

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2021

THESE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**L'apport de l'anticorps anti-PRAME en immunohistochimie pour
distinguer les lésions mélanocytaires bénignes et malignes par
rapport aux autres outils immunohistochimiques déjà utilisés en
pratique courante.**

Présentée et soutenue publiquement le 26 novembre 2021 à 16h
au Pôle Formation
Par Jérémie PASSOS

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Philippe MODIANO

Madame le Docteur Marie CRINQUETTE

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Pierre GOSSET

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACPA : analyse chromosomique par puce à ADN

ADN : acide désoxyribonucléique

ALM : acral lentiginous melanoma

AR : acide rétinoïque

ARN : acide ribonucléique

BIN : BAP1 inactivated naevus

CGH : comparative genomic hybridization

CNV : copy number variation

CPNPC : carcinome pulmonaire non à petites cellules

CTA : cancer testis antigen

CSD : chronic sun damage

CTL : cytotoxic T lymphocytes

FISH : fluorescence in situ hybridization

GEP : genomic expression profiles

HES : Hémalun Eosine Safran

HLA : human leucocyte antigen

LMC : leucémie myéloïde chronique

LMM : lentiginous malignant melanoma

LRR : leucine rich repeat

MLM : mucosal lentiginous melanoma

ORL : oto-rhino-laryngée

OMS : organisation mondiale de la santé

PAM : primary acquired melanosis

PCR : polymerase chain reaction

PLA : pigmented lesion assay

ROC : receiver operating characteristic

RT-PCR : reverse transcriptase polymerase chain reaction

qRT-PCR : quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

SSM : superficial spreading melanoma

TILS : tumour infiltrating lymphocytes

TNM : tumor nodes metastasis

VPN : valeur prédictive négative

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
INTRODUCTION	2
I. Épidémiologie et santé publique.....	2
II. Lésions mélanocytaires et concept de « spectre lésionnel ».....	4
III. Tumorigénèse mélanocytaire	5
IV. Sous-groupes lésionnels et mode d'exposition solaire	10
V. Classification des différents « spectres lésionnels ».....	12
VI. Outils diagnostiques pour l'évaluation de la malignité.....	17
A. Outils immunohistochimiques	17
B. Outils cytogénétiques	20
C. Vue d'ensemble des outils complémentaires disponibles	24
VII. Le manque de reproductibilité diagnostique	25
VIII. L'origine de <i>PRAME</i> et ses sites anatomiques d'expression	27
IX. Les grandes fonctions de <i>PRAME</i>	29
X. <i>PRAME</i> & la cancérogénèse	31
XI. Régulation d'expression génique de <i>PRAME</i>	31
XII. L'apport diagnostique de <i>PRAME</i> dans les lésions mélanocytaires	35
A. En pratique clinique	35
B. En anatomie et cytologie pathologiques	37
XIII. L'apport de <i>PRAME</i> dans l'évaluation pronostique	40
XIV. L'apport de <i>PRAME</i> dans le progrès thérapeutique.....	43
XV. Résumé des données concernant <i>PRAME</i> en oncologie	46
OBJECTIFS	47
I. Objectif principal.....	47
II. Objectifs secondaires	48
MATÉRIEL ET MÉTHODES	49
I. Sélection des cas	49
II. Analyse immunohistochimique.....	50
III. Analyse statistique	55
RESULTATS	57
I. Données descriptives.....	57
II. Courbe ROC de l'analyse par anticorps anti- <i>PRAME</i>	58
III. Résultats des tests immunohistochimiques	59
IV. Comparaison de performance des tests immunohistochimiques.....	61
V. Résultats complémentaires	63
DISCUSSION	64

I.	Justification de l'étude	64
II.	Comparaison par rapport aux données de la littérature.....	65
III.	Anticorps anti-PRAME versus anti-P16, HMB45 et Ki67.....	66
IV.	Intérêt d'étudier l'intensité de marquage pour l'anticorps anti-PRAME.....	71
V.	Influence des variables histologiques sur l'analyse anti-PRAME	72
VI.	Intérêt de l'anticorps anti-PRAME dans les lésions mélanocytaires « fines » et rares pièges associés	74
VII.	Piège dans le spectre des lésions de « spitz » et mélanomes desmoplastiques	79
VIII.	Intérêt de la combinaison de l'anticorps anti-PRAME et anti-HMB45	80
IX.	Limites de l'étude.....	81
X.	Proposition d'algorithme d'utilisation de l'anticorps anti-PRAME dans les lésions mélanocytaires.....	82
XI.	Résultats discordants et perspectives.....	85
	CONCLUSION	89
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
	ANNEXES	96

RESUME

Contexte : Les lésions mélanocytaires représentent une grande proportion de l'activité diagnostique dans la pratique de l'anatomie et cytologie pathologiques. Il est cependant parfois difficile de déterminer leur potentiel de malignité. Les anticorps anti-HMB45, p16, et Ki67 sont les outils immunohistochimiques les plus fréquemment utilisés dans l'aide à l'interprétation de ces lésions, en complément de l'analyse microscopique par coloration standard (HES). Récemment, l'anticorps anti-PRAME est apparu comme un test performant pour distinguer les lésions bénignes et malignes. L'objectif de ce travail est de déterminer sa place par rapport aux trois autres outils immunohistochimiques cités dans la discrimination des lésions mélanocytaires bénignes et malignes.

Méthode : Une analyse rétrospective a été menée sur 140 lésions mélanocytaires malignes et bénignes de diagnostic non équivoque et une analyse immunohistochimique par anticorps anti-HMB45, p16, Ki-67 et anti-PRAME a été réalisée pour chaque lésion (à l'exception de l'analyse par anti-Ki67 réalisée seulement au sein du groupe des lésions malignes). Le statut de réactivité des cellules tumorales pour anti-PRAME a été évalué par deux observateurs indépendants en utilisant deux méthodes distinctes. Le résultat évocateur de malignité ou de bénignité de chacun des trois autres tests a également été interprété par lecture collégiale. Le diagnostic final de malignité ou bénignité de chaque lésion était fondé sur le seul examen morphologique (coloration standard par HES), représentant le gold standard de notre étude. La sensibilité, la spécificité et la concordance diagnostique de chaque test immunohistochimique ont ensuite été calculées en référence à ce gold standard, puis comparées les unes aux autres.

Résultats : Le taux de concordance diagnostique avec le gold standard pour anti-PRAME, HMB45 et p16 était respectivement de 95 %, 87,3 % et 85,2 %, et la sensibilité d'anti-Ki-67 dans le groupe « malin » était de 0,574. La comparaison statistique de ces résultats a montré une supériorité significative d'anti-PRAME sur anti-P16 et une supériorité à la limite de la significativité ($p=0,052$) sur anti-HMB45 pour distinguer les lésions bénignes et malignes. Par ailleurs, le résultat de l'analyse par anti-PRAME n'est significativement influencé par aucune des autres variables histologiques étudiées, en dehors de la malignité ou bénignité, et à l'exception de la régression tumorale de façon minime (coefficient de corrélation à -0,3). Enfin, la sensibilité de l'analyse par anti-PRAME est de 100% au sein du sous-groupe des mélanomes « fins », dans lequel les autres anticorps ne sont pas interprétables.

Conclusion : En considérant certaines exceptions telles que les lésions spitzoïdes et mélanomes desmoplastiques, l'anticorps anti-PRAME apparaît supérieur aux outils immunohistochimiques existants (anti-HMB45, p16 et Ki-67) pour distinguer des lésions mélanocytaires malignes et bénignes de diagnostic univoque. Il s'agit par ailleurs d'un marqueur qui n'est pas influencé par les autres variables histologiques et d'un outil diagnostique très fiable dans les lésions mélanocytaires « fines ». Malgré sa grande robustesse et sa reproductibilité diagnostique, certains pièges doivent être évités lors de son utilisation et un algorithme diagnostique l'intégrant à l'ensemble des données cliniques, histologiques et aux autres outils immunohistochimiques est ainsi proposé car l'étude morphologique reste l'outil principal de la décision diagnostique.

INTRODUCTION

I. Épidémiologie et santé publique

Le mélanome représente un problème de santé publique puisqu'il est responsable d'environ 1600 décès chaque année en France. (1) Son incidence a par exemple augmenté de 270 % aux États-Unis entre 1973 et 2002. (2) Contrairement à la majorité des autres tumeurs solides, le mélanome touche des personnes relativement jeunes avec un âge médian d'apparition de 55 ans.



Figure 1. Épidémiologie des mélanomes cutanés en France.
Source : Santé publique France.

Tandis que la mortalité s'est stabilisée ces dernières années, l'incidence du mélanome a continué d'augmenter et la communauté scientifique a cherché à expliquer cette divergence. Bien que le progrès thérapeutique puisse en parti expliquer cette stabilisation de mortalité, l'augmentation du nombre de mélanomes dépistés à un stade plus précoce y participe également. Une telle évolution peut donc être due, au moins partiellement, au dépistage et à un « sur-diagnostic » de lésions potentiellement indolentes. (3–5). L'augmentation de dépistage et d'incidence des mélanomes « fins » contraste avec la faible évolution d'incidence des lésions épaisses de stade plus évolué. (6) L'incidence globale se voit donc artificiellement augmentée par l'exérèse de tumeurs « histologiquement malignes » mais au comportement évolutif « biologiquement bénin ». A contrario, il existe peu de preuves évoquant une augmentation réelle de fréquence des tumeurs « biologiquement malignes ».

Il est donc de plus en plus fréquent que le diagnostic de mélanome soit retenu chez des patients atteints de tumeurs mélanocytaires « fines » et « biologiquement bénignes ». (4) Même si cela permet une prise en charge thérapeutique plus précoce, les limites des critères histo-pathologiques face à ces lésions précoces entravent l'identification de lésion pouvant véritablement menacer le pronostic vital.

A l'instar de l'évolution de dépistage du cancer de prostate (3), les médecins pathologistes doivent s'attendre dans les prochaines années à être de plus en plus confrontés aux exérèses « d'identification » (à visée diagnostique) de tumeurs mélanocytaires dépistées à un stade précoce.

Plus précisément, les lésions dites « ambiguës », dont le diagnostic de malignité est équivoque mais parfois de potentiel évolutif faible, sont de plus en plus courantes et il reste indispensable de statuer quant à leur gravité et à la conduite thérapeutique à tenir pour le patient.

II. Lésions mélanocytaires et concept de « spectre lésionnel »

Malgré l'avènement de l'étude génomique à grande échelle et à haute résolution, le Gold Standard du diagnostic de mélanome reste aujourd'hui l'examen histopathologique. Il s'effectue après coloration par hématoxyline-éosine-safran (HES), parfois complétée par des techniques immunohistochimiques d'appoint. (7) Cette analyse permet également de classifier les lésions en divers sous-types en combinaison avec le contexte clinique.

Les différentes tumeurs mélanocytaires représentent des maladies très variables. De nombreux « spectres lésionnels » sont décrits et englobent des sous-types histologiques différents. (8) Des études récentes proposent la succession de mutations oncogénétiques comme mécanisme nécessaire au développement du mélanome et ces mutations varient en fonction des spectres lésionnels. Ces données sur la mélanomagénèse ont également permis de développer l'idée d'un « continuum lésionnel » entre lésions bénignes et malignes, impliquant donc une catégorie « intermédiaire » de néoplasie mélanocytaire.

On qualifie ainsi de néoplasie « intermédiaire » les lésions caractérisées par la présence de plus d'une mutation génétique pathogène (en opposition à une lésion bénigne) mais aux caractéristiques histopathologiques insuffisantes pour correspondre à une lésion maligne. (9)

III. Tumorigénèse mélanocytaire

Schématiquement, la progression des tumeurs mélanocytaires est décrite en quatre étapes majeures. La tumorigénèse mélanocytaire commence par une mutation génétique « driver », initiant le passage d'une population mélanocytaire non tumorale à une population néoplasique et clonale, initialement bénigne.

Progression schématique des tumeurs mélanocytaires selon l'OMS 2018

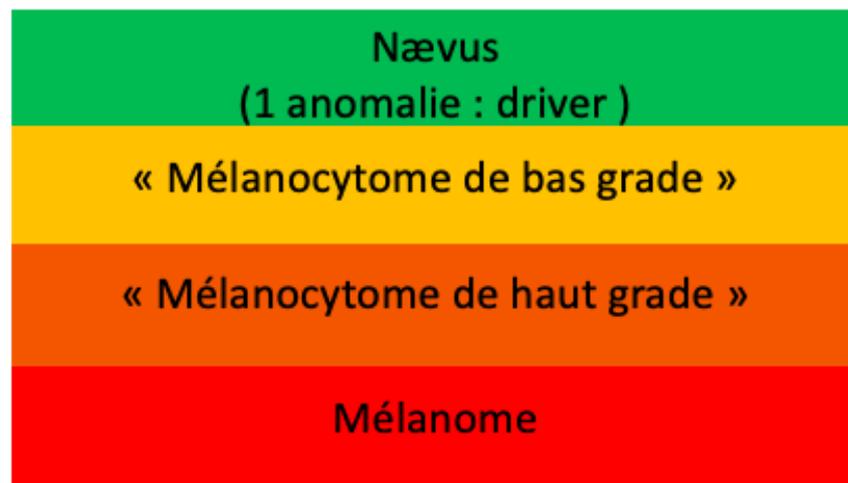


Figure 2. Progression schématique des tumeurs mélanocytaires selon l'OMS 2018.

Dans chaque spectre lésionnel, une première mutation oncogénétique active la voie de signalisation des « protéines-kinases activées par les mitogènes » (« voie MAPK ») et correspond au phénomène initiateur (anomalie « driver »). (9)

Cette mutation correspond le plus souvent à une mutation ponctuelle dans le gène *BRAF* ou *NRAS*, et plus rarement à la production d'un gène de fusion par réarrangement chromosomique.

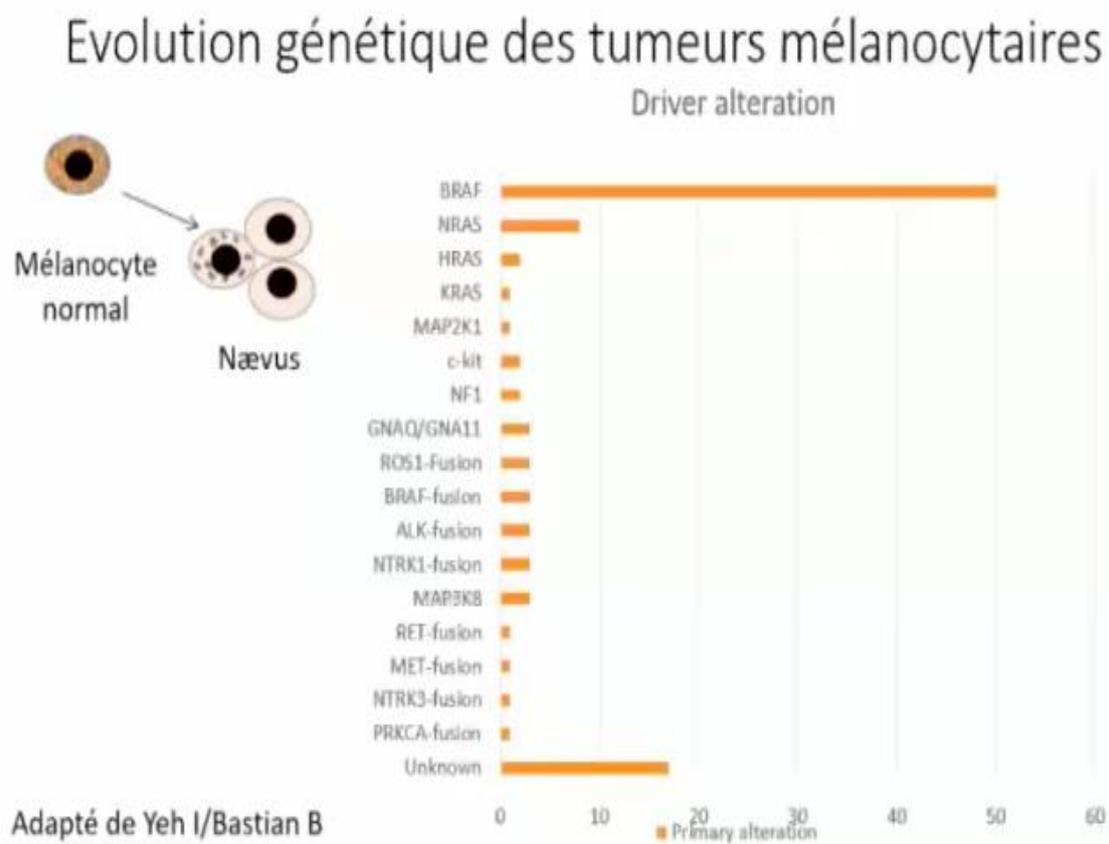


Figure 3A. Fréquence des mutations oncogénétiques « driver » impliquées dans la progression des tumeurs mélanocytaires.

Source : B. Vergier et A. De La Fouchardière. Plateforme Nationale des Disciplines SIDES. DES Anatomie et Cytologie Pathologiques. Prolifération tumorale mélanocytaire.

Les stades lésionnels ultérieurs (« mélanocytome » puis mélanome) abritent généralement des mutations supplémentaires qui n'étaient pas présentes au stade précurseur. Elles se sont produites dans un second temps, impliquant à ce stade des mutations oncogénétiques contribuant à la progression tumorale ainsi qu'à l'acquisition du potentiel de malignité. (9) Une évolution clonale des cellules tumorales est ainsi observée :

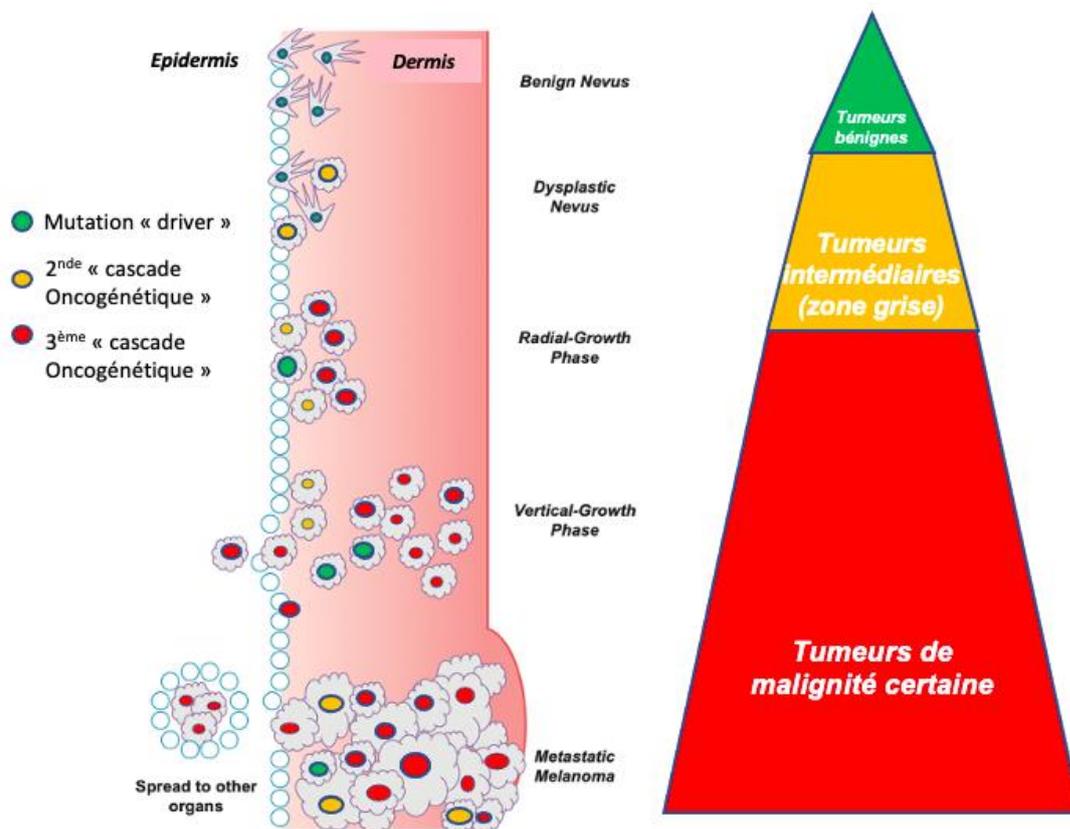


Figure 3B. Évolution génétique et clonale des lésions mélanocytaires. Adapté de Andrea Aquilato et al. BRAF Mutation in Melanoma and Dietary Polyphenols as Adjunctive Treatment Strategy.

Dans ce sens, Shain *et al.* se sont intéressés à 37 lésions mélanocytaires malignes dans le but de déterminer la chronologie d'apparition des différentes mutations oncogénétiques.

Au sein de chacune de ces lésions, la périphérie du mélanome comportait des secteurs de stades lésionnels précurseurs.

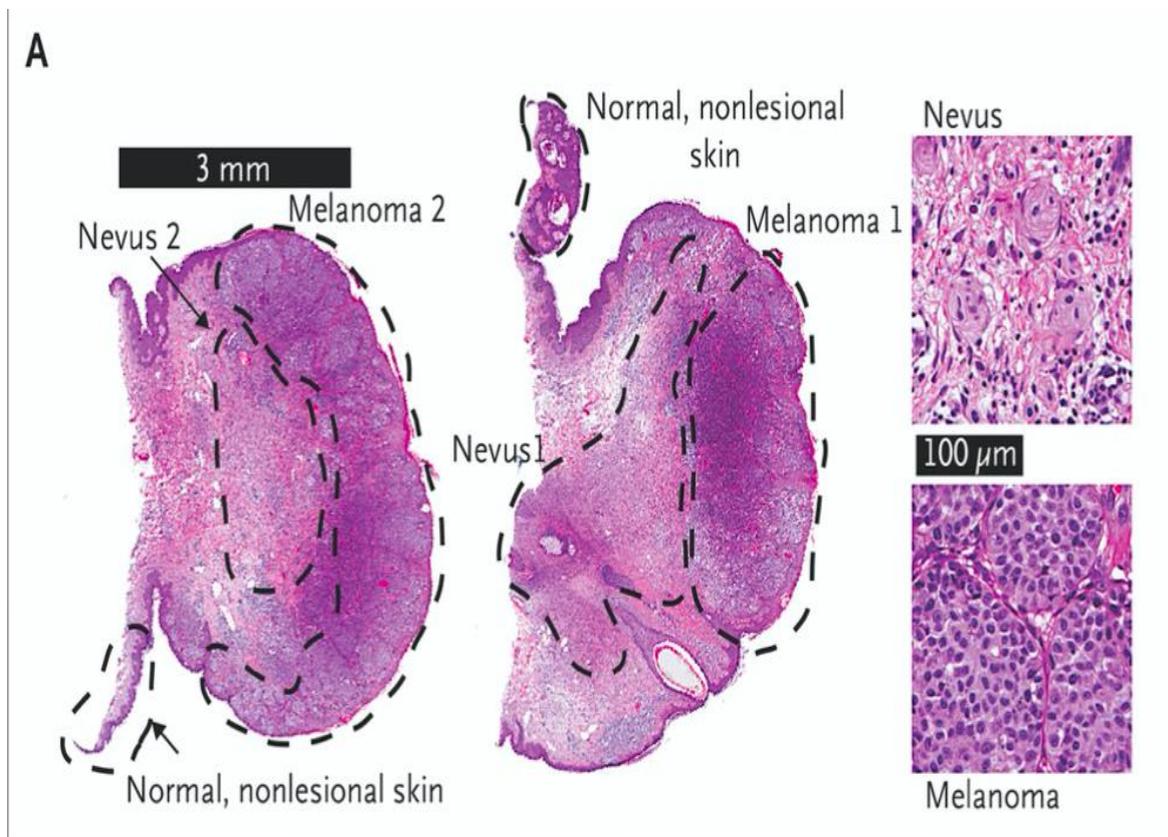


Figure 4. Environnement péri-tumoral des mélanomes et stades précurseurs.
Source: Shain *et al.* *The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor*. 2015.

Au total, 77 % des secteurs dits « intermédiaires » ou secteurs de mélanomes « in situ » (mélanome débutant) hébergeaient des mutations du promoteur *TERT*. Cette constatation indique que les mutations de *TERT* apparaissent à un stade précoce de la séquence de la mélanomagénèse.

L'inactivation bi-allélique de *CDKN2A* (codant la protéine P16) est apparue exclusivement dans des zones de mélanomes invasifs (mélanome évolué). Enfin, les mutations de *PTEN* et *TP53* n'ont été mises en évidence que dans les stades encore plus tardifs. De façon similaire, les variations du nombre de copies de gènes (différent de deux copies) observées par hybridation génomique comparative ne s'observent que tardivement dans la séquence évolutive contrairement aux mutations ponctuelles de gènes.

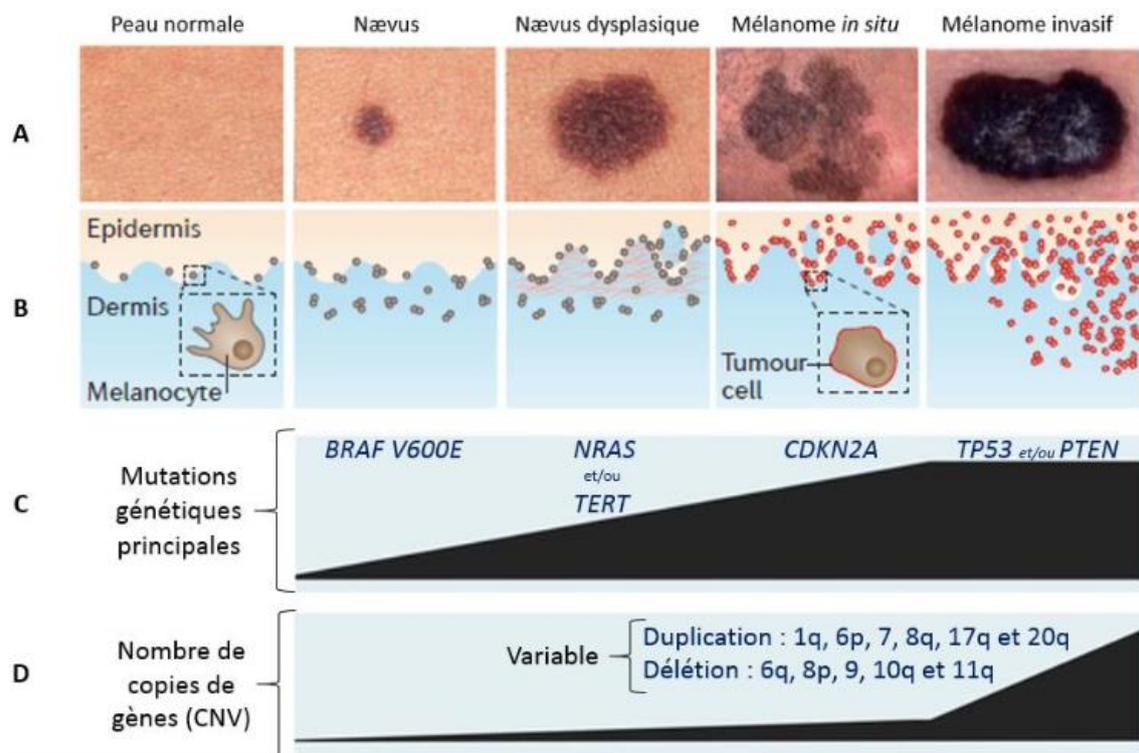


Figure 5. Proposition de modèle scientifique illustrant la progression d'un nævus à un mélanome.

Source: Hunter Shain A. & Bastian BC. *From melanocytes to melanomas*. Nature Reviews Cancer. 2016.

IV. Sous-groupes lésionnels et mode d'exposition solaire

Les recherches sur ces mutations oncogénétiques ont aussi permis de renforcer l'idée que plusieurs sous-types lésionnels existaient. On distingue d'abord deux grands groupes de lésions dans lesquels les mutations sont différentes en fonction du terrain d'exposition solaire. (10) On décrit :

-Les lésions faisant suite à une exposition solaire faible dans le temps et/ou intermittente (dites « Non-chronic sun damage » ou « Non-CSD »), entraînant des mélanomes de sujets plus jeunes et situés sur des zones photo-protégées. Ce groupe lésionnel implique principalement la mutation « driver » *BRAF* p.V600E.

-les lésions faisant suite à une exposition solaire importante dans le temps (« High chronic sun damage » ou « High CSD »), entraînant des mélanomes le plus souvent situés sur zones photo-exposées et chez des patients plus âgés. Cette catégorie implique principalement des mutations de *NRAS*, *KIT*, *BRAF* (non p.V600E) et *NF1*. Il est important de mentionner que les mélanomes de ce groupe lésionnel ne se développent pas sur nævus pré-existant mais font d'emblée suite à un mélanome intra-épidermique (« in situ »).

A ces deux catégories s'ajoutent les lésions n'ayant pas de lien avec l'exposition solaire (mélanomes uvéaux, mélanomes muqueux...) et dont les mutations oncogénétiques sont plus ou moins spécifiques.

