

Immunohistochimie et biologie moléculaire des lésions mélanocytaires

Isabelle Moulouguet

Cabinet de Dermatopathologie Mathurin
Moreau Paris
imoulouguetmichau@gmail.com

Le diagnostic des lésions mélanocytaires est avant tout morphologique. Un nævus bénin ou un mélanome classique sont reconnus sans difficulté par le pathologiste sur la morphologie de la lésion en tenant compte de ses caractères cliniques et dermatoscopiques. Parfois, le diagnostic est plus difficile et une lecture collégiale des lames ou le recours à un expert ainsi que des techniques d'immunohistochimie ou de cytogénétique sont nécessaires. Les tumeurs mélaniques intra-épidermiques pures (niveau I de Clark) ou peu épaisses, avec invasion dermique minime (niveau II de Clark) peuvent poser des problèmes diagnostiques au pathologiste mais moins de problèmes pratiques au clinicien, car leurs conséquences thérapeutiques et pronostiques sont mineures. En effet, en cas de doute diagnostique avec un mélanome *in situ*, une exérèse totale avec des marges saines de 5 mm guérit le patient. Par contre, si la tumeur est épaisse, les conséquences pour le patient sont bien plus importantes en cas de doute diagnostique justifiant alors l'utilisation de techniques plus sophistiquées. De plus, depuis l'avènement des thérapies ciblées, ces techniques de cytogénétique sont nécessaires dans un but thérapeutique. Face aux difficultés diagnostiques de certaines de ces lésions, de nouveaux termes ont été introduits diversement utilisés selon les auteurs : MELTUMP (tumeur mélanocytaire de pronostic incertain), TSA (tumeur de Spitz atypique), tumeurs mélanocytaires ambiguës, reflétant la difficulté de classer ces lésions.

Techniques

Immunohistochimie

Différents anticorps sont utilisés. On distingue, d'une part, des marqueurs de différenciation mélanocytaire, destinés avant tout au diagnostic différentiel pour prouver que la lésion est bien d'origine mélanocytaire, notamment en cas de lésion achromique (protéine S100, Melan-A, HMB45, SOX10) et, d'autre part, des marqueurs

aidant à évaluer le potentiel évolutif de la lésion (HMB45, p16, Ki-67). Dans une problématique de diagnostic différentiel comme pour étayer la malignité ou la bénignité d'une lésion mélanocytaire, il ne faut jamais se limiter à un seul anticorps mais en utiliser plusieurs et les interpréter en fonction de l'aspect morphologique de la lésion. Un chromogène rouge est à privilégier en cas de lésion pigmentée.

PS100

Cet anticorps dont le marquage est nucléaire et cytoplasmique a une forte sensibilité mais une faible spécificité car il marque de nombreuses autres cellules (cellules nerveuses, de Langerhans, cellules des glandes sudorales et adipocytes) et les tumeurs qui en dérivent. Il est incontournable dans une problématique de diagnostic différentiel.

HMB45 et Melan-A

Le marquage est cytoplasmique. Ils peuvent être exprimés par des cellules non mélanocytaires contenant des mélanosomes, notamment des macrophages à ne pas interpréter comme des mélanocytes.

SOX10

Son marquage est nucléaire, bien net sans l'aspect plus diffus et flou des deux anticorps précédents.

Ki-67

Ce marqueur de prolifération, de signal nucléaire, doit être interprété avec soin, en repérant si les cellules marquées sont bien des mélanocytes et non les lymphocytes présents dans la lésion.

p16

Le marquage est cytoplasmique et parfois nucléaire. La perte d'expression (totale ou clonale) de p16 est un argument fort en faveur de la malignité d'une tumeur mélanocytaire. Dans les lésions spitzoïdes, sa négativité témoignerait d'une mutation de *CDKN2A* (9p21).

Anticorps spécifiques de mutations

D'autres anticorps sont spécifiques de mutations : anti-BRAF muté (identifiant la présence d'une mutation V600E du gène *BRAF*), anti-NRAS muté. Leur coût est bien plus élevé que celui des anticorps classiques et ils ne sont donc pas utilisés en routine.

Les anticorps anti-BAP1, anti-ALK, anti-NTRK1 ou anti-ROS1 sont utilisés dans le cadre des lésions spizoïdes.

