

Bases cliniques, histologiques et moléculaires des mélanomes

Dr Elodie Long-Mira

LABORATOIRE DE PATHOLOGIE CLINIQUE ET EXPERIMENTALE
HÔPITAL PASTEUR – CHU de NICE



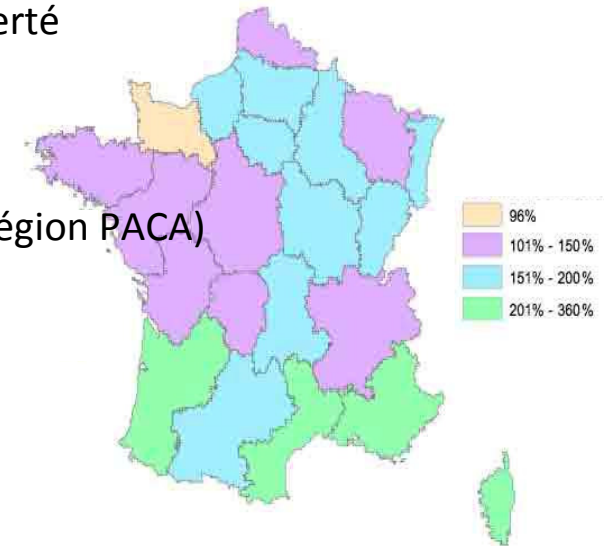
CHU de Nice

● ● ● Chapitres

- Aspects cliniques
- Aspects histologiques
- Oncogenèse
- Techniques de détection des anomalies moléculaires
- Conclusion
- Ce qu'il faut retenir

● ● ● Épidémiologie

- Problème de santé publique : 2,6 % des cancers incidents (13ème rang homme, 7ème rang femme)
- Affecte tous les âges, mais exceptionnel chez l'enfant avant la puberté
- Plus de 7 000 nouveaux cas/an
- Incidence double tous les 10 ans depuis 1945 (Forte incidence en région PACA)
- 1er cancer chez la femme entre 15 et 29 ans (25 % des cancers)
- 1er cancer chez l'homme entre 30 et 44 ans



● ● ● Formes métastatiques

- La forme la plus **agressive** et la plus **mortelle** de cancer de la peau
- **Espérance de vie**: courte
- **Survie à 1 an <1%** (si plus de 2 sites métastatique)
- Aucun progrès significatif n'a été réalisé → jusqu'à récemment
- Très **peu d'options thérapeutiques** depuis les 30 dernières années

● ● ● Facteurs de risques

- Expositions solaires de loisirs au cours de l'enfance
- UV artificiels
- Personnes à phototype clair → risque plus élevé
- Existence d'un mélanome augmente le risque de survenue d'un 2ème (risque X 10 par rapport à population générale)
- Mélanomes familiaux 5 à 10 % des cas :
 - Mutations des gènes CDKN2A, CDK4

● ● ● Diagnostic Clinique

La suspicion de mélanome est clinique
mais
le diagnostic de mélanome est histologique!

La règle ABCDE:

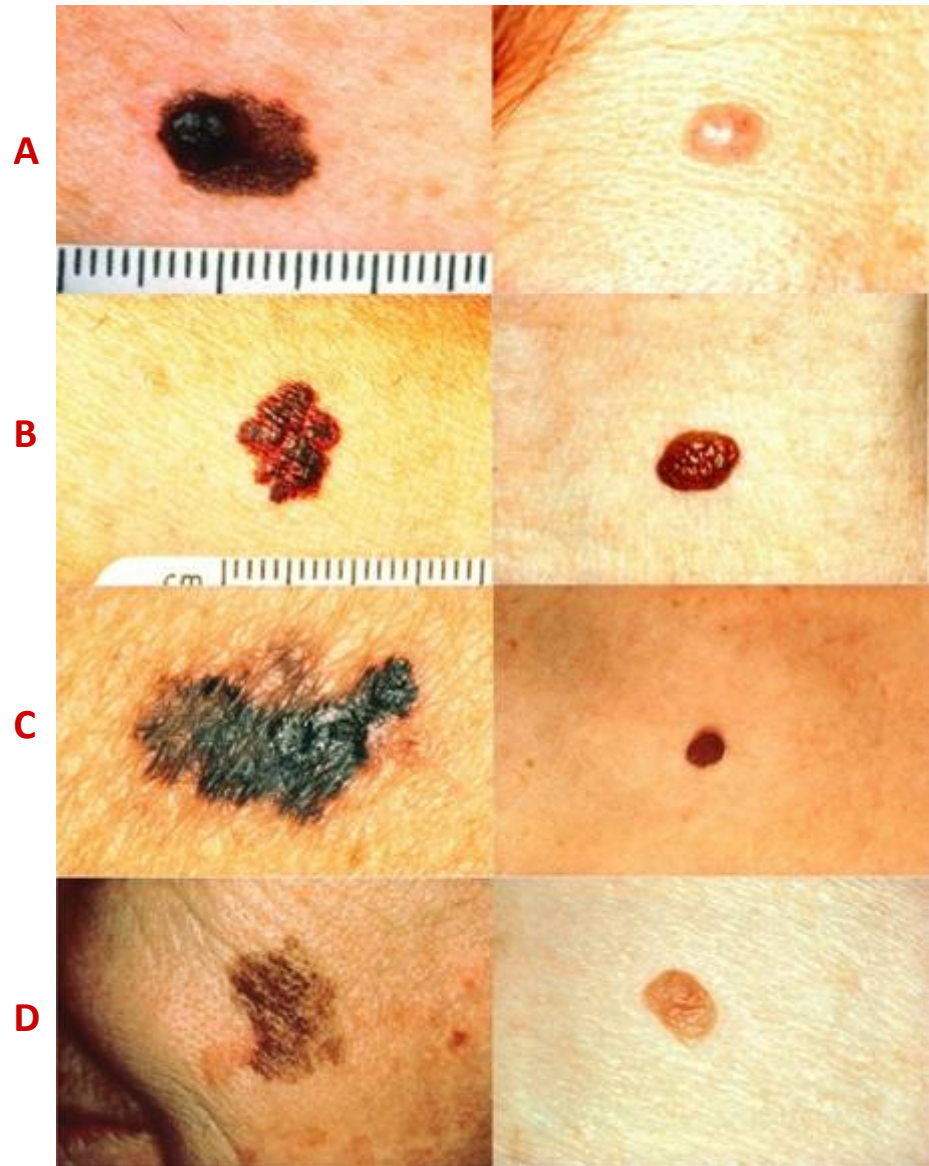
A : Asymétrique,

B : Bords irréguliers,

C : Coloration non homogène

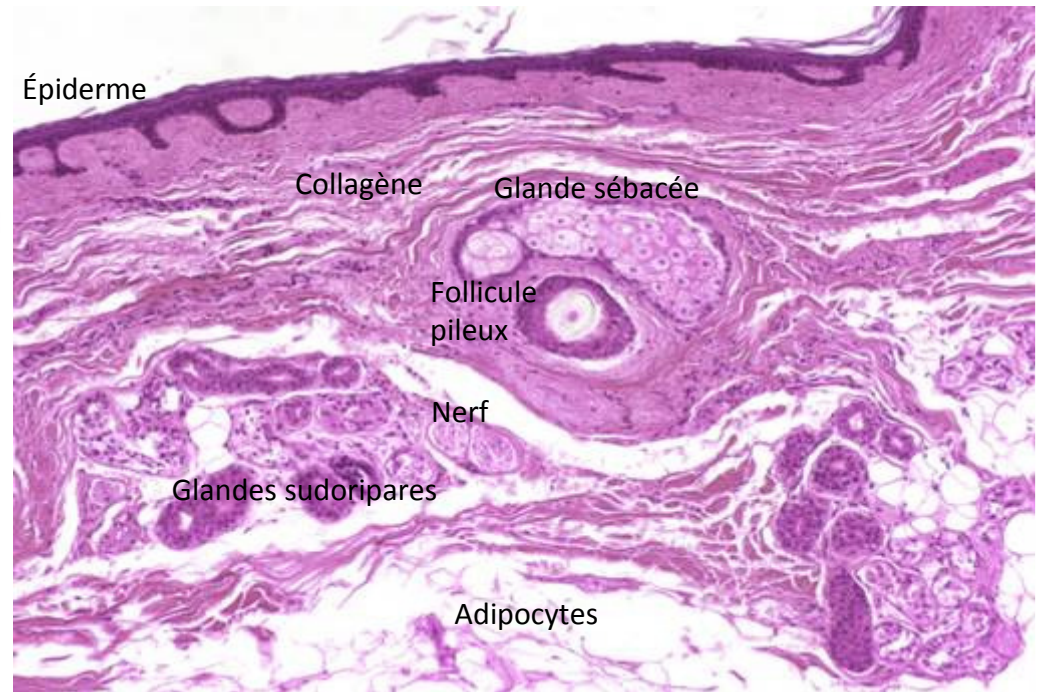
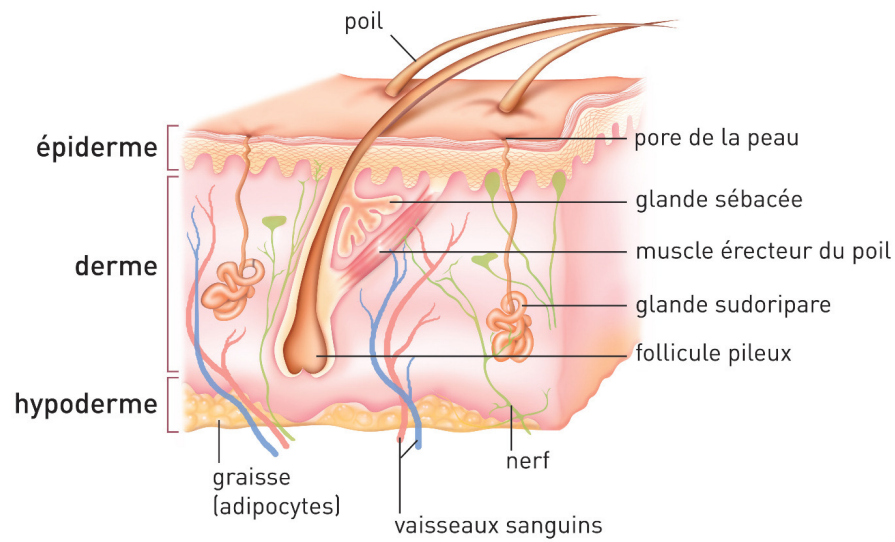
D : Diamètre important (> 6 mm)

E : Évolutif, dont l'aspect se modifie avec le temps



● ● ● **Mélanome = cancer de la peau**

La peau est constituée de trois couches: l'épiderme, le derme et l'hypoderme

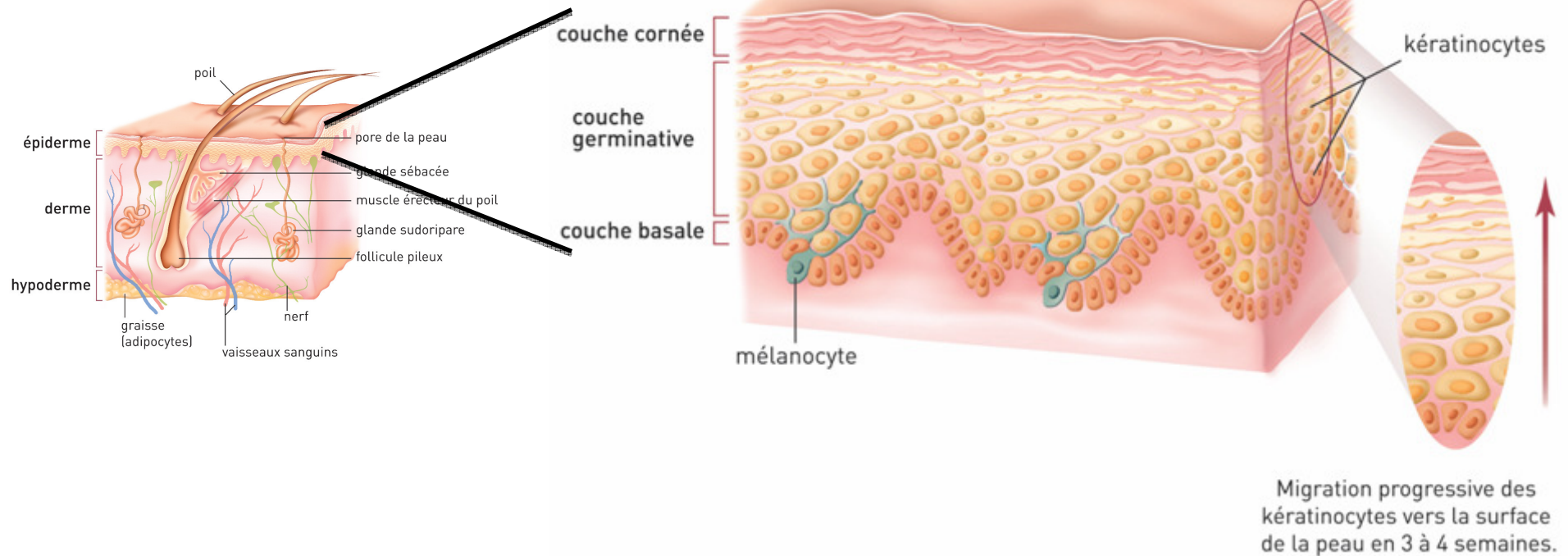


- ● ● **Mélanome = cancer de la peau développé à partir des mélanocytes**

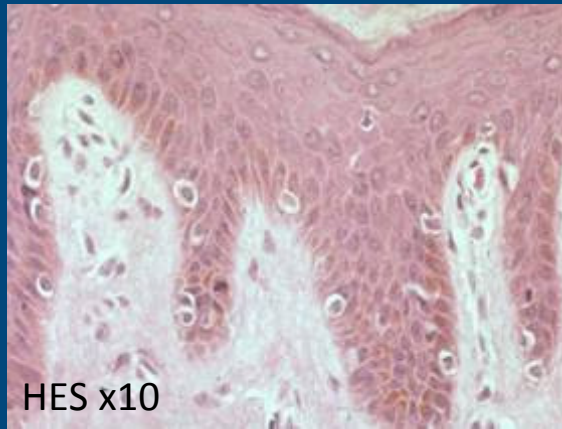
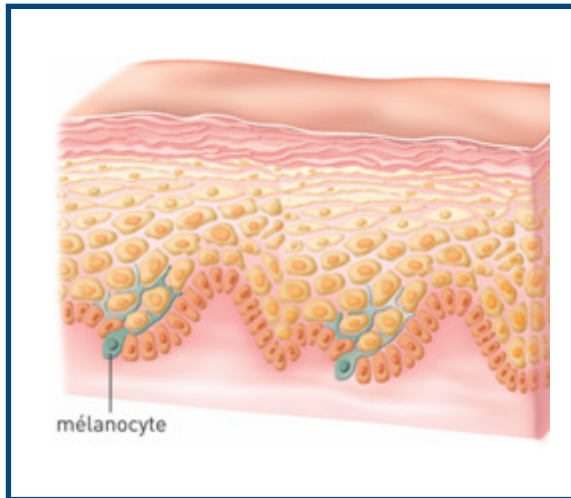
Épiderme

