

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS

RESUME.....	4
ABBREVIATIONS.....	6
ETAT DES CONNAISSANCES.....	8
Le néphroblastome.....	8
• Epidémiologie.....	8
• Prise en charge.....	8
• Anatomie pathologique du néphroblastome.....	12
• Génétique du néphroblastome.....	15
• Syndrome de Beckwith-Wiedemann et néphroblastome.....	19
L’empreinte parentale.....	23
• Epigénétique.....	23
• Marques épigénétiques.....	23
• Le concept de l’empreinte parentale.....	26
• Le cycle de l’empreinte.....	27
• La région 11p15.....	36
Domaine télomérique (IGF2, H19, ICR1).....	37
Domaine centromérique (CDKN1C/KCNQ1OT1, ICR2).....	38
Relation entre les deux domaines.....	39
OBJECTIF DU TRAVAIL.....	40
RESULTATS.....	42
• Projet 1 : Détermination du statut 1p et 16q dans le néphroblastome dans le cadre du protocole SIOP 2001 et corrélation avec les données pathologiques, en particulier le volume de blastème et le pronostic.....	43

Résumé.....	43
Introduction.....	44
Méthodes.....	45
Résultats.....	51
Discussion.....	54
• Projet 2 : Détermination des anomalies du nombre de copies (CNV) par MLPA dans les néphroblastomes pré-traités du protocole SIOP 2001	56
Résumé.....	56
Discussion.....	60
• Projet 3 : Etude des anomalies structurales et de méthylation de la région 11p15 dans le néphroblastome sporadique et associé au syndrome de Beckwith-Wiedemann et étude de l'expression d'IGF2.....	61
Résumé.....	61
Introduction.....	62
Méthodes.....	63
Résultats.....	67
Discussion.....	77
• Projet 4 : Caractérisation immunohistochimique de la réponse immune (CD3, CD4, CD8, PD1, PDL1) dans la série des néphroblastomes prétraités de la SFCE/SIOP et corrélation avec les données cliniques et pathologiques.....	81
Résumé.....	81
Discussion.....	83
PERSPECTIVES.....	84

1) Pucés SNP.....	84
2) Caractérisation génomique des tumeurs de Wilms avec anaplasie diffuse et confrontation avec les tumeurs de Wilms avec anaplasie focale.....	88
3) Perspective dans la recherche biologique et dans le traitement des néphroblastomes au niveau international.....	89
DISCUSSION GENERALE.....	90
REFERENCES.....	93

ANNEXES :

1) ARTICLES EN RELATION AU TRAVAIL DE THESE

2) COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES EN RELATION AU TRAVAIL DE THESE

3) ARTICLE PROJET 2

4) ARTICLE PROJET 4

RESUME

La tumeur de Wilms (WT) ou Néphroblastome, est la tumeur du rein la plus fréquente chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, avec une incidence en France de 1/10000 naissances. Bien que la majorité des enfants avec WT soit aujourd'hui soignée, 10 à 15% de tumeurs qui ne montrent pas de critères particuliers d'agressivité au moment du diagnostic rechutent, et une partie des tumeurs avec des critères d'agressivité biologique au diagnostic ont en réalité un comportement clinique moins agressif. Au final, une partie des enfants sont sur-traités par rapport à leur maladie et développent des séquelles irréversibles dues à la radiothérapie et la chimiothérapie, qui pourraient être évitées si les tumeurs étaient mieux stratifiées au diagnostic. L'identification de nouveaux marqueurs pronostic au diagnostic est donc par conséquence nécessaire.

Afin de mieux comprendre la biologie de ces tumeurs hétérogènes, nous avons centralisé dans notre centre le matériel biologique de toutes les WT's françaises inclus dans le protocole SIOP-2001. Un bloc de paraffine représentatif de chaque tumeur ainsi que du matériel cryopréservé correspondant à la tumeur et au rein sain de chaque patient ont été réceptionnés, nous permettant la constitution d'une tumorotheque, une DNA-thèque et une RNA-thèque.

La première partie du travail a été de caractériser le statut histologique de ces tumeurs (type histologique, groupe de risque histologique) en faisant particulièrement attention au blastème, la composante histologique la plus agressive de ces tumeurs. Le blastème a été caractérisé par une analyse qualitative (architecture et aspect cytologique du blastème, index mitotique, index prolifératif) et quantitative (volume et pourcentage de blastème).

La deuxième partie a été réalisée sur les WT's inclus dans le protocole SIOP-2001 en collaboration avec les équipes européennes du Renal Tumor Study Group ([1](#)) et a permis de caractériser les anomalies structurales de la WT par Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA), en particulier les régions d'intérêt 1p, 16q, 1q et les gènes TP53, IGF2, NMYC. De plus, nous nous sommes focalisés sur la région 11p15, où le gène IGF2 est localisé, en analysant les anomalies structurales et de méthylation au niveau de différents loci (IGF2-DMR0, ICR1, ICR2, H19), par MLPA et par ASMM RTQ-PCR (TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR). Nous avons de plus étudié l'expression d'IGF2 dans les tumeurs et les reins sains correspondants par RT-QPCR à partir de l'ARN

extrait. Une dernière partie de notre étude a porté sur la caractérisation de la réponse immune intratumorale par immunohistochimie (CD3, CD4, CD8, PD1, PDL1).

Nous avons pu confirmer la validité de la stratification pronostique actuellement utilisée pour la WT, qui prend en considération le type histologique, le groupe de risque histologique et le stade local. Nous avons confirmé sur les tumeurs pré-traités la validité pronostique de marqueurs moléculaires comme le gain de 1q, de MYCN et la perte de 1p et 16q, marqueurs qui étaient déjà connus comme étant pronostiques dans les tumeurs traités par chirurgie première. De plus nous avons identifié des potentiels marqueurs pronostiques supplémentaires concernant la prise en charge anatomopathologique des WT: le volume et le pourcentage de blastème, l'index mitotique et de prolifération du blastème, la perte de méthylation d'IGF2-DMRO et le rapport CD4/CD8 évalué par immunohistochimie au sein de la tumeur.

Ce travail pourrait contribuer à la détermination d'une nouvelle classification bio-pathologique de la WT, sur laquelle sera décidé un nouveau traitement dans le futur.

ABBREVIATIONS

AD: autosomique dominant

ADN : acide désoxyribonucléique

AF: anaplasie focale

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messenger

ASMM RTQ-PCR TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR

BWS: Syndrome de Beckwith-Wiedemann

COG: Children Oncology Group

CPDN: cystic partially differentiated nephroblastoma

CGH: comparative genomic hybridization

ddNTP: didésoxyribonucléotides

DMR: Differentially methylated region

FFPE: formalin fixed paraffine embedded

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GOM: gain of methylation

HE: hematoxylyn and eosin

HPF: high performed fields

HR: high risk

ICR-1: imprinting control region 1

ICR-2: imprinting control region 2

ILNR: intralobar nephrogenic rests

IR: intermediate risk

lncRNA : long non coding ribonucleic acid

LOH : loss of heterozygosity

LOI : loss of imprinting

LOM : loss of methylation

LR :low risk

mi-RNA: micro RNA

MLPA: multiple ligation probe amplification

ns: non significatif

OS: overall survival

PFS: progression free survival

PLNR: perilobar nephrogenic rests

pUPD: isodisomie paternelle

RTC : Renal Tumor Committee

RTSG: Renal Tumors Study Group

SIOP: Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique

SFCE : Société Française du Cancer de l'Enfant

TIL: lymphocytes T intraépithéliaux

UKCCSG: United Kingdom Children's Cancer Study Group

WT: Tumeur de Wilms

WTDA: Tumeur de Wilms avec anaplasie diffuse

WTFA: Tumeur de Wilms avec anaplasie focale

Rapport-Gratuit.com

ETAT DES CONNAISSANCES

Le néphroblastome

- **Epidémiologie**

La tumeur de Wilms (WT), ou néphroblastome, est la tumeur rénale la plus fréquente chez l'enfant âgé de moins de 5 ans (2). L'âge moyen au diagnostic est de 3 ans avec une fréquence maximale entre 1 et 5 ans. Cette tumeur représente 5-10% des tumeurs malignes de l'enfant et elle est la plus fréquente des tumeurs abdominales, avec une incidence annuelle de 1/ 10 000 et une prévalence de 1-9/ 100 000.

Elle est le plus souvent une tumeur sporadique, mais dans 10% des cas elle est associée à un syndrome de prédisposition comme le Syndrome de Beckwith-Wiedmann (BWS) ou la mutation du gène WT1 (Syndrome de WAGR et Syndrome de Denis-Drash).

- **Prise en charge**

En Europe, les enfants âgés de plus de 6 mois et atteints d'un néphroblastome sont traités par une chimiothérapie pré-chirurgicale. Après la chirurgie, l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire de néphrectomie confirmera le diagnostic et établira l'histopronostic de la tumeur, en accord avec la classification du risque histologique selon le protocole de la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique SIOP 2001 (2). Cette classification a été développée depuis 1971 (3, 4).

La biopsie de la masse rénale en cas de suspicion d'une WT n'est pas indiquée, sauf devant une tumeur d'aspect radiologique non classique ou chez un enfant âgé de plus de 6 ans. Dans ce cas la biopsie sera réalisée par voie rétropéritonéale, pour éviter le risque de dissémination péritonéale et de récurrence locale. Dans tous les autres cas le diagnostic est fait sur la base des critères cliniques et radiologiques. Chez les adolescents ou les adultes, la haute prévalence de tumeurs rénales autres que la WT supporte l'indication d'une biopsie ou d'une chirurgie première. Historiquement cette catégorie de malades avait un pronostic moins favorable par rapport à celui des enfants mais la survie a augmenté avec l'application des protocoles pédiatriques aux adolescents et aux jeunes adultes (1).

Selon le protocole SIOP-2001, dans le cas de maladie localisée au diagnostic (Stade 1, 2 et 3) le traitement est basé sur 4 semaines de Vincristine et Actinomycine D. Pour les patients avec maladie métastatique au diagnostic (Stade 4), le traitement est de 6 semaines de Vincristine, Actinomycine D et Doxorubicine. La thérapie post-chirurgicale est faite sur la base de la classification histologique (qui classe les tumeurs en bas risque histologique, risque intermédiaire et haut risque) et sur le stade local.

Les études européennes SIOP 93-2001 montrent une survie de 95-100% pour le stade 1, de 90-95% pour le stade 2, de 85-95% pour le stade 3, de 60-70% pour le stade 4 et seulement de 30% pour les patients avec anaplasie diffuse.

Aux Etats-Unis la WT est prise en charge dans le cadre du Children Oncology Group (COG) avec une chirurgie première et une chimiothérapie post-chirurgicale qui est instaurée sur la base de l'histologie tumorale. Dans la caractérisation histologique pré-chimiothérapie du COG le blastème a moins de valeur pronostic et les tumeurs sont classées sur la base de la présence d'anaplasie en histologie favorable (sans anaplasie), anaplasie focale et anaplasie diffuse ([1](#), [5](#))

Prise en charge particulière :

Dans certains cas la prise en charge des patients est particulière. Il s'agit de patients qui sont en Stade IV au moment du diagnostic (métastatiques), des patients inopérables au diagnostic, des patients avec maladie bilatérale et des patients qui récidivent.

Les patients avec métastases au diagnostic (poumon, foie et autres sites), sont traités au sein de la SIOP par 6 semaines de chimiothérapie pré-opératoire avec Vincristine et Actinomycine. Si les nodules métastatiques régressent complètement et l'exérèse chirurgicale est complète, les patients feront une chimiothérapie adjuvante basée sur le risque histologique de la tumeur. Si les nodules tumoraux sont viables ou si l'exérèse n'est pas complète, les patients feront en plus une radiothérapie sur la région des métastases. Au sein du COG, historiquement tous les patients avec métastases au diagnostic bénéficient de la radiothérapie sur la région des métastases avant la chirurgie ([5](#)). Les américains ont plus récemment adapté leur protocole sur le protocole de la SIOP, à la lumière des résultats de la SIOP et de l'évidence que le pronostic était dépendant de la réponse du nodule

métastatique à la chimiothérapie (6). Cela a permis d'éviter des doses de radiothérapie superflues à une partie des enfants.

Les patients qui ne sont pas opérables au diagnostic dans le COG sont classés en Stade III. Chez ces patients, une radiothérapie abdominale et du flanc plus une chimiothérapie sont faites avant la chirurgie. En Europe les tumeurs sont classés en Stade III seulement si, après la chirurgie, l'exérèse est incomplète ou des métastases ganglionnaires loco-régionales sont mises en évidence. Seuls ces patients bénéficient d'une radiothérapie.

Les patients qui ont une tumeur bilatérale sont traités de la même façon au sein du COG et de la SIOP avec une chimiothérapie néo-adjuvante à base de Vincristine, Actinomycine et Doxorubicine, qui réduit la taille tumorale et permet une chirurgie plus conservatrice.

Les patients qui récidivent ont été classés en trois groupes de risque à la suite d'un travail de collaboration entre le COG et la SIOP (7) : risque standard, pour les patients avec une WT non anaplasique initialement traité avec deux drogues ; haut risque, pour les patients avec WT non anaplasique initialement traité avec trois drogues ; très haut risque, pour les patients avec tumeurs initialement anaplasique. Les patients à risque standard ont un taux de survie de 70-80% (8) et sont traités par Vincristine et Actinomycine. Les patients à haut risque ont un taux de survie de 40-50% (9) et sont traités comme le risque standard avec en plus la Doxorubicine et la radiothérapie. Les patients à très haut risque ont un taux de survie de 10% (10, 11) et dans ce groupe de patients l'utilisation d'une chimiothérapie à hautes doses avec transplantation de cellules souches est en cours d'évaluation par le COG et la SIOP.

De façon identique, et malgré les différences dans la prise en charge, aux Etats-Unis et en Europe, 10 à 15% des enfants rechutent dans les deux ans après le traitement.

L'identification de nouveaux marqueurs biologiques est nécessaire pour identifier les tumeurs à évolution défavorable. Une collaboration transcontinentale est mise en place depuis 1992 entre les membres du COG Renal Tumor Committee (COG-RTC) et les membres du SIOP Renal Tumor Study Group (SIOP-RTSG), avec des réunions tous les deux ans, avec

l'objectif de partager les données des différents projets de recherche et de confronter les résultats pour améliorer la survie des patients atteints de WT.

Dans le futur, le nouveau protocole SIOP-UMBRELLA prendra en considération le volume absolu de blastème et le marqueur moléculaire 1q pour le blastème résistant comme critère de stratification et le nouveau protocole du COG prendra en considération le pattern de méthylation de la région 11p15 pour les patients en stade 1 et histologie favorable, chez qui une thérapie adjuvante ne sera pas indiquée ([12](#)).

- **Anatomie pathologique du néphroblastome**

La WT est une tumeur intra-rénale le plus souvent unilatérale et unicentrique, plus rarement bilatérale (5-10%). Macroscopiquement, cette tumeur est habituellement constituée d'une masse solitaire, ronde et bien délimitée, de couleur gris homogène, séparé par une fine capsule du parenchyme rénal adjacent. Des aspects kystiques sont souvent observés.

C'est une tumeur embryonnaire dérivée du blastème néphrogénique, qui reproduit l'histologie du rein adulte générant une composante épithéliale et une composante stromale. Cette dernière peut acquérir une différenciation ultérieure (rhabdomyoblastique, cartilagineuse, osseuse) (1).

Au plan microscopique il associe classiquement trois composantes, une blastémateuse, indifférenciée et basophile, une épithéliale, plus ou moins différenciée (ébauche de glomérule, de tubule) et une mésenchymateuse, de type musculaire ou fibroblastique.

Le blastème est une composante indifférenciée faite de petites cellules rondes, à fort rapport nucléo-cytoplasmique, noyaux ronds et caractérisés par une chromatine dense et très basophile. La classification histologique de la WT repose sur la proportion entre ces différentes composantes et sur le degré de réponse à la chimiothérapie préopératoire (régression). Les remaniements post-chimiothérapie (en anglais CIC=chemotherapy induced changes) se traduisent avec de la nécrose et un infiltrat inflammatoire riche en macrophages et hémosidérophages.

On peut ainsi classer les tumeurs en complètement nécrotique, régressif, épithélial, stromale, blastémateux, mixte, avec anaplasie focale et avec anaplasie diffuse :

- **WT complètement nécrotique** : 100% de remaniements post-chimiothérapie, sans cellules tumorales viables ;

- **WT régressive** : > 2/3 de remaniements post-chimiothérapie ;

- **WT épithéliale** : >1/3 de tumeur viable, >2/3 de composante épithéliale, <10% de blastème ;

- **WT stromale** : >1/3 de tumeur viable, > 2/3 de composante stromale, <10% de blastème ;

- **WT blastémateuse** : >1/3 de tumeur viable, > 2/3 de blastème.

- **WT mixte** : >1/3 de tumeur viable, présence des 3 composantes (blastème, épithélium, stroma), <10% de blastème ;
- **WT avec anaplasie focale** : présence de 1 ou rares foyers d'anaplasie.
- **WT avec anaplasie diffuse** : plusieurs foyers d'anaplasie.

Sur la base de la classification histologique des tumeurs on peut ainsi classer les WTs en bas risque histologique (néphroblastome kystique partiellement différencié ou cistic partially differentiated nephroblastoma(CPDN), et néphroblastome complètement nécrotique), en risque intermédiaire (épithéliale, stromale, mixte, régressive ou avec anaplasie focale) et en haut risque (blastémateux et avec anaplasie diffuse), l'anaplasie étant caractérisée par des mitoses multipolaires polyploïdes, des noyaux hyperchromatiques et de trois fois supérieurs à la norme (WHO Classification of Tumours, IARC Press, Lyon, 2004) (Figure 1).

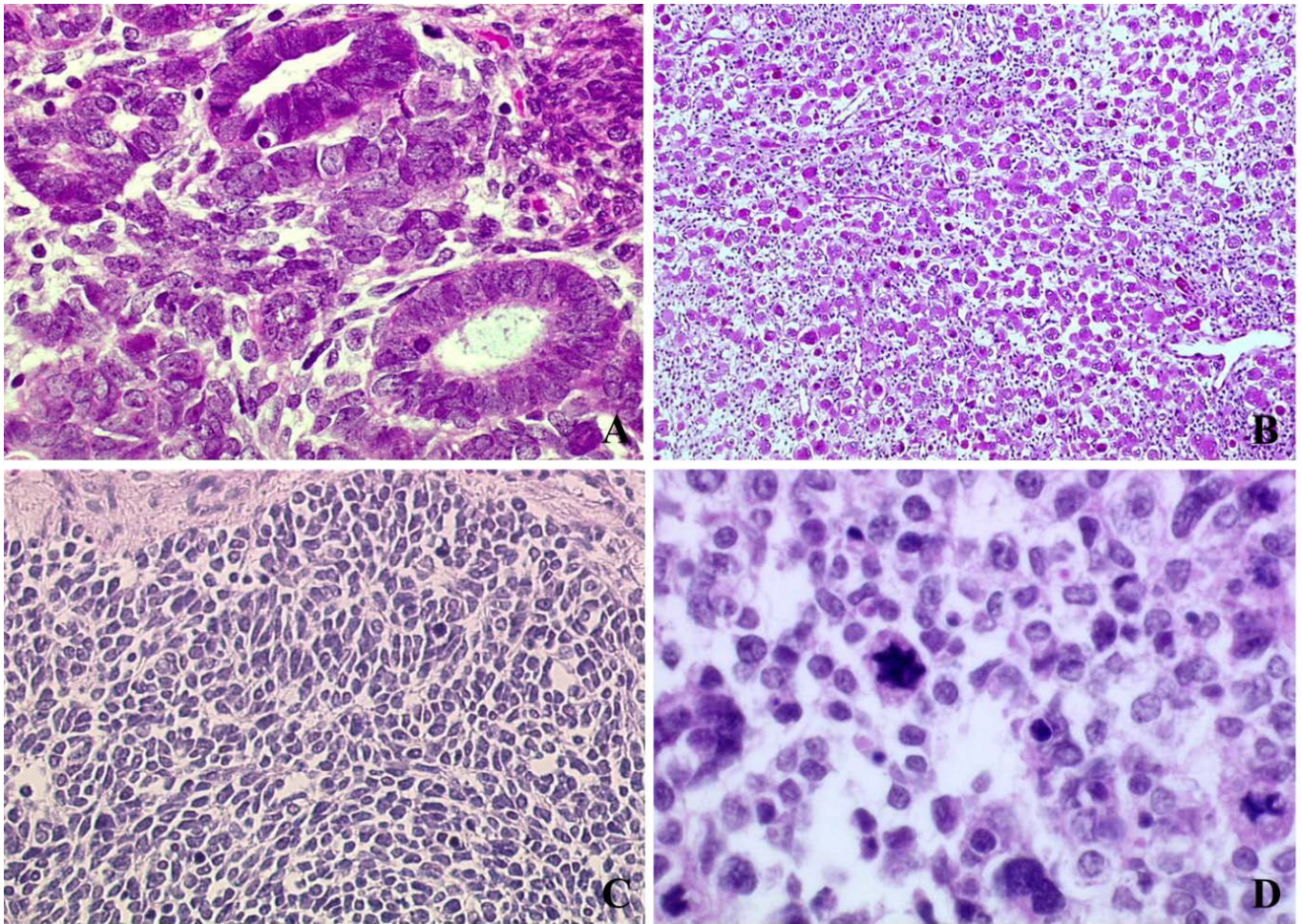


Figure 1. Les différentes composantes histologiques du WT. A : épithélium ; B : stroma, dans le cas spécifique avec différenciation rhabdomyoblastique. C : blastème ; D : anaplasie.

Le stade local est défini selon la classification de la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique (SIOP) :

- **Stade I** : tumeur limitée au rein, encapsulée, d'exérèse complète.
- **Stade II** : tumeur franchissant la capsule rénale mais dont l'exérèse a été totale.
- **Stade III** : exérèse incomplète ou tumeur rompue (par traumatisme biopsie) ou ganglions du hile rénal envahis
- **Stade IV** : métastases hématogènes.
- **Stade V** : néphroblastome bilatéral synchrones.

- **Génétique du néphroblastome**

Dans la plupart des cancers de l'adulte, l'initiation et la progression tumorale sont le résultat de l'accumulation de multiples évènements génétiques dans le temps. De façon différente, le cancer chez l'enfant est le résultat d'un ou deux évènements génétiques sur une période de quelques mois ou de peu d'années. Ce mécanisme concerne souvent des gènes qui sont impliqués dans le développement, raison pour laquelle les cellules tumorales ressemblent souvent à des cellules embryonnaires en voie de développement. La WT est une tumeur qui peut bien expliquer la pathogenèse des tumeurs pédiatriques, une tumeur caractérisée d'une hétérogénéité histologique et une complexité génétique. Cette tumeur est la seule qui provient d'une lésion précurseur : les restes néphrogéniques ([13](#)).

Les restes néphrogéniques se définissent par la présence de tissu embryonnaire dans le rein en développement. Lorsque qu'ils sont multiples ou diffus, le terme de néphroblastomatose est utilisé. Ces lésions sont considérées comme des précurseurs des WTs et se rencontrent également dans les syndromes prédisposant au WT. La classification de Beckwith en reconnaît plusieurs types selon des critères topographiques et morphologiques. On peut simplifier leur classification en identifiant deux groupes de restes néphrogéniques : intra-lobaires (ILNR) et péri-lobaires (PLNR). Leur devenir est imprévisible et ils peuvent soit régresser spontanément ou après traitement soit se transformer en WT ([14](#))

La pathogénie du WT est imputée à deux loci différents : le gène WT1 (dans la région 11p13) et le gène WT2 (dans la région 11p15).

WT1 est un facteur de transcription clef dans des différentes phases du développement rénale, gonadique et cardiaque ([15](#), [16](#)).

Alors que des mutations germinales de WT1 sont à l'origine de certains syndromes, comme Denis-Drash et WAGR, celles-ci comportant des troubles du développement urinaire ([17-19](#)), les mutations somatiques sont à l'origine du 10-20% des WTs ([20-22](#)). La mutation de WT1 peut être accompagnée par l'activation de Wnt, souvent provoqué par la mutation activatrice de la bêta-caténine (CTNNB1) ([23](#), [24](#)). Par ailleurs, des mutations inactivatrices

de WT1, sur le chromosome X, peuvent contribuer à la dégradation de la bêta-caténine, et être à l'origine de 15-20% des WT, indépendamment de la mutation de WT1 ([25-28](#)).

La région contenant le gène WT2 a attiré l'attention des chercheurs par la découverte d'un large nombre de néphroblastomes présentant une LOH (Loss Of Heterozygosity) ou une LOI (Loss Of Imprinting) au niveau de la région 11p15 ([29, 30](#)). De plus, chez les patients avec un syndrome de Beckwith-Wiedemann (voir page 10 ??) ayant un risque élevé de développer une WT, une pUPD (unidisomie paternelle), une duplication de la région 11p15 ou une anomalie de méthylation dans le centre d'empreinte ICR1 de cette région ont été décrites ([31-37](#)).

Malgré l'observation du rôle important de la région 11p15 dans la pathogenèse de la WT, ils existent des patients avec une WT sans anomalies de la région 11p15 ([38](#)). Il a été démontré que des souris mutantes avec LOI d'ICR-1 (Imprinting Control Region) ne développaient pas de WT ([39](#)) étant donné que l'expression biallélique d'IGF2 seule est insuffisante au développement tumoral (voir chapitre 2).

Des nombreuses altérations épigénétiques ont été trouvées dans les WTs (Table 1) ([40](#)).

Aberration	Finding within Wilms tumour
Casp8 hypermethylation	Frequency and associated with RASSF1A methylation
GLIPR1/RTVP hypomethylation	Frequency of 87.5%, results in overexpression
Global hypomethylation	Results in genome instability tumour cells
Gain of methylation 6p22.1, 6p21.32 and 11q13.5	Biomarker for WT, can be detected in the circulation of patients
HACE1 hypermethylation	Frequency of 73%
Hypermethylation of a CTCF binding site downstream of WT1	Correlated with high WT1 expression
Hypermethylation of protocadherin cluster at 5q31	Results in expression loss of these proteins at the cell surface
LOI 11p15	Frequency of 69%, resulting in overexpression of IGF2 and down regulation of H19
P16 hypermethylation	Frequency of 23%
RASSF1 hypermethylation	Frequency of 54%
WT1-antisense transcript hypomethylation	Results in biallelic expression

Table 1. Alterations épigénétiques dans le tumeur de Wilms (selon Maschietto et al, 2014).

En 1992, une LOH au niveau du chromosome 16q a été mise en évidence de façon récurrente dans la WT, parfois associée à une LOH du chromosome 1p (41). Une étude suivante a corrélé ces pertes de chromosomes à un pronostic défavorable (42). Des études allemandes et anglaises ont confirmé ces données (43, 44). Quelques années plus tard une étude américaine réalisée à partir de 1700 patients a évalué rétrospectivement l'impact négatif de l'association d'une LOH 16q et LOH 1p sur le pronostic, cette association a été mise en évidence dans 5% des WT à histologie favorable (45). Sur ces bases ont été conçus les protocoles thérapeutiques américains qui ont prévu une thérapie plus agressive pour les patients avec une LOH combinée du 16q et du 1p. La même recherche a été faite sur 426 patients inclus dans le protocole anglais de la SIOP et dans cette étude la proportion de LOH 1p et 16q était superposable à celle observée aux USA, avec la différence que seulement 2% (contre 5%) des tumeurs à histologie favorable avait une LOH 1p et 16q et que le seul marqueur pronostique significatif identifié était la perte de 16q. (46) Une méta-analyse incluant des cas américains et des cas anglais a montré que des LOH sur 1p ou sur 16q étaient des facteurs pronostiques négatifs indépendants mais leur valeur pronostique était encore plus négative quand les deux pertes d'hétérozygotie étaient associées (47). Une étude de l'Italian Cooperative Group a reporté la valeur pronostique négative de la perte de 1p mais pas de la perte de 16q (48). Une analyse faite au sein du groupe allemand de la SIOP a confirmé aussi l'impact négatif sur le pronostic des pertes de 1p et 16q ainsi que de la perte de 22q, mais ces pertes étaient associées aux tumeurs de haut risque histologique et donc leur valeur pronostique n'était pas indépendante (49). Pour cette raison ces marqueurs ne sont toujours pas intégrés dans la stratification et dans la prise en charge des patients en Europe.

Un autre marqueur moléculaire a été identifié comme ayant un impact négatif sur le pronostic, même plus fort par rapport à la perte des chromosomes 1p et 16q : le gain du chromosome 1q. Le gain de 1q est l'anomalie cytogénétique plus fréquemment identifiée dans les WT, présente dans 30% des cas (50). Des études anglaises ont corrélé ce gain à un risque accru de récurrence (51-53) et d'autres l'ont associée aux pertes de 1p et 16q suggérant que la valeur pronostique des pertes de 1p et 16q n'était pas indépendante (53). Une étude plus récente faite aux USA sur 212 patients traités par chirurgie première a montré un impact négatif du gain de 1q sur la survie sans maladie (54). Actuellement, des études pour

confirmer la valeur pronostique de ces altérations chromosomiques sont en cours, au sein du COG et de la SIOP.

Mon projet de thèse s'inscrit dans le cadre de l'analyse de l'impact pronostique de ces marqueurs sur les tumeurs européennes inscrites dans le protocole SIOP-2001.

Récemment, des techniques de séquençage à génome entier ont identifié des mutations de micro-ARN dans la pathogenèse du WT. Une étude brésilienne a montré une mutation de DROSHA dans 12% des tumeurs analysées et d'autres mutations ont été identifiées avec une fréquence moins importante que pour d'autres micro-ARN comme DGCR8, DICER1, XPO5, TARBP2 et DISL32 ([55-58](#)). Des mutations dans le gène DROSHA/DGCR8 ont été identifiées dans un nombre similaire de cas (18,2%) dans le type blastémateux ([58](#)). De plus, des mutations récurrentes de SIX1 et SIX2 (18.1%) ont été identifiées dans les WTs blastémateux.

Des mutations de TP53 ont été mises en évidence dans 62.5% des WTs avec anaplasie diffuse dans une étude de collaboration entre le COG et la SIOP. Dans cette étude, les mutations de TP53 sont prédictives d'un pronostic défavorable ([59](#)). Dans le passé, une étude nord-américaine avait trouvé une association entre la mutation de TP53, l'anaplasie diffuse et un pronostic défavorable ([60](#)). Différents arguments sont en faveur de l'hypothèse que la WT anaplasique dérive d'une WT de bas risque histologique transformé : le premier argument est que l'anaplasie peut être focale et la mutation de TP53 intéresse seulement les cellules anaplasiques et elle n'est pas clonale dans la tumeur ([60](#), [61](#)). De plus, les tumeurs bilatérales ont souvent une histologie discordante, ce qui confirme la première observation, et en dernier, les tumeurs acquièrent souvent le caractère d'anaplasie diffuse au moment de la rechute alors qu'ils n'avaient pas ce contingent au moment du premier diagnostic. Cela peut faire penser que l'anaplasie s'est développée à partir d'un clone défavorable qui a été sélectionné par la chimiothérapie ([62](#)).

- **Syndrome de Beckwith-Wiedemann et néphroblastome**

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) est un syndrome génétique caractérisé par une croissance excessive fœtale, un risque augmenté de tumeurs embryonnaires dans les premières années de vie et des malformations congénitales. Il n'y a pas de prédisposition ethnique ni de sexe à la maladie et sa prévalence est classiquement de 1 sur 13.700 individus. Le BWS est sporadique (85% des cas) mais une transmission familiale est décrite (15%)([63-65](#)).

La tendance à la croissance excessive se manifeste durant la 2^{ème} moitié de la grossesse et la 1^{ère} année de vie; la taille adulte est en général dans la norme mais dans la zone supérieure des références ([32](#)). L'anomalie de croissance peut aussi se manifester par une hyperplasie hémicorporelle et/ou une macroglossie (entraînant des troubles d'alimentation, d'élocution et parfois une apnée du sommeil). Une hypoglycémie néonatale est rapportée dans 30 à 50% des cas. Un faciès caractéristique est fréquent, celle-ci se normalisant à l'âge adulte. Les autres signes caractéristiques sont : omphalocèle/ hernie ombilicale/diastasis des droits, tumeurs embryonnaires (WT, neuroblastome, cortico-surréalome, hépatoblastome, rhabdomyosarcome)([57](#)), plis auriculaires antérieurs et fistules hélicéennes postérieures, nævus flammeus (ou autres malformations vasculaires), viscéromégalie abdominale (surtout foie, rein), cytomégalie corticosurrénalienne fœtale (pathognomonique), malformations rénales, rarement fente palatine et malformations cardiaques et cérébrales. ([66](#)). Les critères diagnostiques majeurs sont : macroglossie, macrosomie, anomalie de la paroi abdominale dont l'omphalocèle, viscéromégalie et hypertrophie hémicorporelle. Les critères diagnostiques mineurs sont une hypoglycémie néonatale avec un hyperinsulinisme, des anomalies des oreilles et des nævi faciaux. Le diagnostic peut être retenu par la présence de trois critères majeurs ou par l'association de deux critères majeurs et au moins deux critères mineurs([67](#)).

Le BWS est dû à des altérations épigénétiques et/ou génétiques qui dérèglent les gènes soumis à l'empreinte parentale du chromosome 11p15.5. Il existe des groupes moléculaires associés à des risques de récurrence et des signes cliniques différents (comme le risque tumoral) ([32](#)). L'anomalie de 11p15 est identifiée chez environ 80% des patients présentant un phénotype plus ou moins sévère.

La plupart des anomalies épigénétiques sont présentes en mosaïque, l'anomalie moléculaire étant présente seulement sur un certain type de cellule ou tissu et non pas de façon ubiquitaire dans l'organisme. L'anomalie du gène CDKN1C (mutation germinale) est, au contraire, présente de façon ubiquitaire (32).

L'anomalie moléculaire la plus fréquente est une altération épigénétique, il s'agit de la **perte de méthylation du centre d'empreinte ICR-2** (LOM, pour *Loss Of Methylation*) sur l'allèle maternel, étant à l'origine de 60% des cas. Cette anomalie est responsable d'une perte d'expression des gènes normalement exprimés par l'allèle maternel (CDKN1C, régulateur du cycle cellulaire) et de la double expression, biallélique, des gènes de l'allèle paternel (KCNQ1OT1, ARN non-codant) (68, 69) (32, 37)

Le **gain de méthylation d'ICR1** (GOM pour *Gain Of Methylation*) est à l'origine de 10% des cas 32. Il aboutit à une double expression d'IGF2. Ce mécanisme a été mis en évidence dans la WT en 1993 (29, 33, 37) et dans les tissus de patients (36).

L'anomalie moléculaire génétique qui explique 20% des cas est l'**isodisomie paternelle (pUPD)** de la région 11p15. Le mécanisme à la base de cette anomalie pourrait avoir lieu soit pendant la méiose d'un de deux gamètes, correspondant dans ce cas à une correction de trisomie ou de monosomie, soit pendant la mitose, correspondant dans ce cas à un échange de chromatide entre deux chromosomes homologues (70).

La double contribution paternelle de la région 11p15 induit une expression biallélique d'IGF2 et de KCNQ1OT1 et la perte de contribution maternelle induit une perte d'expression de CDKN1C et H19.

Un quatrième mécanisme génétique, intéressant 5% des cas, est la **mutation de CDKN1C**, identifiée en 1996 (71, 72). Elle est à l'origine de la majorité des formes familiales de BWS (73). Les autres anomalies cytogénétiques de type délétion, duplication et autres ne constituent que 2% des cas BWS (71).

Ainsi plusieurs gènes sont à l'origine de l'excès de croissance du BWS et de la WT, comme IGF2, CDKN1C, H19 et KCNQ1OT1, WT1 et WT2 (33, 34, 36, 74).

L'incidence globale de tumeurs abdominales chez les enfants atteints de BWS est en moyenne de 4 à 7% (75-77) mais varie de 2 à 30% en fonction de l'anomalie moléculaire (31,

[32](#)). Les tumeurs observées sont l'hépatoblastome, le neuroblastome, le rhabdomyosarcome, le carcinome cortico-surrénalien et la WT. Celle-ci représente 60% des tumeurs des enfants avec BWS ([78](#), [79](#)). Le risque relatif de développer un néphroblastome chez l'enfant avec BWS a été évalué à 816 fois par DeBaun et Tucker ([80](#)). En revanche, seulement 1 à 2 % des enfants avec BWS développent un néphroblastome ([81](#)).

Depuis la découverte des mécanismes moléculaires à l'origine du BWS, des études ont montré que les anomalies intéressant le domaine télomérique de la région 11p15, comme pUPD et ICR1 GOM, sont corrélées à un risque plus élevé de développer une tumeur embryonnaire. A l'opposé, le risque de tumeur embryonnaire est faible si les anomalies intéressent le domaine centromérique de la même région (CDKN1C et ICR2 LOM) ([31](#), [32](#), [82-85](#)). Jusqu'à aujourd'hui la WT n'a jamais été reporté chez les patients avec ICR2 LOM ou mutation de CDKN1C.

La WT associée au BWS a un pronostic nettement meilleur par rapport à la WT sporadique. Vaughan et collègues rapportent une survie sans évènement de 100% à 9 ans, dans une série de 10 patients avec néphroblastome associé au BWS ([79](#)). La WT syndromique est de plus petite taille, de stade moins élevé au diagnostic avec des métastases moins fréquentes et un taux faible de tumeurs anaplasiques ([86](#)). De plus, ces tumeurs sont souvent bilatérales (21% dans la série de Porteus et al.) ([86](#)) et cette bilatéralité pouvant être synchrones, c'est à dire de découverte concomitante pour les deux cotés (17%) ou métachrone, quand les tumeurs ne sont pas diagnostiquées au même moment (4%). La présence de restes néphrogéniques bilatéraux est rapportée comme étant des lésions précurseurs de WT et associées à la WT dans le BWS ([87](#)).

