



Année 2017

N°

## Thèse

Pour le

### DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Thibault Kervarrec**

Né le 04 Août 1989 à Mont Saint Aignan (76)

---

### **CARCINOME A CELLULES DE MERKEL GANGLIONNAIRE SANS PRIMITIF CUTANÉ : CRITÈRES DIAGNOSTIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIE**

---

Présentée et soutenue publiquement le **18 septembre 2017** devant un jury  
composé de :

Président du Jury : Professeur Laurent MACHET, Dermatologie, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Professeur Serge Guyétant, Anatomie et cytologie pathologiques, Faculté de Médecine -  
Tours

Professeur Mahtab Samimi, Dermatologie, Faculté de Médecine - Tours

Docteur Janine Wechsler, Anatomie et cytologie pathologiques, MCU-PH, Faculté de  
Médecine - Créteil

Docteur Marie-Christine Machet, Anatomie et cytologie pathologiques, MCU-PH, Faculté de  
Médecine - Tours

**Directeur de thèse : Professeur Serge Guyétant, Anatomie et cytologie pathologiques,  
Faculté de Médecine – Tours**





Année 2017

N°

## Thèse

Pour le

### DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'État

par

**Thibault Kervarrec**

Né le 04 Août 1989 à Mont Saint Aignan (76)

---

### **CARCINOME A CELLULES DE MERKEL GANGLIONNAIRE SANS PRIMITIF CUTANÉ : CRITÈRES DIAGNOSTIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIE**

---

Présentée et soutenue publiquement le **18 septembre 2017** devant un jury  
composé de :

Président du Jury : Professeur Laurent MACHET, Dermatologie, Faculté de Médecine - Tours

Membres du Jury :

Professeur Serge Guyétant, Anatomie et cytologie pathologiques, Faculté de Médecine -  
Tours

Professeur Mahtab Samimi, Dermatologie, Faculté de Médecine - Tours

Docteur Janine Wechsler, Anatomie et cytologie pathologiques, MCU-PH, Faculté de  
Médecine - Créteil

Docteur Marie-Christine Machet, Anatomie et cytologie pathologiques, MCU-PH, Faculté de  
Médecine - Tours

**Directeur de thèse : Professeur Serge Guyétant, Anatomie et cytologie pathologiques,  
Faculté de Médecine – Tours**

UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS  
FACULTÉ DE MÉDECINE DE TOURS

**DOYEN**

**Pr. Patrice Diot**

**VICE-DOYEN**

**Pr. Henri Marret**

**ASSESSEURS**

Pr. Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*  
Pr. Mathias BUCHLER, *Relations internationales*  
Pr. Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*  
Pr. Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*  
Pr. François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*  
Pr. Patrick VOURC'H, *Recherche*

**SECRÉTAIRE GÉNÉRALE**

**Mme Fanny BOBLETER**

\*\*\*\*\*

**DOYENS HONORAIRES**

**Pr. Emile ARON (†) – 1962-1966**

*Directeur de l'École de Médecine - 1947-1962*

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

**Pr. André GOUAZE - 1972-1994**

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

**Pr. Dominique PERROTIN – 2004-2014**

**PROFESSEURS ÉMERITES**

**Pr. Catherine BARTHELEMY**

**Pr. Philippe BOUGNOUX**

**Pr. Etienne DANQUECHIN-DORVAL**

**Pr. Loïc DE LA LANDE DE CALAN**

**Pr. Noël HUTEN**

**Pr. Olivier LE FLOCH**

**Pr. Yvon LEBRANCHU**

**Pr. Elisabeth LECA**

**Pr. Gérard LORETTE**

**Pr. Roland QUENTIN**

**Pr. Alain ROBIER**



### *PROFESSEURS HONORAIRES*

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – A. AUTRET – P. BAGROS – G. BALLON – P. BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – JC. BESNARD – P. BEUTTER – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – P. CHOUTET – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – J. FUSCIARDI – P. GAILLARD – G. GINIES – A. GOUAZE – J.L. GUILMOT – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – E. LEMARIE – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MAURAGE – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINÉ – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – L. POURCELOT – P. RAYNAUD – D. RICHARD-LENOBLE – M. ROBERT – J.C. ROLLAND – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – B. TOUMIEUX – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

---

ALISON Daniel .....	Radiologie et imagerie médicale
ANDRES Christian .....	Biochimie et biologie moléculaire
ANGOULVANT Denis.....	Cardiologie
ANGOULVANT Théodora .....	Pharmacologie clinique
ARBEILLE Philippe.....	Biophysique et médecine nucléaire
AUPART Michel.....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BABUTY Dominique .....	Cardiologie
BALLON Nicolas.....	Psychiatrie ; addictologie
BARILLOT Isabelle.....	Cancérologie ; radiothérapie
BARON Christophe .....	Immunologie
BERNARD Louis .....	Maladies infectieuses et maladies tropicales
BODY Gilles.....	Gynécologie et obstétrique
BONNARD Christian .....	Chirurgie infantile
BONNET-BRILHAULT Frédérique .....	Physiologie
BRILHAULT Jean.....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BRUNEREAU Laurent.....	Radiologie et imagerie médicale
BRUYERE Franck .....	Urologie
BUCHLER Matthias.....	Néphrologie
CALAIS Gilles.....	Cancérologie, radiothérapie
CAMUS Vincent.....	Psychiatrie d'adultes
CHANDENIER Jacques .....	Parasitologie, mycologie
CHANTEPIE Alain .....	Pédiatrie
COLOMBAT Philippe.....	Hématologie, transfusion
CONSTANS Thierry .....	Médecine interne, gériatrie
CORCIA Philippe .....	Neurologie
COSNAY Pierre.....	Cardiologie
COTTIER Jean-Philippe .....	Radiologie et imagerie médicale
COUET Charles.....	Nutrition
DE TOFFOL Bertrand.....	Neurologie
DEQUIN Pierre-François .....	Thérapeutique
DESTRIEUX Christophe.....	Anatomie
DIOT Patrice .....	Pneumologie
DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague .....	Anatomie & cytologie pathologiques
DUCLUZEAU Pierre-Henri .....	Endocrinologie, diabétologie, et nutrition
DUMONT Pascal .....	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
EL HAGE Wissam .....	Psychiatrie adultes
EHRMANN Stephan .....	Réanimation
FAUCHIER Laurent .....	Cardiologie
FAVARD Luc .....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
FOUQUET Bernard .....	Médecine physique et de réadaptation
FRANCOIS Patrick .....	Neurochirurgie
FROMONT-HANKARD Gaëlle .....	Anatomie & cytologie pathologiques
GOGA Dominique.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
GOUDEAU Alain .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUPILLE Philippe.....	Rhumatologie
GRUEL Yves .....	Hématologie, transfusion
GUERIF Fabrice .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
GUYETANT Serge .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GYAN Emmanuel .....	Hématologie, transfusion
HAILLOT Olivier .....	Urologie
HALIMI Jean-Michel .....	Thérapeutique
HANKARD Régis.....	Pédiatrie
HERAULT Olivier.....	Hématologie, transfusion
HERBRETEAU Denis.....	Radiologie et imagerie médicale
LABARTHE François.....	Pédiatrie
LAFFON Marc.....	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence

LARDY Hubert .....	Chirurgie infantile
LARIBI Saïd .....	Médecine d'urgence
LARTIGUE Marie-Frédérique .....	Bactériologie-virologie
LAURE Boris.....	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
LECOMTE Thierry .....	Gastroentérologie, hépatologie
LESCANNE Emmanuel .....	Oto-rhino-laryngologie
LINASSIER Claude .....	Cancérologie, radiothérapie
MACHET Laurent .....	Dermato-vénéréologie
MAILLOT François .....	Médecine interne
MARCHAND-ADAM Sylvain.....	Pneumologie
MARRET Henri.....	Gynécologie-obstétrique
MARUANI Annabel.....	Dermatologie-vénéréologie
MEREGHETTI Laurent.....	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MORINIERE Sylvain.....	Oto-rhino-laryngologie
MOUSSATA Driffa .....	Gastro-entérologie
MULLEMAN Denis .....	Rhumatologie
ODENT Thierry.....	Chirurgie infantile
OUAISSI Mehdi .....	Chirurgie digestive
PAGES Jean-Christophe.....	Biochimie et biologie moléculaire
PAINTAUD Gilles .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PATAT Frédéric.....	Biophysique et médecine nucléaire
PERROTIN Dominique.....	Réanimation médicale, médecine d'urgence
PERROTIN Franck .....	Gynécologie-obstétrique
PISELLA Pierre-Jean .....	Ophtalmologie
QUENTIN Roland .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
REMERAND Francis .....	Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence
ROINGEARD Philippe .....	Biologie cellulaire
ROSSET Philippe .....	Chirurgie orthopédique et traumatologique
ROYERE Dominique .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
RUSCH Emmanuel.....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
SAINT-MARTIN Pauline .....	Médecine légale et droit de la santé
SALAME Ephrem .....	Chirurgie digestive
SALIBA Elie .....	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
SANTIAGO-RIBEIRO Maria .....	Biophysique et médecine nucléaire
SIRINELLI Dominique .....	Radiologie et imagerie médicale
THOMAS-CASTELNAU Pierre.....	Pédiatrie
TOUTAIN Annick .....	Génétique
VAILLANT Loïc.....	Dermato-vénéréologie
VELUT Stéphane.....	Anatomie
VOURC'H Patrick .....	Biochimie et biologie moléculaire
WATIER Hervé .....	Immunologie

---

## PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

LEBEAU Jean-Pierre  
LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie

---

## PROFESSEURS ASSOCIÉS

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

---

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

BAKHOS David ..... Physiologie |

BARBIER Louise .....	Chirurgie digestive
BERNARD-BRUNET Anne.....	Cardiologie
BERTRAND Philippe .....	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
BLANCHARD Emmanuelle .....	Biologie cellulaire
BLASCO Hélène.....	Biochimie et biologie moléculaire
CAILLE Agnès .....	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
DESOUBEUX Guillaume .....	Parasitologie et mycologie
DOMELIER Anne-Sophie .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
DUFOUR Diane .....	Biophysique et médecine nucléaire
FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie .....	Anatomie et cytologie pathologiques
GATAULT Philippe .....	Néphrologie
GAUDY-GRAFFIN Catherine .....	Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière
GOUILLEUX Valérie.....	Immunologie
GUILLON Antoine.....	Réanimation
GUILLON-GRAMMATICO Leslie .....	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
HOARAU Cyrille .....	Immunologie
HOURIOUX Christophe.....	Biologie cellulaire
IVANES Fabrice .....	Physiologie
LE GUELLEC Chantal .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
MACHET Marie-Christine .....	Anatomie et cytologie pathologiques
PIVER Éric.....	Biochimie et biologie moléculaire
ROUMY Jérôme .....	Biophysique et médecine nucléaire
PLANTIER Laurent.....	Physiologie
SAMIMI Mahtab .....	Dermatologie-vénéréologie
TERNANT David .....	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
ZEMMOURA Ilyess .....	Neurochirurgie

## MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

---

AGUILLON-HERNANDEZ Nadia .....	Neurosciences
DIBAO-DINA Clarisse.....	Médecine Générale
LEMOINE Maël.....	Philosophie
MONJAUZE Cécile.....	Sciences du langage - orthophonie
PATIENT Romuald .....	Biologie cellulaire
RENOUX-JACQUET Cécile .....	Médecine Générale

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

---

BOUAKAZ Ayache .....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
CHALON Sylvie .....	Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
COURTY Yves.....	Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
DE ROCQUIGNY Hugues .....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
ESCOFFRE Jean-Michel.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
GILOT Philippe .....	Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice .....	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
GOMOT Marie .....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
HEUZE-VOURCH Nathalie .....	Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
KORKMAZ Brice.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric .....	Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
LE PAPE Alain.....	Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
MAZURIER Frédéric.....	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
MEUNIER Jean-Christophe.....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
PAGET Christophe .....	Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

RAOUL William..... Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292  
SI TAHAR Mustapha ..... Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM  
1100  
WARDAK Claire ..... Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930

## **CHARGÉS D'ENSEIGNEMENT**

---

### ***Pour l'École d'Orthophonie***

DELORE Claire ..... Orthophoniste  
GOUIN Jean-Marie ..... Praticien Hospitalier  
MONDON Karl ..... Praticien Hospitalier  
PERRIER Danièle ..... Orthophoniste

### ***Pour l'École d'Orthoptie***

LALA Emmanuelle ..... Praticien Hospitalier  
MAJZOUB Samuel ..... Praticien Hospitalier

### ***Pour l'Éthique Médicale***

BIRMELE Béatrice..... Praticien Hospitalier

# SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

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

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

Que les hommes m'accordent leur estime

si je suis fidèle à mes promesses.  
Que je sois couvert d'opprobre  
et méprisé de mes confrères  
si j'y manque.

## **Remerciements :**

**Je remercie tout particulièrement le Pr Serge Guyétant pour le rôle essentiel qu'il a joué dans le choix de ma spécialité en accompagnant mes premiers pas dans celle-ci, je le remercie pour le soutien qu'il m'apporte depuis maintenant presque dix ans, aussi bien dans ma formation professionnelle que pour mes travaux de recherche.**

**Je remercie vivement le Pr Laurent Machet à qui je dois ma formation en Dermatologie clinique. Je le remercie et je me réjouis qu'il m'ait fait l'honneur de présider mon jury.**

**Je remercie également chaleureusement le Pr Mahtab Samimi qui a joué un rôle décisif dans l'obtention du financement de mon année de Master 2 et dans l'élaboration de mes premiers travaux au sein de l'équipe de recherche. Je la remercie particulièrement pour le temps qu'elle me consacre, pour ses conseils et relectures avisés. J'espère pouvoir continuer à travailler avec elle de manière pérenne.**

**Je remercie très vivement le Dr Janine Wechsler de m'avoir fait l'honneur de participer à mon Jury de Thèse. Je la remercie également pour ses enseignements et de m'avoir permis d'assister aux rencontres anglo-franco-belges de Dermatopathologie.**

**Je remercie chaleureusement le Dr Marie-Christine Machet, pour le soutien inconditionnel qu'elle m'apporte depuis des années.**

**Je remercie le Pr Gonzague de Pinieux qui m'a guidé dans la rédaction de mon premier article original. Je le remercie vivement pour son enseignement et son soutien.**

**Je remercie également chaleureusement le Docteur Anne de Muret pour son enthousiasme et sa passion de notre spécialité.**

**Je remercie très sincèrement le Pr Antoine Touzé de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et d'avoir encadré mon travail de M2. Je le remercie sincèrement de m'avoir laissé choisir ma thématique de recherche et intégrer ma spécialité au cœur de ce travail tout en m'apportant son soutien constant. J'espère pouvoir continuer à travailler avec lui dans d'aussi bonnes conditions.**



**Je remercie également l'ensemble de son équipe notamment Pauline Gaboriaud, le Dr Françoise Arnold, le Dr Valérie Leblond et le Dr Patricia Berthon.**

**Je remercie le Pr Gaëlle Fromont ainsi que la technicienne de son équipe de recherche, Mlle Roseline Guibon, pour leur aide dans la réalisation du TMA et leurs précieux conseils.**

**Je remercie l'ensemble des médecins pathologistes qui ont participé à ma formation notamment les Drs Jean Frédéric Bruch, Claire Bléchet, Rémy Kerdraon et Patrick Michenet.**

**Je tiens également à remercier vivement les dermatologues cliniciens qui m'ont accueilli dans leur service et notamment les Drs Eric Estève et Guido Bens.**

**Je tiens vivement à remercier le Docteur Christine Collin et l'ensemble de son équipe avec qui j'ai pu réaliser mes premiers pas en biologie moléculaire.**

**Enfin, je remercie vivement l'ensemble des patients qui ont donné leur accord pour l'utilisation des prélèvements et tous les médecins qui ont permis la constitution de la cohorte, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.**

## **Abréviations**

AgsT : Antigène petit T

AgLT : Antigène grand T

ATOH1 : Atonal homolog 1

CAP1 : Carcinome de primitif inconnu

CCM : Carcinome à cellules de Merkel

CD : Cluster of differentiation

DIPS : Detection of integrated polyomavirus sequences

PCR : Polymerase chain reaction

IARC : International Agency for Research on Cancer

MCPyV : Polyomavirus à cellules de Merkel

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAX5 : Paired box 5

PDL-1 : Programmed death ligand 1

PNET : Primitive Neuroectodermal Tumors

TDT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

TTF-1 : Thyroid Transcription factor 1

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Zeb1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

Pour la partie du manuscrit rédigée en langue anglaise, une liste des abréviations utilisées est disponible à la fin des articles correspondants.

## Table des Matières

<b>I. RESUME.....</b>	<b>2</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>III. INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
1. Historique et histogénèse des carcinomes à cellules de Merkel.....	6
2. Clinique .....	8
3. Histologie .....	9
4. Diagnostics différentiels.....	11
5. Virologie.....	12
6. Immunologie .....	15
<b>IV. CONTEXTE DU TRAVAIL .....</b>	<b>17</b>
<b>V. DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF MERKEL CELL CARCINOMA OF LYMPH NODES WITHOUT SKIN PRIMARY TUMOR AND OTHER METASTATIC NEUROENDOCRINE CARCINOMAS: THE ELECTHIV CRITERIA .....</b>	<b>19</b>
<b>VI. MERKEL CELL CARCINOMA OF LYMPH NODES WITHOUT SKIN PRIMARY TUMOR ARE METASTATIC NEOPLASIA ASSOCIATED WITH AN EFFICIENT IMMUNE RESPONSE .....</b>	<b>47</b>
<b>VII. DISCUSSION .....</b>	<b>66</b>
<b>VIII. REFERENCES.....</b>	<b>72</b>

## **I. Résumé**

Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané rare. Dans 5 à 15 % des cas, le CCM apparaît sous la forme d'une tumeur ganglionnaire isolée sans primitif cutané retrouvé. L'absence de critères de définition validés de cette entité conduit parfois au diagnostic de carcinome neuroendocrine de primitif inconnu, entraînant ainsi une prise en charge inadaptée. De plus la physiopathologie de cette lésion, notamment sa nature métastatique ou primitivement ganglionnaire reste à préciser.

Dans un premier travail, les cas de CCM ganglionnaires sans primitif ainsi que ceux de métastases ganglionnaires de CCM cutanés ont été identifiés au sein d'une cohorte de CCM. Les données cliniques, morphologiques, immunohistochimiques et virologiques de ces deux populations ont été comparées avec celles de métastases ganglionnaires superficielles d'autres carcinomes neuroendocrines. Ce travail a permis d'identifier 7 critères permettant de distinguer l'ensemble des CCM des autres carcinomes neuroendocrines.

Au cours d'un second travail, la physiopathologie du CCM ganglionnaire sans primitif cutané a été explorée. L'expression du facteur de transcription Zeb1, impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, a d'abord été validée comme potentiel marqueur du processus métastatique. Zeb1 était plus fréquemment observé dans les CCM ganglionnaires sans primitif et les métastases que dans les tumeurs cutanées primitives. De plus des densités plus élevées en lymphocytes CD8<sup>+</sup> et cellules myéloïdes CD33<sup>+</sup> étaient observées au sein des CCM ganglionnaires sans primitif. Ces résultats suggèrent que les CCM ganglionnaires sans primitif représentent un processus métastatique associé à une réponse immunitaire efficace, pouvant expliquer la régression du primitif cutané.