➤ Kératinocytes

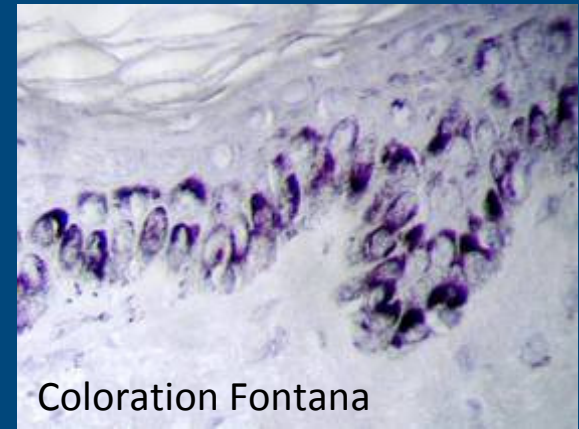
➤ Mélanocytes



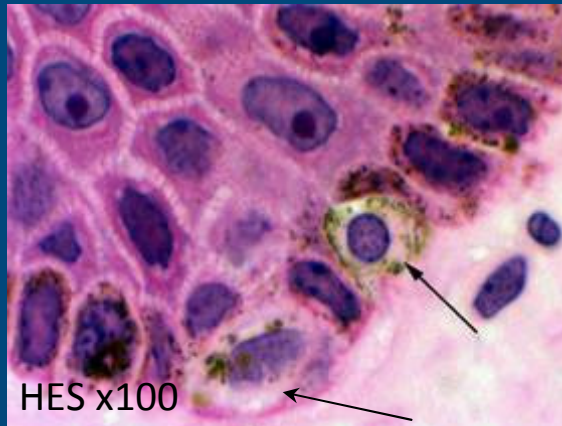
● ● ● Les mélanocytes normaux



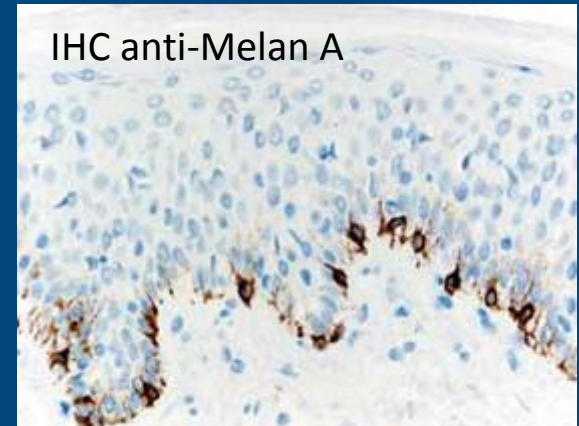
HES x10



Coloration Fontana

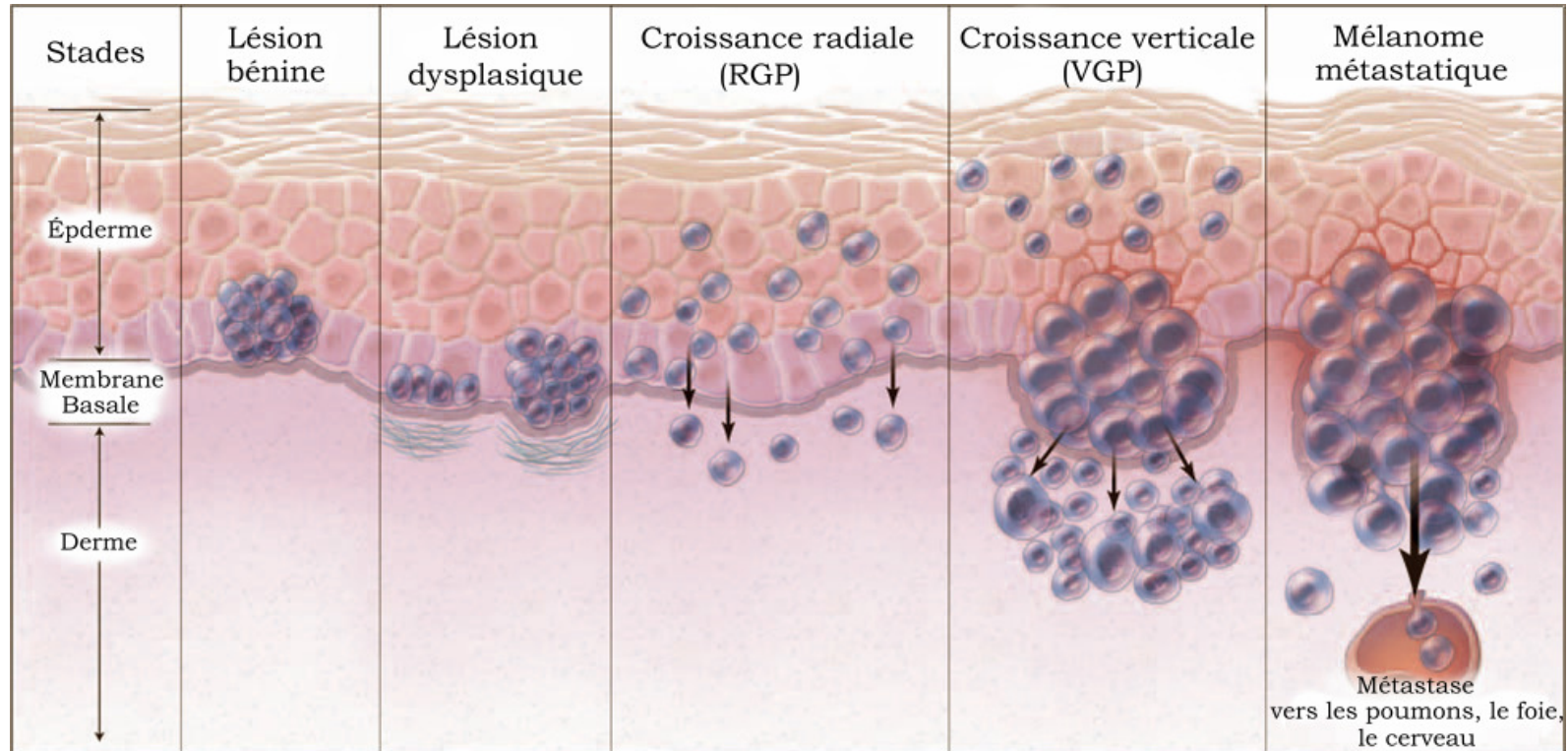


HES x100



IHC anti-Melan A

Progression du mélanome



● ● ● L'analyse histologique des mélanomes

➤ Permet de :

➤ Confirmer le diagnostic → critères cytologiques et architecturaux

➤ Déterminer l'**épaisseur** (Breslow) (Facteur de pronostic ++)

➤ Caractère ulcéré ou non (Facteur de pronostic)

➤ Présence de mitoses

➤ Déterminer le degré d'**invasion** de la peau (Classification de Clark)

➤ → définir le traitement complémentaire

● ● ● Mélanomes – critères pour le diagnostic (*ne pas retenir*)

A. Critères architecturaux (à faible grossissement)

Asymétrie de la lésion

Mauvaise délimitation latérale

Des thèques mélanocytaires épidermiques confluentes, variables en taille et forme, et disposées de façon désordonnée (« pontage »)

Prédominance de mélanocytes isolés intraépidermiques, d'extension pagétoïde, disposés de façon désorganisée,

Composante dermique invasive sans gradient de maturation

B. Critères cytologiques (à fort grossissement)

Pléomorphisme nucléaire (variabilité dans la taille du noyau)