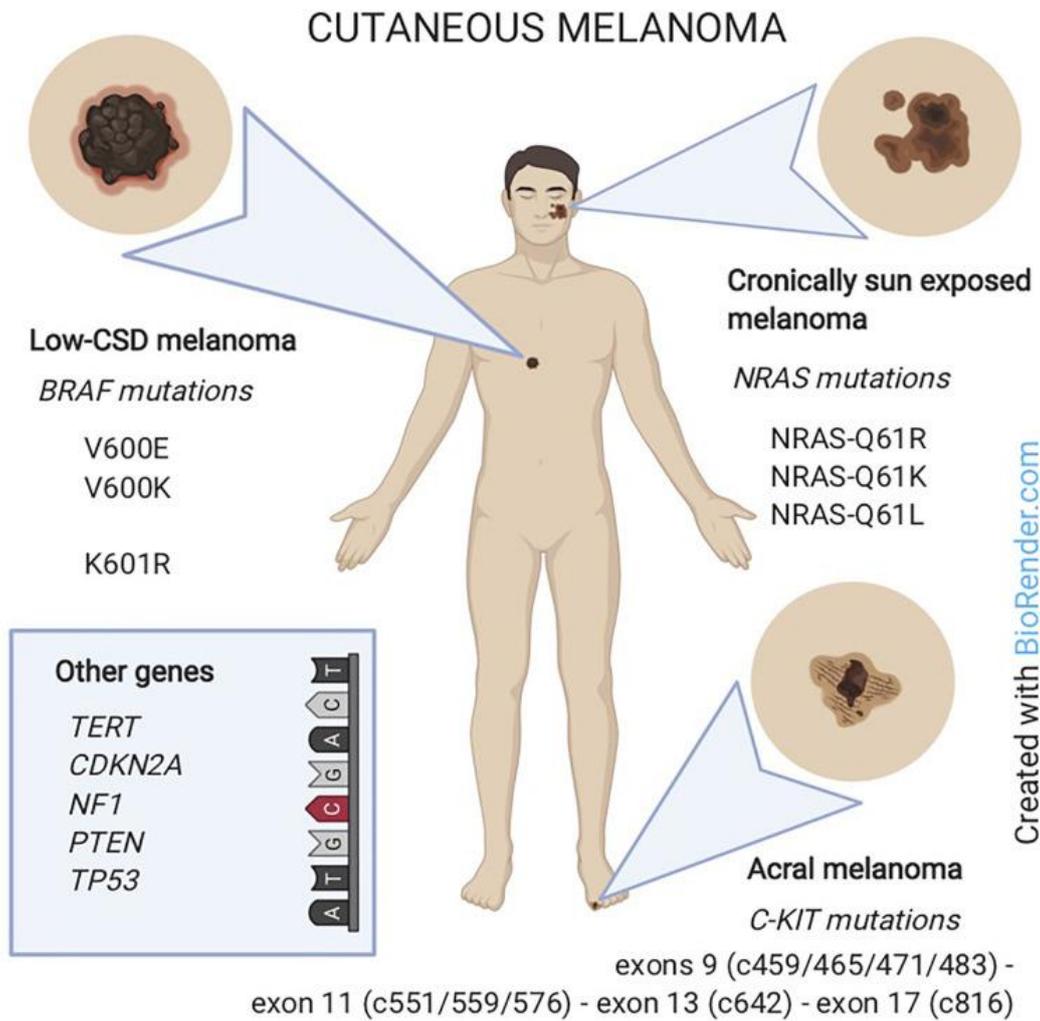
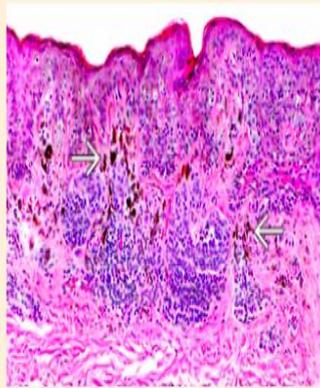
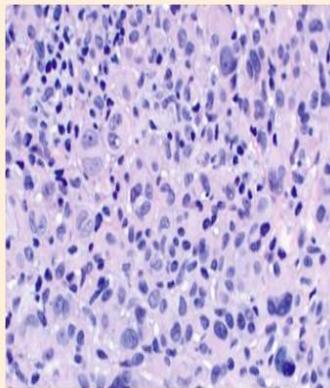
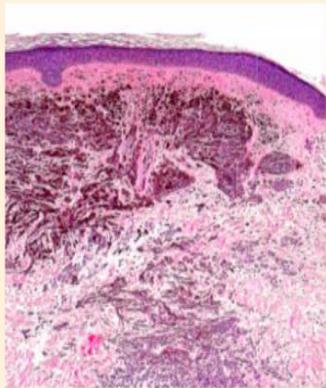


Figure 6. Classification des mélanomes en fonction du terrain d'exposition solaire et leurs caractéristiques génomiques associées.

Source: Source : Scatena et al. *Cutaneous Melanoma Classification : The Importance of High-Throughput Genomic Technologies subtypes genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities.* 2021.

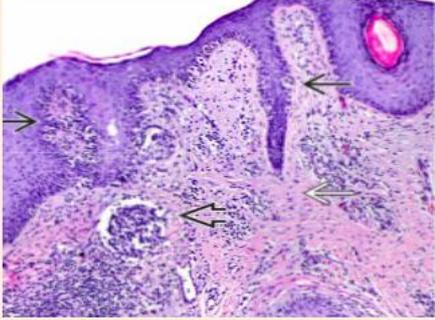
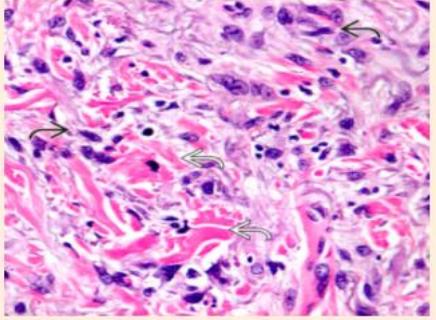
V. Classification des différents « spectres lésionnels »

Toutes ces données ont en partie contribué à établir la classification multidimensionnelle de l'Organisation Mondiale de la Santé des lésions mélanocytaires, basée sur le contexte épidémiologique, clinique, histopathologique et désormais génomique :

Exposition solaire sous-jacente Groupe ou spectre lésionnel	Dommages solaires légers Tumeurs "Low chronic sun damage" (Low CSD)		
Lésion bénigne précurseur	Naevus commun		
Lésion intermédiaire	Naevus atypique (ou "dysplasique")	Naevus "BAP-1 inactive" (BIN)	"Deep penetrating Naevus" (DPN)
Lésion maligne	Mélanome superficiel extensif (SSM)	Mélanome développé sur BIN	Mélanome sur DPN
Contexte clinique	<u>Mélanome SSM</u> : lésions très fréquentes, Ratio H/F = 1, souvent localisée au tronc ou membres.	<u>Mélanome développé sur BIN</u> : lésions rares, sujets jeunes (médiane à 30 ans), possible prédisposition génétique (syndrome BAP1).	<u>Mélanome sur DPN</u> : lésions rares, sujets jeunes (env 10-30 ans), souvent à la tête/cou et tronc.
Critères histologiques principaux :	<u>Mélanome SSM</u> : architecture en thèques et migration trans-épidermique pagétoïde de grandes cellules tumorales.	<u>BIN</u> : contingent clonal de cellules de morphologie épithéloïde, BAP1 négatives en IHC.	<u>DPN</u> : lésion d'extension profonde, d'architecture plexiforme et invasive, cytologie épithéloïde ou fusiforme.
			
Mutations impliquées les plus fréquentes (Mutations ponctuelles, translocations chromosomiques)	Mutation activatrice de <i>BRAF</i> p.V600E	Mutation inactivatrice de <i>BAP1</i>	Mutation activatrice de <i>CTNNB1</i>

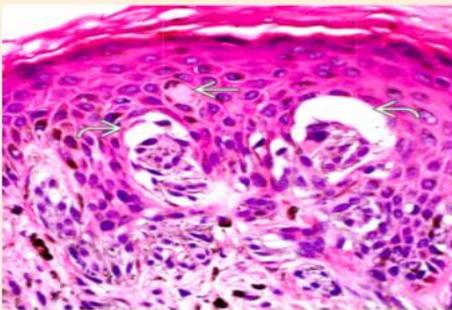
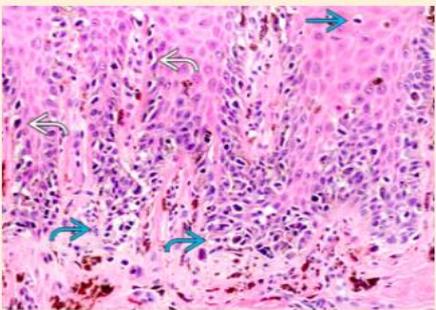
Dommages solaires sévères	
Tumeurs "High chronic sun damage" (High CSD)	Spectre des lésions desmoplastiques
Absence de précurseur	Absence de précurseur
Lentigo malin in situ	Mélanome in situ
Mélanome lentigineux invasif (LMM)	Mélanome desmoplastique

<p>LMM : patients âgés, localisation à la tête et cou, lésions planes irrégulières de croissance lente.</p> <p>LMM : lésion lentigineuse composée de mélanocytes confluents et atypiques, extension aux annexes et infiltration dermique, élastose sévère associée.</p>	<p>Mélanome desmoplastique : lésions rares, patients âgés, lésion mimant une cicatrice, de couleur claire.</p> <p>Mélanome desmoplastique : lésion infiltrante fusiforme et mal limitée, contingent épidermique in situ sus-jacent, agrégats lymphoïdes et élastose sévère associés.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	
<p>Mutation activatrice de <i>NRAS</i> +++ (ou <i>BRAF</i> non p.V600E et <i>KIT</i>)</p>	<p>Mutation de inactivatrice de <i>NF1</i> (ou mutation de <i>NFKBIE</i>)</p>

Dommages solaires très faibles ou inexistants	
Spectre des lésions de spitz	Spectre des lésions acrales
Naevus de spitz	Absence de précurseur
Naevus de spitz atypique	Mélanome in situ en zone acrale
Mélanome de spitz	Mélanome acral invasif (ALM)

<p>Naevus de spitz : enfants et jeunes adultes, face ou tronc, lésion papuleuse rosée.</p> <p>Naevus de spitz : lésion bien limitée de silhouette triangulaire, cellules épithéloïdes ou fusiformes organisées en thèques, fentes de rétraction et corps de Kamino.</p>	<p>ALM : plus fréquent chez les sujets d'Asie et d'Afrique, lésion des extrémités de modification récente.</p> <p>ALM : lésion lentigineuse comprenant des thèques d'architecture variable à la jonction dermo-épidermique, atypies mélanocytaires avec noyaux hyperchromatiques.</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	
<p>Translocations de <i>ALK</i>, <i>ROS1</i>, <i>NTRK1/3</i>, <i>RET</i> (ou mutation activatrice de <i>HRAS</i>)</p>	<p>Mutation activatrice de <i>KIT/HRAS/BRAF</i></p>

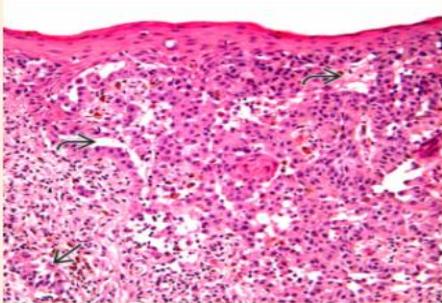
Dommages solaires très faibles ou inexistants Spectre des lésions muqueuses	Dommages solaires très faibles ou inexistants Spectre des lésions congénitales
Absence de précurseur	Naevus congénital
Mélanome in situ en zone muqueuse	Nodule sur naevus congénital
Mélanome muqueux invasif (MLM)	Mélanome sur naevus congénital

Mélanome muqueux : rares, fréquemment au niveau de la vulve ou du gland et souvent de teinte achromique.

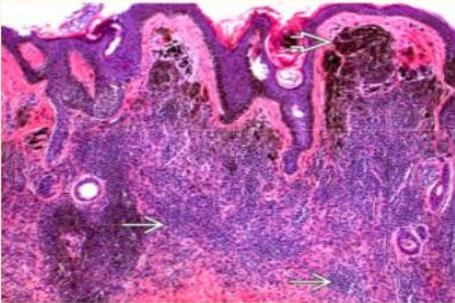
Naevus congénital : lésions de taille variable (parfois géante), aspect mameloné et souvent fortement pigmenté.

Mélanome muqueux : lésions polymorphes, plusieurs architectures possibles (SSM, lentigineux, nodulaire...).

Naevus congénital : lésion d'extension profonde avec annexotropisme mais conservation d'un gradient de maturation cytologique.



Mutation activatrice de *KIT* (ou *NRAS/BRAF*)



Mutation activatrice de *NRAS/BRAF p.V600E*

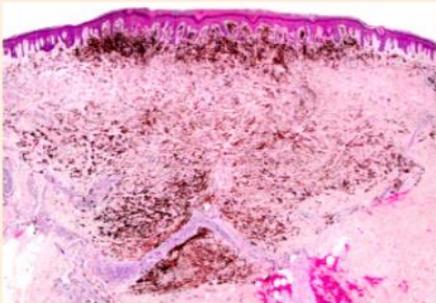
Dommages solaires très faibles ou inexistants Spectre des naevus bleu	Dommages solaires très faibles ou inexistants Spectre des lésions uvéales
Naevus bleu	Naevus
Naevus bleu cellulaire	Non connu
Mélanome sur naevus bleu cellulaire	Mélanome uvéal

Naevus bleu : lésions fréquentes, survient à tout âge, lésion bien limitée papulo-nodulaire, surélevée de couleur bleue à grisâtre, de bon pronostic.

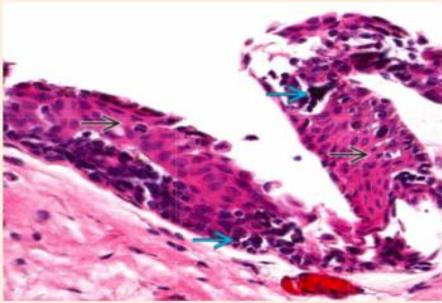
Naevus bleu : lésion dermique relativement bien limitée composée de mélanophages, de cytologie fusiforme +/- pigmentée, extension profonde et "silhouette en battant de cloche" pour le sous-type bleu cellulaire.

Mélanome uvéal : rares et plus fréquents chez les sujets âgés, au niveau de la conjonctive bulbaire le plus souvent.

Mélanome uvéal : lésion infiltrante et mal limitée, architecture pagétoïde de la composante mélanocytaire épithéliale.



Mutation activatrice de *GNAQ, GNA11*



Mutation activatrice de *GNAQ, GNA11*

Figure 7. Classification des lésions mélanocytaires selon l'OMS 2018.

Quel que soit le groupe lésionnel (« pathway ») et la mutation oncogénétique « driver » qui lui est rattachée, l'activation d'une voie de signalisation (touchant le plus souvent la voie des MAPK) stimule le cycle de prolifération cellulaire, permettant d'abord l'apparition d'une population mélanocytaire clonale et d'une néoplasie bénigne. (11)

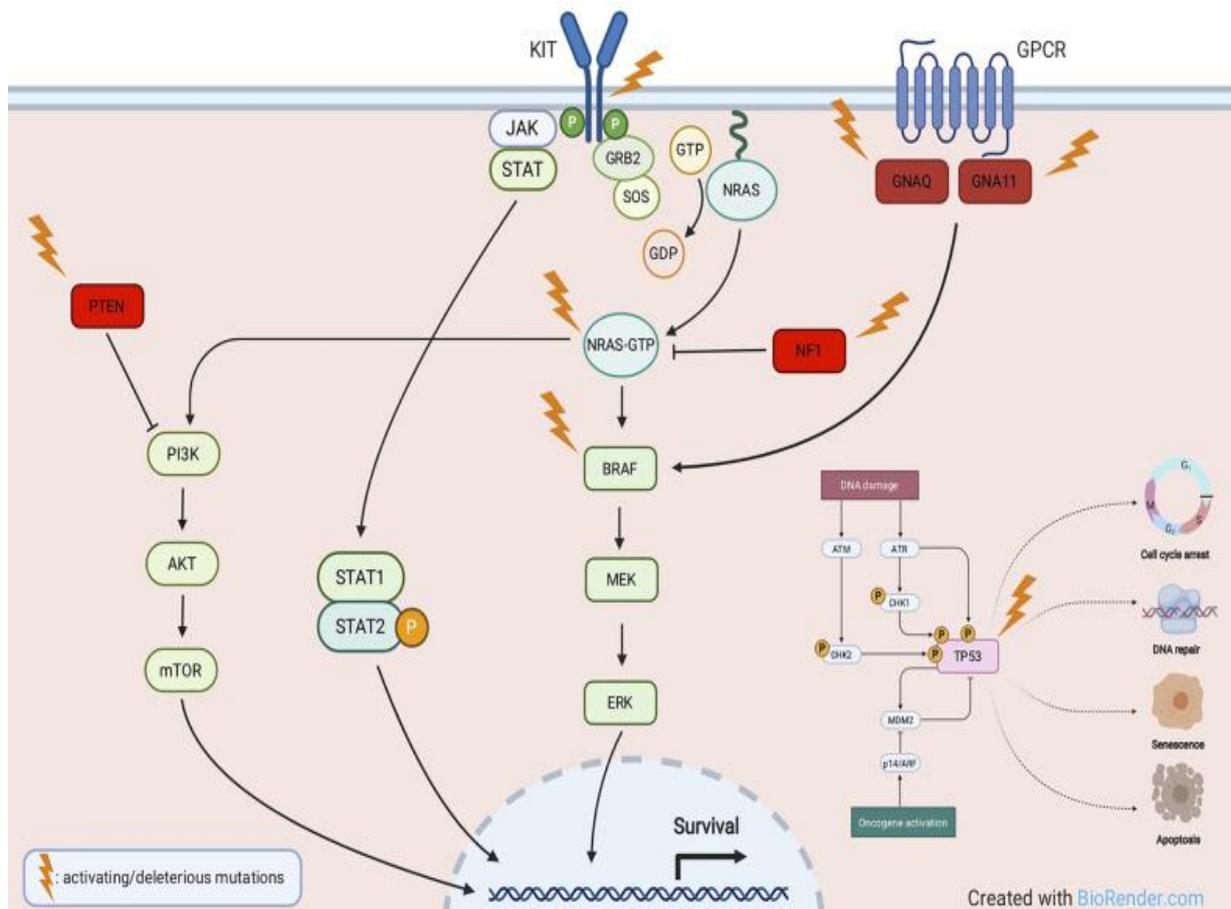


Figure 8. Principales voies moléculaires impliquées dans la mélanomagenèse. Les mutations activatrices sont couramment détectées dans les oncogènes comme KIT, NRAS, BRAF, GNAQ, GNA11, tandis que les mutations délétères affectent le plus souvent les gènes suppresseurs de tumeurs comme NF1, PTEN et TP53.

Source : Scatena et al. *Cutaneous Melanoma Classification : The Importance of High-Throughput Genomic Technologies subtypes genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities.* 2021.

Cette classification moléculaire des spectres lésionnels ne se limite pas au champ du diagnostic. La compréhension des signatures moléculaires des mélanomes a permis le développement de tests étudiant le profil d'expression génique (« gene expression profiling » ou GEP). Ces tests permettent de mieux prédire leur évolution y compris pour des mélanomes fins et précoces. (12) Ils sont aujourd'hui particulièrement utilisés à visée pronostique dans le spectre des mélanomes uvéaux. De plus, le développement de thérapies ciblées pour des patients en situation métastatique a également été rendu possible grâce à ces découvertes oncogénétiques. (11) L'exemple le plus classique est représenté par le traitement combiné avec inhibiteurs de *BRAF* et *MEK*. Cette classification représente donc finalement un outil diagnostique, pronostique et théranostique.

Le modèle de progression proposée par l'OMS 2018 a pour vocation de fournir une classification d'ordre histopathologique ; il s'agit d'un schéma linéaire relativement simplifié qui doit être accepté en gardant à l'esprit qu'il existe non seulement de multiples voies de la mélanomagenèse, mais aussi que certaines des étapes intermédiaires présentées peuvent être contournées et que d'autres voies non linéaires existent. Le modèle non linéaire le plus fréquent et le plus important est de loin le mélanome « de novo ». Dans une méta-analyse réalisée par Pampena et al. portant sur 38 études observationnelles à type de cohortes et cas-témoins, seuls 29,1 % des mélanomes sont associés à des nævus. (13,14)

Ces travaux portant sur l'association entre mélanome et nævus et basés uniquement sur l'histopathologie peuvent cependant présenter plusieurs biais : une composante bénigne peut être absente des niveaux tissulaires examinés ou bien être complètement détruite par la croissance maligne. Inversement, les zones périphériques ou profondes du mélanome peuvent avoir un aspect trompeur de «naevus » (par « pseudomaturation »). (14) Ceci explique en partie que la prévalence rapportée de mélanomes associés à un naevus varie considérablement selon les sources.

VI. Outils diagnostiques pour l'évaluation de la malignité

A. Outils immunohistochimiques

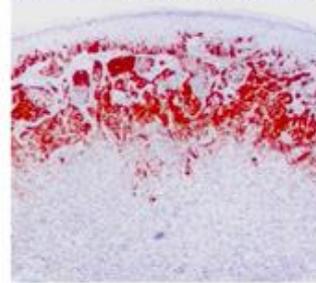
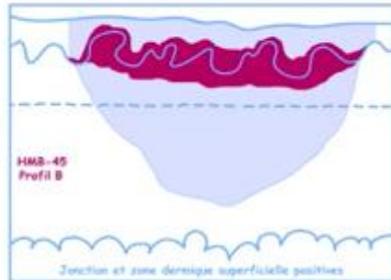
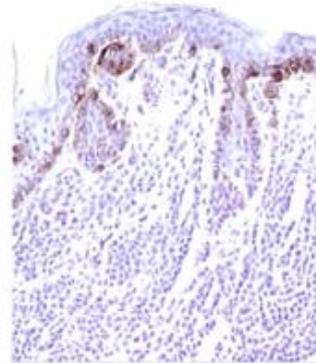
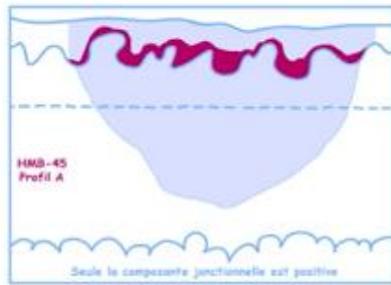
L'existence du continuum lésionnel entre néoplasie bénigne et maligne soulève malheureusement de nombreuses difficultés diagnostiques pour le médecin pathologiste. Indéniablement, les lésions mélanocytaires de catégorie « intermédiaire » sont de plus en plus fréquemment adressées pour étude microscopique aux pathologistes. Il existe heureusement divers outils complémentaires à la coloration standard pour étudier ces lésions parfois difficiles à classer.

Plusieurs examens immunohistochimiques existent. Les plus fréquemment utilisés en pratique courante pour statuer sur la malignité de ces lésions sont les anticorps anti-HMB45, anti-P16 et anti-Ki67. (15)

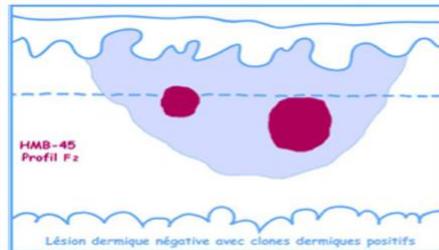
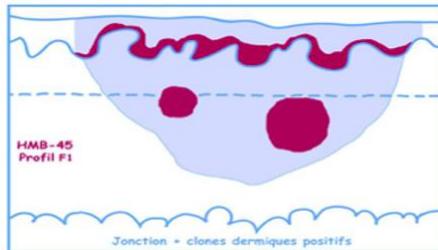
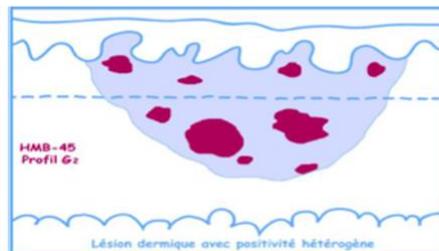
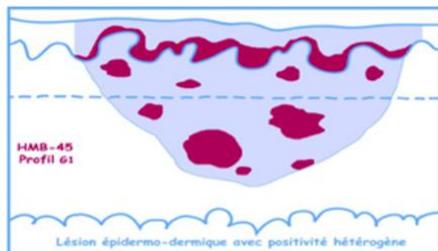
Selon le profil d'expression de ces trois antigènes par les cellules tumorales, le potentiel de malignité de la lésion étudiée est plus ou moins suspect.

A

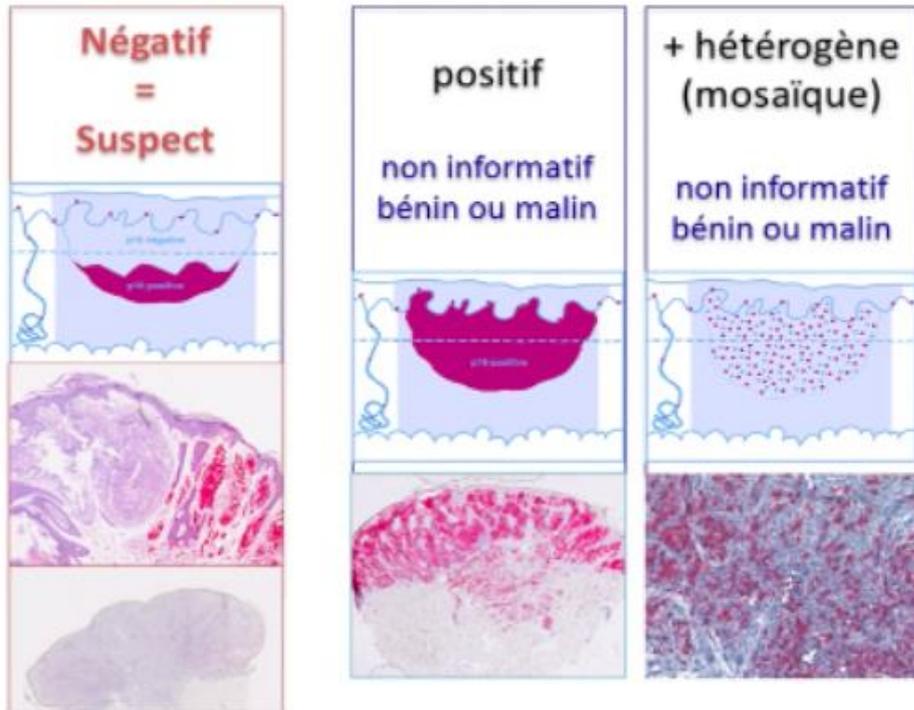
connotation bénigne



connotation maligne hétérogène / plurifocal



B



C

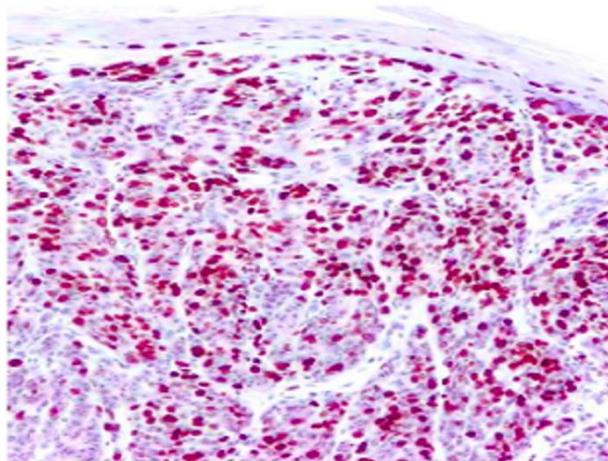


Figure 9. Profils d'expression immunohistochimique pour anti-HMB45 (A), P16 (B) et profil suggestif de malignité si index de prolifération >5% à l'étude par anti-Ki67 (C).
Source : B. Vergier et A. De La Fouchardière. Plateforme Nationale des Disciplines SIDES. DES Anatomie et Cytologie Pathologiques. Prolifération tumorale mélanocytaire.