**Mots clés :**

- Carcinome à cellules de Merkel
- Primitif ganglionnaire
- Transition épithélio-mésenchymateuse
- Infiltrat immun

## **II. Abstract**

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare cancer of the skin. In 5 to 15% of the cases, this tumor occurs as an isolated adenopathy without skin primary. The lack of validated diagnosis criteria of this entity may lead sometime the pathologist to consider it as a metastatic neuroendocrine carcinoma of unknown primary origin, resulting in inappropriate treatment. In addition, the pathophysiology of this tumor, notably this potential metastatic nature, has to be clarified.

In a first work, cases of MCC without cutaneous primary and metastases from cutaneous MCC were identified in a cohort of MCC. Clinical data, morphological and immunochemical features and viral status were compared with a population of lymph node metastases from other neuroendocrine carcinomas occurring in superficial areas. This study leads to the identification of 7 criteria, which show high abilities to distinguish MCC from other neuroendocrine carcinomas.

In the second part of the study, pathophysiology of the tumor was investigated. Expression of the transcription factor Zeb1, involved in epithelial-mesenchymal transition, was first validated as a potential marker of the metastatic process. Zeb1 expression was more frequently observed in MCC without cutaneous primary and in MCC lymph node metastasis than in the cutaneous primary MCC group. In addition, higher densities of both intra tumor CD8 lymphocytes and CD33 myeloid cells, were found in MCC without primary than in other MCCs. These results suggest that MCC without primary may represent a metastatic neoplasia associated with efficient immune response.

**Key words :**

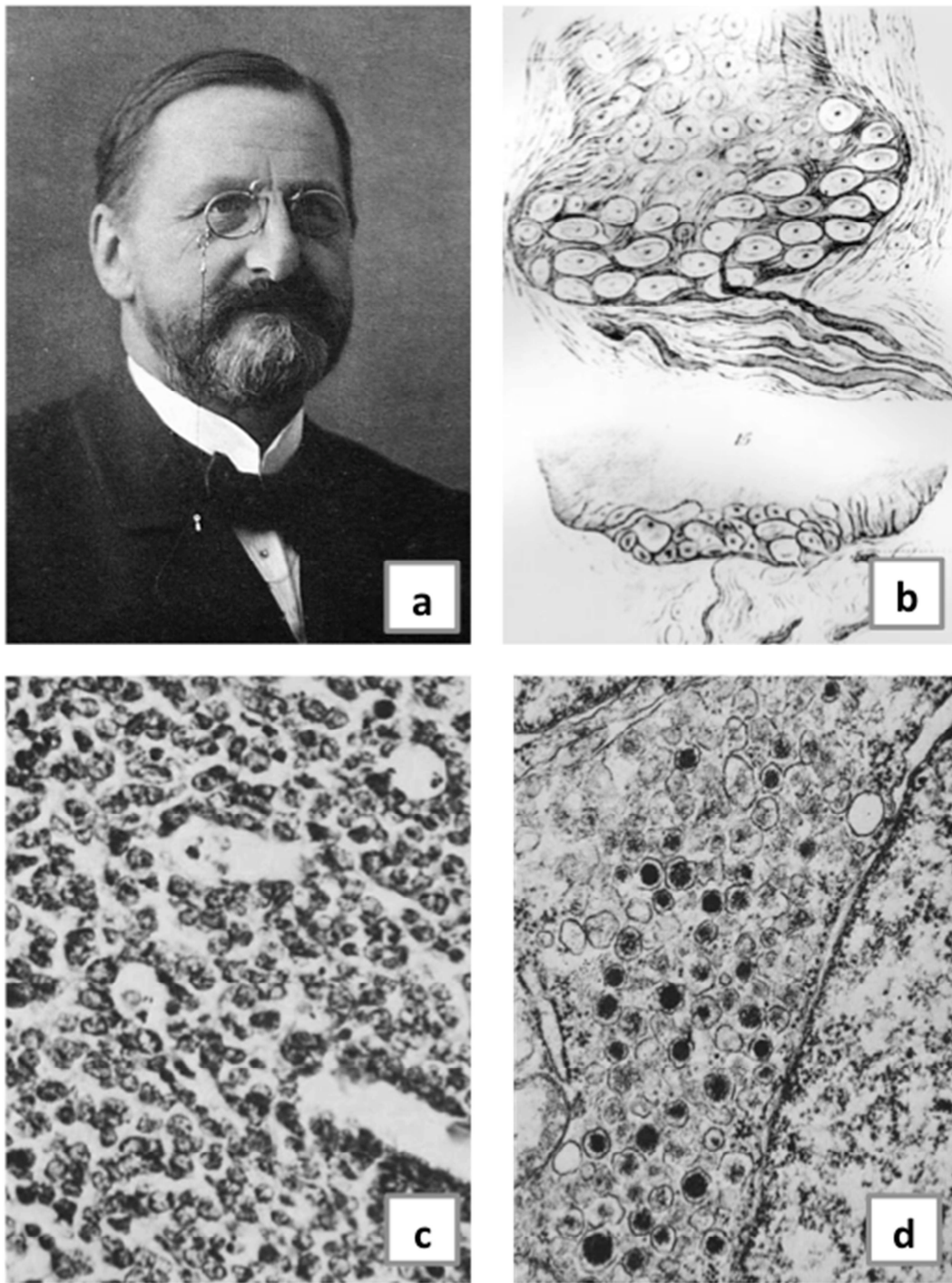
- Merkel cell carcinoma
- Lymph node primary
- Epithelial mesenchymal transition
- Immune infiltrate

### **III. Introduction**

#### **1. Historique et histogénèse des carcinomes à cellules de Merkel**

En 1878, Friedrich Merkel, anatomiste et histologiste allemand, identifiait un nouveau type cellulaire, la cellule de Merkel, présent au niveau des assises basales de l'épiderme (**Figure 1a**). Ces cellules, de localisation ubiquitaire mais plus nombreuses en peau acrale, présentent un cytoplasme pâle, et se regroupent en amas, le plus souvent en contact avec la partie terminale de fibres nerveuses myélinisées. L'étude en microscopie électronique réalisée ultérieurement permit la confirmation des relations étroites entre ces cellules et des terminaisons nerveuses de petits calibres (1) (**Figure 1b**) suggérant ainsi une fonction de mécanorécepteur cutané. De plus, la mise en évidence dans leur cytoplasme de granules neuro-sécrétoires, rattachait ces cellules au système endocrinien disséminé et semblait suggérer qu'elles dérivent des crêtes neurales. Plusieurs expériences de xénogreffe ont par la suite été réalisées afin de répondre à la question de l'origine de ce type cellulaire et ont rapporté des résultats contradictoires (2,3). Cependant en 2010, Van Keymeulen et al. (4) montrèrent que les cellules de Merkel dérivent en réalité de progéniteurs kératinocytaires de la basale épidermique, qui se différencient en cellules de Merkel sous l'influence du facteur de transcription Atonal homolog 1 (ATOH1) en association avec l'inhibition de la voie Notch. En 1972, Toker et al. rapportait cinq observations de « carcinomes trabéculaires » de la peau (5). Cette nouvelle entité se caractérisait par des travées souvent anastomosées et des nids de cellules de petite taille (**Figure 1c**), localisées dans le derme ou l'hypoderme, sans connexion avec l'épiderme de surface ou les annexes. L'étude ultrastructurale mettait en évidence un phénotype proche de celui des cellules de Merkel avec la présence de granules neurosécrétoires (**Figure 1d**) conduisant à nommer cette entité « carcinome à cellules de Merkel » (CCM) (6). Actuellement, le CCM est défini par l'Organisation Mondiale de la





**Figure 1 :** **a :** Portrait de Friedrich Merkel ; **b :** Dessin original des cellules de Merkel (Sigmund Merkel, 1878) ; **c :** Aspects microscopiques du carcinome trabéculaire ; **d :** Aspects ultrastructururaux des carcinomes trabéculaires avec mise en évidence des granules neurosécrétoires (Toker, 1978).

Santé (OMS) (7) comme : « un carcinome cutané primitif montrant une double différenciation épithéliale et neuroendocrine. Ce carcinome partage des similitudes phénotypiques avec les cellules de Merkel mais une relation histogénétique n'a pu être prouvée ». Cependant, plusieurs éléments de description récente plaident en faveur d'une relation histogénétique entre cellules de Merkel et CCM. En effet, l'expression d'ATOH1, principal facteur de transcription responsable de la différenciation des cellules de Merkel, a été mise en évidence dans les CCM (8). De plus, l'expression induite d'ATOH1 et des oncogènes responsables des CCM dans des kératinocytes a permis d'induire la formation de CCM dans un modèle murin (9). Ces résultats suggèrent que la cellule à l'origine des CCM est un progéniteur kératinocytaire dont le degré de différenciation en cellules de Merkel reste à déterminer. On peut d'ailleurs remarquer que, parmi les observations initiales de Toker (6), l'une d'elles comportait un second contingent de carcinome épidermoïde intraépidermique suggérant une origine kératinocytaire de cette tumeur.

## **2. Clinique**

L'incidence du CCM est estimée entre 0,3 et 0,8 pour 100000 habitants et serait en constante augmentation (10,11). Il survient principalement chez le sujet âgé de plus de 65 ans (12) et le patient immunodéprimé (hémopathie, greffe d'organe, infection par le VIH) (13). Cliniquement le CCM se présente sous la forme d'un nodule tumoral non douloureux, de croissance rapide, localisé en zone photo-exposée (14,15). La maladie est fréquemment diagnostiquée à un stade métastatique (27% de malades sont porteurs de métastases ganglionnaires et 7% présentent des métastases viscérales au moment du diagnostic) (12). Le traitement des formes localisées associe une exérèse chirurgicale à la radiothérapie (16) alors qu'une chimiothérapie à base de sels de platine sera proposée pour les stades avancés. La survie à 5 ans, tous stades confondus, est estimée à 40% (12). La présence d'une

immunosuppression sous-jacente ou d'une atteinte ganglionnaire représentent des facteurs de mauvais pronostic (13). Récemment, l'efficacité de l'avelumab, anticorps anti PD-L1 (programmed death ligand 1), a été mise en évidence (17). Ce traitement est actuellement disponible en autorisation temporaire d'utilisation en France.

### 3. Histologie

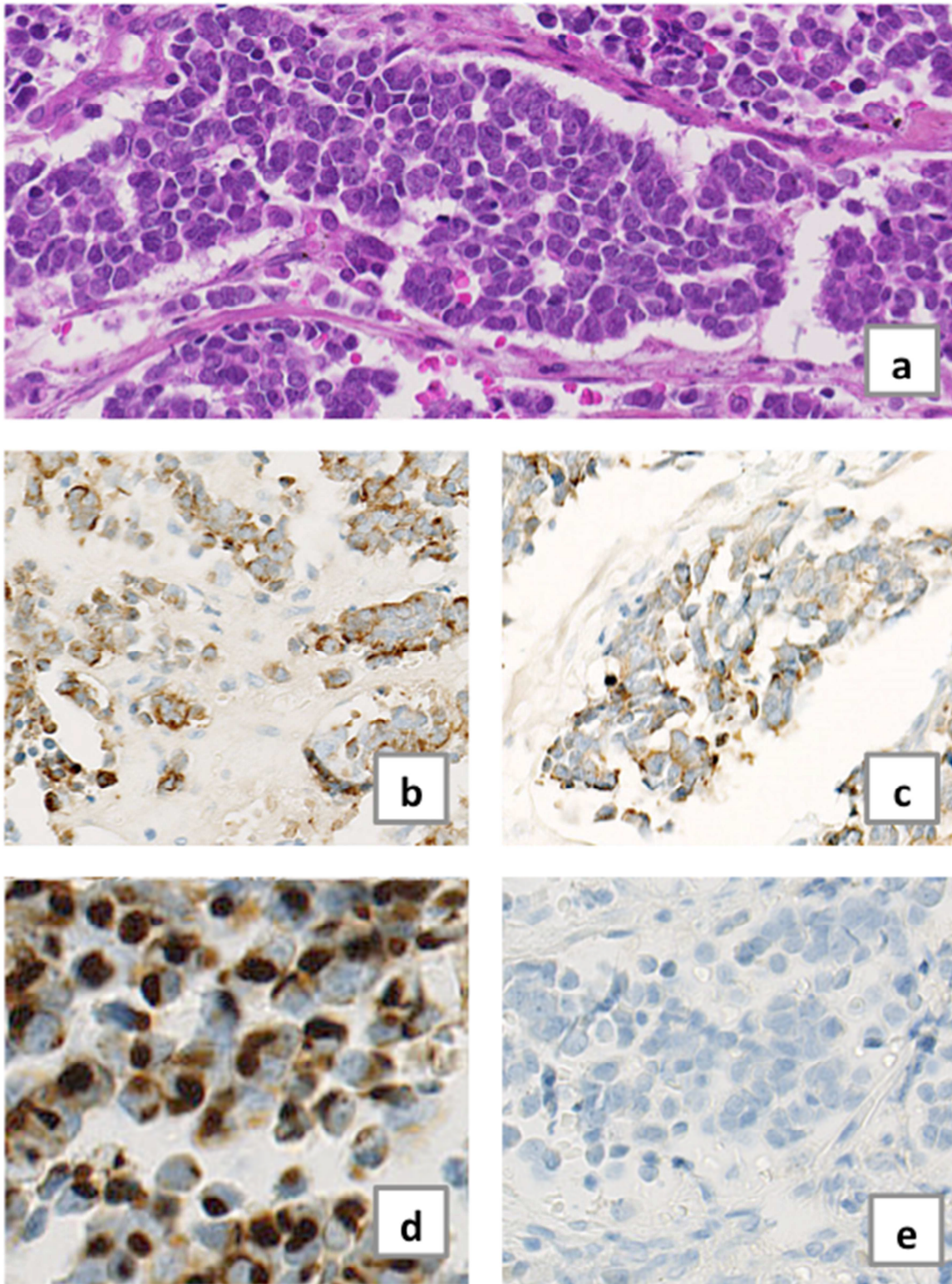
L'examen microscopique du CCM met en évidence une tumeur dont les caractéristiques sont celles d'un carcinome neuroendocrine de haut grade : il s'agit d'une prolifération tumorale le plus souvent dépourvue de connexion avec l'épiderme de surface, infiltrant massivement le derme et parfois l'hypoderme (7). Différentes architectures peuvent être observées (trabéculaire, solide ou diffuse) sans impact sur le pronostic (18). Les cellules tumorales sont le plus souvent de petite taille, avec un haut rapport nucléocytoplasmique ; cependant la présence d'éléments avec un cytoplasme plus abondant a été rapportée par certaines observations (19). Le noyau présente une chromatine fine de type « poivre et sel » (**Figure 2**). De nombreuses figures de mitoses et des plages de nécrose sont souvent présentes et témoignent du caractère agressif de la tumeur. Plusieurs variants morphologiques rares sont décrits : les CCM composites associent au contingent de CCM une seconde population tumorale présentant une autre ligne de différenciation (\*) (20). Un variant avec composante intra épidermique (21) a également été rapporté.

En immunohistochimie, il existe une expression des marqueurs épithéliaux (pancytokératine AE1/AE3), neuroendocrines (chromogranine A, synaptophysine et CD56) et, dans la majorité des cas, de la cytokératine 20 avec un marquage en boule paranucléaire (93% de notre cohorte) (**Figure 2**). Comme pour les cellules de Merkel (1), une expression de la

---

(\*) Au sein de notre cohorte, cette entité représente 6% (n=8/103) des cas. Dans un travail récent, soumis dans *Modern Pathology*, nous avons mis en évidence des particularités immunophénotypiques de cette entité.





**Figure 2 :** Aspects microscopiques du carcinome à cellules de Merkel : **a** : HPS x40 ; **b** : Expression de la chromogranine A ; **c** : Expression de la synaptophysine ; **d** : Expression de la cytokératine 20 en boule paranucléaire ; **e** : Absence d'expression du TTF-1.

cytokératine 19 est également fréquente dans les CCM (22). L'expression de la cytokératine 7 est rare (10% de la cohorte) ainsi que celle du TTF-1 (Thyroid Transcription factor 1) (17% de la cohorte) qui est le plus souvent associée aux formes composites.

#### **4. Diagnostics différentiels**

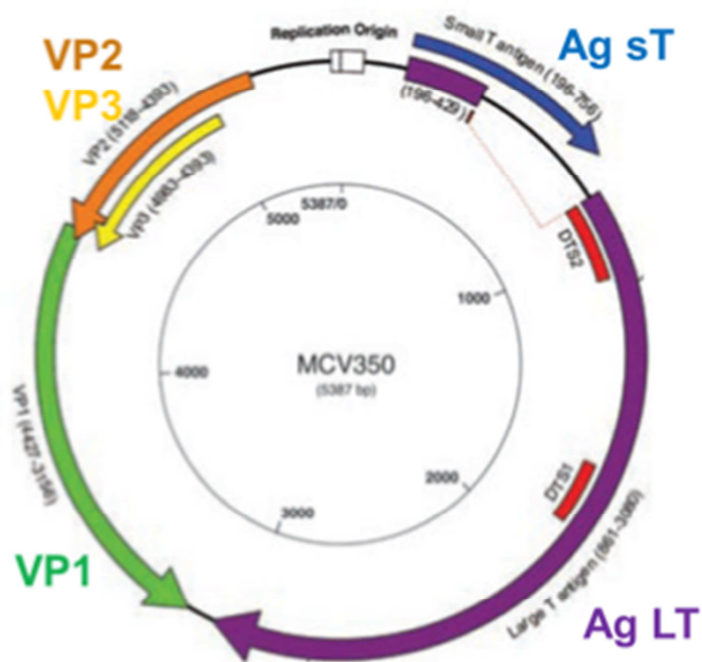
Sur coloration standard, le CCM rentre dans le cadre des proliférations tumorales indifférenciées à petites cellules rondes et bleues. Les principaux diagnostics différentiels à examiner alors sont les hémopathies (leucémie aiguë et leucémie lymphoïde chronique) et les sarcomes (Primitive Neuroectodermal Tumors (PNET), rhabdomyosarcome, synoviosarcome). Un mélanome doit toujours être éliminé.

En immunohistochimie, l'expression fréquente du CD99 (55 à 100% des cas) (23) ne doit pas orienter à tort le diagnostic de PNET. De même, la fréquente positivité de certains marqueurs lymphoïdes (PAX5 : 100%, TDT : 73%, chaînes légères et chaînes lourdes des immunoglobulines : environ 50% des cas avec parfois une monotypie (24)) ne doit pas faire conclure à une hémopathie notamment une leucémie aiguë.