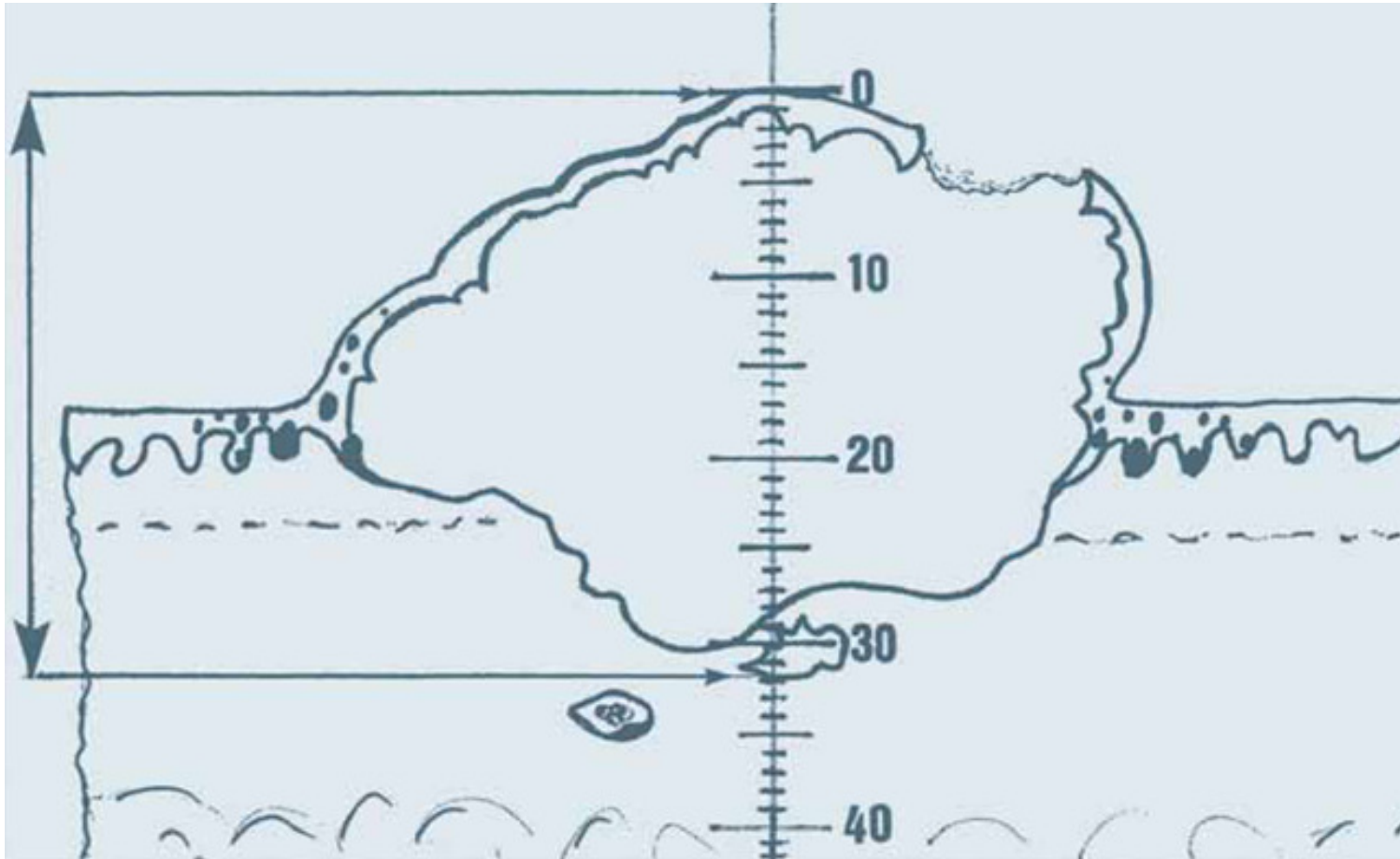
Nucléole proéminent

Mitoses atypiques

Pigment mélanique poussiéreux (verdâtre)

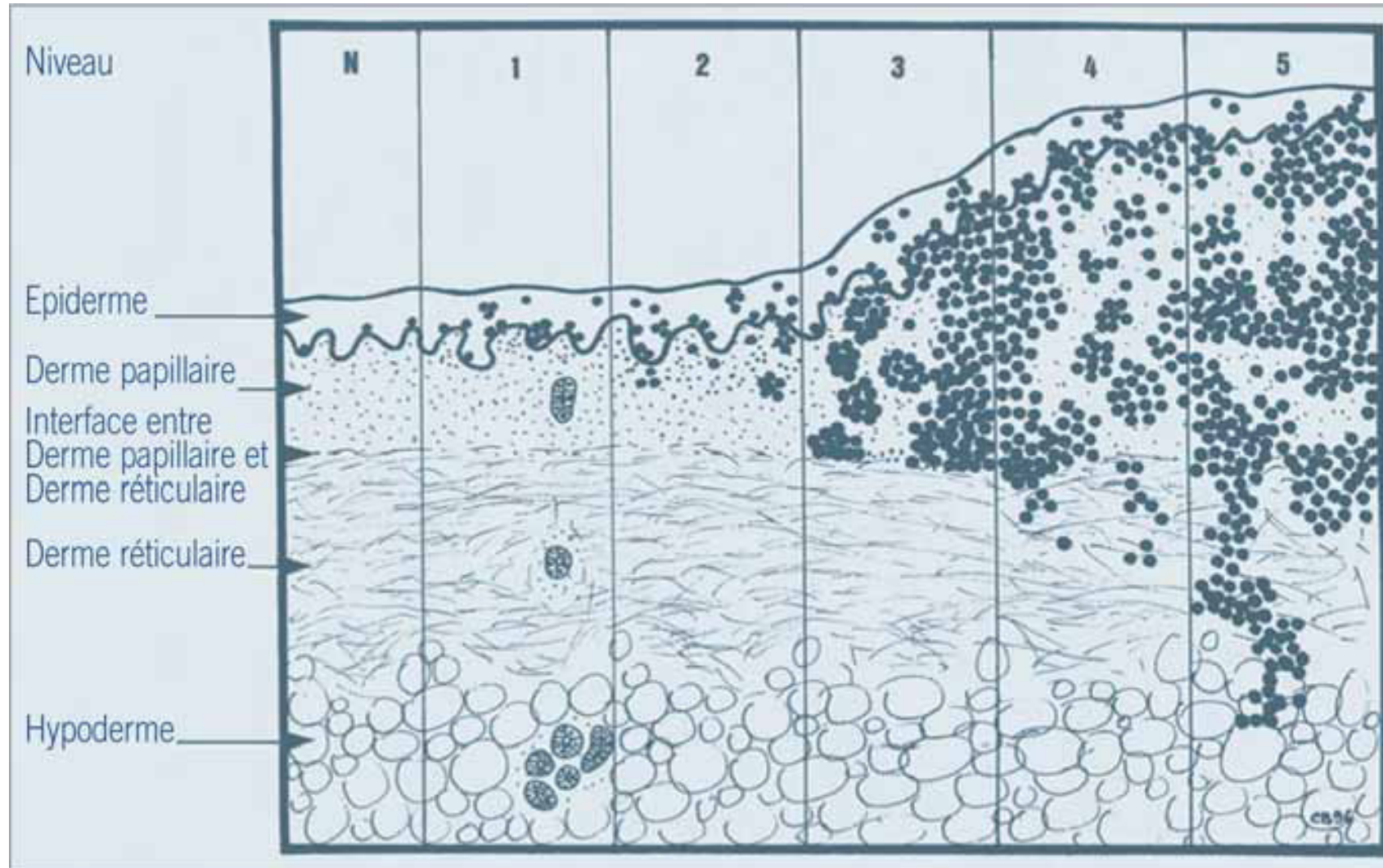
● ● ● **L'épaisseur – l'indice de Breslow ++**