B. Outils cytogénétiques

Rarement, des examens cytogénétiques complexes et coûteux sont utilisés dans les cas diagnostiques les plus difficiles. Par exemple, l'hybridation in situ par fluorescence (FISH), permet d'étudier de façon ciblée et simultanée 3 locus chromosomiques d'intérêt au sein des cellules tumorales. Il existe un « kit » commercial de FISH comportant 4 sondes chromosomiques complémentaires, marquées avec 4 fluorescents de couleurs différentes. (16,17)

Ce lot d'hybridation dit « FISH 4 couleurs » cible :

- La sonde RREB1, localisée sur le chromosome en 6p25, est marquée en SpectrumRed (Rouge) et couvre une région d'environ 638 kb qui contient la totalité du gène RREB1.
- La sonde MYB, localisée sur le chromosome en 6q23, est marquée en SpectrumGold (Jaune) et couvre une région d'environ 743 kb qui contient la totalité du gène MYB.
- La sonde CCND1, localisée sur le chromosome en 11q13, est marquée en SpectrumGreen (Vert) et couvre une région d'environ 378 kb qui contient la totalité du gène CCND1.
- La sonde CEP 6 est marquée en SpectrumAqua (Bleu) et s'hybride sur la région alpha satellite du centromère sur le chromosome en 6p11.1-q11. Le centromère du 6 est utilisé comme témoin interne de la technique (chaque cellule doit toujours avoir 2 signaux bleus centromériques)

En fonction du nombre de copies identifiées pour chaque locus chromosomique, cette analyse permet de distinguer les lésions malignes et bénignes avec une sensibilité et une spécificité respective de 87 % et 96 % dans une étude de 804 tumeurs mélanocytaires « ambiguës ». (18)

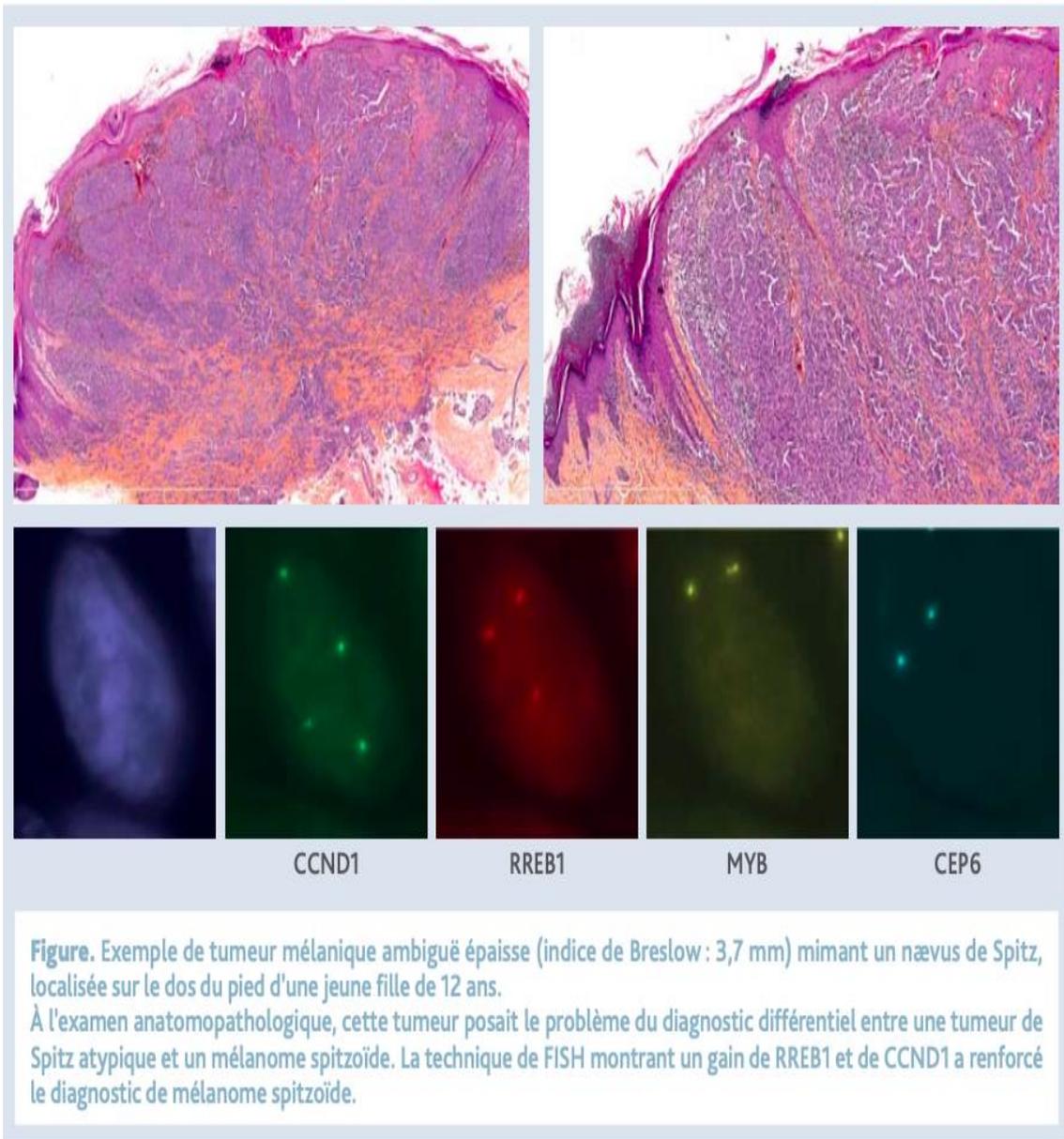


Figure 10. Profil chromosomique en hybridation in situ fluorescente (FISH) d'une tumeur mélanocytaire ambiguë évocateur de malignité.
 Source : Vergier et al. *Le diagnostic des tumeurs mélaniques d'interprétation difficile : la biologie moléculaire au service du pathologiste averti.*

L'étude globale de variation du nombre de copies de gène (« CNV ») par hybridation génomique comparative (CGH-array) représente également un outil dans la distinction de bénignité et malignité.

Boris C. Bastian *et al.* ont comparé 132 mélanomes et 54 naevus bénins par CGH-array. Il s'est avéré que 96,2 % des mélanomes présentaient une forme d'aberration chromosomique contre seulement 13 % des naevus. (19) Par ailleurs les sept cas bénins présentant un CNV appartenaient au même spectre lésionnel de « Spitz » et six d'entre eux contenaient un gain isolé, impliquant la totalité du bras court du chromosome 11. Cette aberration n'a par ailleurs été observée chez aucun des 132 mélanomes. Enfin, les mélanomes du spectre « acral » présentaient pour leur part un taux d'aberrations plus important que les autres lésions malignes. De la même façon que pour les mutations ponctuelles de gènes, il existe donc des différences marquées dans le profil chromosomique des mélanomes, dépendant de l'emplacement anatomique et du modèle d'exposition au soleil.

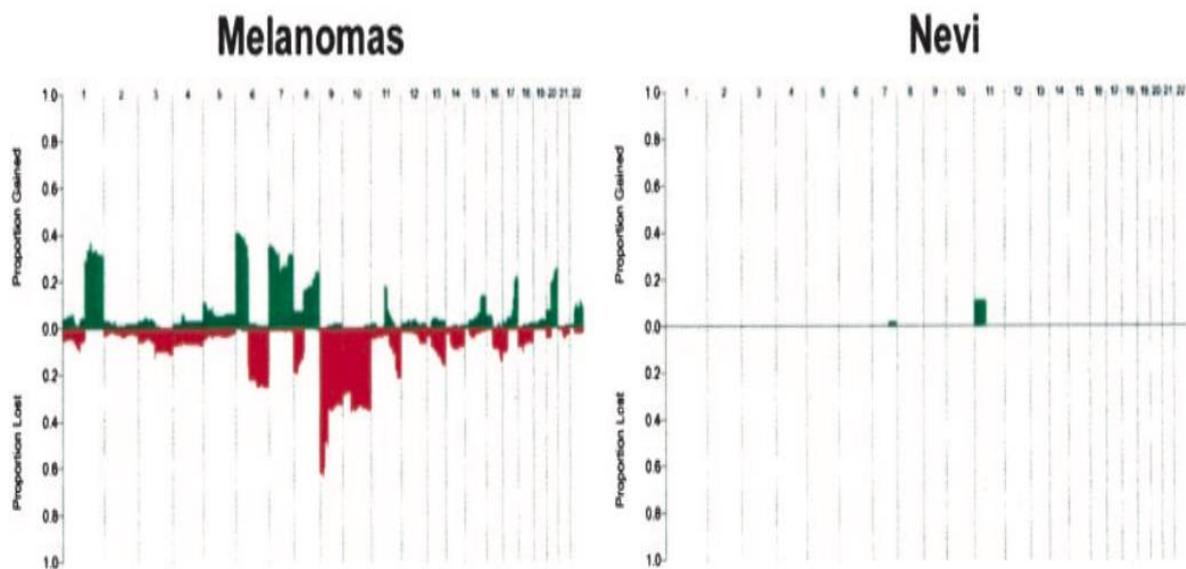


Figure 11. Variation du nombre de copies de gènes d'un mélanome en comparaison à celle d'un nævus.

Source: Bastian et al. *Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number changes*. 2003

Enfin, bien que les mutations oncogénétiques responsables de l'acquisition d'un potentiel de malignité soient désormais connues (cf supra), les analyses génétiques par biologie moléculaire sont rarement utilisées en pratique courante pour répondre à cette problématique en raison de leur difficulté d'accès, à la fois économique et technique.

C. Vue d'ensemble des outils complémentaires disponibles

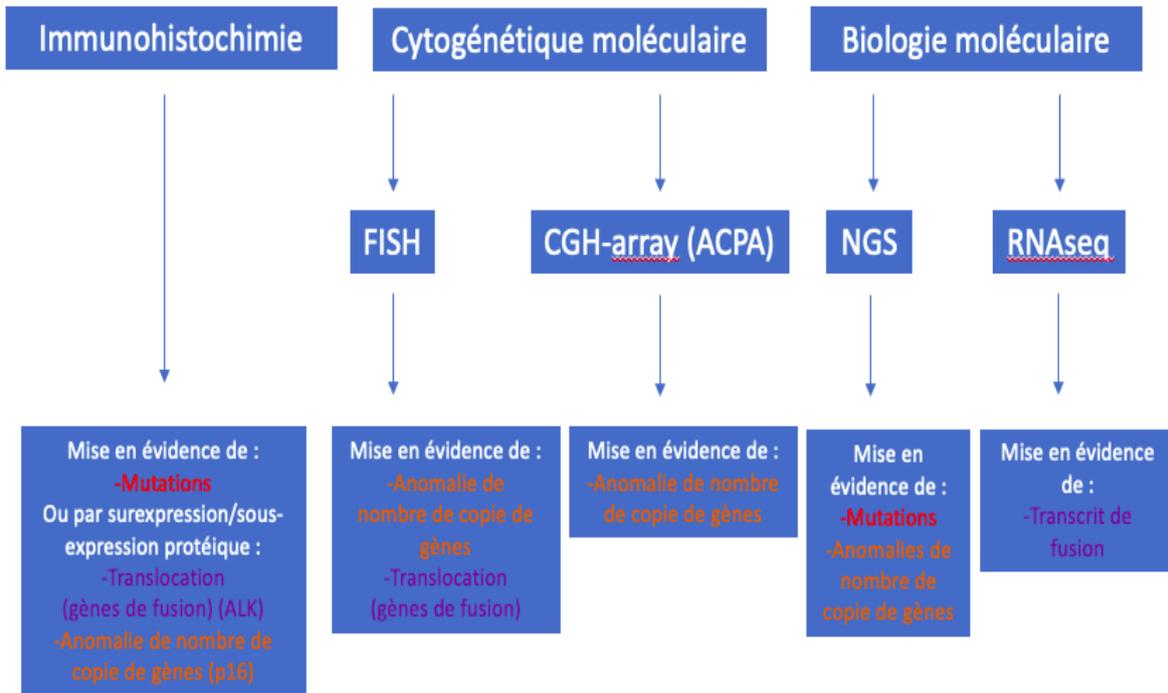


Figure 12. Résumé des examens complémentaires disponibles dans l'examen diagnostique et thérapeutique des lésions mélanocytaires.

Adapté de B.Vergier et A. de la Fouchardière.

VII. Le manque de reproductibilité diagnostique

Malgré les efforts déployés pour fournir de nouveaux outils diagnostiques fiables, le continuum lésionnel entre néoplasie bénigne et maligne explique que les pathologistes utilisent des critères de classification très variables en fonction de leurs habitudes individuelles et leurs formations. Malheureusement, la reproductibilité des diagnostics concernant les lésions situées en zone « intermédiaire » se retrouve fortement impactée et apparaît donc imparfaite. (20,21) En outre, si l'impact thérapeutique est moindre pour des lésions « fines » de faible potentiel évolutif, il sera conséquent pour les tumeurs ambiguës « épaisses » (indice de Breslow $\geq 1,5$ mm). La décision thérapeutique concernant ces lésions sera très variable selon le statut de malignité déterminé, allant d'une simple surveillance clinique à une résection chirurgicale complémentaire. (17)

Des études rapportent des niveaux élevés de discordance diagnostique dans l'interprétation de lésions mélanocytaires intermédiaires entre des pathologistes expérimentés. Il existe parfois même une discordance entre les experts eux-mêmes pour classer les lésions. En 1996, Corona *et al* avaient rapporté une corrélation inter-observateur selon le coefficient kappa de 0,61 à propos du diagnostic de mélanome cutané par rapport aux lésions bénignes. (21) Des résultats plus récents datant de 2017 et portant sur de plus grands effectifs soulignent que les diagnostics de lésion mélanocytaire intermédiaire (allant de néoplasie mélanocytaire « modérément dysplasique » à « mélanome invasif de stade précoce ») n'étaient ni reproductibles ni précis. (20)

A

Table 3 | Intraobserver concordance of 118 pathologists' interpretations of melanocytic skin biopsy lesions of the same case at phase 1 and phase 2 at least eight months apart*

Phase 1 diagnosis	Phase 2 diagnosis (No of paired interpretations)						Intraobserver concordance † % (95% CI)
	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V	Total	
Class I	1155	188	119	27	17	1506	77 (73 to 80)
Class II	170	227	182	37	28	644	35 (31 to 39)
Class III	91	120	653	169	58	1091	60 (56 to 63)
Class IV	20	37	147	531	105	840	63 (59 to 67)
Class V	14	16	44	105	852	1031	83 (80 to 85)
Total	1450	588	1145	869	1060	5112	67 ‡ (65 to 69)

Numbers of diagnostic interpretations with intraobserver agreement are emboldened.
 *Concordance rates are influenced by case composition, which included larger proportions of cases in classes II-V than would typically be encountered in practice.
 †Denominator is phase 1 interpretations and numerator is phase 2 assessments that agreed with phase 1 interpretation. Does not include participants who reviewed glass slides in phase 1 and digital images in phase 2.
 ‡Average κ for intraobserver agreement across participants is 0.57.

B

Table 4 | Interobserver concordance of pathologists' interpretations of melanocytic skin biopsy lesions. Pairwise comparison of interpretations by 187 participating pathologists in phase 1. Diagnoses for all possible ordered pairs of participants reading the same glass slide are included*

First pathologist's interpretation	Second pathologist's interpretation						Interobserver concordance † % (95% CI)
	Class I	Class II	Class III	Class IV	Class V	Total	
Class I	64 122	15 082	11 223	2993	1773	95 193	71 (69 to 73)
Class II	15 082	10 366	11 028	3974	1903	42 353	25 (22 to 27)
Class III	11 223	11 028	31 326	12 675	4494	70 746	45 (42 to 47)
Class IV	2993	3974	12 675	22 334	8854	50 830	46 (43 to 49)
Class V	1773	1903	4494	8854	50 926	67 950	77 (75 to 79)
Total	95 193	42 353	70 746	50 830	67 950	327 072	55 † (53 to 56)

Numbers of interpretations with agreement are emboldened.
 *Average pairwise agreement is an unweighted average across all participant pairs. The number of first pathologist interpretations for a given diagnostic class varies across pairs. Concordance rates are influenced by case composition, which included larger proportions of cases in classes II-V than would typically be encountered in practice. There are 6814 distinct order participant pairs \times 48 case interpretations per pair yielding 327 072 interpretations.
 †Average κ for interobserver agreement across all participant pairs is 0.42.

Figure 13. Variabilité intra-observateur (A) et inter-observateur (B) de l'évaluation diagnostique de lésions mélanocytaires plus ou moins ambiguës. Le spectre étudié s'étend depuis des lésions bénignes non ambiguës (« Class I ») aux lésions manifestement malignes (« Class V »). Les lésions situées à l'intermédiaire du spectre (« Class III ») correspondent à la catégorie de diagnostic le plus compliqué, situé à la frontière entre la bénignité et la malignité.
 Source: Elmore et al. *Pathologists' diagnosis of invasive melanoma and melanocytic proliferations: observer accuracy and reproducibility study.* 2017.

Face à cette problématique, il devient indispensable de déployer de nouveaux outils pour améliorer la précision diagnostique des lésions mélanocytaires. C'est en ce sens que l'antigène PRAME présente un réel intérêt.

VIII. L'origine de *PRAME* et ses sites anatomiques d'expression

Dans les années 1990, des lignées cellulaires de mélanome ont été produites à partir de métastases issues de plusieurs patients. Ces cellules tumorales de mélanomes métastatiques exprimaient plusieurs antigènes reconnus par des lymphocytes T cytolytiques autologues (CTL) sur des molécules HLA de classe I. En stimulant les lymphocytes par ces cellules tumorales, un clone lymphocytaire d'affinité limitée pour l'HLA-A24 et capable de lyser ces cellules a pu être identifié. *PRAME* est ainsi apparu comme le gène codant l'antigène du même nom, qui était reconnu spécifiquement et de façon restreinte par ces CTL.

PRAME est donc à l'origine d'un antigène exprimé préférentiellement par les cellules tumorales de mélanome (« preferentialy antigen melanoma expressed »). Il a été identifié comme le gène codant pour un peptide antigénique d'expression restreinte et en lien avec HLA-A24. Secondairement, le profil d'expression de cet antigène a permis de le définir comme appartenant au groupe « cancer-testis antigen » (CTA). (22) Ces antigènes codés par des gènes non mutés sont exprimés à des niveaux élevés dans les tissus germinaux et les tumeurs, mais sont absents ou détectés à de faibles taux dans les autres tissus. (22,23) Les cellules germinales masculines présentent un profil de déméthylation particulier à l'échelle du génome, expliquant la forte expressivité de *PRAME* dans cette localisation.

A contrario, la région régulatrice de *PRAME* est hyperméthylée dans la plupart des autres tissus physiologiques, expliquant sa faible expression génique dans ces localisations. (22) *PRAME* se distingue des autres antigènes du groupe CTA par une discrète expression dans d'autres tissus normaux tels que l'ovaire, les surrénales, le placenta et l'endomètre. (22,23)

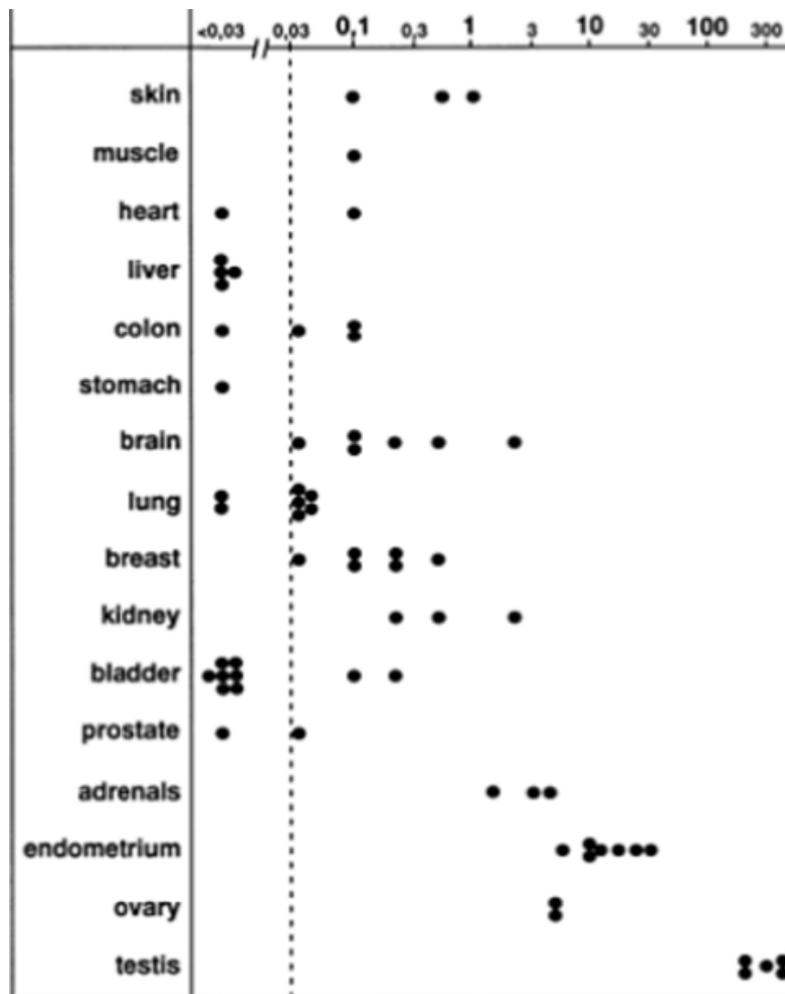


Figure 14. Niveau d'expression de *PRAME* dans les tissus normaux évaluée par RT-PCR.

Source: Ikeda et al. *Characterization of an Antigen That Is Recognized on a Melanoma Showing Partial HLA Loss by CTL Expressing an NK Inhibitory Receptor*. 1997.

IX. Les grandes fonctions de *PRAME*

Le gène humain *PRAME* est codé sur le brin inverse du chromosome 22 (22q11.22) et s'étend sur une région d'environ 12 kilobases. (23) Son homologie de séquence et des prévisions structurales suggèrent que l'antigène *PRAME* est lié à la famille des protéines « répétées riches en leucine » (LRR) ayant diverses fonctions. (23)

Ses fonctions physiologiques au sein des tissus normaux et des cellules tumorales sont peu connues à ce jour. L'existence d'un rôle dans la régulation de la signalisation de l'acide rétinoïque constitue cependant une hypothèse forte.

Il existe des preuves soulignant que *PRAME* puisse réguler négativement la signalisation de l'acide rétinoïque. Cette inhibition passe par le recrutement de protéines telles que EZH2, agissant en collaboration avec *PRAME* au niveau des complexes promoteurs de l'acide rétinoïque. (23) L'acide rétinoïque (AR) joue normalement un rôle dans l'arrêt de la prolifération ainsi que l'activation de la différenciation et l'apoptose cellulaire. En le considérant comme suppresseur de tumeur, un défaut dans sa voie de signalisation peut ainsi être impliqué dans la cancérogénèse.

Il a été démontré que *PRAME* avait la capacité d'agir comme répresseur dans la signalisation de l'AR, en se liant au récepteur de l'acide rétinoïque par le recrutement de diverses protéines (dont EZH2). Cette liaison empêche la cascade de signalisation de l'AR et la transcription des gènes situés en aval dans la voie de signalisation.

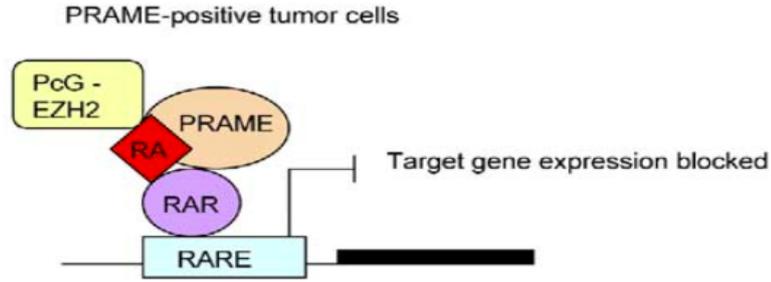


Figure 15. Mode d'action de PRAME sur la voie de l'acide rétinoïque.
 Source: Epping et al. *The Human Tumor Antigen PRAME Is a Dominant Repressor of Retinoic Acid Receptor Signaling*. 2005.

PRAME inhibe finalement les signaux d'arrêt de croissance, de différenciation et d'apoptose des cellules, ce qui le qualifie donc indirectement de pro-oncogène. Inversement, il a été démontré in vitro et in vivo que l'arrêt induit de l'expression de *PRAME* dans le mélanome (par interférence au niveau de son ARN), permettait de restaurer la signalisation de l'acide rétinoïque et de rétablir ses effets antiprolifératifs.

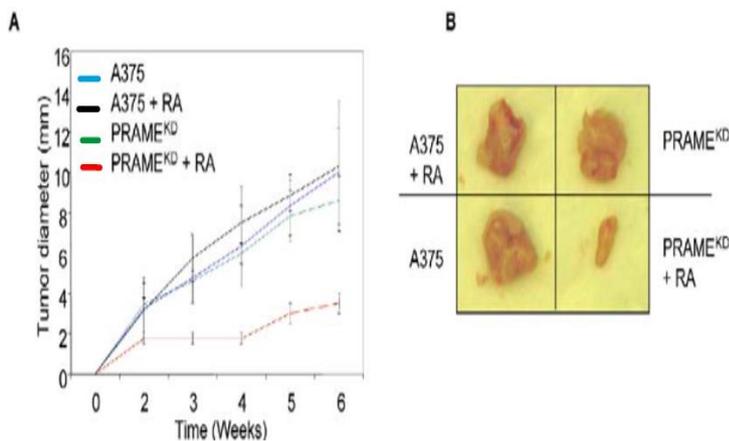


Figure 7. PRAME Knockdown Restores RA-Induced Growth Arrest In Vivo

(A) Xenograft of PRAME RNAi melanoma cells is sensitive to RA treatment. A375-PRAME^{KD} cells and control A375 cells were injected in the right and left flanks of nude mice, respectively, and mice were treated orally with 5 mg/kg RA daily. Tumor growth was measured weekly.

(B) Dissected tumors from the experiment in (A).

Figure 16. Effets in vivo de la restauration de la voie de l'acide rétinoïque après inactivation de *PRAME*.
 Source: Epping et al. *The Human Tumor Antigen PRAME Is a Dominant Repressor of Retinoic Acid Receptor Signaling*. 2005.

X. *PRAME* & la cancérogénèse

Ces données suggèrent que la surexpression du gène *PRAME*, observée dans divers cancers humains, confère aux cellules tumorales des avantages en termes de croissance et de survie par antagonisme de l'acide rétinoïque. (24) En effet, *PRAME* est également exprimé dans de nombreux autres cancers solides, tels que les cancers de la sphère ORL, du sein, du rein, le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), les liposarcomes myxoïdes et les sarcomes synoviaux. D'autres néoplasies tels que les séminomes et carcinomes d'origines diverses (notamment endométriaux et ovariens séreux) présentent une proportion variable de cellules tumorales exprimant la protéine *PRAME*. (25) Des études révèlent aussi qu'un niveau d'expression élevé de *PRAME* existe dans les leucémies aiguës et chroniques ainsi que dans les lymphomes de Hodgkin.

XI. Régulation d'expression génique de *PRAME*

De nouveaux travaux ont été réalisés afin d'étudier le type de régulation transcriptionnelle régissant *PRAME* ainsi que le mécanisme pouvant être à l'origine de sa surexpression. Le profil de méthylation de sa région régulatrice a ainsi été étudié. Il existe en effet une corrélation entre ce profil de méthylation et l'expression de *PRAME* dans divers échantillons de patients humains, ainsi que sur des lignées cellulaires. Des changements du schéma de méthylation de *PRAME* dans des cellules n'exprimant habituellement pas le gène à l'état physiologique sont suffisants pour entraîner sa régulation à la hausse. (26)

Dans la leucémie aiguë myéloïde, son schéma de méthylation dans une région riche en îlots CpG a été corrélé avec le niveau d'ARNm de *PRAME* par PCR en temps réel dans les cellules tumorales. La corrélation inverse et significative obtenue dans cette population cellulaire entre le degré de méthylation et l'expression de *PRAME* suggère un rôle causal de la méthylation de l'ADN dans la régulation de *PRAME*.

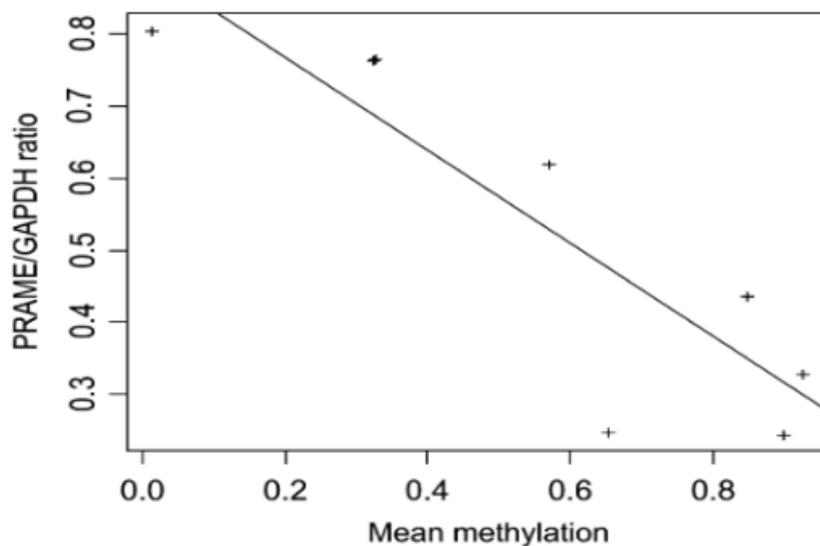


Figure 17. Corrélation inverse entre la méthylation et le taux d'expression de *PRAME*.