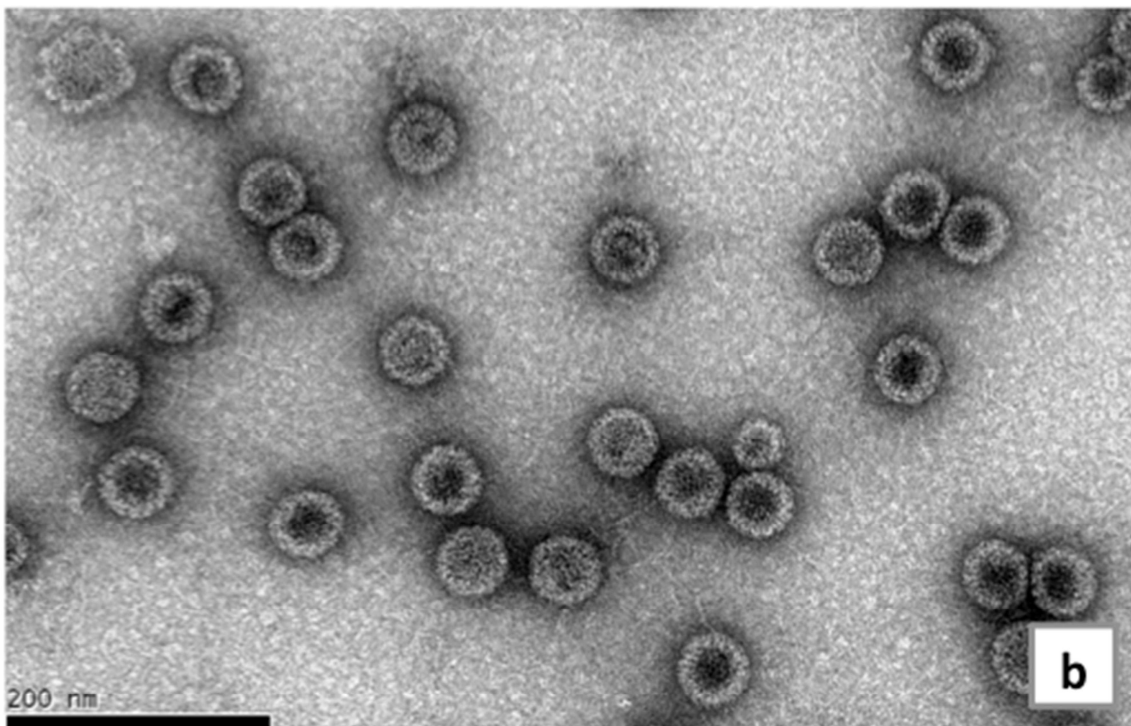
L'expression des pancytokératines et des marqueurs neuroendocrines permet de porter le diagnostic de carcinome neuroendocrine. Le principal diagnostic différentiel restant à éliminer est la métastase d'un carcinome neuroendocrine d'une autre origine qui exprimera le plus souvent le TTF-1 sans expression associée de la cytokératine 20 (25). A noter que l'OMS recommande (7), devant toute tumeur cutanée ayant les caractéristiques immunophénotypiques du CCM, la réalisation systématique d'une imagerie pulmonaire afin d'éliminer un primitif viscéral.

## 5. Virologie

En 2008, suspectant une étiologie infectieuse devant la forte prévalence des CCM chez les sujets immunodéprimés, l'équipe américaine de Moore (26) met en évidence, par soustraction digitale du transcriptome, la séquence d'un virus, le polyomavirus à cellules de Merkel (MCPyV) jusqu'alors inconnue, intégrée dans le génome d'environ 80% des CCM. Le MCPyV est actuellement classé agent carcinogène 2A par l'International Agency for Research on Cancer (IARC). Il s'agit d'un virus non enveloppé, de forme icosaédrique, de symétrie T7, à ADN circulaire double brin (**Figure 3**). Son génome, constitué de 5200 paires de bases, s'organise en trois régions : l'origine de réplication, les séquences codant pour les protéines de la phase précoce (antigènes petit T (AgsT) et grand T (AgLT)) et les séquences codant pour les protéines de la phase tardive qui sont les protéines structurales de capsid (VP1, 2 et 3) (**Figure 3**). A l'état sauvage, le virus se réplique dans le derme papillaire de la majorité des individus sains (27) avec une séroprévalence supérieure à 85% dans la population générale adulte (28,29). Les dommages actiniques et l'immunodépression favoriseraient chez de rares sujets l'intégration du génome viral, elle-même à l'origine du processus de carcinogenèse. Cette intégration s'accompagne de mutations du génome viral, localisées au niveau de l'exon 2 de la séquence de l'AgLT. Ces mutations aboutissent à l'apparition d'un codon stop conduisant à la perte des capacités réplcatives du virus, à la perte de la synthèse des protéines de capsid et à la synthèse d'un AgLT tronqué (26). Au sein de la tumeur, les deux seules protéines exprimées sont l'AgsT (9) et l'AgLT (30) sous une forme tronquée, qui comportent toutes deux des propriétés oncogéniques. La découverte du MCPyV a conduit à distinguer deux sous-populations de CCM : les tumeurs viropositives et les tumeurs vironégatives. Ce dernier sous-groupe serait secondaire à l'exposition aux ultraviolets, il présente un taux de mutations somatiques plus élevé, une faible immunogénicité et un pronostic plus péjoratif (31).



**a**



**Figure 3 : a** : Génome du MCPyV (d'après Feng et al. 2008) ; **b** : Pseudoparticules virales produites à partir des protéines de capside du MCPyV mettant en évidence des structures icosahédriques (avec l'aimable autorisation du Pr A. Touzé).

La mise en évidence du MCPyV représente un outil diagnostique majeur dans les cas de CCM de diagnostic difficile (phénotype inhabituel, absence de primitif cutané, métastase révélatrice de la maladie). Cependant, de faibles charges de MCPyV sous forme épisomale sont présentes dans le derme papillaire des sujets sains (27) et peuvent être détectées dans des tumeurs non CCM (32). Dans ce contexte, la technique de détection ne doit donc mettre en évidence que le MCPyV associé aux CCM. En immunohistochimie, un anticorps commercial dirigé contre l'antigène T (clone CM2B4) est disponible. Le marquage doit être interprété en utilisant un score semi quantitatif selon la méthode d'Allred (31) et permet la mise en évidence du virus dans 60% des tumeurs. A noter, dans notre expérience, certains éléments du stroma, notamment des lymphocytes, peuvent être marqués en utilisant cette technique. En biologie moléculaire, plusieurs méthodes ont été proposées afin de mettre en évidence l'intégration du virus (DIPS-PCR (Detection of integrated polyomavirus sequences-PCR) (33), séquençage de nouvelle génération). Cependant ces méthodes sont complexes et ne sont actuellement pas disponibles en routine. Les méthodes quantitatives peuvent être utilisées en contrôlant la sensibilité de la technique. En effet, le virus n'est présent sous forme épisomale qu'à des charges très faibles. Dans ce contexte, l'utilisation d'un seuil de détection suffisamment élevé permet d'écarter les faux positifs. C'est cette méthode qui est actuellement utilisée en routine dans notre équipe. Enfin, la mise en évidence de la mutation du génome viral par séquençage de l'exon 2 de la séquence de l'AgLT semble être un outil prometteur (\*).

---

(\*) Un projet visant à comparer les méthodes quantitatives et le séquençage de l'exon 2 est actuellement en cours d'initialisation au sein de notre équipe, en étroite collaboration avec la plateforme de biologie moléculaire des cancers du CHRU de Tours.



## 6. Immunologie

Comme décrit précédemment, le CCM est une tumeur survenant chez le sujet âgé et/ou immunodéprimé et la présence d'une immunodépression constitue un facteur de mauvais pronostic dans l'évolution de la maladie (13). Le développement du CCM est donc intimement lié à ses interactions avec le système immunitaire. En effet, des lymphocytes T CD8+, spécifiques d'épitopes viraux du MCPyV, sont présents au sein du microenvironnement tumoral (34). Une densité élevée de ces lymphocytes CD8 intra-tumoraux est d'ailleurs corrélée avec un meilleur pronostic (35–37). La réponse lymphocytaire cytotoxique CD8 constitue donc un élément clé de la réponse anti-tumorale dans les CCM. Elle pourrait expliquer certaines observations de régression complète de la tumeur, parfois à des stades métastatiques, notamment après biopsie ou restauration immunitaire du sujet (38). Cependant, plusieurs mécanismes empêchent cette réponse effectrice CD8 dans le CCM :

- la diminution de l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I par les cellules tumorales (39)
- l'anergie des populations lymphocytaires par détournement des points de contrôle immunitaire (« immune check points ») (40)
- l'exclusion des lymphocytes CD8 du microenvironnement tumoral par dégradation de certaines molécules (sélectines) localisées au niveau de l'endothélium des capillaires intra-tumoraux empêchant ainsi l'adhésion lymphocytaire (41).

Récemment (travail non publié, en cours de finalisation, qui sera prochainement soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology*), nous avons réalisé au sein du laboratoire un travail sur l'infiltrat inflammatoire intratumoral dans le CCM en se focalisant sur les populations myéloïdes. Nous avons pu mettre en évidence qu'une densité élevée en macrophages CD33+ était associée à la présence de lymphocytes CD8 et que ces tumeurs

riches en cellules CD33+ et en lymphocytes CD8 présentait un meilleur pronostic. L'ensemble de ces résultats incite à distinguer deux groupes de tumeurs : un groupe immunogène infiltré par des macrophages CD33 et des lymphocytes CD8, associé à un meilleur pronostic et un groupe peu immunogène dépourvu d'infiltrat inflammatoire significatif.

#### **IV. Contexte du travail**

Suite à la découverte du MCPyV en 2008, l'équipe de recherche « Biologie des infections à Polyomavirus » (UMR INRA ISP 1282, Université François Rabelais de Tours) dirigée par le Pr Antoine Touzé s'est consacrée à l'étude du MCPyV. Des interactions se sont rapidement établies entre cette équipe et les services de Dermatologie et d'Anatomie pathologique du CHRU de Tours permettant la mise en place d'une collection biologique multicentrique, intégrant une sérothèque et une cohorte historico-prospective de tumeurs incluses en paraffine. Les premiers travaux réalisés se sont intéressés à la sérologie (42) avec la mise en évidence d'une sous-population de patients présentant un taux élevé d'anticorps anti VP1 dans le sérum et ayant une meilleure survie. Secondairement, le dosage d'anticorps anti AgLT (43) a été identifié comme une méthode de suivi des patients, actuellement utilisée en routine dans notre établissement. Sous l'impulsion du Pr Samimi, des travaux sur le métabolisme tumoral (étude de la vitamine D (44) et de l'expression des récepteurs de la somatostatine (45)) ainsi que sur les interactions du CCM avec le système immunitaire (46) ont par la suite été réalisés.

Dans ce contexte, m'intéressant particulièrement à la dermatopathologie, j'ai eu la chance d'intégrer cette équipe, dans laquelle j'ai pu réaliser mon stage de master 2 et avec laquelle j'ai pu mettre en place un projet de thèse de sciences en cotutelle franco-allemande qui débutera dès novembre 2017.

Les deux articles présentés dans ce manuscrit portent sur les CCM ganglionnaires sans primitif cutané et représentent le premier travail que j'ai pu initier au sein de l'équipe. Les CCM ganglionnaires représentent entre 5 à 15 % de l'ensemble des CCM, il s'agit d'une entité encore largement méconnue par les cliniciens et les pathologistes et nous avons été confrontés, dans la pratique, à un certain nombre d'erreurs diagnostiques ayant conduit à la mise en place d'une prise en charge non optimale. De ce fait, l'objectif du premier travail

présenté était de déterminer des critères diagnostiques de CCM ganglionnaires sans primitif cutané, utilisables en pratique courante. Ce travail a été soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology* en novembre 2016. Des révisions majeures ont été demandées en avril 2017 et une seconde version a été soumise en mai 2017. Nous attendons actuellement la décision du journal.

Le second travail présenté avait pour but d'explorer la physiopathologie des CCM ganglionnaires sans primitif cutané afin d'éclairer leur rapport avec les CCM cutanés. Il s'agit d'une première version d'un travail récent qui n'a pas encore été présenté à l'ensemble des coauteurs ni soumis pour publication dans aucun journal. Cependant, du fait de la relation directe entre ces deux travaux, il nous a semblé intéressant de les présenter en association.

**V. Differential diagnosis of Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin  
primary tumor and other metastatic neuroendocrine carcinomas: the  
ELECTHiV criteria**

## **Differential diagnosis of Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor and other metastatic neuroendocrine carcinomas: the ELECTHiVcriteria**

Thibault Kervarrec, MSc<sup>1,2</sup>, Julia Zaragoza, MD<sup>3</sup>, Pauline Gaboriaud<sup>2</sup>, Amélie Le Gouge, MSc<sup>4</sup>, Agnès Beby-Defaux, MD<sup>5,6</sup>, Yannick Le Corre, MD<sup>7</sup>, Eva Hainaut-Wierzbicka, MD<sup>8</sup>, Francois Aubin, MD, PhD<sup>9</sup>, Guido Bens, MD<sup>10</sup>, Patrick Michenet, MD<sup>11</sup>, Hervé Maillard, MD<sup>12</sup>, Antoine Touzé, PhD<sup>2</sup>, Mahtab Samimi, MD, PhD(\*)<sup>2,3</sup>, Serge Guyétant, MD, PhD(\*)<sup>1</sup>

- (1) Department of Pathology, Université François Rabelais, CHU de Tours, avenue de la République, 37170, Chambray-les-tours, France
- (2) “Biologie des infections à polyomavirus” team, UMR INRA ISP 1282, Université François Rabelais, 31, avenue Monge 37200 Tours, France
- (3) Dermatology Department, Université François Rabelais, CHU de Tours, avenue de la République, 37170, Chambray-les-tours, France
- (4) CHU de Tours, Biometrical Department, Centre d'Investigation Clinique - INSERM CIC 1415, 2 boulevard Tonnellé, 37000 Tours, France
- (5) Virology Department, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France
- (6) “Récepteurs et régulation des cellules tumorales” team, 1 rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers, France
- (7) Dermatology Department, LUNAM Université, CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers, France
- (8) Dermatology Department, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France
- (9) Dermatology Department, Université de Franche Comté, CHU Besançon, EA3181, IFR133, 2 boulevard Fleming 25030 Besançon, France
- (10) Dermatology Department, CHR d'Orléans, 14 avenue de l'hôpital, 45100 Orléans, France
- (11) Department of Pathology, CHR d'Orléans, 14 avenue de l'hôpital, 45100 Orléans, France
- (12) Dermatology Department, CHR Le Mans, 194 avenue Rubillard 72037 Le Mans Cedex 09, France

(\*) M. Samimi and S. Guyétant contributed equally to the present study.

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

**Grant numbers and sources of support:** project POCAME, Axe Immunothérapies, Cancéropôle Grand Ouest-Région Centre Val de Loire (France)

**Institutional review board:** The local Ethics Committee of Tours (France) approved the study (N° ID RCB2009-A01056-51)

**Prior presentation statement :** this article has never been presented.

## **Abstract**

**Background:** Merkel cell carcinoma (MCC) can present as a cutaneous tumor or a lymph node without primary tumor (MCCWP). MCCWP can be misinterpreted on histologic examination as lymph node metastasis (LNM) from other neuroendocrine carcinomas (LNMNECs). However, this distinction is crucial for therapeutic management.

**Objective:** To determine the discriminative criteria for differential diagnosis between MCCWP, LNM from cutaneous MCC and LNMNECs.

**Methods:** Clinical, morphologic, immunohistochemical data (expression of cytokeratin AE1/AE3, 7, 19, 20; chromogranin A, thyroid transcription factor-1 [TTF-1]) and presence of Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) (immunohistochemistry and PCR) were compared in patients with MCCWP (n=17), LNM from cutaneous MCC (n=11) and LNMNEC (n=20: lung, n=8; thyroid, n=7; digestive tract, n=3; other, n=2).

**Results:** MCC (MCCWP and LNM from cutaneous MCC) differed from LNMNEC by 7 discriminative criteria: **E**lderly age, **L**ocation of the tumor, **E**xtent, **C**ytokeratin and **T**TTF-1 expression, **H**istologic types and **V**irus (MCPyV) detection, summarized under the acronym **ELECTHiV**. All MCC patients had at least 5 of the ELECTHiV criteria, whereas all LNMNEC patients but 1 had fewer than 3 criteria.

**Limitations:** The discriminant ability of the ELECTHiV criteria should be validated in a second independent set.

**Conclusion:** MCCWP can be distinguished from other LNMNEC by the ELECTHiV criteria.

## **Introduction**

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare aggressive cutaneous neoplasm with a 5-year overall survival rate of 40% (12). It occurs essentially in elderly and the main risk factors are sun exposure and immunosuppression. Histological examination reveals infiltration of the dermis or hypodermis by small cells with neuroendocrine features. Immunohistochemistry shows the expression of both epithelial and neuroendocrine markers in tumor cells. Cytokeratin 20 (CK20) expression is observed in 92% of MCC cases (47); thyroid transcription factor-1 (TTF-1) expression is rare (47).

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) is a ubiquitous human polyomavirus with seroprevalence reaching 90% (29) in adults. In 2008, Feng et al. (26) identified integration of the MCPyV genome in tumoral cells of most MCCs. MCPyV DNA is detected by PCR in approximately 80% of cutaneous MCC cases, and the large T antigen (LTag), a major viral oncoprotein, is detected by immunohistochemistry (48) in 60% of cases (47).

Approximately 5% to 15% of MCC cases present as a lymph node metastasis (LNM) without primary skin tumor (11,49–51). In such cases of MCC of lymph nodes without primary tumor (MCCWP), superficial lymph nodes are removed and standard histological examination reveals features of high-grade neuroendocrine carcinoma (NEC) indistinguishable from LNM of an unidentified (non-Merkel cell) NEC (LNMNEC). However, the distinction between MCCWP and LNMNEC is crucial because of significant differences in therapeutic management and outcome (50). Indeed, MCCWP requires lymph-node dissection combined with radiotherapy (50), whereas LNMNEC requires chemotherapy. The outcome for patients with MCCWP is worse with chemotherapy alone than with surgery and radiotherapy (52), which highlights the need for accurate differential diagnosis of MCCWP and LNMNEC.

CK20 and TTF-1 expression profiles, which enable a differential diagnosis between cutaneous MCC and small-cell NEC from other sites (25,53,54), are currently used as



diagnostic criteria for a positive diagnosis of MCC. Although MCCWP features have been compared with those from cutaneous MCC (55,56), no study has investigated the diagnostic accuracy of any marker for the differential diagnosis of MCCWP, LNM from cutaneous MCC and LNMNEC.

We aimed to compare the clinical, histologic and virologic features among MCCWP, LNM from cutaneous MCC and superficial LNMNEC to establish relevant criteria for their differential diagnosis.

## **Methods**

### **Design and settings**

MCC cases diagnosed in the dermatology departments from 5 hospital centers were considered for inclusion in the historical prospective “MCC cohort” (45) (Local Ethic Committee, Tours, France, no. ID RCB2009-A01056-51). Tumor FFPE samples were reviewed by a pathologist from the French “TENPath” network (SG) and were included as MCC cases if they displayed a morphology compatible with MCC, together with positive immunostaining for CK20 and at least 1 neuroendocrine marker among synaptophysin and chromogranin A. CK20-negative tumors were also considered if the morphology was compatible and at least 2 neuroendocrine markers were expressed.

LMNEC cases were retrieved from the database of 1 department of pathology (Tours, France) by a search of samples registered between 1999 and 2015.

### **Inclusion criteria**

#### ***MCC cases (MCCWP and LNM from cutaneous MCC)***

For the specific needs of the current study, all MCC cases with available FFPE samples, included in the cohort were reviewed for medical history, clinical and imaging data. An MCCWP diagnosis was retained with LNM revealing the cancer, no previous history of cutaneous MCC or deep NEC, no evidence of cutaneous or extra-cutaneous primary NEC after exhaustive work-up consisting of cutaneous physical examination and extensive imaging (whole-body CT-scan and/or 18 FDG-PET-CT scan). The samples of LNM from cutaneous MCC were included on the basis of the following criteria: confirmation of cutaneous MCC primary tumor.

### ***LNMNEC cases***

MCCWP occurs mostly in superficial lymph nodes (50), so only patients with superficial LNM from other NECs were included to establish criteria. From our database, we retrieved data for patients with LNM from any NEC histologic subtype in a superficial location (parotid, cervical, supraclavicular, axillary or groin areas) and with a lymph node revealing the cancer or the relapse, presence of histologic NEC features, and immunohistochemical expression of both neuroendocrine (chromogranin A or synaptophysin) and epithelial (AE1-AE3) markers.