Se mesure avec un micromètre oculaire



● ● ● Le degré d'invasion – Niveau de Clark

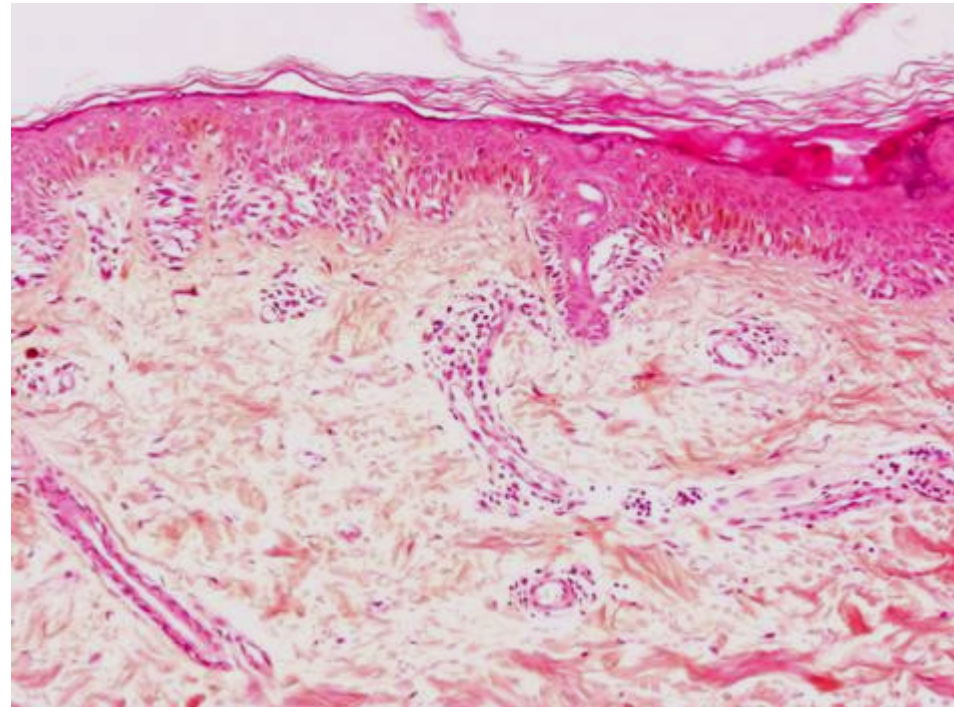
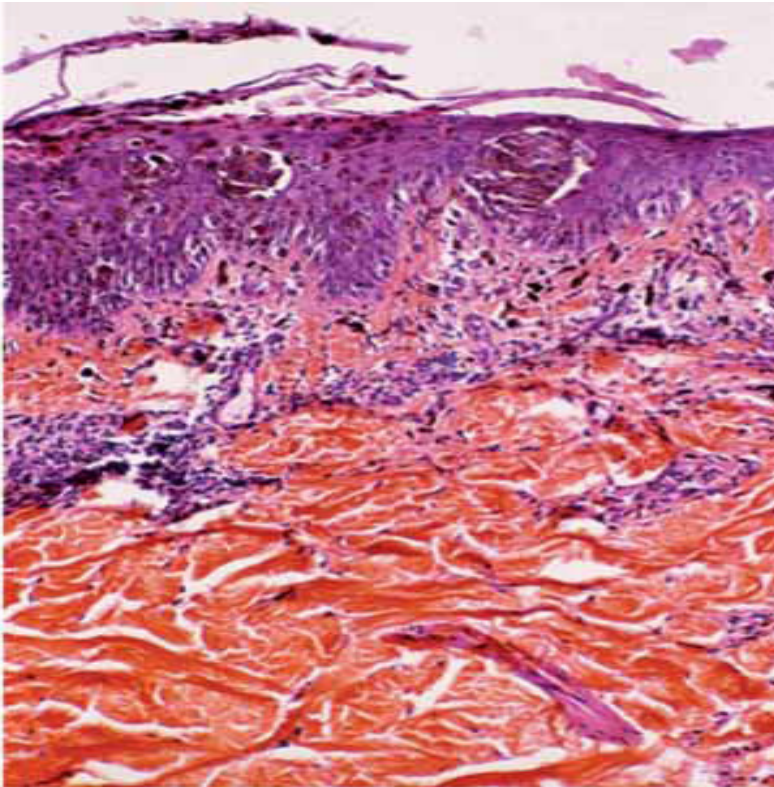
C'est-à-dire quelle structure est envahie en profondeur, indépendamment de l'épaisseur de la lésion.
Dépend des zones anatomique



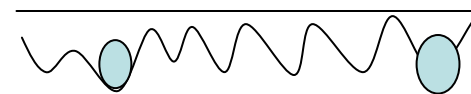
● ● ● Mélanomes – Formes anatomo-cliniques

Mélanome à extension superficielle (SSM)

Mélanocytes atypiques, isolés ou groupés en thèques
Toute la hauteur de l'épiderme
Migration intra-épidermique "pagétoïde"



Thèques: nids de cellules mélanocytaires situés en position basale



Epiderme

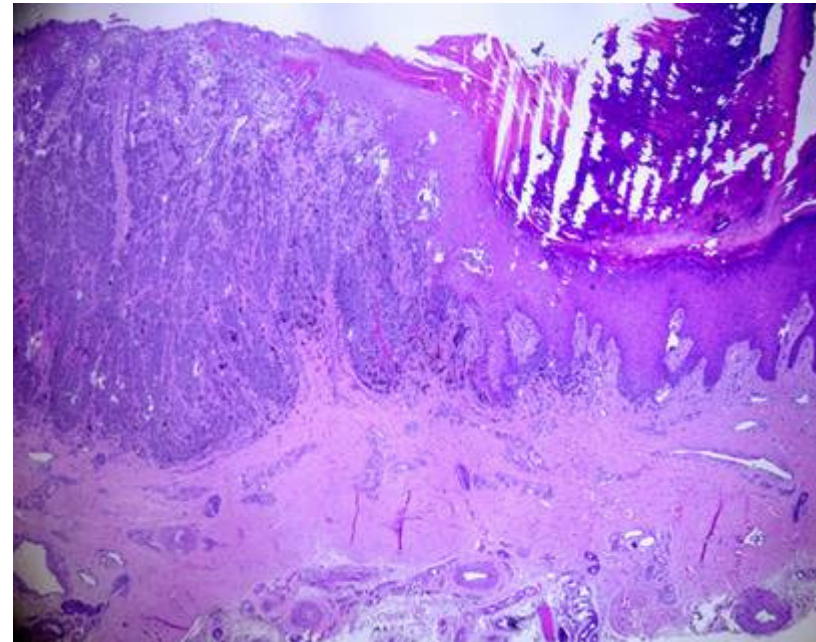
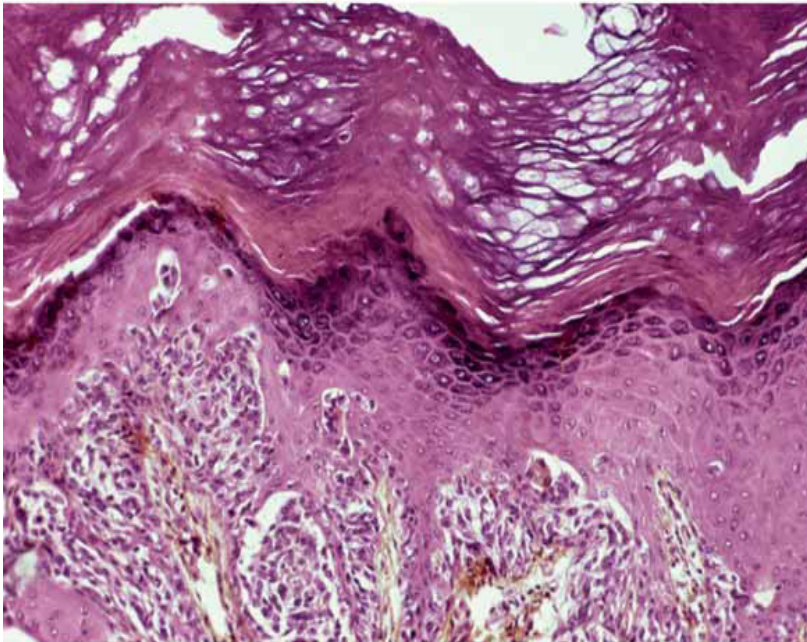
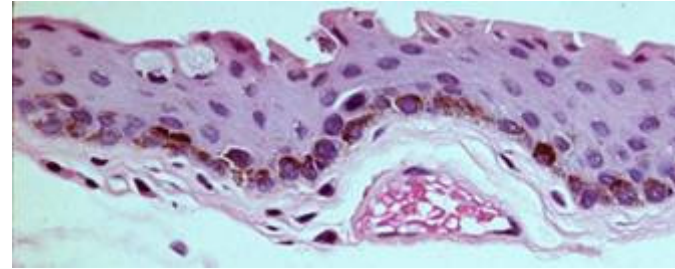
● ● ● Mélanomes – Formes anatomo-cliniques

