charge thérapeutique. En effet, les CCMSPC localisés sont traités par curage ganglionnaire et radiothérapie, tandis que les patients présentant une métastase ganglionnaire d'un carcinome neuroendocrine extra-cutané reçoivent une chimiothérapie. De plus, il a été démontré que les CCMSPC localisés traités par chimiothérapie ont un pronostic plus défavorable que ceux pris en charge par chirurgie et radiothérapie(47).

Au-delà des implications thérapeutiques, nos résultats pourraient également contribuer à une meilleure compréhension de la pathogénie des CCMSPC en confirmant des données précédemment publiées(48,49). En effet, la détection antérieure de l'intégration du MCPyV ou

d'une signature mutationnelle UV associée à une forte réponse immunitaire dans les CCMSPC(19,35,46,50) suggère fortement que ces tumeurs correspondent en réalité à des métastases ganglionnaires de MCC cutanés, soit d'une tumeur primaire trop petite pour être détectée, soit après une régression tumorale complète. Dans cette perspective, la mise en évidence d'un profil de méthylation commun entre les MCC cutanés et ganglionnaires renforce l'hypothèse d'une origine épithéliale unique pour ces tumeurs. À noter que des investigations antérieures menées par deux groupes indépendants sur les profils de méthylation de lignées cellulaires de CCM viro-positifs et négatifs soutiennent également l'hypothèse d'une origine commune pour cette tumeur(48,49).

Par ailleurs, notre travail met en évidence le potentiel diagnostique de signatures mutationnelles spécifiques, en soulignant qu'il est rare que des patients atteints de SCLC présentent de multiples mutations associées aux UV (mutations C>T ou CC>TT). De plus, certaines mutations semblent relativement spécifiques aux CCM viro-négatifs, comparativement aux CPC, cependant leur fréquence globale reste faible. Tandis que *RB1* et *TP53* soient fréquemment mutés dans les deux tumeurs, le type et le nombre de ces mutations diffèrent. En combinant ces paramètres, nous avons démontré une efficacité diagnostique robuste.

Ces résultats suggèrent la possibilité de l'utilisation d'un panel génétique plus ciblé et accessible en routine clinique. De plus, nos résultats ouvrent la voie au développement d'un algorithme diagnostique ou d'un système de score combinant les critères du score ELECTHIP(35) aux caractéristiques moléculaires, notamment le type, le nombre et les gènes impliqués dans les mutations. Un tel algorithme intégré pourrait significativement améliorer la précision diagnostique, en particulier dans les cas complexes de CCMSPC, et impacter ainsi les décisions thérapeutiques et la prise en charge des patients.

Malgré ces résultats prometteurs, notre seconde étude présente certaines limites. L'absence de validation dans une cohorte indépendante, nécessaire pour confirmer nos résultats, en est la principale. La taille relativement réduite de l'échantillon et la nature rétrospective des données peuvent restreindre la généralisation de nos résultats. De plus, les données mutationnelles ont été extraites de plusieurs études, impliquant une hétérogénéité méthodologique potentielle. Enfin, alors que nous nous sommes concentrés sur les mutations fonctionnellement pertinentes, des études prospectives supplémentaires seront nécessaires pour valider leur intégration dans un protocole diagnostique standardisé.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'analyse du profil de méthylation pourrait représenter un outil diagnostique pertinent pour les CCMSPC, y compris les cas viro-négatifs, bien qu'une validation sur une cohorte indépendante incluant un large nombre de contrôles

soit requise. Notre étude renforce également le potentiel diagnostique des signatures mutationnelles spécifiques pour les CCM viro-négatifs, en particulier les CCMSPC, et souligne leur utilité pratique en diagnostic clinique et dans la prise en charge des patients. Une validation complémentaire d'un panel moléculaire simplifié pourrait faciliter son application en routine et améliorer significativement la différenciation et la prise en charge de ces entités tumorales complexes.