Tous ces éléments suggèrent une prise en charge différente de la WT associée au BWS par rapport à la WT sporadique avec une particulière attention à la détection de tumeur bilatérale (synchrones ou métachrone), et à l'application d'une chirurgie le plus conservatrice possible (Nephron Sparing Surgery NSS) en prévision d'une reprise de maladie controlatérale ([30](#), [32](#), [57](#), [86](#))

Brioude et collaborateurs ont pu montrer une corrélation entre les anomalies moléculaires et le type et risque tumoral, dans la plus grande cohorte de patients avec BWS ([32](#)). Cette étude confirme que la prévalence tumorale est plus élevée (28,6%) chez les patients avec

ICR1 GOM et chez les patients avec pUPD 11p15 (17,3%). Dix des 17 tumeurs étaient des WT. Grâce à cette étude, de nouvelles lignes guidant dans la prise en charge du BWS ont pu être élaborées, basées sur le risque de développer une tumeur en relation avec le type moléculaire.

L’empreinte parentale

Epigénétique

L’épigénétique est l’ensemble des modifications de la chromatine aboutissant à une modification de l’expression des gènes, sans modification de la séquence nucléotidique. Par conséquent, à une séquence nucléotidique identique correspondent de nombreux épigénomes en fonction du niveau d’expression des différents gènes. Les différents épigénomes peuvent varier au cours de la vie ou d’un tissu à l’autre. Le contrôle épigénétique est impliqué dans des processus physiologiques, concernant le développement et la différenciation cellulaire, dans des processus d’inactivation du chromosome X et dans les mécanismes de l’empreinte parentale. Son implication est également connue dans des processus pathologiques comme les tumeurs et les troubles du développement.

Marques épigénétiques

Le concept d’épigénétique est connu depuis les années 1940. Conrad Waddington définit l’épigénétique comme la relation entre les gènes et leurs produits, à l’origine du phénotype.

Dans les années 1970, Holliday et Pugh identifient la méthylation comme la première marque épigénétique (88). Plus tard, l’identification des modifications des queues des histones et le rôle des ARN non codants ont permis de préciser les mécanismes épigénétiques.

Méthylation de l’ADN

La méthylation de l’ADN se produit sur les cytosines des nucléotides CpG, au niveau de régions préférentielles, les îlots CpG. Ces domaines riches en dinucléotides CpG se situent pour la plupart dans les promoteurs de gènes, des régions intergéniques et des régions riches en séquences répétées.

L’ADN méthylé est le plus souvent associé à un état fermé de la chromatine, et va recruter des domaines de protéines (MBD : Methyl CpG Binding Domain ; MeCP : Methyl CpG Binding Protein). Ces protéines, qui se lient à l’ADN sur un domaine de liaison spécifique, sont responsables de la répression de la transcription et du recrutement d’autres facteurs responsable d’un état condensé de la chromatine (89). La méthylation peut également

empêcher la liaison de certains facteurs de transcription à l'ADN, empêchant leur fonction d'expression. Cela arrive en particulier au niveau des promoteurs des gènes.

Dans les régions intergéniques et les régions répétées, la méthylation de l'ADN est indispensable au maintien de l'intégrité du génome. Une hypométhylation des régions intergéniques ou répétées, mais aussi des régions promotrices, est fréquemment observé dans certains cancers, comme l'adénocarcinome du colon où ce phénomène est associé à une instabilité génomique ([90](#)).

Modification des queues des histones

Les modifications des histones (par exemple H3K9ac) sont des modifications post-traductionnelles des histones, comprenant le plus souvent l'acétylation, la méthylation, mais aussi l'ubiquitination et la phosphorylation. Ces modifications intéressent l'extrémité N-terminale des histones qui sont situées sur le versant externe du nucléosome, et sont donc accessibles aux autres protéines intervenant dans la modification de la structure de la chromatine.

L'ensemble de ces modifications aboutit à un grand nombre de modifications aboutissant à un code histone ([91](#)).

L'acétylation des histones active et transcrit le gène en réduisant les charges positives sur les histones et diminuant l'affinité des histones pour l'ADN chargé négativement, entraînant ainsi une chromatine non compactée et accessible à différents facteurs notamment à facteurs de transcription.

La méthylation des histones ne change pas la charge des histones et peut être associée à une activation ou une inactivation de gène. Les trois marques « méthyl » les plus connues sont la marque H3K4me1 ou me2 (observée dans les promoteurs des gènes et associée à un état actif du promoteur, et les marques H3K9 et H3K27me1 et me3 (associées à une répression des gènes et principalement observées dans les régions d'hétérochromatine). De façon générale, le code histone est lu par d'autres facteurs qui vont lier la chromatine et qui sont capables à leur tour de modifier les marques épigénétiques de la région et la conformation de la chromatine.

Longs ARN non codants (lncRNA)

Ces ARN sont constitués par des transcrits non traduits dont la taille dépasse 200 nucléotides. Leur expression est tissu spécifique et leur transcription suit les règles habituelles de la transcription des gènes : ils possèdent souvent un promoteur, sont épissés, parfois polyadénillés et leur niveau d'expression peut être commandé par des « enhancers ». Les lncRNA les plus connus sont ceux qui interviennent dans l'inactivation du chromosome X, ceux qui sont présents dans les régions soumises à empreinte parentale, où le gène soumis à empreinte et les lncRNA sont exprimés réciproquement en fonction de l'origine parentale de l'allèle : sur la région 11p15 ils sont respectivement IGF2/H19 et CDKN1C/KCNQ1OT1 ([92](#)).

Sur le plan physiologique, les lncRNA sont impliqués dans le processus de différenciation et prolifération cellulaire, dans le maintien de la pluripotence dans les cellules souches embryonnaires et aussi en pathologie dans le développement de certains cancers. Ils sont également impliqués dans la pathogenèse de certaines pathologies héréditaires comme la dysplasie musculaire fascio-scapulo-humérale et la brachydactylie de type E ([93-95](#)).

Les mécanismes d'interaction entre les lncRNA et l'expression des gènes sont multiples : certains interagissent avec l'ADN, certains avec l'ARN, certains avec les protéines. Les lncRNA peuvent agir en modifiant la chromatine, sur la transcription de gènes cibles (par interaction directe avec des facteurs de transcription), directement sur les ARN messagers (modifiant l'épissage, la stabilité, la traduction ou la quantité de transcrit par compétition avec les miRNA, ou en étant eux même source de mi-ARN comme miR675 à partir de lncRNA H19) ([92](#), [93](#), [96](#)).

Le concept d'empreinte parentale

L'empreinte parentale est l'expression différentielle des deux allèles d'un même gène en fonction de leur origine parentale. Un gène soumis à empreinte maternelle ne sera exprimé qu'à partir de l'allèle paternel et vice versa. Le concept d'empreinte parentale a émergé à la fin des années 1980 suite à la démonstration d'une non équivalence des deux génomes paternel et maternel. Dans le règne animal, des cas d'animaux hybrides, produit du croisement entre animaux d'espèces différentes mais proches illustrent le concept : le croisement d'un âne avec une jument est un mulet, mais le croisement d'une ânesse avec un cheval donne un bardot, animal phénotypiquement différent. De la même façon le croisement entre un lion et une tigresse donne une ligre, un félin docile qui peut atteindre les 3.30 mt de longueur, et le croisement d'une lionne avec un tigre male donne le tigron, animal plus petit et plus agressif. Des nombreux autres exemples existent. La plus part de ces animaux sont cependant stériles. Une illustration d'une non équivalence des deux génomes parentaux a été apportée par la création d'embryons gynogénètes (deux génomes maternels), qui aboutit au développement de l'embryon mais non des annexes, alors que la création d'un embryon androgénète (deux génomes paternels) entraîne le développement des annexes sans développement des embryons (97). En pathologie humaine ce sujet est illustré par des tumeurs comme le tératome (duplication du génome maternel dans un ovocyte aboutissant dans une cellule diploïde gynogénète), par la mole hydatiforme, tumeur du trophoblaste qui apparaît si un spermatozoïde féconde un ovocyte dépourvu de pronucléus et ensuite duplique le génome paternel.

A ce jour, 87 gènes soumis à empreinte ont été identifié chez l'humain et 107 autres sont prédits comme soumis à empreinte mais ils sont peut-être plus nombreux (<http://www.geneimprint.com/>)(98, 99)

Les gènes soumis à empreinte présentent un certain nombre de caractéristiques communes : ils sont regroupés en clusters ; la plupart de ces clusters comprennent des centres de régulation de l'empreinte (ICR pour *Imprinting Control Regions*) qui sont des régions différenciellement méthylées sur chacun des deux allèles (DMR pour *Differentially Methylated Region*). Ces régions sont particulièrement riches en îlots CpG et en séquences répétées. Les gènes soumis à empreinte subissent un asynchronisme de réplication lors de

la mitose (l'allèle paternel se duplique plus précocement que l'allèle maternel pour la plupart des gènes soumis à empreinte).

Le cycle de l'empreinte

La mise en place de l'empreinte est un processus complexe pendant lequel les différentes régions soumises à empreinte vont subir une série de modifications dynamiques durant deux étapes clés du développement embryonnaire. La première prend place dans la lignée germinale et l'autre pendant les premières étapes du développement dans les cellules somatiques de l'embryon (Figure 2).

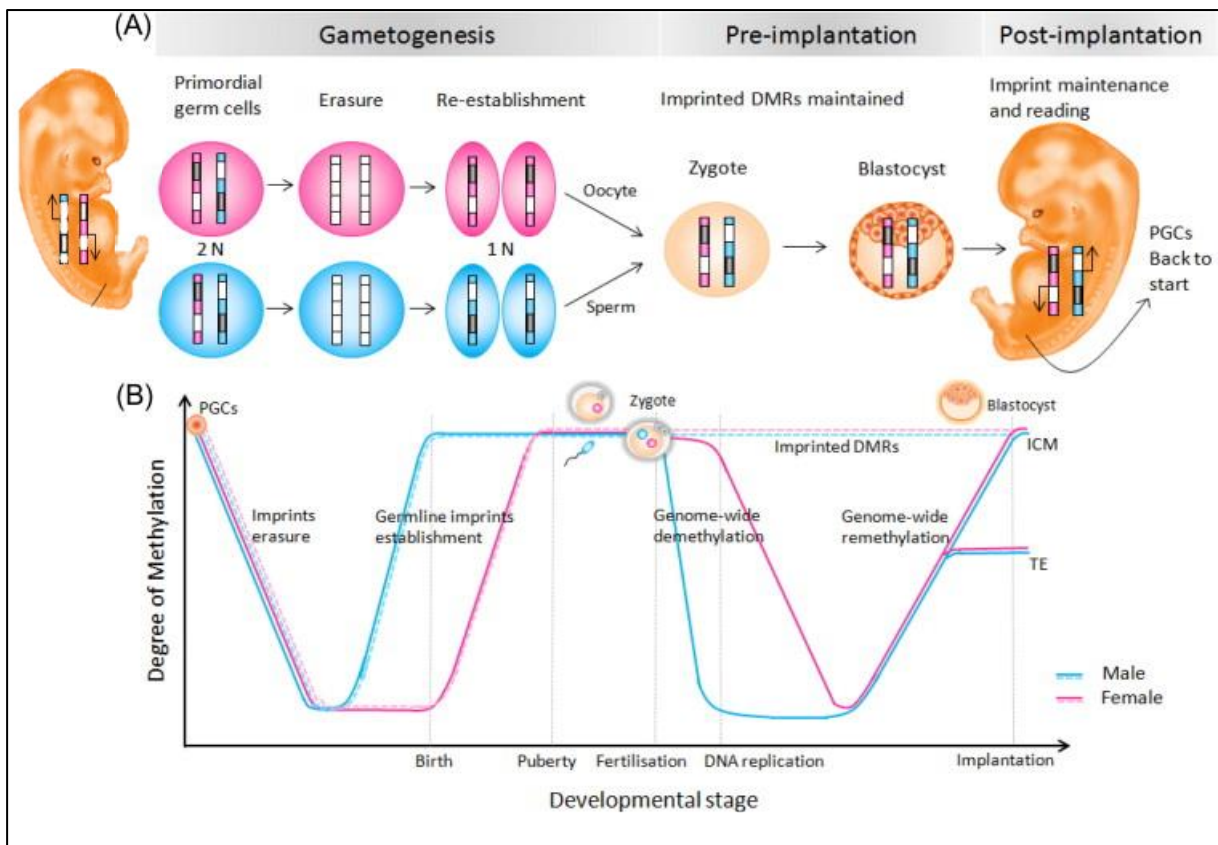


Figure 2: Dans les cellules germinales primordiales du nouvel organisme, les marques d'empreinte commencent à être effacées à un stade très précoce. Elles seront réapposées à un stade plus tardif (après la naissance pendant la maturation de l'ovocyte) au cours de la gamétogenèse, en fonction du sexe de l'individu (marquage de type maternel dans les ovocytes et marquage de type paternel dans les spermatozoïdes). Au contraire, au cours du développement postzygotique précoce, les marques d'empreinte présentes sur les génomes d'origine maternelle et paternelle doivent être maintenues alors qu'il existe successivement une vague de déméthylation globale du génome (pendant les premières divisions cellulaires) puis une méthylation *de novo* (après le stade blastocyste). Les marques d'empreinte sont ensuite maintenues dans les cellules somatiques au cours du développement (100).

La méthylation est le marquage épigénétique le mieux étudié et est utilisé comme marque de la mise en place de l’empreinte dans les deux lignées germinales dans la plupart des études. Cependant, les données les plus récentes laissent penser que les autres modifications structurelles de la chromatine pourraient jouer également un rôle primordial dans ce processus.

a. Effacement de l’empreinte dans les cellules germinales primordiales

La première étape de ce processus implique l’effacement des marques d’empreinte (méthylation de l’ADN) dans les cellules germinales primordiales (PGC *primordial germ cells*) afin de permettre à ces cellules d’apposer leurs propres marques correspondant au sexe de l’embryon. Ce phénomène d’effacement est bien étudié chez la souris. Cette première étape commence au cours de la migration des PGC dans les crêtes génitales (à partir du jour embryonnaire E8) et se termine au moment où elles prennent place dans les gonades différenciées (E12/E13) ([91](#), [101-103](#)). Ceci semble survenir au moins au cours de deux phases de déméthylation : la première commençant à E8 et concerne la majorité du génome et la deuxième aux alentours de E12.5 dans les gonades et concernant l’effacement de l’empreinte parentale. La première vague de déméthylation est précédée par l’exclusion des DNMT des noyaux des PGC. D’une façon concomitante à la déméthylation progressive du génome des PGC, une diminution de la marque histone *H3K9me2* se produit. Par contre, cela est suivi par une augmentation de la marque répressive de la transcription *H3K27me3*, qui débute à partir de E8.5-E9 et est maintenue au moins jusqu’à E12.5 ([104-106](#)). Ces vagues de reprogrammation épigénétique permettent un retour des cellules germinales à un état pluripotent et l’effacement d’éventuelles anomalies épigénétiques évitant la transmission d’épimutations à la génération suivante ([101](#), [105](#)). Cette déméthylation globale du génome coïncide avec l’arrêt de la mitose (mâle) et la méiose (femelle) des gamètes primordiales ce qui éviterait la réplication de l’ADN déméthylé et par conséquent éviterait des anomalies chromosomiques qui pourraient être fatales pour le devenir du gamète ([107](#)). Cette déméthylation est un processus actif car elle a lieu dans un bref intervalle de temps (entre 11.5 et 12.5 jours post conceptionnels), faisant intervenir deux protéines spécifiques DNA déméthylases de la famille des TET ([108](#)). Les deux homologues de chaque paire chromosomique se retrouvent donc théoriquement dans un état

épigénétique identique (au moins en ce qui concerne la méthylation), quelle que soit leur origine parentale.

b. Etablissement de l’empreinte dans les cellules germinales

Après la phase d’effacement, une phase d’établissement de l’empreinte se produit, suite à un processus actif de méthylation *de novo*, dans les deux lignées germinales au cours de la maturation des gamètes et qui permet une reprogrammation épigénétique appropriée et l’acquisition des marques d’empreinte en fonction du sexe du nouvel individu : marquage de type maternel dans les ovocytes et marquage de type paternel dans les spermatozoïdes ([109](#), [110](#)). La réapposition de l’empreinte coïncide avec la reprise des divisions cellulaires dans les gamètes mâles et avec la maturation des gamètes femelles (Figure 3). Le moment auquel se déroule l’acquisition de l’empreinte est cependant très différent dans les deux sexes, avec une apposition plus précoce dans la lignée germinale mâle (qui s’effectue dans les gonocytes diploïdes bien avant le début de la méiose) comparée à la lignée germinale femelle (s’effectuant dans les ovocytes au cours de la maturation durant la vie postnatale) ([111](#)).

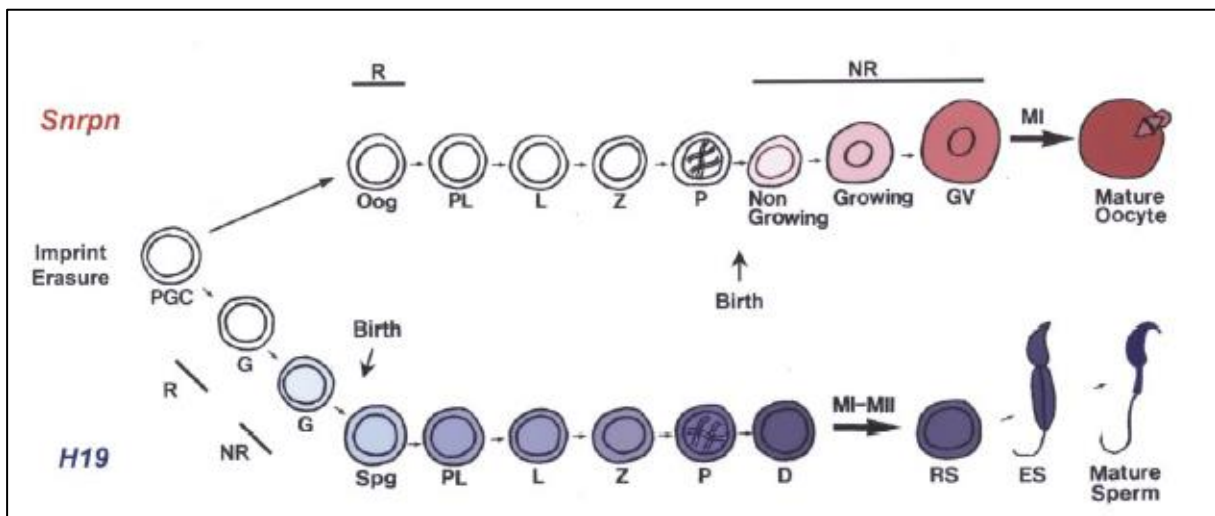


Figure 3: Exemple de l’établissement pour les gènes *Snrpn* (dans la lignée femelle) et *H19* (dans la lignée mâle) au cours de la gamétogénèse. Selon Weaver et al. ([111](#))

Dans la lignée germinale mâle, la méthylation de la région *H19* DMD (qui est l’ICR du domaine *Igf2/H19* chez la souris), est déjà initiée dans les spermatogonies au moment de la naissance avant l’entrée en méiose (Figure 3) puis renforcée en période postnatale et

achevée au stade pachytène de la méiose ([112](#), [113](#)). Cela semble aussi être le cas pour les deux autres ICR paternels, *Dlk1/Gtl2* et *Rasgfr1* ([114](#)). Au contraire, dans la lignée germinale femelle, la méthylation des ICR maternels sera acquise bien après la naissance, au cours de la phase de croissance de l'ovocyte et n'est complète que dans les ovocytes en métaphase II ([111](#)) (Figure 3). Certaines de ces données, obtenues chez la souris, ont aussi été validées chez l'humain. En effet, il a été démontré suite à l'étude de l'acquisition de la méthylation au cours des différents stades de maturation ovocytaire (vésicule germinale, métaphase I et II) chez l'humain, que la méthylation de la DMR/ICR du gène *SNRPN* et de la région ICR2/KvDMR1, centre d'empreinte du locus *KCNQ1OT1/CDKN1C*, était presque totalement acquise aux stades vésicule germinale (VG) et en phase Métaphase I, mais elle n'est totale qu'au stade MII ([115-117](#)). Ces observations confirment l'utilité du modèle murin dans l'étude de ce processus complexe particulièrement difficile à appréhender chez l'humain en raison du manque de disponibilité en ovocytes issus de cycles naturels. Malheureusement, il n'y a pas de données concernant les stades plus précoces. Durant le développement des spermatozoïdes chez l'homme, il a été démontré que la méthylation au locus *IGF2/H19* était absente dans les spermatogonies fœtales (24 SA), mais complètement acquise dans les spermatogonies adultes entrant en méiose ([118](#)). Par ailleurs, alors que la méthylation au locus *DLK1/GTL2* (intergénique DMR ; IG-DMR) est totalement absente dans les différents stades de maturation ovocytaire (VG, MI et MII), elle est totalement acquise dans les spermatozoïdes matures ([119](#)). La méthylation dans les spermatogonies à la naissance et avant la puberté n'a pas été étudiée et on ne sait donc pas si elle est acquise autour de la naissance ou plus tardivement dans l'espèce humaine. Alors que l'effacement de l'empreinte semble se produire de la même façon dans les deux types de gamètes (ovocyte et spermatozoïde), sa réapposition se caractérise par une chronologie bien précise (Figure 2).

Dans le but d'étudier la chronologie de l'acquisition de l'empreinte maternelle durant la maturation de l'ovocyte, des équipes ont étudié l'apposition de l'empreinte de différents gènes dans des embryons parthénogénétiques créés par transfert nucléaire d'ovocytes à différents stades de ([120](#)). Ils ont démontré que la méthylation aux loci *Snrpn*, *Znf127* et *Ndn* est apposée très précocement durant les stades follicule primordial et primaire, alors que l'empreinte aux loci *Peg3*, *Igf2r* et *Cdkn1c* est apposée plus tardivement au stade follicule secondaire. Certains gènes (comme *Peg1/Mest*), cependant, n'acquièrent leur empreinte

que durant les stades très avancés du développement folliculaire voir même lors de sa maturation (Figure 4A).

Des études ont montré ultérieurement que, non seulement l'acquisition de la méthylation au niveau des DMR/ICR des différents gènes *Snrpn*, *Igf2r*, *Peg1* et *Peg3* est asynchrone, mais que, au sein de la même DMR/ICR de *Snrpn*, la méthylation est acquise plus précocement sur l'allèle d'origine maternelle, suggérant l'existence d'une « mémoire épigénétique allèle spécifique » indépendante de la méthylation de l'ADN et qui pourrait faire intervenir des modifications d'histones (121). Cette observation a également été faite dans la lignée germinale mâle puisqu'au locus *Igf2/H19*, l'allèle d'origine paternelle acquiert sa méthylation avant l'allèle d'origine maternelle (Figure 4B) (122, 123).

Le rôle des différentes DNMT dans l'apposition des marques d'empreinte au cours de la gamétogénèse sera discuté ultérieurement. Certains facteurs agissant en *trans* ont été impliqués dans ces mécanismes d'apposition de l'empreinte.

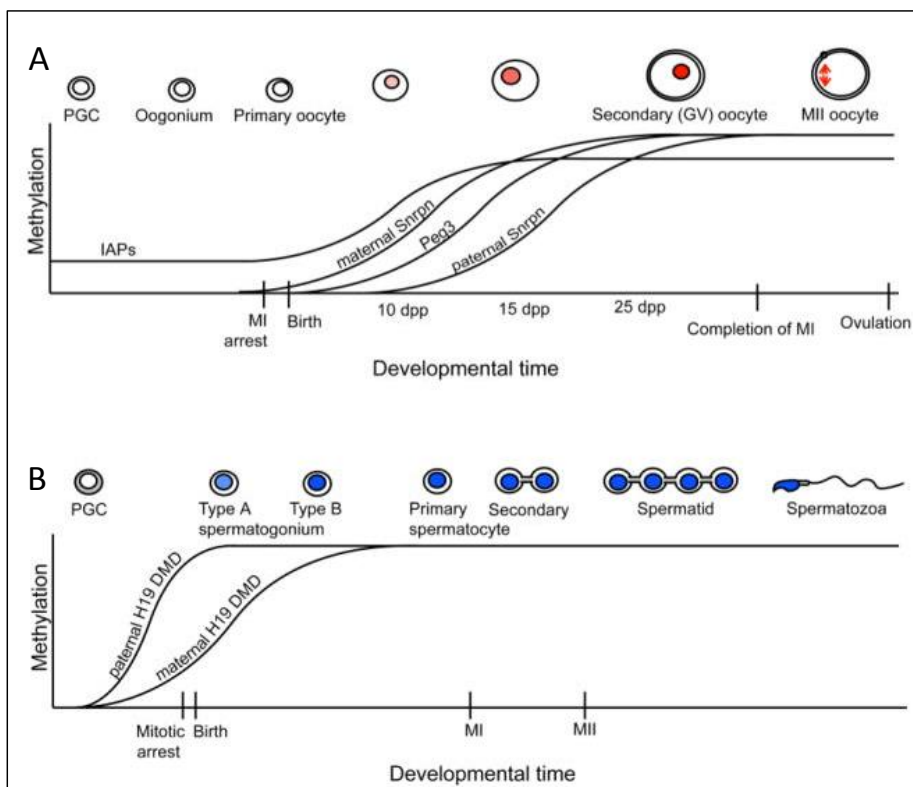


Figure 4: (A) Etablissement de l'empreinte dans la lignée germinale femelle. (B) Etablissement de l'empreinte dans la lignée germinale mâle. (123)

La protéine Zfp57 est un acteur primordial de ce processus. En fait, les souris invalidées pour le gène *Zfp57* présentent une perte de méthylation au niveau de la DMR/ICR de *Snrpn*. En revanche, l'inactivation de ce gène dans les lignées germinales mâles n'a pas d'effet sur la méthylation des DMR ([124](#)). En pathologie humaine, des mutations de *ZFP57* ont été identifiées chez des patients atteints de diabète néonatal transitoire avec perte de méthylation à différents loci soumis à empreinte dont *ZAC1* ([125](#)).

c. Maintien des marques d'empreinte après la fécondation

La deuxième étape de la reprogrammation épigénétique tient place juste après la fécondation. Pendant que le pronucléus femelle achève sa méiose, le génome paternel subit déjà une vague de changement. Les protamines (qui ont remplacé les histones dans le spermatozoïde) sont rapidement remplacées par les histones et une phase de déméthylation du génome paternel débute (Figure 2). Cette déméthylation sera maximale avant l'initiation de la réplication de l'ADN du pronucléus mâle ([126-128](#)). Cependant, certaines régions du génome paternel sont protégées de cette vague de déméthylation: l'hétérochromatine centromérique et péri-centromérique, certains retrotransposons et les ICR paternels ([116](#), [129](#), [130](#)). Cette déméthylation globale du génome paternel dépend très probablement d'un mécanisme actif grâce à l'action d'enzymes spécifiques contenues dans l'ovocyte ([131-133](#)). Le génome maternel subit lui aussi une vague de déméthylation mais plus tardive (Figure 2). Le mécanisme impliqué dans ce processus est probablement passif par défaut de maintien de la méthylation au cours de la réplication de l'ADN, lié à l'exclusion du noyau de DNMT1 ([134](#), [135](#)). Cependant, comme pour les ICRs paternels, la méthylation est conservée au niveau des ICRs maternels ([115](#), [116](#)).

Cette déméthylation du génome après la fécondation permet un retour à l'état de totipotence des cellules lors des premiers stades de divisions cellulaires et jusqu'à l'implantation. Après ce stade une phase de méthylation *de novo* débute. Comme dans la phase de déméthylation globale du génome, les régions soumises à empreinte parentale sont protégées de cette vague de méthylation *de novo* ([109](#)). Cependant, les mécanismes protégeant les ICR de cette vague de déméthylation puis de méthylation *de novo* survenant après la fécondation sont encore incomplètement compris. Différents facteurs ont été

identifiés comme indispensables afin de protéger les ICRs de cette déméthylation du génome, le plus souvent à partir de modèles animaux d'inactivation génique.

Dppa3 fut le premier facteur identifié (initialement appelé *PGC7* ou *Stella*). *Dppa3* est exprimé dans les cellules germinales primordiales, puis dans les ovocytes au cours de la maturation, et son expression se maintient après la fécondation (136). La plupart des embryons invalidés pour *Dppa3* n'atteignent pas le stade blastocyste à cause d'une importante déméthylation des gènes soumis à empreinte: déméthylation des gènes normalement méthylés sur l'allèle maternel (*Peg1*, *Peg3* et *Peg10*) ou sur l'allèle paternel (*H19* ou *Rasgfr1*). Pour le troisième locus méthylé sur l'allèle paternel (*Dlk1/Gtl2*), l'état de méthylation était normal malgré l'inactivation de *Dppa3*, démontrant ainsi que la méthylation à ce locus se fait indépendamment de ce facteur, probablement en raison de marques d'histones différentes (137, 138).

La protéine ZFP57, impliquée dans le maintien de la méthylation, joue un rôle aussi dans le maintien des marques durant la phase de déméthylation du génome. Bien que *Zfp57* ne semble pas être impliqué dans l'établissement de la méthylation du locus *Dlk1/Gtl2*, son invalidation conduit à une perte de méthylation de ce locus pendant la phase de déméthylation, probablement à cause d'une perte de protection ou bien de maintien des sites méthylés de la DMR (124).

La protéine *Kap1* (ou *Trim28*), un partenaire de *Zfp57*, est aussi impliquée dans le maintien de l'empreinte. Les embryons issus d'ovocytes inactivés pour cette protéine se développent normalement jusqu'au stade blastocyste, puis présentent des degrés d'hypométhylation variés à différents loci soumis à empreinte, tant sur le génome paternel (*Igf2/H19*, *Dlk1/Gtl2*) que maternel (*Snrpn*) (139) (Figure 5).

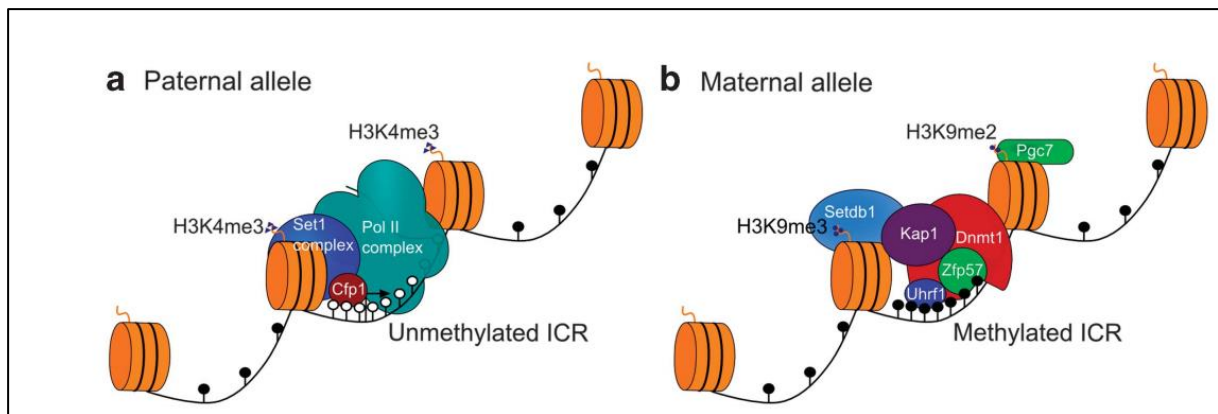


Figure 5: au stade préimplantatoire, les ICR sont liés par des complexes spécifiques pour maintenir leur statut de méthylation différentielle lors de la reprogrammation épigénétique. A) L'ICR non méthyly possède les propriétés typiques d'un îlot CpG. Il coïncide avec un promoteur exprimé et est, par conséquent, associé avec le complexe ARN polymérase II (pol II). Les sites CpG non méthylysés sont liés par la protéine Cfp1, qui recrute le complexe Set1 pour triméthyliser les H3K4 qui, à son tour, renforce l'état de l'ADN hypométhyly, étant donné que la marque de H3K4me3 est antagoniste à la liaison de Dnmt3a / Dnmt3L. La protection contre la méthylation de novo de l'ADN de l'allèle ICR non méthyly pourrait, par conséquent, être accomplie par des facteurs génétiques agissant au niveau des îlots CpG, plutôt que par des facteurs spécifique aux centres d'empreinte. (B) L'ICR méthyly est lié par le complexe Zfp57/Kap1 et UHRF1 qui recrute Dnmt1; le complexe interagit aussi avec la méthyltransférase SETDB1, qui dépose la marque répressive des histones H3K9me3. En outre, la reconnaissance des marques H3K9me2 par la protéine Pgc7/Stella peut protéger contre déméthylation dans le zygote. Le maintien de la méthylation de l'ADN à un ICR, par conséquent, implique l'interaction entre le facteur spécifique à l'empreinte Zfp57 et des facteurs génétiques, tels que Dnmt1. ([140](#))

d. Reméthylation *de novo*

Le niveau de méthylation le plus bas est atteint au stade blastocyste. A ce stade, le génome subit une vague de méthylation *de novo*, qui permettra la différenciation et la spécialisation cellulaire. Les cellules souches embryonnaires (ESC) présentent une chromatine dans un état permissif, favorisant la transcription. La différenciation cellulaire à partir des ESC s'accompagne de modifications de la structure chromatinienne, en rapport avec un nombre de modifications épigénétiques, en particulier, des phénomènes de réorganisation nucléaire de certaines régions du génome, comme pour *Oct4* et *Nanog* (facteurs de pluripotence), qui se trouvent au contact de la *lamina* au cours des processus de différenciation cellulaire ([141](#)). Le génome subit ensuite une large vague de modification de la chromatine et de méthylation de l'ADN tout au long du processus de différenciation. Les régions soumises à

empreinte doivent être protégées de cette méthylation *de novo* dans la plupart des tissus. Le premier facteur identifié comme protecteur de l'allèle non méthylé contre la méthylation *de novo* est le *CCCTC-binding factor* (CTCF), une protéine insulatrice en doigt de zinc ubiquitaire. Le rôle de cette protéine a été particulièrement bien étudié au niveau du locus *Igf2/H19*, à l'extrémité du bras court du chromosome 7 de la souris, région orthologue de la région 11p15 chez l'humain. Cette protéine semble être primordiale dans la protection de l'allèle maternel contre la méthylation *de novo* qui survient au moment de l'implantation ([142](#), [143](#)). La mutation des 4 sites de liaisons de CTCF (*CTCF Binding Site ; CBS*) dans le centre d'empreinte murin du locus *Igf2/H19* chez une souris femelle est responsable chez les souriceaux d'un gain de méthylation sur l'allèle maternel (normalement non méthylé), alors que les ovocytes et les embryons au stade blastocyste avaient une méthylation normale ([142](#), [144](#)). Chez l'humain, de telles mutations de CBS n'ont pas été identifiées dans les gains de méthylation du centre d'empreinte (ICR1 pour *Imprinting Control Region 1*). En revanche, des délétions partielles de l'ICR1, ont été rapportées dans des cas de gain de méthylation du locus *IGF2/H19*, suggérant un défaut de la conformation chromatinienne ([145](#)). Ces délétions anéantissent des sites de liaison de facteurs de pluripotence (notamment *OCT4* et *SOX2*) à l'ICR1. Des mutations ponctuelles sur l'allèle maternel au sein des motifs conservés dans l'ICR1 de ces facteurs, associées à des gains de méthylation de la région, ont mis en évidence le rôle de protection de ces facteurs contre la méthylation *de novo* et le maintien de la forme non méthylée de l'allèle maternel ([145-148](#)).

La région 11p15

La région 11p15 chez l'humain constitue un large domaine d'environ 1Mb comprenant plusieurs gènes soumis à empreinte parentale, mais aussi des gènes dont l'expression est biallélique.

Cette région comprend un domaine télomérique, sur lequel sont localisés les gènes IGF2 et H19 et un domaine centromérique, sur lequel sont localisés les gènes CDKN1C (ou p57/Kip2), KCNQ1 et KCNQ1OT1 (ou Lit1) (Figure 6).

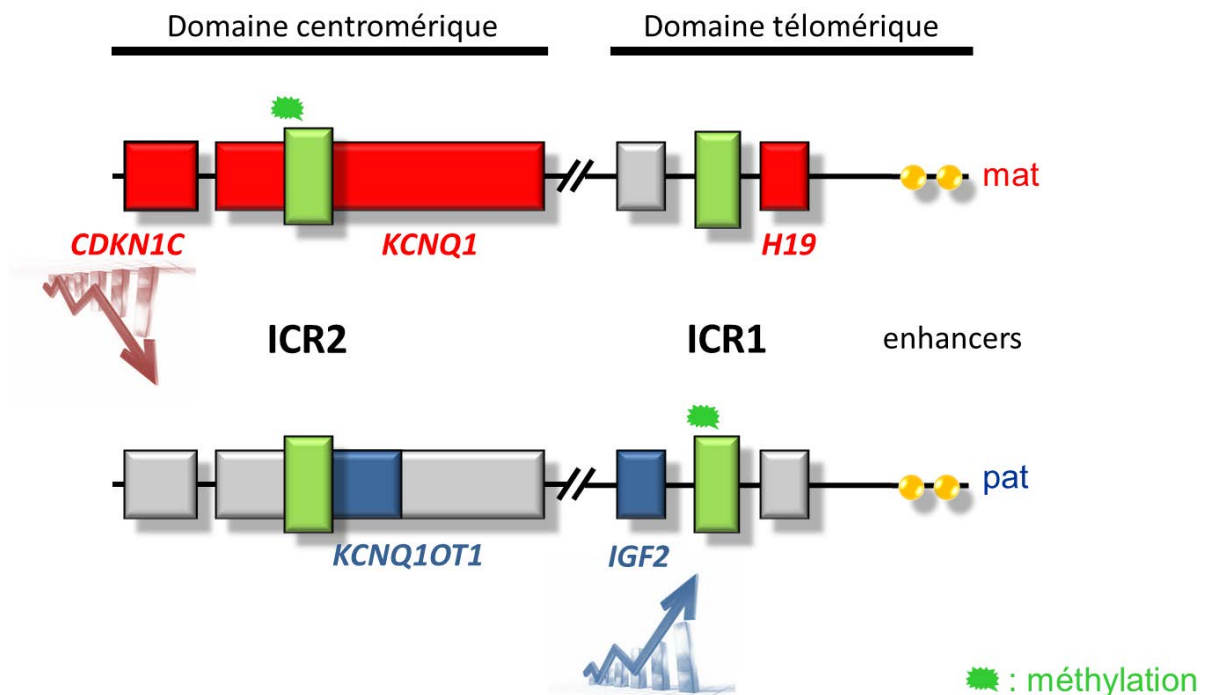


Figure 6: Représentation schématique de la région 11p15 soumise à empreinte chez l'humain. Seuls les gènes soumis à empreinte et/ou connus pour être impliqués dans la physiologie de la croissance fœtale et post natale ont été représentés. En rouge : expression d'origine maternelle, en bleu : expression paternelle. En situation physiologique sur l'allèle maternel ICR2 est méthylé, cela empêche la transcription de LIT1 (*KCNQ1OT1*) et induit la transcription de p57, avec un signal négatif sur la prolifération cellulaire. De plus, ICR1 sur le domaine télomérique n'est pas méthylé et cela induit une expression d'H19 et empêche l'interaction des enhancers avec le promoteur d'IGF2, qui n'est pas transcrit. Sur l'allèle paternel, ICR2 sur le domaine centromérique n'est pas méthylé, avec par conséquent une expression de LIT1 et une inhibition de p57. Sur le domaine télomérique ICR1 est méthylé, avec une expression d'IGF2 et une inhibition d'H19. Cela se traduit avec un signal positif dans la prolifération cellulaire. L'équilibre entre l'allèle maternel et paternel est la base de l'homéostasie cellulaire en conditions physiologiques.