Mélanome acral lentigineux (ALM)

Peau glabre

Aspect lentigineux : multiplication des mélanocytes dans l'épiderme, sous forme de cellules isolées le long de la basale

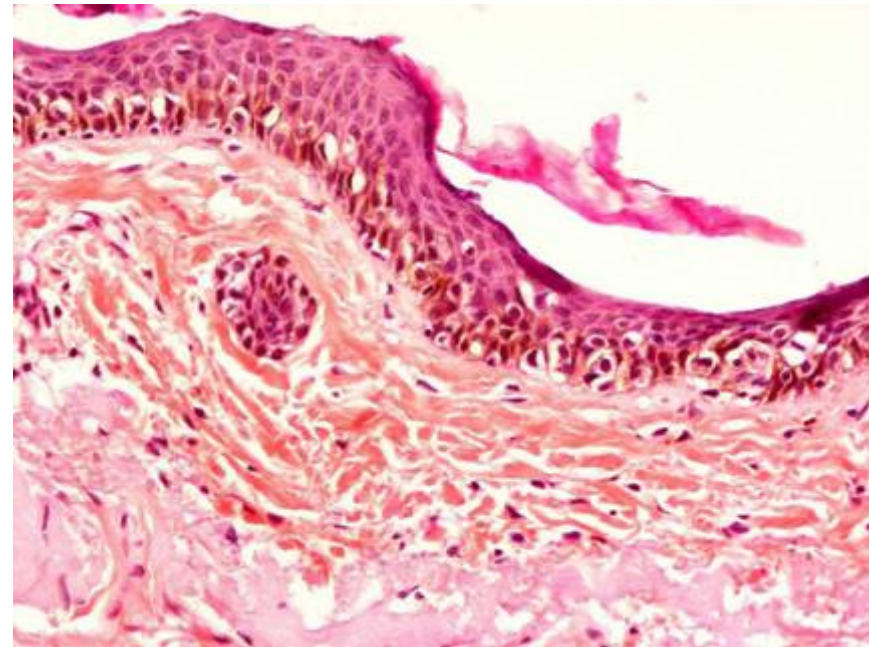
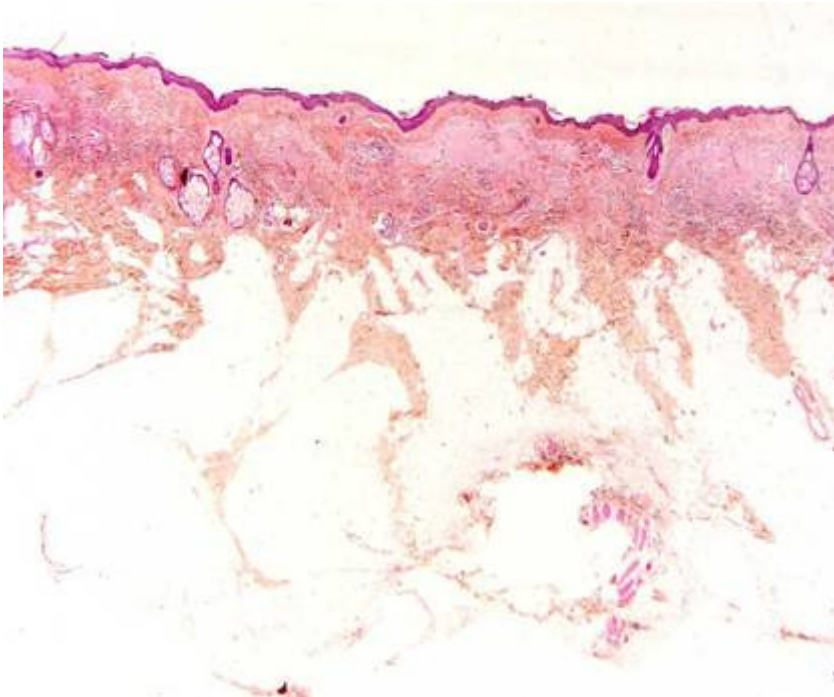
Aspect lentigineux