Source: Ortmann et al. *Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia.* 2008

Des analyses expérimentales ont d'ailleurs montré que le traitement de lignées cellulaires non tumorales initialement « *PRAME* négatives » par un agent déméthylant (5'-Aza-2'dC), entraînait une régulation à la hausse de son expression, et ceci de manière proportionnelle à la dose d'agent déméthylant utilisée. (27)

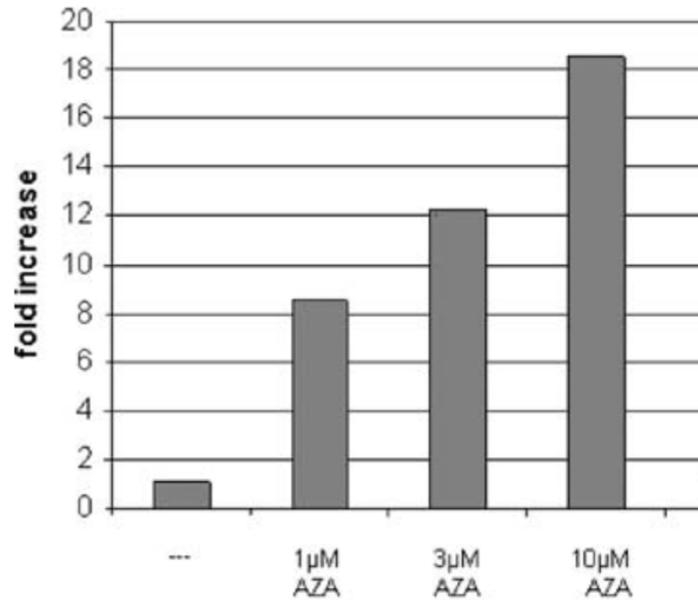


Figure 18. Taux d'expression de *PRAME* dans les cellules hématopoïétiques en fonction de doses croissantes de 5-Aza-2'- deoxycytidine (AZA).
 Source: Ortmann et al. *Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia*. 2008

L'augmentation d'expression de *PRAME* dans des cellules tumorales pourrait donc faire intervenir des mécanismes épigénétiques. Ce mode de régulation pourrait même avoir un impact pronostique sur l'évolution de la maladie cancéreuse. Une analyse par PCR spécifique de méthylation a montré que l'hypométhylation de *PRAME* est significativement plus fréquente en phase blastique de leucémie myéloïde chronique (70 %) qu'en phase chronique (36 %) ($p = 0,01$). L'hypométhylation pourrait ainsi jouer un rôle important dans l'évolution de la maladie. (28)

Ces observations sont en lien avec les résultats obtenus à propos du mélanome. Lee *et al* ont démontré que la présence d'un agent hypométhylant (le facteur de transcription MZF1) augmente le potentiel de prolifération des cellules de mélanome, via une régulation à la hausse de l'expression protéique de *PRAME* et une régulation à la baisse de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27. (29)

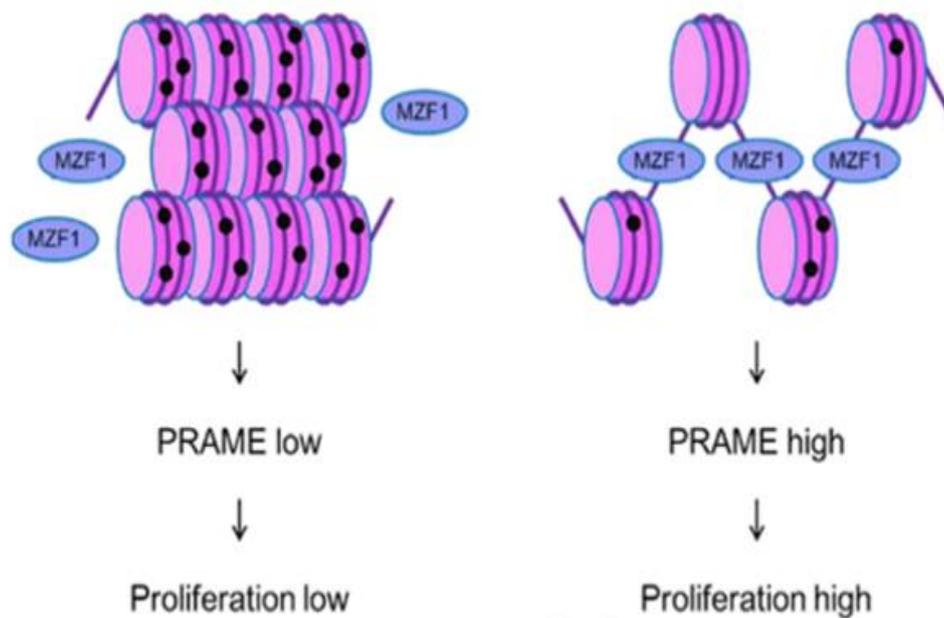


Figure 19. Modèle hypothétique de coopération entre MZF1 et l'hypo-méthylation pour la régulation d'expression de *PRAME* dans les cellules tumorales de mélanomes.

Source: Lee et al. *Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells.* 2017

Néanmoins, il faut mentionner que la surexpression de *PRAME* dans le myélome multiple semble être due à des variations du nombre de copies du gène plutôt qu'à des mécanismes de régulations épigénétiques. (30)

XII. L'apport diagnostique de *PRAME* dans les lésions mélanocytaires

A. En pratique clinique

Actuellement, la combinaison de l'observation clinique et de l'examen histopathologique des lésions mélanocytaires présente une valeur prédictive négative (VPN) pour la malignité d'environ 83 %. Ceci signifie que 17 % des mélanomes seront faussement interprétés comme des lésions bénignes. (31) L'étude d'expression de *PRAME* au sein d'une lésion mélanocytaire pourrait s'avérer utile avant même l'étape d'exérèse ou de biopsie à visée diagnostique, grâce à une technique relativement simple. Le « Pigmented Lesion Assay (PLA) » est un test d'expression génique destiné aux cliniciens, permettant en cas de négativité de quasiment exclure le diagnostic de mélanome et ainsi réduire la quantité d'exérèses chirurgicales nécessaires. Il s'agit d'un patch-test dirigé sur la lésion permettant une analyse d'expression de deux gènes clés (*PRAME* et *LINC00518*) connus pour être surexprimés dans le mélanome.

Son résultat binaire (positif ou négatif) est basé sur la détection de l'un ou des deux gènes. Une positivité rend l'exérèse à visée diagnostique souhaitable, tandis que les cas négatifs font l'objet d'une surveillance continue.

Avec une VPN très élevée à >99%, cette technique permettrait de réduire le taux de faux négatifs et de mieux sélectionner les cas nécessitant une biopsie pour analyse histologie. Elle pourrait permettre également de réduire l'incidence de lésions microscopiquement bénignes, mais parfois histologiquement atypiques et ambiguës.

(31)

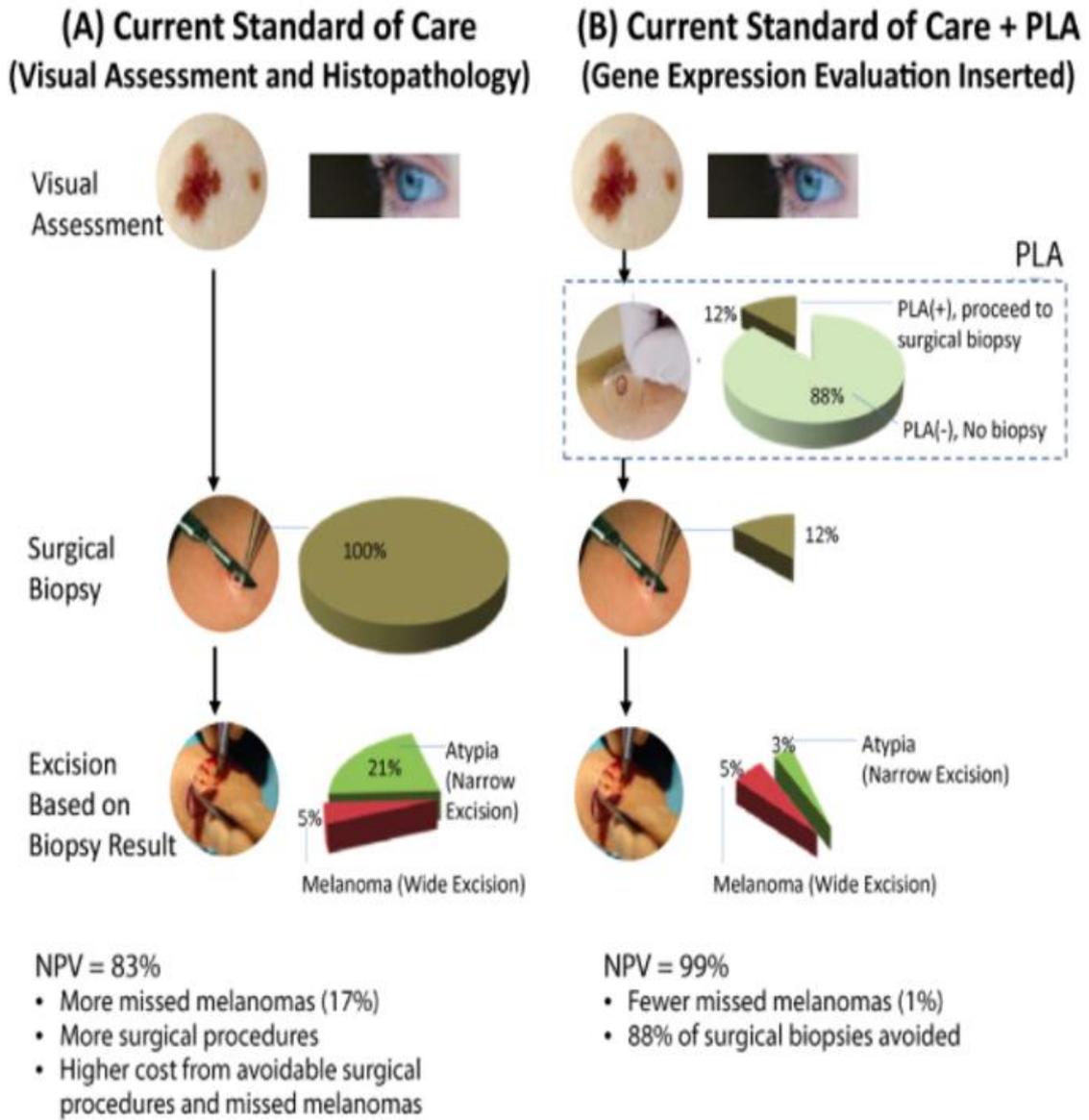


Figure 20. Comparaison entre une prise en charge clinique « standard » de lésion pigmentaire **(A)** et celle faisant intervenir le test « Pigmented Lesion assay » **(B)**.
 Source : Rivers JK, Copley MR, Svoboda R, Rigel DS. *Non-Invasive Gene Expression Testing to Rule Out Melanoma. Skin Therapy Lett.* 2018.

B. En anatomie et cytologie pathologiques

D'un point de vue histopathologique, plusieurs études ont déjà recensé le fort pouvoir discriminatif de l'analyse immunohistochimique par anticorps anti-PRAME dans le diagnostic de mélanome versus naevus. Les résultats statistiques obtenus sont d'ailleurs excellents au sein de plusieurs spectres lésionnels :

Auteurs	Lésions étudiées	Résultats	Conclusion	Référence
<i>Lezcano et al.</i>	45 lésions mélanocytaires ganglionnaires (30 « naevus nodaux » / 15 métastases de mélanomes).	30/30 « naevus nodaux » PRAME négatifs, 15/15 métastases de mélanomes PRAME diffusément positifs.	PRAME est utile dans la distinction des naevus nodaux et des métastases ganglionnaires de mélanome.	(32)
<i>Lezcano et al.</i>	400 tumeurs mélanocytaires , (155 mélanomes primitifs / 100 mélanomes métastatiques / 145 naevus mélanocytaires)	87% des mélanomes métastatiques et 83,2% des mélanomes primitifs PRAME positifs. 86,4% des naevus PRAME négatifs. Lentigos solaires rarement positifs.	PRAME peut être utile pour étayer un diagnostic suspect de mélanome . Précieux également pour l'évaluation de la marge d'un mélanome PRAME-positif.	(33,34)
<i>Lezcano et al.</i>	110 tumeurs mélanocytaires « ambiguës », comparatif du résultat de PRAME, de l'analyse cytogénétique (FISH et CGH), avec le diagnostic final retenu.	Concordance de PRAME avec les résultats cytogénétiques dans 90% des cas. Concordance de PRAME avec le diagnostic final dans 92,7% des cas.	PRAME est utile comme test auxiliaire dans l'évaluation du potentiel de malignité des néoplasies mélanocytaires ambiguës .	(35)
<i>Lopez et al.</i>	5 naevus « BAP1 inactivé » / 7 naevus pénétrant profond (DPN) / 12 naevus combinés avec contingent DPN .	Aucun cas ne présente une positivité diffuse pour PRAME.	Négativité de PRAME dans les néoplasies mélanocytaires au faible potentiel de malignité mais histologiquement ambiguë .	(36)

<p><i>Raghavan et al.</i></p>	<p>112 proliférations mélanocytaires (naevus dysplasique /irrité /récurent /mitotique ou mélanome naevoïde /composite /spitzoïde...)</p>	<p>-23/24 (95,8%) des mélanomes non spitzoïdes PRAME positifs. - 95,6% (43/45) des naevus PRAME négatifs. -15/20 naevus de spitz et 10/13 et tumeurs atypiques de Spitz PRAME négatives. -Positivité de PRAME dans un naevus de Spitz, une tumeur de Spitz atypique et un mélanome spitzoïde.</p>	<p>Négativité de PRAME dans les proliférations mélanocytaires atypiques avec des caractéristiques histopathologiques intermédiaires. PRAME doit être interprété avec prudence dans le cadre des néoplasies spitzoïdes.</p>	<p>(37)</p>
<p><i>Gradeki et al.</i></p>	<p>155 cas de métastases de mélanomes, ganglionnaires (54) ou viscérales (101).</p>	<p>151/155 (97,4%) métastases PRAME positives Les métastases ganglionnaires sont susceptibles de présenter une expression moins intense (P = 0,003).</p>	<p>PRAME est utile pour confirmer le diagnostic de mélanome dans un contexte métastatique, (lymphatique ou viscérale).</p>	<p>(38)</p>
<p><i>Sekoranja et al.</i></p>	<p>Uniquement des lésions mélanocytaires conjonctivales 114 naevus, 30 mélanomes invasifs et 10 mélanomes in situ 23 mélanoses primaires acquises (PAM) sans atypie et 11 PAM avec atypie</p>	<p>-Expression diffuse de PRAME dans 17 des 30 (57%) mélanomes invasifs, 7 des 10 (70%) mélanomes in situ et 4 des 5 (80%) PAM avec des atypies sévères -Absence d'expression significative des 114 naevus, des 3 PAM avec des atypies modérées, des 3 PAM avec des atypies légères -Expression diffuse dans seulement 1 des 23 (4%) PAM sans atypies.</p>	<p>PRAME est hautement spécifique des lésions mélanocytaires conjonctivales malignes. De plus, l'expression de PRAME dans les mélanomes invasifs était corrélée à un nombre plus élevé de mitoses mais n'était pas liée à l'âge et au sexe des patients, à l'épaisseur de Breslow, à la localisation ou au statut mutationnel.</p>	<p>(39)</p>
<p><i>LeBlanc et al.</i></p>	<p>30 lésions mélanocytaires conjonctivales (2 mélanomes, 3 PAM avec atypies, 7 PAM sans atypie, 15 naevus, 2 naevus combinés et 1 naevus atypiques)</p>	<p>Une expression forte et diffuse de PRAME était présente dans les mélanomes et les PAM avec des atypies de haut grade, mais non mise en évidence dans les PAM avec des atypies de bas grade, les PAM sans atypie, ou les naevus.</p>	<p>-PRAME est utile pour distinguer mélanome et lésions conjonctivales bénignes. -pièges diagnostiques : quelques mélanocytes intra-épithéliaux et des mélanophages peuvent être positifs dans des lésions bénignes</p>	<p>(40)</p>

<i>Umano et al.</i>	38 lésions mélanocytaires spitzoïdes pédiatriques.	Dans cette série, PRAME n'est exprimé ni dans les naevus de spitz ni dans les naevus de spitz atypiques.	La positivité de PRAME pourrait être considérée comme un élément utile dans le diagnostic différentiel du naevus de spitz et du mélanome chez les enfants.	(41)
<i>Hovander et al.</i>	8 cas de mélanomes muqueux oraux comprenant deux lésions in situ.	6 étaient positifs (86%), un cas était négatif (14%) et un cas non contributif.	PRAME peut être utile dans le diagnostic de mélanome muqueux oral , y compris le mélanome in situ précoce.	(42)

L'expression diffuse de PRAME représente également un outil robuste pour la distinction de mélanome avec d'autres diagnostics différentiels comme le sarcome à cellules claires, avec lequel il partage de nombreuses caractéristiques histopathologiques. (43)

Enfin, peu de données sont disponibles à propos de *PRAME* dans le contexte des lésions mélanocytaires congénitales. L'analyse par anti-PRAME fut récemment réalisée sur un naevus congénital suspect de transformation chez un nouveau-né. Le différentiel de marquage obtenu entre le contingent mélanocytaire atypique et surajouté au contingent naevique et congénital sous-jacent suggère qu'il pourrait s'agir d'un outil diagnostique utile concernant les proliférations mélanocytaires atypiques survenant sur naevus congénitaux, et notamment dans la distinction entre mélanome surajouté et nodule prolifératif bénin. (44) Cette observation ne concerne malheureusement qu'un seul cas et nécessite d'être confirmée à travers une étude plus élargie.

XIII. L'apport de *PRAME* dans l'évaluation pronostique

Sur le plan pronostique, *PRAME* représente d'ores-et-déjà un marqueur de risque dans le mélanome uvéal. Ce type de lésions est pour le moment classé par profilage d'expression génétique (GEP) en deux classes moléculaires déterminant le risque métastatique (classe 1 de risque faible / classe 2 de risque élevé). Cette classification est cependant influencée par la stadification TNM de la lésion et n'est donc pas totalement indépendante. A contrario, l'expression de *PRAME* s'avère être un marqueur indépendant du sexe et de l'âge du patient et il n'existe pas de lien entre le stade TNM et le statut *PRAME* de la lésion. (45) Par ailleurs, le taux annuel de métastases de 0 % dans les tumeurs de « classe 1 *PRAME*-négative » versus 38 % dans celles de « classe 1 *PRAME*-positive » souligne que l'expression de l'ARNm de *PRAME* est un des éléments les plus précis dans la prédiction du risque des mélanomes uvéaux de classe 1. Enfin, l'expression de *PRAME* est associée à un délai de survenue plus court de dissémination métastatique et à une mortalité spécifique plus élevée dans les tumeurs de classe « GEP 2 ». (46) Il apparaît donc comme biomarqueur pronostique robuste et indépendant dans le mélanome uvéal. (47)

Il a également été démontré qu'une augmentation de l'expression de *PRAME* est associée à une survie globale moindre dans les mélanomes muqueux. A travers un modèle de risques proportionnels de Cox, il apparaît d'ailleurs qu'une augmentation de 100 points du score *PRAME* en analyse immunohistochimique était associée à une augmentation de 170 % du risque de décès (HR : 2,70, 95 % IC : [1,11, 6,59], p = 0,029). L'intensité de positivité des cellules tumorales pour l'anticorps est ainsi proportionnellement liée à une survie globale moindre à 2 ans. (48)

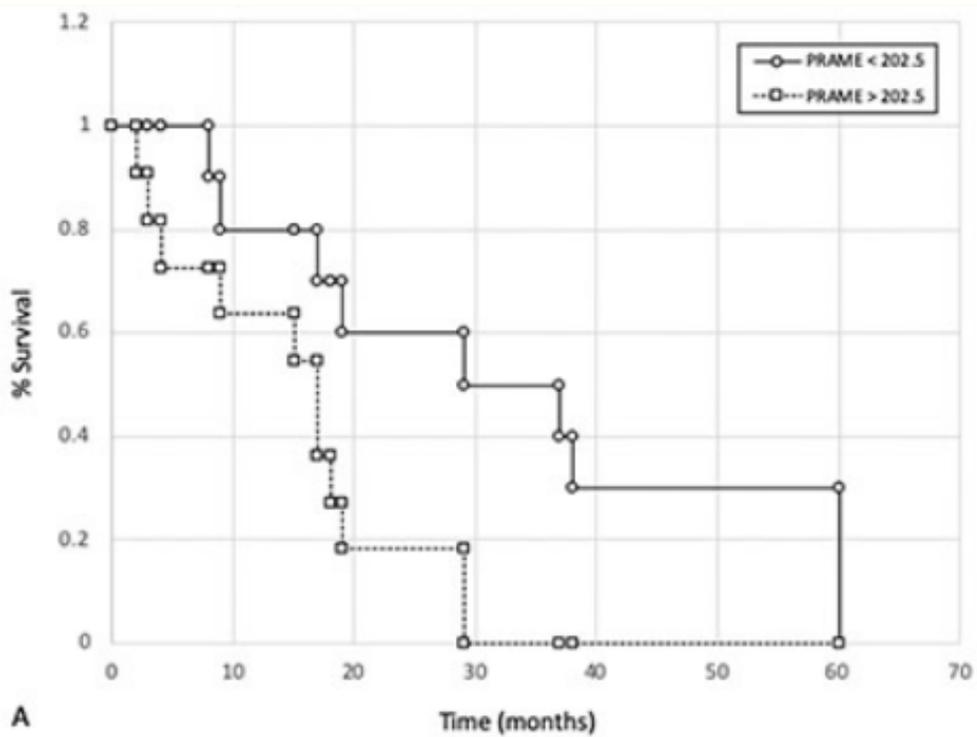


Figure 21. Courbe de survie de Kaplan-Meier comparant le taux de survie des lésions avec taux d'expression de PRAME au-dessus de la médiane (202.5) et celles avec un taux d'expression en dessous.

Source : Toyama et al. *Analyses of molecular and histopathologic features and Expression of PRAME by Immunohistochemistry in Mucosal Melanomas*. 2019.

Dans le cancer du sein, l'analyse d'expression de PRAME par quantification d'ARN messenger (qRT-PCR) montre que son taux d'expression est corrélé à une issue défavorable en termes de survie sans récurrence et survie globale. Il s'agit même d'un facteur pronostique indépendant en analyse multivariée. (49) Ceci est concordant avec l'impact péjoratif connu de sa surexpression chez des patients atteints de neuroblastome (50) ou de myélome multiple. (30) Il pourrait également servir de biomarqueur pour prédire le risque de récurrence hématogène des carcinomes épidermoïdes de l'œsophage. (51) Enfin, son impact pronostique péjoratif a aussi été démontré dans les sarcomes (52,53), les carcinomes hépatocellulaires (54) et ovariens (55,56), les cancers de vessie (57) et cancers de la sphère ORL (58), ainsi que les médulloblastomes. (59) Il s'agit ainsi d'un nouveau marqueur pronostique dans le cancer. (60)

Les résultats semblent plus contrastés dans la catégorie des tumeurs hématopoïétiques où la positivité de PRAME dans les lymphomes de Hodgkin est corrélée à une survie sans récurrence et une survie globale plus courte (61) alors que les leucémies aiguës lymphoblastiques « PRAME positives » semblent moins réfractaires au traitement. (62) C'est également un indicateur pronostique favorable dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et un indicateur utile pour surveiller la maladie résiduelle minimale dans la LAM infantile.

Le rôle de PRAME en tant qu'oncogène ou gène suppresseur de tumeur pourrait donc dépendre du type de lésion maligne.

XIV. L'apport de *PRAME* dans le progrès thérapeutique

Enfin, *PRAME* est déjà identifié comme un potentiel outil thérapeutique capable d'induire une réaction immunitaire anti-tumorale chez des patients atteints de leucémie myéloïde aiguë, de leucémie myélogène chronique (LMC), de leucémie lymphoblastique aiguë et de médulloblastome. (59,63–65) Bien que les inhibiteurs de « Checkpoints » soient déjà utilisés aujourd'hui pour le traitement du mélanome métastatique, il est nécessaire d'utiliser des immunothérapies encore plus spécifiques et ciblant des antigènes tumoraux exprimés de façon restreinte. Le but étant d'augmenter la spécificité thérapeutique et de diminuer les effets secondaires des approches immunothérapeutiques.

De façon générale, des progrès significatifs ont été réalisés en recherche fondamentale dans l'identification d'antigènes associés au mélanome reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques. Certains disposent de propriétés immunogènes et protectrices mais leur capacité à induire une réponse immunitaire significative est souvent limitée à cause de leur expression dans des tissus sains, entraînant alors une tolérance immunitaire et des effets indésirables. *PRAME* dispose d'un caractère immunogène grâce à ses épitopes de liaison aux « HLA de classe I ». Mais il s'agit surtout de sa faible expression dans les tissus non tumoraux qui suscite un réel intérêt. De plus, les testicules où il apparaît plus fortement exprimé à l'état physiologique ne sont pas accessibles à une réaction immunitaire importante en raison du manque de contact direct avec des cellules immunitaires et l'absence d'expression d'HLA de classe I à la surface des cellules germinales. (66)

Il a été démontré qu'une fixation in vivo et une absorption spécifique d'anticorps polyclonaux (MPA1) anti-PRAME était possible dans les tumeurs sur-exprimant l'antigène. C'était la première fois qu'un antigène du groupe « CTA » était ciblé à l'aide de technologies conventionnelles, le rendant par la même occasion exploitable pour d'autres applications techniques telle que la thérapie ciblée avec toxicité minimale. (67)

Une première étude expérimentale montre des résultats prometteurs concernant l'utilisation de cellules lymphocytaires T spécifiques de PRAME reconnaissant les cellules de mélanome uvéaux « PRAME-positifs ». La forte réaction de ces lymphocytes T suggère un possible rôle immunothérapeutique de *PRAME*. (68) Le traitement à base d'anticorps anti-PRAME dans le mélanome cutané métastatique a déjà fait l'objet d'une étude clinique de phase I et montre un profil de sécurité acceptable. Ce dernier est désormais autorisé pour les essais de phase II. L'étude de phase I réalisée avec des doses croissantes a notamment permis d'évaluer l'immunothérapie anticancéreuse exploitant PRAME par injection intramusculaire. Le profil de sécurité était cliniquement acceptable pour les trois doses étudiées et des réponses immunitaires humorales associées à une réponse lymphocytaire T CD4+ ont été obtenues :

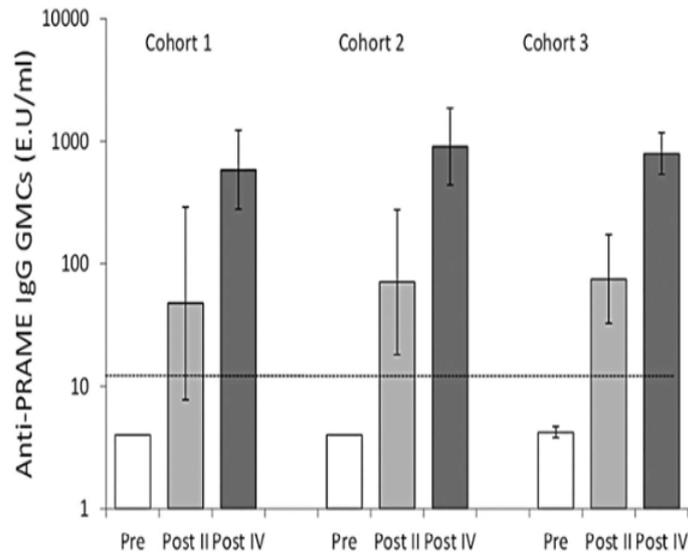


Figure 22. Évaluation de la réponse humorale anti-PRAME après injections intramusculaires répétées de l'antigène à 3 reprises et à 3 doses différentes pour chaque cohorte.

Source : Gutzmer et al. *Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study.* 2016.

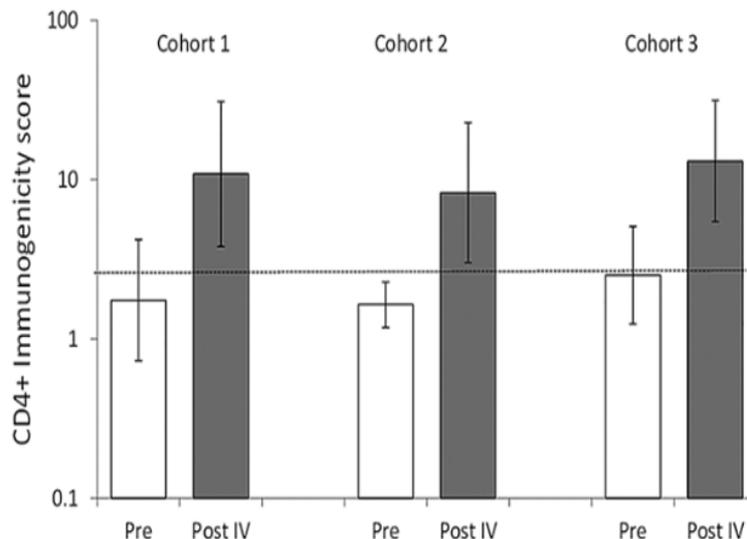


Figure 23. Évaluation de la réponse lymphocytaires T CD4+ après injections intramusculaires de l'antigène PRAME à 3 reprises et à 3 doses différentes pour chaque cohorte.

Source: Gutzmer et al. *Safety and immunogenicity of the PRAME cancer immunotherapeutic in metastatic melanoma: results of a phase I dose escalation study.* 2016.

De nombreux essais cliniques sont en cours dans le cancer pour évaluer des vaccins exploitant le caractère immunogène de PRAME et des thérapies lymphocytaires T spécifiques. (69)

XV. Résumé des données concernant *PRAME* en oncologie

Dans un travail de synthèse, Xu *et al* ont réalisé une revue de la littérature pour résumer les rôles et fonctions physiologiques de PRAME dans divers types de cancers. Il s'agit d'un récapitulatif des données portant sur son utilité diagnostique, pronostique et thérapeutique. (70)

TABLE 1 Role of PRAME in human cancers

Cancer type	Function	Target	References
Breast cancer	Involved in poor survival and distant metastases; relates with negative oestrogen receptor status	N/A	16,27,28
Cervical cancer	Associates with cell apoptosis	N/A	32
Haematological malignancies	Inhibits cell differentiation, growth arrest and apoptosis; increases the sensitivity to chemotherapy; and promotes cell apoptosis and favourable prognosis	Inhibits RAR signal and TRAIL; promotes p53; and downregulates S100A4, HSP27 and p21	8,32,44,45
Lung cancer	Exhibits higher expression in squamous cell carcinomas lung cancer patients than adenocarcinomas	N/A	65
Melanoma	Associates with an increased risk of metastasis; enhances cell colony-forming capability	Promotes by MZF1 and inhibits by miR-211	74,75,77,78
Ovarian cancer	Exhibits higher expression in tumours from deceased patients, and its function remains unknown	N/A	85,86
Sarcoma	Associates with tumour grade and poor prognosis; inhibits cell proliferation and colony formation; and causes cell arrest at G1 phase	N/A	91,94
Other tumours			
Seminomas	Regulation of cell differentiation and pluripotency	Activates by SOX17	102
HCC	Correlates with alpha fetoprotein levels, tumour size, AJCC stage and poor survival prognosis; induces cell growth; and inhibits cell apoptosis	Inhibits p53/Bcl2 and p21	97
HNSCC, MB, prostate cancer and bladder carcinoma	Related to poor prognosis, but function remains unknown; associates with poor response to chemotherapy	Inhibits by miR-421	98,99,101,103

Figure 24. Résumé des fonctions actuellement connues de PRAME dans l'oncogénèse.