Techniques de biologie moléculaire

Les cellules des mélanomes ont subi des pertes et des gains de fragments de chromosomes qui peuvent être détectées par différents outils moléculaires dont la réalisation nécessite une plate-forme labellisée de biologie des tumeurs travaillant en collaboration avec un pathologiste spécialisé en pathologie mélanocytaire. Ces techniques sont coûteuses et actuellement non remboursées, ce qui limite leur utilisation aux cas pour lesquels les conséquences notamment thérapeutiques sont importantes. Leurs indications à visée diagnostique sont limitées aux tumeurs mélanocytaires épaisses, étiquetées comme ambiguës par un pathologiste expert. Selon les pays et les habitudes, on peut utiliser à titre diagnostique, soit l'hybridation *in situ* en fluorescence (*Fluorescence In Situ Hybridization*, FISH) ou la CGH (*Comparative Genomic Hybridization*). Ces techniques ont largement fait avancer les connaissances de la génétique du mélanome et ont permis d'ébaucher une classification moléculaire qui s'appuie en partie sur la morphologie. Elles sont en pleine évolution et ont également un intérêt thérapeutique et pronostique en raison des nouvelles thérapies qui ciblent directement telle ou telle anomalie génétique. La recherche de ces mutations est maintenant systématique dans les formes métastatiques et largement réalisée dans les mélanomes primitifs à fort potentiel métastatique.

FISH

L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) est une technique à visée diagnostique rapide qui peut être réalisée sur des coupes de lésion fixée en formol. Elle doit être corrélée à l'aspect clinique et morphologique de la lésion. Elle utilise des sondes spécifiques de régions d'intérêt marquées par un marqueur fluorescent et permet de repérer des anomalies chromosomiques. P. Gerami, B.C. Bastian *et al.* ont développé la FISH quatre couleurs (FISH mélanome). Il s'agit d'une technique de fluorescence utilisant quatre sondes émettant chacune un fluorochrome de couleur différente dont les cibles sont trois régions situées sur le chromosome 6 et une région située sur le chromosome 11. La FISH ne cible que certains chromosomes d'où ses limites. Elle permet de savoir si une lésion comporte une ou plusieurs des trois anomalies les plus fréquemment rapportées dans le mélanome. Sa sensibilité est de 87 % avec une spécificité de 95 % pour différencier un nævus d'un mélanome non ambigu. La FISH a été développée

au départ pour différencier un mélanome d'un nævus mais elle est utilisée dans plusieurs domaines, notamment dans le démantèlement des tumeurs mélanocytaires ambiguës, en particulier dans les lésions spizoïdes où d'autres sondes sont utilisées en complément comme la sonde 9p21 (quand la p16 est négative en immunohistochimie) à la recherche d'une mutation homozygote du gène *P16* ou des sondes spécifiques de fusion (*ALK*, *ROS1*, etc.).

Technique de CGH

La CGH-array (*Comparative Genomic Hybridization*) est une technique de cytogénétique sur puce qui objective les gains, pertes, amplifications et translocations de l'ADN des cellules tumorales par rapport aux cellules normales sur les 23 paires de chromosomes. Cette technique permet une analyse à plus haut débit et à plus grande résolution que la technique de CGH simple.

Cette technique est lourde à réaliser. Elle nécessite un certain volume tumoral et n'est pas utilisée en routine courante, restant réservée au diagnostic des tumeurs mélanocytaires ambiguës.

Techniques de séquençage

Après avoir étudié les gènes un à un (technique Sanger), on peut maintenant étudier des milliers de fragments d'ADN ou d'ARN (*RNA seq*) simultanément par séquençage à haut débit (*Next-Generation Sequencing*, NGS). Ces techniques peuvent étudier tout le génome (*Whole-Genome Sequencing*) ou seulement certains gènes (*Targeted Sequencing*). Initialement du domaine de la recherche, elles sont davantage utilisées actuellement, surtout à visée thérapeutique.

Indications

Est-ce bien une lésion mélanocytaire ?