Domaine télomérique (IGF2, H19, ICR1)

Les deux gènes IGF2 et H19 ont une expression monoallélique réciproque : IGF2, qui est exprimé à partir de l'allèle paternel, stimule la croissance fœtale et tissulaire, à l'inverse, H19 est un lncARN qui pourrait avoir un rôle anti-tumoral ou agir comme réservoir de mi-RNA. L'expression de ces deux gènes est dépendante d'une couple d'enhancers qui sont situés au niveau 5' du gène H19 ([149](#)). L'expression allèle spécifique est contrôlée par le centre de régulation de l'empreinte ICR1 ([150](#)). Le centre ICR1 est constitué de deux domaines, chacun comprenant un bloc 1 répété (A1 et A2) suivi de 3 ou 4 blocs de séquences répétées (B1 à B4, puis B5 à B7). Sur chaque bloc existe un site de liaison (CBS) au facteur de transcription CTCF (à l'exception du bloc B4). Un septième CBS est situé en 3' du premier bloc A1 (Figure 7).

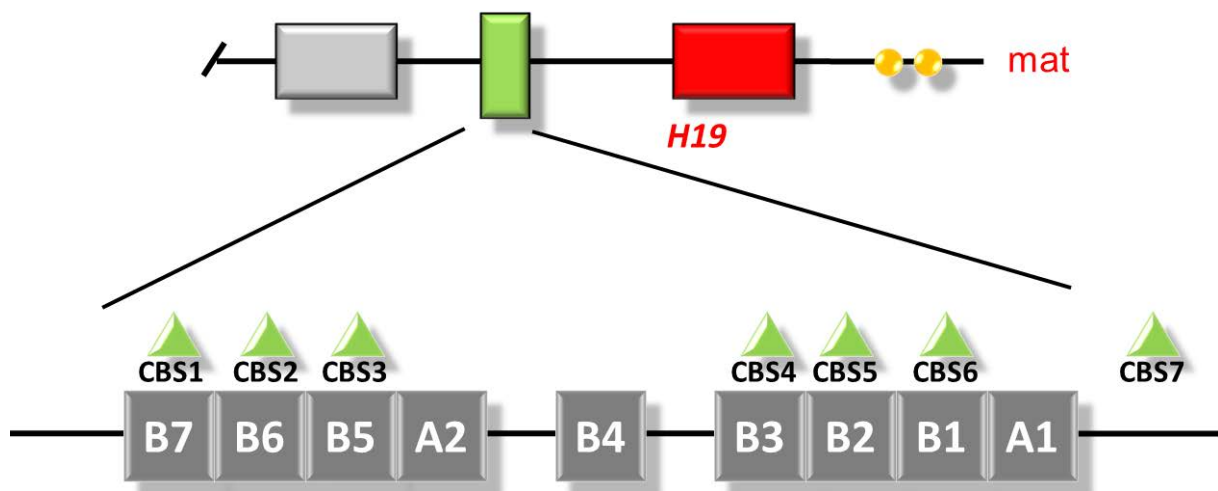


Figure 7. Représentation schématique du domaine télomérique de la région 11p15 IGF2/H19 et organisation du centre d'empreinte ICR1 chez l'homme. E1, E2= *enhancer*.

Le centre d'empreinte ICR1 est une DMR différenciellement méthylé sur chacun des deux allèles, la méthylation est portée pour chacun des sept CBS par l'allèle d'origine paternel.

ICR1 sur l'allèle maternel non méthylé empêche l'interaction entre les enhancers situées en 3' de H19 avec le promoteur d'IGF2 ([151](#)). Cette activité dépend du statut méthylé ou non des CBS d'ICR1 : la protéine CTCF ne peut lier ces sites de liaison que sur l'ADN non méthylé.

La liaison de CTCF à l'ICR1 non méthylé empêche ainsi l'interaction des enhancers avec le promoteur d'IGF2.

Dans ce cas, l'interaction des enhancers se fait avec H19, qui est exprimé. A l'inverse, quand CBS est méthylé sur l'allèle paternel, CTCF ne peut pas se lier à l'ADN et les enhancers interagissent avec IGF2, qui est exprimé ([151](#)).

L'analyse in vitro de certaines délétions d'ICR1 chez les patients avec un BWS a permis de préciser le mécanisme par lequel l'anomalie moléculaire est responsable de la dérégulation d'IGF2 et H19 ([148](#), [150](#), [152](#)), notamment en montrant l'importance des sites de fixation des facteurs SOX2 et Oct4.

Les interactions entre enhancers et promoteurs en fonction du degré de méthylation d'ICR1 sont permis grâce à la conformation spatiale particulière de la chromatine ([153](#)). L'implication récente des cohésines dans la conformation de la chromatine de cette région a permis d'éclaircir le mécanisme par lequel les modifications épigénétiques régulent l'expression des gènes du domaine. La méthylation différentielle d'ICR1 (par le recrutement différentiel de CTCF et des cohésines) confère à la chromatine une configuration en boucle, responsable de l'expression différentielle des gènes IGF2 et H19 ([154](#)).

Domaine centromérique (CDKN1C/KCNQ1OT1, ICR1)

Le domaine centromérique contient de nombreux gènes soumis à empreinte et s'étend sur une région d'environ 800 Kb. Certains gènes soumis à empreinte sont tissu-spécifiques et présents par exemple que dans le placenta, d'autres sont présents de façon ubiquitaire. La plupart de ces gènes sont exprimés à partir de l'allèle maternel. La régulation de l'expression des gènes de ce domaine fait intervenir un lncARN appelé KCNQ1OT1 ou LIT1. Le gène KCNQ1 est soumis à empreinte de façon ubiquitaire sauf dans le cœur où l'expression peut parfois être biallélique ([155](#)). Le promoteur de ce gène correspond à la DMR de la région (et s'appelle ICR-2). Cette DMR est méthylé uniquement sur l'allèle maternel empêchant l'expression de KCNQ1OT1 qui n'est réalisé que sur l'allèle paternel non méthylé. ICR2 contient des motifs (CCAAT) de liaison du facteur de transcription NFY

(156). KCNQ1OT1 agit sur les autres gènes du domaine comme un répresseur bidirectionnel de la transcription. Une délétion du centre d’empreinte ICR2 paternel ou la mutation des sites de fixation NFY dans le promoteur du gène entraîne une perte d’expression de KCNQ1OT1 et l’expression biallélique des autres gènes du domaine.

A l’opposé, si la délétion est sur l’allèle maternel, il n’y a pas de modification de l’expression des gènes (157). Ainsi, en situation normale, l’expression de KCNQ1OT1 sur l’allèle paternel empêche l’expression des autres gènes du domaine (157, 158).

Relation entre les deux domaines

Les deux domaines sont indépendants ayant chacun son propre rôle et sa propre réplication. Cela a pu être confirmé par des études qui montrent que la délétion d’ICR2 n’a pas d’effet sur la région télomérique IGF2/H19 (74, 157). D’autres publications suggèrent un lien entre les deux régions. En traitant des cultures primaires de fibroblastes fœtales par IGF2, Grandjean et collègues ont démontré une diminution de l’expression du gène CDKN1C (159). Les deux domaines sont illustrés schématiquement dans la Figure 6.

OBJECTIF DU TRAVAIL

La WT est la tumeur du rein la plus fréquente chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, avec une incidence en France de 1/10000 naissances. (2) Malgré les progrès dans les connaissances physiopathologiques de ces tumeurs et les innovations thérapeutiques médicales et chirurgicales, 10-15% des enfants rechutent dans les deux ans après le traitement (160).

Historiquement, il y a dans le monde deux façons différentes de prise en charge de cette tumeur. La première, adoptée par le COG (USA et Canada) prévoit une chirurgie première suivie par chimiothérapie, la deuxième, adoptée par la SIOP, prévoit une chimiothérapie néo-adjuvante, suivi par une chirurgie et par une chimiothérapie adjuvante, faite sur la base de la réponse à la chimiothérapie pré-chirurgicale à savoir le groupe de risque histologique et le stade local. Malgré cette différence dans la prise en charge le pronostic de cette tumeur est superposable dans les différents pays. En effet, bien que la majorité des enfants avec WT soit aujourd'hui soignées, une portion de tumeurs qui ne montrent pas de critères particuliers d'agressivité au moment du diagnostic rechute, et une partie des tumeurs avec des critères d'agressivité biologiques au diagnostic a en réalité un comportement clinique moins agressif. Au final une partie des enfants est sur-traitée par rapport à leur maladie et développent des séquelles irréversibles dû à la radiothérapie et la chimiothérapie, qui pourraient être évités si les tumeurs étaient mieux stratifiées au diagnostic.

A ce propos, de nombreuses études transversales impliquant la génétique, la cytogénétique, la biologie moléculaire, l'immunologie et l'anatomie pathologique ont été développées au fil du temps au sein du COG et de la SIOP. Aux Etats-Unis, la disponibilité de matériel tumoral « frais » et non traité par chimiothérapie a permis la réalisation de nombreuses études sur la biologie des WT et cela a permis de mieux stratifier les tumeurs. En Europe toutes les études ont été menées sur des tumeurs traitées, il est donc intéressant de comprendre si la chimiothérapie influence le comportement biologique de ces tumeurs.

En France, les WT sont prises en charge dans 31 centres de la Société Française du Cancer de l'Enfant, dans des Services de Chirurgie Pédiatrique spécialisée. Une prise en charge spécialisée est en effet indispensable pour ces tumeurs, visant à réduire le risque de rupture tumorale et exérèse incomplète qui pourraient défavoriser le pronostic pour le patient. Pour accéder à un nombre significatif d'échantillons permettant d'avoir des résultats significatifs

au niveau statistique nous avons donc centralisé dans notre Institut le matériel biologique de toutes les tumeurs françaises incluses dans le protocole SIOP 2001. Un bloc de paraffine représentatif de chaque tumeur ainsi que du matériel cryopréservé ont été récoltés, avec ainsi la constitution d'une tumorothèque, une ADN-thèque et une RNA-thèque.

Sur ce matériel nous avons réalisé différents projets, dans le but de mieux comprendre la biologie de ces tumeurs hétérogènes.

La première partie du travail a été de caractériser le statut histologique de ces tumeurs (type histologique, groupe de risque histologique) en faisant particulièrement attention au blastème. Le blastème a été caractérisé par une analyse qualitative (aspect du blastème, index mitotique, index prolifératif et mitotique) et quantitative (volume et pourcentage de blastème).

La deuxième partie a été de caractériser les anomalies structurales de la WT, en particulier les régions d'intérêt 1p, 16q, 1q, 11p15 et les gènes TP53, IGF2, NMYC.

Le troisième objectif a été celui de se focaliser sur la région 11p15, en analysant ses anomalies structurales et de méthylation et l'expression d'IGF2 où le gène est localisé.

D'autres projets sont en cours de réalisation, comme la caractérisation génomique du sous-type de WT avec anaplasie diffuse, la plus agressive, et la caractérisation de l'ensemble des WTs par puces SNP.

Les données génétiques et pathologiques étudiées ont été mise en relation avec le suivi clinique des patients, afin d'identifier de possibles marqueurs pronostiques.

Cet approfondissement dans les connaissances de la biologie de la WT permettrait d'adapter la thérapie post-chirurgicale au réel risque biologique de la tumeur, avec un traitement moins agressif pour les enfants avec une tumeur indolente et plus intensive pour les enfants qui présentent des tumeurs avec des signes d'agressivité biologique. Ce travail pourrait contribuer à la détermination d'une nouvelle classification bio-pathologique de la WT, sur laquelle sera décidé le traitement dans le futur.

RESULTATS

Projet 1 : Détermination du statut 1p et 16q dans le néphroblastome dans le cadre du protocole SIOP 2001 et corrélation avec les données pathologiques, en particulier le volume de blastème et le pronostic.

Résumé

Dans cette étude nous avons voulu souligner l'importance de la caractérisation qualitative et quantitative du blastème dans la stratification pronostique et la prise en charge des WT. En effet, alors que le sous-type de WT avec anaplasie diffuse est reconnu pour son agressivité biologique, pour les WT de sous-type blastémateux il y a une forte hétérogénéité soit au niveau de la variabilité morphologique soit au niveau du comportement biologique. Nous pensons que la quantité et la qualité du blastème sont importantes pour différencier les tumeurs plus indolentes des tumeurs plus agressives, bien que ces critères ne soient actuellement pas intégrés dans la stratification pronostique de ces tumeurs. A ce propos nous avons caractérisé de façon qualitative et quantitative le blastème dans la série des WT françaises et anglaise. Les cas français étaient centralisés dans notre Institut et pour la série anglaise, j'ai réalisé cette analyse à l'University Hospital of Wales, à Cardiff. Nous avons ensuite extrait l'ADN de toutes les tumeurs françaises à partir de paraffine et envoyé l'ADN extrait au UCL Institute of Child Health, à Londres, où le statut de la LOH dans les chromosomes 1p et 16q par PCR avec marqueurs microsatellites a été déterminé sur la totalité des cas anglais et français. Nous avons ensuite établi des relations entre la quantité et la qualité du blastème, le statut de la LOH et le comportement biologique des tumeurs.

Introduction

L'objectif de cette étude est de mieux caractériser les WT au niveau pathologique avec l'intégration des données des moléculaires.

En effet, alors que pour le sous-type de WT avec anaplasie diffuse il y a un consensus concernant la codification morphologique de l'anaplasie et son agressivité biologique, pour les WT de sous-type blastémateux il y a une forte hétérogénéité soit au niveau de la variabilité morphologique soit au niveau du comportement biologique.

En effet, certaines tumeurs ont un blastème cellulaire peu dense, chromatine claire et bas index de prolifération, alors que dans d'autres tumeurs le blastème est très basophile et proliférant, suggérant une majeure agressivité. Néanmoins, jusqu'à présent, aucune étude n'a montré que les différentes morphologies du blastème pouvaient correspondre à des blastèmes à comportement biologique différent. Cette caractérisation pourrait permettre d'identifier des critères morphologiques pour pouvoir différencier les tumeurs plus indolentes des tumeurs plus agressives. De plus, l'actuelle classification des WT prévoit qu'une tumeur soit classée comme WT de type histologique blastémateux et donc de haut risque quand elle est constituée par une majorité de composante blastémateuse. Par conséquent, une tumeur de sous type blastémateux sera classée de la même façon si elle est de toute petite taille ou si elle est très volumineuse. Dans les deux cas, la quantité de blastème, qui est censée influencer négativement le pronostic, est très différente, mais dans les deux cas la thérapie adjuvante sera la même. Pour cette raison, le Renal Tumor Study Group (RTSG/SIOP) a suggéré l'utilisation d'une formule pour avoir une estimation quantitative du volume absolu de blastème sur la pièce de néphrectomie. Cela devrait permettre de mieux stratifier les tumeurs en fonction de la quantité de blastème et donc du risque biologique, malgré leur classification histologique. En effet, une tumeur de type mixte, avec donc une composante blastémateuse, et censée avoir moins de 10% de blastème, pourrait avoir beaucoup plus de blastème par rapport à une tumeur blastémateuse si sa taille est assez grande, mais, malgré cela, elle est classée comme tumeur de risque intermédiaire et aura une thérapie adjuvante moins agressive par rapport à la tumeur blastémateuse.

L'intégration du volume de blastème dans les critères de stratification des WT n'est pas encore effective mais sera prise en compte dans le prochain protocole de la SIOP. Pour cette raison, nous avons souhaité inclure ce paramètre dans notre étude.

Il est aujourd'hui connu que la perte d'hétérozygotie au niveau des chromosomes 1p et 16q dans les tumeurs traitées par chirurgie première au sein du COG est associée à un mauvais pronostic ([42](#), [47](#), [161](#), [162](#)).

Dans cette étude, nous avons évalué le statut de la LOH dans les chromosomes 1p et 16 q par PCR avec marqueurs microsatellites à partir de tissus en paraffine et caractérisé de façon quantitative et qualitative le blastème dans une série de WT provenant de 10 différents centres de la Société Française du Cancer de l'Enfant (SFCE) et de l'United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG). Le but étant d'améliorer la stratification pronostique des WT par des outils moléculaires et d'anatomie pathologique et de différencier le « bon » du « mauvais » blastème ».

Méthodes

Les enfants enregistrés (n=228) dans 10 différents centres SFCE et dans les centres de l'UKCCSG pour lesquels un bloc de paraffine était disponible ont été incluses dans l'étude. Les tumeurs ont été évaluées au niveau histologique par le pathologiste local, et revues dans une relecture nationale (Hôpital Armand Trousseau : Linda Dainese, Liliane Boccon-Gibod, Aurore Coulomb). Le suivi des patients a varié entre 51 et 360 mois.

Les tumeurs ont été classées en bas risque, risque intermédiaire et haut risque histologique, selon la classification SIOP ([163](#)).

Une fois récoltés les blocs de paraffine dans notre Institut, pour chaque cas nous avons étudié un bloc de tumeur et un bloc de tissu rénal sain, adjacent à la tumeur. Trois sections de 10 µm ont été coupées à partir de bloc de paraffine pour l'analyse d'allélotypage. L'extraction d'ADN par nos soins à partir de paraffine a été effectuée avec le kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit®. La qualité de l'ADN a été évaluée avec le spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop Technologies). Pour chaque bloc, 5 à 20 µg d'ADN ont été extraits. La qualité et la quantité d'ADN ont été vérifiées avec une PCR de D-Glyceraldehyde-

3-phosphate (GAPDH). Les ADN extrait et dont la qualité a été vérifié dans notre Institut ont été envoyé en Angleterre pour l'analyse LOH.

L'analyse LOH a été réalisée avec une multiplex fluorescent PCR avec marqueurs microsatellites pour les régions 1p et 16q, sur 2 µg de rein normal et tumoral. Cette technique concernant l'analyse LOH a été mise au point et réalisée au UCL Institute of Child Health, Londres.

L'intensité allélique a été calculée pour tous les marqueurs pour lesquels le patient était hétérozygote dans le tissu normal. Pour chaque individu la LOH a été définie si l'intensité allélique était à moins de 0.6 ou à plus de 1.69. Ces valeurs représentent plus du 40% des pertes. Dans cette étude nous avons utilisé un intervalle de référence plus restrictif par rapport à celle utilisé dans la littérature. Ce seuil de référence a été choisie pour obtenir des résultats fiables après extraction d'ADN à partir de paraffine ([47](#), [164](#), [165](#)).

Au total, le statut de LOH au niveau d'1p ou 16q était confirmé si 2 marqueurs ou plus avaient une LOH. Pour 1p et 16q quatre marqueurs pour chacun ont été utilisés. Les marqueurs sont résumés dans la Table 2.

Marker:	Location:	Product size (bp):	Note:
D16S3025	16q22	90-110	Core marker
D16S752	16q22	101-129	Core marker
D16S3043	16q22	118-150	Core marker
D16S3095	16q22	134-162	Only run if result not clear from core markers
D1S1612	1p36	94-130	Core marker
D1S214	1p36	120-142	Core marker
D1S468	1p36	171-191	Core marker
D1S243	1p36	142-170	Only run if result not clear from core markers

Table 2: Marqueurs utilisés pour évaluer le statut de 1p et 16q. Au total, la LOH 1p ou 16q a été assigné aux cas dans lesquels deux ou plus marqueurs avaient une LOH. Quatre marqueurs ont été utilisés pour 1p et 16q.

Les données pathologiques ont été obtenues par le groupe de relecture française des tumeurs du rein des enfants, en accord avec le protocole SIOP. Les trois dimensions des

tumeurs ont été mesurées sur la pièce opératoire de néphrectomie par le pathologiste local et réévaluées sur les photographies effectuées au moment de l'examen microscopique.

La formule utilisée pour calculer le volume de blastème est la suivante : $V_{blastema} (ml) = V_{tumeur} \times (1 - Fraction\ de\ nécrose) \times Fraction\ de\ blastème$. Les trois dimensions de la tumeur ont été mesurées sur la pièce opératoire par le pathologiste local et réévaluées dans notre institut sur la photographie macroscopique pour chaque cas.

Les remaniements post-chimiothérapie (CIC= chemotherapy induced changes) et le blastème viable ont été estimés en pourcentage sur une tranche complète de la tumeur à l'examen histologique, selon le protocole SIOP 2001. Deux blocs de paraffine, correspondant à un rein normal et à une tumeur ont été obtenus pour chaque patient. Chaque bloc a fait l'objet de coupes sériées colorées par la coloration Hématoxyline-Eosine (HE) pour l'évaluation histologique.

Dans les 228 cas, les blocs de tissus ont été traités de façon routinière en découpant des sections en série, qui ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour l'évaluation pathologique. Ils ont été choisis parce qu'ils contenaient des éléments suffisants pour la coloration immunohistochimique.

La cytologie nucléaire du blastème a été classé comme « bland », atypique, « unrest » ou anaplasique, tel que rapporté dans la littérature (1). « Bland » a été attribué au blastème sans superposition cellulaire, chromatine fine et bas taux mitotique et apoptotique. Le blastème atypique était celui avec une superposition cellulaire, nombreuses apoptoses et mitoses. « Unrest » a été utilisé pour le blastème avec des modifications nucléaires telles qu'une chromatine sombre, un haut taux apoptotique et mitotique, approchant les critères de l'anaplasie. Le blastème anaplasique avait les caractéristiques histologiques de l'anaplasie: noyaux hyperchromatiques et élargis avec un diamètre d'au moins trois fois la taille de ceux de la composante blastématique environnante, mitoses multipolaires atypiques (Figure 8).

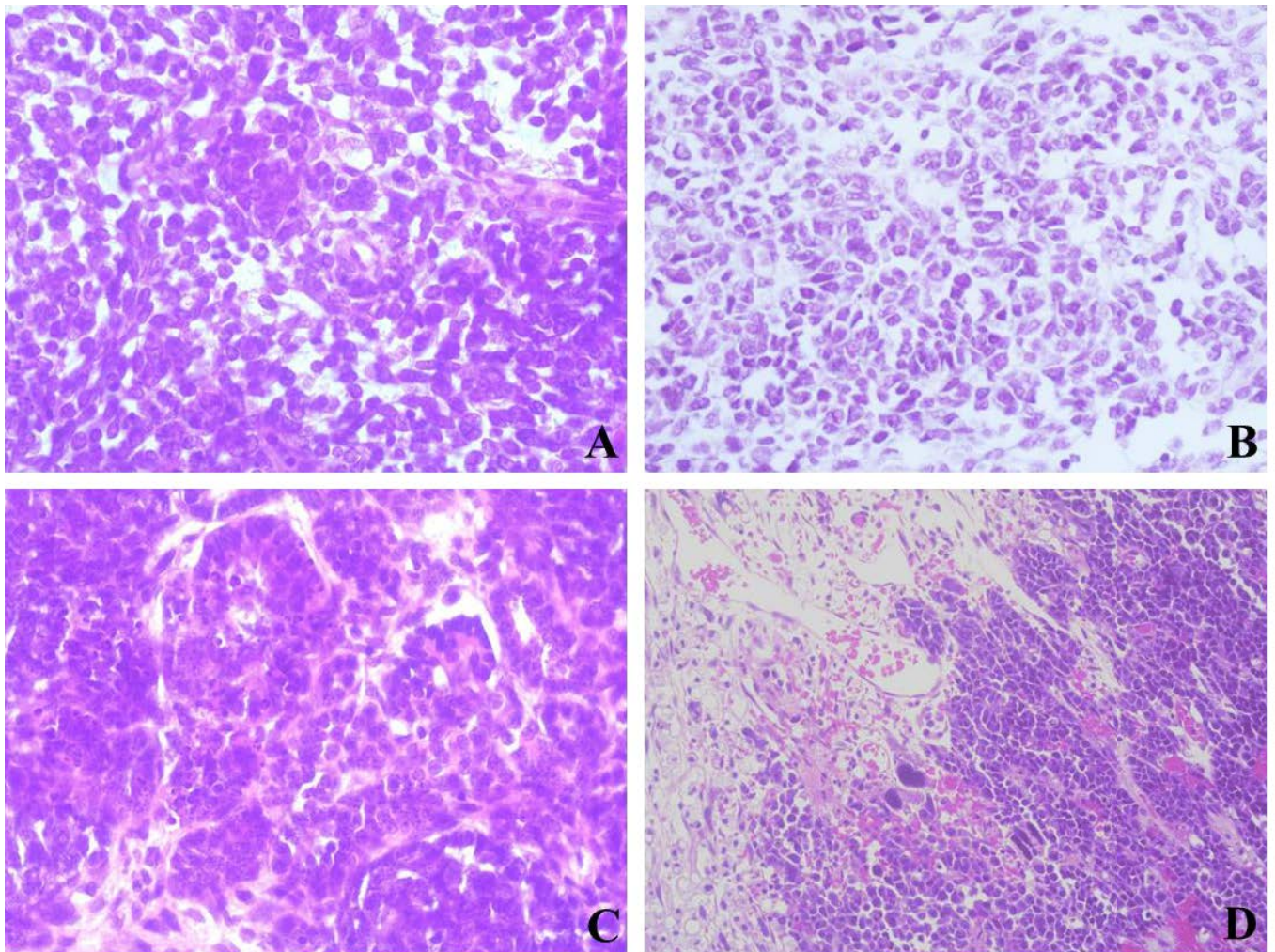


Figure 8 : Différents profils cytologiques définis pour classer le blastème : A : bland ; B : atypique ; C : unrest ; D : anaplasique. Grossissement X10.

L'analyse qualitative de l'architecture du blastème a mis en évidence quatre profils: serpentine, nodulaire, diffuses, et invasif ([166](#)) (Figure 9).

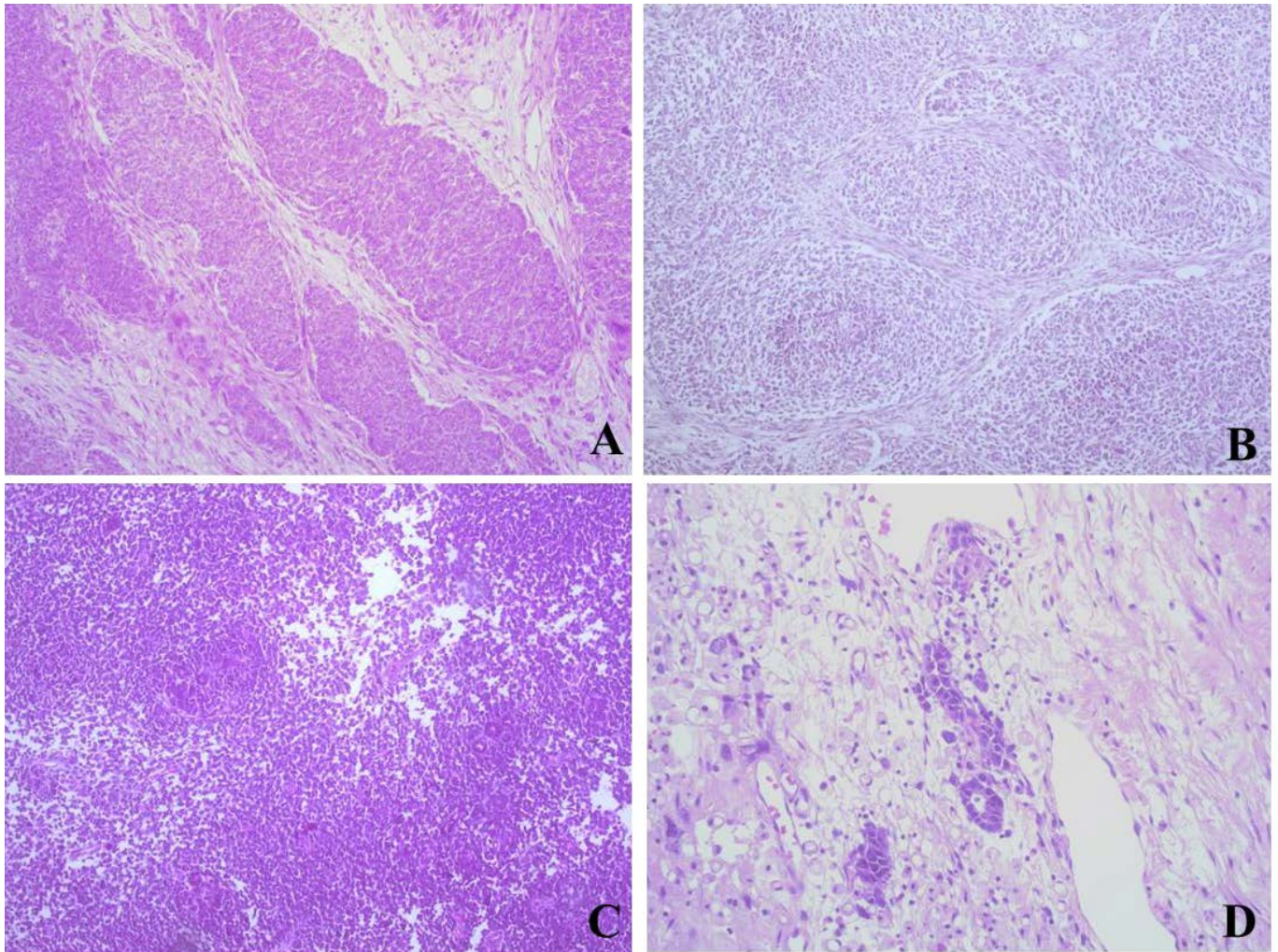


Figure 9 : Différents patterns architecturaux définis pour classer le blastème : A : architecture serpentine ; B : architecture nodulaire ; C : architecture diffuse ; D : architecture invasive. Grossissement X10.

Nous avons évalué la différenciation épithéliale et stromale au sein du blastème. L'index mitotique a été exprimé par le nombre de mitoses par 10 champs de fort grossissement X40. L'index de prolifération Ki67 (Novocastra®, le clone MM1) a été déterminé en calculant la proportion de cellules positives pour Ki67 parmi les cellules tumorales (n=2000) dans les zones ayant le plus grand nombre de cellules positives.

Statistiques

Les statistiques ont été effectuées en utilisant GraphPad Prism Software Version 6 : les relations entre la morphologie du blastème et l'index mitotique, l'index de prolifération (Ki67), le volume et le pourcentage de blastème et le groupe de risque histologique ont été réalisées en utilisant un «Chi test Square». Les relations entre tous les paramètres précédents et le statut de la LOH ont été réalisées en utilisant le « Test Exact de Fisher ».

L'analyse de survie a été faite en utilisant des courbes de survie de Kaplan Meyer.

Résultats

Vingt-trois cas (10%) ont été exclus pour des raisons techniques, principalement en raison de l'extraction d'ADN de qualité médiocre à partir de tissus inclus en paraffine. Nous avons donc retenu 205 cas pour l'analyse finale.

Cinquante-trois autres cas n'étaient pas informatifs pour un chromosome (1p ou 16q) et ne pouvant analyser la LOH n'étaient donc pas inclus dans l'analyse. Les 152 tumeurs restantes ont été classées en quatre groupes: le groupe 1 avec LOH 1p, groupe 2 avec LOH 16q, groupe 3 avec LOH 1p et 16q et le groupe 4 sans LOH. Dix enfants (6,5 %) avaient une LOH 1p, 19 (12,5%) avaient une LOH 16q et 8 cas (5,5%) avaient combiné 1p et 16q LOH. Cent-quinze cas (75,6%) avaient conservé les deux allèles de 16q et 1p.

La distribution histologique des 152 cas en fonction des statuts de LOH respectives sont résumées dans le Table 3 : 9 cas (6 %) ont été classés comme étant à faible risque histologique (LR), 120 (79%) à risque histologique intermédiaire (IR) et 23 (15%) à haut risque histologique (HR). Une LOH 1p et/ou 16q a été plus fréquemment observés dans les tumeurs avec Anaplasie Diffuse que dans toutes les autres tumeurs ($p = 0,014$).

Histological risk	Histological type	Number of cases (152)	Number of cases with LOH 1p and/or 16q
Low risk (9)	CPDN	2	0
	Completely necrotic	3	1
	Mesoblastic nephroma	4	0
Intermediate risk (121)	Non-anaplastic (primary nephrectomy)	4	1
	Epithelial	10	3
	Focal anaplasia	6	1
	Stromal	22	4
	Mixed	51	15
	Regressive	28	3
High risk (22)	Blastemal	5	0
	Diffuse anaplasia	17	9

Table 3. Classification selon le type et le risque histologique dans les 152 cas (CPDN: cystic partially differentiated nephroblastoma, LOH: loss of heterozygosity).

Dans la Table 4 les tumeurs sont classées selon les caractéristiques qualitatives du blastème, le groupe de risque histologique et l'état des chromosomes 1p et 16q. Trente tumeurs n'avaient aucune composante blastématique (19,7%). Parmi eux, 23 (76,6%) n'avaient pas de pertes sur les chromosomes 1p et 16q. Aucune différence statistique n'a été observée entre les tumeurs avec ou sans une composante blastématique dans la fréquence de LOH 1p ou 16q ($p = 0,65$).

Blastemal morphology		Histological risk group			LOH status			
		LR	IR	HR	LOH 1p	LOH 16q	LOH 1p-16q	No LOH
Total cases (n= 152)		n=9	n=121	n=22	n=10	n=19	n=8	n=115
Cases without blastema (n=30)		8	22	0	2	3	2	23
Cases with blastema (n=122)		1	99	22	8	16	6	92
Architectural pattern	Serpentine (n=6)	0	5	1	0	1	1	4
	Nodular (n=76)	0	70	6	4	7	2	63
	Diffuse (n=30)	0	20	10	2	5	1	22
	Invasive (n=10)	1	4	5	2	3	2	3
Differentiation	Undifferentiated (n=33)	0	26	7	3	5	1	24
	Epithelial (n=50)	0	35	15	3	9	4	34
	Stromal (n=17)	1	16	0	2	1	1	13
	E. and S. (n=22)	0	22	0	0	1	0	21
Cytology	Bland (n=43)	0	41	2	1	4	2	36
	Atypical (n=38)	0	36	2	3	3	1	31
	Unrest (n=20)	1	17	2	3	2	1	14
	Anaplastic (n=21)	0	5	16	1	7	2	11

Table 4. Analyse qualitative du blastème incluant le profil architectural, la différenciation et la cytologie en relation avec le groupe de risque histologique, le type histologique et le statut LOH. LR= low risk; IR= intermediate risk; HR= high risk.

Le pattern architectural du blastème et la cytologie nucléaire du blastème étaient liés à la classification de risque histologique. Dans les tumeurs de haut risque histologique, le profil architectural était statistiquement plus souvent invasif ($p < 0,0001$) et la cytologie nucléaire était anaplasique ($p < 0,0001$), tandis que la différenciation du blastème n'était pas liée au groupe de risque histologique (Chi 2 test : $p = 0,63$). Les tumeurs avec profil invasif du blastème avaient une proportion de LOH significativement plus élevée par rapport aux autres profils architecturaux ($p < 0,0005$). La différenciation stromale et épithéliale et la caractérisation cytologique nucléaire du blastème n'étaient pas associées au statut LOH ($p = 0,81$ et $0,21$ respectivement). Le comptage mitotique a été réalisé dans tous les cas et la valeur médiane de mitoses était de 9 pour 10 HPF [0-102]. Cette valeur a été considérée comme cut-off pour l'analyse statistique. Les mitoses étaient significativement plus élevées dans les tumeurs de haut risque histologique que dans les tumeurs de bas risque ou de risque intermédiaire ($p = 0,0002$). Aucune différence dans l'index mitotique a été observée entre les tumeurs avec LOH 1p et 16q et les tumeurs sans LOH (Fisher's exact test: $p = 0,67$). L'index prolifératif médian était de 12,5% [0-80%]. Cette valeur a été choisie pour classer les tumeurs à index prolifératif faible ou élevé. Les tumeurs à haut risque histologique avaient un index prolifératif plus élevé (moyenne 41,5%), que les tumeurs à risque intermédiaire (moyenne 13,8%) ou bas (moyenne 1%) (Chi2 test : $p = 0,0018$). Il n'y avait pas de corrélation statistique entre le statut de 1p et 16q et l'expression de Ki67 à l'immunohistochimie (Fisher's exact test: $p = 0,16$).

Le volume absolu de blastème et en pourcentage de blastème ont été calculés dans toutes les tumeurs. Le volume de blastème médian était de 15 ml [0-777,6] et le pourcentage médian de 15% [0-100]. Ces valeurs ont été prises comme cut-off pour séparer les cas avec un faible volume de blastème ($n = 93$) et un haut volume de blastème ($n = 59$) et les cas avec un faible pourcentage de blastème ($n = 77$) ou élevé ($n = 75$). Le volume absolu de blastème et le pourcentage étaient plus élevés dans les tumeurs à haut risque que dans les tumeurs à faible risque ($p < 0,001$ et $< 0,0001$ respectivement). Les tumeurs à faible volume de blastème avaient moins de LOH sur les chromosomes 1p et 16q que les tumeurs avec un volume élevé

de blastème mais ce résultat n'était pas statistiquement significatif bien que proche de la limite ($p = 0,09$).