Source: Xu et al. *The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer.* 2020

OBJECTIFS

À ce jour, aucune étude n'a encore été réalisée pour comparer les performances diagnostiques de l'analyse immunohistochimique par anti-PRAME avec celles des trois autres principaux marqueurs utilisés pour différencier les lésions mélanocytaires malignes et bénignes : HMB45, p16^{INK4a} et Ki-67.

I. Objectif principal

Après avoir confirmé le pouvoir discriminatif d'anti-PRAME dans la distinction de lésions mélanocytaires malignes et bénignes non équivoques, l'objectif principal de notre étude est de comparer sa performance diagnostique à celles des autres marqueurs au sein de la même série de cas. Nous souhaitons ainsi proposer un algorithme diagnostique standardisé, intégrant ces différents examens immunohistochimiques pour améliorer la précision diagnostique globale des lésions mélanocytaires.

II. Objectifs secondaires

Nous nous sommes également fixé plusieurs objectifs secondaires. Parmi les études diagnostiques précédemment citées, certaines ont évalué l'immunoréactivité de PRAME par un score purement quantitatif, tandis que d'autres ont également pris en compte l'intensité de marquage des cellules tumorales étudiées. (36,37) La comparaison de ces deux méthodes au sein d'une même série nous permettra de juger de leur utilité respective pour la pratique quotidienne.

Pour terminer, nous souhaitons étudier l'influence de diverses variables histologiques sur l'immunoréactivité des cellules tumorales pour anti-PRAME, afin de tester la robustesse de l'analyse à travers des contextes histologiques très variables.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Sélection des cas

Après approbation de notre protocole de recherche par le comité éthique de la recherche interne du groupement des hôpitaux de l'institut catholique de Lille (GHICL), la base de données du service d'anatomie et cytologie pathologique a été exploitée pour identifier rétrospectivement les mélanomes et naevus diagnostiqués de 2017 à 2021. Un total de 140 lésions de diagnostic non équivoque ont été extraites des archives de l'institution.

Une revue collégiale des différents cas a ensuite été réalisée dans le but de constituer deux groupes de lésions mélanocytaires. Ces deux groupes sont composés de 76 naevi pour le groupe « bénin » et de 64 mélanomes primitifs de la peau pour le groupe « malin ». Les tumeurs incluses représentent les sous-types lésionnels les plus fréquemment rencontrés en pratique quotidienne et seuls des cas dont le diagnostic était non équivoque ont été inclus.

II. Analyse immunohistochimique

Des coupes conventionnelles de 3 à 4 µm d'épaisseur intéressant la totalité de la surface tumorale ont été réalisées à partir des blocs de tissus fixés au formol et inclus en paraffine. Chaque analyse immunohistochimique a ainsi été réalisée sur l'entièreté de la lésion afin de prendre en compte l'ensemble de l'environnement histologique. La coloration immunohistochimique a été réalisée à l'aide d'un système BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems Inc., AZ, USA) et d'un kit de révélation (ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche Diagnostics)).

Les coupes tissulaires ont été immuno-marquées avec un anticorps anti-Ki-67 (clone 30-9, Ventana-Roche Diagnostics, prédilué), anti-p16 (clone E6H4, Ventana-Roche Diagnostics, prédilué), anti-HMB45 (clone HMB45, Ventana-Roche Diagnostics, prédilué), et avec un anticorps monoclonal de souris anti-PRAME (clone QR005, Diagnostics, 1:50).

L'étude immunohistochimique par anticorps anti-Ki-67 a été réalisée uniquement dans le groupe des mélanomes. En accord avec les recommandations de bonne pratique, l'immunoréactivité pour anti-Ki-67, p16 et HMB45 n'a été étudié qu'au sein du contingent dermique des lésions mélanocytaires lorsque celui-ci était représenté.

En cas de lésions confinées exclusivement ou principalement à l'épiderme (niveau 1 ou 2 selon l'index de Clark), le résultat pour ces trois analyses a été classé comme « indéfini » car non interprétable.

-L'index de prolifération Ki-67 a été déterminé au sein de la zone tumorale la plus proliférative (« hot spot ») dépourvue d'infiltrat inflammatoire, sur la base d'un examen microscopique à faible grossissement.

Le pourcentage de cellules marquées par anti-Ki-67 a été estimé sur une centaine de cellules tumorales.

-L'immunoréactivité des cellules tumorales pour anti-p16 a quant à elle été estimée sur la totalité de la surface lésionnelle dermique.

-Concernant l'analyse par anti-HMB45, nous avons considéré la présence d'un gradient d'immunoréactivité lorsque seules les cellules les plus superficielles de la tumeur étaient marquées. Ce gradient a été considéré comme perdu lorsque l'immunoréactivité cellulaire concernait de façon égale des parties superficielles et profondes de la lésion, ou lorsqu'un contingent clonal de cellules tumorales dermiques était marqué. Il a été considéré comme « douteux » et non concluant lorsqu'aucune, ou de rares cellules disposées de façon éparse étaient immunoréactives.

L'intensité de positivité n'a pas été prise en compte pour ces trois marqueurs.

Nous avons utilisé ces critères issus de la littérature pour la classification des résultats de chaque analyse immunohistochimique :

-L'analyse par anti-p16 était suggestive de malignité en cas d'absence d'immunoréactivité des cellules tumorales, et de bénignité en cas d'immunoréactivité (nucléaire et/ou cytoplasmique) qu'elle soit diffuse ou en mosaïque.

-L'indice de prolifération Ki-67 était évocateur de bénignité si <5% de cellules dermiques étaient marquées et de malignité si >5% de cellules dermiques étaient positives. Le choix de ce seuil discriminant est issu de la littérature. (71)

-L'analyse par anti-HMB45 était suggestive de bénignité en cas de conservation d'un gradient de marquage, le résultat était indéfini en cas de gradient de marquage « douteux » et suggestif de malignité en cas de gradient de marquage perdu.

La réactivité pour anti-PRAME a pour sa part été considérée à la fois en fonction de l'intensité de marquage (0 : pas d'expression, 1 : faible expression, 2 : expression modérée, 3 : forte expression) et du pourcentage de cellules tumorales marquées (0%-100%).

A partir de ces deux données, un « score global d'expression de PRAME » a ensuite été calculé indépendamment par deux observateurs pour chaque lésion, pour correspondre à une fourchette quantitative allant de 0 à 300. Cette méthode d'évaluation fait référence au système de notation utilisé par Toyama et al. (48)

Si un consensus (défini comme un écart par rapport au score global < 50) n'était pas atteint lors de la première estimation indépendante, une seconde lecture collégiale était organisée.

D'autre part et à visée comparative, le pourcentage de cellules tumorales marquées par anti-PRAME a été pris en compte isolément (sans prise en compte de l'intensité associée) pour classer chacune des lésions.

Nous avons considéré le résultat évocateur de malignité lorsque plus de 75% des cellules tumorales étaient positives quelque soit l'intensité, en référence à la méthode de Lezcano et al. (33)

La réalisation de cette méthode d'analyse nous a permis de la comparer avec celle basée sur le score global précédemment évoqué (prenant en compte l'intensité de marquage).

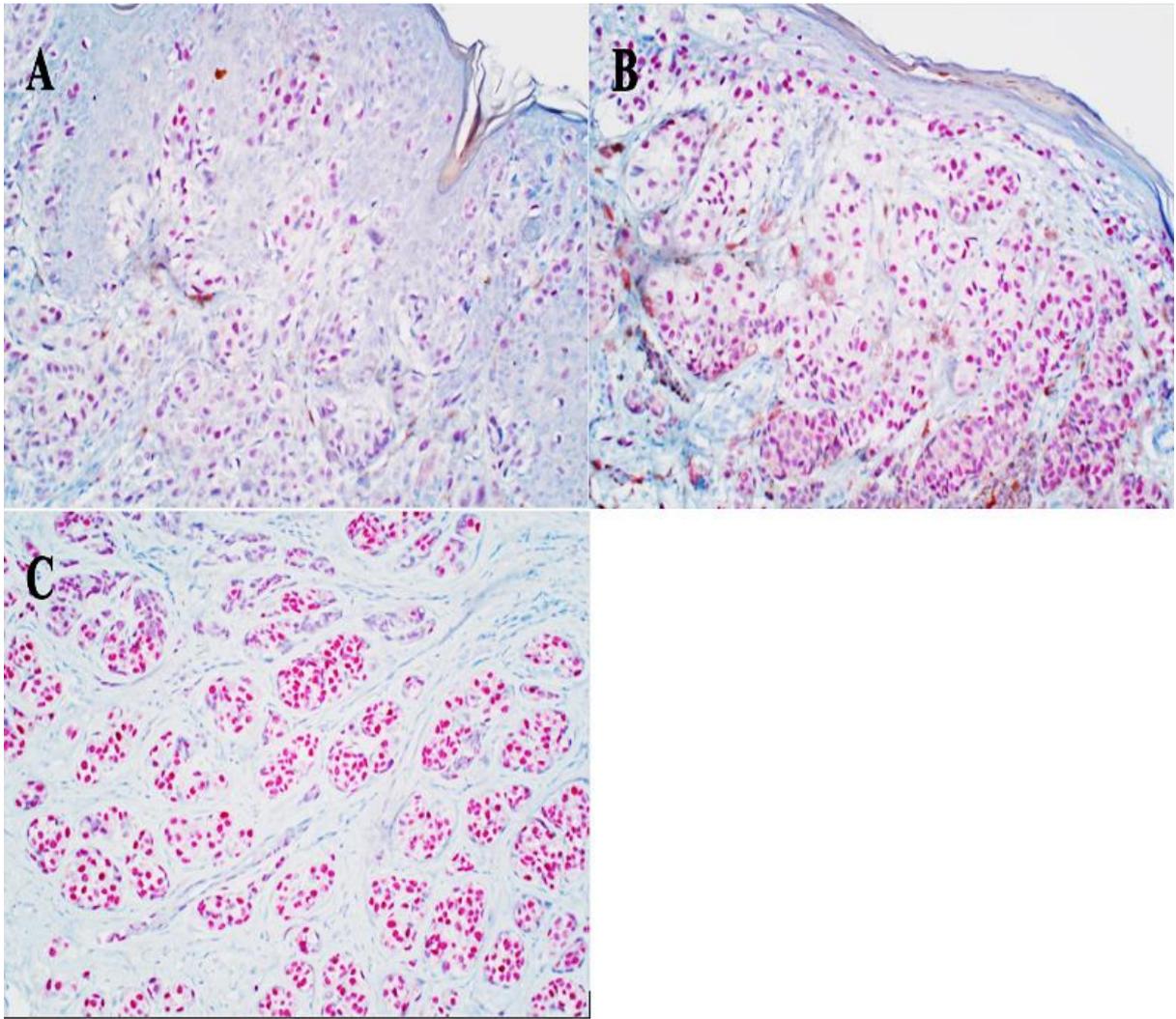


Figure 25. Illustration des différentes intensités de marquage étudiées pour l'anticorps anti-PRAME avec immunoréactivité faible (1+) **(A)** modérée (2+) **(B)** et forte (3+) **(C)**.

III. Analyse statistique

Après analyse descriptive des 140 lésions, une courbe ROC a été établie en fonction du "score global d'expression de PRAME" de chaque lésion et du diagnostic histologique final de malignité (Gold Standard). Le seuil optimal du score (maximisant la sensibilité et la spécificité du test immunohistochimique) a ainsi pu être calculé.

Pour limiter de potentiels biais, cette estimation de performance diagnostique a été conduite par « bootstrapping » ; le seuil optimal ayant été ré-estimé à chaque itération. Les performances diagnostiques des trois autres tests immunohistochimiques ont également été estimées en fonction du diagnostic histologique final. Des résultats pour anti-HMB45 classés comme « douteux » ont été exclus de l'analyse statistique.

24 lésions mélanocytaires trop « fines », pour lesquelles le résultat d'anti-HMB45, Ki-67 et p16 était ininterprétable (« indéfini ») n'ont pas été incluses dans le calcul de performances respectives de ces tests, ni dans la comparaison avec PRAME.

Pour faciliter la comparaison de performance diagnostique entre les tests, le taux de concordance diagnostique de chacun d'entre eux a été établi en fonction du Gold Standard histopathologique. Les résultats ont ensuite été comparés 2 à 2 par un test de McNemar. Aucune correction de multiplicité n'a été effectuée pour éviter de diminuer la puissance statistique de l'étude.

Enfin, un coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour les diverses variables histologiques (de répartition numérique ou ordinale) à la recherche d'une éventuelle influence sur le score global d'expression de PRAME dans le groupe des mélanomes.

Pour les facteurs qualitatifs, le score médian pour anti-PRAME a été déterminé et la différence entre les modalités a été testée par un test de Kruskal-Wallis s'il existait plus de deux modalités ou par un test de Wilcoxon-Mann-Whitney dans le cas contraire. Cette analyse n'a été conduite que dans le groupe « malin » car le score global de PRAME dans les lésions du groupe « bénin » était le plus souvent extrêmement bas.

Un seuil de significativité de 5% ($p=0,05$) a été considéré pour toutes les analyses et les résultats ont été obtenus à l'aide du logiciel R (version 4.0.5).

RESULTATS

I. Données descriptives

Tableau 1. Caractéristiques des 140 lésions mélanocytaires étudiées.

Groupe	M= 64 (45.7%)		N= 76 (54.3%)			
Sexe	Femme= 90 (64.3%)		Homme= 50 (35.7%)			
Age <i>Bénin</i> <i>Malin</i>	Médiane [IQR] (min; max) 29 [19.8 ; 42.2] (4 ; 79) 71 [53.5 ; 82.2] (23 ; 94)					
Taille (cm) <i>Bénin</i> <i>Malin</i>	Médiane [IQR] (min; max) 0.6 [0.4 ; 0.9] (0.1 ; 2,5) 1,25 [0.9 ; 1.6] (0.5 ; 4)					
Topographie	Tête et cou= 35 (25%)	Tronc= 49 (35%)	Membres= 42 (30%)	Acral= 11 (7.86%)	ND= 3 (2.14%)	
<i>Bénin</i>	19	27	21	6	3	
<i>Malin</i>	16	22	21	5	0	
Sous-type	SSM= 45 (32.1%)	ML= 11 (7.9%)	MN= 8 (5.7%)	NCA= 39 (27.9%)	Spitz/Reed= 19 (13.6%)	NB/NBC= 18 (12.9%)
Epaisseur (mm) <i>Bénin</i> <i>Malin (Breslow)</i>	Médiane [IQR] (min; max) 1.5 [0.9 ; 2.5] (0 ; 13) 0.93 [0.615 ; 2.06] (0 ; 14)					
Niveau de Clark	Niveau 1= 12 (8.6%)	Niveau 2= 28 (20%)	Niveau 3= 12 (8.6%)	Niveau 4= 78 (55.7%)	Niveau 5= 10 (7.1%)	
<i>Bénin</i>	4	10	9	47	6	
<i>Malin</i>	8	18	3	31	4	
Inflammation <i>Bénin</i> <i>Malin</i>	Absent= 73 (52.1%)	Légère= 45 (32.1%)	Modérée= 13 (9.3%)	Sévère= 9 (6.4%)		
	60	15	1	0		
	13	30	12	9		
Degré d'élastose <i>Bénin</i> <i>Malin</i>	Absent= 77 (55%)	Léger= 27 (19.3%)	Modéré= 18 (12.9%)	Sévère= 17 (12.1%)	ND= 1 (<1%)	
	63	10	3	0	0	
	14	17	15	17	1	
Régression <i>Bénin</i> <i>Malin</i>	Absent= 123 (87.9%)		Légère= 9 (6.4%)	Sévère= 8 (5.7%)		
	76		0	0		
	47		9	8		
Ulcération* <i>Malin</i>	Oui= 15 (23.4%)		Non= 49 (76.6%)			
TILS* <i>Malin</i>	Oui= 11 (17.2%)		Non= 53 (82.8%)			

*La présence d'une ulcération et/ou d'un "TILS" ne sont reportés que dans le groupe des mélanomes car ces deux facteurs histologiques sont inexistant dans le groupe des naevus. Abréviations: NCA, Naevus commun acquis; NB, Naevus bleu; NBC, Naevus bleu cellulaire; M, Mélanome; ML, Mélanome lentigineux; N, Naevus; ND, non déterminé; MN, mélanome nodulaire; SSM, "superficial spreading melanoma"; TILS, "tumor-infiltrating lymphocytes".

II. Courbe ROC de l'analyse par anticorps anti-PRAME

La figure 26 illustre la courbe ROC du score global de PRAME, avec un seuil optimal calculé à 50/300 (les lésions dont le score global était ≥ 50 étant classées comme « malignes » selon PRAME).

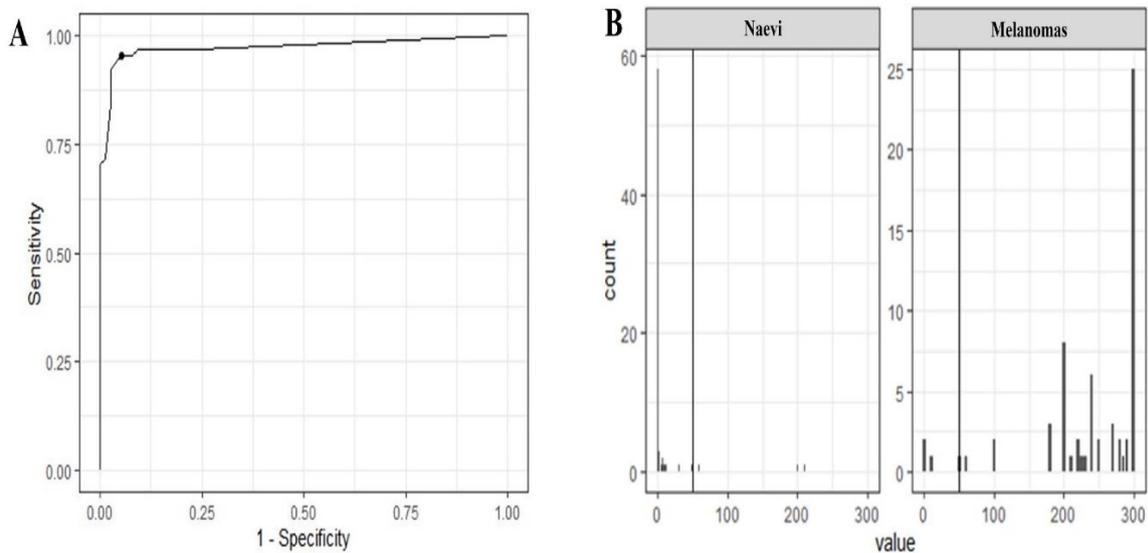


Figure 26. Courbe ROC de l'analyse immunohistochimique anti-PRAME basée sur la méthode du score global d'expression (prenant en compte l'intensité de marquage des cellules tumorales) **(A)** et distribution des résultats dans les deux groupes par rapport au seuil optimal évalué à 50/300 **(B)**.

III. Résultats des tests immunohistochimiques

Tableau 2. Résultats des différents tests immunohistochimiques dans le groupe malin (A) et le groupe bénin (B).

A

Test	HMB45	P16	Ki-67	PRAME (score) [†]	PRAME (Seuil à 75%) [‡]
Résultat suggestif de malignité	31	29	27	61	57
Résultat suggestif de bénignité	10	18	20	3	7
Indéfini	6	0	0	0	0
ND	17	17	17	0	0
Total	64	64	64	64	64

B

Test	HMB45	P16	PRAME (score) [†]	PRAME (Seuil à 75%) [‡]
Résultat suggestif de malignité	4	0	4	2
Résultat suggestif de bénignité	65	75	72	74
Indéfini	1	0	0	0
ND	6	1	0	0
Total	76	76	76	76

[†]Méthode d'évaluation de PRAME prenant en compte la fréquence et l'intensité de marquage des cellules tumorales. Un seuil de 50/300 au score global a été utilisé pour classer chaque lésion. Le résultat était évocateur de malignité si ce seuil était franchi.

[‡]Méthode d'évaluation de PRAME considérant seulement la proportion de cellules tumorales immunoréactives au sein de la lésion. Le résultat était évocateur de malignité si au moins 75% de cellules étaient marquées.

ND, non déterminé.

La sensibilité, la spécificité et la concordance diagnostique de chacun de tests sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3. Performance diagnostique calculée des différents tests immunohistochimiques.

Test	Sensibilité	Spécificité	Concordance diagnostique*
PRAME (score)[†]	0.927 [0.815 ; 1]	0.943 [0.84 ; 1]	95% [89.6% ; 97.8%]
PRAME (Seuil à 75%)[‡]	0.891 [0.788 ; 0.955]	0.974 [0.908 ; 0.997]	93.6% [87.8% ; 96.8%]
HMB45	0.756 [0.597 ; 0.876]	0.942 [0.858 ; 0.984]	87.3% [79.2% ; 92.6%]
P16	0.617 [0.464 ; 0.755]	1 [0.952 ; 1]	85.2% [77.4% ; 90.8%]
Ki-67	0.574 [0.423 ; 0.714]	ND	ND

*Taux de concordance diagnostique avec le diagnostic final (déterminé par l'étude morphologique représentant le Gold standard de notre étude).

[†]Méthode d'évaluation de PRAME prenant en compte la fréquence et l'intensité de marquage des cellules tumorales.

[‡]Méthode d'évaluation de PRAME considérant seulement la proportion de cellules tumorales immunoréactives au sein de la lésion.

La sensibilité et la spécificité de la méthode d'évaluation basée sur le score PRAME a été évaluée par bootstrapping pour limiter de potentiels biais.

ND, non déterminé.

IV. Comparaison de performance des tests immunohistochimiques

La figure 27 illustre l'aperçu comparatif des différents tests, basé sur la sensibilité et la spécificité de chacun par rapport au diagnostic histologique final (Gold Standard).

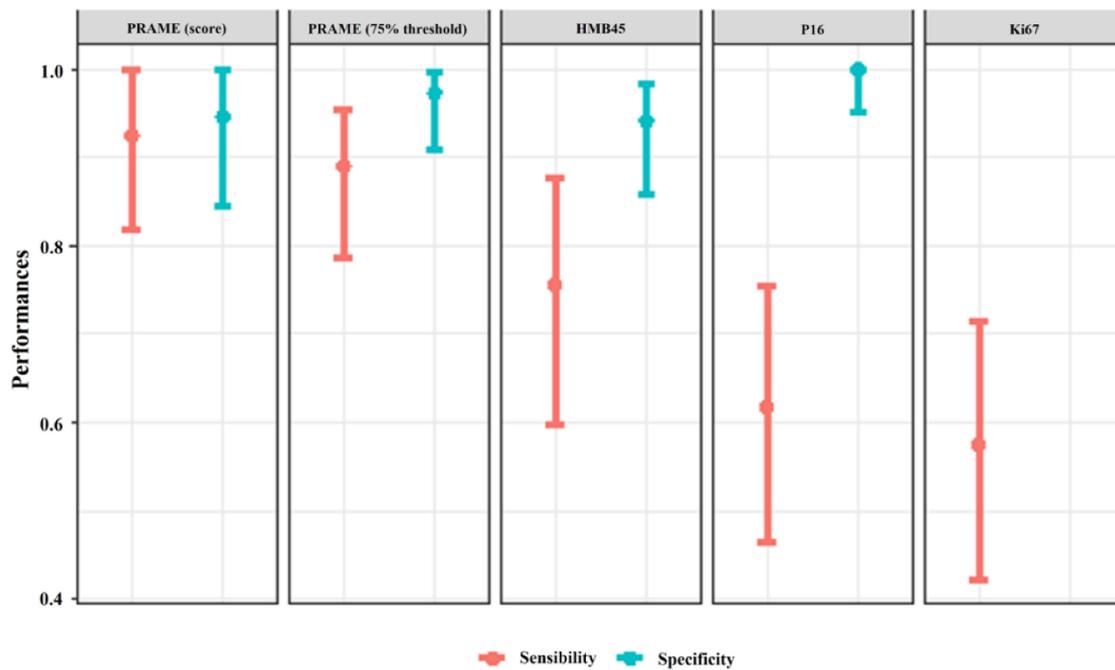


Figure 27. Illustration comparative basée sur la sensibilité et spécificité de chaque test avec intervalles de confiance à 95%.

Tableau 4. Valeurs de l'indice de significativité « p » des comparaisons statistiques une à une des performances diagnostiques de chaque test.

Test	PRAME (Seuil à 75%)	HMB45	P16
PRAME (score)	0.68	0.052	0.029
PRAME (Seuil à 75%)		0.052	0.014
HMB45			1.000

V. Résultats complémentaires

Il est important de souligner que 8 des 12 lésions purement intra-épidermiques incluses dans l'étude (de niveau 1 selon l'indice de Clark) correspondent à des mélanomes in situ (groupe malin). Ces 8 lésions étaient immunoréactives pour PRAME. La sensibilité au sein de ce sous-groupe de lésions malignes in situ est ainsi égale à 100%.

De plus, 17 mélanomes « fins » n'ayant pas pu être étudiés par anti-HMB45, Ki-67, et p16 (résultat « indéfini ») sont tous positifs en étude immunohistochimique par anti-PRAME.

Au total, le résultat de l'analyse par anti-PRAME était non concordant avec celui du Gold Standard pour 11 lésions mélanocytaires (plus précisément 7 mélanomes et 4 nævus, représentant au total environ 8% des cas de notre série). Le résultat pour anti-HMB45 était interprétable concernant 7 de ces lésions et il était en adéquation avec le Gold Standard pour 6 d'entre elles (86%), permettant ainsi de « corriger » le résultat d'anti-PRAME dans la majeure partie des cas.

Enfin, le score global d'expression de PRAME de chaque lésion n'est significativement influencé par aucune des variables histologiques étudiés, à l'exception de la régression qui apparaît statistiquement significative avec néanmoins un coefficient de corrélation extrêmement faible ($\sim -0,3$). (cf annexe.)

DISCUSSION

I. Justification de l'étude

Les lésions mélanocytaires peuvent représenter un véritable défi dans la pratique de l'anatomie et cytologie pathologiques.

De nombreux outils de biologie moléculaire ont récemment été développés pour améliorer la classification des lésions mélanocytaires avec des résultats très prometteurs. (31,72–74) Malheureusement, la plupart de ces analyses moléculaires sont difficilement accessibles pour les laboratoires les plus modestes.

Plusieurs études portant sur des analyses immunohistochimiques ont également été menées pour chercher à distinguer plus précisément les nævus des mélanomes. (71,75–77) Aucun marqueur pris isolément n'est cependant considéré comme suffisamment sensible et spécifique dans ce domaine. (75) L'analyse immunohistochimique par l'anticorps anti-PRAME semble néanmoins représenter un outil prometteur dans l'évaluation de lésion mélanocytaire d'interprétation difficile. (35,36,78) Il paraissait donc essentiel de mener une étude comparative pour déterminer sa place par rapport aux autres tests immunohistochimiques couramment utilisés (HMB45, p16 et Ki-67).