VIII- 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, Mascre 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 PE, World Health Organization. Pathology and genetics of skin tumours. Lyon: IARC Press, 2007.
6. Pedersen EA, Verhaegen ME, Joseph MK, Harms KL, Harms PW. Merkel cell carcinoma: updates in tumor biology, emerging therapies, and preclinical models. *Front Oncol.* 2024;14:1413793.
7. Stang A, Becker JC, Nghiem P, Ferlay J. The association between geographic location and incidence of Merkel cell carcinoma in comparison to melanoma: An international assessment. *Eur J Cancer.* mai 2018;94:47-60.
8. Fondain M, Dereure O, Uhry Z, Guizard AV, Woronoff AS, Colonna M, et al. Merkel cell carcinoma in France: a registries-based, comprehensive epidemiological survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* août 2018;32(8):1292-6.
9. Silling S, Kreuter A, Gambichler T, Meyer T, Stockfleth E, Wieland U. Epidemiology of Merkel Cell Polyomavirus Infection and Merkel Cell Carcinoma. *Cancers.* 14 déc 2022;14(24):6176.
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. Fields RC, Busam KJ, Chou JF, Panageas KS, Pulitzer MP, Allen PJ, et al. Five Hundred Patients With Merkel Cell Carcinoma Evaluated at a Single Institution. *Ann Surg.* sept 2011;254(3):465-75.
12. 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.
13. Harms KL, Healy MA, Nghiem P, Sober AJ, Johnson TM, Bichakjian CK, et al. Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System. *Ann Surg Oncol.* oct 2016;23(11):3564-71.
14. 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.* 2012;22(3):375-9.
15. 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.
16. Gauci ML, Aristei C, Becker JC, Blom A, Bataille V, Dreno B, et al. Diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma: European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2022. *Eur J Cancer.* août 2022;171:203-31.

17. Schmults CD, Blitzblau R, Aasi SZ, Alam M, Amini A, Bibee K, et al. NCCN Guidelines® Insights: Merkel Cell Carcinoma, Version 1.2024: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. janv 2024;22(1D):1-11.
18. 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.
19. Kervarrec T, Tallet A, Miquelestorena-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*. avr 2019;32(4):499-510.
20. Thanguturi S, Tallet A, Miquelestorena-Standley E, Coco C, Le Corre Y, Hainaut-Wierzbicka E, et al. Investigation of the RB1-SOX2 axis constitutes a tool for viral status determination and diagnosis in Merkel cell carcinoma. *Virchows Arch Int J Pathol*. juin 2022;480(6):1239-54.
21. Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel EJ, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*. 15 août 2013;73(16):4982-7.
22. 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.
23. Martel-Jantin C, Pederghana V, Nicol JTJ, Leblond V, Trégouët DA, Tortevoe 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.
24. 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 CVI*. mars 2013;20(3):363-8.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Yang A, Wijaya WA, Yang L, He Y, Cen Y, Chen J. The impact of merkel cell polyomavirus positivity on prognosis of merkel cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Front Oncol*. 2022;12:1020805.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.

33. Thibault K. Evidence of an epithelial origin of Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* avr 2022;35(4):446-8.
34. Durand MA, Drouin A, Mouchard A, Durand L, Esnault C, Berthon P, et al. Distinct Regulation of EZH2 and its Repressive H3K27me3 Mark in Polyomavirus-Positive and -Negative Merkel Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol.* oct 2023;143(10):1937-1946.e7.
35. Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, Le Gouge A, Beby-Defaux A, Le Corre Y, 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.* mai 2018;78(5):964-972.e3.
36. Busam KJ, Scolyer RA, Tetzlaff M, Kervarrec T et al. Merkel cell carcinoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. *Skin tumours.* Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; forthcoming. . (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 12). <https://publications.iarc.fr>.
37. Kervarrec T, Tallet A, Miquelstorena-Standley E, Houben R, Schrama D, Gambichler T, et al. Morphologic and immunophenotypical features distinguishing Merkel cell polyomavirus-positive and negative Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol.* nov 2019;32(11):1605-16.
38. Miner AG, Patel RM, Wilson DA, Procop GW, Minca EC, Fullen DR, et al. Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma is infrequently associated with the Merkel cell polyomavirus. *Mod Pathol.* avr 2015;28(4):498-504.
39. Harms PW, Collie AMB, Hovelson DH, Cani AK, Verhaegen ME, Patel RM, et al. Next generation sequencing of Cytokeratin 20-negative Merkel cell carcinoma reveals ultraviolet-signature mutations and recurrent TP53 and RB1 inactivation. *Mod Pathol.* mars 2016;29(3):240-8.
40. Pasternak S, Carter MD, Ly TY, Doucette S, Walsh NM. Immunohistochemical profiles of different subsets of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* déc 2018;82:232-8.
41. Karpinski P, Mendez-Pena JE, Wu CL, Akalin A, Cornejo KM, Hung YP, et al. POU4F3 Is a Sensitive and Specific Marker of Merkel Cell Carcinoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* janv 2025;38(1):100627.
42. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu YM, Dhanasekaran SM, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 15 sept 2015;75(18):3720-7.
43. Donizy P, Wróblewska JP, Dias-Santagata D, Woznica K, Biecek P, Mochel MC, et al. Merkel Cell Carcinoma of Unknown Primary: Immunohistochemical and Molecular Analyses Reveal Distinct UV-Signature/MCPyV-Negative and High Immunogenicity/MCPyV-Positive Profiles. *Cancers.* 31 mars 2021;13(7):1621.
44. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 19 janv 2016;7(3):3403-15.
45. González-Vela MDC, Curiel-Olmo S, Derdak S, Beltran S, Santibañez M, Martínez N, et al. Shared Oncogenic Pathways Implicated in Both Virus-Positive and UV-Induced Merkel Cell Carcinomas. *J Invest Dermatol.* janv 2017;137(1):197-206.
46. Donizy P, Wróblewska JP, Dias-Santagata D, Woznica K, Biecek P, Mochel MC, et al. Merkel Cell Carcinoma of Unknown Primary: Immunohistochemical and Molecular Analyses Reveal Distinct UV-Signature/MCPyV-Negative and High Immunogenicity/MCPyV-Positive Profiles. *Cancers.* 31 mars 2021;13(7):1621.
47. Deneve JL, Messina JL, Marzban SS, Gonzalez RJ, Walls BM, Fisher KJ, et al. Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Ann Surg Oncol.* juill 2012;19(7):2360-6.