Discussion

Notre analyse a été faite à partir de tissus inclus en paraffine. Nous avons choisi d'utiliser cette approche, parce que dans les protocoles SFCE/SIOP2001 et UKCCLG les tissus congelés n'étaient pas centralisés dans un seul institut de référence et il n'était pas possible d'accéder au matériel cryo-présumé. L'étude a été faite sur les blocs 228 de tissus inclus en paraffine disponibles dans les instituts de pathologie français et britannique et cela représente une proportion de 940 patients inclus dans le protocole SFCE/SIOP2001 et 705 dans le protocole UKCCSG/SIOP2001. Cette faible proportion de cas disponibles a souligné l'importance d'un processus centralisé de collecte de matériel biologique pour évaluer les biomarqueurs moléculaires dans un seul centre et pour améliorer la fiabilité et l'importance des études impliquant des tumeurs pédiatriques.

La répartition des LOH était similaire à celle des tumeurs qui ont été traitées par chirurgie première ([45](#), [167](#)), ce qui suggère que la chimiothérapie pré-opératoire n'a pas d'effet sur la fréquence des pertes sur les chromosomes 1p et 16q. Cette constatation a déjà été suggérée par Grundy et al dans une étude pilote réalisée sur les tumeurs traitées par chirurgie première et comprenant une minorité de patients (9,3%) traités par chimiothérapie pré-opératoire due à une tumeur inopérable ([45](#), [167](#)). Les auteurs ont constaté qu'une LOH 16q était significativement plus fréquente dans les tumeurs de Wilms anaplasiques que dans les tumeurs à histologie favorable. Ceci a été confirmé par notre étude et cela indique que la chimiothérapie pré-opératoire n'a pas d'effet sur la prévalence des pertes sur les chromosomes 1p et 16q.

C'est la classification histologique actuelle des WT qui prédit le pronostic dans la majorité des cas, malgré cela, certaines tumeurs, qui ne sont pas classées comme des tumeurs de haut risque, rechutent. Pour cette raison, il nous semble très important d'identifier des nouvelles caractéristiques histologiques pour identifier le petit sous-ensemble de patients qui sont susceptibles de rechuter. Dans ce but, nous mettons en évidence l'importance de

l'analyse qualitative et quantitative des blastèmes dans la prise en charge des WT prétraitées. Un profil particulier de blastème semble être associé avec les WT agressives. Comme prévu, les tumeurs classées en haut risque dans la classification SIOP2001 avaient un volume plus élevé de blastème ainsi qu'un pourcentage de blastème plus élevé ($p < 0,001$ et $<0,0001$ respectivement). De plus, ces tumeurs avaient un blastème avec profil invasif ($p < 0,0001$), une cytologie nucléaire anaplasique ($p < 0,0001$), un haut index mitotique ($p = 0,0002$) et prolifératif ($p = 0,001$).

Nous avons étudié l'association entre les caractéristiques de blastème et le statut des chromosomes 1p et 16q, déjà connu comme étant un outil potentiel pour identifier les tumeurs agressives dans les études COG ([42](#), [45](#), [47](#), [53](#), [162](#), [167](#)). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée en terme de fréquence de LOH entre les tumeurs avec ou sans composante blastématique ($p = 0,65$). Les tumeurs avec anaplasie diffuse et blastème à architecture invasive avaient plus fréquemment une LOH 1p et/ou 16q que d'autres ($p = 0,006$ et $<0,0005$ respectivement).

Même si le petit nombre de cas ne nous permet pas d'atteindre une corrélation statistique significative entre les caractéristiques qualitatives du blastème et les rechutes, nous avons montré que l'évaluation morphologique de blastème ainsi que mitotique et l'analyse de l'index prolifératif et l'évaluation de la perte d'hétérozygotie au niveau des chromosomes 1p et 16q étaient des approches potentiellement utiles pour identifier des tumeurs agressives.

En conclusion, les principaux outils pour la prise en charge du WT sont : la mesure en trois dimensions de la tumeur lors de l'examen macroscopique qui permettra d'obtenir une évaluation quantitative de blastème chimio-résistant et l'analyse microscopique d'une tranche complète de la tumeur. En outre, l'évaluation qualitative du blastème, en particulier l'architecture et la cytologie nucléaire, ainsi que l'évaluation des mitoses et de l'index prolifératif, associés à l'analyse LOH sur le chromosome 1p et /ou 16q, sont importants pour stratifier ces tumeurs.

Projet 2 : Détermination des anomalies du le nombre de copies (CNV) par MLPA dans les néphroblastomes pré-traités du protocole SIOP 2001

Résumé

Le traitement actuel des WTs est basé sur la stratification clinique et sur des critères histopathologiques évalués sur la pièce de néphrectomie post-chimiothérapie. Les tumeurs classées en haut risque histologique bénéficient d'une chimiothérapie post-opératoire plus agressive (Doxorubicine). Néanmoins, il est constaté que la plupart des tumeurs qui rechutent sont de stade local I et II et de risque histologique intermédiaire. Pour cette raison, il est intéressant d'étudier la valeur pronostique de nouveaux marqueurs moléculaires dans la stratification de ces tumeurs.

Dans les études américaines du COG, la perte simultanée de 1p et de 16q est associée à un pronostic défavorable ([45](#)). Néanmoins, la rareté de ces marqueurs rend difficiles les études statistiques pour en affirmer la valeur pronostique. L'altération chromosomique la plus fréquente dans les WTs est le gain de 1q ([51](#), [52](#), [168](#)) qui semble être associée à un pronostic défavorable dans des études anciennes ([169](#)). Des études plus récentes ont aussi confirmé la valeur péjorative du gain de 1q ([54](#), [170](#)). Le but de ce projet a été de tester la faisabilité de la stratification des WTs par le gain de 1q dans une large cohorte européenne de WTs donc sur tumeurs prétraitées.

La technique choisie a été la Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA) commercialisée par MRC-Holland, The Netherlands, en raison de sa rapidité d'exécution et de son bas coût ([171](#)) (Figure 10).

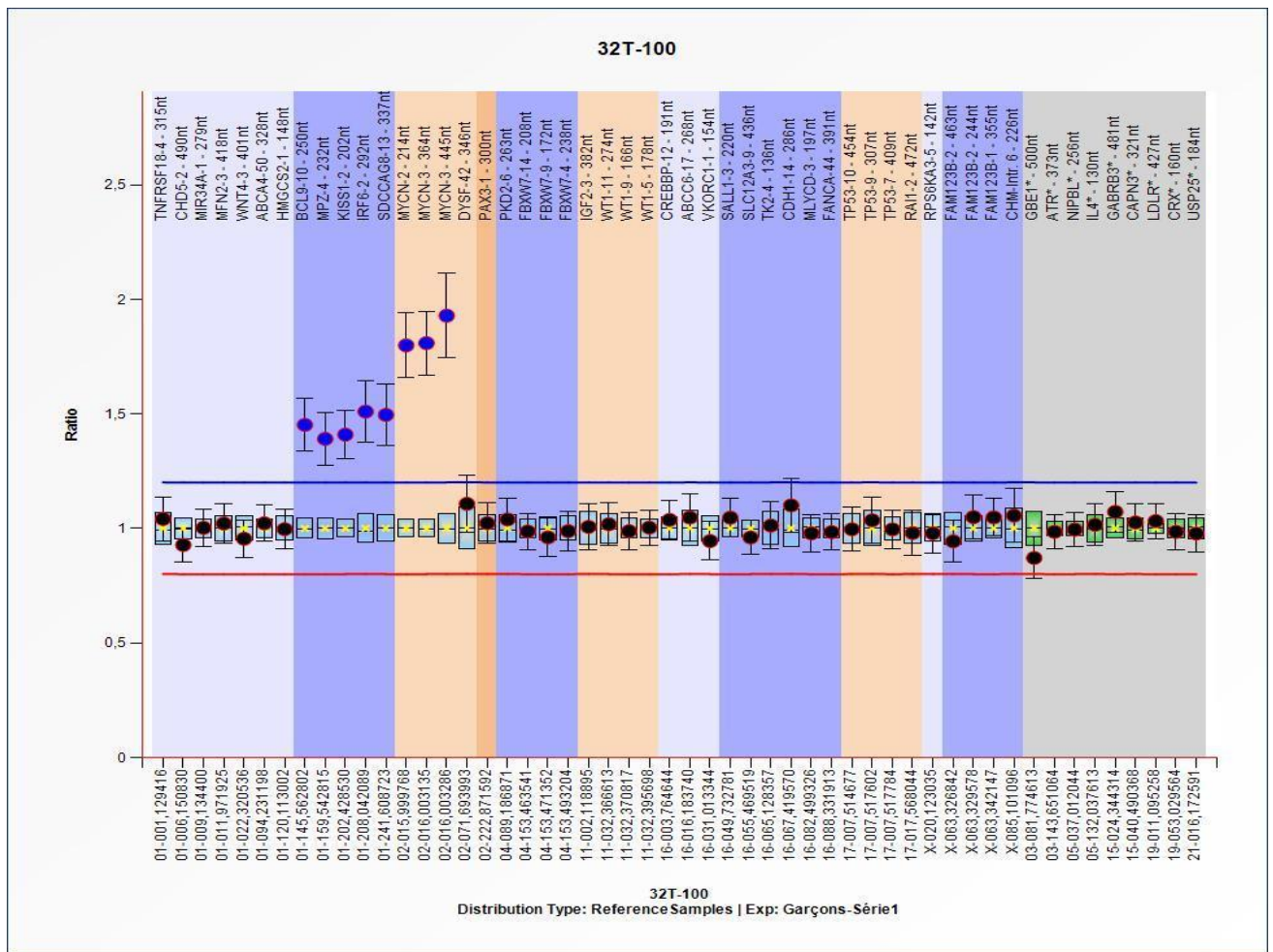


Figure 10. Exemple de MLPA montrant un gain complet de 1q (5 sondes) et de MYC1 (3 sondes) dans une WT.

Cette technique a été utilisée et appliquée aux cas français par notre équipe et aux autres cas européens par les différents laboratoires référents dans les autres pays européens. Le contrôle de qualité ainsi que l'interprétation des résultats de la série française ont été faits dans notre Institut. L'analyse statistique de la totalité des résultats a été faite de façon centralisé au UCL Institute of Child Health, Londres.

L'étude a inclus les patients enregistrés dans le protocole SIOP 2001, provenant de 31 centres SFCE de France et d'autres pays Européens (UK, Hollande, Suède, Irlande, Autriche et Allemagne). Tous les cas avec disponibilité de tissus rénal non-tumoral et tumoral cryopréservés ont été inclus. Le diagnostic de WT a été faite par le pathologiste local et confirmé par une lecture nationale et internationale. Les tumeurs ont été classées selon la

classification SIOP 2001 ([163](#)). Les cas français ont été collectés entre Juin 2013 et Janvier 2014.

Le contrôle de qualité des prélèvements reçus a été fait sur un fragment tissulaire obtenu avant le broyage, inclus dans le formol et coloré avec la coloration Hématoxyline et Eosine (HES)

L'extraction des ADN a été réalisée après broyage manuel, selon le protocole standard avec la technique au Phénol-Chloroforme. La qualité de l'ADN a été testée avec NanoDrop (Thermo Scientific) et Qubit (Invitrogen). Les ADN avec un ratio A260/230 égal ou supérieur à 1 ont été utilisés. Au final, 5 µL d'échantillon (100 ng d'ADN + 3µL de 10 mM Tris-HCl pH 8.2) ont été utilisés pour la MLPA.

Les données cliniques et les suivis ont été obtenus grâce à la base de données SIOP2001.

Annexe 1-Article:

Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumours treated with pre-operative chemotherapy in the SIOP WT 2001 trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study.

Chagtai T, Zill C*, **Dainese Linda***, Wegert J, Savola S, Popov S, Mifsud W, Vujanic G, Sebire N, Le-Bouc Y, Ambros PF, Kager L, O'Sullivan M, Blaise A, Bergeron C, Holmquist Mengelbier L, Gisselsson D, Kool M, Tytgat GAM, van den Heuvel-Eibrink M, Graf N, van Tinteren H, Coulomb A, Gessler M, Williams R, Pritchard-Jones K for International Society of Paediatric Oncology Renal Tumours Study Group (SIOP-RTSG).

*These authors contribute equally.

Journal of clinical Oncology. August 2016. Sous presse.

Discussion

Grâce au réseau de relecture des tumeurs rénales de l'enfant centralisé à l'Hôpital Armand Trousseau, nous avons pu récolter les 232 WT's françaises et obtenir toutes les informations clinico-pathologiques pour chaque cas.. De plus, ce réseau de pathologistes a rendu possible la centralisation des tissus cryopréservés et la constitution d'une tumorothèque.

L'ADN extrait à partir de tissu cryopréservé avec la technique du phénol-chloroforme a permis d'avoir un ADN de très bonne qualité et des bons résultats dans 184 tumeurs sur 232 (80% des cas).

Le petit nombre de tumeurs et le bas taux de rechutes de cette maladie n'ont pas permis de faire des corrélations statistiquement significatives dans la population française, donc cette analyse a été centralisé à Londres, permettant d'avoir un plus grand nombre d'échantillons et une plus grande puissance statistique.

Dans cette étude, nous avons effectué la première analyse à grande échelle d'aberration de nombre de copies de 1q dans les WT's pré-traitées avec chimiothérapie néoadjuvante selon le protocole SIOP-2001.

Nous avons montré que la MLPA fournit un outil rapide et efficace pour déterminer le statut des anomalies du nombre de copies chromosomiques associées à un pronostic défavorable. La fréquence relativement élevée du gain de 1q rend ce marqueur particulièrement attractif pour une utilisation potentielle dans la planification du traitement, mais toute modification de l'intensité thérapeutique en fonction du seul statut 1q aurait une incidence sur une proportion trop élevée de patients. Il pourrait être plus approprié de faire une stratification basée sur plusieurs biomarqueurs moléculaires ou histologiques; dans notre analyse multivariée sur l'ensemble des tumeurs, le gain 1q, stade local avancé et haut risque histologique étaient tous individuellement significatifs. Cependant, avant que les biomarqueurs de cette étude puissent être introduits dans la pratique clinique, les résultats doivent être validés indépendamment dans une étude clinique prospective. L'évaluation de l'impact pronostique du gain de 1q et d'autres biomarqueurs moléculaires émergents seront une composante fondamentale d'UMBRELLA, l'étude sur les tumeurs rénales de l'enfant du prochain protocole SIOP.

Projet 3 : Etude des anomalies structurales et de méthylation de la région 11p15 dans le néphroblastome sporadique et associé au syndrome de Wiedemann-Beckwith

Résumé

Des anomalies de la région 11p15 ont été montrés dans différents cancers de l'adulte et pédiatriques. De plus, une surexpression d' IGF2, situé dans cette région, ainsi que des nombreuses anomalies de la région 11p15, ont été décrites dans le BWS, syndrome associé à différentes tumeurs pédiatriques dont le principal est la WT. Pour cette raison, nous avons voulu nous intéresser de plus près à ce gène, avec un kit MLPA spécifique de la région 11p15, où IGF2 est situé. Nous avons recherché les anomalies structurelles de cette région et de façon parallèle étudié le statut de méthylation de ses centres d'empreinte et des DMR (ICR1, ICR2, H19, DMRO-IGF2) par ASMM RTQ-PCR (allèle specific methylated multiplex real-time quantitative PCR), le but étant de corrélér le phénotype génétique et épigénétique des tumeurs étudiées avec les données pathologiques et cliniques. De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression d'IGF2, facteur de prolifération cellulaire.

Dans cette étude, réalisé sur 128 WTs pré-traités inclus dans le protocole SIOP-2001, nous avons confirmé la valeur pronostique des facteurs déjà connus et utilisés pour la stratification pronostique de la WT, comme la présence d'anaplasie diffuse

, le stade local, les anomalies en MLPA p380 et la délétion de TP53 et nous avons mis en évidence des facteurs pronostiques jamais rapportés auparavant, comme la déméthylation de IGF2-DMRO ($p < 0.0001$) et la déméthylation d'ICR-2 ($p = 0.049$).

Introduction

L'étude des WT français par MLPA p380 Wilms spécifique nous a permis d'évaluer le statut de certaines régions d'intérêt dans ce type tumoral, en particulier des régions 1p, 16q et 1q. En analysant de plus près les autres régions couvertes par le kit utilisé, nous nous sommes également intéressés à d'autres gènes d'intérêt impliqués dans la physiopathologie de ces tumeurs comme NMYC, WT1, WTX, TP53 et IGF2. Cependant ce dernier gène, crucial dans la tumorigénèse de nombreux cancers et dans le développement, n'est représenté dans le kit que par une seule sonde qui était insuffisante pour l'étude complète de 11p15.

Des anomalies de la région 11p15 ont été montrés dans différents cancers de l'adulte et pédiatriques, notamment dans des tumeurs corticosurréaliennes, hépatiques et coliques ([172](#), [173](#)). IGF2 est un gène soumis à empreinte parentale, dont seul l'allèle d'origine paternel est exprimé. Une surexpression de ce gène ainsi que de nombreuses anomalies de la région 11p15 ont été décrites dans le BWS dont on sait qu'il est associé à différentes tumeurs pédiatriques dont le principal est la WT ([167](#), [173-176](#)). Pour cette raison, nous avons voulu nous intéresser de plus près à ce gène, avec un kit MLPA spécifique de la région 11p15, où IGF2 est situé. Nous avons recherché les anomalies structurelles de cette région et de façon parallèle étudié le statut de méthylation de ses centres d'empreinte et des DMR (ICR1, ICR2, H19, DMRO-IGF2), le but étant de corréler le phénotype génétique et épigénétique des tumeurs étudiées avec les données pathologiques et cliniques. De plus, nous nous sommes intéressés à l'expression d'IGF2, facteur de prolifération cellulaire.

Méthodes

Cette étude a intéressé 128 WT, dont 2 associés au syndrome BWS, inclus dans le protocole SIOP 2001. Les ADN des tumeurs et des tissus sains correspondants ont été extraits après broyage manuel avec la technique du phénol-chloroforme.

Pour interpréter les anomalies de la région 11p15 nous avons utilisé deux techniques combinées, une qui fournit des informations sur le statut de méthylation, l'ASMM RTQ-PCR (allèle specific methylated multiplex real-time quantitative PCR), et une sur les anomalies structurelles, une MLPA spécifique de la région 11p15.5. L'interprétation concomitante des deux techniques permet la détermination des anomalies structurelles et de méthylation au niveau de la région 11p15.

L'étude de la méthylation de l'ADN a été réalisée après traitement de l'ADN (1µg dans 45 µl H₂O RNA-ase free à 20°C) par bisulfite [EZ DNA Methylation kit (Zymo research, Orange, CA)].: Après bisulfite nous avons effectué l'analyse par ASMM RTQ-PCR, selon la technique mise au point dans le laboratoire par Azzi et collaborateurs ([71](#)), capable de déterminer le statut de méthylation des sites CTCF *binding sites* de l'ICR1 (CBS2,CBS3), de l'ICR2, du promoteur d'H19 (H19DMR) et d'IGF2DMRO. L'analyse de la méthylation a été déterminée pour chaque locus avec le calcul d'un ratio entre les allèles méthylés et non-méthylés. Les normes de méthylations ont été établies à 43-55 % pour ICR1, 44-54 % pour ICR2, 42-57 % pour H19 et 23-50 % pour DMRO-IGF2.

La MLPA spécifique de la région 11p15.5 (MRC-Holland, The Netherlands) a été réalisée sur la totalité des reins sains et des tumeurs. La technique a comporté quatre étapes dénaturation, hybridation, ligation et amplification. La MLPA a été réalisé selon le protocole du fabricant sur 100 ng d'ADN de tumeur et de tissu sain, dissous dans 5 µL de tampon TRIS-acide ethylenediaminetetracétique (TE 10¹), dénaturés à 98° C pendant 5 minutes. Après refroidissement à 25° C, 1,5 µL du mélange de 33 sondes MLPA et 1,5 µL de tampon ont été ajoutés à chaque échantillon, suivi de dénaturation à 95° C pendant 1 minute et de l'hybridation à 60° C pendant 16 heures. La ligation a été réalisée par l'ajout de 32 µL du mélange tampon et ligase à 54° C pendant 15 minutes, suivie d'une incubation à 98° C pendant 5 minutes. Puis 10µl de mix polymérase contenant un mélange d'oligonucléotides synthétiques fluorescents, tampon, dNTPs, polymérase et eau sont ajoutés dans le tube de

ligation. La réaction de PCR a été réalisée avec 35 cycles à 95° C pendant 30 secondes, 60° C pendant 30 secondes, 72° C pendant 1 minute et une extension finale à 72° C pendant 20 min. Les fragments PCR finaux sont dénaturés avec de la formamide et séparés par électrophorèse capillaire sur un analyseur génétique ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Le pic et la hauteur ont été mesurés à l'aide du logiciel d'analyse de Coffalyser.Net®. Avec le même logiciel les données ont été analysées en utilisant le contrôle ADN du rein normal du même patient pour chaque tumeur. Une anomalie dans le nombre de copies a été définie lorsqu'un ratio déséquilibré d'au moins deux sondes adjacentes a été observé en comparaison avec le reste des sondes sur le même bras du chromosome.

Le ratio entre l'échantillon testé et la référence (tissu non tumoral) a été calculé. L'analyse a été faite avec le logiciel Coffalyser.Net d'MRC-Holland. Le gain a été retenu quand le ratio était supérieur à 1.3, la perte quand le ratio était inférieur à 0.7. Pour être retenu, le gain ou la perte devaient être observés sur au moins deux sondes consécutives. Seulement les échantillons avec au moins 5 des 13 sondes de référence dans le range normal ont été retenus. Un exemple de MLPA 11p15.5 est illustré dans la Figure 13.

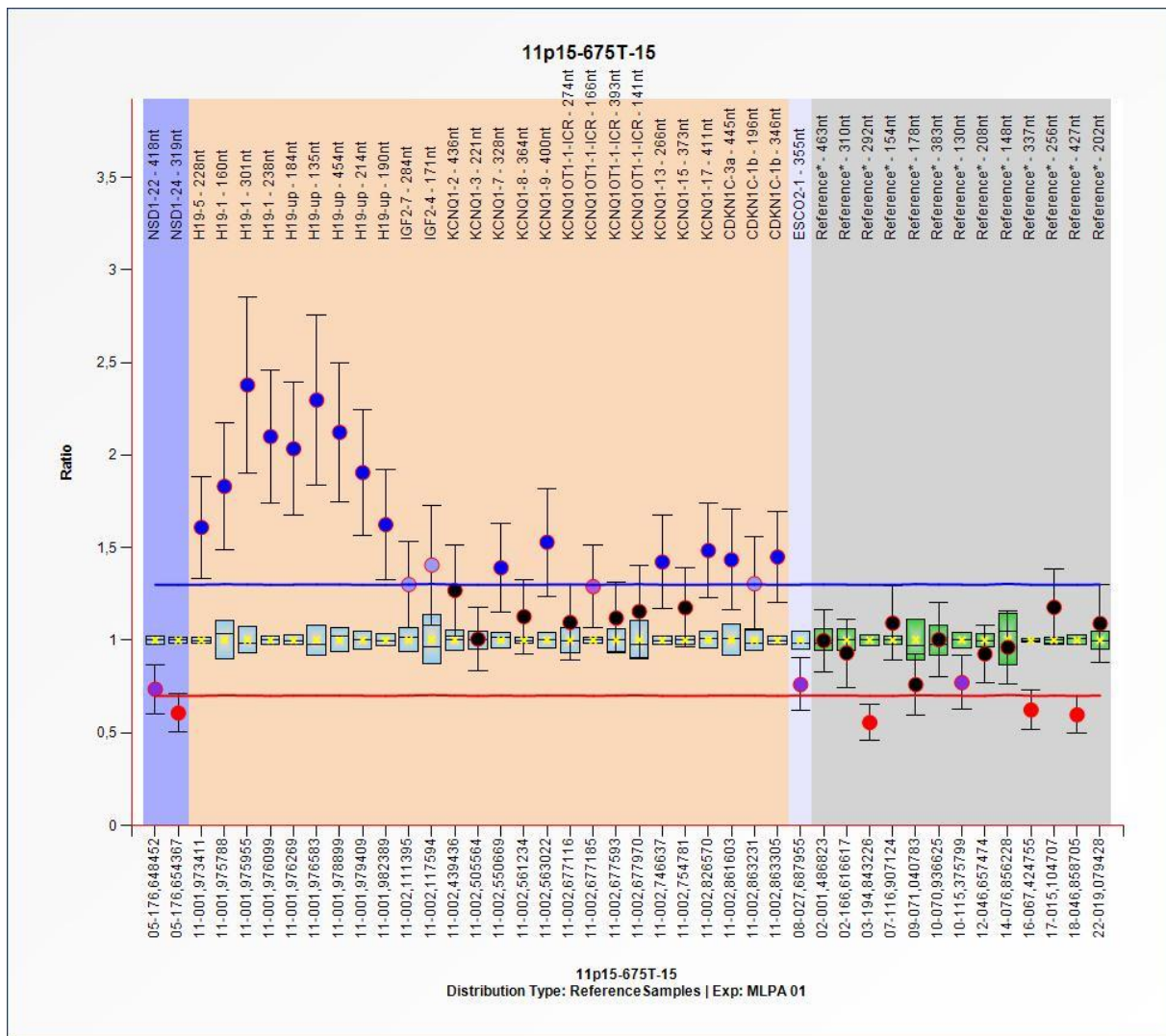


Figure 13. Exemple de MLPA spécifique de la région 11p15.5. Les points bleus indiquent un gain de nombre de copies sur les sondes examinées (9 sondes pour H19, 2 pour IGF2, 9 pour KCNQ10T1 et 3 pour CDKN1C) au niveau de la région 11p15.5. Au niveau des deux sondes en correspondance du gène IGF2 on peut observer un gain du nombre de copies, dans la limite de la significativité.

Dans les cas où la MLPA 11p15.5 montrait des résultats douteux, à la limite de la significativité (voir figure 13) ou des gains et des pertes en mosaïque, nous avons étudié les tumeurs avec des puces SNP (single nucleid polymorphisme) Illumina, pour déterminer les anomalies de nombre des copies alléliques et le pourcentage des cellules dans lesquelles elles étaient présentes.

Cette technique comporte l'amplification enzymatique isothermique pangénomique à partir de 200 ng d'ADN génomique dénaturé par du NaOH, suivie par la fragmentation enzymatique pendant 1 heure à 37°C. L'ADN fragmenté est précipité et le culot est re

suspendu dans le tampon d'hybridation avant d'être dénaturé, puis disposé sur la puce et hybridé pendant 16-24 heures à 48°C dans des chambres d'hybridation.

L'extension des bases se fait en se servant de la sonde comme amorce et du fragment hybridé comme matrice. Cette extension se fait par un ddNTP marqué par un haptène au niveau du SNP lui-même.

Après un lavage et l'amplification du signal, l'analyse se fait sur le logiciel Bead Studio.

Pour l'évaluation de l'expression d'IGF2, la quantité relative (Fold change FC) de l'ARNm d'IGF2 a été normalisée par rapport à un gène de ménage (PPIA) et dont l'expression relative par rapport aux contrôles (tissus sains adjacentes) a été calculée en utilisant la formule $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$. L'ARNm de rein sain (5 reins sains dont l'exérèse chirurgicale a été effectuée pour des pathologies non-oncologiques) est identifié comme calibrateur et est fixé à une valeur de 1. Les autres échantillons ont une valeur par rapport à ce calibrateur.

$\Delta Ct = Ct \text{ gène} - Ct \text{ contrôle}$.

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon1} - \Delta Ct \text{ calibrateur}$.

Statistiques

Le test de Kruskal-Wallis et le Chi-2 test ont été utilisés pour mettre en relation les altérations de la région 11p15 et les données cliniques (âge au moment du diagnostic, sexe, évolution), pathologiques (type histologique, stade local, risque histologique) et moléculaires (expression d'IGF2, anomalies détectées en MLPap380). Pour les courbes de survie (OS, PFS) nous avons utilisé la méthode de Kaplan - Meier en combinaison avec le test du log-rank. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives. L'analyse Cox - régression multivariée a été effectuée pour déterminer des prédicteurs significatifs. Les ratios de risque (HR) et les intervalles de 95% de confiance (IC) ont été utilisés.

Résultats

Les résultats sont résumés dans la Table 5.

Sur les 128 tumeurs étudiés, 31 (24%) n'avaient pas d'anomalie de la région 11p15, 62 (48.6%) avaient des altérations génétiques de la région 11p15 comme UPD (n=56), hémizygotie avec perte de l'allèle maternelle (n=3) et duplication de la région 11p15 (n=3) ; Trente-cinq (27.4%) avaient une anomalie d'empreinte à type de GOM-ICR1 de la région 11p15 (Table 5).

L'âge moyen au diagnostic était de 3.6 ans (médiane=3.0 [0.0; 11.1]). Il y avait une différence significative entre l'âge des enfants sans anomalies de la région 11p15 qui étaient plus jeunes, que les enfants avec UPD et avec GOM-ICR1 ($p < 0.001$). De plus, les patients qui avaient des altérations de la région 11p15 avaient un âge supérieur à 2 ans de façon statistiquement significative ($p = 0.006$).

Le sexe, l'histologie, le groupe de risque histologique et le volume de blastème n'étaient pas corrélés à la présence ou l'absence d'anomalies de la région 11p15, par contre, 80.6 % des tumeurs sans altération de la région 11p15 avaient un stade local moins élevé (stade local I et II) et seulement 6 (19.4%) de ces tumeurs étaient de stade local avancé (III et IV) ($p = 0.074$).

Deux tumeurs étaient associées au BWS (1.5%), chez deux petites filles âgées de 3 et 5 ans, d'histologie mixte et avec anaplasie diffuse, de stade local I et II et aucune de ces tumeurs a développé de métastases pendant le suivi. Des anomalies moléculaires de la région 11p15 ont été identifiées dans la tumeur et dans le rein sain adjacent pour ces deux cas: ICR1-GOM dans un cas et pUPD dans l'autre.

Parmi la totalité des cas analysés, 26 cas avaient des anomalies de la région 11p15 à la fois dans le tissu tumoral et dans le tissu sain correspondant, comme on peut le voir dans les WTs associés au BWS. Néanmoins, parmi ces patients seulement 2 avaient des signes cliniques de BWS. Nous n'avons pas pu confirmer le diagnostic de BWS chez ces patients n'ayant pas accès à l'ADN leucocytaire. Les altérations observées dans ces cas étaient ICR1-GOM dans 16 cas (76%) et pUPD dans 5 cas (24%). Histologiquement ces cas avaient un

pourcentage plus élevé d'anaplasie diffuse par rapport aux cas sans anomalie dans le tissu sain (11% VS 6.5%) et un stade local plus avancé, avec 13 cas sur 16 en stade III et IV (81%). Parmi ces 21 cas 5 ont rechuté pendant le suivi (24%).

L'expression d'IGF2 a été évaluée dans 114 cas. L'expression était de façon statistiquement significative plus élevée dans les tumeurs avec pUPD, duplication de la région 11p15 ou hémizygotie avec perte de l'allèle maternel que dans les tumeurs sans altérations de la région 11p15 ou avec GOM-ICR1 (p=0.046).

Pour l'étude par MLPA P380, la plupart des tumeurs sans anomalie en MLPA n'avaient pas non plus des anomalies dans la région 11p15, même si ces données étaient proche de la significativité (p=0.099).

Concernant la région 17p, où est localisé l'oncogène TP53, 102 cas n'avaient pas d'altération en nombre de copies détectées (80.3%), 17 cas avaient un gain en 17p (13.4%) et 8 cas une perte (6.3%).

	Anomalies de la région 11p15			Total N=128	Test
	Normal N=31	pUPD ou Hémizygotie avec perte d'allèle maternelle ou Duplication N=62	Gain de méthylation d'ICR1 N=35		
Age au diagnostic					
N	31	62	35	128	Kruskal-Wallis P = <0.001
Donnée manquante	0	0	0	0	
Moyenne (Et)	2.5 (1.9)	3.5 (2.3)	4.6 (2.7)	3.6 (2.4)	
Médiane (min; max)	2.0 (0.6; 8.9)	3.0 (0.4; 11.1)	4.0 (0.0; 10.4)	3.0 (0.0; 11.1)	
Age au diagnostic					
< 2 ans	16 (51.6%)	16 (25.8%)	6 (17.1%)	38 (29.7%)	Chi-2 P = 0.006
>=2 ans	15 (48.4%)	46 (74.2%)	29 (82.9%)	90 (70.3%)	
Sexe					
F	17 (54.8%)	32 (51.6%)	20 (57.1%)	69 (53.9%)	Chi-2 P = 0.865
M	14 (45.2%)	30 (48.4%)	15 (42.9%)	59 (46.1%)	
Histologie					
Anaplasie diffuse (312)	0 (0.0%)	7 (11.3%)	3 (8.6%)	10 (7.8%)	Chi-2 P = 0.175
Blastemateuse (212)	4 (12.9%)	6 (9.7%)	6 (17.1%)	16 (12.5%)	
CPDN (110)	1 (3.2%)	1 (1.6%)	0 (0.0%)	2 (1.6%)	
Epithéliale (211)	5 (16.1%)	3 (4.8%)	0 (0.0%)	8 (6.3%)	
Anaplasie focale	0 (0.0%)	1 (1.6%)	1 (2.9%)	2 (1.6%)	
Mixte (214)	7 (22.6%)	23 (37.1%)	11 (31.4%)	41 (32.0%)	
Regressive (216)	8 (25.8%)	14 (22.6%)	12 (34.3%)	34 (26.6%)	
Stromale (213)	6 (19.4%)	7 (11.3%)	2 (5.7%)	15 (11.7%)	
Stade					
I	14 (45.2%)	29 (46.8%)	9 (25.7%)	52 (40.6%)	Chi-2 P = 0.155
II	11 (35.5%)	13 (21.0%)	10 (28.6%)	34 (26.6%)	
III	4 (12.9%)	13 (21.0%)	13 (37.1%)	30 (23.4%)	
IV	2 (6.5%)	7 (11.3%)	3 (8.6%)	12 (9.4%)	
Stade					
I-II	25 (80.6%)	42 (67.7%)	19 (54.3%)	86 (67.2%)	Chi-2 P = 0.074
III-IV	6 (19.4%)	20 (32.3%)	16 (45.7%)	42 (32.8%)	

	Anomalies de la région 11p15			Total N=128	Test
	Normal N=31	pUPD ou Hémizygotie avec perte d'allèle maternelle ou Duplication N=62	Gain de méthylation d'ICR1 N=35		
Risque					Chi-2 P = 0.603
Haut risque	4 (12.9%)	14 (22.6%)	9 (25.7%)	27 (21.1%)	
Risque intermédiaire	26 (83.9%)	47 (75.8%)	26 (74.3%)	99 (77.3%)	
Bas risque	1 (3.2%)	1 (1.6%)	0 (0.0%)	2 (1.6%)	
Volume de blastème					Kruskal- Wallis P = 0.348
Nombre	30	62	35	127	
Donnée manquante	1	0	0	1	
Moyenne (Et)	51.5 (115.9)	68.6 (208.1)	68.1 (189.7)	64.4 (183.9)	
Médiane (min; max)	12.5 (0.0; 562.6)	14.5 (0.0; 1558.1)	5.3 (0.0; 1081.3)	10.7 (0.0; 1558.1)	
Cas avec anomalies dans le rein sain					Chi-2 P = <0.001
non	31 (100.0%)	54 (87.1%)	17 (48.6%)	102 (79.7%)	
oui	0 (0.0%)	8 (12.9%)	18 (51.4%)	26 (20.3%)	
IGF2					Kruskal- Wallis P = 0.046
Nombre	29	57	28	114	
Donnée manquante	2	5	7	14	
Moyenne (Et)	39.3 (59.6)	96.6 (133.7)	78.6 (99.1)	77.6 (112.4)	
Médiane (min; max)	10.7 (0.0; 222.4)	39.4 (0.0; 681.3)	36.2 (0.2; 435.1)	30.3 (0.0; 681.3)	
IGF2					Chi-2 P = 0.559
<30	2	5	7	14	
>=30	17 (58.6%)	27 (47.4%)	13 (46.4%)	57 (50.0%)	
>=30	12 (41.4%)	30 (52.6%)	15 (53.6%)	57 (50.0%)	
IGF2					Chi-2 P = 0.203
<5	2	5	7	14	
[5-30[11 (37.9%)	10 (17.5%)	6 (21.4%)	27 (23.7%)	
[30-100[6 (20.7%)	17 (29.8%)	7 (25.0%)	30 (26.3%)	
>=100	9 (31.0%)	12 (21.1%)	8 (28.6%)	29 (25.4%)	
>=100	3 (10.3%)	18 (31.6%)	7 (25.0%)	28 (24.6%)	
IGF2-DMR0					Chi-2 P = 0.195
DM	1 (3.2%)	10 (16.1%)	7 (20.0%)	18 (14.1%)	
HM	13 (41.9%)	27 (43.5%)	17 (48.6%)	57 (44.5%)	
NM	17 (54.8%)	25 (40.3%)	11 (31.4%)	53 (41.4%)	
MLPA P380					Chi-2 P = 0.099
Gain 1q	0	0	1	1	
Gain 1q, perte 16q	3 (9.7%)	11 (17.7%)	7 (20.6%)	21 (16.5%)	
Perte 16q	0 (0.0%)	5 (8.1%)	2 (5.9%)	7 (5.5%)	
Perte 1p	0 (0.0%)	5 (8.1%)	4 (11.8%)	9 (7.1%)	
Perte 1p, Gain 1q	0 (0.0%)	1 (1.6%)	1 (2.9%)	2 (1.6%)	
Perte 1p, Gain 1q, Perte 16q	0 (0.0%)	4 (6.5%)	0 (0.0%)	4 (3.1%)	
Normal	0 (0.0%)	3 (4.8%)	1 (2.9%)	4 (3.1%)	
Normal	28 (90.3%)	33 (53.2%)	19 (55.9%)	80 (63.0%)	
17p flanking probe					Chi-2 P = 0.163
Gain	0	0	1	1	
Perte	2 (6.5%)	11 (17.7%)	4 (11.8%)	17 (13.4%)	
Normal	0 (0.0%)	4 (6.5%)	4 (11.8%)	8 (6.3%)	
Normal	29 (93.5%)	47 (75.8%)	26 (76.5%)	102 (80.3%)	

Table 5. Caractéristiques clinico-pathologiques en fonction des anomalies de la région 11p15. En rouge les résultats avec une valeur p significatif ou très proche de la significativité. DM= déméthylé ; HM= hyperméthylé ; NM= normalement méthylé.