● ● ● **Mélanomes – Formes anatomo-cliniques**

Mélanome de Dubreuilh

Lésion d'élastose solaire marquée

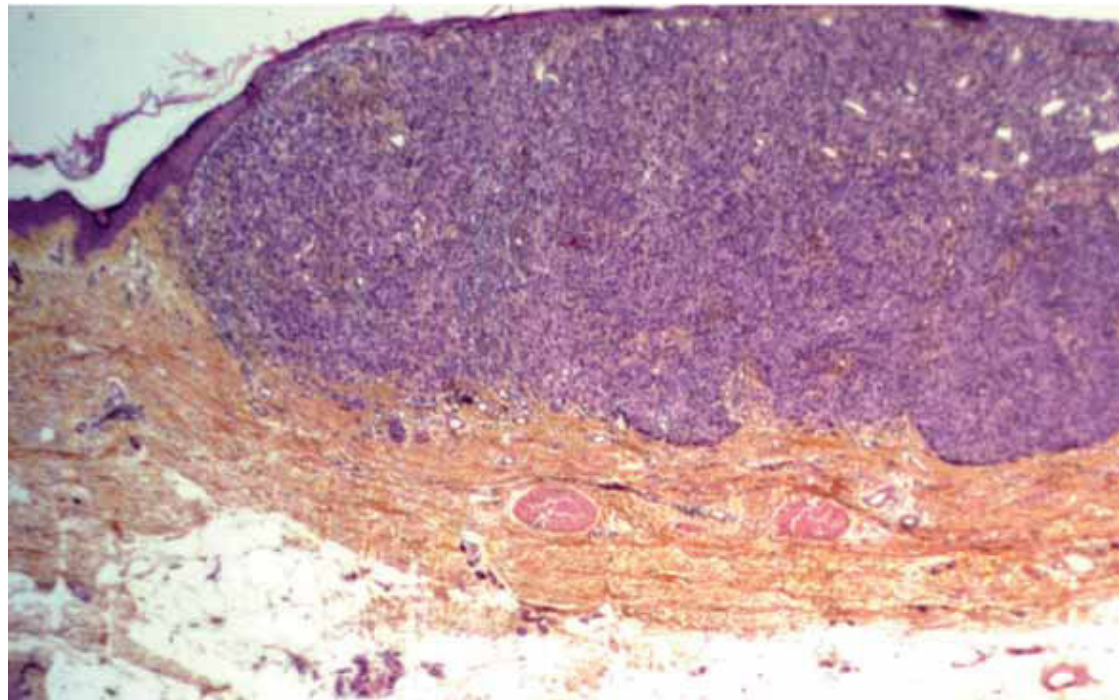


● ● ● Mélanomes – Formes anatomo-cliniques

Mélanome nodulaire

Pas de composante intra-épidermique latérale

Composante dermique



● ● ● Classification TNM du mélanome

Tumor **Nodes (Ganglion)** **Metastase**

1. Classification selon la taille T du mélanome (épaisseur)		
T ₁	≤ 1,0 mm	a : sans ulcération et niveau II ou III b : avec ulcération ou niveau IV ou V
T ₂	1,1-2,0 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération
T ₃	2,1-4,0 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération
T ₄	> 4,0 mm	a : sans ulcération b : avec ulcération
2. Classification selon le statut ganglionnaire N		
N ₁	1 ganglion	a : micrométastase b : macrométastase
N ₂	2-3 ganglions	a : micrométastase, b: macrométastase, c : en transit/satellite(s) sans ganglion
N ₃	≥ 4 ganglions ou en transit, ou mélanome ulcéré et 1 ganglion « Micrométastases : diagnostic après dissection du ganglion sentinelle » « Macrométastases : ganglion palpable puis exérèse et/ou si effraction capsulaire »	
3. Classification selon l'existence de métastases à distances		
M _{1a}	métastases cutanées ou ganglionnaires à distance	LDH normales
M _{1b}	métastases pulmonaires	LDH normales
M _{1c}	autres sites viscéraux autre métastase à distance ou métastases avec LDH élevées	LDH normales LDH élevées
<p>Les micrométastases sont diagnostiquées lors de l'analyse du ganglion sentinelle ou lors de lymphadénectomie élective. Les macrométastases sont définies comme cliniquement détectables et confirmées par curage ganglionnaire ou en cas d'envahissement ganglionnaire extracapsulaire.</p>		

● ● ● Puis Classification du mélanome en 4 stades

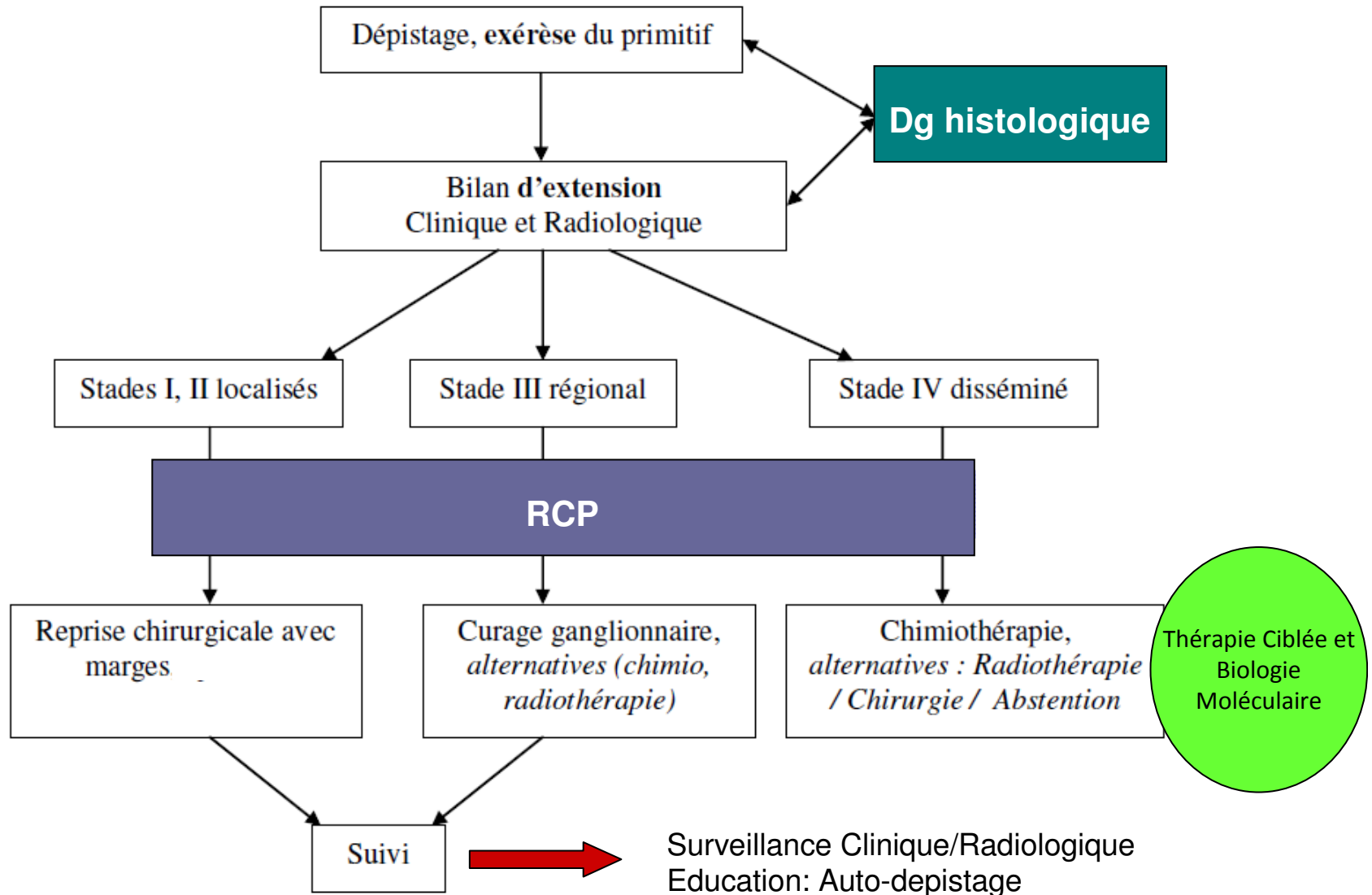
Classification clinique				Classification histologique			
o	Tis (in situ)	No	Mo	o	Tis (in situ)	No	Mo
IA	T1a	No	Mo	IA	T1a	No	Mo
IB	T1b	No	Mo	IB	T1b	No	Mo
	T2a	No	Mo		T2a	No	Mo
IIA	T2b	No	Mo	IIA	T2b	No	Mo
	T3a	No	Mo		T3a	No	Mo
IIB	T3b	No	Mo	IIB	T3b	No	Mo
	T4a	No	Mo		T4a	No	Mo
IIC	T4b	No	Mo	IIC	T4b	No	Mo
III	tout T	N1, N2, N3	Mo				
IIIA				IIIA	T1-4a	N1a	Mo
					T1-4a	N2a	Mo
IIBB				IIBB	T1-4b	N1a	Mo
					T1-4b	N2a	Mo
					T1-4a	N1b	Mo
					T1-4a	N2b	Mo
					T1-4a/b	N2c	Mo
IIIC				IIIC	T1-4b	N1b	Mo
					T1-4b	N2b	Mo
					tout I	N3	Mo
IV	tout T	tout N	tout M1	IV	tout T	tout N	tout M1

La classification clinique inclut la micro-classification du mélanome primaire et l'évaluation clinique/radiologique pour les métastases. Par convention, cette classification devrait être utilisée après excision complète du mélanome primaire avec évaluation clinique des métastases régionales et à distance.

La classification histologique inclut la micro-classification du mélanome primaire et l'information histologique sur les ganglions régionaux après lymphadénectomie partielle ou totale. Les patients de stade histologique o ou IA sont une exception : ils ne nécessitent pas d'évaluation histologique de leurs ganglions.

Il n'y a pas de sous-groupe de stade III pour la classification clinique.