II. Comparaison par rapport aux données de la littérature

Tout d'abord, cette nouvelle étude portant sur une série de lésions mélanocytaires non équivoques corrobore les résultats d'autres études soulignant la capacité de PRAME à distinguer les lésions bénignes et malignes avec une bonne valeur prédictive. Ces résultats sont notamment en accord avec l'étude princeps de Lezcano et al. (33)

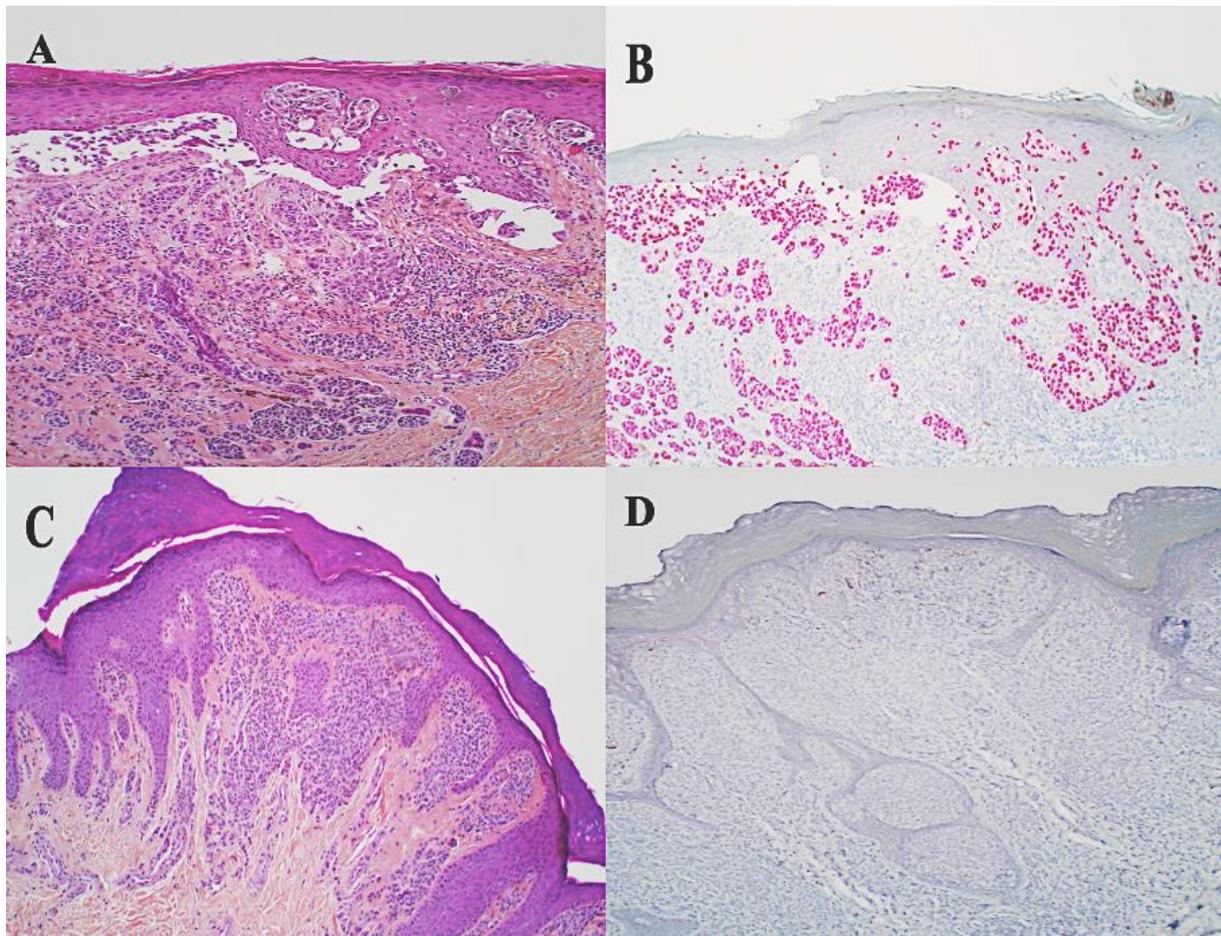


Figure 28. Présentation d'un mélanome SSM (A) immunoréactif de façon intense et diffuse pour anti-PRAME (B) en comparaison avec un naevus commun (C) totalement dépourvu de marquage (D).

III. Anticorps anti-PRAME versus anti-P16, HMB45 et Ki67

La comparaison de l'analyse anti-PRAME et anti-P16 montre une nette supériorité significative en faveur de l'anticorps anti-PRAME dans la distinction des lésions bénignes et malignes. Nos résultats ainsi que ceux de la littérature s'accordent sur le fait que l'analyse par anti-P16 est très spécifique, mais trop peu sensible.

En effet et contrairement à l'analyse par anti-PRAME, le statut pour l'anticorps anti-p16 des cellules tumorales apparaît pour sa part corrélé à d'autres variables histologiques, telles que l'angiogénicité tumorale, le degré d'invasion et la présence d'une ulcération (80), ainsi que l'épaisseur et le nombre de mitoses au sein de la lésion. (81)

Ceci lui confère donc un caractère histopronostique dans l'évaluation des mélanomes (80), mais une capacité moins reproductible dans la distinction de lésions mélanocytaires malignes et bénignes.

Certaines études indiquent par ailleurs que p16 est un marqueur fiable pour distinguer les « inclusions naeviques » de véritables métastases ganglionnaires de mélanome dans les ganglions lymphatiques (82). Mais des résultats plus récents montrent que PRAME discrimine de façon plus significative ces deux types de lésions. (83)

Ces données ainsi que celles d'une méta-analyse récente concernant l'analyse par anti-p16 dans les lésions mélanocytaires indiquent que le rôle de cette dernière dans la distinction des lésions bénignes et malignes est d'utilité limitée. (84)

Par ailleurs, des travaux portant spécifiquement sur les mélanomes acraux suggèrent que l'expression de PRAME est également très sensible et spécifique dans ce sous-

groupe et constitue un outil diagnostique plus robuste que l'immunohistochimie par anti-p16 à laquelle il a été comparé. (85)

Le résultat de l'analyse comparative entre anti-PRAME et anti-HMB45 est à la limite de la significativité statistique ($p=0,052$). Ceci s'explique probablement par la relative petite taille de l'échantillon, et par l'exclusion des résultats « douteux » ou « indéfini » pour anti-HMB45, ayant artificiellement participé à « booster » la performance statistique de cette analyse.

La différence de sensibilité obtenue entre les deux tests suggère cependant que PRAME est un outil plus robuste pour exclure la malignité avec une certitude plus élevée. De plus, Il peut être intéressant de coupler ces deux analyses pour éviter un diagnostic erroné de malignité suggéré par anti-HMB45. En effet, un profil de marquage « aberrant » pour anti-HMB45 dans certains naevus complètement bénins a déjà été rapporté et concerne par exemple des naevus traumatisés, exposés à de la cryothérapie ou des naevus de halo. (86–88)

On peut également prendre pour exemple la positivité diffuse d'HMB45 dans le groupe des naevus bleus et naevus pénétrants profonds bénins (« deep penetrating naevus »). (89) où l'analyse par anti-PRAME devient alors un outil de choix pour suspecter une transformation maligne des tumeurs de ce spectre lésionnel.

Pour illustration, une lésion mélanocytaire utérine associée à une pigmentation péritonéale ont récemment été identifiées chez une femme de 37 ans. Une hystérectomie a été réalisée et l'étude histologique associée aux analyses moléculaires ont permis de caractériser cette lésion de « naevus bleu cellulaire utérin ». L'absence d'expression de PRAME par les cellules tumorales était rassurante et concordante avec le diagnostic de lésion bénigne. (90)

Par ailleurs, l'exclusion de l'analyse statistique des résultats « indéfinis » pour anti-HMB45, P16 et Ki67 dans l'estimation des performances respectives de chacun de ces tests et dans la comparaison avec celle de l'analyse anti-PRAME, a artificiellement favorisé les performances de ces trois examens. Ce biais d'exclusion renforce la supériorité de l'analyse par anti-PRAME dans notre série.

Dans la littérature, de bons résultats sont évoqués concernant l'analyse anti-Ki67 en utilisant un seuil de positivité de 5%. (71) Sa sensibilité de 0,574 est cependant apparue très faible dans notre série. Ce résultat couplé aux difficultés connues de reproductibilité de l'évaluation de l'index de prolifération (77,91) nous amène à la considérer comme d'intérêt moindre en application pratique.

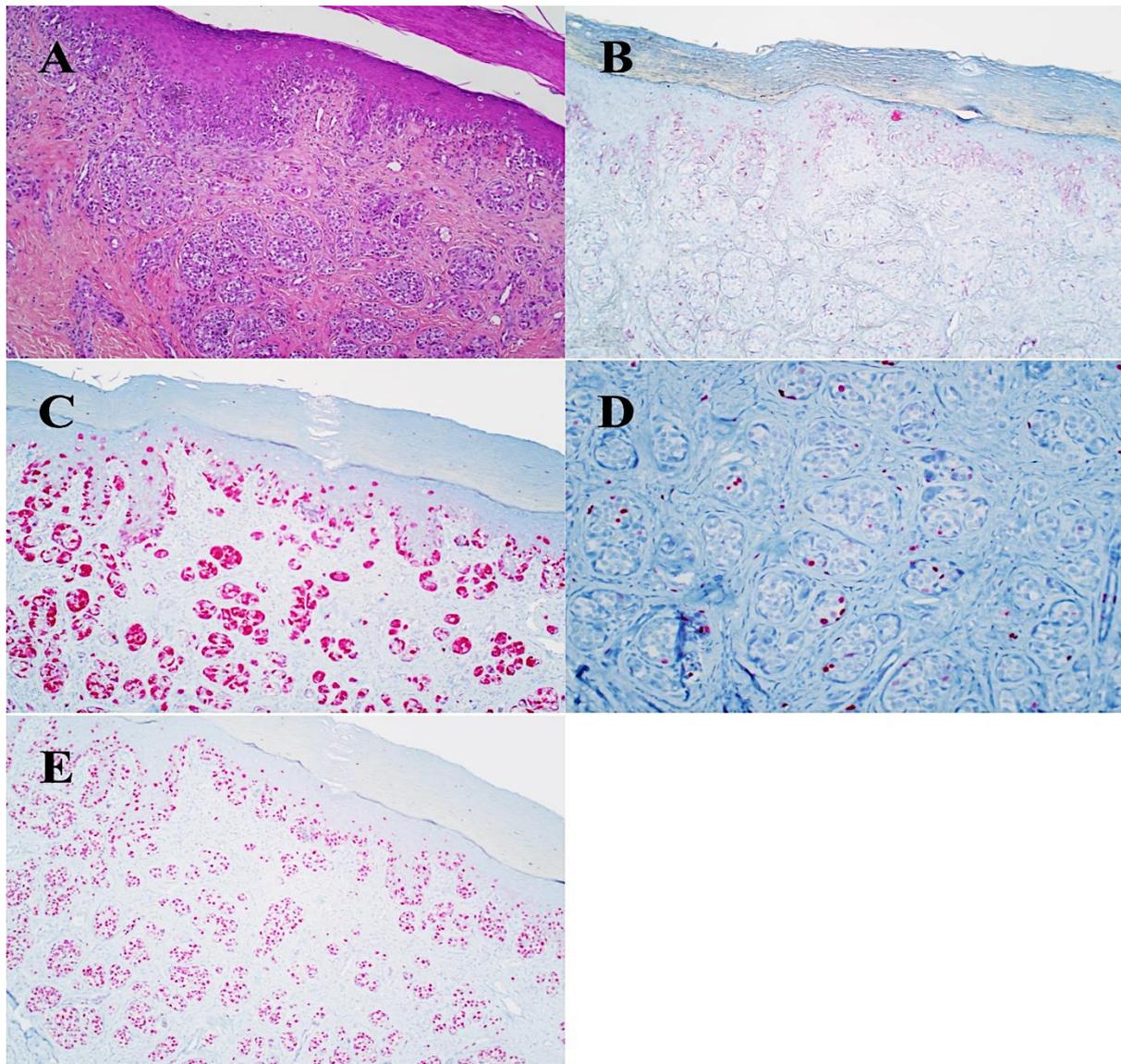


Figure 29. Caractéristiques microscopiques d'un mélanome SSM (A) avec un statut HMB45 évocateur de bénignité (conservation d'un gradient de marquage) (B), un résultat également erroné pour anti-P16 (conservation d'expression) (C) et Ki-67 (index de prolifération < 5%) (D). L'immunoréactivité pour anti-PRAME est cependant concordante avec le diagnostic final de malignité (E).

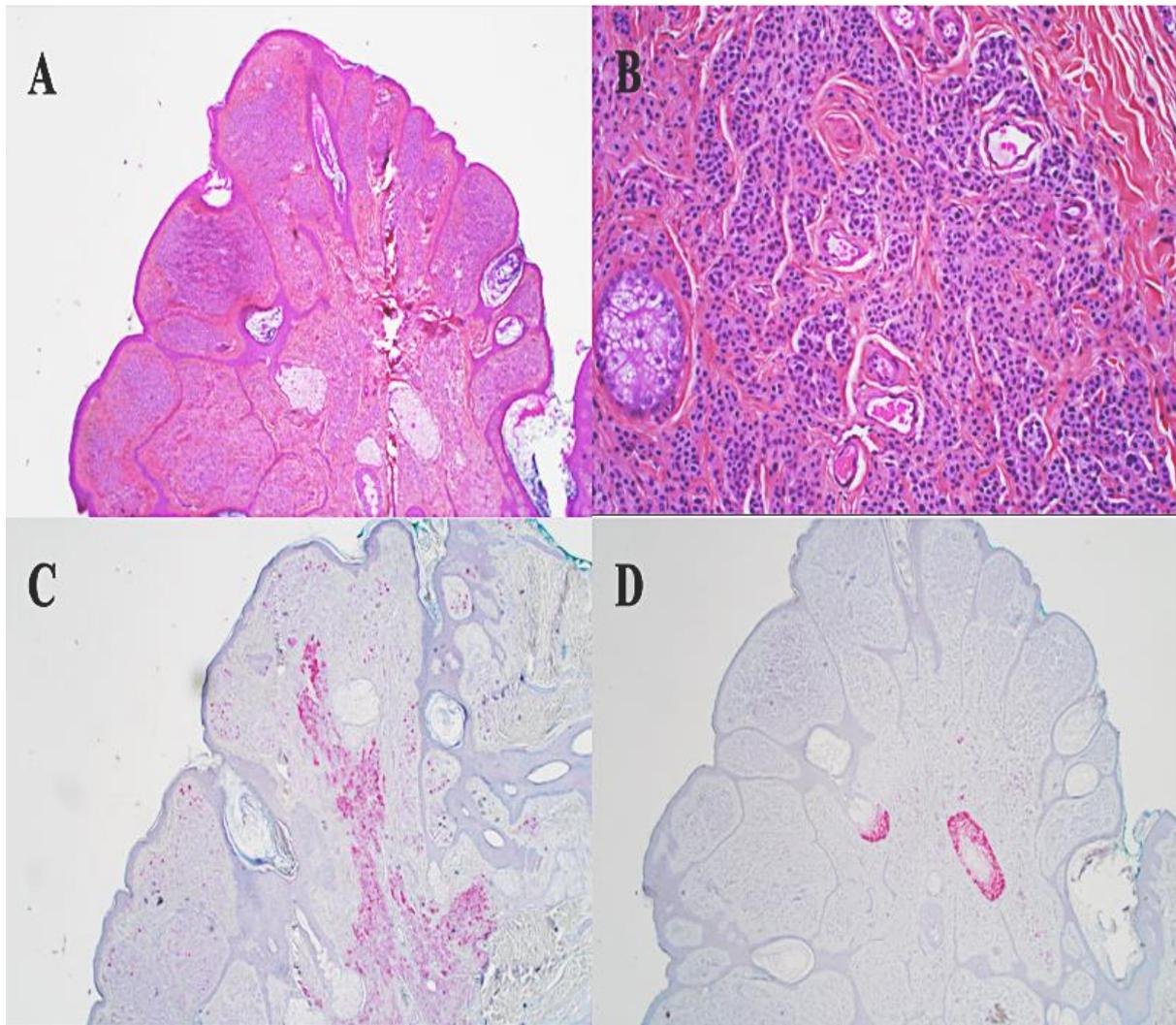


Figure 30. Illustration au faible (x2.5) et moyen (x20) grandissement d'un nævus tubéreux dépourvue d'atypies cyto-nucléaires (**A et B**), dont l'immunoréactivité dermique pour anti-HMB45 (**C**) pourrait faussement induire en diagnostic de malignité et contraste avec la négativité pour anti-PRAME qui est concordante avec le diagnostic final (**D**).

IV. Intérêt d'étudier l'intensité de marquage pour l'anticorps anti-PRAME

Nous n'avons cependant pas mis en évidence de différence significative entre la méthode d'évaluation basée uniquement sur la fréquence de marquage des cellules tumorales et celle considérant également son intensité.

En prenant en compte l'intensité via « le score global de PRAME » pour chaque lésion, la très légère augmentation de sensibilité de cette méthode (0,927 vs 0,891) ne justifie pas son utilisation en pratique quotidienne en raison d'un potentiel manque de reproductibilité.

Il peut néanmoins être intéressant de l'utiliser pour des lésions mélanocytaires avec immunoréactivité clonale pour anti-PRAME. En effet, une étude récente a démontré que considérer un marquage positif en « hot-spot » pour anti-PRAME comme suggestif de malignité peut augmenter la sensibilité diagnostique du test sans compromettre de manière significative sa spécificité. (78) Le fait de prendre en compte l'intensité de marquage des cellules tumorales dans ces cas de figure à immunoréactivité clonale pourrait donc présenter un intérêt.

V. Influence des variables histologiques sur l'analyse anti-PRAME

L'un des apports majeurs de notre étude concerne le taux de reproductibilité du test pour distinguer une lésion maligne d'une lésion bénigne, quelles que soient les autres variables histologiques. Au sein de notre série de lésions non équivoques, la robustesse du test apparaît extrêmement élevée car le résultat du « score de PRAME » apparaît uniquement lié à la malignité ou la bénignité de la lésion étudiée. Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative ou d'influence des divers facteurs histologiques étudiés sur le score (à l'exception de la régression de façon très minoritaire). Ces observations renforcent la validité du test dans le groupe des lésions mélanocytaires qui sont des tumeurs histologiquement très hétérogènes qu'elles soient malignes ou bénignes. (79)

Plus précisément, l'immunoréactivité des lésions pour anti-PRAME n'était ni liée à la taille de la lésion, ni à son niveau d'infiltration, rendant cet outil reproductible même pour les lésions mélanocytaires très « fines ». Il n'y a pas eu non plus d'influence significative de la topographie de la lésion ou du degré de dommages solaires en peau péri-lésionnelle. Par ailleurs, la présence ou non d'une ulcération, le degré et le type d'inflammation (« tumor-infiltrating lymphocytes » par exemple) ainsi que le nombre de mitoses n'ont pas non plus influencé le score et le résultat de l'analyse immunohistochimique. C'est ainsi que dans cette série de lésions non équivoques, tous ces cofacteurs histologiques ne constituent donc pas des éléments confondants qu'il serait primordial de contrôler avant d'interpréter le résultat de l'analyse.

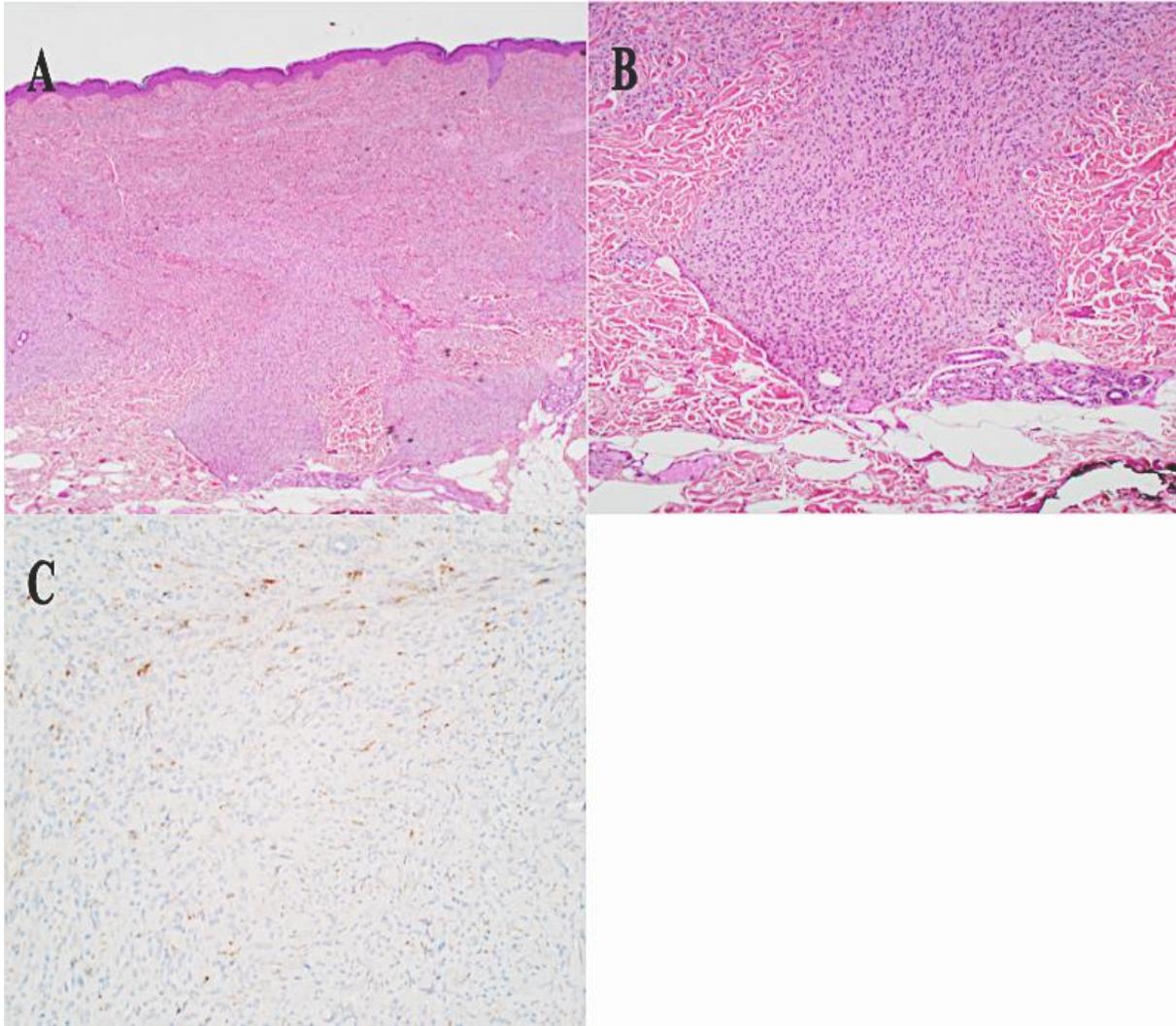


Figure 31. Présentation au faible (x2.5) et moyen (x20) grossissement (**A et B**) d'un nævus bleu cellulaire avec une silhouette classiquement décrite en « battant de cloche ». La négativité de l'analyse anti-PRAME (**C**) dans une lésion bénigne appartenant à ce spectre lésionnel renforce son pouvoir discriminatif à travers les divers sous-types histologiques existant.

VI. Intérêt de l'anticorps anti-PRAME dans les lésions mélanocytaires « fines » et rares pièges associés

Au vu de l'augmentation du dépistage de mélanomes « précoces » et fins (6), l'analyse anti-PRAME représente un outil de choix dans l'évaluation du potentiel de malignité de lésions « in situ » ou d'index de Clark 2 d'interprétation difficile (78). En effet, le diagnostic différentiel entre naevus dysplasique et mélanome in situ peut être difficile et l'anti-PRAME permet de différencier avec une bonne valeur prédictive les cellules mélanocytaires bénignes et malignes dans des lésions épidermiques pures. (92) Parmi ces lésions fines, l'expression diffuse de PRAME est hautement spécifique des mélanomes en comparaison aux nævus dysplasiques qui sont majoritairement négatifs et rarement positifs avec gradient décroissant suivant la profondeur lésionnelle. (93)

Dans notre série, son excellente sensibilité (100%) parmi le sous-groupe des mélanomes « fins » suggère également que la surexpression de PRAME est un évènement relativement précoce dans la mélanomagénèse, comparativement à la perte d'expression de p16 par exemple. (81,94)

De plus, l'analyse par anti-PRAME est réalisable au sein de ce groupe de lésions « fines », là où les autres tests immunohistochimiques sont ininterprétables.

Enfin, l'évaluation microscopique des limites d'exérèses chirurgicales de ces lésions par anti-PRAME est fortement corrélée avec les méthodes conventionnelles (colorations HES standard +/- immunohistochimie par anti-SOX10/MelanA). (95)

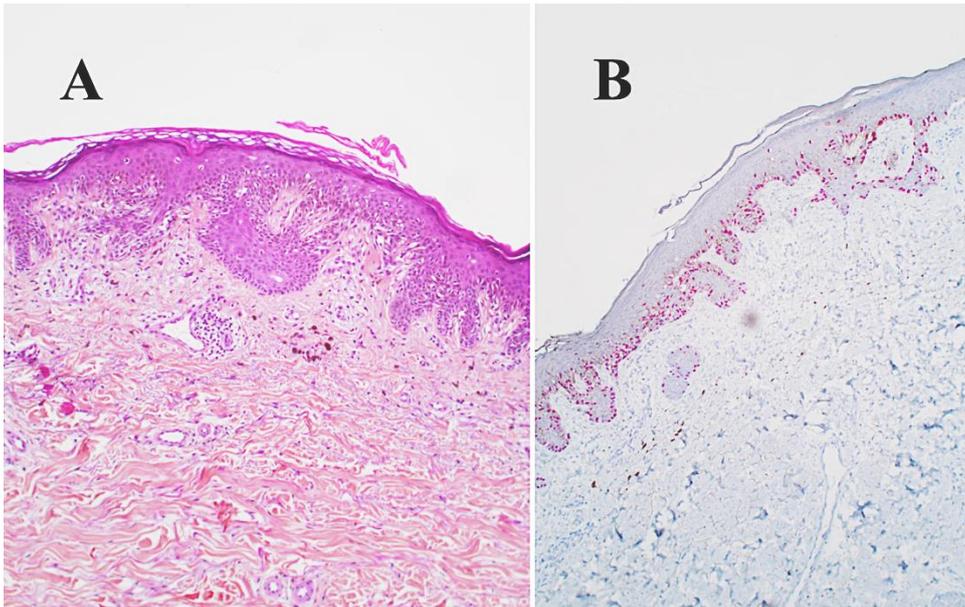


Figure 32. Caractéristiques microscopiques d'un mélanome in situ **(A)** dont l'immunoréactivité pour anti-PRAME malgré sa fine épaisseur lésionnelle **(B)** est concordante avec le diagnostic final.

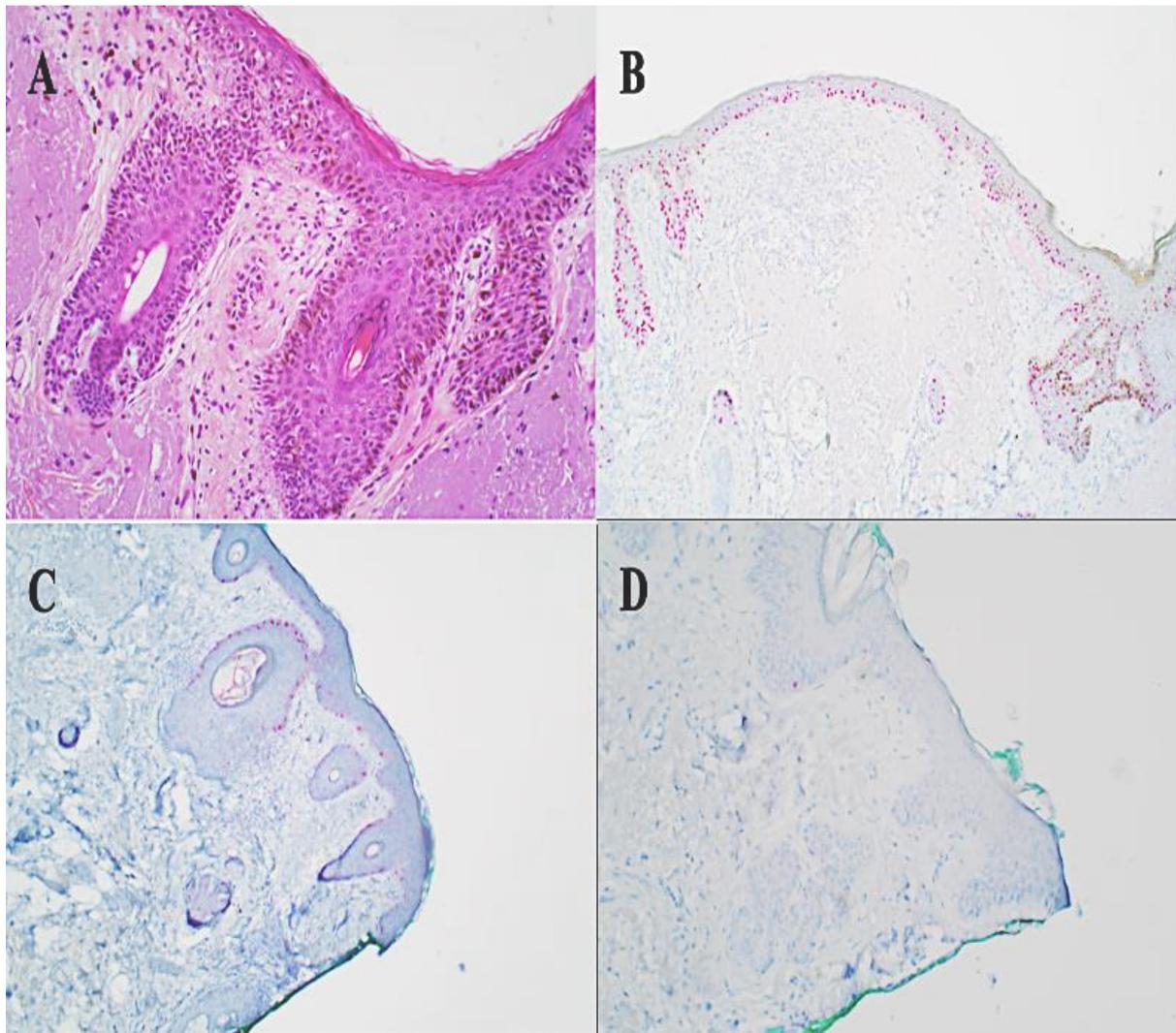


Figure 33. Étude des limites de résection chirurgicale (repérée par encre verte) d'un mélanome de Dubreuilh in situ visible en coloration HES (A). La lésion est immunoréactive de façon intense et diffuse pour anti-PRAME (B). Les mélanocytes jonctionnels révélés par anti-MelanA situés en bordure de lésion (C) ne sont pas immunoréactifs pour anti-PRAME (D), permettant d'éliminer leur caractère néoplasique et d'affirmer l'exérèse complète de la lésion avec une bonne certitude.