Ces mêmes résultats exprimés en fonction de la présence de pUPD par rapport à toute autre anomalie de la région 11p15 n'ont pas une plus grande puissance statistique.

Concernant l'analyse de la méthylation au niveau d'IGF2-DMR0, elle n'était pas statistiquement corrélée aux altérations de la région 11p15. Par ailleurs, il n'y avait pas de relation statistique entre le statut de méthylation d'IGF2-DMR0 et l'expression d'IGF2. Table 6.

	IGF2-DMR0			Total N=128	Test
	DM N=18	HM N=57	NM N=53		
IGF2					Kruskal-Wallis P = 0.294
Nombre	15	51	48	114	
Donnée manquante	3	6	5	14	
Moyenne (Et)	94.0 (78.3)	69.2 (121.4)	81.4 (112.7)	77.6 (112.4)	
Médiane (min; max)	97.6 (0.0; 216.6)	25.2 (0.0; 681.3)	27.1 (0.0; 461.5)	30.3 (0.0; 681.3)	
IGF2					Chi-2 P = 0.364
<30	3	6	5	14	
>=30	5 (33.3%)	26 (51.0%)	26 (54.2%)	57 (50.0%)	
>=30	10 (66.7%)	25 (49.0%)	22 (45.8%)	57 (50.0%)	
IGF2					Chi-2 P = 0.376
<5	3	6	5	14	
[5-30[2 (13.3%)	12 (23.5%)	13 (27.1%)	27 (23.7%)	
[30-100[3 (20.0%)	14 (27.5%)	13 (27.1%)	30 (26.3%)	
>=100	3 (20.0%)	16 (31.4%)	10 (20.8%)	29 (25.4%)	
>=100	7 (46.7%)	9 (17.6%)	12 (25.0%)	28 (24.6%)	

Table 6. Relation entre expression d'IGF2 et méthylation d'IGF2-DMR0. DM= déméthylé ; HM= hyperméthylé ; NM= normalement méthylé.

Analyse statistique de la survie sans progression

Au total, 18 patients ont rechuté pendant le suivi (14%) et 7 sont décédés suite à la rechute (5%).

A l'analyse univariée, la survie sans progression (PFS) était statistiquement liée au type histologique (Log rank $p=0.0012$), au risque histologique (Log rank $p=0.0004$) et à la limite de la significativité statistique au stade local (I-II vs III-IV) (Log-rank $p=0.079$). De plus, le pronostic en terme de PFS était défavorable chez les patients avec une déméthylation en IGF2-DMR0 par rapport aux patients avec hyperméthylation en IGF2-DMR0 ou absence d'anomalie de la méthylation en IGF2-DMR0 (Log Rank $p<0.0001$). La PFS était également liée aux anomalies en MLPA p380, avec un pronostic particulièrement défavorable dans les tumeurs avec gain de 1q et perte de 16q (Log-rank $p<0.0001$). La perte de 17p était aussi associée à une PFS défavorable ($p=0.0007$). Figure 14. A l'opposé la présence d'une p-UPD ou ICR1-GOM, l'âge au diagnostic, la présence d'anomalie de type BWS associé dans le tissu sain, l'expression d'IGF2, le statut de méthylation d'ICR1, ICR2 et H19 n'avaient pas d'impact sur la PFS.

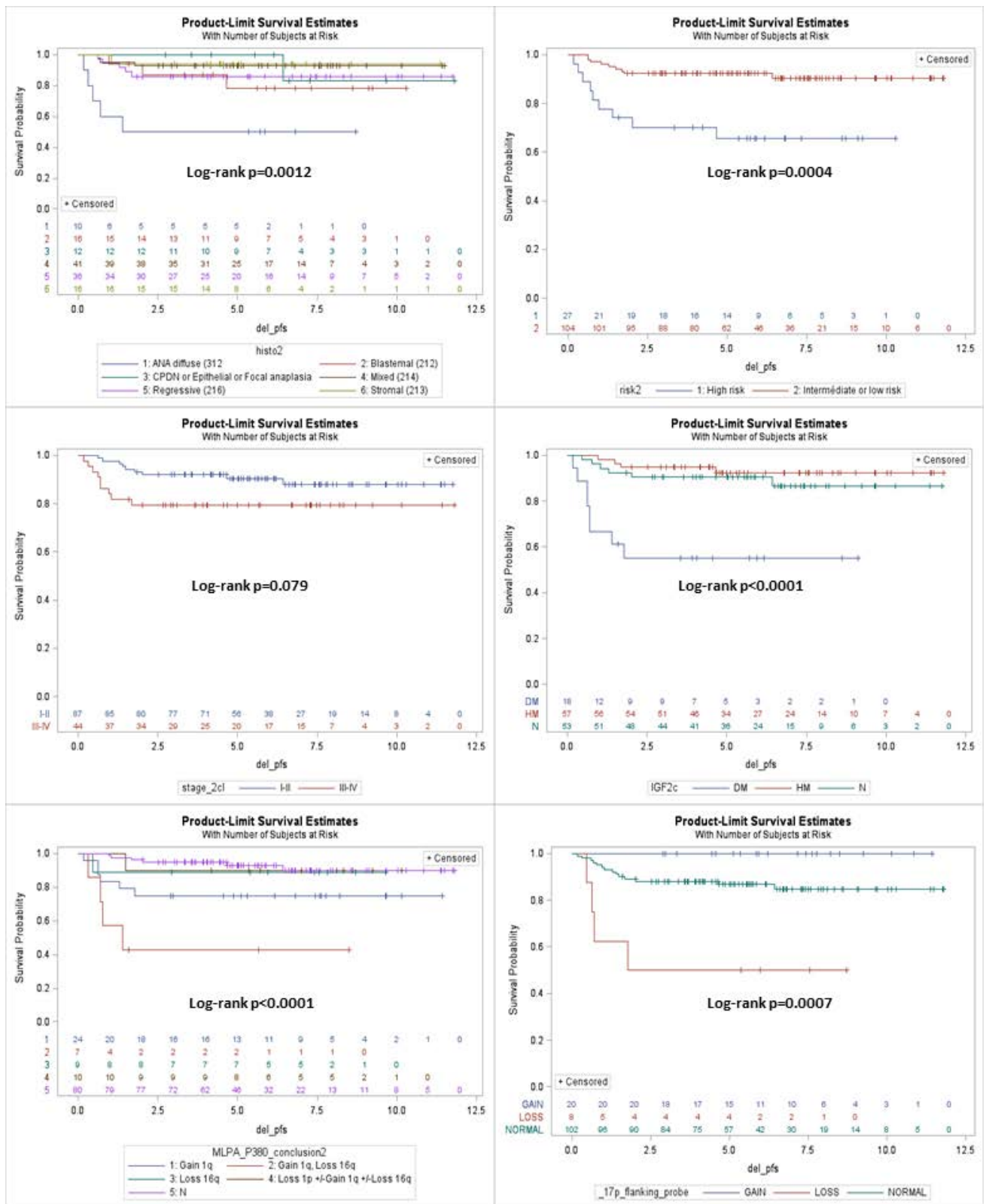


Figure 14. Facteurs significatifs à l'analyse multivariée de la PFS : type histologique, risque histologique, méthylation d'IGF2-DMR0 (dans le tableau IGF2c), anomalie en MLPA p380, anomalie du chromosome 17p. Le stade local est à la limite de la significativité.

Les facteurs significatifs à 15% ont été intégrés en analyse multivariée : le type histologique, le groupe de risque histologique, le stade local (I-II vs III-IV), le statut de méthylation d'IGF2-DMR0, les anomalies en MLPA p380 en 1q, 1p, 16q et 17p. Une procédure descendante pas à pas (backward) a ensuite été appliquée afin de regarder dans le modèle multivarié final uniquement les facteurs significatifs à 10% : seul les facteurs groupe de risque histologique (p=0.01 ; HR 3.91 ; IC95% : 1.38-10.99]), stade (p=0.081 ; HR 2.33; IC95% : 0.9-6.03]) et anomalies en MLPA p380 (p=0.0082) apparaissent comme des facteurs pronostiques indépendants de la PFS au seuil de 10%. Pour les anomalies de MLPA P380 en particulier on retient le gain de 1q vs pas d'altérations (HR 5.36 ; IC95% 1.70-16.91), gain de 1q et perte de 16q vs pas d'altérations (HR 7.11 ; IC95% 1.78-28.39), la perte de 16q vs pas d'altérations (HR 1.46 ; IC95% 0.17-12.30) et perte de 1p associée à gain de 1q et perte de 16q vs pas d'altérations (HR 0.81 ; IC95% 0.09-6.98). Table 7.

Facteurs	p-value dans le modèle final multivarié	Hazard ratio (IC95%)
Risk High risk vs intermediate or low risk	0.010	3.91 [1.38 ; 10.99]
Stage III-IV vs I-II	0.081	2.33 [0.9; 6.03]
MLPA conclusion Gain 1q vs N	0.0082	5.36 [1.70; 16.91]
Gain 1q, Loss 16q vs N		7.11 [1.78; 28.39]
Loss 16q vs N		1.46 [0.17; 12.30]
Loss 1p +/-Gain 1q +/-Loss 16q vs N		0.81 [0.09; 6.98]

Table 7. Analyse multivariée de la PFS.

Analyse statistique de la survie globale

A l'analyse univariée, la survie globale (OS) était statistiquement liée au type histologique (Log rank $p < 0.0001$), au risque histologique (Log rank $p = 0.0005$) et au stade local (I-II vs III-IV) (Log-rank $p = 0.024$) et (I vs II vs III vs IV) (Log rank $p = 0.018$). De plus, le pronostic en terme d'OS était défavorable chez les patients avec une déméthylation en IGF2-DMR0 par rapport aux patients avec hyperméthylation en IGF2-DMR0 ou absence d'anomalie de la méthylation en IGF2-DMR0 (Log-Rank $p < 0.0001$). L'OS était également lié aux anomalies en MLPA p380, avec un pronostic particulièrement défavorable dans les tumeurs avec gain de 1q et perte de 16q (Log-rank $p < 0.0001$). La perte de 17p était aussi associée à un OS défavorable ($p = 0.025$). Un autre paramètre influençant négativement l'OS était la déméthylation d'ICR2 (Log-rank $p = 0.049$) Figure 15. En fait, il n'y a pas de déméthylation isolée d'ICR2 mais elle est dans notre série toujours associée soit à une hyperméthylation d'ICR1 traduisant une p-UPD, soit à une duplication de la région 11p15 ou une hémizygotie avec perte de l'allèle maternel. Ainsi la significativité notée avec la déméthylation d'ICR2 est due à la réunion de toutes les causes, augmentant ainsi le nombre d'anomalies et donc la puissance statistique alors que la présence d'UPD ou de l'hyperméthylation d'ICR1 (GOM ICR1) et de l'hyperméthylation d'H19 pris isolément n'avait pas de significativité.

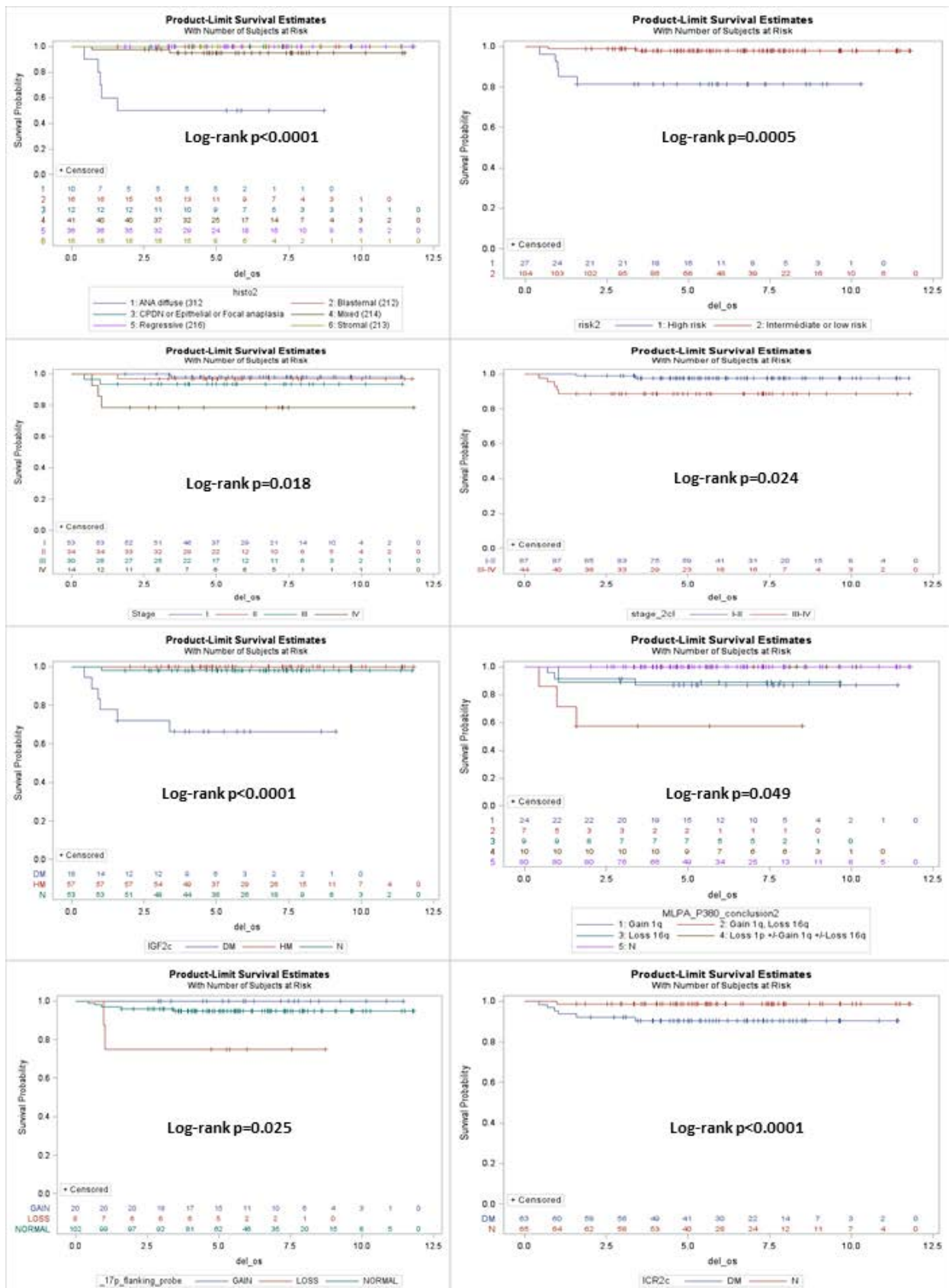


Figure 15. Facteurs significatifs à l'analyse multivariée de l'OS : type histologique, risque histologique, stade local (I vs II vs III vs IV), stade local groupé (I-II vs III-IV), méthylation d'IGF2-DMR0, anomalie en MLPA p380, anomalie du chromosome 17p et ICR1-GOM.

A l'opposé, l'âge au diagnostic, la présence d'une BWS associée, l'expression d'IGF2, n'avaient pas d'impact sur l'OS.

Les facteurs significatifs à 15% en analyse univariée ont été intégrés à l'analyse multivariée : Anomalies de 11p15 (UPD vs les autres), type histologique, groupe de risque histologique, stade local (I,II,III,IV), statut de méthylation d'IGF2-DMR0, anomalies en MLPA p380 en 1q, 1p, 16q et 17p, statut de méthylation d'ICR1, ICR2 et H19. Le modèle multivariée ne convergeait pas et était très instable. Les résultats de l'analyse multivariée ne seront donc pas exploitables.

Discussion

Dans cette étude nous avons pour la première fois réalisé une analyse génétique et épigénétique sur la région 11p15 dans une large cohorte de WT's sporadiques ou associées au BWS, pré-traitées, avec le but de mieux comprendre la physiopathologie de ces tumeurs embryonnaires très hétérogènes et avec le souhait de pouvoir identifier des outils moléculaires pouvant nous aider dans la stratification pronostique de cette tumeur.

En moyenne, environ 7.5% des WT's sont associées au BWS, parmi ces tumeurs environ 60% sont dues à des altérations génétiques ou épigénétiques, 80% d'entre elles localisées sur la région 11p15 (32). Les WT's associées au BWS sont connus pour avoir un pronostic plus favorable par rapport aux tumeurs isolées, une plus petite taille au diagnostic, un stade local moins avancé, moins de métastases au diagnostic (moins de stade IV) et moins d'anaplasie diffuse (79, 86). Cela suggère une prise en charge différente de ces tumeurs par rapport aux tumeurs isolées. Dans notre série les deux tumeurs associées au BWS étaient chez deux petites filles âgées de 3 et 5 ans, et, conformément à ce qui était attendu, leur stade local était peu avancé et leur décours clinique favorable. De façon opposée, nous avons identifié des patients qui avaient des altérations moléculaires à la fois dans la région 11p15 dans la tumeur et dans le tissu normal, mais sans signe clinique de BWS. Ces patients avaient un stade local plus avancé au diagnostic, plus d'anaplasie diffuse et un pronostic défavorable avec un taux de rechutes supérieures à ce qui était attendu. Ceci est probablement dû au fait que le suivi des patients atteints de BWS a permis le dépistage tumoral de façon plus précoce, alors que dans ces patients la découverte des tumeurs a été sporadique, et donc à un stade plus avancé de la maladie. Nous émettons l'hypothèse que ces patients, qui ont des anomalies constitutionnelles de découverte fortuite, ont peut-être des formes de BWS à mosaïcisme faible, et devraient bénéficier d'un dépistage particulier pour détecter l'éventuelle survenue d'autres tumeurs embryonnaires, ainsi que d'un conseil génétique pour établir le risque tumoral chez eux et chez leurs proches, même si les formes familiales sont très rares. Nous n'avons pas pu poser un diagnostic de BWS chez ces patients n'ayant pas accès à l'ADN leucocytaire. Ces résultats pourraient inciter à analyser statistiquement la région 11p15 dans le tissu constitutionnel des enfants atteints de WT.

L'intérêt envers la région 11p15 dérive du fait que l'expression du gène IGF2, situé sur cette région, a été observé comme étant augmentée dans de nombreuses tumeurs embryonnaires ([167](#), [173-176](#)), dont la WT. Comme déjà reporté par Hubertus et al. en 2011, nous avons observé une augmentation de l'expression d'IGF2 dans les tumeurs de Wilms, par rapport à l'expression dans le rein non tumoral ([177](#)). Les tumeurs embryonnaires, à la différence des tumeurs développées chez l'adulte, ne sont pas le résultat de l'accumulation de mutations génétiques dans le temps. Cela suggère un autre mécanisme pathogénique à l'origine de ces tumeurs. IGF2 est un gène soumis à empreinte et il fait partie du cluster ICR1-IGF2-H19 (H19 DMR), qui dans des conditions physiologiques est exprimé par l'allèle paternel (ICR1 méthylé), l'allèle maternel étant déméthylé. Si les deux allèles sont méthylés, IGF2 est transcrit par les deux allèles et cela donne une surexpression d'IGF-2 et par conséquence une contribution positive à la croissance tumorale.

Un étude de Ravenel et collègues ([178](#)) montre que les tumeurs avec une augmentation d'expression d'IGF2 et perte de l'empreinte au niveau de 11p15 (LOI), sont associés à un développement plus tardif et dérivent de la WT mature, par conséquence ces tumeurs sont observées chez des patients plus âgés. Cela a été confirmé par des études successives de Watanabe ([179](#)) et Brown ([180](#)). Nous avons aussi observé que les patients sans altération de l'empreinte sur 11p15 étaient de façon statistiquement significative plus jeunes au diagnostic (médiane = 2 ans), par rapport aux patients avec LOH (UPD, hémizygotie avec duplication de l'allèle maternel et duplication de la région 11p15) (médiane= 3 ans) ou avec LOI (ICR1-GOM) (médiane= 4ans) ($p=0.006$). Comme reporté dans les études précédentes nous avons observé que l'expression d'IGF2 était augmentée de façon significative chez les patients avec LOI ou LOH dans la région 11p15 ($p=0.046$). Cela nous fait émettre l'hypothèse que ces tumeurs, avec altérations de LOH ou LOI au niveau de la région 11p15, soient des tumeurs de développement plus tardif et dérivé du néphroblaste mature, à la différence des tumeurs sans altérations de la région 11p15 qui ont un âge plus jeune au diagnostic et une expression d'IGF2 plus faible. Ce deuxième groupe de tumeurs, avait aussi un stade moins avancé au diagnostic, avec 80% de tumeurs diagnostiquées en stade local I et II ($p=0.074$). De plus, ces tumeurs étaient le plus souvent classées en risque histologique intermédiaire avec un pourcentage mineur de haut risque histologique (12,9%), plus faible par rapport aux tumeurs avec LOH (22.6%) ou LOI (25.7%) de la région 11p15, même si cela n'était pas

significatif au niveau statistique ($p=0.6$). Ces tumeurs avaient de façon statistiquement significative moins d'altérations dans le nombre de copie sur les régions 1p, 1q et 16q à l'analyse par MLPA ($p=0.099$), avec seulement 3/31 tumeurs avec gain de 1q et 28/31 sans altérations.

Une étude du COG cherche à inclure l'évaluation du profil de méthylation de la région 11p15 dans la classification du risque moléculaire des WT. Dans cette étude a été mis en évidence une catégorie de tumeurs dites à très bas risque (VLRWT), qui ne nécessite pas de thérapie adjuvante, caractérisée par un âge inférieur à 24 mois, stade local I, histologie favorable, poids inférieur à 550 g et pas d'anomalie au niveau de l'empreinte de la région 11p15 ([181](#)). La validité de cette étude sera confirmée dans le prochain protocole SIOP sur les cas prétraités.

Dans notre étude, en plus d'avoir confirmé la valeur pronostique des facteurs connus comme la présence d'anaplasie diffuse, le stade local, les anomalies en MLPA p380 et la délétion de TP53, nous avons mis en évidence un facteur pronostique jamais rapporté auparavant, comme la déméthylation de IGF2-DMRO ($p<0.0001$). La déméthylation d'ICR-2, observé chez les patients avec p-UPD, duplication de la région 11p15 et hémizygotie avec perte de l'allèle maternel, était en effet également associée à un pronostic défavorable ($p=0.049$), alors que la présence de p-UPD, duplication de la région 11p15 ou l'hémizygoties avec perte de l'allèle maternel pris isolément n'étaient pas liés à la PFS ($p=0.69$) ni à l'OS ($p=0.12$) de façon statistiquement significative. Cela est peut-être dû au faible nombre de cas de GOM ICR1 pris isolément. Là encore, le fait de réunir sous la situation déméthylation d'ICR2 l'ensemble des anomalies d'ICR1 qui lui sont associées permet d'augmenter le nombre d'anomalies d'ICR1 et donc la puissance statistique.

Etant donné le nombre de facteurs considérés pour l'analyse multivariée, au regard du nombre d'évènements en PFS (18 évènements) le manque potentiel de puissance pour cette analyse n'a pas permis de mettre en évidence tous les facteurs pronostiques indépendants de PFS. Les facteurs retenus pour l'analyse multivariée étaient le risque histologique ($p=0.01$), le stade local I-II vs III-IV ($p=0.081$) et le gain de 1q ainsi que le gain de 1q associé à la perte de 16q ($p=0.0082$)(voir Table 8). L'analyse multivariée de l'OS ne convergeait pas et était très instable, ceci peut s'expliquer par le faible nombre d'évènements en survie globale

qui n'est pas suffisant méthodologiquement pour une analyse multivariée : ceci induit un manque de puissance et potentiellement des problèmes de convergence du modèle.

IGF2-DMR0 est la séquence proximale du promoteur d'IGF2 et sa déméthylation a été proposé comme un facteur de risque prédisposant au cancer colorectal ([182](#)).

IGF2-DMR0 est physiologiquement déméthylé sur l'allèle paternel qui l'exprime, il est donc peu probable que sa déméthylation puisse conduire directement à la réactivation de l'allèle maternel. Ainsi, l'hypométhylation d'IGF2-DMR0 dans le cancer est un indicateur d'une altération dans la transcription d'IGF2 de l'allèle actif indépendamment du statut de l'empreinte d'IGF2. En outre la déméthylation d'IGF2-DMR0 a été rapporté dans des ostéosarcomes ([175](#)), des cancers de la vessie ([183](#)) et cancers de l'ovaire ([184](#)) sans une association avec la LOI d'IGF2. Un étude de 1999 montre la déméthylation d'IGF2-DMR0 dans une petite cohorte de WT et dans le tissu sain adjacent indépendamment du statut d'expression d'IGF2, sans corrélation pronostique ([185](#)).

Plus récemment, la déméthylation d'IGF2-DMR0 a été démontré comme étant un biomarqueur de pronostic négative dans des séries de carcinomes de l'œsophage et du colon ([186](#), [187](#)).

Dans notre étude aussi, nous pouvons affirmer l'impact négatif de ce marqueur sur le pronostic dans les WT en terme de PFS et OS.

En conclusion nous pensons qu'une analyse de la région 11p15 sur une plus grosse population de tumeurs pourrait conclure à des résultats d'une plus grande puissance statistique. L'altération de l'empreinte de cette région ainsi que la déméthylation d'IGF2-DMR0 pourraient être des biomarqueurs intéressants à explorer dans le futur. Une collaboration européenne comme celle réalisée à l'occasion de l'étude MLPA pourrait être envisagée dans ce sens.

Projet 4 : Caractérisation immunohistochimique de la réponse immune (CD3, CD4, CD8, PD1, PDL1) dans la série des néphroblastomes pré-traités de la SFCE/SIOP et corrélation avec les données cliniques et pathologiques.

Résumé

En pédiatrie, on en sait peu sur le rôle de la réponse inflammatoire dans le développement du cancer. Nous avons analysé les lymphocytes d'immunohistochimie intratumoral (TIL : CD3, CD4, CD8 et CD4 / CD8) et du check-point immunitaire (PD1 / PD-L1) dans 55 WTs pré-traités enregistrés dans le protocole SIOP-2001 et corrélés aux données clinico-pathologiques. Dix patients ont récidivé pendant le suivi (18%).

Les TILs ont été principalement observées dans le stroma et l'infiltrat inflammatoire était plus abondant dans les tumeurs que les reins sains.

Nous avons défini les médianes de CD4, CD3, CD8 et CD4/CD8 comme cut-off pour regrouper les tumeurs en haute et basse densité de TILs.

Densité de CD3, CD4, CD8 et le rapport CD4 / CD8 ne sont pas corrélés avec les données clinico-pathologiques.

PD1 et PDL1 étaient exprimées dans une minorité de cas: deux ont montré une positivité membranaire à PD1 dans 5% et 18% des lymphocytes intratumoraux, et quatre une positivité membranaire à PDL1 dans les cellules tumorales (moyenne 20%).

En analyse univariée, la survie sans progression était défavorable chez les patients avec tumeur avec anaplasie diffuse, haut risque histologique, faible taux de CD8 et faible rapport CD4/CD8. Un faible rapport CD4/CD8, la présence d'anaplasie diffuse, une tumeur de risque histologique élevé et de stade local avancé étaient corrélés à une OS défavorable. Un faible rapport CD4 / CD8 était un facteur pronostic négatif indépendant du risque histologique (valeur $p = 0,0027$).

En conclusion le rapport CD4 / CD8 est un outil de stratification pronostique très important et devrait être pris en considération pour stratifier la WT à l'avenir.

Annexe 2-Article :

**CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes is significantly associated with clinical
outcome in pretreated Wilms patients**

Linda Dainese^{*}, Gabriel G. Malouf^{*}, Roger Mowauad, Annick Blaise, Arnauld Vershuur,
Sabine Irtan, Marie Dominique Tabone, Marion Classe, David Khayat, Christophe Bergeron,
Yves Le Bouc, Aurore L'herminé-Coulomb.

*These authors contribute equally.

Modern Pathology. Soumis.

Discussion

Le microenvironnement immunitaire joue un rôle important dans la progression du cancer adulte, cependant, sa contribution potentielle dans les cancers pédiatriques n'a pas encore été bien évaluée. Des nombreux études ont exploré la présence de TILs CD8 est un sujet de grand débat dans la littérature. Alors que pour certains auteurs une grande quantité de TIL est un facteur pronostique positif ([188](#), [189](#)), pour d'autres il est un facteur pronostique négatif ([190-194](#)). En outre, le rapport des cellules CD4/ CD8, qui est un paramètre clé pour la fonction appropriée des TILs, a été corrélée avec le pronostic dans le cancer de l'adulte. Sheu et al (16) ont suggéré que l'incapacité de l'hôte de contrôler le développement d'une tumeur doit être la conséquence d'une baisse de la production de CD4. En fait, chez les patients ayant une charge tumorale élevée ou avec métastases, une diminution du nombre de CD4 intratumoral avec un ratio CD4/CD8 inversé a été observée. Cette hypothèse a déjà été exploré dans d'autres études sur le cancer du poumon, le mélanome métastatique et le carcinome de la vessie ([195-197](#)).

Dans cette étude le rôle de l'infiltrat immunitaire dans les WTs pré-traités a été étudié pour la première fois sur une série consécutive. Nous avons identifié le rapport CD4/CD8 comme facteur pronostique puissant influençant la PFS et l'OS. Sa valeur pronostique était supérieure et indépendante de la stratification pronostique actuellement utilisée sur la base du protocole SIOP2001.

Nous sommes conscients que cette constatation doit être interprétée avec prudence, car l'infiltrat immunitaire intratumoral pourrait être influencé par le fait que tous les patients pédiatriques ont été traités par une chimiothérapie néo-adjuvante. Ces résultats devraient être validés dans une plus grande série de WTs pré-traités et pris en considération comme un outil pour mieux stratifier ces tumeurs par le pathologiste.

PERSPECTIVES

1) Puces SNP

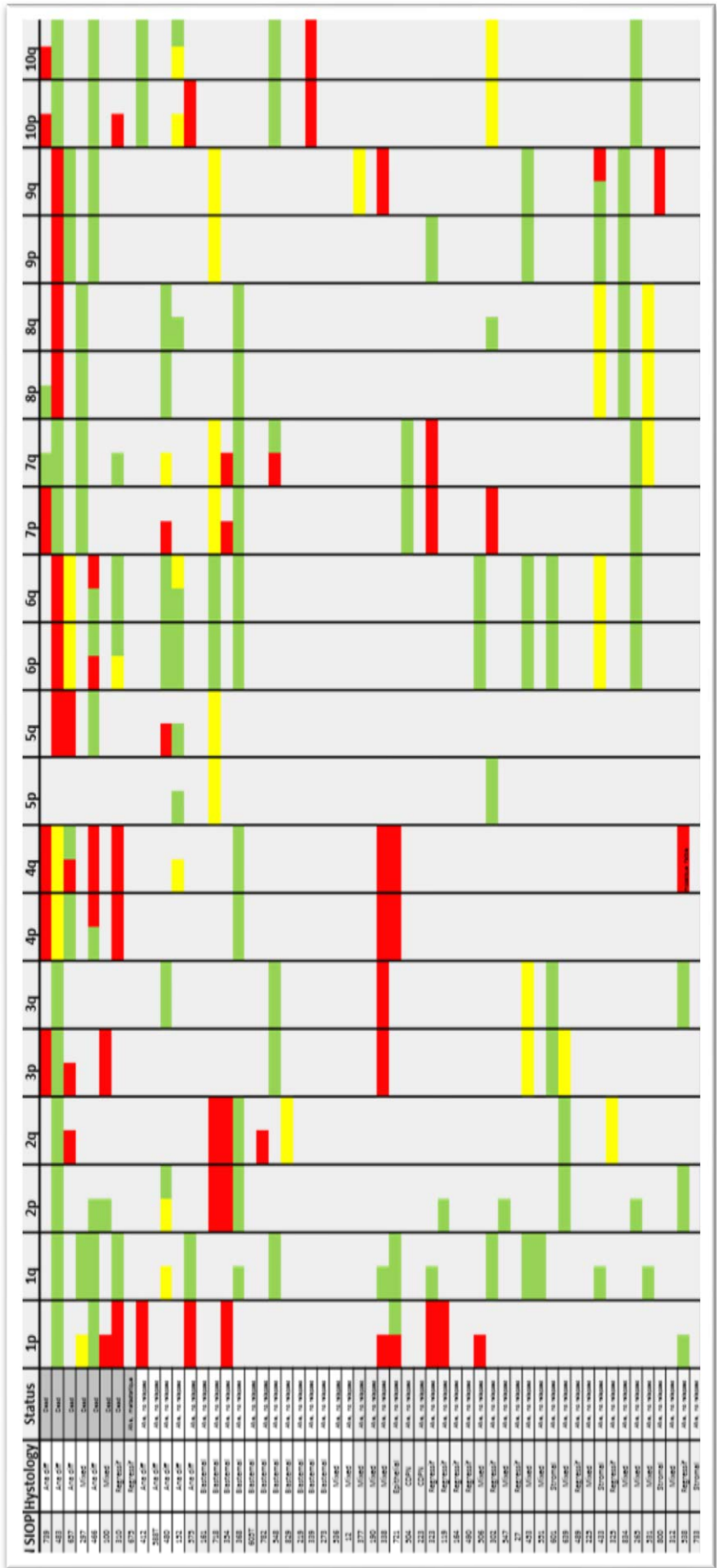
La totalité des échantillons cryopréservés récoltés (tissus tumoraux et tissus sains correspondants) a été analysée par puces SNP Illumina en collaboration avec le Dr. Sandra Chantot Bastaraud du Service de Cytogénétique de l'Hôpital Trousseau. L'interprétation des résultats ainsi que la confrontation avec les résultats de l'étude par MLPA a été faite de façon collective et est en cours de finalisation. Une partie des résultats des puces SNP analysés jusqu'à maintenant est illustrée dans la Table 8. En premier lieu nous voudrions essayer de comparer les modifications en nombre de copies mis en évidence par les puces SNP avec la classification anatomopathologique des WT et le suivi clinique des patients. Cette technique, à la différence de la technique MLPA, permet d'analyser non seulement les loci d'intérêts ciblés par des kits spécifiques pour la tumeur en question, mais aussi toutes les autres régions du génome. Grace à cette technique nous pouvons observer que les tumeurs qui ont rechuté ont un profil SNP plus complexe par rapport aux tumeurs avec un suivi favorable.

Cette analyse pourrait permettre de définir une caractérisation moléculaire des WT, comme celle faite par l'équipe de G. Assié et al. sur les carcinomes corticosurrénaux ([198](#)).

Nous avons observé de nombreuses pertes de chromosomes mettant en évidence des tumeurs hypodiploïdes et des nombreux gains mettant en évidence des tumeurs hyperdiploïdes. Nous pouvons également observer que les deux tumeurs associées au BWS ont une disomie au niveau du chromosome 11p15 dans la tumeur et dans le tissu sain correspondant, mais cette caractéristique n'est pas exclusive des tumeurs syndromiques et on peut la voir aussi dans les tumeurs sporadiques. Cela rejoint ce que nous avons mis en évidence par l'étude de méthylation de la région 11p15. De plus, avec les gains de 1q et les pertes de 1p et 16q, régions d'intérêt dans la WT et faisant partie des cibles de la MLPA p380, d'autres gains sont présents de façon récurrente, sur les chromosomes 6p, 12p et 12q. Des gains de chromosomes 6p et 12q ont également été reportés dans les tumeurs germinales de l'ovaire ([199](#)). Le chromosome 12p, siège de la Cycline D2, est rapporté comme étant dupliqué dans les tumeurs germinales testiculaires ([200](#)).

Une analyse plus fine et détaillée des puces SNP à l'aide de bio-informaticiens pourrait permettre d'identifier des gènes impliqués dans la physiopathologie de ces tumeurs et d'établir une séquence temporelle des anomalies génétiques et épigénétiques dans leur développement.

Une analyse plus fine de l'amplification du gène MYCN pourrait être faite pour mieux en comprendre l'impact sur le pronostic de l'amplification isolée du gène par rapport à l'amplification du bras entier du chromosome 8 où MYCN est situé.