### **Exclusion criteria**

We excluded data for patients without available tissue samples or insufficient samples to perform molecular analysis.

### **Clinical and follow-up data**

Age, sex, past history of cancer, and lymph-node location were collected from patient files. Disease extent at the time of diagnosis was classified as “localized” (restricted to primary skin and/or 1 superficial lymph node area) or “systemic” (extension beyond skin and/or lymph nodes). Regarding LNMNEC, the primary tumor location was classified as “proved” (diagnosis relying on histologically proven primary tumor sample), “possible” (diagnosis relying on strong clinical and imaging arguments without biopsy of the primary) or “undetermined”.

### **Histology and immunohistochemistry**

Histological classification of tumors was assessed by a pathologist (SG) according to the WHO classification (57–59), distinguishing 3 NEC subtypes (small-cell, large-cell and well-

differentiated NEC) based on cytological features (tumor cell morphology, nucleocytoplasmic ratio, chromatin) and proliferation rate. Briefly, poorly differentiated NEC cases shared features of high proliferative activity and frequent necrosis; they were subclassified as small-cell NEC when composed of small- to medium-sized cells with high nucleocytoplasmic ratio, “salt-and-pepper” chromatin with inconspicuous nucleoli, or large-cell NEC when composed of larger cells with more abundant cytoplasm and apparent nucleoli. Well-differentiated neuroendocrine tumors showed a more prominent nested or trabecular pattern with often absence of necrosis, bland cytology and low proliferation rate.

Tissue samples were included in a tissue microarray (TMA) with a semi-motorized tissue arrayer (MTA booster OI v2.00, Alphelys). Triplicate spots were obtained for all patients. Immunohistochemistry was performed according to the manufacturer’s instructions on a BenchMark XT platform. Tumors were screened with relevant markers for NEC (pan-CKAE1-AE3, chromogranin A, synaptophysin), MCC (CK19, CK20 and LTA<sub>g</sub>) and other NEC markers (TTF-1, CK7). Antibodies and dilutions are in **Supplemental Table S1**. AE1/AE3-positive cases were classified as dot-like or diffuse according to staining pattern. Chromogranin A and synaptophysin expression was classified as “positive” or “low” according to an arbitrary threshold of 30% of stained cells. Positivity for CM2B4 antibody was assessed using the Allred score as previously described (31).

### **Detection of MCPyV DNA**

Genomic DNA was isolated from tissue samples by use of the Maxwell 16 Instrument (Promega) with the Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA purification kit (Promega). PCR assay was performed as described (60). Briefly, 15 ng DNA was mixed with 0.2  $\mu$ M primers (**Supplemental Table S2**), 0.1  $\mu$ M DNA probe and Mix Life technologies (Applied): Taqman(R) Universal PCR Master Mix 2X in a final volume of 25  $\mu$ l. PCR reactions were

performed with the Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems platform programmed for  $50^{\circ}\text{C} \times 2 \text{ min}$  with an initial denaturation at  $95^{\circ}\text{C} \times 15 \text{ min}$ , followed by 45 cycles at  $95^{\circ}\text{C} \times 15 \text{ sec}$  and  $60^{\circ}\text{C} \times 60 \text{ sec}$ .

### **Statistical Analysis**

Continuous data are described with median (quartiles [Q] 1–3) and categorical data with number (percentages). Categorical data were compared between groups by using the two-tailed Fisher's exact test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

### **Patient characteristics**

Among the 223 patients included in the MCC cohort, FFPE samples were available for 128 cases, including 44 with LNM at the time of diagnosis (**Figure 1**). Among these, 17 met our criteria for MCCWP and 11 for LNM from cutaneous MCC (**Figure 1**). Data for patients are in **Supplemental Table S3**. Among the 17 patients with MCCWP, a dermatologist had performed a skin examination to exclude a primary tumor of the skin or mucosae for 16 and an oncologist had performed multiple physical examinations for 1 (patient 9). Extra-cutaneous primary NEC was excluded in all 17 cases by imaging (18-FDG PET-CT scan, n=8; whole body CT-scan, n=4; both, n=5). Two patients underwent endoscopy and Indium-111 somatostatin analog scintigraphy (Octreoscan) (patients 1 and 17). Among the 102 patients with NEC and LNM retrieved from our database, 23 with LNMNEC met our inclusion criteria and 3 were excluded because of unavailable samples (**Figure 1**). Patients had primary LNMNEC tumors of the lung (n=8: small-cell carcinoma, n=5; and large-cell NEC, n=3), thyroid (n=7), or gastrointestinal tract (n=3: small-cell carcinoma, n=1; large-cell neuroendocrine component of mixed adenoneuroendocrine carcinoma [MANEC], n=2); atypical carcinoid tumor of the arytenoid (n=1); or unknown cancer (n=1: large-cell NEC) (**Supplemental Table S3**).

### **Clinical data**

Clinical features of patients are described in **Table I**. The median age was 70 years [63–79]. At the time of diagnosis, most of the MCC LNM cases were limited to the inguinal area (MCCWP, n=15; cutaneous MCC, n=7). In contrast, LNMNEC patients with a pulmonary primary tumor (n=8) presented advanced metastatic disease at diagnosis (large mediastinal tumor bulk, extensive lymph-node involvement and visceral metastases) with no history of

NEC. Patients with a gastrointestinal primary tumor (n=3) had a history of NEC and showed aggressive relapse (generalized disease, n=2; localized disease with fast disease progression and death, n=1). All patients with primary thyroid (n=7) and arytenoid (n=1) cancer showed localized lymph node recurrence. One patient with an unknown primary site (patient 27) had extensive metastatic disease and died a few days after lymph node biopsy (**Supplemental Table S3**).

### **Immunomorphological and virologic data**

The 3 groups showed close similarities in architectural patterns and cytology, as illustrated by representative microscopic features of MCCNWP, LNM from cutaneous MCC and LNMNEC cases **in Figure 2**. All MCCWP and LNM from cutaneous MCC cases were classified as small-cell carcinoma, whereas LNMEC cases displayed small-cell (n=6), large-cell (n=6) or well-differentiated NEC (n=8) features.

Comparative immunostaining data for the 43 tumors analyzed is reported in **Table II**. Marker expression by histologic type and primary tumor site is reported in **Table S4**. MCPyV DNA was detected in 15 of 17 patients with MCCWP (88%), all patients with LNM from cutaneous MCC (100%) and 1 patient with LNM from a large-cell NEC of the lung (5%).

### **Determining diagnostic features — the ELECTHiV criteria**

We were able to identify 7 features that differed significantly between MCCWP and LNM from cutaneous MCC and LNMNEC. MCCWP and LNM from cutaneous MCC differed from LNMNEC by age ( $\geq 70$  vs  $< 70$  years,  $p < 0.001$ ), location of the lymph node (inguinal or parotid vs other locations,  $p < 0.01$ ), disease extent (localized vs systemic,  $p < 0.01$ ), histologic type (small-cell carcinoma vs large-cell carcinoma and well-differentiated tumors,  $p < 0.01$ ), CK expression (CK20 positive vs negative,  $p < 0.01$ ) and TTF-1 expression (absent vs present,

p<0.01) as well as MCPyV detection (present vs absent, p<0.01). These 7 features could be summarized as the ELECTHiV criteria (**E**lderly:  $\geq 70$  years, **L**ocation: inguinal or parotid, **E**xtent restricted to the lymph node area, **C**K20 positivity, **T**TF-1 negativity, **H**istological type: small cell carcinoma, **V**irus detection).

The classification of patients by their diagnosis and number of ELECTHiV criteria (0 to 7) is in **Figure 3**. Among patients with MCCWP and LNM from cutaneous MCC, the 7 criteria were assessable in 16 of 17 and 9 of 10 patients, respectively. All of these patients had at least 5 criteria (5 criteria, n=4; 6 criteria, n=12; 7 criteria, n=9). In contrast, 19 of 20 patients with LNM from NEC had fewer than 3 criteria (0 criteria, n=2; 1 criterion, n=13; 2 criteria, n=4), except for 1 patient with metastatic digestive MANEC (patient 28, **supplemental Table S3**), who had 5 criteria.



## Discussion

In this study, we examined the diagnostic markers for MCCWP, LNM from cutaneous MCC and LNMNEC to establish criteria for the differential diagnosis of these cancers. MCCWP shared similar morphological and phenotypical features as LNM from cutaneous MCC but were accurately distinguished from other superficial LNMNEC by a spectrum of clinical, histologic and virologic criteria that were summarized as the ELECTHiV criteria (**E**lderly:  $\geq 70$  years, **L**ocation: inguinal or parotid, **E**xtent restricted to the lymph node area, **C**K20 positivity, **T**TF-1 negativity, **H**istological type: small cell carcinoma, **V**irus detection).

Although MCCWP features have been compared with those from cutaneous MCC tumors (55,56), the biologic connection between MCCWP and cutaneous MCC is still unclear: whether MCCWP primarily originates in nodal lymph nodes or occurs after a metastatic process is unclear. In current practice, superficial LNMNEC represents the main differential diagnosis of MCCWP and must be distinguished from MCCWP because of different therapeutic management and outcome (50). It must be underlined that there is no current gold standard for the positive diagnosis of MCCWP. In our study, the classification of cases involved multiple pathology reviewing as well as a multidisciplinary approach to develop criteria that could be easily used in routine practice.

The ELECTHiV criteria include 3 clinical features: age, disease extent and LNM location. Indeed, MCCWP mainly affects older people (median age at onset, 81 years (61)) and is often confined to a single lymph node area (56). However, LNMNEC, especially small-cell carcinoma of the lung (62), occurs in younger patients, often in a setting of extensive disease.

The ELECTHiV criteria include the tumoral CK20 expression, which appears as a robust but not specific marker of MCC. In our study, all patients with MCCWP expressed CK20, as did 1 with LNMNEC, a large-cell NEC component of a metastatic digestive MANEC (patient 28). Although CK20 expression is rare in most patients with NEC (25,53,63), it can be

expressed in patients with MANEC, consisting of a non-neuroendocrine component (mainly adenocarcinoma) associated with NEC (58). Therefore, one patient with LNM from MANEC in our series had five ELECTHiV criteria, which indicates that LNM from MANEC remains a major diagnostic pitfall in the differential diagnosis of MCCWP. Similarly, TTF-1 expression was rarely detected in MCC (47), but 1 of our patients with MCCWP showed moderate nuclear TTF-1 expression (patient 12). In our experience, as in others (64), moderate nuclear expression of TTF-1 is not an infrequent feature of MCC (15% of our MCC cohort, data not shown) and moderate expression of TTF-1 should not by itself exclude the diagnosis of MCC. The last ELECTHiV criteria was detection of MCPyV DNA by PCR in tumor samples. Indeed, MCPyV DNA was detected in 15 of 17 patients with MCCWP, all with LNM from cutaneous MCC and only 1 with LNMNEC. Previously, De Biase et al. (55) detected MCPyV DNA by PCR in 5 of 5 patients with MCCWP as compared with 7 of 22 with MCCWP by Pan et al. (56). Using immunohistochemistry, Haymerle et al. (51) detected MCPyV in 4 of 6 patients with MCCWP. Such discrepancies have been observed for cutaneous MCC (47) and probably reflect heterogenous technical procedures (DNA fragmentation in FFPE tissue samples, PCR amplicon size and sets of primers, CM2B4 antibody immunostaining sensitivity). Altogether, our results suggest that MCPyV prevalence in MCCWP is probably the same as in its cutaneous counterpart. However, we also detected MCPyV DNA in a large-cell NEC of the lung, which is consistent with previous detection of MCPyV in non-Merkel cell neoplasms (65) .

Because none of the markers we describe allow for accurate discrimination between MCC and LNMNEC when used alone, we suggest combining them in the seven ELECTHiV criteria. In our cohort, all patients with assessable MCC had at least 5 of the 7 criteria, whereas all patients with other metastatic NEC except one (with MANEC, discussed previously) showed fewer than 3 criteria. When considering the ELECTHiV criteria as a 7-

point diagnostic score, an ELECTHiV score  $\geq 3$  would be associated with a MCCWP diagnosis with sensitivity of 100% (95% confidence interval: 84-100%) and a specificity of 95% (95% confidence interval: 75-100%) in our study sample. Although this score should be validated in a second independent set of patients before drawing definite conclusions regarding its accuracy, we assessed it with 19 additional MCCWP patients, with all available items retrieved from the literature (55,56) and confirmed ELECTHiV scores  $\geq 3$  in all patients (score 3, n=1; score 4, n= 4; score 5, n=3; score 6, n=7; score 7, n=4).

To conclude, MCCWP represents a well-defined entity in the MCC tumor spectrum. MCCWP can be discriminated from LNMNEC by a body of clinical, radiologic, morphologic and biologic criteria. We suggest the use of the ELECTHiV criteria to optimize classification of these cancers and thus management in current practice.

#### **Acknowledgments:**

The authors sincerely thank the patients who gave their approval for the study. They also thank Pr Gaëlle Fromont G (Tours, France), Roseline Guibon (Tours, France), Dr Micheline Chargeboeuf (Lons le Saunier, France), Dr Christine Collin (Tours, France), Dr Benjamin Linot (Angers, France), and Dr Isabelle Valo (Angers, France) for their help and contributions to the study.

#### **Grant numbers and sources of support:**

Project POCAME, Axe Immunothérapies, Cancéropole Grand Ouest-Région Centre Val de Loire (France)