Parfois, la nature mélanocytaire de la lésion n'est pas certaine, les cellules mélanocytaires pouvant prendre de nombreux aspects morphologiques. L'immunohistochimie est d'une grande aide. Quelques exemples :

- Devant une tumeur dermique très peu différenciée non pigmentée ou en cas de métastase d'origine inconnue, on utilisera une batterie d'anticorps explorant plusieurs lignes de différenciation et notamment des marqueurs de différenciation mélanocytaire. Il ne faut pas se limiter à un seul anticorps mais en utiliser plusieurs.
- Devant une prolifération de cellules fusiformes avec des îlots lymphocytaires, il faut penser au mélanome desmoplastique et réaliser un marquage par l'anti-PS100 et l'anti-SOX10, ces lésions n'exprimant pas MelanA ou HMB45 (*figure 1*).

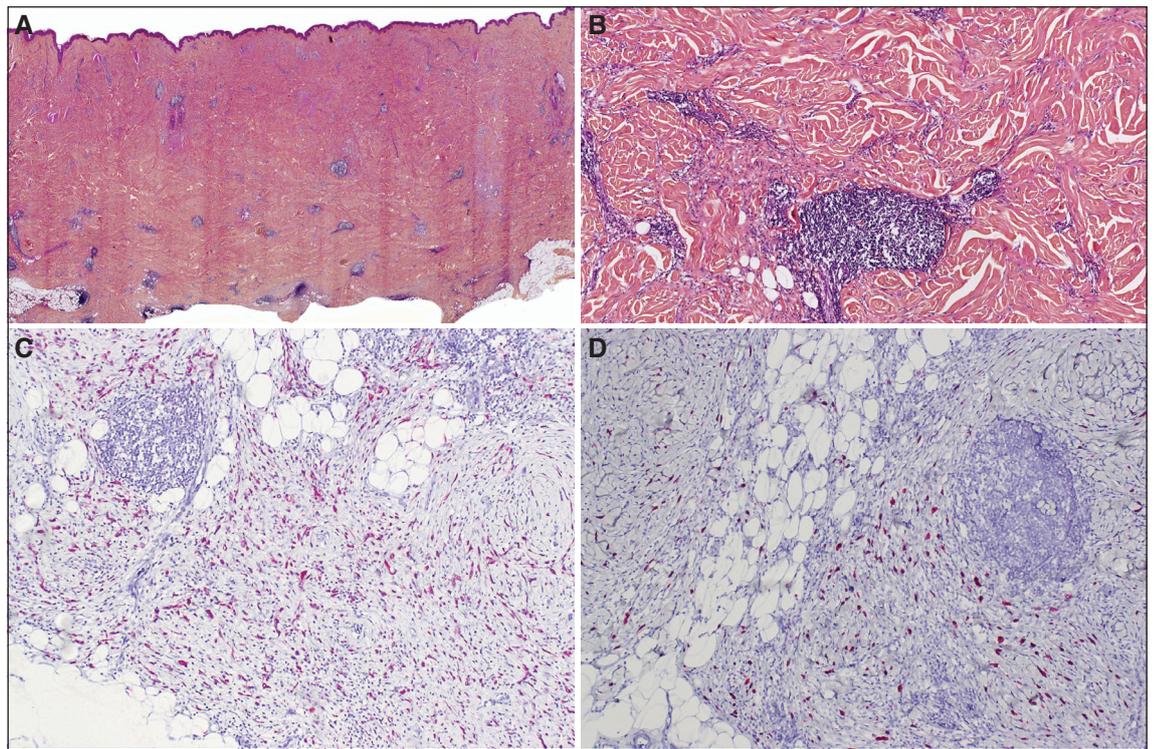


Figure 1. Mélanome desmoplastique (Coll. Dr S. Fraitag). A) Prolifération cellulaire fusiforme sur toute la hauteur du derme avec îlots lymphocytaires. B) Détail de la prolifération fusiforme. C) La prolifération exprime la PS100. D) La prolifération exprime le SOX10.

– En cas de lésion mal visible sur la coloration standard et donc difficile à identifier, notamment sur une biopsie, l'immunohistochimie peut permettre de mieux visualiser une éventuelle prolifération mélanocytaire. Ainsi, elle aidera à différencier une simple hyperplasie mélanocytaire photo-induite d'un mélanome de Dubreuilh débutant devant une lésion pigmentée du visage suspecte cliniquement, ou permettra de mieux visualiser un mélanome acrolentigineux, notamment au niveau de la matrice unguéale ou encore montrera l'absence d'hyperplasie mélanocytaire dans une mélanonychie fonctionnelle (*figure 2*). Là encore, il faut utiliser plusieurs anticorps, en sachant que l'anti-PS100 ne marque pas les mélanocytes de la matrice unguéale.