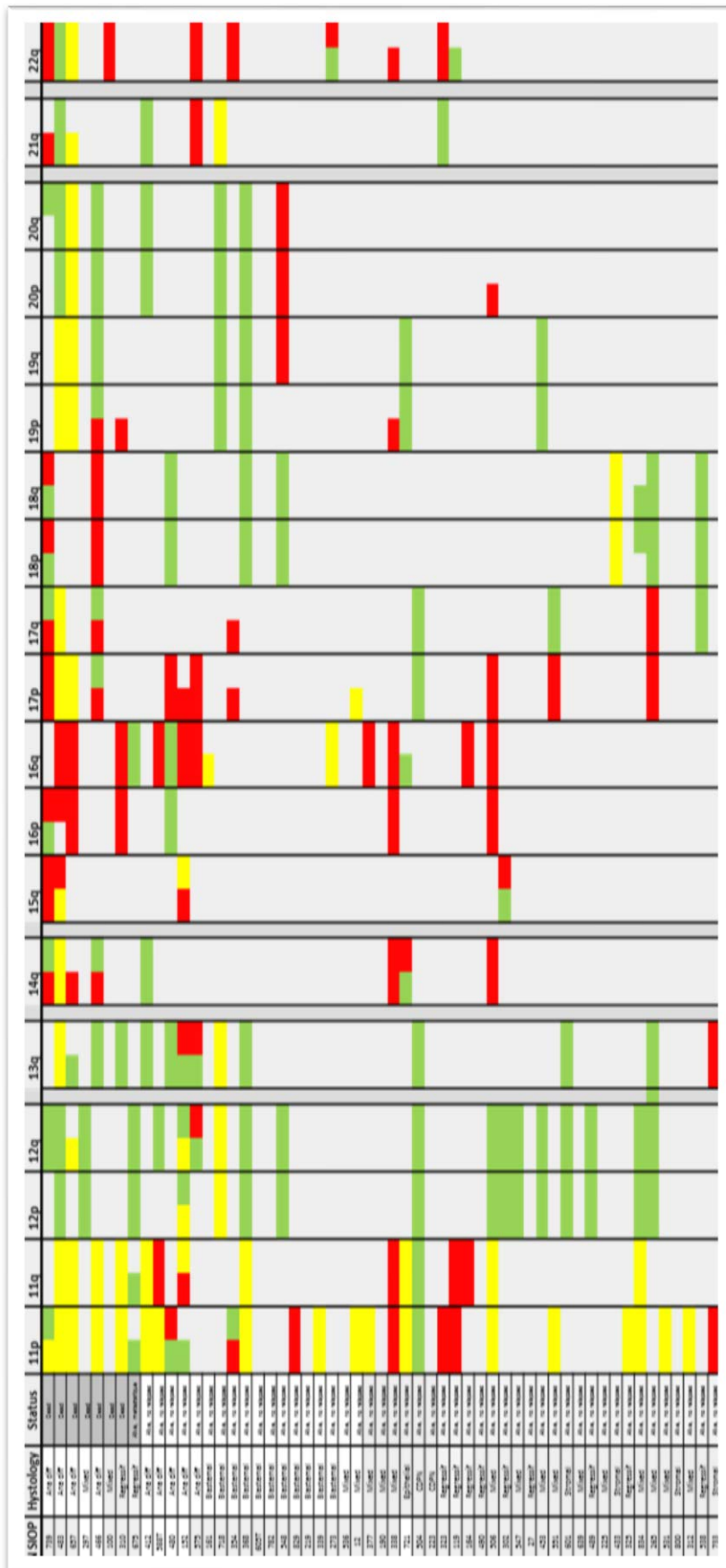


Table 8. Résultats partiels des puces SNP pour 55 cas. En rouge : perte ; en vert : gain ; en jaune : disomie.

2) Caractérisation génomique des tumeurs de Wilms avec anaplasie diffuse et confrontation avec les tumeurs de Wilms avec anaplasie focale

L'anaplasie est un puissant marqueur de pronostic défavorable chez les patients atteints de WT, selon les protocoles de la SIOP et du COG ([201](#), [202](#)). Des mutations et / ou suppressions de TP53 ont été signalés chez 62,5% des tumeurs de Wilms avec anaplasie diffuse (WTDA) dans une étude collaborative de SIOP (n = 8 cas) et COG (n = 32 cas). Le statut TP53 semble prédire un pronostic défavorable en terme de survie sans récurrence et de survie globale ([59](#)). Auparavant, une étude nord-américaine avait déjà trouvé une association entre la mutation de TP53, l'anaplasie diffuse et un mauvais pronostic ([60](#)). De plus, dans notre étude en collaboration avec les équipes européennes, la perte du chromosome 17p, où le gène TP53 est situé, a été corrélée à un pronostic négatif (voir projet 3). Cette constatation est désormais consolidée dans la littérature pour les tumeurs non traitées, mais le statut mutationnel de TP53 doit être validé dans une grande cohorte de WTs prétraités, puisque la chimiothérapie préopératoire pourrait influencer l'état de TP53. Si validées, les mutations et / ou suppressions de TP53 pourraient avoir un impact dans la prise en charge des patients.

Si les patients atteints de WT avec anaplasie focale (FA) ont une survie identique à ceux qui n'ont pas d'anaplasie, les patients avec anaplasie diffuse sont classés comme à haut risque, comme les blastémateux, et ont un mauvais pronostic ([79](#)). Une étude récente fait par exome et séquençage transcriptomique sur les WTs à sous-type blastémateux, identifie un profil génétique spécifique de ces tumeurs ([58](#)). En revanche, le profil génétique typique des WTDA et WTFA reste encore peu connu. Du moment où le WTDA est le sous-type le plus agressif de WT, nous voudrions étudier l'ensemble du génome et le catalogue de mutations somatiques dans ces tumeurs, et le comparer avec celui du WTFA. De plus, nous voudrions explorer la valeur pronostique des altérations de TP53 dans les WTs avec anaplasie.

La caractérisation moléculaire de ces tumeurs est essentielle en vue de personnaliser le traitement du patient.

3) Perspective dans la recherche biologique et dans le traitement des néphroblastomes au niveau international

La coopération internationale mise en place entre COG-RTC et le SIOP-RTSG a identifié quatre groupes de patients prioritaires sur lesquels concentrer les prochaines discussions et collaborations internationales. Ces patients sont ceux qui ont une maladie plus agressive et un décours clinique moins favorable : patients avec tumeur en Stade IV (métastatique au moment du diagnostic), patients avec tumeurs inopérable au moment du diagnostic, patients avec tumeur bilatérale et patients avec récurrence tumorale.

De façon parallèle à l'élaboration de nouveaux essais cliniques pour le traitement de ces patients, des études visant à la validation de l'impact de certaines anomalies biologiques sur le pronostic de ces tumeurs sont en cours ([203](#)):

- 1) Analyse de l'anomalie du nombre de copies au niveau des chromosomes 1p, 16q et 1q et étude de l'hétérogénéité tumorale pour ces marqueurs.
- 2) Analyse génomique des WT avec anaplasie diffuse
- 3) Analyse des mutations des « mi-RNA processing genes ».

Le prochain protocole de prise en charge de la WT, le protocole SIOP-UMBRELLA, prendra en considération le gain de 1q dans la stratification des WT pour identifier les patients à évolution défavorable qui nécessitent un traitement néo-adjuvant plus agressif.

L'étude au niveau européen des anomalies de la région 11p15 permettrait de valider les résultats de notre travail et d'augmenter la puissance statistique sur un plus grand nombre de cas.

DISCUSSION GENERALE

La tumeur de Wilms (WT) ou Néphroblastome, est la tumeur du rein la plus fréquente chez l'enfant âgé de moins de 5 ans, avec une incidence en France de 1/10000 naissances. Bien que la majorité des enfants avec WT soit aujourd'hui soignés, une minorité de tumeurs qui ne montrent pas de critères particuliers d'agressivité au moment du diagnostic rechutent, et une partie des tumeurs avec des critères d'agressivité biologique au diagnostic ont en réalité un comportement clinique moins agressif.

En Europe, les enfants âgées de plus de 6 mois et atteints d'une WT sont traités par une chimiothérapie pré-chirurgicale. Après la chirurgie, l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire de néphrectomie confirmera le diagnostic et établira l'histopronostic de la tumeur, en accord avec la classification du risque histologique selon le protocole de la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique SIOP 2001 (2). Aux Etats Unis les enfants atteints d'une WT sont pris en charge au sein du Children Oncology Group (COG) et traités par chirurgie première et l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire permettra de classer la tumeur et décidera de la chimiothérapie et de la radiothérapie néo-adjuvantes.

De façon identique, et malgré les différences dans la prise en charge, aux Etats-Unis et en Europe, 10 à 15% des enfants rechutent dans les deux ans après le traitement. La stratification de plus en plus fine de ces tumeurs avec l'identification de sous-groupes aux caractéristiques cliniques et biologiques uniformes a rendu nécessaire une collaboration internationale pour surmonter le problème de la rareté de ces entités et augmenter la puissance statistique des études.

Une collaboration transcontinentale est mise en place à ce propos depuis 1992 entre les membres du COG Renal Tumor Committee (COG-RTC) et les membres du SIOP Renal Tumor Study Group (SIOP-RTSG), avec des réunions tous les deux ans, avec l'objectif de partager les idées et les données des différents projets de recherche et d'améliorer les résultats de chaque côté, améliorant ainsi la survie des patients atteints de WT.

Grâce à une collaboration internationale en constante évolution à laquelle nous avons adhéré avec notre étude, de nouveaux gènes, cibles thérapeutiques et marqueurs biologiques ont été identifiés au fil du temps dans cette tumeur.

Pour cette étude, nous avons centralisé dans notre centre le matériel biologique de toutes les WT françaises incluses dans le protocole SIOP-2001. Un bloc de paraffine représentatif de chaque tumeur ainsi que du matériel cryopréservé correspondant à la tumeur et au rein sain de chaque patient ont été récoltés, avec la constitution d'une tumorothèque, une DNA-thèque et une RNA-thèque. Une partie des projets a été réalisé au niveau local, une partie en collaboration avec l'équipe anglaise du SIOP-RTSG, pour augmenter le nombre des échantillons et la significativité statistique des études.

La première partie du travail a été de caractériser le statut histologique de WT français et anglais inclus dans le protocole SIOP-2001 (type histologique, groupe de risque histologique) en faisant particulièrement attention au blastème, la composante histologique la plus agressive de ces tumeurs. Le blastème a été caractérisé par une analyse qualitative (architecture et aspect cytologique du blastème, index mitotique, index prolifératif) et quantitative (volume et pourcentage de blastème). En collaboration avec l'équipe anglaise du UCL Institute of Child Health (Londres) nous avons, sur ces mêmes cas, déterminé le statut de LOH au niveau des chromosomes 1p et 16q et corrélié tous ces données aux données cliniques (suivi).

La deuxième partie a été réalisé sur la totalité des WT inclus dans le protocole SIOP-2001 en collaboration avec les équipes européennes du Renal Tumor Study Group ([1](#)) et a permis de caractériser les anomalies structurelles de la WT par Multiple Ligation Probe Amplification (MLPA), en particulier les régions d'intérêt 1p, 16q, 1q et les gènes TP53, IGF2, NMYC.

De plus, sur les cas français, nous nous sommes focalisés sur la région 11p15, où le gène IGF2 est localisé, en analysant les anomalies structurales et de méthylation au niveau de différents loci (IGF2-DMR0, ICR1, ICR2, H19), par MLPA et par ASMM RTQ-PCR (TaqMan allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR).

Nous avons de plus étudié l'expression d'IGF2 dans les tumeurs et les reins sains correspondants par RT-QPCR à partir de l'ARN extrait.

Une dernière partie de notre étude a porté sur la caractérisation de la réponse immune intratumorale par immunohistochimie (CD3, CD4, CD8, PD1, PDL1).

Au total, nous avons pu confirmer la validité de la stratification pronostique actuellement utilisé pour la WT, qui prend en considération le type histologique, le groupe de risque

histologique et le stade local. Nous avons confirmé sur les tumeurs pré-traités la validité pronostique de marqueurs moléculaires comme le gain de 1q, de MYCN et la perte de 1p et 16q, marqueurs qui étaient déjà connus comme étant pronostiques mais étudié que dans les tumeurs traités par chirurgie première. De plus nous avons identifié des potentiels marqueurs pronostiques supplémentaires concernant la prise en charge anatomopathologique des WT: le volume et le pourcentage de blastème, l'index mitotique et de prolifération du blastème, la perte de méthylation d'IGF2-DMR0 et le rapport CD4/CD8 évalué par immunohistochimie au sein de la tumeur.

Dans le futur, le nouveau protocole SIOP-UMBRELLA prendra en considération le volume absolu de blastème et le marqueur moléculaire 1q pour le blastème résistant comme critère de stratification et le nouveau protocole du COG prendra en considération le pattern de méthylation de la région 11p15 pour les patients en stade 1 et histologie favorable, chez qui une thérapie adjuvante ne sera pas indiquée (12).

Notre travail développé au sein d'une collaboration internationale, pourrait contribuer à la détermination d'une nouvelle classification bio-pathologique de la WT, sur laquelle sera décidé un nouveau traitement dans le futur.

REFERENCES

1. Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Pritchard-Jones K, Coppes MJ, Aitchison M, Bergeron C, et al. Management of adults with Wilms' tumor: recommendations based on international consensus. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011;11(7):1105-13.
2. Perlman E, Boccon-Gibod L. [Kidney tumors in childhood]. *Ann Pathol.* 2004;24(6):516-35.
3. Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumors: results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer.* 1978;41(5):1937-48.
4. D'Angio GJ, Evans AE, Breslow N, Beckwith B, Bishop H, Feigl P, et al. The treatment of Wilms' tumor: Results of the national Wilms' tumor study. *Cancer.* 1976;38(2):633-46.
5. Green DM, Breslow NE, Evans I, Moksness J, D'Angio GJ. Treatment of children with stage IV favorable histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Med Pediatr Oncol.* 1996;26(3):147-52.
6. Warmann SW, Nourkami N, Fruhwald M, Leuschner I, Schenk JP, Fuchs J, et al. Primary lung metastases in pediatric malignant non-Wilms renal tumors: data from SIOP 93-01/GPOH and SIOP 2001/GPOH. *Klin Padiatr.* 2012;224(3):148-52.
7. Spreafico F, Pritchard Jones K, Malogolowkin MH, Bergeron C, Hale J, de Kraker J, et al. Treatment of relapsed Wilms tumors: lessons learned. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009;9(12):1807-15.
8. Green DM, Cotton CA, Malogolowkin M, Breslow NE, Perlman E, Miser J, et al. Treatment of Wilms tumor relapsing after initial treatment with vincristine and actinomycin D: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2007;48(5):493-9.
9. Malogolowkin M, Cotton CA, Green DM, Breslow NE, Perlman E, Miser J, et al. Treatment of Wilms tumor relapsing after initial treatment with vincristine, actinomycin D, and doxorubicin. A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(2):236-41.
10. Dome JS, Cotton CA, Perlman EJ, Breslow NE, Kalapurakal JA, Ritchey ML, et al. Treatment of anaplastic histology Wilms' tumor: results from the fifth National Wilms' Tumor Study. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2352-8.
11. Reinhard H, Schmidt A, Furtwangler R, Leuschner I, Rube C, Von Schweinitz D, et al. Outcome of relapses of nephroblastoma in patients registered in the SIOP/GPOH trials and studies. *Oncol Rep.* 2008;20(2):463-7.
12. Dome JS, Perlman EJ, Graf N. Risk stratification for wilms tumor: current approach and future directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2014:215-23.
13. Beckwith JB, Kiviat NB, Bonadio JF. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor. *Pediatr Pathol.* 1990;10(1-2):1-36.
14. Perlman E, Dijoud F, Boccon-Gibod L. [Nephrogenic rests and nephroblastomatosis]. *Ann Pathol.* 2004;24(6):510-5.
15. Kreidberg JA, Sariola H, Loring JM, Maeda M, Pelletier J, Housman D, et al. WT-1 is required for early kidney development. *Cell.* 1993;74(4):679-91.

16. Scharnhorst V, van der Eb AJ, Jochemsen AG. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. *Gene*. 2001;273(2):141-61.
17. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell*. 1990;60(3):509-20.
18. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA. Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature*. 1990;343(6260):774-8.
19. Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in the murine urogenital system. *Genes Dev*. 1991;5(8):1345-56.
20. Gessler M, Konig A, Arden K, Grundy P, Orkin S, Sallan S, et al. Infrequent mutation of the WT1 gene in 77 Wilms' Tumors. *Hum Mutat*. 1994;3(3):212-22.
21. Huff V. Wilms tumor genetics. *Am J Med Genet*. 1998;79(4):260-7.
22. Varanasi R, Bardeesy N, Ghahremani M, Petruzzi MJ, Nowak N, Adam MA, et al. Fine structure analysis of the WT1 gene in sporadic Wilms tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):3554-8.
23. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, Betts D, Adams V, Niggli F, et al. Mutational activation of the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Res*. 1999;59(16):3880-2.
24. Maiti S, Alam R, Amos CI, Huff V. Frequent association of beta-catenin and WT1 mutations in Wilms tumors. *Cancer Res*. 2000;60(22):6288-92.
25. Perotti D, Gamba B, Sardella M, Spreafico F, Terenziani M, Collini P, et al. Functional inactivation of the WTX gene is not a frequent event in Wilms' tumors. *Oncogene*. 2008;27(33):4625-32.
26. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, et al. An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science*. 2007;315(5812):642-5.
27. Ruteshouser EC, Robinson SM, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(6):461-70.
28. Major MB, Camp ND, Berndt JD, Yi X, Goldenberg SJ, Hubbert C, et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science*. 2007;316(5827):1043-6.
29. Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*. 1993;362(6422):747-9.
30. Scott RH, Stiller CA, Walker L, Rahman N. Syndromes and constitutional chromosomal abnormalities associated with Wilms tumour. *J Med Genet*. 2006;43(9):705-15.
31. Bliiek J, Gicquel C, Maas S, Gaston V, Le Bouc Y, Mannens M. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *J Pediatr*. 2004;145(6):796-9.
32. Brioude F, Lacoste A, Netchine I, Vazquez MP, Auber F, Audry G, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Horm Res Paediatr*. 2013;80(6):457-65.
33. Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, et al. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature*. 1993;362(6422):749-51.

34. Ohlsson R, Nystrom A, Pfeifer-Ohlsson S, Tohonen V, Hedborg F, Schofield P, et al. IGF2 is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1993;4(1):94-7.
35. Ping AJ, Reeve AE, Law DJ, Young MR, Boehnke M, Feinberg AP. Genetic linkage of Beckwith-Wiedemann syndrome to 11p15. *Am J Hum Genet.* 1989;44(5):720-3.
36. Weksberg R, Shen DR, Fei YL, Song QL, Squire J. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1993;5(2):143-50.
37. Schneid H, Seurin D, Vazquez MP, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y. Parental allele specific methylation of the human insulin-like growth factor II gene and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 1993;30(5):353-62.
38. Chao LY, Huff V, Tomlinson G, Riccardi VM, Strong LC, Saunders GF. Genetic mosaicism in normal tissues of Wilms' tumour patients. *Nat Genet.* 1993;3(2):127-31.
39. Hu Q, Gao F, Tian W, Ruteshouser EC, Wang Y, Lazar A, et al. Wt1 ablation and Igf2 upregulation in mice result in Wilms tumors with elevated ERK1/2 phosphorylation. *J Clin Invest.* 2011;121(1):174-83.
40. Maschietto M, Charlton J, Perotti D, Radice P, Geller JI, Pritchard-Jones K, et al. The IGF signalling pathway in Wilms tumours--a report from the ENCCA Renal Tumours Biology-driven drug development workshop. *Oncotarget.* 2014;5(18):8014-26.
41. Maw MA, Grundy PE, Millow LJ, Eccles MR, Dunn RS, Smith PJ, et al. A third Wilms' tumor locus on chromosome 16q. *Cancer Res.* 1992;52(11):3094-8.
42. Grundy PE, Telzerow PE, Breslow N, Moksness J, Huff V, Paterson MC. Loss of heterozygosity for chromosomes 16q and 1p in Wilms' tumors predicts an adverse outcome. *Cancer Res.* 1994;54(9):2331-3.
43. Grundy RG, Pritchard J, Scambler P, Cowell JK. Loss of heterozygosity on chromosome 16 in sporadic Wilms' tumour. *Br J Cancer.* 1998;78(9):1181-7.
44. Klamt B, Schulze M, Thate C, Mares J, Goetz P, Kodet R, et al. Allele loss in Wilms tumors of chromosome arms 11q, 16q, and 22q correlate with clinicopathological parameters. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;22(4):287-94.
45. Grundy PE, Breslow NE, Li S, Perlman E, Beckwith JB, Ritchey ML, et al. Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol.* 2005;23(29):7312-21.
46. Ha TC, Spreafico F, Graf N, Dallorso S, Dome JS, Malogolowkin M, et al. An international strategy to determine the role of high dose therapy in recurrent Wilms' tumour. *Eur J Cancer.* 2013;49(1):194-210.
47. Messahel B, Williams R, Ridolfi A, A'Hern R, Warren W, Tinworth L, et al. Allele loss at 16q defines poorer prognosis Wilms tumour irrespective of treatment approach in the UKW1-3 clinical trials: a Children's Cancer and Leukaemia Group (CCLG) Study. *Eur J Cancer.* 2009;45(5):819-26.
48. Spreafico F, Gamba B, Mariani L, Collini P, D'Angelo P, Pession A, et al. Loss of heterozygosity analysis at different chromosome regions in Wilms tumor confirms 1p allelic loss as a marker of worse prognosis: a study from the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology. *J Urol.* 2013;189(1):260-6.
49. Wittmann S, Zirn B, Alkassar M, Ambros P, Graf N, Gessler M. Loss of 11q and 16q in Wilms tumors is associated with anaplasia, tumor recurrence, and poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(2):163-70.

50. Bown N, Cotterill SJ, Roberts P, Griffiths M, Larkins S, Hibbert S, et al. Cytogenetic abnormalities and clinical outcome in Wilms tumor: a study by the U.K. cancer cytogenetics group and the U.K. Children's Cancer Study Group. *Med Pediatr Oncol.* 2002;38(1):11-21.
51. Hing S, Lu YJ, Summersgill B, King-Underwood L, Nicholson J, Grundy P, et al. Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(2):393-8.
52. Lu YJ, Hing S, Williams R, Pinkerton R, Shipley J, Pritchard-Jones K, et al. Chromosome 1q expression profiling and relapse in Wilms' tumour. *Lancet.* 2002;360(9330):385-6.
53. Natrajan R, Williams RD, Hing SN, Mackay A, Reis-Filho JS, Fenwick K, et al. Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol.* 2006;210(1):49-58.
54. Gratijs EJ, Jennings LJ, Anderson JR, Dome JS, Grundy P, Perlman EJ. Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer.* 2013;119(21):3887-94.
55. Rakheja D, Chen KS, Liu Y, Shukla AA, Schmid V, Chang TC, et al. Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun.* 2014;2:4802.
56. Torrezan GT, da Silva FC, Santos EM, Krepischi AC, Achatz MI, Aguiar S, Jr., et al. Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype-phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. *Orphanet J Rare Dis.* 2013;8:54.
57. Scalabre A, Bergeron C, Brioude F, Dainese L, Cropet C, Coulomb L'hermine A, et al. Is Nephron Sparing Surgery Justified in Wilms Tumor With Beckwith-Wiedemann Syndrome or Isolated Hemihypertrophy? *Pediatr Blood Cancer.* 2016.
58. Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, Georg C, Gu Z, Bieg M, et al. Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie high-risk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell.* 2015;27(2):298-311.
59. Maschietto M, Williams RD, Chagtai T, Popov SD, Sebire NJ, Vujanic G, et al. TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One.* 2014;9(10):e109924.
60. Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, Nowak N, Zabel B, Adam M, et al. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet.* 1994;7(1):91-7.
61. Faria P, Beckwith JB, Mishra K, Zuppan C, Weeks DA, Breslow N, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor--new definitions with prognostic significance: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol.* 1996;20(8):909-20.
62. Hill DA, Shear TD, Liu T, Billups CA, Singh PK, Dome JS. Clinical and biologic significance of nuclear unrest in Wilms tumor. *Cancer.* 2003;97(9):2318-26.
63. Best LG, Hoekstra RE. Wiedemann-Beckwith syndrome: autosomal-dominant inheritance in a family. *Am J Med Genet.* 1981;9(4):291-9.
64. Kosseff AL, Herrmann J, Opitz JM. The Wiedemann-Beckwith syndrome: genetic considerations and a diagnostic sign. *Lancet.* 1972;1(7755):844.
65. Niikawa N, Ishikiriya S, Takahashi S, Inagawa A, Tonoki H, Ohta Y, et al. The Wiedemann-Beckwith syndrome: pedigree studies on five families with evidence for autosomal dominant inheritance with variable expressivity. *Am J Med Genet.* 1986;24(1):41-55.
66. Gardinier MV, Macklin WB, Diniak AJ, Deininger PL. Characterization of myelin proteolipid mRNAs in normal and jimpy mice. *Mol Cell Biol.* 1986;6(11):3755-62.

67. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2010;154C(3):343-54.
68. Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet.* 1997;15(2):181-5.
69. Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, et al. A maternally methylated CpG island in KVLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(14):8064-9.
70. Lapunzina P, Monk D. The consequences of uniparental disomy and copy number neutral loss-of-heterozygosity during human development and cancer. *Biol Cell.* 2011;103(7):303-17.
71. Azzi S, Steunou V, Rousseau A, Rossignol S, Thibaud N, Danton F, et al. Allele-specific methylated multiplex real-time quantitative PCR (ASMM RTQ-PCR), a powerful method for diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes. *Hum Mutat.* 2011;32(2):249-58.
72. Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y, Kaneko Y, Inoue M, Komoto Y, et al. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 1996;14(2):171-3.
73. Brioude F, Netchine I, Praz F, Le Jule M, Calmel C, Lacombe D, et al. Mutations of the Imprinted CDKN1C Gene as a Cause of the Overgrowth Beckwith-Wiedemann Syndrome: Clinical Spectrum and Functional Characterization. *Hum Mutat.* 2015;36(9):894-902.
74. Lee KH, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) ameliorates and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) exacerbates the effects of undernutrition on brain growth during early postnatal life: studies in IGF-I and IGFBP-1 transgenic mice. *Pediatr Res.* 1999;45(3):331-6.
75. Borer JG, Kaefer M, Barnewolt CE, Elias ER, Hobbs N, Retik AB, et al. Renal findings on radiological followup of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Urol.* 1999;161(1):235-9.
76. Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet.* 1994;46(2):168-74.
77. Wiedemann HR, Burgio GR, Aldenhoff P, Kunze J, Kaufmann HJ, Schirg E. The proteus syndrome. Partial gigantism of the hands and/or feet, nevi, hemihypertrophy, subcutaneous tumors, macrocephaly or other skull anomalies and possible accelerated growth and visceral affections. *Eur J Pediatr.* 1983;140(1):5-12.
78. Sotelo-Avila C, Gonzalez-Crussi F, Fowler JW. Complete and incomplete forms of Beckwith-Wiedemann syndrome: their oncogenic potential. *J Pediatr.* 1980;96(1):47-50.
79. Vaughan WG, Sanders DW, Grosfeld JL, Plumley DA, Rescorla FJ, Scherer LR, 3rd, et al. Favorable outcome in children with Beckwith-Wiedemann syndrome and intraabdominal malignant tumors. *J Pediatr Surg.* 1995;30(7):1042-4; discussion 4-5.
80. DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr.* 1998;132(3 Pt 1):398-400.
81. Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, Green DM. Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol.* 1993;21(3):172-81.
82. Blik J, Maas SM, Ruijter JM, Hennekam RC, Alders M, Westerveld A, et al. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation:

occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet.* 2001;10(5):467-76.

83. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet.* 2002;70(3):604-11.

84. Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, et al. Analysis of the methylation status of the KCNQ1OT and H19 genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2001;9(6):409-18.

85. Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet.* 2001;10(26):2989-3000.

86. Porteus MH, Narkool P, Neuberg D, Guthrie K, Breslow N, Green DM, et al. Characteristics and outcome of children with Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol.* 2000;18(10):2026-31.

87. Coppes MJ, Clericuzio CL. "Molecular genetic analysis of the WT1 gene in patients suspected to have the Denys-Drash syndrome". *Med Pediatr Oncol.* 1994;23(4):390.

88. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science.* 1975;187(4173):226-32.

89. Fujita K, Shimazaki N, Ohta Y, Kubota T, Ibe S, Toji S, et al. Terminal deoxynucleotidyltransferase forms a ternary complex with a novel chromatin remodeling protein with 82 kDa and core histone. *Genes Cells.* 2003;8(6):559-71.

90. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(5):808-11.

91. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2002;3(9):662-73.

92. Kung JT, Colognori D, Lee JT. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics.* 2013;193(3):651-69.

93. Paralkar VR, Weiss MJ. Long noncoding RNAs in biology and hematopoiesis. *Blood.* 2013;121(24):4842-6.

94. Maass PG, Rump A, Schulz H, Stricker S, Schulze L, Platzer K, et al. A misplaced lncRNA causes brachydactyly in humans. *J Clin Invest.* 2012;122(11):3990-4002.

95. Neguembor MV, Jothi M, Gabellini D. Long noncoding RNAs, emerging players in muscle differentiation and disease. *Skelet Muscle.* 2014;4(1):8.

96. Keniry A, Oxley D, Monnier P, Kyba M, Dandolo L, Smits G, et al. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol.* 2012;14(7):659-65.

97. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell.* 1984;37(1):179-83.

98. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):253-62.

99. Weidman JR, Dolinoy DC, Murphy SK, Jirtle RL. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. *Cancer J.* 2007;13(1):9-16.

100. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet.* 2012;28(1):33-42.

101. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev.* 2002;117(1-2):15-23.
102. Szabo PE, Hubner K, Scholer H, Mann JR. Allele-specific expression of imprinted genes in mouse migratory primordial germ cells. *Mech Dev.* 2002;115(1-2):157-60.
103. Tada T, Tada M, Hilton K, Barton SC, Sado T, Takagi N, et al. Epigenotype switching of imprintable loci in embryonic germ cells. *Dev Genes Evol.* 1998;207(8):551-61.
104. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature.* 2008;452(7189):877-81.
105. Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol.* 2005;278(2):440-58.
106. Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development.* 2007;134(14):2627-38.
107. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet.* 1998;20(2):116-7.
108. Zhenwei J, Shuxin G, Yongchun Z, Xianhua Z. Mechanisms of TET protein-mediated DNA demethylation and its role in the regulation of mouse development. *Yi Chuan.* 2015;37(1):34-40.
109. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet.* 2005;14 Spec No 1:R47-58.
110. Swales AK, Spears N. Genomic imprinting and reproduction. *Reproduction.* 2005;130(4):389-99.
111. Lucifero D, Mertineit C, Clarke HJ, Bestor TH, Trasler JM. Methylation dynamics of imprinted genes in mouse germ cells. *Genomics.* 2002;79(4):530-8.
112. Davis E, Caiment F, Tordoir X, Cavaille J, Ferguson-Smith A, Cockett N, et al. RNAi-mediated allelic trans-interaction at the imprinted Rtl1/Peg11 locus. *Curr Biol.* 2005;15(8):743-9.
113. Davis TL, Trasler JM, Moss SB, Yang GJ, Bartolomei MS. Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics.* 1999;58(1):18-28.
114. Li JY, Lees-Murdock DJ, Xu GL, Walsh CP. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. *Genomics.* 2004;84(6):952-60.
115. Geuns E, De Rycke M, Van Steirteghem A, Liebaers I. Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos. *Hum Mol Genet.* 2003;12(22):2873-9.
116. Geuns E, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet.* 2007;44(2):144-7.
117. Khoueiry R, Ibala-Rhomdane S, Mery L, Blachere T, Guerin JF, Lornage J, et al. Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes. *J Med Genet.* 2008;45(9):583-8.
118. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, et al. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet.* 2000;9(14):2183-7.

119. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet.* 2007;15(3):352-61.
120. Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5285-9.
121. Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet.* 2004;13(8):839-49.
122. Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS. The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet.* 2000;9(19):2885-94.
123. Weaver JR, Bartolomei MS. Chromatin regulators of genomic imprinting. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(3):169-77.
124. Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, et al. A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell.* 2008;15(4):547-57.
125. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nat Genet.* 2008;40(8):949-51.
126. Nonchev S, Tsanev R. Protamine-histone replacement and DNA replication in the male mouse pronucleus. *Mol Reprod Dev.* 1990;25(1):72-6.
127. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.* 2000;403(6769):501-2.
128. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol.* 2002;241(1):172-82.
129. Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997;17(3):275-6.
130. Rougier N, Bourc'his D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, et al. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* 1998;12(14):2108-13.
131. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, et al. Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol.* 2000;10(8):475-8.
132. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E, et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(24):13734-8.
133. Beaujean N, Taylor JE, McGarry M, Gardner JO, Wilmut I, Loi P, et al. The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(20):7636-40.
134. Monk M, Boubelik M, Lehnert S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development.* 1987;99(3):371-82.
135. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9(16):2395-402.
136. Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, et al. Identification of *PGC7*, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev.* 2002;113(1):91-4.
137. Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, et al. *PGC7/Stella* protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* 2007;9(1):64-71.

138. Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, et al. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature*. 2012;486(7403):415-9.
139. Messerschmidt DM, de Vries W, Ito M, Solter D, Ferguson-Smith A, Knowles BB. Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. *Science*. 2012;335(6075):1499-502.
140. Hanna CW, Kelsey G. The specification of imprints in mammals. *Heredity (Edinb)*. 2014;113(2):176-83.
141. Peric-Hupkes D, van Steensel B. Role of the nuclear lamina in genome organization and gene expression. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*.75:517-24.
142. Engel N, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted H19/Igf2 locus. *Hum Mol Genet*. 2006;15(19):2945-54.
143. Rand E, Ben-Porath I, Keshet I, Cedar H. CTCF elements direct allele-specific undermethylation at the imprinted H19 locus. *Curr Biol*. 2004;14(11):1007-12.
144. Schoenherr CJ, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF maintains differential methylation at the Igf2/H19 locus. *Nat Genet*. 2003;33(1):66-9.
145. Demars J, Shmela ME, Rossignol S, Okabe J, Netchine I, Azzi S, et al. Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet*. 2010;19(5):803-14.
146. Poole RL, Leith DJ, Docherty LE, Shmela ME, Gicquel C, Splitt M, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome caused by maternally inherited mutation of an OCT-binding motif in the IGF2/H19-imprinting control region, ICR1. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(2):240-3.
147. Berland S, Appelback M, Bruland O, Beygo J, Buiting K, Mackay DJ, et al. Evidence for anticipation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2013;21(12):1344-8.
148. Abi Habib W, Azzi S, Brioude F, Steunou V, Thibaud N, Das Neves C, et al. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*. 2014;23(21):5763-73.
149. Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM. An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev*. 1995;9(17):2079-89.
150. Demars J, Rossignol S, Netchine I, Lee KS, Shmela M, Faivre L, et al. New insights into the pathogenesis of Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Hum Mutat*. 2011;32(10):1171-82.
151. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*. 2000;405(6785):486-9.
152. Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, et al. The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet*. 2013;22(3):544-57.
153. Murrell A, Heeson S, Reik W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet*. 2004;36(8):889-93.

154. Nativio R, Wendt KS, Ito Y, Huddleston JE, Uribe-Lewis S, Woodfine K, et al. Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted IGF2-H19 locus. *PLoS Genet.* 2009;5(11):e1000739.
155. Lee MP, DeBaun M, Randhawa G, Reichard BA, Elledge SJ, Feinberg AP. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet.* 1997;61(2):304-9.
156. Du M, Zhou W, Beatty LG, Weksberg R, Sadowski PD. The KCNQ10T1 promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5. *Genomics.* 2004;84(2):288-300.
157. Horike S, Mitsuya K, Meguro M, Kotobuki N, Kashiwagi A, Notsu T, et al. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(14):2075-83.
158. Pandey RR, Ceribelli M, Singh PB, Ericsson J, Mantovani R, Kanduri C. NF-Y regulates the antisense promoter, bidirectional silencing, and differential epigenetic marks of the Kcnq1 imprinting control region. *J Biol Chem.* 2004;279(50):52685-93.
159. Grandjean V, Smith J, Schofield PN, Ferguson-Smith AC. Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(10):5279-84.
160. Pritchard-Jones K, Pieters R, Reaman GH, Hjorth L, Downie P, Calaminus G, et al. Sustaining innovation and improvement in the treatment of childhood cancer: lessons from high-income countries. *Lancet Oncol.* 2013;14(3):e95-e103.
161. Grundy P, Perlman E, Rosen NS, Warwick AB, Glade Bender J, Ehrlich P, et al. Current issues in Wilms tumor management. *Curr Probl Cancer.* 2005;29(5):221-60.
162. Grundy P, Telzerow P, Moksness J, Breslow NE. Clinicopathologic correlates of loss of heterozygosity in Wilm's tumor: a preliminary analysis. *Med Pediatr Oncol.* 1996;27(5):429-33.
163. Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J, et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol.* 2002;38(2):79-82.
164. Gadd S, Huff V, Huang CC, Ruteshouser EC, Dome JS, Grundy PE, et al. Clinically relevant subsets identified by gene expression patterns support a revised ontogenic model of Wilms tumor: a Children's Oncology Group Study. *Neoplasia.* 2012;14(8):742-56.
165. Tomlinson EJ, Ferguson SJ. Loss of either of the two heme-binding cysteines from a class I c-type cytochrome has a surprisingly small effect on physicochemical properties. *J Biol Chem.* 2000;275(42):32530-4.
166. Beckwith JB, Zuppan CE, Browning NG, Moksness J, Breslow NE. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol.* 1996;27(5):422-8.
167. Wittmann S, Wunder C, Zirn B, Furtwangler R, Wegert J, Graf N, et al. New prognostic markers revealed by evaluation of genes correlated with clinical parameters in Wilms tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(5):386-95.
168. Perotti D, Spreafico F, Torri F, Gamba B, D'Adamo P, Pizzamiglio S, et al. Genomic profiling by whole-genome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(7):644-53.
169. Pritchard-Jones K, Williams R, Segers H, van den Heuvel-Eibrink M, Pieters R, van Tinteren H, et al. Response to the letter to the editor: 1q gain is a frequent finding in preoperatively treated Wilms tumors, but of limited prognostic value for risk satisfaction in

- the SIOP2009/Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hamatologie (GPOH) trial. *Genes Chromosomes Cancer*. 2015;54(6):397-9.
170. Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Williams RD, van Tinteren H, Vujanic G, Pieters R, et al. Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(11):1065-74.
171. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
172. Gicquel C, Le Bouc Y. Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res*. 1997;47(4-6):269-72.
173. Nakagawa H, Chadwick RB, Peltomaki P, Plass C, Nakamura Y, de La Chapelle A. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene occurs by biallelic methylation in a core region of H19-associated CTCF-binding sites in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(2):591-6.
174. Ohlsson R, Cui H, He L, Pfeifer S, Malmikumpu H, Jiang S, et al. Mosaic allelic insulin-like growth factor 2 expression patterns reveal a link between Wilms' tumorigenesis and epigenetic heterogeneity. *Cancer Res*. 1999;59(16):3889-92.
175. Ulaner GA, Vu TH, Li T, Hu JF, Yao XM, Yang Y, et al. Loss of imprinting of IGF2 and H19 in osteosarcoma is accompanied by reciprocal methylation changes of a CTCF-binding site. *Hum Mol Genet*. 2003;12(5):535-49.
176. Zhan S, Shapiro DN, Helman LJ. Loss of imprinting of IGF2 in Ewing's sarcoma. *Oncogene*. 1995;11(12):2503-7.
177. Hubertus J, Lacher M, Rottenkolber M, Müller-Höcker J, Berger M, Stehr M, et al. Altered expression of imprinted genes in Wilms tumors. *Oncol Rep*. 2011;25(3):817-23.
178. Ravenel JD, Broman KW, Perlman EJ, Niemitz EL, Jayawardena TM, Bell DW, et al. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II (IGF2) gene in distinguishing specific biologic subtypes of Wilms tumor. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(22):1698-703.
179. Watanabe N, Nakadate H, Haruta M, Sugawara W, Sasaki F, Tsunematsu Y, et al. Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45(6):592-601.
180. Brown KW, Power F, Moore B, Charles AK, Malik KT. Frequency and timing of loss of imprinting at 11p13 and 11p15 in Wilms' tumor development. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1114-23.
181. Perlman EJ, Grundy PE, Anderson JR, Jennings LJ, Green DM, Dome JS, et al. WT1 mutation and 11P15 loss of heterozygosity predict relapse in very low-risk wilms tumors treated with surgery alone: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2011;29(6):698-703.
182. Ito Y, Koessler T, Ibrahim AE, Rai S, Vowler SL, Abu-Amero S, et al. Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet*. 2008;17(17):2633-43.
183. Byun HM, Wong HL, Birnstein EA, Wolff EM, Liang G, Yang AS. Examination of IGF2 and H19 loss of imprinting in bladder cancer. *Cancer Res*. 2007;67(22):10753-8.
184. Murphy SK, Huang Z, Wen Y, Spillman MA, Whitaker RS, Simel LR, et al. Frequent IGF2/H19 domain epigenetic alterations and elevated IGF2 expression in epithelial ovarian cancer. *Mol Cancer Res*. 2006;4(4):283-92.