**Abbreviation and acronym list:**

CK: Cytokeratin

DNA: Desoxyribonucleic acid

LNМ: Lymph node metastasis

LNМNEC: Lymph node metastasis from neuroendocrine carcinoma

LTag: Large T antigen

MANEC : Mixed adenoneuroendocrine carcinoma

MCC: Merkel cell carcinoma

MCCWP: Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor

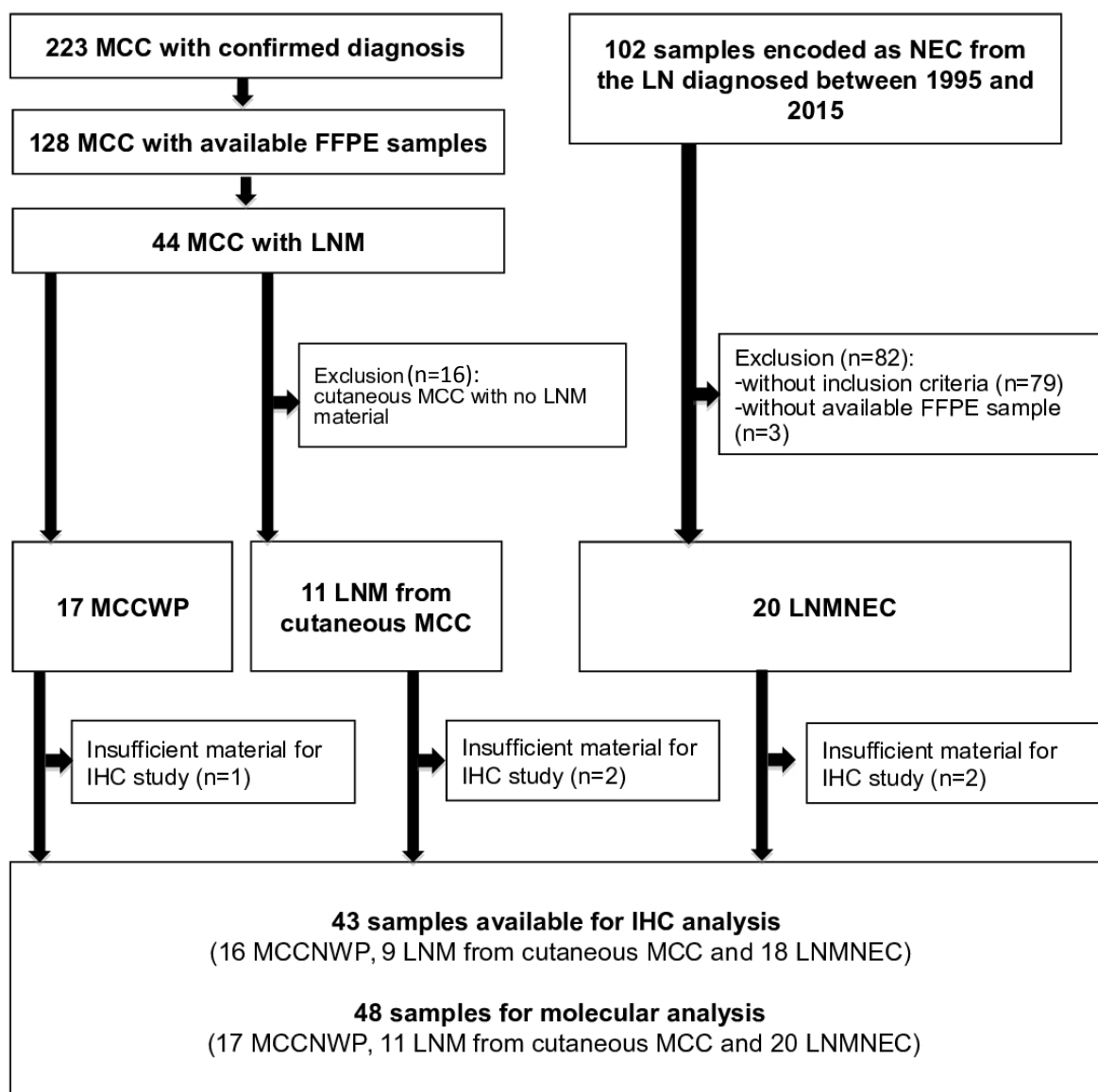
MCPyV: Merkel cell polyomavirus

NEC: Neuroendocrine carcinoma

PCR: Polymerase chain reaction

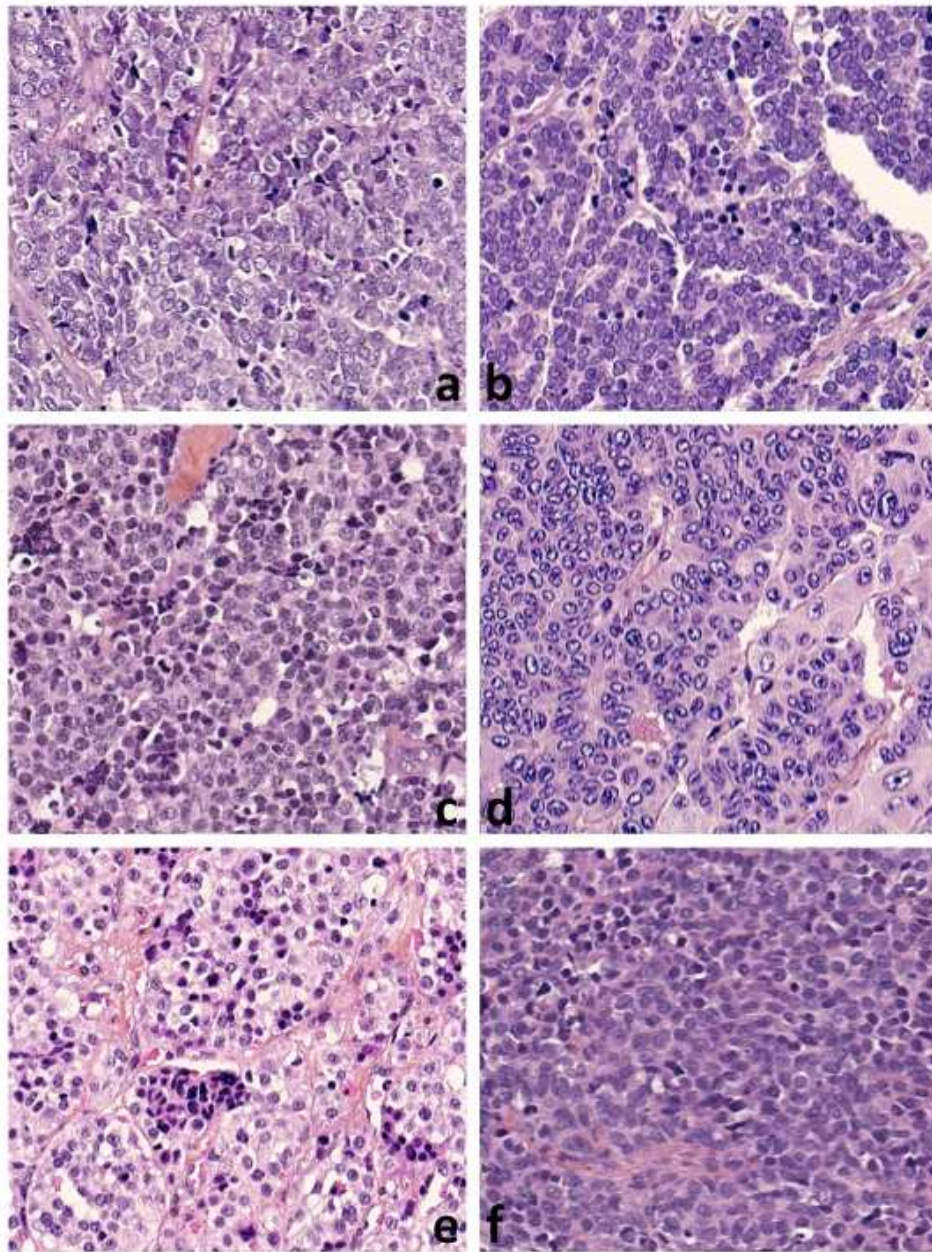
TTF-1: Thyroid transcription factor 1

## Figures and Tables:

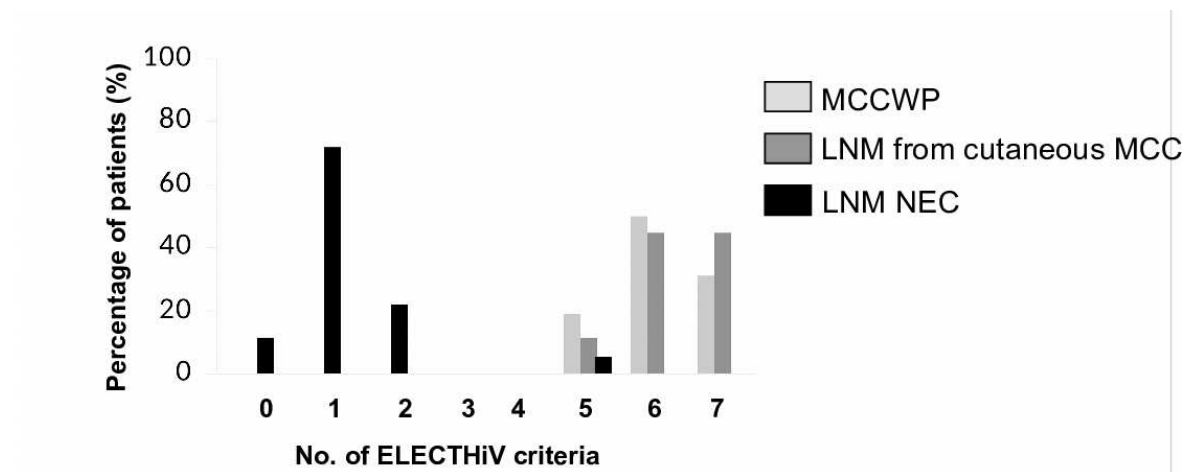


**Figure 1: Flow of patients in the study**

FFPE: formalin fixed and paraffin embedded, IHC: immunohistochemical; LN: lymph node, LNM: lymph node metastasis, MCC: Merkel cell carcinoma, MCCNWP: Merkel cell carcinoma of lymph node without primary tumor, NEC: neuroendocrine carcinoma.



**Figure 2:** Microscopic features of MCCNWP (a), LNM from cutaneous CCM (b) and LNMNEC cases (c: small-cell carcinoma of the lung, d: large-cell carcinoma of the lung, e: well-differentiated neuroendocrine tumor of the thyroid [medullar thyroid carcinoma], f: neuroendocrine component of MANEC from the digestive tract). On morphological examination (HES x200), all high-grade NEC cases shared a similar architectural pattern forming islands and ribbons of uniform tumor cells. Tumors classified as small-cell carcinoma (a, b, c, f) displayed a high nucleocytoplasmic ratio, “salt-and-pepper” chromatin and high number of mitoses; large-cell NEC (d) were characterized by abundant cytoplasm and apparent nuclei. Well-differentiated neuroendocrine tumors showed few mitosis and a more obvious nested pattern (e: medullar thyroid carcinoma).



**Figure 3:** Patient diagnoses and ELECTHiV criteria (**E**lderly:  $\geq 70$  years, **L**ocation: inguinal or parotid, **E**xtent restricted to the lymph node area, **C**K20 positivity, **T**TF-1 negativity, **H**istological type: small cell carcinoma, **V**irus detection). All patients with MCCWP and LNM from cutaneous MCC had at least five ELECTHiV criteria, whereas 19 of 20 patients with LNM from NEC had fewer than 3 criteria, except for 1 patient with metastatic digestive mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC), who had 5 criteria.

**Table I.** Characteristics of patients with Merkel cell carcinoma (MCC) without primary tumor (MCCWP), lymph node metastasis (LNM) from cutaneous MCC and LNM from neuroendocrine carcinomas (LNMNEC). NS, not significant.

Characteristics	MCCWP (n=17)	LNM from cutaneous MCC (n=11)	LNMNEC (n=20)	P value
<b>Age, n (%)</b>				<b>&lt;0.001</b>
< 70 years	8 (47)	1 (9)	16 (80)	
≥ 70 years	9 (53)	10 (91)	4 (20)	
<b>Sex ratio (male/female)</b>	8/9	4/7	11/9	NS
<b>Lymph node location, n (%)</b>				<b>&lt;0.01</b>
Parotid	2 (12)	1 (9)	0	
Cervical	0	1 (9)	10 (50)	
Supra-clavicular	0	0	6 (30)	
Axillar	0	2 (18)	3 (15)	
Inguinal	15 (88)	7 (64)	1 (5)	
<b>Disease extent, n (%)</b>				<b>&lt;0.02</b>
Localized	16 (94)	11 (100)	9 (45)	
Systemic	1 (6)	0	11 (55)	



**Table II.** Histologic, immunohistochemical and virologic features of patients with MCCWP, LNM from cutaneous MCC and LNMNEC. NS: not significant.

	<b>MCCWP (n=17)</b>	<b>LNM from cMCC (n=11)</b>	<b>LNMNEC (n=20)</b>	<b>P value</b>
<b>Histologic features</b>				
Histological subtypes				<b>&lt;0.01</b>
Small-cell carcinoma	17 (100)	11 (100)	6 (30)	
Large-cell carcinoma	0	0	6 (30)	
Well-differentiated tumor	0	0	8 (40)	
<b>Immunochemical features</b>				
Cytokeratin expression				
AE1/AE3				NS
Dot staining	14 (88)	7 (78)	3 (17)	
Diffuse staining	2 (13)	2 (22)	15 (83)	
CK7	0	0	8 (44)	<b>&lt;0.01</b>
CK19	10 (63)	1 (11)	3 (17)	<b>&lt;0.01</b>
CK20				<b>&lt;0.01</b>
Dot staining	5 (31)	6 (67)	0	
Diffuse staining	11 (69)	2 (22)	1 (6)	
Neuroendocrine marker expression				NS
Chromogranin A	14 (88)	7 (78)	14 (78)	
High expression	2 (13)	2 (22)	4 (22)	
Low expression				NS
Synaptophysin	9 (56)	2 (22)	11 (61)	
High expression	3 (19)	6 (67)	5 (22)	
Low expression				
Other markers				
TTF-1	1 (6)	0	14 (78)	<b>&lt; 0.01</b>
MCPyV detection				
Immunochemistry	8 (50)	4 (44)	0	<b>&lt;0.01</b>
<b>Virologic features</b>				
MCPyV detection by PCR	15 (88)	11 (100)	1 (5)	<b>&lt;0.01</b>

**Supplemental Table S1: Antibodies used for immunohistochemistry\***

Antigen	Clone	Provider	Dilution
CKAE1/AE3	M3515	Dako	1/200
CK7	M7018	Dako	1/200
CK19	M8880	Dako	1/100
CK20	M7019	Dako	1/100
Chromogranin A	A0430	Dako	1/2000
Synaptophysin	RBK011	Zytomed	1/200
TTF-1	SP141	Roche	Pre-diluted
Large T Antigen	sc-136172	Santa Cruz	1/50

CK: cytokeratin; TTF-1: thyroid transcription factor-1

\*the kit used for all antibodies was Ultraviewuniversal DAB kit (ref 760-500 Ventana Roche)

**Supplemental Table S2: Large T-antigen primer sequences for Merkel cell polyomavirus (MCPyV) detection by PCR**

LT3F	5' TCG-CCA-GCA-TTG-TAG-TCT-AAA-AAC 3'
LT3R	5' CCA-AAC-CAA-AGA-ATA-AAG-CAC-TGA 3'
LT3S	6-FAM5' AGC-AAA-AAC-AAC-ACT-CTC-CCC-ACG-TCA-GAC-AG 3' BHQ

**Supplemental Table S3:** Clinical, histologic, immunochemical and virologic features all patients

Patient	Clinical data								Expression of immunochemical and biologic markers								
No.	Diagnosis	Primary tumor site	Status of primary tumor	Age	Sex	History of cancer	Localization of lymph node	Disease extension	CK20	CK7	chromo	synapto	TTF-1	CM2B4	AE1/AE3	CK19	PCR
1	MCCWP	LN	proven	68	M	no	inguinal	localized	+	-	+	low	-	+	dot	dot	+
2	MCCWP	LN	proven	83	F	colon ADC, pheochromocytoma	inguinal	localized	+	-	+	-	-	+	dot	-	+
3	MCCWP	LN	proven	65	F	large-cell lymphoma	inguinal	localized	+	-	+	+	-	+	dot	dot	+
4	MCCWP	LN	proven	71	M	NA	inguinal	localized	+	-	+	+	-	+	dot	dot	+
5	MCCWP	LN	proven	75	F	no	inguinal	localized	+	-	+	+	-	-	dot	-	-
6	MCCWP	LN	proven	80	M	no	inguinal	localized	+	-	+	+	-	-	dot	-	+
7	MCCWP	LN	proven	63	M	no	inguinal	localized	+	-	+	low	-	+	dot	dot	+
8	MCCWP	LN	proven	59	F	no	inguinal	localized	+	-	+	low	-	-	dot	-	+
9	MCCWP	LN	proven	63	F	pancreas ADC	inguinal	localized	+								+
10	MCCWP	LN	proven	70	M	no	inguinal	localized	+	-	+	+	-	-	diffuse	dot	+

11	MCCWP	LN	proven	79	F	no	inguinal	localized	+	-	low	-	-	-	dot	-	+
12	MCCWP	LN	proven	73	M	no	inguinal	localized	+	-	low	-	+	+	dot	-	+
13	MCCWP	LN	proven	67	F	NA	inguinal	localized	+	-	+	+	-	-	dot	dot	+
14	MCCWP	LN	proven	57	F	no	inguinal	localized	+	-	+	+	-	+	dot	dot	+
15	MCCWP	LN	proven	81	F	no	inguinal	systemic	+	-	+	+	-	+	dot	dot	+
16	MCCWP	LN	proven	84	M	no	parotid	localized	+	-	+	+	-	-	dot	dot	-
17	MCCWP	LN	proven	56	M	no	parotid	localized	+	-	+	-	-	-	diffuse	dot	+
18	SCNEC	lung	possible	70	M	no	susclavicular	systemic	-	-	low	+	+	-	dot	-	-
19	SCNEC	lung	possible	67	F	no	cervical	systemic	-	-	low	-	+	-	dot	-	-
20	SCNEC	lung	possible	62	M	no	susclavicular	systemic	-	-	+	+	+	-	dot	-	-
21	SCNEC	lung	possible	56	M	no	susclavicular	systemic	-	-	+	low	+	-	diffuse	-	-

22	SCNEC	lung	possible	43	F	no	cervical	systemic	-	-	+	+	+	-	diffuse	-	-
23	LCNEC	lung	possible	58	M	no	axillary	systemic	-	+	+	+	+	-	diffuse	-	-
24	LCNEC	lung	possible	64	M	no	susclavicular	systemic	-								+
25	LCNEC	lung	possible	46	M	no	susclavicular	systemic	-								-
26	atypical carcinoid	arethynoid	proven	91	M	prostate ADC	cervical	localized	-	+	+	+	-	-	diffuse	-	-
27	LCNEC	unknown	undetermined	83	F	no	axillary	systemic	-	-	+	+	-	-	-	-	-
28	MANEC	anal canal	proven	91	M	no	inguinal	localized	+	-	low	+	-	-	diffuse	dot	-
29	MANEC	stomach	proven	69	M	no	susclavicular	systemic	-	-	+	-	-	-	-	-	-
30	SCNEC	anal canal	proven	40	F	no	axillary	systemic	-	+	low	+	+	-	diffuse	-	-
31	MTC	thyroid	proven	70	F	no	cervical	localized	-	-	+	low	+	-	diffuse	-	-
32	MTC	thyroid	proven	55	F	no	cervical	localized	-	+	+	+	+	-	diffuse	-	-

33	MTC	thyroid	proven	61	F	no	cervical	localized	-	+	+	low	+	-	diffuse	-	-
34	MTC	thyroid	proven	67	F	no	cervical	localized	-	-	+	low	+	-	diffuse	-	-
35	MTC	thyroid	proven	71	M	no	cervical	localized	-	+	+	+	+	-	diffuse	diffuse	-
36	MTC	thyroid	proven	69	F	prostate ADC	cervical	localized	-	+	+	low	+	-	diffuse	-	-
37	MTC	thyroid	proven	60	M	no	cervical	localized	-	+	+	+	+	-	diffuse	diffuse	-
38	LNM from CMCC	skin	proven	73	M	no	axillary	localized LNM recurrence	-			low	low	-	-	dot	+
39	LNM from CMCC	skin	proven	82	F	no	inguinal	localized LNM recurrence	+			+	low	-	-	diffuse	+
40	LNM from CMCC	skin	proven	85	F	kidney ADC	inguinal	LNM associated with skin primary	+			+	+	-	-	diffuse	+
41	LNM from CMCC	skin	proven	74	F	no	inguinal	LNM associated with skin primary	+	-	+	low	-	-	dot	-	+
42	LNM from CMCC	skin	proven	65	M	no	inguinal	localized LNM recurrence	+	-	+	low	-	+	dot	-	+
43	LNM from CMCC	skin	proven	71	M	no	axillary	LNM associated with skin primary	+	-	+	low	-	+	dot	low	+
44	LNM from CMCC	skin	proven	78	F	kidney and bladder ADC	inguinal	LNM associated with skin primary	+	-	+	+	-	+	dot	-	+

45	LNM from CMCC	skin	proven	73	M	no	cervical	localized LNM recurrence	+	-	low	low	-	+	dot	-	+
46	LNM from CMCC	skin	proven	78	F	NA	parotid	localized LNM recurrence									+
47	LNM from CMCC	skin	proven	72	F		inguinal	localized LNM recurrence	+	-	+	-	-	-	dot	-	+
48	LNM from CMCC	skin	proven	76	F	NA	inguinal	LNM associated with skin primary									+

**Table S4:** Detailed immunohistochemical features of MCCWP, LNM from cMCC and LNMNEC.

Tumors	Number of cases	AE1E3 positivity		CK7	CK19	CK20	Chromogranine		Synaptophysine		TTF1	CDX2	Large T antigen
		Dots staining	Diffuse staining				High staining	Low staining	High staining	Low staining			
MCCNWP	16	14	2	0	10	16	14	2	9	3	1	0	8
LNM from cMCC	9	6	2	0	1	8	7	2	2	6	0	0	4
LNMNEC (total):	18	3	15	8	3	1	14	4	11	5	14	0	0
- <u>Lung NEC</u>													
Small cell carcinoma	5	3	2	0	0	0	3	2	3	1	5	0	0
Large cell carcinoma	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0
- <u>Digestive NEC</u>													
Small cell carcinoma	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0
MANEC	2	0	2	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0
- <u>MCT</u>	7	0	7	5	2	0	7	0	3	4	7	0	0
- <u>Arytenoid carcinoid</u>	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
- <u>Unknown</u>	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0



**VI.   Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor are  
metastatic neoplasia associated with an efficient immune response**

## **Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor are metastatic neoplasia associated with an efficient immune response**

Thibault Kervarrec, MSc<sup>1,2</sup>, Julia Zaragoza, MD<sup>3</sup>, Pauline Gaboriaud<sup>2</sup>, Gaelle Fromont, MD, PhD<sup>1</sup>, Yannick Le Corre, MD<sup>4</sup>, Eva Hainaut-Wierzbicka, MD<sup>5</sup>, Francois Aubin, MD, PhD<sup>6</sup>, Guido Bens, MD<sup>7</sup>, Patrick Michenet, MD<sup>8</sup>, Hervé Maillard, MD<sup>9</sup>, Antoine Touzé, PhD<sup>2</sup>, Mahtab Samimi, MD, PhD(\*)<sup>2,3</sup>, Serge Guyétant, MD, PhD(\*)<sup>1</sup>

- (1) Department of Pathology, Université Francois Rabelais, CHU de Tours, avenue de la République, 37170, Chambray-les-tours, France
- (2) “Biologie des infections à polyomavirus” team, UMR INRA ISP 1282, Université Francois Rabelais, 31, avenue Monge 37200 Tours, France
- (3) Dermatology Department, Université Francois Rabelais, CHU de Tours, avenue de la République, 37170, Chambray-les-tours, France
- (4) Dermatology Department, LUNAM Université, CHU Angers, 4 rue Larrey 49933 Angers, France
- (5) Dermatology Department, Université de Poitiers, CHU de Poitiers, 2 rue de la Milétrie, 86021 Poitiers, France
- (6) Dermatology Department, Université de Franche Comté, CHU Besançon, EA3181, IFR133, 2 boulevard Fleming 25030 Besançon, France
- (7) Dermatology Department, CHR d’Orléans, 14 avenue de l’hôpital, 45100 Orléans, France
- (8) Department of Pathology, CHR d’Orléans, 14 avenue de l’hôpital, 45100 Orléans, France
- (9) Dermatology Department, CHR Le Mans, 194 avenue Rubillard 72037 Le Mans Cedex 09, France

(\*) M. Samimi and S. Guyétant contributed equally to the present study.

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

**Grant numbers and sources of support:** project POCAME, Axe Immunothérapies, Cancéropole Grand Ouest-Région Centre Val de Loire (France), Fond de recherche de la Société Française de Pathologie.

**Institutional review board:** The local Ethics Committee of Tours (France) approved the study (N° ID RCB2009-A01056-51)

## **Abstract**

**Background:** Overall, 5% to 15% of Merkel cell carcinoma (MCC) cases appear as isolated superficial adenopathy and have been reported as MCC of the lymph node without cutaneous primary tumor (MCCWP). Whether this tumor results from a metastatic process with spontaneous regression of the primary or is a primary tumor of the lymph node is debated.

**Objective:** To determine the metastatic or primitive nature of MCCWP by investigating epithelial-mesenchymal transition makers and immune infiltrate in a cohort of MCC.