A propos de la précision des mesures lésionnelles, il est également possible d'obtenir une mesure plus fiable de l'index de Breslow concernant les mélanomes qui surviennent sur nævus sous-jacent, en raison d'une nette différence d'immunoréactivité pour anti-PRAME des deux contingents malin et bénin. (96) Une étude consacrée uniquement aux mélanomes développés sur nævus a montré que l'anticorps différencie à 100% (24/24 cas étudiés) les populations mélanocytaires bénignes et malignes et permettait donc de distinguer les deux populations. (96)

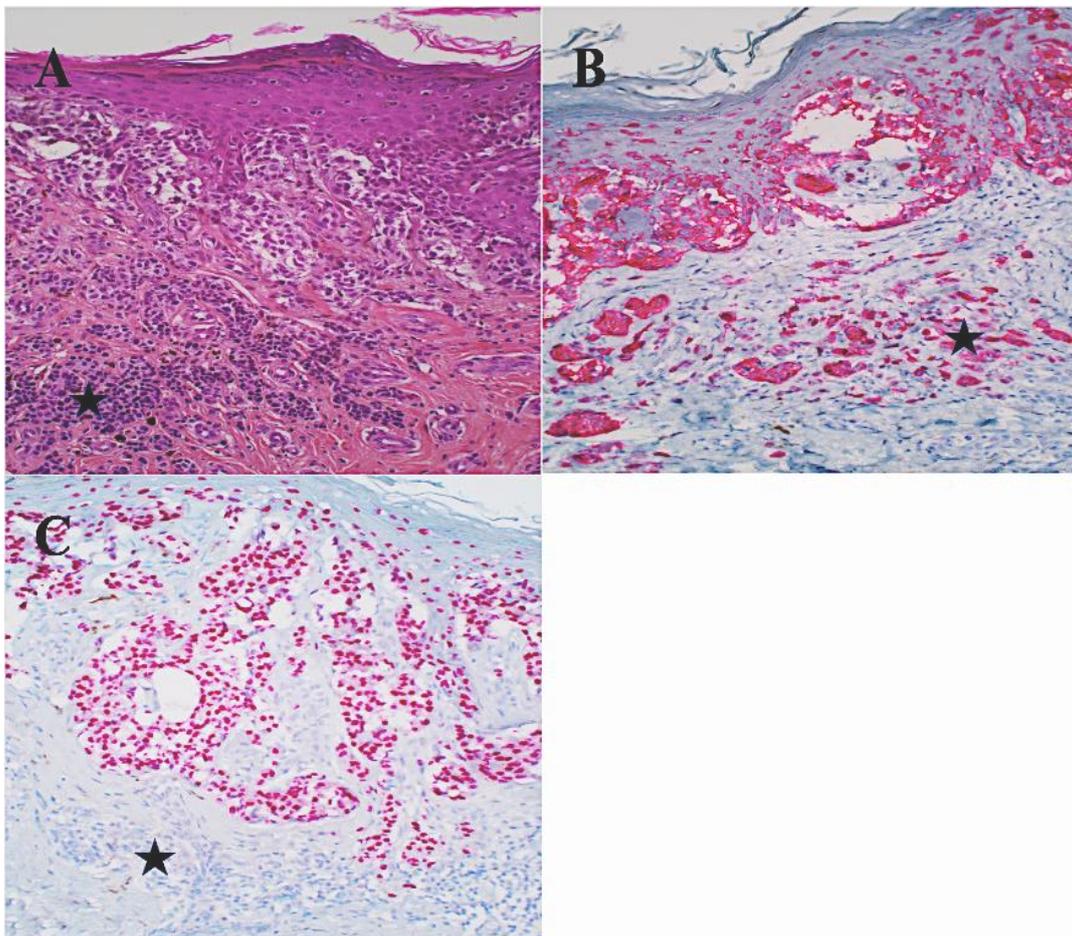


Figure 34. Exemple d'un mélanome SSM (A) associé à un nævus sous-jacent (★). Les deux contingents sont positifs pour l'anticorps anti-MelanA (B) mais l'immunoréactivité différentielle pour anti-PRAME (C) permet de s'assurer de la bénignité du contingent profond et de mesurer ainsi l'épaisseur totale de la lésion maligne avec fiabilité.

Concernant les lésions mélanocytaires « fines », Il est toutefois important de mentionner que certains pièges existent et concernent de rares mélanocytes isolés non néoplasiques qui peuvent être positifs pour anti-PRAME. Un lentigo solaire de notre étude est apparu immunoréactif et ceci corrobore les observations de Lezcano et al à propos d'une lésion du même type histologique. (33)

Il est donc nécessaire d'être prudent dans la distinction d'une lésion épidermique maligne et d'une hyperplasie mélanocytaire réactive non néoplasique. Des critères morphologiques simples en faveur de cette dernière sont cependant évocateurs, telle que la faible densité cellulaire de la lésion, la répartition éparse des mélanocytes dans l'épiderme ainsi que leur caractère dépourvu d'atypie cyto-nucléaire.

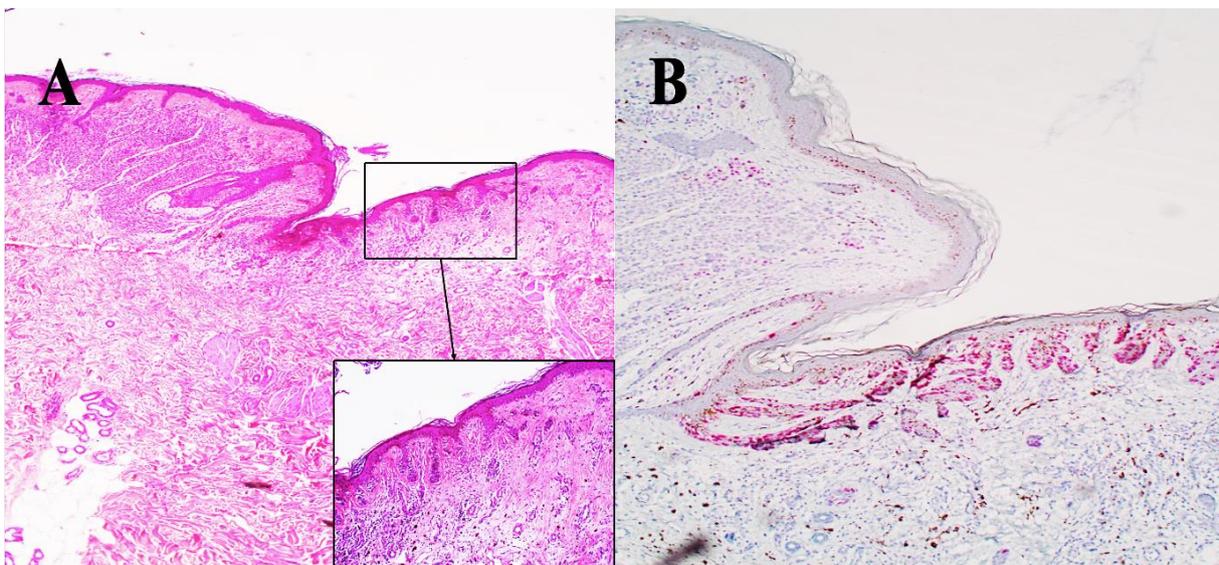


Figure 35. Exemple d'un lentigo solaire situé à proximité d'un naevus solaire **(A)**, dont l'immunoréactivité pour anti-PRAME **(B)** contraste avec la négativité du contingent naevique et ne doit pas faire considérer à tort cette lésion comme une néoplasie maligne in situ.

VII. Piège dans le spectre des lésions de « spitz » et mélanomes desmoplasiques

Un dernier écueil à fortement considérer concerne la potentielle positivité pour l'analyse anti-PRAME de tumeurs de Spitz. Un cas « faussement » positif de notre série (avec score global = 200/300) correspondait à un nævus de Spitz fusiforme. Or, il s'avère que les nævus de Spitz bénins peuvent classiquement exprimer PRAME de façon diffuse dans de rares cas. (97) C'est pourquoi l'analyse doit être interprétée avec prudence dans le cadre de néoplasmes spitzoïdes. (37)

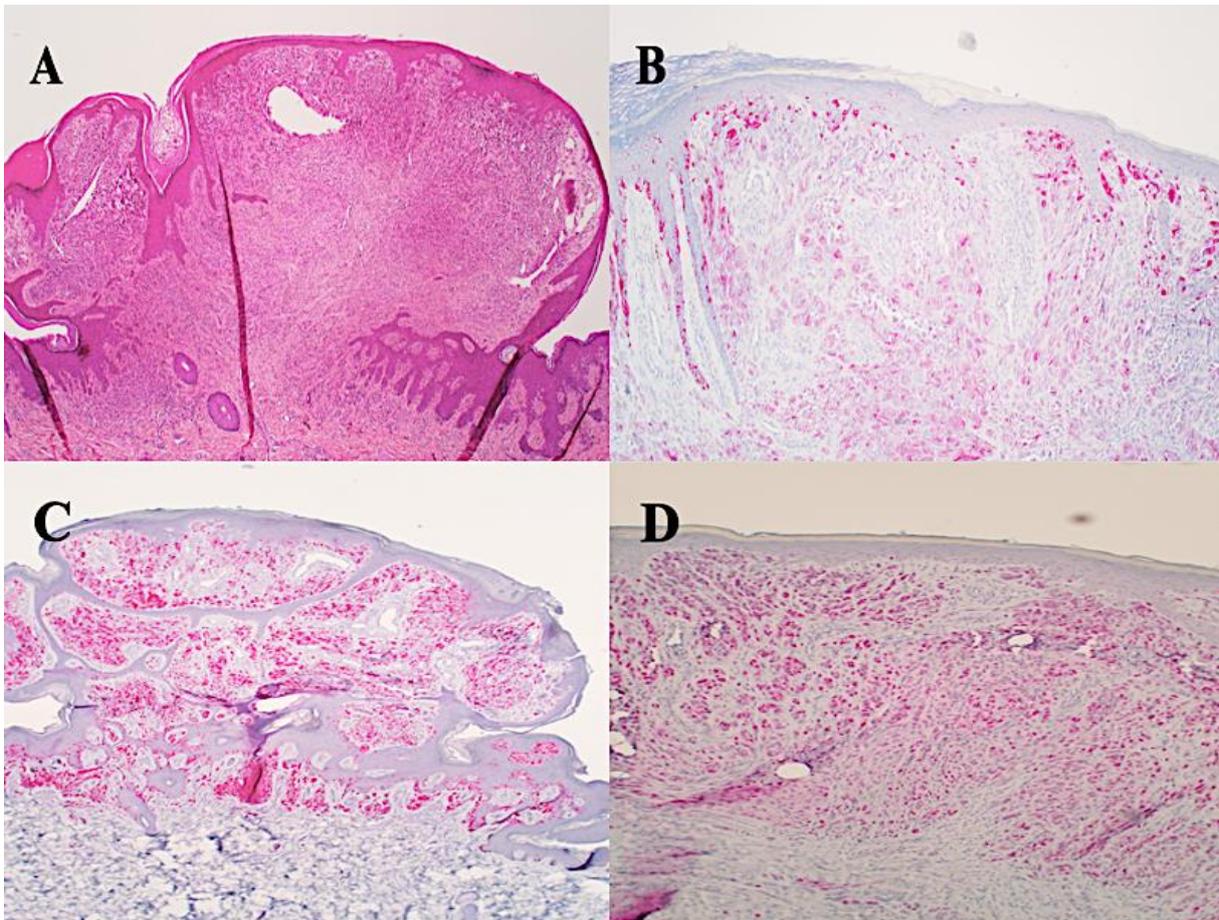


Figure 36. Présentation d'un nævus de spitz fusiforme (A), avec gradient de marquage préservé pour anticorps anti-HMB45 (B), positif pour l'anticorps anti-P16 (C) et présentant une positivité pour anti-PRAME (D), illustrant le résultat « faussement positif » d'anti-PRAME parfois rencontré au sein de ce spectre lésionnel.

Des données supplémentaires concernant PRAME dans ce spectre sont nécessaires, d'autant plus depuis qu'un cas de mélanome spitzoïde métastatique a été rapporté comme présentant une expression diffuse de PRAME dans les cellules tumorales en dissémination lymphatique, et une expression de façon focale par les cellules de la lésion primitive. (98)

Indépendamment, Il faut enfin prendre en compte le fait que les mélanomes desmoplastiques sont le plus souvent non immunoréactifs pour anti-PRAME malgré leur caractère malin. (33)

VIII. Intérêt de la combinaison de l'anticorps anti-PRAME et anti-HMB45

Comme mentionné précédemment, 6 sur 7 lésions (86%) de statut discordant pour l'analyse anti-PRAME par rapport au diagnostic final ont été correctement classées selon l'analyse anti-HMB45. Ceci suggère que l'association de ces deux examens pour distinguer les lésions malignes et bénignes pourrait augmenter leurs valeurs prédictives globales.

Des travaux exploitant un test composite intégrant ces deux analyses au sein de lésions mélanocytaires atypiques pourraient être intéressants, à l'instar d'un test composite intégrant anti-p16, Ki67 et HMB45 qui a déjà été testé par le passé. (75,76)

Une étude portant sur un double marquage anti-PRAME/HMB45 a d'ailleurs déjà été réalisée sur 63 cas et permet d'illustrer l'utilité de coupler les deux anticorps pour éviter certains pièges de diagnostic différentiel avec des tumeurs malignes d'origine non mélanocytaire.

IX. Limites de l'étude

Notre travail comporte quelques limites qui doivent être mentionnées. Même si la courbe ROC et les performances statistiques du score PRAME apparaissent excellentes dans notre série, le seuil optimal obtenu est néanmoins très bas (50/300). Nous pensons que cela peut être au moins partiellement dû au type de lésions que nous avons incluses (des lésions de diagnostic final non équivoque) et au score obtenu pour la quasi-totalité des nævus du groupe bénin qui apparaît extrêmement bas, contribuant à abaisser le seuil optimal qui maximise la sensibilité et spécificité du score.

Ce seuil optimal serait probablement différent dans une série de lésions mélanocytaires dites « intermédiaires ». Il doit donc être tempéré et des données supplémentaires portant sur ce type de lésion seraient nécessaires avant de pouvoir l'extrapoler à la pratique quotidienne.

Il est donc possible que la performance diagnostique de l'anti-PRAME apparaisse moins bonne dans un groupe de lésions mélanocytaires intermédiaires, qu'il s'agisse de sa sensibilité ou spécificité. Néanmoins, les autres biomarqueurs tels que Ki-67 et p16 présentent eux aussi une valeur limitée pour distinguer les lésions mélanocytaires atypiques (lésions situées à en « zone grise ») de véritables mélanomes (99). Une nouvelle étude comparative au sein d'un groupe de lésions mélanocytaires « intermédiaires » pourrait donc démontrer le même type de supériorité statistique en faveur de l'anticorps anti-PRAME.

X. Proposition d'algorithme d'utilisation de l'anticorps anti-PRAME dans les lésions mélanocytaires.

Selon un rapport d'experts récent, PRAME fait désormais partie des tests qui pourraient être réalisés en routine dans tous les laboratoires de pathologie générale concernés par un volume important d'exérèse diagnostique de tumeurs mélanocytaires. (100)

Étant donné qu'aucun critère immunohistochimique ne peut à lui seul fournir un diagnostic définitif de malignité, il est cependant important de considérer l'association des différents tests immunohistochimiques dont nous avons discuté.

C'est pourquoi nous proposons un algorithme diagnostique (Figure 5), permettant d'intégrer l'anti-PRAME dans le processus diagnostique, en association avec les autres anticorps et en gardant à l'esprit les différents pièges diagnostiques qui ont pu être évoqués.

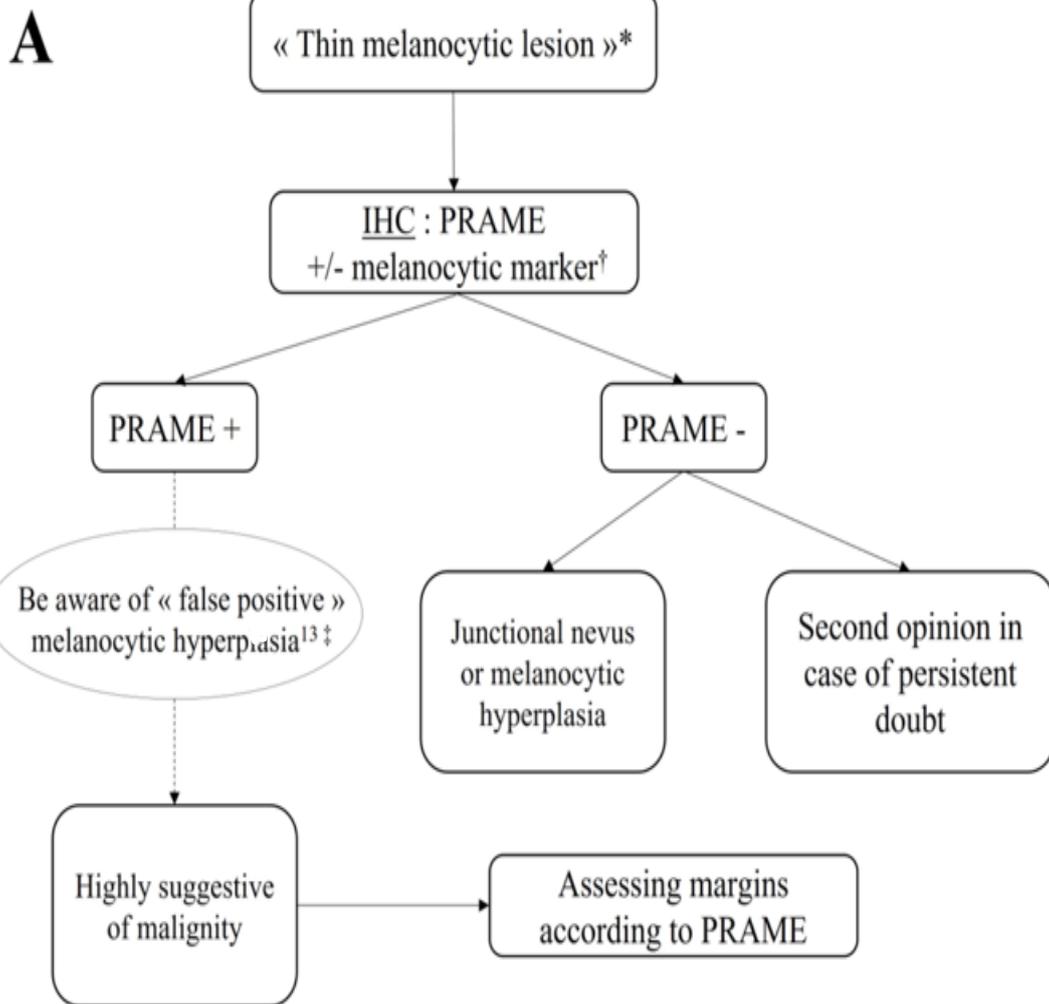


Figure 37A. Proposition d’algorithme diagnostique impliquant PRAME dans les lésions mélanocytaires « fines ».

*Thin integrated purely intra-epidermal lesions or with a minimal superficial dermal component, others being considered as a thick lesion.

†A melanocyte marker among Melan A/Sox10 according to practical habits. The aim of this examination is to find out more precisely the distribution and density of tumour cells.

‡A sparse distribution and low cell density are rather in favour of benignity.

IHC, immunohistochemistry

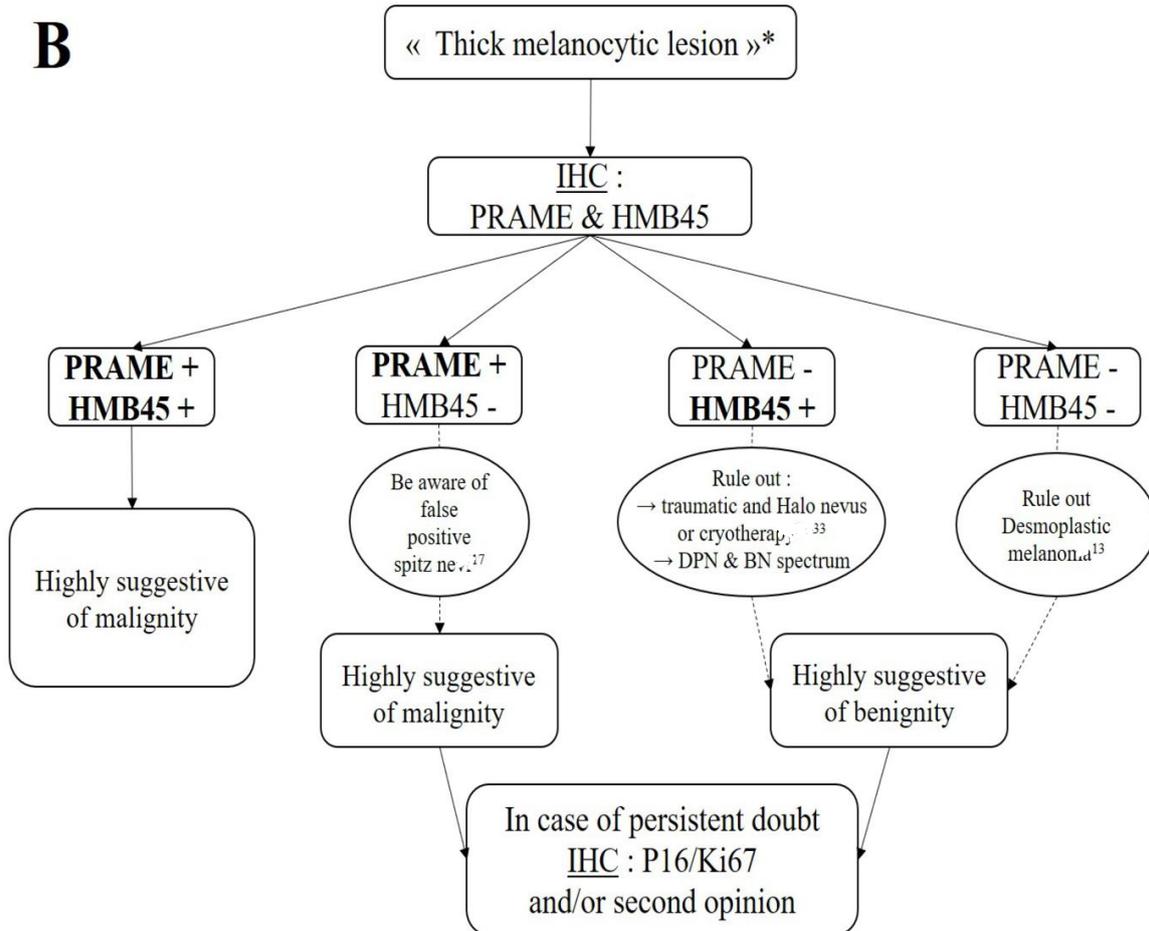
B

Figure 37B. Proposition d’algorithme diagnostique impliquant PRAME dans les lésions mélanocytaires « fines ».

BN, Blue naevus; DPN, Deep penetrating naevus; IHC, immunohistochemistry

*Thin integrated purely intra-epidermal lesions or with a minimal superficial dermal component, others being considered as a thick lesion.

Des données supplémentaires issues d’une série prospective à propos de lésions mélanocytaires « intermédiaires » peuvent être nécessaires pour vérifier l’applicabilité et l’utilité de cet algorithme dans la pratique courante des pathologistes généralistes.

XI. Résultats discordants et perspectives.

Enfin et comme mentionné précédemment, une série de ce volume entraîne obligatoirement la présence de cas aux résultats discordants pour l'analyse anti-PRAME. Au-delà de la lésion bénigne de spitz faussement positive précédemment illustrée, un autre nævus de notre série était positif pour l'analyse anti-PRAME avec un score de 210/300. Par ailleurs, trois mélanomes dont le diagnostic de malignité ne faisait aucun doute à l'analyse morphologique ont présentés une négativité pour l'analyse anti-PRAME avec un score global d'expression quasiment nul (10/300) voire nul (0/300).

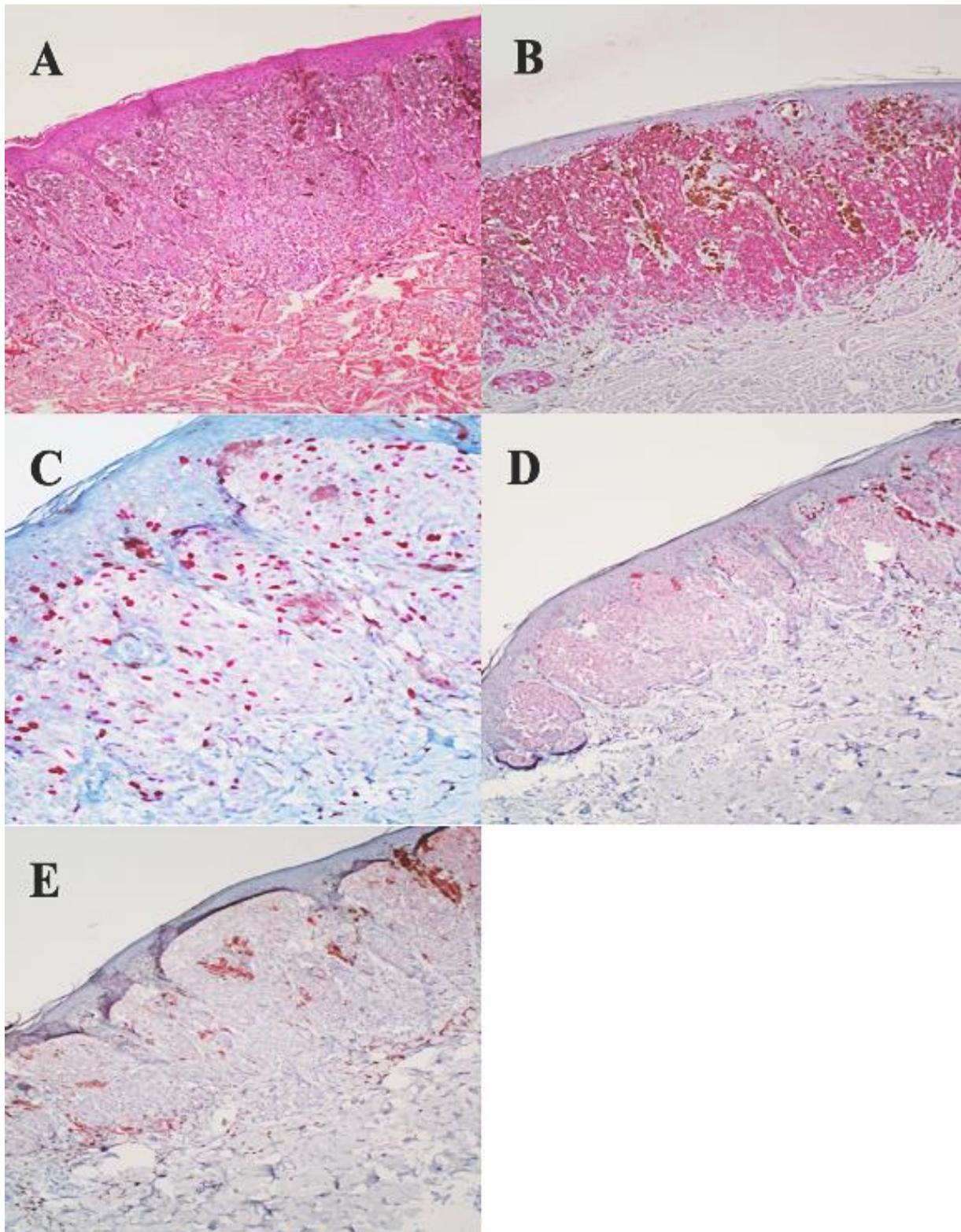


Figure 38. Illustration d'un mélanome SSM (A) dont les résultats d'analyses par anti-HMB45, Ki67 et P16 sont en accord avec le diagnostic final de malignité (B à D) mais dont celui pour anti-PRAME est discordant (score global d'expression à 0/300) (E).

Pour discuter ces discordances qui concernent 5 lésions mélanocytaires (2 nævus et 3 mélanomes) et y chercher une éventuelle explication, nous étudions actuellement ces lésions via des analyses cytogénétiques dont le principe a été exposé en introduction. Il s'agit d'analyse par hybridation in situ fluorescente (FISH) associée à une analyse chromosomique par puce à ADN (ACPA). Le but de ce travail complémentaire est d'étudier le profil chromosomique global (par ACPA) de ces 5 lésions et d'analyser de manière plus ciblée certaines de leurs régions chromosomiques d'intérêt via une FISH commerciale « kit 4 sondes » (ciblant les locus chromosomiques où sont situés les gènes *MYB*, *RREB1*, *CCND1* ainsi que le centromère du chromosome 6).

Il s'agit non seulement de vérifier la concordance entre les résultats de ces analyses cytogénétiques et le diagnostic histologique final retenu pour ces 5 lésions, mais également d'étudier la relation entre ces données cytogénétiques et les résultats de l'analyse anti-PRAME. En effet, des études rapportent déjà une bonne concordance entre les résultats de l'immunohistochimie pour PRAME et les ceux de FISH, mais la concordance entre les deux apparaît parfois insuffisante pour se passer de l'analyse cytogénétique. (101) Les résultats de ces travaux feront donc l'objet d'une présentation et d'une discussion complémentaire à travers la rédaction d'un mémoire.