185. Sullivan MJ, Taniguchi T, Jhee A, Kerr N, Reeve AE. Relaxation of IGF2 imprinting in Wilms tumours associated with specific changes in IGF2 methylation. *Oncogene*. 1999;18(52):7527-34.
186. Baba Y, Noshio K, Shima K, Huttenhower C, Tanaka N, Hazra A, et al. Hypomethylation of the IGF2 DMR in colorectal tumors, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. *Gastroenterology*. 2010;139(6):1855-64.
187. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, et al. IGF2 DMR0 methylation, loss of imprinting, and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2014;21(4):1166-74.
188. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1536-43.
189. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(3):203-13.
190. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
191. Krpina K, Babarovic E, Jonjic N. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes with bladder cancer recurrence in patients with solitary low-grade urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 2015;467(4):443-8.
192. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949-55.
193. Muris JJ, Meijer CJ, Cillessen SA, Vos W, Kummer JA, Bladergroen BA, et al. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2004;18(3):589-96.
194. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71.
195. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T, Pyrhonen S. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother*. 1997;20(6):488-95.
196. Igarashi T, Murakami S, Takahashi H, Matsuzaki O, Shimazaki J. Changes on distribution of CD4+/CD45RA- and CD8+/CD11- cells in tumor-infiltrating lymphocytes of renal cell carcinoma associated with tumor progression. *Eur Urol*. 1992;22(4):323-8.
197. Yoshino I, Yano T, Murata M, Miyamoto M, Ishida T, Sugimachi K, et al. Phenotypes of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer tissues and its variation with histological types of cancer. *Lung Cancer*. 1993;10(1-2):13-9.
198. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(6):607-12.
199. Kraggerud SM, Szymanska J, Abeler VM, Kaern J, Eknaes M, Heim S, et al. DNA copy number changes in malignant ovarian germ cell tumors. *Cancer Res*. 2000;60(11):3025-30.
200. Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res*. 2000;60(6):1475-82.
201. Dome JS, Fernandez CV, Mullen EA, Kalapurakal JA, Geller JI, Huff V, et al. Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: renal tumors. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(6):994-1000.

202. Vujanic GM, Sandstedt B. The pathology of Wilms' tumour (nephroblastoma): the International Society of Paediatric Oncology approach. *J Clin Pathol.* 2010;63(2):102-9.
203. Dome JS, Graf N, Geller JI, Fernandez CV, Mullen EA, Spreafico F, et al. Advances in Wilms Tumor Treatment and Biology: Progress Through International Collaboration. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2999-3007.

ANNEXE 1 : ARTICLES EN RELATION AU TRAVAIL DE THESE

1. Chagtai T, Zill C*, **Dainese Linda***, Wegert J, Savola S, Popov S, Mifsud W, Vujanic G, Sebire N, Le-Bouc Y, Ambros PF, Kager L, O'Sullivan M, Blaise A, Bergeron C, Holmquist Mengelbier L, Gisselsson D, Kool M, Tytgat GAM, van den Heuvel-Eibrink M, Graf N, van Tinteren H, Coulomb A, Gessler M, Williams R, Pritchard-Jones K for International Society of Paediatric Oncology Renal Tumours Study Group (SIOP-RTSG). *These authors contribute equally. Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumours treated with pre-operative chemotherapy in the SIOP WT 2001 trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study. J Clin Oncol. IF 17.96
2. Scalabre A, Brioude F, Bergeron C, **Dainese Linda**, Le Bouc Yves, Audry G, Coulomb A, Irtan S. Is Nephron Sparing Surgery justified in Wilms tumor with Beckwith-Wiedemann syndrome or Isolated Hemihypertrophy? Pediatr Blood and Cancer. IF: 2.8
3. **Dainese Linda**, Brioude F, Chagtai M, Badibanga G, Dijoud F, Vershuur A, Audry G, Bergeron C, Schleiermacher G, Williams R, Le Bouc Y, Blaise A, Pritchard-Jones K, L'herminé-Coulomb A and the French Paediatric Renal Tumors Pathology Group. 1p and 16q allelic loss and morphological and characterization of blastema in Wilms tumors in SFCE/SIOP 2001 Nephroblastoma trial – Are they prognostic factors? En cours de soumission. Histopathology. IF:3.45
4. **Dainese Linda**, Blaise A, Brioude F, Dijoud F, Ribault B, Boccon-Gibod L, Audry G, Tabone MD, Bergeron C, Vershuur A, Cropet C, Chantot Bastaraud S, L'herminé-Coulomb A, Le Bouc Y. Structural and methylation analysis in 11p15 region in a large cohort of Wilms tumors: correlation with pathological data and clinical outcome. En preparation. J of Pediatrics. IF 3.79

5. **Dainese Linda***, Malouf G*, Blaise A, Mowauad R, Bergeron C, Classe M, Verchuur A, Le Bouc Yves, Coulomb A. Immunohistochemical characterisation of the immune response including PD1 and PDL1 in pre-treated Wilms tumors and correlation with pathological and clinical data. En cours de soumission. Modern Pathology. IF 6.187

6. Malouf G*, **Dainese Linda***, Su X, Verschuur A, Bergeron C, Mouawad R, Allanick F, Bensalma S, Blaise A, Irtan S, Le Bouc Y, Khayat D and Coulomb A. Genomic Landscape of Post-chemotherapy Anaplastic Wilms Tumors. En preparation. Pediatrics blood and cancer. IF: 2.8

ANNEXE 2 : COMMUNICATIONS ORALES ET AFFICHEES EN RELATION AU TRAVAIL DE THESE

1. **Dainese Linda**, Frédéric Brioude, Arnauld Vershuur, Christophe Bergeron, Yves Le Bouc, Liliane Boccon-Gibod, Kathy Pritchard-Jones, Aurore L'herminé-Coulomb. **1p and 16q allelic loss in Wilms tumours in the SFCE/SIOP 2001 Nephroblastoma trial – Are they correlated with pathology?** 8 Mai 2013, 8th International Conference on Pediatric Renal Tumor Biology *Presented by The Pablove Foundation and Children's National Medical Center, Bethesda, U.S.A* (communication affichée)
2. **Dainese Linda**, Brioude F, Vershuur A, Bergeron C., Le Bouc Y., Boccon-Gibod L., Pritchard-Jones K., L'herminé-Coulomb A. **Corrélation entre la perte allélique des chromosomes 1p et 16q et les données anatomo-pathologiques dans les tumeurs de Wilms (Néphroblastomes), dans le cadre de l'étude SFCE/SIOP 2001.** Carrefour de Pathologie, CNIT-La Défense, Paris. 18-22 Novembre 2013 (communication orale)
3. Tasnim Chagtai, Christina Zill*, **Linda Dainese***, Wegert J, Williams R, Maschietto M, Vujanic G, Sebire N, Leuschner I, Ambros P, O'Sullivan M, Bergeron C, Gisselson D, Van den Heuvel-Eibrink M, Graf N, Van Tinteren H, Coulomb A, Gessler M, Pritchard-Jones K. **Copy number analysis of 1q gain in Wilms tumour by multiplex ligation-dependent probe amplification.** 8 Mai 2013, 8th International Conference on Pediatric Renal Tumor Biology *Presented by The Pablove Foundation and Children's National Medical Center, Bethesda, U.S.A* (communication affichée)
4. Chagtai T, Zill C, **Dainese Linda**, Wegert J, Williams R, Maschietto M, Vujanic G, Sebire N, Leuschner I, Ambros P, O'Sullivan M, Bergeron C, Gisselson D, Van den Heuvel-Eibrink M, Graf N, Van Tinteren H, Coulomb A, Gessler M, Pritchard-Jones K. **Gain of 1q and other molecular biomarkers in the context of histological risk group assessed after pre-operative chemotherapy in Wilms tumours treated in the SIOP**

WT 2001 trial: A SIOP Renal Tumours Study Group (SIOP-RTSG) Biology consortium study. 22-25 Octobre 2014, Toronto, (communication affichée)

5. Baranne ML, **Dainese Linda**, Annick Blaise, Bettina Ribaud, Boudjemaa S, Coulomb A. **Epithelial Wilms in SFCE/SIOP2001 study: clinical, pathological and molecular analysis.** 26th European Congress of Pathology, 30 Aout- 3 Septembre 2014, London (communication affichée)
6. **Dainese Linda**, Annick Blaise, Bettina Ribault, Frederic Brioude, Christophe Bergeron, Arnould Vershuur, Yves Le-Bouc, Aurore Coulomb. **Facteurs pronostiques dans les Tumeurs de Wilms : confrontation pathologique et moléculaire.** 10^{ème} séminaire du centre de recherche de Saint Antoine, 16 et 17 octobre 2014 – Fontainebleau-Ury (communication affichée)
7. **Dainese Linda**, Blaise A, Brioude F, Ribault B, Vershuur A, Irtan S, Bergeron C, L'Hérminé Coulomb, Le Bouc Y. **Wilms tumors: clinical, histological and 11p15 molecular status.** European Imprinting Disorder School IDSchool 2015, 4-6 Mai 2015, Guermantes, France (communication orale)
8. Malouf G*, **Dainese Linda***, Su X, Vershuur A, Bergeron C, Mouawad R, Blaise A, Irtan S, Le Bouc Y, Khayat D, Coulomb A. **The Genomic Landscape of Anaplastic Wilms Tumors with Diffuse versus Focal Anaplasia.** ASCO, Mai 29 2015, Chicago, USA (communication orale)
9. **Dainese Linda***, Malouf G*, Su X, Vershuur A, Bergeron C, Mouawad R, Blaise A, Irtan S, Le Bouc Y, Khayat D, Coulomb A. **The Genomic Landscape of Anaplastic Wilms Tumors with Diffuse versus Focal Anaplasia.** SIOP, Octobre 2015, Capetown, South Africa (communication orale)
10. **Dainese Linda**, Blaise A, Brioude F, Ribault B, Vershuur A, Irtan S, Bergeron C, L'Hérminé Coulomb, Le Bouc Y. **Expression d'IGF2 dans les tumeurs de Wilms.**

11ème Séminaire du CdR St Antoine, Novembre 2015, Ury-Fontainbleau
(communication affichée)

11. **Dainese Linda**, Annick Blaise, Frederic Brioude, Frédérique Dijoud, Bettina Ribault, Liliane Boccon-Gibod, Georges Audry, Marie Dominique Tabone, Christophe Bergeron, Arnauld Vershuur, Sabah Boudjemaa, Claire Cropet, Sandra Chantot Bastaraud, Aurore L'herminé-Coulomb, Yves Le Bouc. **Structural and molecular characterization of 11p15 region in a cohort of SIOP Wilms Tumors**. Society for Pediatric Pathology Spring Meeting, March 11-13, 2016. Seattle, Washington (communication orale)

12. **Dainese Linda***, Gabriel Malouf*, Annick Blaise, Roger Mowauad, Arnauld Vershuur, Sabine Irtan, Marion Classe, Samia Hachemane, Christophe Bergeron, Yves Le Bouc , Aurore L'herminé-Coulomb. **Immunohistochemical characterisation of the immune response including PD1 and PDL1 in pre-treated Wilms tumors and correlation with pathological and clinical data**. Pediatric Renal Tumor Biology Group. Toronto. Canada, Avril 2016 (communication orale)

13. **Dainese Linda**, Annick Blaise, Frederic Brioude, Frédérique Dijoud, Bettina Ribault, Liliane Boccon-Gibod, Georges Audry, Marie Dominique Tabone, Christophe Bergeron, Arnauld Vershuur, Sabah Boudjemaa, Claire Cropet, Sandra Chantot Bastaraud, Aurore L'herminé-Coulomb, Yves Le Bouc. **Structural and methylation analysis in 11p15 region in a large cohort of Wilms tumors: correlation with pathological data and clinical outcome**. Pediatric Renal Tumor Biology Group. Toronto. Canada, Avril 2016 (communication affichée)

14. T Chagtaj, C Zill*, **Dainese Linda***, J Wegert, S Savola, S Popov, W mifsud, G Vujanic, N Sebire, Y Le Bouc, PF Ambros, L Kager, MJ O'Sullivan, A Blaise, C Bergeron, L Holmquist Mengelbier, D Gisselsson, M Kool, GAM Tygat, MM van den Heuvel-Eirink, N Graf, H van Tinteren, A coulomb, M Gessler, RD Williams and K Pritchard-Jones.
*These authors contribute equally. Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms

tumours treated with pre-operative chemotherapy in the SIOP WT 2001 trial. Pediatric Renal Tumor Biology Group. Toronto. Canada, Avril 2016 (communication orale)

15. **Dainese Linda**, Annick Blaise, Frederic Brioude, Frédérique Dijoud, Bettina Ribault, Liliane Boccon-Gibod, Georges Audry, Marie Dominique Tabone, Christophe Bergeron, Arnauld Vershuur, Sabah Boudjemaa, Claire Cropet, Sandra Chantot Bastaraud, Aurore L'herminé-Coulomb, Yves Le Bouc. **Structural and methylation analysis in 11p15 region in a large cohort of Wilms tumors: correlation with pathological data and clinical outcome.** 3ème European Imprinting Disorder School IDSchool, Behoust (Paris, France), 3-5 Mai, 2016 (communication orale)

ANNEXE 3 : Article projet 2.

Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumours treated with preoperative chemotherapy in the SIOP WT 2001 trial: A SIOP Renal Tumours Biology Consortium Study.

Running head: Gain of 1q as a prognostic biomarker in Wilms tumours

T Chagtai¹, C Zill^{2*}, L Dainese^{3,4*}, J Wegert², S Savola⁵, S Popov⁶, W Mifsud¹, G Vujanic⁷, N Sebire¹, Y Le Bouc^{3,8}, PF Ambros⁹, L Kager^{9,10}, MJ O'Sullivan¹¹, A Blaise³, C Bergeron¹², L Holmquist Mengelbier¹³, D Gisselsson¹³, M Kool¹⁴, GAM Tytgat¹⁵, MM van den Heuvel-Eibrink¹⁵, N Graf¹⁶, H van Tinteren¹⁷, A Coulomb^{3,4}, M Gessler^{2,18}, RD Williams¹ and K Pritchard-Jones^{1**}, for the International Society of Paediatric Oncology Renal Tumours Study Group (SIOP-RTSG).

*Equal second author contributions

**Correspondence to:

Prof. Kathy Pritchard-Jones

Tel. +44 20 7905 2349/2238

email: k.pritchard-jones@ucl.ac.uk

1UCL Institute of Child Health, 30 Guilford Street, London WC1N 1EH, UK

2Theodor-Boveri-Institute/Biocenter, Developmental Biochemistry, Wuerzburg University, 97074 Wuerzburg, Germany

3Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France

4APHP-Hôpital Armand Trousseau, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques; UF Tumorotheque HUEP, Paris, France

5MRC-Holland, Willem Schoutenstraat 1, 1057 DL Amsterdam, the Netherlands

6Department of Cellular Pathology, University Hospital of Wales, Cardiff, UK

7Cardiff University School of Medicine, Institute of Cancer and Genetics, Heath Park,
Cardiff, UK

8APHP-Hôpital Armand Trousseau, Service d'Endocrinologie clinique et
moléculaire, F-75012, Paris, France

9Children's Cancer Research Institute, St. Anna Kinderkrebsforschung,
Zimmermannplatz 10, 1090 Vienna, Austria

10St. Anna Children's Hospital, Department of Pediatrics, Medical University Vienna,
Austria

11National Children's Research Centre, Our Lady's Children's Hospital, Crumlin,
Dublin 12, Ireland and University of Dublin, Trinity College, Dublin, Ireland

12Paediatric Oncology Department, Centre Léon Bérard, IHOP, Lyon, France

13Department of Clinical Genetics, Lund University, BMC C13, SE22184 Lund,
Sweden

14Division of Pediatric Neurooncology, German Cancer Research Center, 69120
Heidelberg, Germany

15Princess Maxima Center for Pediatric Oncology/Hematology, Lundlaan 6, 3584 EA
Utrecht, Netherlands

16Department of Paediatric Oncology and Haematology, Saarland University
Hospital, Homburg/Saar, Germany

17Netherlands Cancer Institute, Biometrics Department, Antonie van Leeuwenhoek
Ziekenhuis, Amsterdam

18Comprehensive Cancer Center Mainfranken, Wuerzburg University, 97074
Wuerzburg, Germany

Abstract

Purpose

Wilms tumour (WT) is the most common paediatric renal tumour. Treatment planning under International Society of Paediatric Oncology (SIOP) protocols is based on staging and histological assessment of response to pre-operative chemotherapy. Despite high overall survival, many relapses occur in cases without specific risk factors, while many successfully treated patients are exposed to treatments with significant risks of late effects. To investigate whether molecular biomarkers could improve risk stratification, we assessed 1q status and other potential copy number biomarkers in a large WT series.

Patients and methods

586 WT nephrectomy samples from SIOP WT 2001 were analysed using a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay that measured copy number of 1q and other regions of interest.

Results

167/586 (28%) WTs had 1q gain. 5 year event-free survival (EFS) was 75.0% in cases with 1q gain (95% confidence interval: 68.5-82.0), and 88.2% in cases without gain (95% CI: 85.0-91.4). Overall survival (OS) was 88.4% with gain (95% CI: 83.5-93.6) and 94.4% without gain (95% CI: 92.1-96.7). In univariable analysis, 1q gain was associated with poorer EFS ($p < 0.0001$; HR = 2.33) and OS ($p = 0.01$, HR = 2.16). The association of 1q gain with poorer EFS retained significance in multivariable analysis adjusted for 1p and 16q loss, sex, stage, age and histological risk group. 1q gain remained associated with poorer EFS in tumour subsets limited either to intermediate risk localised disease or to non-anaplastic localised disease. Other notable aberrations associated with poorer EFS included *MYCN* gain and *TP53* loss.

Conclusion

1q gain is a potentially valuable prognostic biomarker in WT in addition to histological response to pre-operative chemotherapy and tumour stage.

Introduction

Wilms tumour (WT) is the most common childhood renal malignancy¹. Most cases are treated effectively, with around 90% of patients achieving 5 year survival, but new approaches are needed to improve the outcome of the remainder, especially in cases of recurrence, where ~50% will have a fatal outcome^{2,3}. More specific biomarkers for treatment stratification could also reduce the therapeutic burden on the successfully treated majority. Treatment planning is currently based on clinical staging and histopathological criteria. In countries that follow the protocols of the International Society of Paediatric Oncology (SIOP), WT patients typically receive neoadjuvant chemotherapy, and the histopathology at nephrectomy is used to classify the cases into risk groups. Tumours with diffuse anaplasia, or containing a high proportion of chemo-resistant blastema (blastemal type) are regarded as high risk; epithelial, stromal, mixed and regressive subtypes are classed as intermediate risk, and completely necrotic tumours as low risk⁴. Using this classification, the SIOP WT 2001 trial recently reported that doxorubicin can be safely omitted from treatment of stage II/III intermediate risk histology tumours, although it still adds benefit in high risk histology cases^{5,6}. However, high risk tumours are relatively uncommon, and most relapses still occur in cases with localised (stage I-III) low and intermediate risk histology tumours. There is therefore a clinical need to improve the sensitivity and specificity of risk prediction in WT. The SIOP WT 2001 trial included, as a secondary aim, investigation of the potential value of including molecular biomarkers in addition to the current use of tumour stage and histology in risk stratification.

Previous analyses have identified multiple recurrent aberrations in Wilms tumour.

Notable genes with documented mutations include *WT17-9*, *CTNNB110*, *WTX* (*AMER1*)¹¹, *TP53*¹², *FBXW7*¹³, *MYCN*, *SIX1/2*, *DICER1*, *DROSHA*, and *DGCR8*¹⁴⁻¹⁸. Copy neutral loss of heterozygosity on 11p, common in stromal type tumours, can lead both to second hit inactivation of mutated *WT1* on 11p13, and to aberrant expression of the imprinted genes *H19* and *IGF2* on 11p15; the latter locus is also frequently targeted by epigenetic abnormalities¹⁹. Several WT genes, including *WT1*, *WTX*, *TP53*, *FBXW7*, and *MYCN* are also subject to recurrent copy number aberrations (CNAs), as are a number of larger scale genomic regions, but few of these are of known prognostic relevance. Simultaneous allele loss of 1p and 16q is associated with adverse outcome in patients with favourable histology WT treated with immediate nephrectomy, and this biomarker is already used in treatment stratification by the Children's Oncology Group (COG) of North America²⁰. We have recently shown that *TP53* mutation and 17p loss, aberrations largely confined to anaplastic histology (AH) WT, are potential adverse indicators within this subtype²¹. However, the utility of both these biomarkers is limited by their relative rarity. Genomic gain of 1q, one of the most common copy number changes in WT²²⁻²⁵, appears to be associated with poor outcome, as does gain of *MYCN*¹⁸. Recent studies in the US and UK have focused on the significance of 1q gain and support its prognostic value^{26,27}.

The principal aim of this study was to assess the feasibility of using 1q gain as a prognostic biomarker by determining its association with EFS and OS in the largest cohort of WTs investigated to date, drawn entirely from the SIOP WT 2001 clinical trial. Accordingly, a rapid and relatively low cost multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay²⁸ was developed and optimised to assess the copy number status of 1q and other key regions or gene-specific loci including 1p, 16q, *WT1*, *WTX*, *TP53*, *MYCN* and *FBXW7*.

Materials and Methods

Patients

Patients registered prospectively in the SIOP WT 2001 clinical trial and treated with pre-operative chemotherapy according to standardised risk stratified regimens based on tumour stage, histology and metastatic response to pre-operative chemotherapy^{5,29} with stage I-IV WT and available frozen tumour were eligible for this study. Selection criteria are given in the Supplementary Methods, and case characteristics in Supplementary Table 1. Informed consent was obtained from all families. Our research was approved by local ethics committees and conducted in accordance with the Helsinki Declaration.

Samples

All samples were freshly frozen specimens obtained at nephrectomy. Genomic DNA was prepared by standard methods. Only WTs where a paediatric pathologist had determined the tumour content was $\geq 50\%$ were used for the study (N=586, Supplementary Table 1). Full details, including sample inclusion criteria and DNA quality control metrics are given in the Supplementary Methods.

MLPA

The MLPA assay (P380-X2) was designed and developed in collaboration with MRC-Holland (Amsterdam, The Netherlands). The panel included 33 probes (Supplementary Table 2) for regions or genes of interest, including seven on 1p, five on 1q, six on 16q, and three each targeting *MYCN* (2p), *TP53* (17p), *FBXW7* (4q), *WT1* (11p) and *WTX* (*AMER1*, Xq), as well as reference and quality control probes (Supplementary Methods). MLPA reactions were performed according to the manufacturer's instructions with appropriate internal quality and external normal controls. PCR products were analysed on an ABI 3730 DNA Analyser.

Data Analysis

Copy number ratios relative to the normal reference were calculated with Coffalyser.NET software (MRC-Holland) using the default settings. A numerical gain was scored when the ratios exceeded 1.2, and a loss when the ratios were lower than 0.8; all other values were considered to be normal diploid. For individual genes, aberrations were scored by the median ratio of the gene-specific probes. For 1p, 1q and 16q, gain or loss of at least two consecutive probed loci was required to score a whole arm aberration. Associations between CNAs and histopathological subtypes were calculated by logistic regression, and survival analyses were performed using the Kaplan-Meier estimator, log-rank test and the Cox proportional hazards model (Supplementary Methods). For multivariable analyses, the factors considered are those listed in the 'Variable' column of Table 2.

Results

Sample series and histological subtypes

586 patients with stages I-IV WTs in which tumour content was confirmed by histological review, high quality DNA was successfully extracted, and data exceeded QC thresholds (Supplementary Methods) were included in the analysis. In this series (Supplementary Table 1), median clinical follow-up was 68 months, 92 patients had an event (relapse), and 41 died. In 55% (321/586) of tumours at least one of the major copy number aberrations targeted by the assay (1q gain, 1p loss, 16q loss, *MYCN* gain, *TP53* loss, *WT1* loss, *WTX* loss, or *FBXW7* loss) was detected (Supplementary Table 1). Overall, the numbers of alterations identified across all markers were consistent with previous reports. Some aberrations were more common in specific subtypes (Figure 1, Supplementary Table 3) and some significant associations were noted. In comparison with mixed type histology, diffuse anaplasia was significantly associated with *TP53* (17p) loss ($p = 2.99 \times 10^{-12}$), *MYCN* (2p) gain

($p = 0.000883$), 16q loss ($p = 0.000578$) and *FBXW7* (4q) loss ($p = 2.68 \times 10^{-5}$), the latter presumably reflecting an association between anaplasia and whole arm 4q loss we have described previously³⁰. The stromal subtype was associated with *WT1* (11p) loss ($p = 0.0014$), consistent with previous reports, and with a significantly lower frequency of 1q gain than the other subtypes ($p = 0.00912$). 1q gain was most frequent in blastemal type tumours (Figure 1), but not to a statistically significant extent. We also noted an association between the regressive type and a lower frequency of *WTX* (*AMER1*, Xq) loss. Most aberrations, including 1q gain, were somewhat less common in stage I than in higher stage tumours (Supplementary Table 4).

Univariable outcome analysis of 1q gain

In the complete series of 586 patients (Table 1, Figure 2a, 2b), 167 (28.5%) tumours had 1q gain. 5 year event free survival (EFS) in the '1q gain' group was 75.0% (95% confidence interval (CI) = 68.5-82.0%), and 88.2% in the 'no 1q gain' group (95% CI = 85.0-91.4%). The corresponding overall survival (OS) values were 88.4% (95% CI = 83.5%-93.6%) and 94.4% (95% CI = 92.1-96.7%), respectively. At the $\alpha = 0.05$ significance level, univariable analyses using the Cox Proportional Hazards Model showed that 1q gain was associated with poorer event-free survival (Hazard ratio (HR) = 2.33, log-rank $p < 0.0001$) and overall survival (HR = 2.16, $p = 0.01$).

Since 1q gain as a potential biomarker would be of most value in optimising risk stratification in localised tumours, we also considered two important subsets. The first consisted of 441 patients with localised disease (stage I-III), intermediate risk histology tumours according to the SIOP classification. In univariable analysis (Table 1, Figure 2c, 2d), 1q gain was significantly associated with inferior EFS ($p = 0.004$, HR = 2.21), but not OS ($p = 0.99$, HR = 1.01). The second subset was selected to

allow direct comparison with the Children's Oncology Group risk stratification. Among 482 patients with localised, non-anaplastic tumours (i.e. excluding both diffuse and focal anaplastic but including blastemal type WTs), 1q gain was associated with poorer EFS ($p = 0.001$, HR = 2.34), but not OS ($p = 0.1$, HR = 2.48) (Table 1, Figure 2e, 2f).

Univariable outcome analysis of 1p loss and 16q loss

Neither 1p loss, nor 16q loss, nor combined loss of 1p and 16q considered as a single biomarker in a univariable Cox model were significantly associated with EFS or OS in the entire tumour series at the $p = 0.05$ level (Supplementary Figures 1-3).

This was also true for the subsets, with the single exception of a marginal association between 1p loss and poorer OS in non-anaplastic cases (Table 1, Supplementary Figures 1-3).

Multivariable outcome analyses

In a multivariable outcome analysis including 1q gain, 1p loss, 16q loss, tumour stage and histological risk group, sex and age, 1q gain was significantly associated with poorer EFS (HR = 1.98, $p = 0.002$), but not OS (HR 1.61, $p = 0.16$) (Table 2).

The only other independent factors of those assessed for adverse outcome in the full series ($n = 586$) were high risk histology and stage IV disease. The significant independent association of 1q gain with adverse EFS but not OS persisted in the subsets of intermediate risk histology, localised Wilms tumours ($n = 440$, EFS HR 1.92, $p = 0.04$) and non-anaplastic, localised Wilms tumours ($n = 481$, EFS HR 2.0, $p = 0.02$).

Univariable analysis of gene-specific markers

The outcome data for the other markers covered by the assay were also analysed on an exploratory basis (Table 1, Supplementary Figures 4-9). *MYCN* (2p) gain was

significantly associated with poorer EFS and OS in the complete data set, in the localised disease intermediate risk subset, and in the localised disease subset with anaplastic WTs excluded (Supplementary Figure 4). Using a more specific definition of *MYCN* gain, 'MYCN only' gain (excluding from the *MYCN* gain group those tumours where the *DYSF* control probe on 2p is also gained, since gains at both loci are likely to be whole arm gains) we see higher hazard ratios and lower p values (Table 1, Supplementary Figure 5). Similarly, *TP53* (17p) loss was significantly associated with inferior EFS and OS in the complete series and, perhaps

surprisingly, in both subsets, neither of which included diffuse anaplastic WTs (Table 1, Supplementary Figure 6).

A third copy number change, loss of the *FBXW7* locus on 4q, was significantly associated with poorer EFS and OS in the complete 586 tumour series, but only with poorer EFS in both subsets (Table 1, Supplementary Figure 7). No significant associations were noted between the copy number status of *WT1* and outcome at the $p = 0.05$ significance level (Table 1, Supplementary Figure 8). For *WTX*, there was no significant association with EFS, but improved OS was marginally associated with copy number loss in the complete series only ($p = 0.04$, Supplementary Figure 9).

Discussion

In this study we have carried out the first large-scale analysis of 1q copy number aberrations in Wilms tumours sampled at nephrectomy after neoadjuvant chemotherapy according to the SIOP WT 2001 protocol. The clinical characteristics of the patient cohort were representative of the entire registered population who had

received pre-operative chemotherapy and presented with unilateral disease; 586 cases with stage I-IV WT including all intermediate and high risk histological subtypes were analysed. We found that 1q gain is significantly associated with poorer EFS and OS in univariable analyses, with hazard ratios in excess of two-fold for relapse and death. These results are broadly consistent with those recently reported in a study of cases treated by immediate nephrectomy under COG protocols without pre-operative chemotherapy²⁶ and, while it is essential to assess 1q gain independently in cohorts treated under both regimens, it is encouraging to note that it appears to be a prognostically valuable marker irrespective of treatment protocol. However, in our multivariable analysis of the SIOP data, which also considered 1p loss, 16q loss, sex, stage, age, and histological risk group, 1q gain remained significantly associated only with EFS (HR 1.98, $p = 0.002$) and not OS (HR 1.61, $p = 0.16$). This lack of association with OS is perhaps not surprising given the comparatively low number of deaths in the patient series (41, compared to 92 relapses), reflecting the relative success of second line therapy.

Since just over half of all relapses occur in children with localised Wilms tumours that are not of high risk histology, we analysed this subset of patients ($n = 441$) where treatment intensification to reduce relapse risk would be clinically appropriate and feasible. Here, we found that 1q gain retained its independent prognostic significance for EFS (HR 1.92, $p = 0.04$) but not OS in multivariable analysis. Similar results (HR 2.00, $p = 0.02$) were obtained for localised non-anaplastic tumours ($n = 481$), excluding both diffuse and focal anaplastic WTs but retaining blastemal type. This subset is comparable to the current North American definition of 'favourable histology' for localised cases treated by immediate nephrectomy (where blastemal type, which implies chemo-resistance, cannot be defined).

In contrast to a previous report based on immediate nephrectomy cases²⁰, we did not find that the combination of 1p loss and 16q loss was prognostically significant in the SIOF series in the univariable or multivariable analyses. This was true both for EFS and OS, in the entire series and in the non-anaplastic and intermediate risk subsets. However, the size of our sample series (significantly smaller than the immediate nephrectomy cohort) meant that the current study did not have sufficient power to assess reliably the prognostic significance of relatively rare aberrations like combined 1p/16q loss, observed in only 16 cases (3 of which relapsed). We note also that any copy neutral loss of heterozygosity, another possible mechanism of allele loss at these loci, would not be detected by MLPA. A substantially larger series would be required to obtain definitive results for this rare combined marker in SIOF cases.

In a previous study we presented an analysis of *MYCN* copy number status that included 234 of the samples described here¹⁸. Our observations are therefore not independent, but the current expanded series should give a more reliable indication of the prognostic relevance of *MYCN* gain. As before, we note that *MYCN* gain appears to be a promising adverse prognostic indicator for WT, both for EFS and OS (Supplementary Figure 4). We also analysed the data using a more specific definition of gain ('*MYCN* only' gain, Supplementary Figure 5), excluding whole arm gains. The adverse association with both EFS and OS was retained in all univariable analyses, but with lower p values and higher hazard ratios throughout, perhaps suggesting that the type of genomic disruption that has given rise to *MYCN* gain, rather than the relative dose of *MYCN* relative to the genomic baseline, is more prognostically relevant. A higher resolution (e.g. SNP array) platform that allows precise delineation of the region of gain and distinguishes between focal events like

those we described previously¹³ and larger segmental changes would allow us to address this question.

We have previously described an association between poor outcome and *TP53* aberrations (typically point mutation coincident with whole arm copy number loss of 17p) in diffuse anaplastic tumours²¹. Interestingly, *TP53* (17p) loss in the present study was associated with poorer EFS and OS even in the subsets that excluded anaplastic tumours. It is currently not known whether the non-anaplastic tumours with CN loss at this locus also had *TP53* mutations, or whether these tumours had any unusual histological features such as 'nuclear unrest'³¹.

Loss of the *FBXW7* locus on 4q was significantly associated with poorer EFS and OS in the complete tumour series, and with adverse EFS only in the subsets. In earlier studies, we reported focal homozygous loss and point mutation of *FBXW7* in several intermediate risk histology WT cases¹³ as well as broader but typically single copy loss of 4q associated with anaplasia³⁰; the current assay does not distinguish between these types of aberration.

Optimising treatment to minimise the risk of long-term side effects without compromising EFS or OS is a principal aim of clinical research in WT. The previous SIOP randomised trial^{5,6} showed that therapeutic intensity could be reduced in cases

with localised intermediate risk tumours without affecting OS, at the cost of a 4.4% reduction in EFS (95% CI 0.4-9.3). Since it is clearly desirable for patients to avoid even treatable relapses, further refinement of first line therapy remains a priority, and novel biomarkers may provide the key data required to improve risk stratification and maximise EFS. In this study we have shown that MLPA provides a rapid and effective means of determining the status of CN aberrations associated with poorer EFS. The relatively high frequency of 1q gain makes this marker particularly

attractive for potential use in risk stratification. However, any change in intensity based on 1q status alone would affect a significant proportion of patients who have a reasonably good EFS on current therapies and where relapse is salvageable.

Hence, the SIOP-RTSG considers it may be more appropriate to define risk groups for treatment stratification based on several combined molecular biomarkers, taking account of our findings of the adverse significance of *MYCN* gain and *TP53* loss and incorporating mutations in recently discovered WT genes, some of which are reported to have prognostic significance. This requires a prospective clinical study powered to include tumour stage and histological risk group, both individually significant in our multivariable analysis, alongside quantitative assessment of the volume of blastema that survives preoperative chemotherapy, a further potential prognostic factor³². This prospective study will also incorporate multiple sampling of each WT, to determine the extent of intratumoral heterogeneity of 1q gain and other biomarkers. This forthcoming study will register all patients with a newly diagnosed renal tumour and continue the risk stratification and treatment arms for localised WT used in the SIOP WT 2001 trial. The study will be known as UMBRELLA and is due to open in 2016.

Acknowledgements

We wish to thank all the families who donated samples, and all the staff at the treatment centres in the UK, Republic of Ireland, Germany, Austria, France, the Netherlands, and Sweden who enrolled patients on the SIOP WT 2001 trial and study and collected frozen tumour for the biological studies. This study builds on the work of Dr. Jan de Kraker, original chief investigator of the SIOP WT1 2001 trial, who died on Jan 19, 2012. Work in the UK was supported by Cancer Research UK (C1188/A4614), Great Ormond Street Hospital (GOSH) Children's Charity, Children

with Cancer (11MH16), and the NIHR GOSH UCL Biomedical Research Centre. We thank Rebecca West and Nelly Bier for technical assistance, and Mariana Maschietto for helpful comments during the development of this study. The UK clinical database was managed by the Children's Cancer Trials Team, CRUK Clinical Trials Unit, Birmingham. Work in Germany was supported by the DFG (Ge539/12-1), the Wilhelm-Sander-Stiftung and the Competence Network Paediatric Oncology and Haematology. Work in France was supported by L'Association Léon Bérard pour les Enfants Cancéreux, Enfants et Santé, Société Française du Cancer de l'Enfant, INSERM and UPMC (UMR.S 938). Work in Austria was supported by a CID grant of the St. Anna Kinderkrebsforschung (PFA, LK). Work in multiple countries was supported by the European Network for Cancer Research in Children and Adolescents (ENCCA, EU FP7 grant number 261474) and the P-medicine Project (EU FP7 grant number 270089). Samples were made available by individual treatment centres and in the UK by the Children's Cancer and Leukaemia Group (UK) and in France by the French Pediatric Renal Tumor Pathology Group, Cardiobiotec, Tumorotheque Marseille, Service de Pathologie Robert-Debré APHP Université Denis-Diderot Paris7-SPC, Tumorotheque Necker-Enfants malades, CRB Paris Sud, Tumorotheque Champagne-Ardenne, Tumorotheque Caen Basse-Normandie, Tumorotheque Régionale Franche-Comté, CRB Grenoble, Tumorotheque Lille-CRRC, Tumorotheque du Limousin, CRB HUS.