**Methods:** Cases from an MCC cohort were reviewed and classified as primary cutaneous tumors (n=60), lymph node metastasis (LNM) from primary cutaneous tumors (n=18) or MCCWP (n=15). Samples were included in a tissue microarray and immunochemistry was used to compare the expression of 4 potential metastatic markers related to the epithelial-mesenchymal transition (E-cadherin, N-cadherin, zinc finger E-box binding homeobox 1 [Zeb1], vimentin) among the three groups. Because high immune response may explain the regression of an occult skin primary tumor in MCCWP, density of intratumoral immune cells, which have been associated with improved outcome (CD8 lymphocytes and CD33 myeloid cells), was also evaluated.

**Results:** For MCC with an identified cutaneous primary, high and diffuse expression of Zeb1 was more frequent in LNM (73%) than in primary MCC (32%) and could be therefore considered as indicative of the metastatic nature ( $p=0.017$ ). Zeb1 expression profile was similar for MCCWP (66% high diffuse staining) and LNM from cutaneous primary but differed from that for primary MCC ( $p=0.014$ ). In addition, density of CD8 and CD33 immune infiltrating cells was higher with MCCWP than MCC with identified cutaneous primary (both primary MCC and LNM) ( $p=0.03$ ).

**Conclusion:** Frequent Zeb1 expression and high immune infiltrate suggest that MCCWP could be a metastatic process associated with an efficient immune response.

## **Introduction**

Merkel cell carcinoma (MCC) is a rare aggressive neuroendocrine carcinoma of the skin occurring essentially in older people; the main risk factors are sun exposure and immunosuppression (7). On microscopic examination, MCC shows high-grade neuroendocrine carcinoma features mainly characterized by a proliferation of small-sized tumor cells showing high nucleocytoplasmic ratio, high mitotic rate and frequent association with necrosis (7).

In 2008, Feng et al. (26) found integration of the Merkel cell polyomavirus (MCPyV) genome in tumoral cells of most MCCs. Additional studies confirmed MCPyV DNA could be detected by PCR in approximately 80% of cutaneous MCC.

Approximately 5% to 15% of MCC cases present as lymph-node metastasis (LNM) without a primary skin tumor (MCCWP) (49–51,61). We and others (52,55,56) have confirmed that MCCWP belongs to the spectrum of MCC because of a common phenotype shared by MCCWP and its cutaneous counterparts and distinguishing it from other neuroendocrine carcinomas. However biological connections between MCCWP and cutaneous MCC remain unclear. MCCWP has been suggested to correspond to the nodal metastasis from an occult or totally regressive skin MCC (66). However, MCCWP could also derive from intranodal preexisting epithelial nests of MCC cell precursors (66), as reported for nodal melanocytic naevi, and represent a localized non-metastatic tumor.

Metastatic evolution is a complex biological process, closely related to the invasion abilities of the tumor cells and to epithelial–mesenchymal transition (EMT) (67,68). EMT is characterized by a loss of epithelial markers such as E-cadherin and acquisition of a mesenchymal phenotype with abnormal expression of N-cadherin or vimentin. EMT depends on a few transcription factors that are common to most neoplasias. Among these, zinc finger

E-box binding homeobox 1 (Zeb1) (67) is the main determinant of the EMT in many solid cancers, but its expression has never been investigated in MCC.

The metastatic nature of MCCWP would imply a complete regression of a skin primary tumor. Indeed, complete spontaneous regression of both localized and metastatic MCC has been reported (66). Inoue et al. identified increased apoptosis as well as high cytotoxic T-cell-mediated responses (38,69) as major determinants of this regression. The impact of immune infiltrates on MCC behavior has also been revealed in non-regressive tumors. Indeed, Paulson and others showed brisk CD8 lymphocytic infiltrate in the intratumoral area, reflecting an effective anti-tumor immune response (35–37). However, most MCC display immune evasion from anti-tumoral effectors by excluding CD8 lymphocytes at the periphery of the tumor and/or by inhibition of the cytotoxic response (35,41). Recently, our group revealed CD33-expressing myeloid cells as a second population associated with an efficient immune response in MCC. Indeed, intratumor CD33 density was closely associated with the presence of intratumoral CD8 lymphocytes, and tumors with brisk CD33 and CD8 infiltrates were associated with better survival ((\*) unpublished data).

The aim of this study was to clarify whether MCCWP could represent a metastatic process deriving from an occult cutaneous primary tumor. We studied EMT markers expression and immune infiltrates in a large cohort of MCC cases, including MCCWP and MCC with identified cutaneous primary.

---

(\*) Travail intitulé “Merkel Cell Carcinoma tumors infiltrated by CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome”. Le manuscrit est en cours de finalisation, et sera bientôt soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology*.

## **Methods**

### **Design and settings**

MCC cases were selected from an ongoing historical/prospective cohort of MCC patients from 5 French hospital centers. Inclusion criteria of the cohort were previously described (45). Briefly, patients had a diagnosis of MCC established between 1998 and 2016 (local ethics committee, Tours, France, no. ID RCB2009-A01056-51). Only cases with available formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were considered for inclusion in the present study.

Among this population, MCCWP cases were identified as previously described (\*). Briefly, the diagnostic criteria were: no previous history of cutaneous MCC, no evidence of cutaneous or extra-cutaneous primary tumor, no evidence of cancer after exhaustive work-up consisting of cutaneous physical examination and extensive imaging (whole-body CT scan and/or <sup>18</sup>FDG-PET-CT scan). Cases with identified cutaneous primary MCC were included as cutaneous primary tumor or LNM according to the location of the available FFPE sample. In cases with available FFPE samples from both the primary tumor and metastasis were available, only the metastasis was included. Cases with unknown location were excluded from the study.

### **Clinical and follow-up data**

Age, sex, immunosuppression (HIV infection, organ transplant recipients, hematological malignancies) and American Joint Committee on Cancer (AJCC) stage at the time of surgery were collected from patient files.

---

(\*) Décrit dans l'article précédent : "Differential diagnosis of Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor and other metastatic neuroendocrine carcinomas: the ELECTHiVcriteria"

## **Tissue microarray**

Before including samples in the tissue microarray, areas of interest were selected on hematoxylin/eosin (HES)-stained sections using the following criteria: central intratumor area, lack of necrosis or fibrous septa and representative immune infiltrates after overall slide evaluation on HES. The selected areas were extracted by using a 1-mm tissue core and cores were mounted in triplicate using a semi-motorized tissue arrayer (MTA booster OI v2.00, Alphelys). The representativeness of this method for evaluating immune infiltrates was previously assessed (\*).

## **Immunohistochemistry**

Immunohistochemistry for CD8, E-cadherin and vimentin staining was performed on a BenchMark XT Platform as instructed. Staining was performed manually for Zeb1, N-cadherin and CD33 as previously described (70). Antibodies and dilutions are summarized in **Table S1**.

## **Interpretation of immunohistochemical staining**

E-cadherin, N-cadherin and vimentin expression was considered positive or negative. Because of significant variations in proportion of expressing cells and intensity of the staining, Zeb1 expression was evaluated with a semiquantitative score: 0, lack of expression; 1, low staining of tumor cells or high staining of less than 50% of the tumor cells; 2, high staining of more than 50% of tumor cells.

CD8 infiltration was scored according to Paulson et al.(35), considering only cells located inside the tumor. For CD33 infiltrate assessment, cells were counted in 5 high-power fields of the “intratumor area” defined as the tumor area with few fibrous septa and no necrosis. Only

---

(\*) Travail intitulé “Merkel Cell Carcinoma tumors infiltrated by CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome”. Le manuscrit est en cours de finalisation, et sera bientôt soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology*.

immune cells with obvious nuclei and adequate morphology in contact with tumor cells and not within vessels were considered in the analysis (35). Cases with less than 5 representative high-power foci were excluded as not interpretable.

CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> infiltrates were defined by the association of brisk density of CD33 (> 87 cells/mm<sup>2</sup>) together with the presence of CD8 T-cell infiltrates (scores 1-5) as previously described ((\*) unpublished data).

### **Statistical Analysis**

Continuous data are described with medians (ranges) and categorical data with number (percentage the population with available data). Continuous data were compared by Non-parametric Mann Whitney test and categorical data by two-tailed Fisher exact test. P<0.05 was considered statistically significant.

---

(\*) Travail intitulé “Merkel Cell Carcinoma tumors infiltrated by CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome”. Le manuscrit est en cours de finalisation, et sera bientôt soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology*.



## **Results:**

### **Patient characteristics**

Among the whole MCC cohort (n=242), FFPE tumor samples were available for 103 patients and were considered for inclusion in this study. The location of the tumors was unknown for 10 cases, which were excluded from further analysis. The 93 remaining cases consisted of 60 cutaneous primary MCC, 18 LNM from cutaneous MCC and 15 MCCWP (**flow chart/figure 1**). Clinical features of the 3 groups are in **Table 1**.

### **EMT markers in MCC**

Overall, loss of E-cadherin expression and abnormal expression of N-cadherin were observed in 82 tumors (91% of interpretable cases) and 75 tumors (88% of interpretable cases), respectively. Vimentin expression was identified in only 5 cases (6%). Zeb1 expression was observed in 61 cases (74%), with diffuse high staining (score 2) in 40 cases (49%).

In cases with identified cutaneous primary MCC, the transcription factor Zeb1 was the only marker with statistically significant differential expression between primary cutaneous MCC and LNM ( $p=0.047$ ) (**Table 2**). Furthermore, 11/15 LNM from cutaneous MCC (73%) but only 19/52 of primary MCC cases (n=36%) showed high and diffuse expression of Zeb1 (score 2) ( $p=0.017$ ). Therefore, we considered diffuse and intense Zeb1 staining (score 2) as a potential marker of the metastatic nature in MCC.

In this setting, we focused on MCC cases with score 2 for Zeb1 expression. Considering AJCC stage and regardless of the location of the cancer sample (primary tumor or metastasis), the Zeb1 score was 2 for 38%, 56%, 58% and 100% of cases with AJCC stage I, II, III and IV, respectively. In addition, N-cadherin expression was more frequent in tumors with score 2 for Zeb1 expression ( $p=0.007$ ).

In MCCWP group, 66% of cases (n=10/15) had a score of 2 for Zeb1 expression. This expression profile was similar to that for MCC with LNM cases but differed from that for primary cutaneous MCC cases (p=0.014) (**Table 3**).

### **Immune infiltrate evaluation in MCC**

Lack of tumor-infiltrating CD8 lymphocytes was observed in 34 MCC cases (score 0, 40%). In the other cases (n= 53), most of them showed low CD8 infiltrate (score 1, n=45) and brisk infiltration (scores 2-5) was found in only 8 cases (9%, all were primary cutaneous MCC). CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> immune infiltrates were identified in 32 cases (42%). CD8 density and frequency of CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> infiltrates were higher in MCCWP (73% and 69% respectively) than MCC with identified cutaneous primary (p=0.03 and 0.0012) (**Table 4**). For the latter group, the density of CD8-infiltrated tumors was higher for primary cutaneous MCC than LNM from cutaneous MCC (66% vs 31%, p=0.04) as was CD33/CD8<sup>high</sup> infiltrate status (48% vs 6%, p=0.005). Representative illustrations of immunostaining are in **Figure 2**.

## Discussion

In this study, we investigated EMT markers and the immune response in MCCWP as compared with a reference group of MCC with identified skin primary. To our knowledge, EMT markers expression has never been studied in MCC. Zeb1 analysis revealed a common expression profile shared by MCCWP and LNM from cutaneous MCC, with more frequent and higher expression of Zeb1 as compared with cutaneous primary tumors. Moreover, we found a higher frequency of both intratumoral CD8 lymphocytes and CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> infiltrate with MCCWP than both primary MCC and LNM from cutaneous MCC.

To date, the inclusion of MCCWP in the MCC spectrum is mainly based on phenotype similarities. Indeed, MCCWP and cutaneous MCC occur in the same population of older people with immunosuppression, share the same morphological and immunochemical features, and are frequently associated with MCPyV (52,55,56). Moreover, MCCWP almost always occurs in superficial lymph nodes, which are responsible for lymphatic drainage of the skin, which suggests a potential metastatic process. However, in comparison with LNM from cutaneous MCC cases, MCCWP show better outcome, which led to consider it as a less aggressive neoplasia and to its recent reclassification as AJCC stage IIIa (71). The potential metastatic nature of MCCWP as well as the determinants of its reduced aggressiveness have never been investigated.

Metastasis results from complex biological processes such as invasion of the tumor microenvironment, vascular invasion, intravascular migration, preparation and invasion of the pre-metastatic niche and development of a metastatic tumor and many of them require EMT. The EMT process is defined as the ability of the carcinoma to lose its epithelial phenotype, notably intercellular junctions, and to acquire mesenchymal features required for invasion. The N-cadherin/E-cadherin couple has been used to reflect this balance of loss of epithelial features and appearance of a mesenchymal phenotype (68). In our study, MCC showed

frequent expression of N-cadherin without E-cadherin expression, which consecrates MCC as an aggressive, undifferentiated neoplasm. Molecular mechanisms leading to EMT have been widely investigated and seem to be common in most carcinomas (67), notably colon, lung, breast and pancreatic cancer. EMT depends on a few transcription factors — Zeb1, Zeb2, Snail, Slug and Twist. Few data are available on the EMT in neuroendocrine carcinomas: small-cell lung carcinomas (72,73) show frequent EMT features, mainly related to inhibition of the Notch pathway and expression of transcription factors, notably Zeb1. Moreover, esophageal cancer show immunochemical expression of Zeb1 with a specific nuclear location (74).

Our study revealed frequent Zeb1 expression in MCC tumors, especially with LNM. This result identifies Zeb1 as a new unexplored determinant of aggressiveness in MCC. In addition to its key role in EMT, Zeb1 has been associated with other aggressiveness mechanisms such as “cancer stem-cell” ability and chemotherapy resistance (67). Zeb1 has notably been involved in the acquisition of resistance to cisplatin drugs (75), the current therapy used in MCC. In our study, no other epithelial or mesenchymal markers showed discriminative abilities between primary tumor and metastatic tumors, which led to the hypothesis that Zeb1 can act in a EMT-independent manner in MCC. However further investigations are needed to determine the EMT-dependant or -independent impact of Zeb1 in MCC biology.

A high number of MCCWP expressed Zeb1. This profile was very similar to that for LNM from cutaneous MCC and differed from that for primary MCC. This finding suggests that MCCWP more probably represent metastases from a regressive cutaneous tumor than LN primary tumors.

Fewer than 40 cases of total regression of cutaneous primary MCC have been reported, always after biopsy (66). Several factors could explain the discrepancy between the low incidence of spontaneous regression of MCC and incidence of MCCWP, which represents up

to 15% of all MCC cases (49–51). In our opinion, the incidence of spontaneous regression may be underestimated, because during the past 3 years, 16 MCC tumors were surgically removed in our center and 3 of them experienced total regression after biopsy. In addition, spontaneous regression might also occur in the skin at a subclinical, undetectable tumor stage. Biological determinants of the MCC regression were investigated by Inoue et al (38), who showed high lymphocytic CD8 infiltrates on prior biopsies of MCC before spontaneous regression. Immunity is obviously involved in MCC development. Indeed, specific CD8 cells targeted against viral and cellular antigens have been detected in the MCC microenvironment, and intratumoral CD8 density is also associated with better outcome in non-spontaneous MCC (36). However, in a large portion of MCC, CD8 populations are excluded from the intratumor area and are confined to the fibrous septa surrounding the tumor (35,41). Moreover, CD8 populations show expression of anergy markers, probably because of the expression of immune checkpoints. We observed frequent infiltration of CD8 cells in MCCWP, probably related to an effective lymphocyte response, which could be responsible for the spontaneous regression of an undetected cutaneous primary tumor and for the better outcome of MCCWP as compared with other AJCC stage III tumors (50). In addition, we identified a frequent CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> infiltrate in MCCWP which have also been associated with better outcome ((\*) unpublished data). In a previous study, comparing primary cutaneous tumors with MCC lymph node locations (both MCCWP and MCC with LNM), we did not find any difference concerning the immune infiltrate density. In this present work, separating MCCWP from LNM from cutaneous MCC, we revealed specificity of both entities. Indeed, MCCWP appeared as a high immune-infiltrating cell tumor, in contrast to MCC with LNM, which lacked relevant immune infiltrates. Our study shows some limitations essentially the low number of MCCWP and LNM from cutaneous, due to the low incidence of the disease.

---

(\*) Travail intitulé “Merkel Cell Carcinoma tumors infiltrated by CD33+ myeloid cells and CD8+ T cells are associated with improved outcome”. Le manuscrit est en cours de finalisation, et sera bientôt soumis dans le *Journal of the American Academy of Dermatology*.

In this context, further studies of the immune microenvironment are needed to explore the differences between MCCWP and LNM from cutaneous MCC.

To conclude, our study favors the view of MCCWP as a metastatic process associated with a specific high and efficient immune response rather than a primitive LN tumor. Zeb1 appears as a potential marker of the metastatic process in MCC. Further investigations are needed to define the specific molecular pathway triggered by this factor in MCC.

**Acknowledgments:**

The authors sincerely thank the patients who gave their approval for the study. They also thank Roseline Guibon (Tours, France), Dr Micheline Chargeboeuf (Lons le Saunier, France), Dr Benjamin Linot (Angers, France), and Dr Isabelle Valo (Angers, France) for their help and contributions to the study.