Est-ce une lésion bénigne ou maligne ?

Sans être formelle, l'immunohistochimie peut, devant une lésion mélanocytaire dermique ou épidermo-dermique épaisse dont l'aspect morphologique n'est pas évident, aider à conforter le diagnostic. Une batterie de quatre anticorps est couramment utilisée (HMB45, anti-MelanA, anti-p16 et Ki-67) en corrélation avec la morphologie (*figure 3*). Outre l'aide au diagnostic bénin-malin, ces immunomarquages permettront de *screener* les lésions pour lesquelles les techniques de biologie moléculaire sont souhaitables. L'immunohistochi-

mie est inutile dans les lésions superficielles et doit être réservée aux lésions épaisses. Pour chaque anticorps, il existe des profils d'expression de connotation bénigne, variable ou maligne. Une synthèse de ces profils doit être réalisée par le pathologiste, conjointement à l'analyse de l'aspect morphologique. Pour l'HMB45, on recherchera la présence ou l'absence d'un gradient de marquage. Un marquage surtout superficiel est en faveur d'une lésion bénigne (marquage isolé de la prolifération jonctionnelle sans marquage de la prolifération dermique ou marquage jonctionnel avec un gradient de marquage dans le derme). Attention, ce profil peut se voir dans un mélanome sur nævus préexistant, d'où l'importance de la confrontation avec la morphologie des cellules marquées. Un marquage dermique (surtout profond) ou hétérogène ou plurifocal sera en faveur d'une lésion maligne. Avec l'anti-MelanA, le marquage est en général diffus dans les nævus communs (et de Spitz). Une positivité diffuse du MelanA avec un gradient de marquage par l'HMB45 est en faveur de la bénignité. L'absence de marquage (totale ou clonale) par l'anti-p16 est le plus souvent synonyme de malignité. Par ailleurs, une p16 négative dans une tumeur de Spitz atypique témoigne d'une mutation de 9p21 qui peut être hétérozygote ou homozygote. Une mutation homozygote de 9p21 pourrait évoluer de manière agressive comme un