- Profil génomique plat
- ACPA négative
- Exception : présence d'un léger gain en 15q

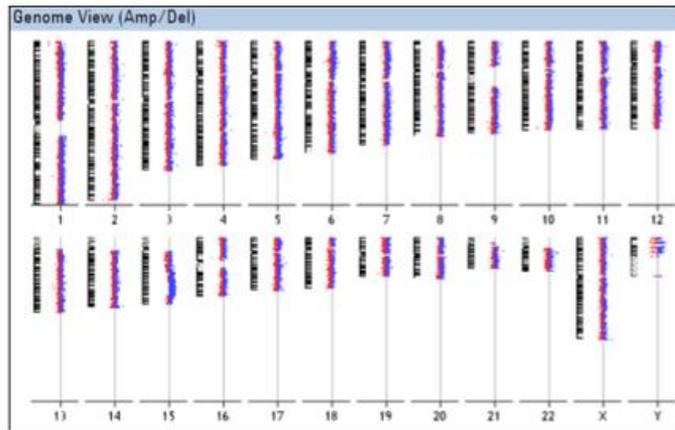
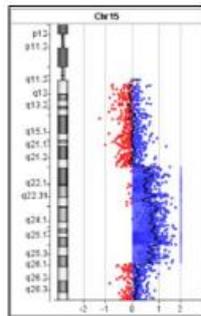


Figure 39. Profil chromosomique d'un nævus au résultat discordant (positif) pour anti-PRAME.
Adapté du mémoire de cytogénétique de JACQUEMONT Elisa.

CONCLUSION

En prenant en considération certaines exceptions telles que les lésions du spectre de spitz et les mélanomes desmoplastiques, le résultat de l'analyse immunohistochimique par anti-PRAME apparaît indépendamment corrélé au statut de malignité ou bénignité de la tumeur dans un groupe de lésions mélanocytaires non équivoques, quel que soit le sous-type de la tumeur, le contexte clinique ou l'environnement histologique de la lésion étudiée.

Surtout, l'anticorps apparaît nettement supérieur à l'analyse par anti-p16 pour distinguer les lésions bénignes des lésions malignes.

Bien qu'il soit également supérieur de façon quasi significative ($p=0,052$) à celle par anti-HMB45, ces deux tests devraient à notre sens être systématiquement utilisés en association autant que possible (notamment dans l'analyse des lésions « épaisses »), pour éviter certains écueils diagnostiques et augmenter leurs valeurs prédictives globales.

Concernant les lésions « fines », l'analyse est d'une fiabilité diagnostique extrêmement robuste, en plus d'être la seule applicable par rapport aux autres tests mentionnés.

PRAME semble donc représenter un intérêt grandissant auprès des pathologistes pour distinguer des lésions mélanocytaires bénignes et malignes dans leur pratique quotidienne, en complément d'une étude morphologique minutieuse qui reste néanmoins l'outil principal dans la décision diagnostique, en association avec les différents examens complémentaires disponibles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. SPF. Encadré. L'épidémiologie du mélanome cutané en France et en Europe. Numéro thématique. Le bronzage artificiel : une menace bien réelle, mais évitable, pour la santé publique [Internet]. [cité 2 nov 2020]. Disponible sur: /notices/encadre.-l-epidemiologie-du-melanome-cutane-en-france-et-en-europe.-numero-thematique.-le-bronzage-artificiel-une-menace-bien-reelle-mais-evitab
2. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *Vivo Athens Greece*. déc 2014;28(6):1005-11.
3. Ej G. The melanoma « epidemic »: lessons from prostate cancer [Internet]. Vol. 39, *Journal of cutaneous pathology. J Cutan Pathol*; 2012 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/22211331/>
4. Ra S, S C. The melanoma epidemic: more apparent than real? [Internet]. Vol. 72, *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clin Proc*; 1997 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/9179141/>
5. Tripp MK, Watson M, Balk SJ, Swetter SM, Gershenwald JE. State of the Science on Prevention and Screening to Reduce Melanoma Incidence and Mortality: The Time is Now. *CA Cancer J Clin*. 12 nov 2016;66(6):460.
6. Lipsker DM, Hedelin G, Heid E, Grosshans EM, Cribier BJ. Striking increase of thin melanomas contrasts with stable incidence of thick melanomas. *Arch Dermatol*. déc 1999;135(12):1451-6.
7. Bitterman A. Molecular testing to differentiate melanoma from benign nevi: The gold standard limitation. *J Am Acad Dermatol*. 1 oct 2016;75(4):849-50.
8. Yeh I. New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas. *Mod Pathol*. janv 2020;33(1):1-14.
9. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions [Internet]. <http://dx.doi.org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/10.1056/NEJMoa1502583>. Massachusetts Medical Society; 2015 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://www-nejm-org.ressources-electroniques.univ-lille.fr/doi/10.1056/NEJMoa1502583>
10. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(6):345-58.
11. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol*. 2019;247(5):539-51.
12. Rw K, T K, B G. Gene expression profiling in melanoma: past results and future potential [Internet]. Vol. 15, *Future oncology (London, England). Future Oncol*; 2019 [cité 2 déc 2020]. Disponible sur: <https://pubmed-ncbi-nlm-nih-gov.ressources-electroniques.univ-lille.fr/30453756/>
13. Pampena R, Kyrgidis A, Lallas A, Moscarella E, Argenziano G, Longo C. A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. *J Am Acad Dermatol*. nov 2017;77(5):938-945.e4.
14. Ferrara G, Argenziano G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Front Oncol*. 2 juill 2021;11:675296.
15. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*. mai 2008;35(5):433-44.
16. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol*. août 2009;33(8):1146-56.
17. Vergier B, Laharanne E, Prochazkova-Carlotti M, Merlio JP. Le diagnostic des

tumeurs mélaniques d'interprétation difficile : la biologie moléculaire au service du pathologiste averti. :6.

18. North JP, Garrido MC, Kolaitis NA, LeBoit PE, McCalmont TH, Bastian BC. Fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool in the diagnosis of ambiguous melanocytic neoplasms: a review of 804 cases. *Am J Surg Pathol.* juin 2014;38(6):824-31.
19. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. *Am J Pathol.* nov 2003;163(5):1765-70.
20. Elmore JG, Barnhill RL, Elder DE, Longton GM, Pepe MS, Reisch LM, et al. Pathologists' diagnosis of invasive melanoma and melanocytic proliferations: observer accuracy and reproducibility study. *BMJ.* 28 juin 2017;357:j2813.
21. Corona R, Mele A, Amini M, De Rosa G, Coppola G, Piccardi P, et al. Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* avr 1996;14(4):1218-23.
22. Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain J-F, De Smet C, et al. Characterization of an Antigen That Is Recognized on a Melanoma Showing Partial HLA Loss by CTL Expressing an NK Inhibitory Receptor. *Immunity.* 1 févr 1997;6(2):199-208.
23. Wadelin F, Fulton J, McEwan PA, Spriggs KA, Emsley J, Heery DM. Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia. *Mol Cancer.* 27 août 2010;9:226.
24. Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlée L, Hernandez M, Bernards R. The Human Tumor Antigen PRAME Is a Dominant Repressor of Retinoic Acid Receptor Signaling. *Cell.* sept 2005;122(6):835-47.
25. Lezcano C, Müller AM, Frosina D, Hernandez E, Geronimo JA, Busam KJ, et al. Immunohistochemical Detection of Cancer-Testis Antigen PRAME. *Int J Surg Pathol.* 23 avr 2021;10668969211012084.
26. Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP. Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer.* sept 2007;46(9):796-804.
27. Ortmann CA, Eisele L, Nüchel H, Klein-Hitpass L, Führer A, Dührsen U, et al. Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol.* oct 2008;87(10):809-18.
28. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES, et al. Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res.* nov 2007;31(11):1521-8.
29. Lee Y-K, Park U-H, Kim E-J, Hwang J-T, Jeong J-C, Um S-J. Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells. *Cancer Lett.* 10 2017;403:144-51.
30. Yang L, Wang Y-Z, Zhu H-H, Chang Y, Li L-D, Chen W-M, et al. PRAME Gene Copy Number Variation Is Related to Its Expression in Multiple Myeloma. *DNA Cell Biol.* déc 2017;36(12):1099-107.
31. Rivers JK, Copley MR, Svoboda R, Rigel DS. Non-Invasive Gene Expression Testing to Rule Out Melanoma. *Skin Ther Lett.* 2018;23(5):1-4.
32. Lezcano C, Pulitzer M, Moy AP, Hollmann TJ, Jungbluth AA, Busam KJ. Immunohistochemistry for PRAME in the Distinction of Nodal Nevi From Metastatic Melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2020;44(4):503-8.
33. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ. PRAME Expression in Melanocytic Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2018;42(11):1456-65.
34. Lezcano C, Jungbluth AA, Busam KJ. PRAME Immunohistochemistry as an Ancillary Test for the Assessment of Melanocytic Lesions. *Surg Pathol Clin.* juin 2021;14(2):165-75.

35. Lezcano C, Jungbluth AA, Busam KJ. Comparison of Immunohistochemistry for PRAME With Cytogenetic Test Results in the Evaluation of Challenging Melanocytic Tumors. *Am J Surg Pathol.* 2020;44(7):893-900.
36. Lopez DR, Forcucci JA, O'Connor H, Maize JC. PReferentially Expressed Antigen in MELanoma (PRAME) expression in BRCA1-associated protein (BAP1)-inactivated melanocytic tumors and deep penetrating nevi, a pilot study. *J Cutan Pathol.* 23 oct 2020;
37. Raghavan SS, Wang JY, Kwok S, Rieger KE, Novoa RA, Brown RA. PRAME expression in melanocytic proliferations with intermediate histopathologic or spitzoid features. *J Cutan Pathol [Internet].* [cité 2 nov 2020];n/a(n/a). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cup.13818>
38. Gradecki SE, Slingluff CL, Gru AA. PRAME Expression in 155 Cases of Metastatic Melanoma. *J Cutan Pathol.* 16 sept 2020;
39. Šekoranja D, Hawlina G, Pižem J. PRAME expression in melanocytic lesions of the conjunctiva. *Histopathology.* 16 juill 2021;
40. LeBlanc RE, Miller DM, Zegans ME. PRAME immunohistochemistry is useful in the evaluation of conjunctival melanomas, nevi, and primary acquired melanosis. *J Cutan Pathol.* 4 juin 2021;
41. Umamo GR, Errico ME, D'Onofrio V, Delehay G, Trotta L, Spinelli C, et al. The Challenge of Melanocytic Lesions in Pediatric Patients: Clinical-Pathological Findings and the Diagnostic Value of PRAME. *Front Oncol.* 2021;11:688410.
42. Hovander D, Allen J, Oda D, Moshiri AS. PRAME immunohistochemistry is useful in the diagnosis of oral malignant melanoma. *Oral Oncol.* 24 août 2021;105500.
43. Raghavan SS, Wang JY, Toland A, Bangs CD, Rieger KE, Novoa RA, et al. Diffuse PRAME expression is highly specific for malignant melanoma in the distinction from clear cell sarcoma. *J Cutan Pathol.* déc 2020;47(12):1226-8.
44. Gill P, Prieto VG, Austin MT, Giubellino A, Torres-Cabala CA. Diagnostic utility of PRAME in distinguishing proliferative nodules from melanoma in giant congenital melanocytic nevi. *J Cutan Pathol.* 23 juin 2021;
45. Scheffler AC, Koca E, Bernicker EH, Correa ZM. Relationship between clinical features, GEP class, and PRAME expression in uveal melanoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol.* juill 2019;257(7):1541-5.
46. Field MG, Durante MA, Decatur CL, Tarlan B, Oelschlager KM, Stone JF, et al. Epigenetic reprogramming and aberrant expression of PRAME are associated with increased metastatic risk in Class 1 and Class 2 uveal melanomas. *Oncotarget.* 13 sept 2016;7(37):59209-19.
47. Field MG, Decatur CL, Kurtenbach S, Gezgin G, van der Velden PA, Jager MJ, et al. PRAME as an Independent Biomarker for Metastasis in Uveal Melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 mars 2016;22(5):1234-42.
48. Toyama A, Siegel L, Nelson AC, Najmuddin M, Bu L, LaRue R, et al. Analyses of molecular and histopathologic features and expression of PRAME by immunohistochemistry in mucosal melanomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2019;32(12):1727-33.
49. Doolan P, Clynes M, Kennedy S, Mehta JP, Crown J, O'Driscoll L. Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* mai 2008;109(2):359-65.
50. Oberthuer A, Hero B, Spitz R, Berthold F, Fischer M. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juill 2004;10(13):4307-13.
51. Baba H, Kanda M, Sawaki K, Shimizu D, Umeda S, Koike M, et al. PRAME Expression as a Potential Biomarker for Hematogenous Recurrence of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* nov 2019;39(11):5943-51.

52. Iura K, Kohashi K, Hotokebuchi Y, Ishii T, Maekawa A, Yamada Y, et al. Cancer-testis antigens PRAME and NY-ESO-1 correlate with tumour grade and poor prognosis in myxoid liposarcoma. *J Pathol Clin Res*. juill 2015;1(3):144-59.
53. Tan P, Zou C, Yong B, Han J, Zhang L, Su Q, et al. Expression and prognostic relevance of PRAME in primary osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 mars 2012;419(4):801-8.
54. Zhu H, Wang J, Yin J, Lu B, Yang Q, Wan Y, et al. Downregulation of PRAME Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Through the Activation of P53 Mediated Pathway. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 2018;45(3):1121-35.
55. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Claesson I, Fallenius G, Sundfeldt K, et al. Four potential biomarkers as prognostic factors in stage III serous ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer*. 1 nov 2008;123(9):2130-7.
56. Partheen K, Levan K, Osterberg L, Horvath G. Expression analysis of stage III serous ovarian adenocarcinoma distinguishes a sub-group of survivors. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. nov 2006;42(16):2846-54.
57. Dyrskjøt L, Zieger K, Kissow Lildal T, Reinert T, Gruselle O, Coche T, et al. Expression of MAGE-A3, NY-ESO-1, LAGE-1 and PRAME in urothelial carcinoma. *Br J Cancer*. 26 juin 2012;107(1):116-22.
58. Szczepanski MJ, DeLeo AB, Łuczak M, Molinska-Glura M, Misiak J, Szarzynska B, et al. PRAME expression in head and neck cancer correlates with markers of poor prognosis and might help in selecting candidates for retinoid chemoprevention in pre-malignant lesions. *Oral Oncol*. févr 2013;49(2):144-51.
59. Orlando D, Miele E, De Angelis B, Guercio M, Boffa I, Sinibaldi M, et al. Adoptive Immunotherapy Using PRAME-Specific T Cells in Medulloblastoma. *Cancer Res*. 15 2018;78(12):3337-49.
60. Li J, Yin J, Zhong J, Yang Z, Tang A, Li S. Clinicopathological and Prognostic Significance of PRAME Overexpression in Human Cancer: A Meta-Analysis. *BioMed Res Int*. 2020;2020:8828579.
61. Ercolak V, Paydas S, Bagir E, Ergin M, Seydaoglu G, Celik H, et al. PRAME Expression and Its Clinical Relevance in Hodgkin's Lymphoma. *Acta Haematol*. 2015;134(4):199-207.
62. Abdelmalak CA, Yahya RS, Elghannam DM, El-Khadragy AE, Abd El Messih HM. PRAME gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact on prognosis. *Clin Lab*. 2014;60(1):55-61.
63. Rezvani K, Yong ASM, Tawab A, Jafarpour B, Eniafe R, Mielke S, et al. Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia. *Blood*. 5 mars 2009;113(10):2245-55.
64. Quintarelli C, Dotti G, De Angelis B, Hoyos V, Mims M, Luciano L, et al. Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. *Blood*. 1 sept 2008;112(5):1876-85.
65. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, et al. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood*. 15 déc 2006;108(13):4109-17.
66. Kirkin AF, Dzhandzhugazyan K, Zeuthen J. The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Exp Clin Immunogenet*. 1998;15(1):19-32.
67. Pankov D, Sjöström L, Kalidindi T, Lee S-G, Sjöström K, Gardner R, et al. In vivo immuno-targeting of an extracellular epitope of membrane bound preferentially expressed

- antigen in melanoma (PRAME). *Oncotarget*. 12 sept 2017;8(39):65917-31.
68. Gezgin G, Luk SJ, Cao J, Dogrusöz M, van der Steen DM, Hagedoorn RS, et al. PRAME as a Potential Target for Immunotherapy in Metastatic Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol*. 01 2017;135(6):541-9.
 69. Al-Khadairi G, Decock J. Cancer Testis Antigens and Immunotherapy: Where Do We Stand in the Targeting of PRAME? *Cancers [Internet]*. 15 juill 2019 [cité 25 janv 2021];11(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6678383/>
 70. Xu Y, Zou R, Wang J, Wang Z, Zhu X. The role of the cancer testis antigen PRAME in tumorigenesis and immunotherapy in human cancer. *Cell Prolif [Internet]*. 5 févr 2020 [cité 2 nov 2020];53(3). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7106952/>
 71. Rudolph P, Schubert C, Schubert B, Parwaresch R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol*. août 1997;37(2 Pt 1):169-78.
 72. Clarke LE, Warf MB, Flake DD, Hartman A, Tahan S, Shea CR, et al. Clinical validation of a gene expression signature that differentiates benign nevi from malignant melanoma. *J Cutan Pathol*. avr 2015;42(4):244-52.
 73. Torres R, Lang UE, Hejna M, Shelton SJ, Joseph NM, Shain AH, et al. MicroRNA Ratios Distinguish Melanomas from Nevi. *J Invest Dermatol*. janv 2020;140(1):164-173.e7.
 74. Koh SS, Opel ML, Wei J-PJ, Yau K, Shah R, Gorre ME, et al. Molecular classification of melanomas and nevi using gene expression microarray signatures and formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. avr 2009;22(4):538-46.
 75. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol*. 26 oct 2015;10:195.
 76. Uguen A, Uguen M, Guibourg B, Talagas M, Marcorelles P, De Braekeleer M. The p16-Ki-67-HMB45 Immunohistochemistry Scoring System is Highly Concordant With the Fluorescent In Situ Hybridization Test to Differentiate Between Melanocytic Nevi and Melanomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. juill 2018;26(6):361-7.
 77. Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol*. déc 2000;22(6):489-95.
 78. Alomari AK, Tharp AW, Umphress B, Kowal RP. The utility of PRAME immunohistochemistry in the evaluation of challenging melanocytic tumors. *J Cutan Pathol*. 3 mars 2021;
 79. Banerjee SS, Harris M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology*. mai 2000;36(5):387-402.
 80. Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. mai 2000;6(5):1845-53.
 81. Pavey SJ, Cummings MC, Whiteman DC, Castellano M, Walsh MD, Gabrielli BG, et al. Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion. *Melanoma Res*. déc 2002;12(6):539-47.
 82. Mihic-Probst D, Saremaslani P, Komminoth P, Heitz PU. Immunostaining for the tumour suppressor gene p16 product is a useful marker to differentiate melanoma metastasis from lymph-node nevus. *Virchows Arch Int J Pathol*. déc 2003;443(6):745-51.
 83. See SHC, Finkelman BS, Yeldandi AV. The diagnostic utility of PRAME and p16 in distinguishing nodal nevi from nodal metastatic melanoma. *Pathol Res Pract*. sept 2020;216(9):153105.
 84. Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical Expression of p16 in Melanocytic Lesions: An Updated Review and Meta-analysis. *Arch Pathol Lab Med*. juill

2018;142(7):815-28.

85. McBride JD, McAfee JL, Piliang M, Bergfeld WF, Fernandez AP, Ronen S, et al. Preferentially expressed antigen in melanoma and p16 expression in acral melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol*. 3 sept 2021;
86. Adeniran AJ, Prieto VG, Chon S, Duvic M, Diwan AH. Atypical histologic and immunohistochemical findings in melanocytic nevi after liquid nitrogen cryotherapy. *J Am Acad Dermatol*. août 2009;61(2):341-5.
87. Leleux TM, Prieto VG, Diwan AH. Aberrant expression of HMB-45 in traumatized melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol*. sept 2012;67(3):446-50.
88. Ruby KN, Li Z, Yan S. Aberrant expression of HMB45 and negative PRAME expression in halo nevi. *J Cutan Pathol* [Internet]. [cité 25 janv 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cup.13916>
89. Wood WS, Tron VA. Analysis of HMB-45 immunoreactivity in common and cellular blue nevi. *J Cutan Pathol*. août 1991;18(4):261-3.
90. Cunningham CJ, Fleischman A, Buckingham L, O'Connor S, Gehrig PA, Googe PB. Uterine Cellular Blue Nevus Arising in Mullerian and Pelvic Dendritic Melanocytosis: Case Report of a Rare Phenomenon to Be Distinguished From Uterine Melanoma. *Int J Gynecol Pathol Off J Int Soc Gynecol Pathol*. 1 juill 2021;40(4):349-54.
91. Ostmeier H, Suter L. The Ki-67 antigen in primary human melanomas--its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. *Arch Dermatol Res*. 1989;281(3):173-7.
92. Tio D, Willemsen M, Krebbers G, Kasiem FR, Hoekzema R, van Doorn R, et al. Differential Expression of Cancer Testis Antigens on Lentigo Maligna and Lentigo Maligna Melanoma. *Am J Dermatopathol*. août 2020;42(8):625-7.
93. Gassenmaier M, Hahn M, Metzler G, Bauer J, Yazdi AS, Keim U, et al. Diffuse PRAME Expression Is Highly Specific for Thin Melanomas in the Distinction from Severely Dysplastic Nevi but Does Not Distinguish Metastasizing from Non-Metastasizing Thin Melanomas. *Cancers*. 31 juill 2021;13(15):3864.
94. Reed JA, Loganzo F, Shea CR, Walker GJ, Flores JF, Glendening JM, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res*. 1 juill 1995;55(13):2713-8.
95. Gradecki SE, Valdes-Rodriguez R, Wick MR, Gru AA. PRAME immunohistochemistry as an adjunct for diagnosis and histological margin assessment in lentigo maligna. *Histopathology*. juin 2021;78(7):1000-8.
96. Lohman ME, Steen A, Grekin RC, North JP. The utility of PRAME staining in identifying malignant transformation of melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* [Internet]. [cité 25 janv 2021];n/a(n/a). Disponible sur: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/cup.13958>
97. Googe PB, Flanigan KL, Miedema JR. Preferentially Expressed Antigen in Melanoma Immunostaining in a Series of Melanocytic Neoplasms. *Am J Dermatopathol*. 11 mai 2021;
98. Muto Y, Fujimura T, Kambayashi Y, Ohuchi K, Amagai R, Akira Hashimoto, et al. Metastatic PRAME-Expressing Juvenile Spitzoid Melanoma on the Buttock. *Case Rep Oncol*. déc 2020;13(3):1141-4.
99. Ensslin CJ, Hibler BP, Lee EH, Nehal KS, Busam KJ, Rossi AM. Atypical Melanocytic Proliferations: A Review of the Literature. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. févr 2018;44(2):159-74.
100. de la Fouchardiere A, Blokkx W, van Kempen LC, Luzar B, Piperno-Neumann S, Puig S, et al. ESP, EORTC, and EURACAN Expert Opinion: practical recommendations for the pathological diagnosis and clinical management of intermediate melanocytic tumors and rare related melanoma variants. *Virchows Arch* [Internet]. 12 janv 2021 [cité 15 févr 2021]; Disponible sur: <https://doi.org/10.1007/s00428-020-03005-1>

101. Harvey NT, Peverall J, Acott N, Mesbah Ardakani N, Leecy TN, Iacobelli J, et al. Correlation of FISH and PRAME Immunohistochemistry in Ambiguous Superficial Cutaneous Melanocytic Proliferations. Am J Dermatopathol. 21 avr 2021;

ANNEXES

Annexe 1. Influence des variables histologiques sur le score global d'expression de PRAME.

Variable	Spearman correlation	95% confidence interval	P-Value
Taille (cm)	0.10	[-0.17 ; 0.37]	0.440
Breslow (mm)	0.07	[-0.17 ; 0.32]	0.570
Index de Clark	-0.12	[-0.36 ; 0.13]	0.350
Inflammation	-0.15	[-0.39 ; 0.13]	0.230
Mitoses	0.10	[-0.15 ; 0.36]	0.440
Regression	-0.28	[-0.51 ; -0.03]	0.026
Elastose	0.02	[-0.25 ; 0.26]	0.850

Variable		PRAME score Median & IQR	P-Value
Sexe	F	240 [200 ; 297.5]	0.078
	H	300 [221.2 ; 300]	0.078
Topographie	Tête et cou	295 [237.5 ; 300]	0.7
	Tronc	240 [202.5 ; 300]	0.7
	Membres	270 [200 ; 300]	0.7
Sous-type	Acral	300 [200 ; 300]	0.7
	SSM	240 [200 ; 300]	0.096
	Lentigineux	300 [280 ; 300]	0.096
Ulcération	Nodulaire	275 [215 ; 300]	0.26
	Non	250 [200 ; 300]	0.26
	Oui	300 [215 ; 300]	0.26

Le score global d'expression pour PRAME n'est significativement affecté par aucune des variables histologiques, à l'exception de la régression de façon significative avec un coefficient de corrélation extrêmement faible cependant.

AUTEUR : Nom : PASSOS

Prénom : Jérémy

Date de soutenance : Vendredi 26 novembre

Titre de la thèse : L'apport de l'anticorps anti-PRAME en immunohistochimie pour distinguer les lésions mélanocytaires bénignes et malignes par rapport aux autres outils immunohistochimiques déjà utilisés en pratique courante.

Thèse - Médecine – Lille - 2021

Cadre de classement : Anatomie et Cytologie Pathologiques

DES + spécialité : Anatomie et Cytologie Pathologiques

Mots-clés : mélanome, nævus, PRAME, HMB45, p16, Ki67.

Résumé :

Contexte : Les lésions mélanocytaires représentent une grande proportion de l'activité diagnostique dans la pratique de l'anatomie et cytologie pathologiques. Il est cependant parfois difficile de déterminer leur potentiel de malignité. Les anticorps anti-HMB45, p16, et Ki67 sont les outils immunohistochimiques les plus fréquemment utilisés dans l'aide à l'interprétation de ces lésions, en complément de l'analyse microscopique par coloration standard (HES). Récemment, l'anticorps anti-PRAME est apparu comme un test performant pour distinguer les lésions bénignes et malignes. L'objectif de ce travail est de déterminer sa place par rapport aux trois autres outils immunohistochimiques cités dans la discrimination des lésions mélanocytaires bénignes et malignes.

Méthode : Une analyse rétrospective a été menée sur 140 lésions mélanocytaires malignes et bénignes de diagnostic non équivoque et une analyse immunohistochimique par anticorps anti-HMB45, p16, Ki-67 et anti-PRAME a été réalisée pour chaque lésion (à l'exception de l'analyse par anti-Ki67 réalisée seulement au sein du groupe des lésions malignes). Le statut de réactivité des cellules tumorales pour anti-PRAME a été évalué par deux observateurs indépendants en utilisant deux méthodes distinctes. Le résultat évocateur de malignité ou de bénignité de chacun des trois autres tests a également été interprété par lecture collégiale. Le diagnostic final de malignité ou bénignité de chaque lésion était fondé sur le seul examen morphologique (coloration standard par HES), représentant le gold standard de notre étude. La sensibilité, la spécificité et la concordance diagnostique de chaque test immunohistochimique ont ensuite été calculées en référence à ce gold standard, puis comparées les unes aux autres.

Résultats : Le taux de concordance diagnostique avec le gold standard pour anti-PRAME, HMB45 et p16 était respectivement de 95 %, 87,3 % et 85,2 %, et la sensibilité d'anti-Ki-67 dans le groupe « malin » était de 0,574. La comparaison statistique de ces résultats a montré une supériorité significative d'anti-PRAME sur anti-P16 et une supériorité à la limite de la significativité ($p=0,052$) sur anti-HMB45 pour distinguer les lésions bénignes et malignes. Par ailleurs, le résultat de l'analyse par anti-PRAME n'est significativement influencé par aucune des autres variables histologiques étudiées, en dehors de la malignité ou bénignité, et à l'exception de la régression tumorale de façon minime (coefficient de corrélation à $-0,3$). Enfin, la sensibilité de l'analyse par anti-PRAME est de 100% au sein du sous-groupe des mélanomes « fins », dans lequel les autres anticorps ne sont pas interprétables.

Conclusion : En considérant certaines exceptions telles que les lésions spitzoïdes et mélanomes desmoplasiques, l'anticorps anti-PRAME apparaît supérieur aux outils immunohistochimiques existants (anti-HMB45, p16 et Ki-67) pour distinguer des lésions mélanocytaires malignes et bénignes de diagnostic univoque. Il s'agit par ailleurs d'un marqueur qui n'est pas influencé par les autres variables histologiques et d'un outil diagnostique très fiable dans les lésions mélanocytaires « fines ». Malgré sa grande robustesse et sa reproductibilité diagnostique, certains pièges doivent être évités lors de son utilisation et un algorithme diagnostique l'intégrant à l'ensemble des données cliniques, histologiques et aux autres outils immunohistochimiques est ainsi proposé car l'étude morphologique reste l'outil principal de la décision diagnostique.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT

Assesseurs : Monsieur le Professeur Philippe MODIANO

Madame le Docteur Marie CRINQUETTE

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Pierre GOSSET