**Abbreviation and acronym list:**

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CD: Cluster of differentiation

DNA: Desoxyribonucleic acid

EMT: Epithelial-mesenchymal transition

HES: Hematein-eosin safran

LNM: Lymph node metastasis

MCC: Merkel cell carcinoma

MCCWP: Merkel cell carcinoma of lymph nodes without skin primary tumor

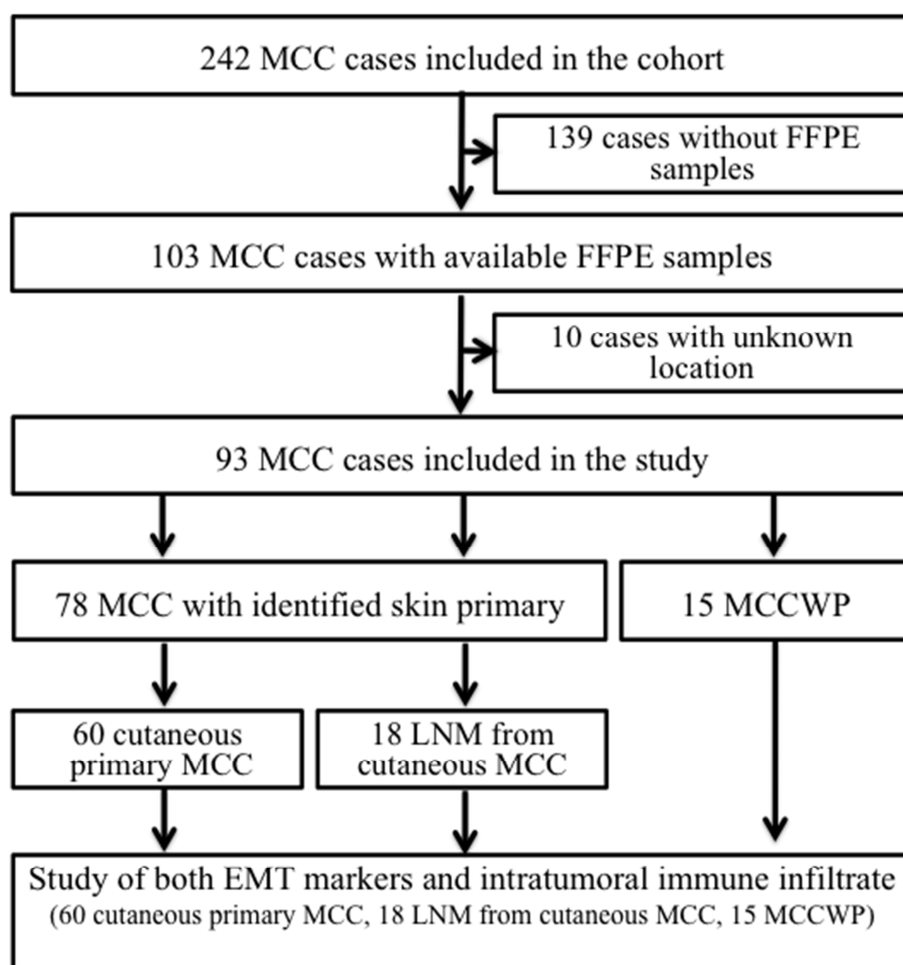
MCPyV: Merkel cell polyomavirus

PCR: Polymerase chain reaction

TMA: Tissue micro array

Zeb1: Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1

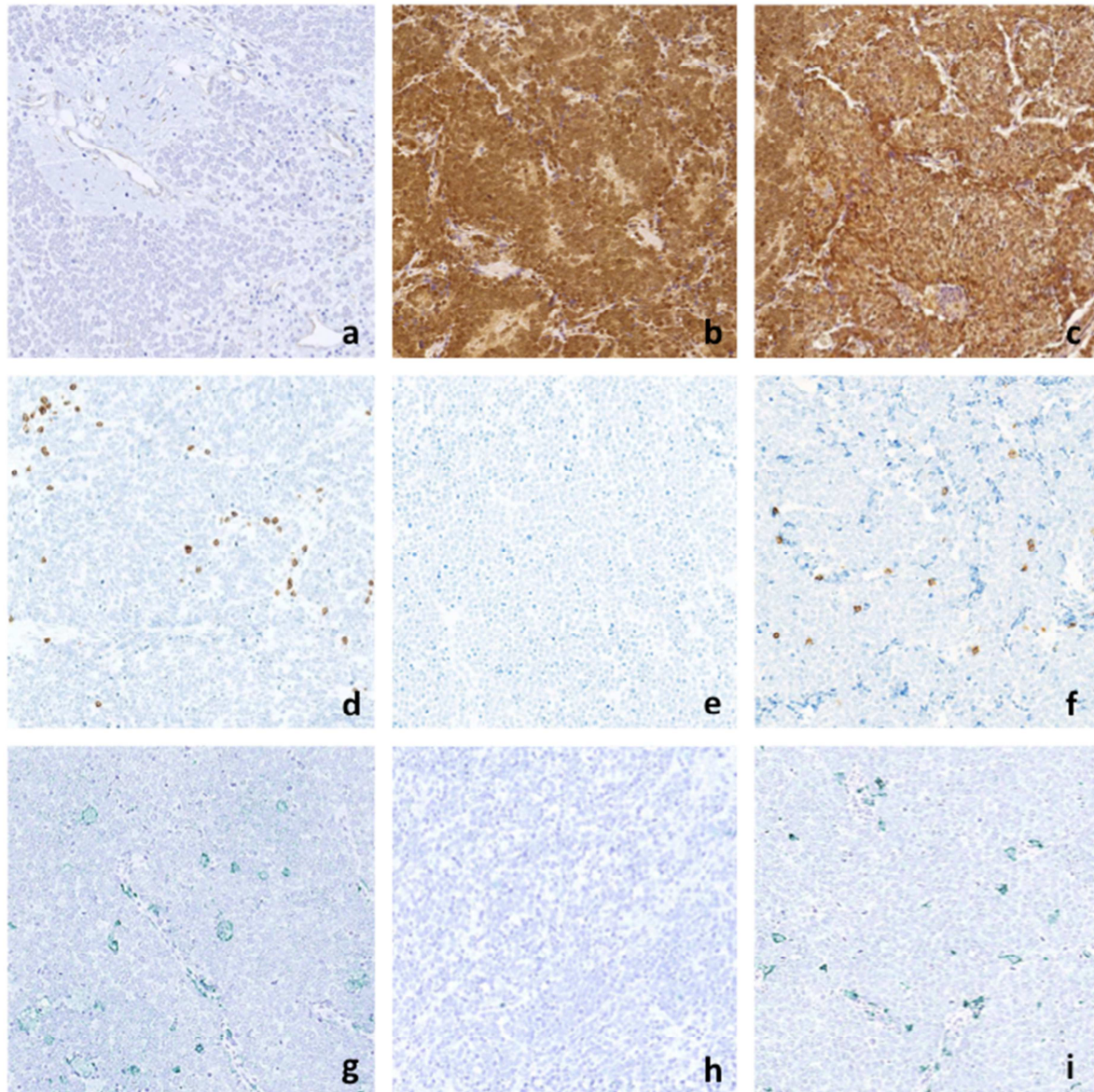
**Figures and tables:**



**Figure 1:** Flow chart

MCC: Merkel cell carcinoma, MCCWP: Merkel cell carcinoma of lymph node without primary tumor, EMT: Epithelial-mesenchymal transition





**Figure 2:** Representative immunochemical stainings of Zeb1 (a, b,c), CD8 (d,e,f) and CD33 (g,h,i) in the primary cutaneous tumor (a,d,g), metastasis of cutaneous MCC (b,e,h) and MCCWP (c,f,i)

**Table 1:** Clinical characteristics of the 3 groups: primary cutaneous Merkel cell carcinoma (MCC), lymph-node metastasis (LNM) from cutaneous MCC and MCC of the lymph node without cutaneous primary tumor (MCCWP)

Clinical data	Primary MCC (n=60)	LNM from cutaneous MCC (n=18)	MCCWP (n=15)
<b>Age:</b> median, range Missing data	82 (49-100) 4	74 (54-90) 0	70 (59-84)
<b>Sex:</b> F/M Missing data	37/19 4	10/8 0	6/9 0
<b>Stage:</b> I II III IV Missing data	16 18 9 0 17	0 0 16 2 0	0 0 14 1 0
<b>Immunosuppression:</b> Yes No Missing data	7 34 19	1 15 2	0 15 0

**Table 2:** Immunohistochemical expression of epithelial–mesenchymal transition (EMT) markers in primary cutaneous MCC and LNM from cutaneous MCC.

EMT markers	Primary MCC (n=60)	LNM from cutaneous MCC (n=18)	p
<b>E-cadherin:</b> Yes No Missing data	6 52 2	0 18 0	0.3
<b>N-cadherin:</b> Yes No Missing data	47 8 5	14 1 3	0.67
<b>Zeb1:</b> Score 0 Score 1 Score 2 Missing data	17 16 19 8	2 2 11 3	0.047
<b>Vimentin:</b> Yes No Missing data	4 47 9	0 14 4	0.56

Zeb1 score: 0, lack of expression; 1, low staining of tumor cells or high staining of less than 50% of the tumor cells; 2, high staining of more than 50% of tumor cells.

**Table 3:** Immunohistochemical expression of Zeb1 in primary cutaneous MCC, LNM from cutaneous MCC and MCCWP.

<b>Zeb1</b>	<b>Primary MCC (n=60)</b>	<b>LNM from cutaneous MCC (n=18)</b>	<b>MCCWP (n=15)</b>	<b>p</b>
Score 0-1	33	4	5	0.0014
Score 2	19	11	10	
Missing data	8	3	0	

Score 0, lack of expression; 1, low staining of tumor cells or high staining of less than 50% of the tumor cells; 2, high staining of more than 50% of tumor cells.

**Table 4:** Immune infiltrates in primary cutaneous MCC, LNM from cutaneous MCC and MCCWP

	<b>Primary MCC (n=60)</b>	<b>LNM from cutaneous MCC (n=18)</b>	<b>MCCWP (n=15)</b>	<b>p</b>
<b>CD8 score:</b>				0.03
Absent	19	11	4	
Present	37	5	11	
Missing data	4	2	0	
<b>CD33<sup>brisk</sup>/CD8<sup>+</sup> infiltrate:</b>				0.0012
No	24	14	4	
Yes	22	1	9	
Missing data	14	3	2	

**Table S1:** Antibodies used and dilutions

<b>Target</b>	<b>Clone/provider</b>	<b>dilution</b>
E-cadherin	NCH-38 / Dako	1/100
N-cadherin	13A9 /Novus Biological	1/100
Vimentin	V9/Dako	1/1000
Zeb1	PAB19268/Abnova	1/500
CD8	C8/144B/Dako	1/50
CD33	SP266/Ventana	ready to use solution

## VII. Discussion

Les CCM ganglionnaires sans primitif cutané correspondent à une population homogène de tumeurs survenant chez des sujets âgés. Ces tumeurs se caractérisent par un envahissement ganglionnaire, le plus souvent localisé, de la région inguinale ou parotidienne et partagent les mêmes caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et virologiques que les CCM cutanés. Elles se distinguent des métastases d'autres carcinomes neuroendocrines par les 7 critères ELECTHIV (**E**lderly age, **L**ocation of the tumor, **E**xtent of the disease, **C**ytokeratin and **T**TF-1 expression, **H**istologic types and **V**irus detection) qui peuvent être utilisés en pratique courante. Ces tumeurs ganglionnaires sans primitif cutané expriment certains marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse notamment Zeb1, ce qui incite à les considérer comme issus d'un processus métastatique plutôt que comme des lésions ganglionnaires primitives. De plus, la présence d'un dense infiltrat inflammatoire, contenant des lymphocytes intratumoraux cytotoxiques de type CD8 ainsi que des macrophages exprimant CD33, constitue probablement le témoin d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. Cette dernière pourrait expliquer l'absence de primitif cutané décelable (régression complète ou maintien à un stade infra clinique).

La première partie du travail avait pour but d'établir des critères diagnostiques de CCM sans primitif cutané utilisables en routine. Ce travail a été initié, à la suite de la relecture de plusieurs cas de CCM ganglionnaires sans primitif pour lesquels le diagnostic n'avait pas été posé, favorisant ainsi la mise en place de prises en charge non optimales des patients. Plusieurs éléments participent à ces erreurs diagnostiques. Premièrement, la non connaissance des renseignements cliniques (notamment la non connaissance des antécédents du malade) et des données de l'imagerie (bilan d'extension) conduit le pathologiste à se limiter au diagnostic de localisation ganglionnaire de carcinome neuroendocrine entraînant par la suite

une prise en charge par des oncologues qui n'évoqueront pas le diagnostic de CCM. Le second élément de réponse est l'absence de validation des outils immunohistochimiques utilisés pour le CCM dans cette localisation. En effet, dans une partie des cas, la cytokératine 20 n'est pas réalisée et l'absence de marquage par le TTF-1 n'est pas utilisée comme un argument en faveur du CCM. Enfin, devant une localisation ganglionnaire souvent inguinale d'un carcinome neuroendocrine, chez un malade sans antécédent de carcinome neuroendocrine et avec un bilan d'extension ne retrouvant pas de primitif (examen dermatologique et imagerie), le diagnostic parfois considéré, par analogie au carcinome non neuroendocrine (notion de CAPI (76)), est celui de carcinomes neuroendocrines métastatiques de primitif inconnu. Sur l'ensemble de la cohorte étudiée, aucun cas de carcinome neuroendocrine métastatique de primitif inconnu n'a été identifié. En effet, l'ensemble des cas de carcinomes neuroendocrines non CCM présentait soit une localisation profonde, soit un antécédent de primitif profond. Cette constatation incite à penser que devant la localisation ganglionnaire superficielle d'un carcinome neuroendocrine de haut grade, l'hypothèse d'un CCM est beaucoup plus probable que celle d'un carcinome viscéral métastatique.

Notre étude présente certaines limitations. En effet, les CCM ont été inclus à partir d'une cohorte multicentrique développée sur l'ensemble du grand Ouest alors que les cas de carcinomes neuroendocrines non CCM proviennent d'un bassin de population plus restreint (CHRU de Tours). Toutefois une étude monocentrique utilisant uniquement les cas du CHRU de Tours aurait réduit notre effectif de moitié. Les résultats de cette étude devraient être validés sur une seconde cohorte indépendante développée sur un autre bassin de population. Plusieurs pistes sont actuellement à l'étude. Une demande a été déposée au près du groupe de relecture TENPATH dont l'une des indications de relecture est « tumeurs neuroendocrines de site rare ou inhabituel ou de primitif inconnu ». Une collaboration avec un autre site

indépendant, n'incluant pas ses cas de carcinomes neuroendocrines dans la cohorte, permettrait également une validation des critères ELECTHiV.

De nouveaux marqueurs de CCM ont été récemment décrits. Ainsi, l'expression de SATB2 (Special AT-rich sequence-binding protein 2) (77) a été montrée comme spécifique du CCM en comparaison avec 37 tumeurs cutanées, 10 tumeurs neuroendocrines bien différenciées et de 4 carcinomes à petites cellules du poumon. Nous aimerions tester les performances de ce marqueur sur notre cohorte de CCM (ganglionnaires sans primitif et tumeurs cutanées) en comparaison avec une large cohorte de carcinomes neuroendocrines de sites divers. Cette seconde cohorte est à ce jour en cours de constitution. Le développement de nouveaux marqueurs présente un intérêt notamment dans les cas de diagnostics difficiles avec un phénotype incomplet.

La seconde partie de notre travail s'est intéressée à la physiopathologie des CCM ganglionnaires sans primitif et semble indiquer que cette lésion est un processus métastatique associé à une réponse immune efficace pouvant expliquer la régression du primitif cutané. Dans l'hypothèse où la régression spontanée serait associée à un taux d'apoptose élevé (38,78), l'utilisation de la méthode TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling) avait initialement été envisagée dans le but de mettre en évidence des points de cassures de l'ADN (79) et finalement de souligner les cellules en apoptose. A ce jour, des difficultés ont été rencontrées au cours de la mise au point de cette technique notamment liées aux différences de fixations entre les différents échantillons et les premiers essais ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

Une seconde hypothèse serait que les CCM ganglionnaires sans primitif cutané dérivent d'implants épithéliaux bénins qui auraient subi une transformation secondairement dans le

ganglion. L'étude de ganglions inguinaux sains à la recherche d'implants épithéliaux a également été envisagée. Les implants épithéliaux au sein du tissu ganglionnaire sont observés au niveau de l'appareil digestif et dans la région cervicale (implants thyroïdien). Dans les aires de drainage cutanées, on observe parfois des naevi sous capsulaires ganglionnaires (80) alors que les observations d'implants kératinocytaires sont tout à fait exceptionnelles (81). Une étude immunohistochimique avec un anticorps antipancytokératine aurait pu être réalisée sur des coupes sériées de ganglions d'aires de drainage cutanées de sujets indemnes de carcinomes. Cependant certaines cellules de soutien ganglionnaires, les cellules réticulaires, expriment les cytokératines (82). De plus ces études immunohistochimiques sur coupes sériées sont réalisées en routine dans le cadre de la technique de ganglion sentinelle pour les cancers du sein et les épidermoïdes vulvaires sans qu'il n'ait jamais été décelé d'implants épithéliaux bénins.

Notre étude a mis en évidence pour la première fois l'implication du facteur de transcription Zeb1 dans la biologie des CCM. Comme discuté dans le second projet, Zeb1 est un des régulateurs majeurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, impliqué dans différents mécanismes d'agressivité tumorale (résistance à la chimiothérapie, processus de dé/transdifférenciation) (67). Ces mécanismes sont fréquemment observés dans les CCM.

Dans les carcinomes à petites cellules du poumon (73), la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que la dédifférenciation (acquisition d'un phénotype « stem cell like ») sont étroitement liées à l'inhibition de la voie Notch. Cette voie est également inhibée au cours de la différenciation en cellules de Merkel et dans les CCM (83) et constitue l'un des objets de nos futurs travaux qui porteront sur la question de l'histogénèse des CCM. En effet, bien que l'origine kératinocytaire des CCM soit probable, elle n'a pas encore été prouvée

chez l'homme. De plus les relations entre les oncoprotéines virales et le phénotype des CCM doivent être clarifiées. En effet deux hypothèses peuvent être formulées :

- 1) Le MCPyV s'intègre préférentiellement dans une cellule ayant déjà acquis le phénotype de CCM.
- 2) L'intégration du MCPyV dans une cellule kératinocytaire provoque l'acquisition d'un phénotype CCM.

Afin d'évaluer cette seconde hypothèse, nos travaux doivent évaluer les potentielles interactions entre les protéines virales et les facteurs aboutissant à l'acquisition d'un phénotype « CCM like » (ATOH1 et inhibition de la voie Notch). Ceci sera réalisé en utilisant une double approche : étude d'interactomique et étude phénotypique après transfection de gènes d'intérêt dans des cultures primaires de kératinocytes. Dans ce contexte, après avoir mis en place les outils nécessaires, l'étude de l'impact de Zeb1 sur le phénotype ainsi que celle de ces interactions avec la voie Notch et les oncoprotéines virales semblent constituer une piste prometteuse.

L'ensemble des travaux visant à répondre à la question de l'histogénèse des CCM seront réalisés dans le cadre d'une thèse de sciences en cotutelle franco-allemande. Ce projet a été élaboré au cours de l'année précédente, entre notre équipe et l'équipe de recherche du service de Dermatologie de l'hôpital universitaire de Würzburg (Allemagne) dirigée par les Drs R. Houben et D. Schrama. Dans ce cadre, j'ai récemment obtenu un financement de deux ans par la fondation ARC (bourse doctorale - aide individuelle 2017) me permettant de me consacrer pour les deux prochaines années à ma thèse d'université et de travailler successivement au sein de l'équipe du Dr Houben (novembre 2017-novembre 2018) puis de mon équipe d'origine (novembre 2018-novembre 2019).



Pour conclure, notre premier travail avait pour but d'établir des critères diagnostiques de CCM ganglionnaires utilisables en pratique courante. Devant une localisation ganglionnaire isolée, les 7 critères ELECTHiV permettent de distinguer les CCM des autres carcinomes neuroendocrines. Ces critères doivent maintenant être validés sur une seconde cohorte indépendante. Au plan physiopathologique, nos résultats semblent indiquer que le CCM ganglionnaires sans primitif correspond à un processus métastatique associé à une réponse immunitaire efficace. Cette seconde étude met également en évidence l'expression fréquente du facteur de transcription Zeb1 dont l'impact sur le phénotype tumoral doit maintenant être étudié.