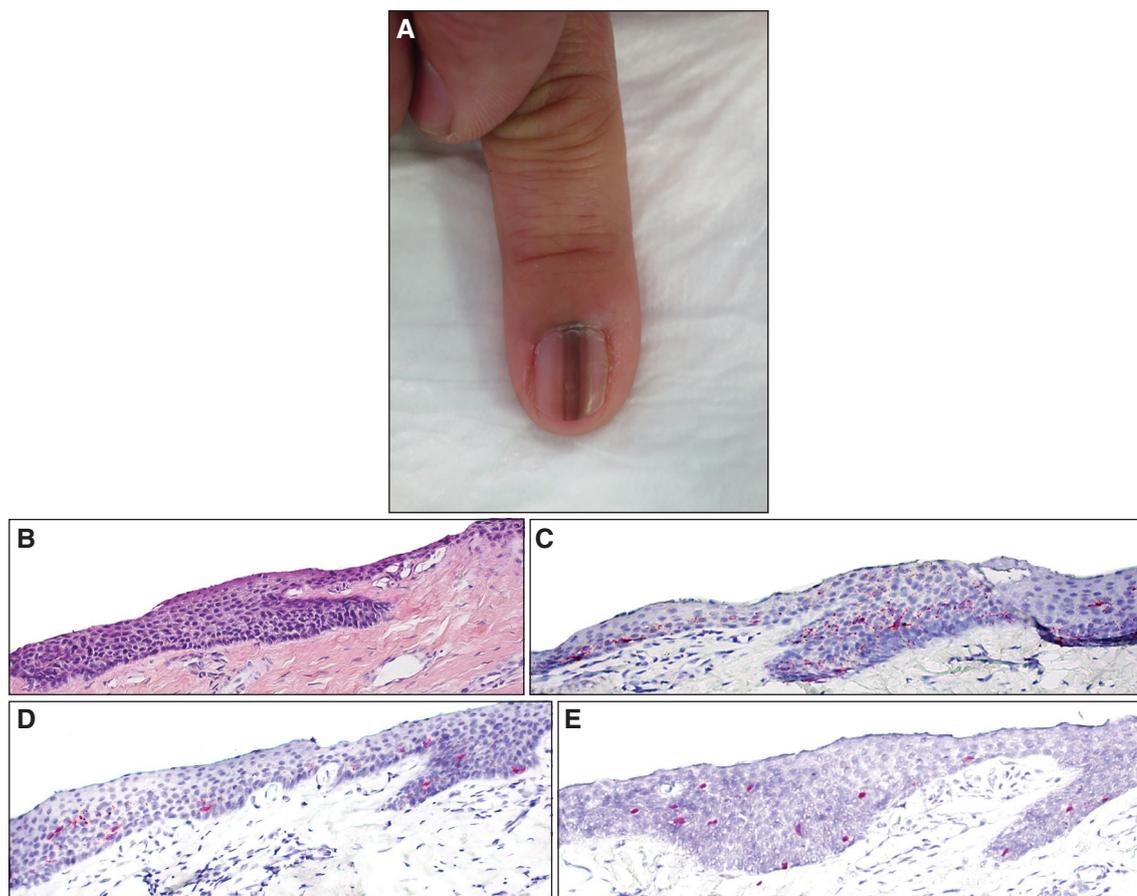


Figure 2. Mélanonychie fonctionnelle (Coll. Dr S. Goettmann). A) Mélanonychie de l'index chez une femme de 45 ans. B) Simple pigmentation de la basale sans prolifération mélanocytaire à la coloration HES. C) HMB45 : mélanocytes en nombre normal. D) MelanA : mélanocytes en nombre normal. E) Sox10 : mélanocytes en nombre normal.

mélanome nécessitant de demander la FISH P16 pour préciser son caractère hétérozygote ou homozygote, la reprise chirurgicale étant différente dans les deux cas.

Ki-67 : le taux de prolifération doit être interprété avec prudence. Un index de prolifération élevé diffus de plus de 20 % dans le derme ou avec des foyers dermiques (*hotspots*) est en faveur de la malignité mais un taux bas ne l'exclut pas.

Tumeurs de Spitz

Ces tumeurs constituent un groupe de lésions mélanocytaires d'aspect histologique bien particulier avec une cytologie fusiforme ou/et épithélioïde, survenant surtout chez l'enfant et l'adulte jeune mais parfois plus tardivement. À l'extrémité bénigne du spectre lésionnel, on trouve les nævus de Spitz, tandis que les mélanomes spitzoïdes sont à l'autre extrémité de ce spectre. Entre ces deux pôles, se trouvent les tumeurs de Spitz atypiques (TSA) où le diagnostic bénin-malin est difficile et qui font souvent l'objet de demande d'avis spécialisé. Elles sont définies par des critères histologiques, en

tenant compte de l'âge de survenue, de la taille de la lésion et de son extension en profondeur notamment une épaisseur de plus de 2 mm et une atteinte de l'hypoderme. Outre l'étude en immunohistochimie, notamment par l'anti-p16, la FISH mélanome associée à la FISH 9p21 est d'une grande aide au diagnostic et a permis de décrire le mélanome spitzoïde développé sur nævus. Le profil cytogénétique des tumeurs de Spitz est bien particulier, sans mutation de *BRAF*, de *NRAS* ni de *KIT* mais avec des mutations de *HRAS* dans 20 % environ des cas. De plus, ces lésions peuvent comporter des fusions de la portion intra-cytoplasmique de la tyrosine kinase des gènes *ALK*, *ROS1*, *NTRK1*, *MET*, *RET* et *BRAF*, avec des fréquences variables pouvant aller jusqu'à 50 % des cas. Ces anomalies sont présentes dans les lésions bénignes, atypiques ou malignes. Ces différentes altérations génomiques sont responsables d'un profil clinique et surtout histologique qui peut parfois les faire suspecter (aspect desmoplastique en cas de mutation de *HRAS*, architecture plexiforme avec cellules fusiformes en cas de fusion de *ALK*, etc.). De plus, leur détection peut avoir des implications