48. Gravemeyer J, Spassova I, Verhaegen ME, Dlugosz AA, Hoffmann D, Lange A, et al. DNA-methylation patterns imply a common cellular origin of virus- and UV-associated Merkel cell carcinoma. *Oncogene*. 3 janv 2022;41(1):37-45.
49. Harms PW, Verhaegen ME, Vo JN, Tien JC, Pratt D, Su F, et al. Viral Status Predicts the Patterns of Genome Methylation and Decitabine Response in Merkel Cell Carcinoma. *J Invest Dermatol*. mars 2022;142(3):641-52.
50. Kervarrec T, Zaragoza J, Gaboriaud P, Berthon P, Fromont G, Le Corre Y, et al. Merkel cell carcinoma of lymph nodes without a skin primary tumor: A potential metastatic neoplasia associated with a brisk immune response. *J Am Acad Dermatol*. déc 2020;83(6):1789-92.

Vu, le Directeur de Thèse

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

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

CHANTREAU Paul-Louis

78 pages – 3 tableaux – 6 figures

Résumé :

Contexte : Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est une tumeur cutanée rare et agressive, principalement associée à l'intégration du polyomavirus de Merkel (MCPyV) dans les cellules tumorales. Le CCM peut se présenter soit comme une tumeur cutanée primitive, soit comme une métastase ganglionnaire sans primitif cutané (CCMSPC). La distinction entre les CCMSPC et les métastases ganglionnaires de carcinomes neuroendocrines extra-cutanés reste particulièrement complexe en pratique quotidienne, en particulier dans les cas viro-négatifs.

Objectif : Ce travail vise à déterminer si le profil de méthylation ou de mutations permet de distinguer les cas de CCMSPC, en particulier les formes viro-négatives, des carcinomes neuroendocrines extra-cutanés.

Méthodes : Les profils de méthylation de 20 cas de CCMSPC, comprenant 5 cas viro-négatifs et 15 cas viro-positifs, issus d'une cohorte multicentrique française, ont été analysés à l'aide de la puce EPIC BeadChip et comparés à 23 CCM cutanés et 37 carcinomes pulmonaires à petites cellules (CPC).

Le profil mutationnel de 43 cas de CCM viro-négatifs, issus d'études antérieures publiées et analysés par séquençage du génome complet, a été extrait des travaux de González-Vela et al., Harms et al., et Goh et al., puis comparé à 110 cas de CPC de l'étude de George et al. Un panel de 35 gènes parmi les plus fréquemment mutés dans le CCM a été étudié.

Résultats : L'analyse de la méthylation (tSNE) a montré que les cas de CCM, y compris les formes ganglionnaires, se regroupaient ensemble, tandis que les CPC constituaient un groupe distinct.

Concernant le profil mutationnel, une fréquence plus élevée de mutations dans les gènes *ATM*, *KMT2A*, *KMT2D*, *NF1* et *NOTCH1* ($p < 0,05$) a été observée dans les CCM viro-négatifs en comparaison aux CPC.

Conclusion : Le profil de méthylation représente un outil diagnostique prometteur pour les CCMSPC. De plus, les CCM et les CPC présentent des profils mutationnels distincts, ce qui pourrait contribuer à l'identification des CCMSPC.

Mots clés : MCPyV ; Carcinome à cellules de Merkel ; Diagnostic différentiel ; Ganglions lymphatiques ; Métastase ; Carcinome neuroendocrine ; Profil de méthylation ; Séquençage du génome complet.

Jury :

Président du Jury : Professeur Serge GUYETANT

Directeur de thèse : Docteur Thibault KERVARREC

Membres du Jury : Professeur Mahtab SAMIMI
Docteur Anne TALLET

Date de soutenance : 23 avril 2025