## VIII. Références

1. Halata Z, Grim M, Bauman KI. Friedrich Sigmund Merkel and his « Merkel cell », morphology, development, and physiology: review and new results. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* mars 2003;271(1):225-39.
2. Moll I, Lane AT, Franke WW, Moll R. Intraepidermal formation of Merkel cells in xenografts of human fetal skin. *J Invest Dermatol.* mars 1990;94(3):359-64.
3. Szeder V, Grim M, Halata Z, Sieber-Blum M. Neural crest origin of mammalian Merkel cells. *Dev Biol.* 15 janv 2003;253(2):258-63.
4. Van Keymeulen A, Mascré G, Youseff KK, Harel I, Michaux C, De Geest N, et al. Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *J Cell Biol.* 5 oct 2009;187(1):91-100.
5. Toker C. Trabecular carcinoma of the skin. *Arch Dermatol.* janv 1972;105(1):107-10.
6. Tang CK, Toker C. Trabecular carcinoma of the skin: an ultrastructural study. *Cancer.* nov 1978;42(5):2311-21.
7. LeBoit PE, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. *Pathology and genetics of skin tumours: [... reflects the views of a working group that convened for an editorial and consensus conference in Lyon, France, September 22 - 25, 2003].*
8. Gambichler T, Mohtezabsade S, Wieland U, Silling S, Höh A-K, Dreißigacker M, et al. Prognostic relevance of high atonal homolog-1 expression in Merkel cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 13 sept 2016;143(1):43-49.
9. Verhaegen ME, Mangelberger D, Harms PW, Eberl M, Wilbert DM, Meireles J, et al. Merkel Cell Polyomavirus Small T Antigen Initiates Merkel Cell Carcinoma-like Tumor Development in Mice. *Cancer Res.* 15 juin 2017;77(12):3151-7.
10. Fitzgerald TL, Dennis S, Kachare SD, Vohra NA, Wong JH, Zervos EE. Dramatic Increase in the Incidence and Mortality from Merkel Cell Carcinoma in the United States. *Am Surg.* août 2015;81(8):802-6.
11. Reichgelt BA, Visser O. Epidemiology and survival of Merkel cell carcinoma in the Netherlands. A population-based study of 808 cases in 1993-2007. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. mars 2011;47(4):579-85.
12. Lemos BD, Storer BE, Iyer JG, Phillips JL, Bichakjian CK, Fang LC, et al. Pathologic nodal evaluation improves prognostic accuracy in Merkel cell carcinoma: analysis of 5823 cases as the basis of the first consensus staging system. *J Am Acad Dermatol.* nov 2010;63(5):751-61.
13. Asgari MM, Sokil MM, Warton EM, Iyer J, Paulson KG, Nghiem P. Effect of host, tumor, diagnostic, and treatment variables on outcomes in a large cohort with Merkel cell carcinoma. *JAMA Dermatol.* juill 2014;150(7):716-23.
14. Heath M, Jaimes N, Lemos B, Mostaghimi A, Wang LC, Peñas PF, et al. Clinical characteristics of Merkel cell carcinoma at diagnosis in 195 patients: the AEIOU features. *J Am Acad Dermatol.* mars 2008;58(3):375-81.
15. Boccara O, Girard C, Mortier L, Bens G, Saiag P, Guillot B, et al. [Guidelines for the diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma]. *Ann Dermatol Venereol.* juill 2011;138(6-7):475-82.
16. Boccara O, Girard C, Mortier L, Bens G, Saiag P, Guillot B, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of Merkel cell carcinoma - Cutaneous Oncology Group of the French Society of Dermatology. *Eur J Dermatol EJD.* juin 2012;22(3):375-9.
17. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* oct 2016;17(10):1374-85.

18. Pilotti S, Rilke F, Bartoli C, Grisotti A. Clinicopathologic correlations of cutaneous neuroendocrine Merkel cell carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. déc 1988;6(12):1863-73.
19. Iwasaki T, Matsushita M, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Higaki-Mori H, et al. Usefulness of significant morphologic characteristics in distinguishing between Merkel cell polyomavirus-positive and Merkel cell polyomavirus-negative Merkel cell carcinomas. *Hum Pathol*. sept 2013;44(9):1912-7.
20. Busam KJ, Jungbluth AA, Reckthman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, et al. Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol*. sept 2009;33(9):1378-85.
21. Miraflor AP, LeBoit PE, Hirschman SA. Intraepidermal Merkel cell carcinoma with pagetoid Bowen's disease. *J Cutan Pathol*. nov 2016;43(11):921-6.
22. Narisawa Y, Koba S, Inoue T, Nagase K. Histogenesis of pure and combined Merkel cell carcinomas: An immunohistochemical study of 14 cases. *J Dermatol*. mai 2015;42(5):445-52.
23. Rajagopalan A, Browning D, Salama S. CD99 expression in Merkel cell carcinoma: a case series with an unusual paranuclear dot-like staining pattern. *J Cutan Pathol*. janv 2013;40(1):19-24.
24. Zur Hausen A, Rennspiess D, Winnepeninckx V, Speel E-J, Kurz AK. Early B-cell differentiation in Merkel cell carcinomas: clues to cellular ancestry. *Cancer Res*. 15 août 2013;73(16):4982-7.
25. Cheuk W, Kwan MY, Suster S, Chan JK. Immunostaining for thyroid transcription factor 1 and cytokeratin 20 aids the distinction of small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma, but not pulmonary from extrapulmonary small cell carcinomas. *Arch Pathol Lab Med*. févr 2001;125(2):228-31.
26. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 22 févr 2008;319(5866):1096-100.
27. Liu W, Yang R, Payne AS, Schowalter RM, Spurgeon ME, Lambert PF, et al. Identifying the Target Cells and Mechanisms of Merkel Cell Polyomavirus Infection. *Cell Host Microbe*. 8 juin 2016;19(6):775-87.
28. Martel-Jantin C, Pedergrana V, Nicol JTJ, Leblond V, Trégouët D-A, Tortevoe P, et al. Merkel cell polyomavirus infection occurs during early childhood and is transmitted between siblings. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol*. sept 2013;58(1):288-91.
29. Nicol JTJ, Robinot R, Carpentier A, Carandina G, Mazzoni E, Tognon M, et al. Age-specific seroprevalences of merkel cell polyomavirus, human polyomaviruses 6, 7, and 9, and trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus. *Clin Vaccine Immunol CVI*. mars 2013;20(3):363-8.
30. Houben R, Adam C, Baeurle A, Hesbacher S, Grimm J, Angermeyer S, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *Int J Cancer*. 15 févr 2012;130(4):847-56.
31. Moshiri AS, Doumani R, Yelistratova L, Blom A, Lachance K, Shinohara MM, et al. Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma: A More Aggressive Subtype Based on Analysis of 282 Cases Using Multimodal Tumor Virus Detection. *J Invest Dermatol*. 1 nov 2016;137(4):819-827.
32. Rollison DE, Giuliano AR, Messina JL, Fenske NA, Cherpelis BS, Sondak VK, et al. Case-control study of Merkel cell polyomavirus infection and cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. janv 2012;21(1):74-81.
33. Sastre-Garau X, Peter M, Avril M-F, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, et al. Merkel

cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol.* mai 2009;218(1):48–56.

34. Iyer JG, Afanasiev OK, McClurkan C, Paulson K, Nagase K, Jing L, et al. Merkel cell polyomavirus-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cell responses identified in Merkel cell carcinomas and blood. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2011;17(21):6671–80.

35. Paulson KG, Iyer JG, Simonson WT, Blom A, Thibodeau RM, Schmidt M, et al. CD8<sup>+</sup> lymphocyte intratumoral infiltration as a stage-independent predictor of Merkel cell carcinoma survival: a population-based study. *Am J Clin Pathol.* oct 2014;142(4):452–8.

36. Paulson KG, Iyer JG, Tegeder AR, Thibodeau R, Schelter J, Koba S, et al. Transcriptome-wide studies of merkel cell carcinoma and validation of intratumoral CD8<sup>+</sup> lymphocyte invasion as an independent predictor of survival. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 avr 2011;29(12):1539–46.

37. Sihto H, Böhling T, Kavola H, Koljonen V, Salmi M, Jalkanen S, et al. Tumor infiltrating immune cells and outcome of Merkel cell carcinoma: a population-based study. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 mai 2012;18(10):2872–81.

38. Inoue T, Yoneda K, Manabe M, Demitsu T. Spontaneous regression of merkel cell carcinoma: a comparative study of TUNEL index and tumor-infiltrating lymphocytes between spontaneous regression and non-regression group. *J Dermatol Sci.* déc 2000;24(3):203–11.

39. Paulson KG, Tegeder A, Willmes C, Iyer JG, Afanasiev OK, Schrama D, et al. Downregulation of MHC-I expression is prevalent but reversible in Merkel cell carcinoma. *Cancer Immunol Res.* nov 2014;2(11):1071–9.

40. Afanasiev OK, Yelistratova L, Miller N, Nagase K, Paulson K, Iyer JG, et al. Merkel polyomavirus-specific T cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 oct 2013;19(19):5351–60.

41. Afanasiev OK, Nagase K, Simonson W, Vandeven N, Blom A, Koelle DM, et al. Vascular E-selectin expression correlates with CD8 lymphocyte infiltration and improved outcome in Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* août 2013;133(8):2065–73.

42. Touzé A, Le Bidre E, Laude H, Fleury MJJ, Cazal R, Arnold F, et al. High levels of antibodies against merkel cell polyomavirus identify a subset of patients with merkel cell carcinoma with better clinical outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 avr 2011;29(12):1612–9.

43. Samimi M, Molet L, Fleury M, Laude H, Carlotti A, Gardair C, et al. Prognostic value of antibodies to Merkel cell polyomavirus T antigens and VP1 protein in patients with Merkel cell carcinoma. *Br J Dermatol.* avr 2016;174(4):813–22.

44. Samimi M, Touzé A, Laude H, Le Bidre E, Arnold F, Carpentier A, et al. Vitamin D deficiency is associated with greater tumor size and poorer outcome in Merkel cell carcinoma patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* mars 2014;28(3):298–308.

45. Gardair C, Samimi M, Touzé A, Coursaget P, Lorette G, Caille A, et al. Somatostatin Receptors 2A and 5 Are Expressed in Merkel Cell Carcinoma with No Association with Disease Severity. *Neuroendocrinology.* 2015;101(3):223–35.

46. Zaragoza J, Kervarrec T, Touzé A, Avenel-Audran M, Beneton N, Esteve E, et al. A high neutrophil-to-lymphocyte ratio as a potential marker of mortality in patients with Merkel cell carcinoma: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol.* oct 2016;75(4):712–721.e1.

47. Kuwamoto S. Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* août 2011;42(8):1063–77.

48. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernández-Figueras M-T, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer J Int Cancer.* 15 sept 2009;125(6):1243–9.

49. Fields RC, Busam KJ, Chou JF, Panageas KS, Pulitzer MP, Allen PJ, et al. Five hundred patients with Merkel cell carcinoma evaluated at a single institution. *Ann Surg.* sept 2011;254(3):465-473; discussion 473-475.
50. Kotteas EA, Pavlidis N. Neuroendocrine Merkel cell nodal carcinoma of unknown primary site: management and outcomes of a rare entity. *Crit Rev Oncol Hematol.* avr 2015;94(1):116-121.
51. Haymerle G, Fochtmann A, Kunstfeld R, Pammer J, Erovic BM. Management of Merkel cell carcinoma of unknown primary origin: the Vienna Medical School experience. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol Off J Eur Fed Oto-Rhino-Laryngol Soc EUFOS Affil Ger Soc Oto-Rhino-Laryngol - Head Neck Surg.* févr 2015;272(2):425-439.
52. Deneve JL, Messina JL, Marzban SS, Gonzalez RJ, Walls BM, Fisher KJ, et al. Merkel cell carcinoma of unknown primary origin. *Ann Surg Oncol.* juill 2012;19(7):2360-2366.
53. Chan JK, Suster S, Wenig BM, Tsang WY, Chan JB, Lau AL. Cytokeratin 20 immunoreactivity distinguishes Merkel cell (primary cutaneous neuroendocrine) carcinomas and salivary gland small cell carcinomas from small cell carcinomas of various sites. *Am J Surg Pathol.* févr 1997;21(2):226-234.
54. Bobos M, Hytioglou P, Kostopoulos I, Karkavelas G, Papadimitriou CS. Immunohistochemical distinction between merkel cell carcinoma and small cell carcinoma of the lung. *Am J Dermatopathol.* avr 2006;28(2):99-104.
55. de Biase D, Ragazzi M, Asioli S, Eusebi V. Extracutaneous Merkel cell carcinomas harbor polyomavirus DNA. *Hum Pathol.* juill 2012;43(7):980-985.
56. Pan Z, Chen Y-Y, Wu X, Trisal V, Wilczynski SP, Weiss LM, et al. Merkel cell carcinoma of lymph node with unknown primary has a significantly lower association with Merkel cell polyomavirus than its cutaneous counterpart. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* sept 2014;27(9):1182-1192.
57. Travis WD, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart: [... reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer, Lyon, April 24 - 26, 2014].
58. Bosman FT, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, éditeurs. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 417 p. (World Health Organization classification of tumours).
59. DeLellis RA, éditeur. Pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC Press; 2004. 320 p. (World Health Organization classification of tumours).
60. Rodig SJ, Cheng J, Wardzala J, DoRosario A, Scanlon JJ, Laga AC, et al. Improved detection suggests all Merkel cell carcinomas harbor Merkel polyomavirus. *J Clin Invest.* déc 2012;122(12):4645-4653.
61. Zaar O, Gillstedt M, Lindelöf B, Wennberg-Larkö A-M, Paoli J. Merkel cell carcinoma incidence is increasing in Sweden. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* 2 mai 2016;30(10):1708-1713.
62. Dore GM, Qubaiah O, Mody A, Ghabach B, Devesa SS. A population-based study of incidence and patient survival of small cell carcinoma in the United States, 1992-2010. *BMC Cancer.* 2015;15:185.
63. Ordóñez NG. Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in distinguishing small cell lung carcinomas from other small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol.* sept 2000;24(9):1217-1223.
64. Reddi DM, Puri PK. Expression of focal TTF-1 expression in a case of CK7/CK20-positive Merkel cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 1 avr 2013;40(4):431-433.
65. Andres C, Ihrler S, Puchta U, Flaig MJ. Merkel cell polyomavirus is prevalent in a

- subset of small cell lung cancer: a study of 31 patients. *Thorax*. nov 2009;64(11):1007-8.
66. Walsh NM. Complete spontaneous regression of Merkel cell carcinoma (1986-2016): a 30 year perspective. *J Cutan Pathol*. déc 2016;43(12):1150-4.
  67. Zhang P, Sun Y, Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle Georget Tex*. 2015;14(4):481-7.
  68. De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer*. févr 2013;13(2):97-110.
  69. Pang C, Sharma D, Sankar T. Spontaneous regression of Merkel cell carcinoma: A case report and review of the literature. *Int J Surg Case Rep*. 2015;7C:104-8.
  70. Figiel S, Vasseur C, Bruyere F, Rozet F, Maheo K, Fromont G. Clinical significance of epithelial-mesenchymal transition markers in prostate cancer. *Hum Pathol*. mars 2017;61:26-32.
  71. Harms KL, Healy MA, Nghiem P, Sober AJ, Johnson TM, Bichakjian CK, et al. Analysis of Prognostic Factors from 9387 Merkel Cell Carcinoma Cases Forms the Basis for the New 8th Edition AJCC Staging System. *Ann Surg Oncol*. oct 2016;23(11):3564-71.
  72. Meredith SL, Bryant JL, Babur M, Riddell PW, Behrouzi R, Williams KJ, et al. Irradiation Decreases the Neuroendocrine Biomarker Pro-Opiomelanocortin in Small Cell Lung Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PloS One*. 2016;11(2):e0148404.
  73. Krohn A, Ahrens T, Yalcin A, Plönes T, Wehrle J, Taromi S, et al. Tumor cell heterogeneity in Small Cell Lung Cancer (SCLC): phenotypical and functional differences associated with Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and DNA methylation changes. *PloS One*. 2014;9(6):e100249.
  74. Goscinski MA, Xu R, Zhou F, Wang J, Yang H, Huang R, et al. Nuclear, cytoplasmic, and stromal expression of ZEB1 in squamous and small cell carcinoma of the esophagus. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. déc 2015;123(12):1040-7.
  75. Arumugam T, Ramachandran V, Fournier KF, Wang H, Marquis L, Abbruzzese JL, et al. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 15 juill 2009;69(14):5820-8.
  76. Gonne E, Collignon J, Jerusalem G, Gennigens C. [Carcinoma of unknown primary : a not so rare entity]. *Rev Med Liege*. oct 2016;71(10):449-54.
  77. Fukuhara M, Agnarsdóttir M, Edqvist P-H, Coter A, Ponten F. SATB2 is expressed in Merkel cell carcinoma. *Arch Dermatol Res*. août 2016;308(6):449-54.
  78. Mori Y, Hashimoto K, Tanaka K, Cui CY, Mehregan DR, Stiff MA. A study of apoptosis in Merkel cell carcinoma: an immunohistochemical, ultrastructural, DNA ladder, and TUNEL labeling study. *Am J Dermatopathol*. févr 2001;23(1):16-23.
  79. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods San Diego Calif*. mars 2008;44(3):250-4.
  80. Ribero S, Longo C, Specchio F, Piana S, Castagnetti F, Moscarella E, et al. Lymph nodes' capsular naevi are associated with high naevus count in melanoma patients: a case-control study. *Melanoma Res*. juin 2017;27(3):274-6.
  81. Haroon S, Faridi N, Fatima S. Squamous inclusion cyst in a sentinel axillary lymph node associated with breast malignancy. *J Coll Physicians Surg--Pak JCPSP*. janv 2012;22(1):50-2.
  82. Linden MD, Zarbo RJ. Cytokeratin immunostaining patterns of benign, reactive lymph nodes: applications for the evaluation of sentinel lymph node specimen. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM*. déc 2001;9(4):297-301.
  83. Abraham KJ, Zhang X, Vidal R, Paré GC, Feilotter HE, Tron VA. Roles for miR-375 in Neuroendocrine Differentiation and Tumor Suppression via Notch Pathway Suppression in Merkel Cell Carcinoma. *Am J Pathol*. avr 2016;186(4):1025-35.

**Vu, le Directeur de Thèse**

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







## **Kervarrec Thibault**

78 pages – 11 tableaux – 5 figures – 83 références

**Résumé :** Le carcinome à cellules de Merkel (CCM) est un cancer cutané rare. Dans 5 à 15 % des cas, le CCM apparaît sous la forme d'une tumeur ganglionnaire isolée sans primitif cutané retrouvé. L'absence de critères de définition validés de cette entité conduit parfois au diagnostic de carcinome neuroendocrine de primitif inconnu, entraînant ainsi une prise en charge inadaptée. De plus la physiopathologie de cette lésion, notamment sa nature métastatique ou primitivement ganglionnaire reste à préciser.

Dans un premier travail, les cas de CCM ganglionnaires sans primitif ainsi que ceux de métastases ganglionnaires de CCM cutanés ont été identifiés au sein d'une cohorte de CCM. Les données cliniques, morphologiques, immunohistochimiques et virologiques de ces deux populations ont été comparées avec celles de métastases ganglionnaires superficielles d'autres carcinomes neuroendocrines. Ce travail a permis d'identifier 7 critères permettant de distinguer l'ensemble des CCM des autres carcinomes neuroendocrines.

Au cours d'un second travail, la physiopathologie du CCM ganglionnaire sans primitif cutané a été explorée. L'expression du facteur de transcription Zeb1, impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse, a d'abord été validée comme marqueur du processus métastatique. Zeb1 était plus fréquemment observé dans les CCM ganglionnaires sans primitif et les métastases que dans les tumeurs cutanées primitives. De plus des densités plus élevées en lymphocytes CD8+ et cellules myéloïdes CD33+ étaient observées au sein des CCM ganglionnaires sans primitif. Ces résultats suggèrent que les CCM ganglionnaires sans primitif représentent un processus métastatique associé à une réponse immunitaire efficace, pouvant expliquer la régression du primitif cutané.

### **Mots clés :**

- Carcinome à cellules de Merkel
- Primitif ganglionnaire
- Transition épithélio-mésenchymateuse
- Infiltrat immun

### **Jury :**

Président du Jury :	Professeur Laurent Macher
Directeur de thèse :	Professeur Serge Guyétant
Membres du Jury :	Professeur Mahtab Samimi
	Docteur Janine Wechsler
	Docteur Marie Christine Machet

Date de soutenance : lundi 18 septembre 2017