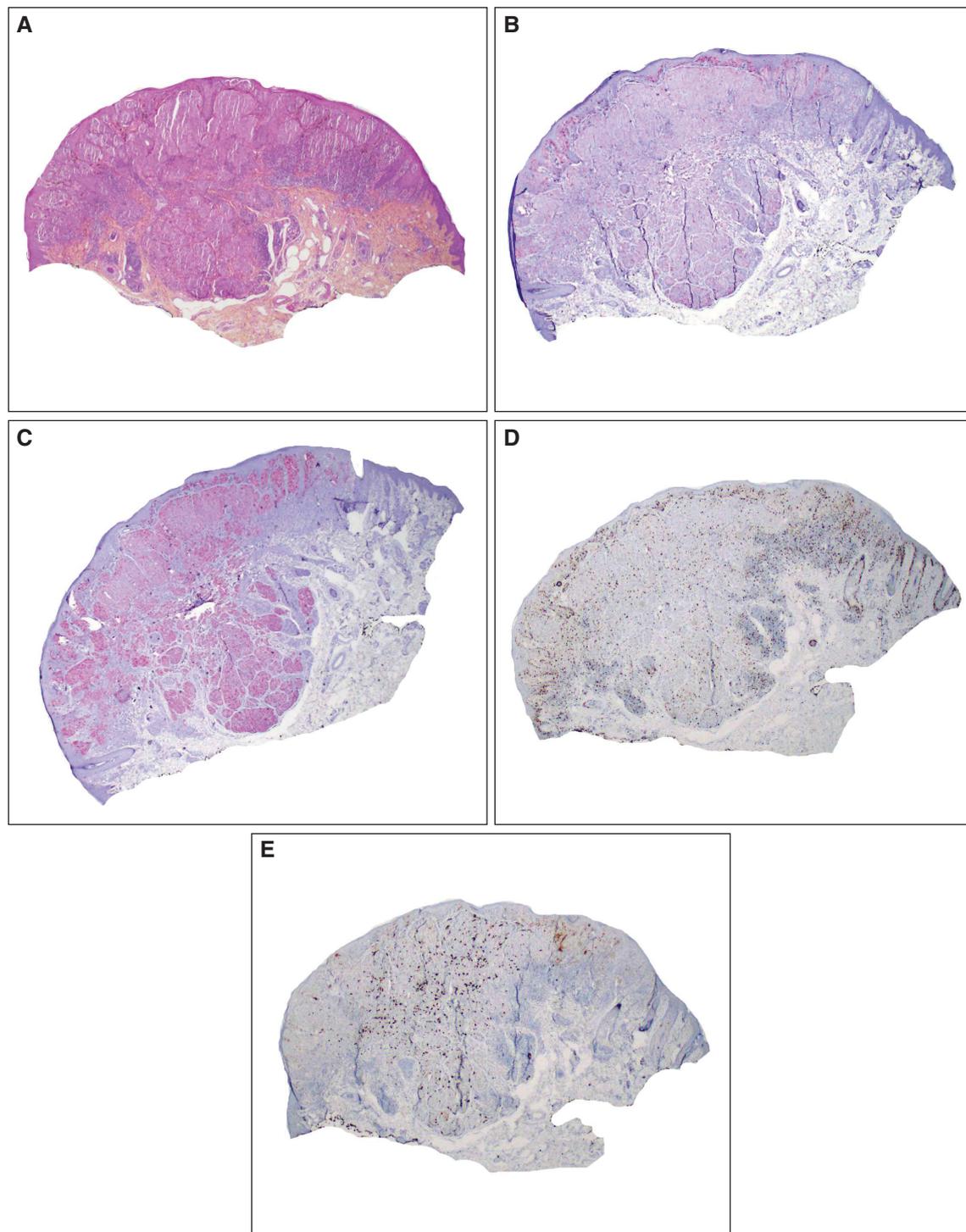


Figure 3. Lésion pigmentée suspecte depuis 2 ans de l'oreille chez un sujet de 18 ans (Coll Dr S. Freitag). Mélanome spitzoïde. A) Lésion spitzoïde asymétrique comportant une anisonucléose avec présence de mitoses sans maturation en profondeur. B) Marquage de toute la prolifération par l'HMB45 sans gradient de maturation. C) Expression diffuse de MelanA. D) Ki67 : marquage de 15 % de la prolifération. 3) Perte de la P16 par la majorité des cellules.

pronostiques et thérapeutiques. Ainsi, les techniques cytogénétiques sont en train de bouleverser le concept large de tumeurs de Spitz qui correspond en fait à un groupe de lésions hétérogènes sur le plan génétique en permettant d'isoler de plus en plus d'entités distinctes.