Author contributions

Conception and design: Tasnim Chagtai, Aurore Coulomb, Manfred Gessler, David Gisselsson, Norbert Graf, Marry M van den Heuvel-Eibrink, Kathy Pritchard-Jones, Sui Savola, Harm van Tinteren, Gordan Vujanic, Richard Williams.

Collection and assembly of data: All authors.

Data analysis and interpretation: Peter Ambros, Annick Blaise, Yves Le Bouc, Tasnim Chagtai, Aurore Coulomb, Linda Dainese, Manfred Gessler, Marry M van den Heuvel-Eibrink, Kathy Pritchard-Jones, Harm van Tinteren, Gordan Vujanic, Richard Williams, Christina Zill.

Manuscript writing: All authors.

Final approval of manuscript: All authors.

Authors disclosures of potential conflicts of interest

Suvi Savola is employed by MRC Holland b.v., manufacturer of commercially available MLPA probemixes. Neil Sebire is a director of Repath Ltd. David Gisselsson is a consultant for Spago Nanomedical. Leo Kager has received expenses from Novartis. Christina Zill has completed a paid internship and received expenses and honoraria from Roche Diagnostics GmbH. Yves Le Bouc has received honoraria from Ipsen and is a consultant for Sandoz. All other authors declare no competing financial interests.

Figure Legends

Figure 1. Aberration frequency histograms for loci of interest in specific histological subtypes of Wilms tumour (full series, n = 586).

Figure 2. Event-free (a, c, e) and overall (b, d, f) survival curves for complete series (a, b), intermediate risk localised disease (c, d) and non-anaplastic localised disease (e, f) Wilms tumours, stratified by 1q status.

References

1. Breslow N, Olshan A, Beckwith JB, et al: Epidemiology of Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 21:172-81, 1993

2. Pritchard-Jones K, Moroz V, Vujanic G, et al: Treatment and outcome of Wilms' tumour patients: an analysis of all cases registered in the UKW3 trial. *Ann Oncol* 23:2457-63, 2012
3. Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, et al: Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. *Lancet Oncol* 5:37-46, 2004
4. Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, et al: Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Medical and pediatric oncology* 38:79-82, 2002
5. Pritchard-Jones K, Bergeron C, de Camargo B, et al: Omission of doxorubicin from the treatment of stage II-III, intermediate-risk Wilms' tumour (SIOP WT 2001): an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 386:1156-64, 2015
6. van den Heuvel-Eibrink MM, van Tinteren H, Bergeron C, et al: Outcome of localised blastemal-type Wilms tumour patients treated according to intensified treatment in the SIOP WT 2001 protocol, a report of the SIOP Renal Tumour Study Group (SIOP-RTSG). *Eur J Cancer* 51:498-506, 2015
7. Bonetta L, Kuehn SE, Huang A, et al: Wilms tumor locus on 11p13 defined by multiple CpG island-associated transcripts. *Science* 250:994-7, 1990
8. Call KM, Glaser T, Ito CY, et al: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. *Cell* 60:509-20, 1990
- 23
9. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, et al: Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. *Nature* 343:774-8, 1990
10. Koesters R, Ridder R, Kopp-Schneider A, et al: Mutational activation of

the beta-catenin proto-oncogene is a common event in the development of Wilms' tumors. *Cancer Research* 59:3880-2, 1999

11. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al: An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315:642-5, 2007

12. Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, et al: Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nature genetics* 7:91-7, 1994

13. Williams RD, Al-Saadi R, Chagtai T, et al: Subtype-specific FBXW7 mutation and MYCN copy number gain in Wilms' tumor. *Clin Cancer Res* 16:2036-45, 2010

14. Rakheja D, Chen KS, Liu Y, et al: Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nat Commun* 2:4802, 2014

15. Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al: Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. *Nat Commun* 5:4039, 2014

16. Walz AL, Ooms A, Gadd S, et al: Recurrent DGCR8, DROSHA, and SIX homeodomain mutations in favorable histology Wilms tumors. *Cancer Cell* 27:286-97, 2015

24

17. Wegert J, Ishaque N, Vardapour R, et al: Mutations in the SIX1/2 pathway and the DROSHA/DGCR8 miRNA microprocessor complex underlie highrisk blastemal type Wilms tumors. *Cancer Cell* 27:298-311, 2015

18. Williams RD, Chagtai T, Alcaide-German M, et al: Multiple mechanisms of MYCN dysregulation in Wilms tumour. *Oncotarget* 6:7232-7243, 2015

19. Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al: Constitutional 11p15

abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *Nat Genet* 40:1329-34, 2008

20. Grundy PE, Breslow NE, Li S, et al: Loss of heterozygosity for chromosomes 1p and 16q is an adverse prognostic factor in favorable-histology Wilms tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 23:7312-21, 2005

21. Maschietto M, Williams RD, Chagtai T, et al: TP53 mutational status is a potential marker for risk stratification in Wilms tumour with diffuse anaplasia. *PLoS One* 9:e109924, 2014

22. Hing S, Lu YJ, Summersgill B, et al: Gain of 1q is associated with adverse outcome in favorable histology Wilms' tumors. *Am J Pathol* 158:393-8, 2001

23. Lu YJ, Hing S, Williams R, et al: Chromosome 1q expression profiling and relapse in Wilms' tumour. *Lancet* 360:385-6, 2002

24. Natrajan R, Williams RD, Hing SN, et al: Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol* 210:49-58, 2006

25. Perotti D, Spreafico F, Torri F, et al: Genomic profiling by wholegenome single nucleotide polymorphism arrays in Wilms tumor and association with relapse. *Genes, chromosomes & cancer* 51:644-53, 2012

25

26. Gratias EJ, Jennings LJ, Anderson JR, et al: Gain of 1q is associated with inferior event-free and overall survival in patients with favorable histology Wilms tumor: a report from the Children's Oncology Group. *Cancer* 119:3887-94, 2013

27. Segers H, van den Heuvel-Eibrink MM, Williams RD, et al: Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 52:1065-74, 2013

28. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al: Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57, 2002
29. Furtwängler R, Pritchard-Jones K: Treatment of Wilms Tumour: The SIOP Approach, in Pritchard-Jones K, Dome JS (eds): *Renal Tumors of Childhood: Biology and Therapy*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2014, pp 101-118
30. Williams RD, Al-Saadi R, Natrajan R, et al: Molecular profiling reveals frequent gain of MYCN and anaplasia-specific loss of 4q and 14q in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer* 50:982-95, 2011
31. Hill DA, Shear TD, Liu T, et al: Clinical and biologic significance of nuclear unrest in Wilms tumor. *Cancer* 97:2318-26, 2003
32. Graf N, van Tinteren H, Pritchard-Jones K, et al: Is the absolute blastema volume after preoperative chemotherapy in nephroblastoma relevant for prognosis? *Pediatr Blood Cancer* 57:741-742, 2011

ANNEXE 4 : Article projet 4.

CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes is significantly associated with clinical outcome in pretreated Wilms patients

Linda Dainese 1,2,3,4*, Gabriel G. Malouf 5,6*, Roger Mowauad 5,6, Annick Blaise1,2, Arnauld Vershuur 7, Sabine Irtan 8, Marie Dominique Tabone 9, Marion Classe 10, David Khayat5,6, Christophe Bergeron 11, Yves Le Bouc 1,2,12, Aurore L'herminé-Coulomb 1,2,3,4

1- Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France ;

2- INSERM, UMR_S 938, CDR Saint-Antoine, F-75012, Paris, France ;

3- AP-HP, Hôpital Armand Trousseau, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Paris, France ;

4- APHP, Hôpital Armand Trousseau, Tumorotheque, Paris, France ;

5- APHP, Goupe Hospitlier de la Pitié Salpêtrière, Service d'Oncologie Medicale, Paris France ;

6- Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, Institut Universitaire de Cancerologie GRCS, F-75013, Paris, France ;

7- Hôpital d'Enfants de la Timone, Centre de Cancérologie Pédiatrique, Marseille, France ;

8- APHP, Hôpital Armand Trousseau, Service de Chirurgie Pédiatrique, Paris, France ;

9- APHP, Hôpital Armand Trousseau, Service d'Hémo-Oncologie Pédiatrique, Paris, France ;

10- APHP, Hôpital Lariboisiere, Paris, France ;

11- Centre Léon Bérard, Institut d'Hémo Oncologie Pédiatrique, Lyon, France ;

12- APHP, Hôpital Armand Trousseau, Explorations Fonctionnelles Endocriniennes, Paris, France ;

Corresponding author:

Linda Dainese

Pathology Department

Hôpital Armand Trousseau, 26, Avenue du Dr. A. Netter, 75012, Paris, France

E-mail: linda.dainese@trs.aphp.fr

Running title: CD4/CD8 ratio and outcome in Wilms patients

Key words: Wilms tumors, immunity, CD4/CD8

Abstract

Wilms tumor (WT) is the most common pediatric renal malignancy. Patients are usually classified in risk-groups according to the SIOP-classification based on morphological criteria as the amount of preoperative chemotherapy induced changes and of viable blastemal, epithelial and stromal components. So far, there is no other approved prognostic marker. Moreover, there is a heterogeneity in clinical outcome despite the risk-group. We thus postulated that this might be related to tumor infiltrating lymphocytes (TIL). We investigated TIL's (CD3, CD4, CD8, CD4/CD8-ratio) and immune checkpoint (PD1/PD-L1) expression in 55 pre-treated WT's included in 2001-SIOP-protocol. Correlations of immune-infiltrate were done with clinicopathological datas and tumor features. Overall, median patients' age at diagnosis was 3.3 years (range: 0.4-11.4), with equal sex ratio. We observed a large variation of CD3+ TIL's ranging from 31-835 per 10 HPF (median: 280). CD4 median value was 210 (range: 26-550) and CD8 was 94 (5-361). Median CD4:CD8-ratio was 2 (range: 0.2-50). CD3, CD4, CD8 and CD4/CD8-ratio didn't correlate with clinico-pathological datas, although CD4 and CD4/CD8-ratio were higher in WT with diffuse anaplasia as compared to others (p-value 0.101 for both). A membranous staining of PD-1 and PD-L1 was observed in two (3%) and four (7%) cases. In univariate analysis, patients with diffuse anaplasia, high histological risk (HR), low CD8 and high CD4/CD8-ratio had shorter progression-free-survival as compared to others. In univariate analysis, overall-survival was worst in patients with diffuse anaplasia, HR, local stage III/IV and high CD4/CD8-ratio. The latter was retained in multivariate analysis as an independent prognostic value (p =0.0027) in addition to prognostic stratification based on the SIOP-2001-protocol. Our data suggests that high CD4/CD8 is associated with poor outcome in pretreated WT independently from current clinico-pathological factors. If validated in an independent cohort, this ratio should be taken into consideration in the future to better stratify WTs.

Introduction

Wilms tumor (WT) is the most common renal malignancy in children. In European countries, children of at least 6 months are treated according to the SIOP2001 protocol with preoperative chemotherapy(1) . After surgery, pathological examination of the tumor will confirm WT diagnosis and patients are classified in different risk groups (low, intermediate, high) according to the amount of chemotherapy induced changes and the amount of viable blastemal, epithelial and stromal components. Pathological examination will also assess the local stage of extension of the tumor (1). According to the previous SIOP93-2001 study, the survival rate in stage I patients was 95-100%, in stage II 90-95%, in stage III 85-95%, in stage IV 60-70% and 30% for patients with diffuse anaplasia. Despite adaptation of the treatment

to this classification and progresses in chemotherapy regimen, 10 to 15% of the children relapsed. Therefore, this prognostic classification should be revisited to adjust adjuvant therapy in function of the real biological aggressiveness of the tumor and new prognostic and therapeutic tools are needed in the management of this tumor.

On the other hand, a growing number of studies showed a role of the immune response and tumor-infiltrating lymphocytes (TIL's) in different adult cancer (2-7). However, their prognostic significance is a subject of great debate. In fact, in many types of cancers, the infiltration by CD8+ cytotoxic T cells has been associated with either good (8, 9) or poor prognosis (10-14). In addition, the ratio of CD4+/CD8+ cells, which is a key parameter for appropriate TIL function, has been correlated to prognosis in adult cancer (15, 16). Beside prognostic values of lymphocytes, T-cells microenvironment are characterized by high expression of PD-1 and PD-L1 which are key players of the immune checkpoints (17). In tumors arising in children, little is known about the role of immune response in the development of Cancers.

Thus, the impact of immune system on prognosis of patients with WT remains limited. Two recent reports characterized immune infiltrate in 5 (18) and 16 untreated WT patients (19), and showed that in contrast to adult cancer, pediatric cancers including WT are infiltrated by macrophages and CD3+ T cells whereas dendritic cells are very few. However, these studies did not address the relationship between WT tumors and the immune system. In the present study, to examine the immune status of WT tumors, we evaluated by immunohistochemistry the status of CTLs (CD3, CD4, CD8) and the expression of the markers of the immune checkpoint (PD-1/PD-L1) in a large number and homogeneous group of French WT patients treated with preoperative chemotherapy according to the SIOP protocol. We correlated them to the clinicopathological parameters and evaluate their predictive value for progression free and overall survival benefit. Overall, we found that high CD4/CD8 ratio was retained in multivariate analysis as an independent prognostic value in addition to the SIOP2001 histological risk group and the stage.

Materials and methods

Patients and samples

Tumors related to patients registered in 31 centers of the "Société Française du Cancer de l'Enfant" (SFCE) with available paraffin tissue blocks were included in this study. All tumors were evaluated by the local pathologist, reviewed at the national level and the histoprognosis was established according to the SIOP risk group classification (1). This study was approved by the institutional review board and the ethics committee. All cases received chemotherapy prior to surgery. Follow-up, clinical and pathological data were obtained from the SIOP 2001 database.

According to SIOP 2001 recommendation, all pediatric patients aged between 6 months and 18 years received preoperative chemotherapy. Patient's with localized disease, treatment is based on a 4 weeks chemotherapy with Vincristine and Actinomycin D (2 drugs regimen). In patients diagnosed with a metastatic disease, the treatment consists in a 6 weeks chemotherapy regimen with Vincristine, Actinomycin D and Doxorubicin (3 drugs regimen).

Histological study

The three dimensions of the tumor were measured on the nephrectomy specimen by the local pathologist. The formula used to calculate the blastema absolute was: $V_{\text{blastema}} = V_{\text{tumor on macroscopy}} \times (1 - \text{fraction necrosis}) \times \text{fraction blastema}$. This formula has been proposed during the European RTSG (Renal Tumors Study Group) annual brainstorming in 2013.

Immunohistochemical study

The formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were cut into 4 μm thick sections and subsequently de-waxed in xylene, rehydrated through graded alcohols and placed into a phosphate buffered saline solution pH 7.4 (PBS). Antigen retrieval was done by heating tissue section, followed by incubation in peroxidase blocking solution. The immunohistochemical staining for the expression of CD3, CD4, CD8 T cells and PD-1, PD-L1 was performed according to the manufacturer's instructions (Table 1) on a Roche Ventana Benchmark XT automated slide stainer (Ventana Medical Systems, Roche, France).

The reaction was carried out using secondary antibodies, then sections were washed with PBS solutions and subsequently coloured by diaminobenzidine. Sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated in alcohol, cleared in xylene and cover slipped.

For PD-L1 two primary antibodies were used. Tissues known to contain the antigen of interest were chosen as positive control to determine the better dilution, incubation time and to optimize the staining. A positive control tissue slide was included in each batch of immunostaining. CD3+, CD4+ and CD8+ T cells quantification was evaluated by choosing a minimum of 10 representative High Performed Fields (HPF, X400 magnification) per tissue section using an Olympus microscope. The number of cells with positive staining was counted manually in three locations, tumor stroma, epithelial and tumor islets. Microscopic analysis was carried out blindly to the clinical data. PD-1 and PD-L1 were evaluated as positive or negative.

Statistical Methods

Statistical analysis was performed using the SPSS software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). The Mann-Whitney U-test for unpaired mean and the Fisher' Exact Test were used to assess whether continuous variables differed significantly between categories, depending on data distribution. Follow-up time was calculated as the interval between the date of diagnosis and last follow-up or death. Cut-off values were determined using descriptive statistics and median values of the mean distribution were used. To assess the prognostic value of each single marker and each ratio, curves of progression free survival (PFS) and overall survival (OS) according to the cut-off were generated using the Kaplan-Meier method in combination with the log-rank test. Two-sided $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. The multivariate Cox-regression analysis was performed to determine significant predictors. Hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI) were used.

Results

Characteristics of patients population

The characteristics of the 55 WT patients included in this study are summarized in Table 2. Median patients age at diagnosis was 3.3 years [range 0.4-11.4], with no male or female predominance. The median follow-up was 57.4 months [range, 10.4-112.6]. The pathological classification of the patients included in this study was as follow, 19 mixed (34.5%), 10 regressive (18%), 7 stromal (13%), 4 blastemal (7%), 3 epithelial (5.5%), 1 WT with focal anaplasia (2%) and 11 with diffuse anaplasia (20%). No low risk tumor was included in the study, 71% of the studied tumors (n=39) were intermediate risk and 29% (n=16) high risk.

All patients aged between 6 months and 18 years received preoperative chemotherapy (54/55 patients=98%) and 1 patients with an age of 4 months was treated by surgery first. Patients with localized disease at diagnosis (n=46, stage I, II and III) received the 2 drugs regimen (83.5%) and patients with metastasis at diagnosis (n=9, stage IV) received the 3 drugs regimen (16.5%).

Evaluation of CD3, CD4 and CD8 T cells infiltration

The analysis of the CD3, CD4 and CD8 expression showed a significantly higher number of infiltrating lymphocytes in WT tumors compared to the normal kidney ($p=0.0001$) (Figure 1). This infiltration was predominately present in the stroma and in a lower manner in epithelial and blastemal components (Figure 2).

Median number of Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) counted in 10 HPF fields was as follow: 280 [range, 31-835] for CD3+ T lymphocytes, 210 [range 26-550] for CD4 and 94 [range 5-361] for CD8. Ratio of CD4/CD8 TIL has a median value of 2 [range: 0.2-50].

We then decided to analyse correlations between CD3+, CD4+, CD8+ and CD4/CD8 ratio and clinicopathological patients and tumors features. To do so, tumors were classified according to the median number of each parameter into 2 groups (low and high) (Table 3). Of note, CD4 high-density group was significantly associated with an age above 3 years and with WT without nephrogenic rests (Fischer Exact test, $p=0.031$ and $p=0.036$ respectively). CD4/CD8 ratio was significantly higher in females than in males (Fischer Exact test, $p=0.0002$). There was no correlation between CD3, CD4, CD8 density, CD4/CD8 ratio and histological risk group, tumor size, local stage, the amount of chemotherapy induced changes, the blastemal volume and the chemotherapy regiment with 2 or 3 drugs.

PD-1 and PD-L1 expression

Two out of 55 patients (3%) showed a membranous PD-1 expression in lymphocytes. PD-L1 was positive in 4 cases (7%) within 5 to 40% of tumoral cells (median expression in 20% of tumoral cells). In the 2 patients expressing PD-1, a high CD8 infiltration level was noted, whereas in 3 out of the 4 patients expressing PD-L1, a low level of CD8 was noted. No association was found between PD-1 or PD-L1 expression and clinicopathological data (Table 3)

Clinical outcome

At the time of analysis, after a median follow-up period of 57.4 months [range 0-144 months], ten patients recurrent (18%) and 6 (11%) patients died from their cancer. Median recurrence time was 10 months [range 1.3-21.5]. Using univariate analysis, patients with diffuse anaplasia histology, and high histological risk group according to the SIOP classification displayed the worst progression-free survival (Figure 3A, 3B and Table 4) as well as OS (Figure 4A, 4B and Table 4). Patients with stage I-II had a better overall survival than patients with stage III-IV ($p=0.018$) (Figure 4C and Table 4). Low CD8 density was significantly correlated with shorter PFS ($p=0.01$, HR=9.18, 95% C.I.=1.46-17.50) (Figure 3C and Table 4) but not with OS (Table 4). Of note, increased CD4/CD8 ratio significantly correlated with a worse PFS ($p=0.026$, HR=0.20, 95% C.I.=0.06-0.84) (Figure 3D and Table 4) and OS ($p=0.024$, HR=0, 95% C.I.=0.03-0.024) (Figure 4D and Table 4). By contrast, gender, age, tumor size, tumoral volume, local stage, presence of nephrogenic rests, necrosis, blastemal volume, CD3, CD4 density or PD-L1 expression didn't not correlated with PFS or OS (Table 4).

Multivariate Analysis of Risk

We then asked whether prognostic values of CD4/CD8 ratio was independent from other clinicopathological criteria. Using Cox proportional hazard regression analysis adjusted for the prognostic stratification and histological risk, we identified CD4/CD8 ratio as an independent predictor of PFS ($p=0.033$) and OS ($p=0.002$) (Table 4).

Discussion

It has been established that the immune microenvironment plays a significant role in the progression of adult cancer; however, its potential contribution in pediatric cancers has not yet been well evaluated. In this study, we described for the first time in a large cohort of 55 WT, the most frequent pediatric cancer of the kidney, the phenotype of tumors infiltrating lymphocytes, the expression of the markers of the immune checkpoint and we showed that, CD4/CD8 ratio is a predictive factor of progression free and overall survival.

It was previously demonstrated that, in contrast to adult cancers which are frequently preceded by a period of chronic inflammation due to infectious or environmental agents, carcinogenesis in children occurs simultaneously with the maturation of the immune system (18)(21). On the other hand, the capacity to promote immune responses to various antigens is weaker during early childhood (20).

In our study, the quantitative assessment of immune cells in WT showed that, the infiltrating lymphocytes varied among tumors and T adaptive immune cells were significantly higher in WT tumors compared to the normal kidney. This expression was predominantly localized in the tumor stromal component and in a lower manner in epithelial and blastemal components. A previous study examined tumor-associated leukocytes in a small group of five WTs and noted the presence of T cells and macrophages in these tumors (18). In our larger panel of pretreated WTs, the number of CD4 lymphocyte was higher than CD8 with a positive CD4/CD8 ratio in all studied patients. Interestingly, CD4 density and CD4/CD8 ratio were higher in 73% of diffuse anaplastic tumors, known to be the most aggressive as compared to other histology (74% vs 43%). These results corroborated well with those observed by Barros et al. (20), showing an increase of T helper CD4 lymphocytes and CD4/CD8 ratio in paediatric Hodgkin lymphomas, suggesting that, age-related changes of the immune system could modify the tumor infiltration of lymphocytes in paediatric patients. No correlation between CD3 and CD4 density, CD4/CD8 ratio and age, gender, risk group, tumor size, local stage, presence of nephrogenic rests and blastemal volume.

Recently, Chowdhury F et al. (21) explored the expression of PD-1/PD-L1 in paediatric cancer and highlighted the presence of PD-1 expressing CD8+ TILs and an active PD-L1 pathway in a

high proportion of paediatric cancers. The studied population included alveolar rhabdomyosarcoma, high-risk neuroblastoma and Ewing's sarcoma suggesting that, bolstering CD8+ T-cell responses through PD-1/PD-L1 blockade would be a viable treatment strategy in paediatric tumors. In our study, similarly to adult renal cancer (22), PD-1 and PD-L1 were expressed in a minority of the studied Wilms tumors. However, in accordance with the results of Chowdhury, we observed that patients expressing PD-1 had high CD8 infiltration. No association was found between PD-1 or PD-L1 expression and clinicopathological data. To be noted that, all relapsed patients, out of one, were negative to PD-1 and PD-L1. Due to the low number of tumors expressing these markers, no correlation with prognosis was established.

Many authors exploring the lymphocytes infiltrating tumors and CD4+/CD8+ ratio noted a positive correlation between the number of infiltrating lymphocytes and patient prognosis (23, 24). However, the presence of TIL's, particularly CD8 is a subject of great debate in the literature. While for some authors a high amount of TIL's is a positive prognostic factor (7,8), for others it's a negative prognostic factor (9-13). Sheu et al; (16) observed a decreased number of intratumoral CD4 with a reverse CD4/CD8 ratio in patients with high tumoral load or with metastasis suggesting that, the inability of the host to overcome a tumor should be the consequence of a lower production of CD4. This hypothesis was already supported by others studies on lung (25), bladder carcinoma (11) and metastatic melanoma (24), suggesting that low CD4/CD8 ratio should be used as a universal negative prognostic marker in adult cancer. Inversely to these observations, in our studied cohort of WT, a low CD4/CD8 ratio was identified as a positive prognostic marker. This result is in accordance with the results reported in ovarian carcinoma (15) and in colorectal cancer (26). The possible explanation is that CD4+ and CD8+ TIL's alone are not associated with survival, which indicates that a subpopulation of CD4+ T lymphocytes might modulate the antitumoral activity of CD8+ T lymphocytes with an immunosuppressive activity (15). Coherently with this theory, in our study neither CD4+ nor CD3 alone were associated with OS.

In conclusion, we described for the first time the phenotype of the immune infiltrate in pretreated WT. We identified CD4/CD8 ratio as a powerful prognostic factor influencing PFS and OS. The prognostic value was greater than, and independent of the currently used prognostic stratification based on the SIOP2001 protocol. These results must be validated in a larger series of pretreated WT's and if validated should be taken into consideration as an useful tool for the pathologist to assess the biological risk of WT and better stratify these tumors in the future.

Disclosure/Conflict of Interest

This study was sponsored by the French associations Enfants et Santé (CB, AV), Fondation Avec (GM, RM), Société Française du Cancer de l'Enfant (SFCE), Inserm (U938) and UPMC.

The authors of this paper have no conflict of interest to declare.

Acknowledgment

We would like to express our gratitude to Eve Brochot and Stephanie Meyer for the excellent technical assistance.

References

1. Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J, et al. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol*. 2002;38(2):79-82.
2. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
3. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
5. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 2009;457(7225):36-7.
6. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
7. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(79):203-13.
8. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1536-43.

9. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes ([194](#)) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. 2015;26(2):259-71.
10. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
11. Krpina K, Babarovic E, Jonjic N. Correlation of tumor-infiltrating lymphocytes with bladder cancer recurrence in patients with solitary low-grade urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 2015;467(4):443-8.
12. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, et al. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):1949-55.
13. Muris JJ, Meijer CJ, Cillessen SA, Vos W, Kummer JA, Bladergroen BA, et al. Prognostic significance of activated cytotoxic T-lymphocytes in primary nodal diffuse large B-cell lymphomas. *Leukemia*. 2004;18([79](#)):589-96.
14. Scott DW, Chan FC, Hong F, Rogic S, Tan KL, Meissner B, et al. Gene expression-based model using formalin-fixed paraffin-embedded biopsies predicts overall survival in advanced-stage classical Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(6):692-700.
15. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(51):18538-43.
16. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer*. 1999;86(8):1537-43.
17. Giraldo NA, Becht E, Pages F, Skliris G, Verkarre V, Vano Y, et al. Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21(13):3031-40.
18. Vakkila J, Jaffe R, Michelow M, Lotze MT. Pediatric cancers are infiltrated predominantly by macrophages and contain a paucity of dendritic cells: a major nosologic difference with adult tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(7 Pt 1):2049-54.
19. Maturu P, Overwijk WW, Hicks J, Ekmekcioglu S, Grimm EA, Huff V. Characterization of the inflammatory microenvironment and identification of potential therapeutic targets in wilms tumors. *Transl Oncol*. 2014;7(4):484-92.
20. Barros MH, Vera-Lozada G, Soares FA, Niedobitek G, Hassan R. Tumor microenvironment composition in pediatric classical Hodgkin lymphoma is modulated by age and Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer*. 2012;131(5):1142-52.

21. Chowdhury F DS, Mitchell S, Mellows T, Ashton-Key M, Gray CG. PD-L1 and CD8+PD1+ lymphocytes exist as targets in the pediatric tumor therapy. *Oncoimmunology*. 2015;4(10).
22. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res*. 2006;66(7):3381-5.
23. Mina M, Boldrini R, Citti A, Romania P, D'Alicandro V, De Ioris M, et al. Tumor-infiltrating T lymphocytes improve clinical outcome of therapy-resistant neuroblastoma. *Oncoimmunology*. 2015;4(9):e1019981.
24. Hernberg M, Turunen JP, Muhonen T, Pyrhonen S. Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy. *J Immunother*. 1997;20(6):488-95.
25. Yoshino I, Yano T, Murata M, Miyamoto M, Ishida T, Sugimachi K, et al. Phenotypes of lymphocytes infiltrating non-small cell lung cancer tissues and its variation with histological types of cancer. *Lung Cancer*. 1993;10(1-2):13-9.
26. Diederichsen AC, Hjelmberg J, Christensen PB, Zeuthen J, Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52(7):423-8.

Figures legends

Figure 1. Quantification of average number of CD3, CD4 and CD8 + cells per 10 High Power Fields in normal kidney and tumors.

Figure 2. A: Hematoxylin and Eosin staining showing a WT with stromal, epithelial and blastemal component presenting an intratumoral immune infiltration made of lymphocytes. B: Immunohistochemical reaction for anti-CD3. C: Immunohistochemical reaction for anti-CD4. D: Immunohistochemical reaction for and anti-CD8. Magnification X10.

Figure 3. Kaplan-Meier plots of Progression Free Survival (PFS) according to histology (A), risk group (B), intratumoral CD8 density (C) and CD4/CD8 ratio (D).

Figure 4. Kaplan-Meier plots of Overall Survival (OS) according to histology (A), risk group (B), local stage (C), and CD4/CD8 ratio (D).

Figure 1

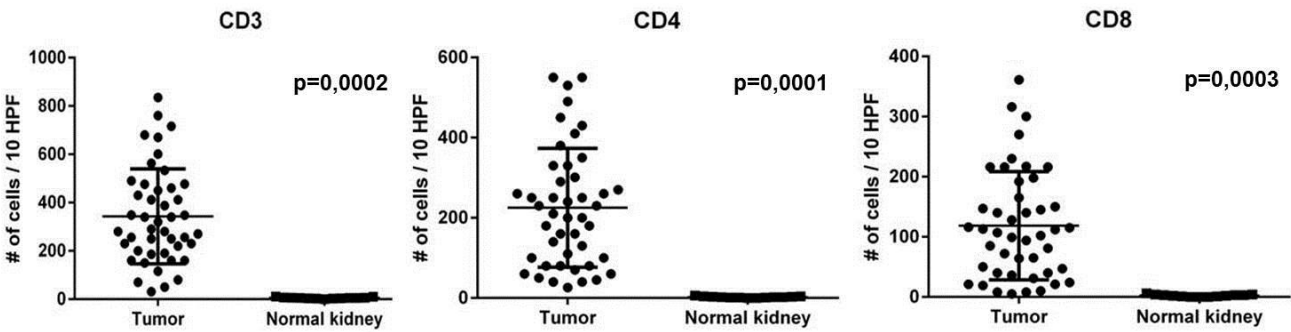


Figure 2

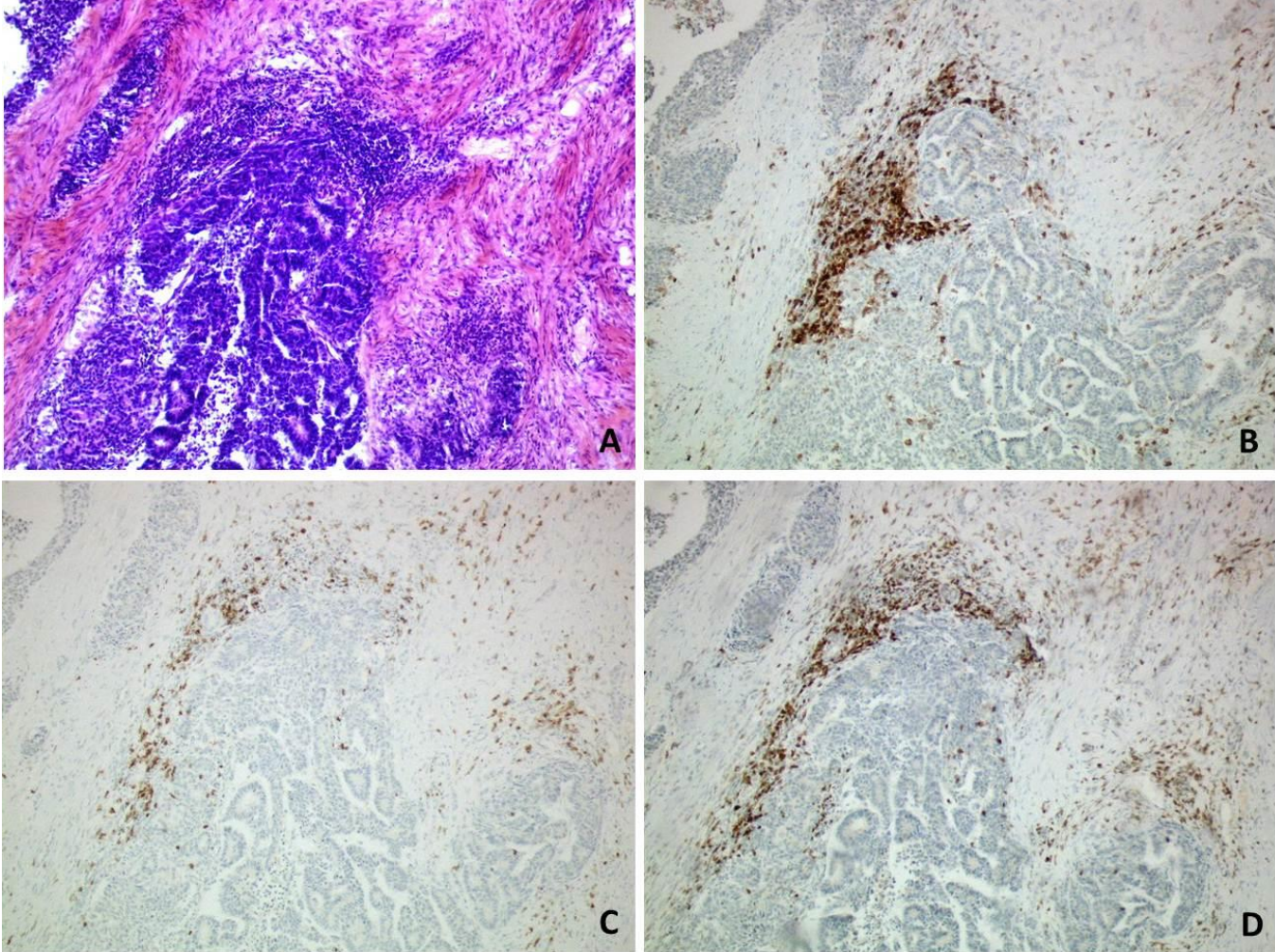


Figure 3

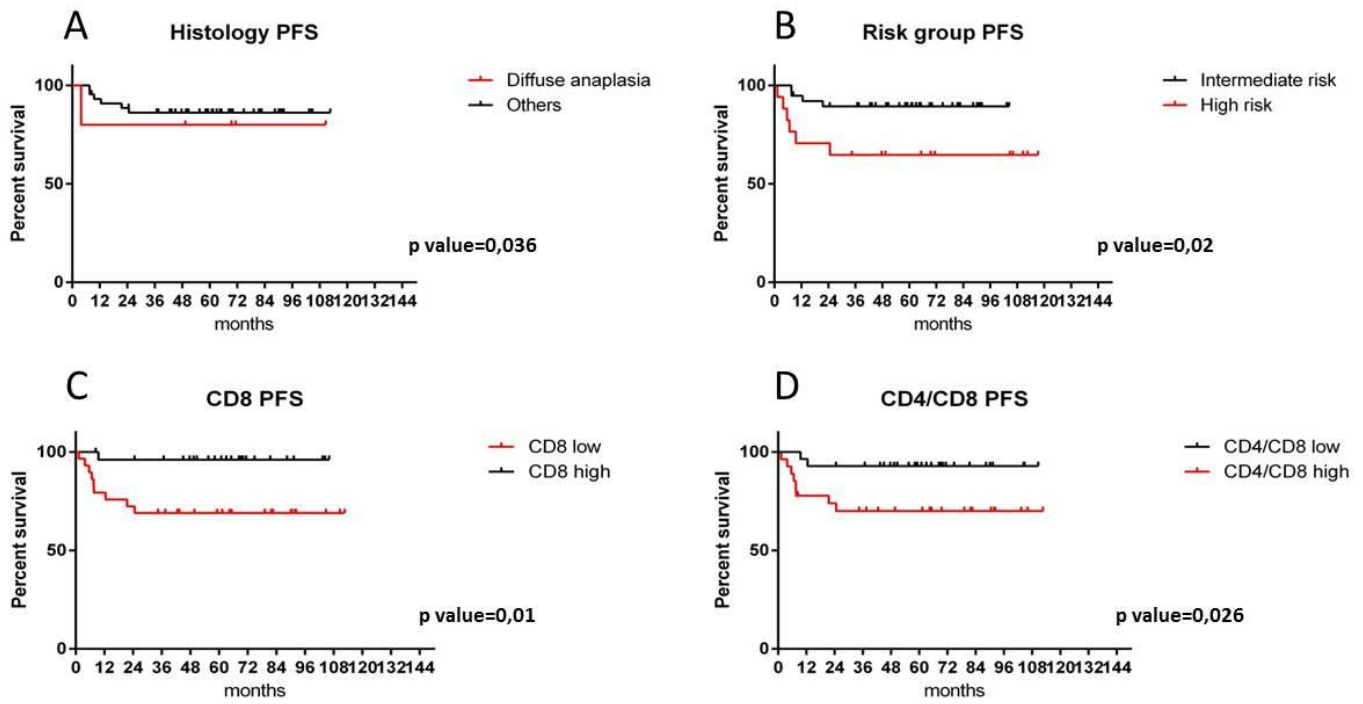


Figure 4