Lésion BAP1

Devant des lésions « spitzoïdes » d'aspect histologique particulier (architecture dermique superficielle sous forme de nappes denses de cellules épithélioïdes aux noyaux pléomorphes sans gradient

de maturation), l'anticorps anti-BAP1 peut mettre en évidence une perte d'expression nucléaire de *BAP1*. Il s'agit le plus souvent d'une mutation somatique de *BAP1* limitée à 1 seule lésion sans contexte familial : lésions sporadiques. Le syndrome BAP1 est une affection génétique autosomique dominante liée à une mutation germinale du gène *BAP1* qui entraîne une susceptibilité génétique envers un spectre tumoral avec survenue à un âge précoce de divers cancers familiaux (mélanomes cutanés, oculaires ou méningés, mésothéliomes, cancers du rein à cellules claires, etc.). Ces lésions dont la terminologie est variable (BAPome, nævus spitzoïde avec inactivation de *BAP1*) sont un marqueur utile pour la reconnaissance de ce syndrome permettant de dépister les autres tumeurs du spectre *BAP1*.

Et sur le plan thérapeutique ?

La présence de mutations des gènes *B-RAF* dans de nombreux mélanomes cutanés (et *C-KIT* dans certains sous-types de mélanome) est devenue capitale depuis la découverte de thérapeutiques ciblant spécifiquement ces mutations.

Une mutation de *B-RAF* est retrouvée dans environ 40 à 60 % des mélanomes avec dans 90 % des cas une mutation V600E aboutissant à une activation permanente de la voie des MAPkinases. Il est impératif de déterminer le statut mutationnel d'un mélanome métastatique pour en guider le traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinases spécifiques (vémurafénib, dabrafénib). Cette mutation peut être détectée par immunohistochimie sur coupe en paraffine ou par une technique classique de séquençage ciblée sur une région génique prédéterminée par des amorces flanquant la zone d'intérêt (NGS, *Next Generation Sequencing*). La mutation de *C-KIT* est retrouvée dans les

mélanomes acrolentigineux et des muqueuses qui représentent une très faible proportion des mélanomes dans les populations blanches mais constituent le principal type de mélanome des populations asiatiques. Le traitement utilisé en cas de la détection de l'anomalie est identique à celui des tumeurs stromales gastro-intestinales (imatinib).

Conclusion

Les techniques d'immunohistochimie associées aux techniques de biologie moléculaire permettent d'aider au diagnostic des lésions mélanocytaires ambiguës et de démembrer ces tumeurs. Elles ont de plus un intérêt thérapeutique depuis l'avènement des nouvelles thérapies ciblées. 

Remerciements : remerciements chaleureux au Dr Christiane Bailly Centre Léon Bérard pour sa relecture avisée.

Liens d'intérêts : l'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Pour en savoir plus :

- 1- de la Fouchardière A, Castillo C, Vergier B. Tumeurs mélanocytaires cutanées. *Ann Pathol* 2016 ; 36 (5) : 314-46.
- 2- Vergier B, de la Fouchardière A, Castillo C, *et al.* Tumeurs mélanocytaires. In : J Wechsler. *Pathologie cutanée tumorale (2^e édition)*. Maisons-Alfort : Sauramps, 2016.
- 3- Yeh I, de la Fouchardière A, Pissaloux D, *et al.* Clinical, histopathologic, and genomic features of Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol* 2015 ; 39 (5) : 581-91.
- 4- de la Fouchardière A. Classification moléculaire des mélanomes et implications thérapeutiques. *Correspondances en Onco-Théranostic* 2016 ; 3 : 110-4.
- 5- Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm MC Jr, Busam KJ, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology* 2016 ; 48 (2) : 113-31.