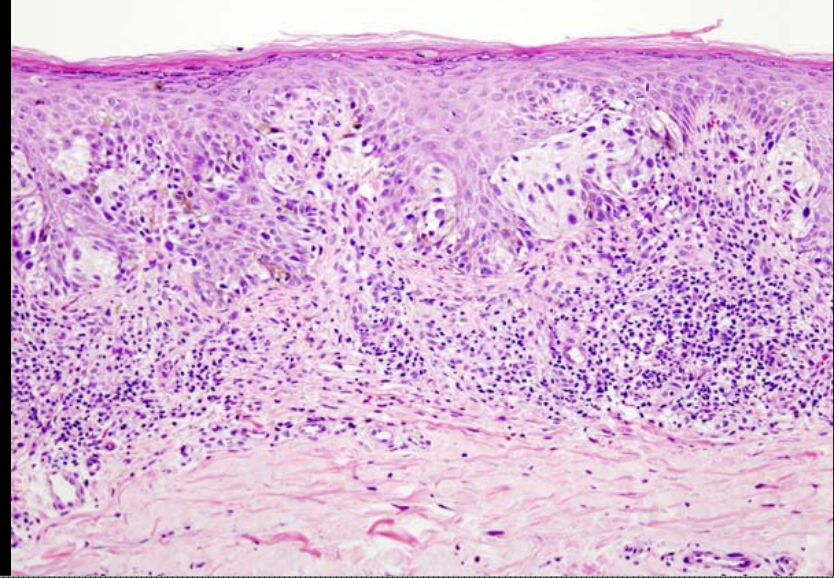
● ● ● Schéma de prise en charge d'un patient présentant un mélanome



RCP: Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

Dermatologue, Chirurgien, Radiothérapeute, Oncologue, Anato-mo-pathologiste

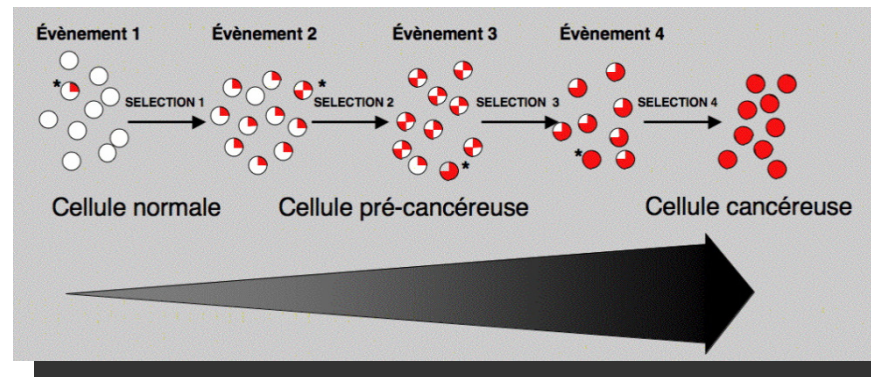
Biologie moléculaire des mélanomes



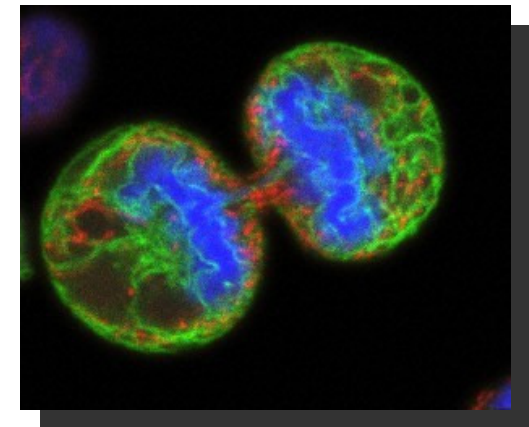
Rappel: Diagnostic moléculaire

(Cours Dr Ilie)

- **Cancer** = tumeur maligne formée à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme grâce à une accumulation d'événements moléculaires délétères (instabilité génétique – ex. **mutations** des gènes)



- La **transformation cellulaire** tumorale se traduit par:
 - Perte de contrôle du cycle cellulaire (prolifération tumorale)
 - Insensibilité à l'apoptose
 - Anomalies de la réparation de l'ADN
 - Migration, invasion et métastase



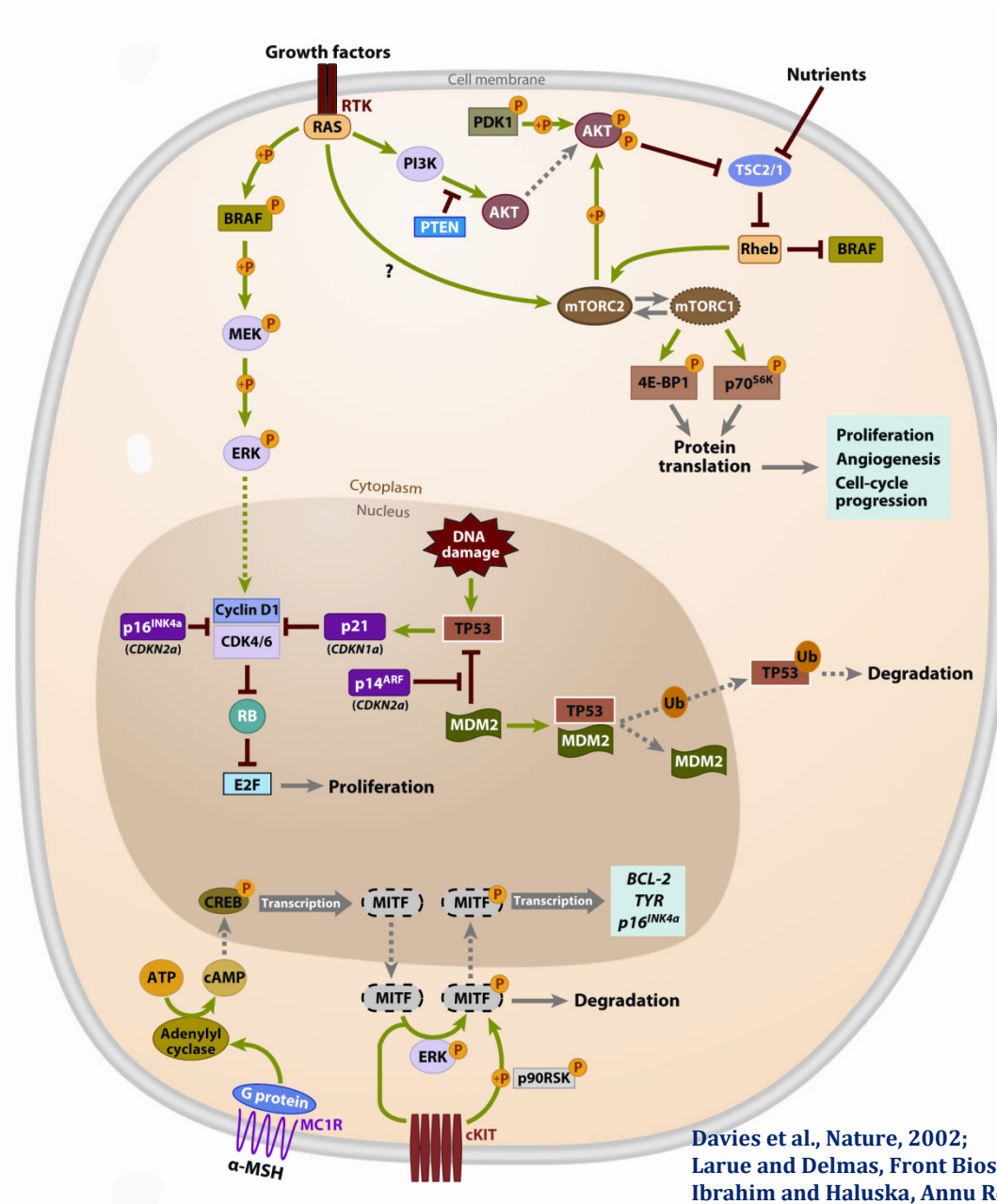
Principales voies oncogéniques – mélanome

1) Voie Braf

2) Voie Ckit (CD117)

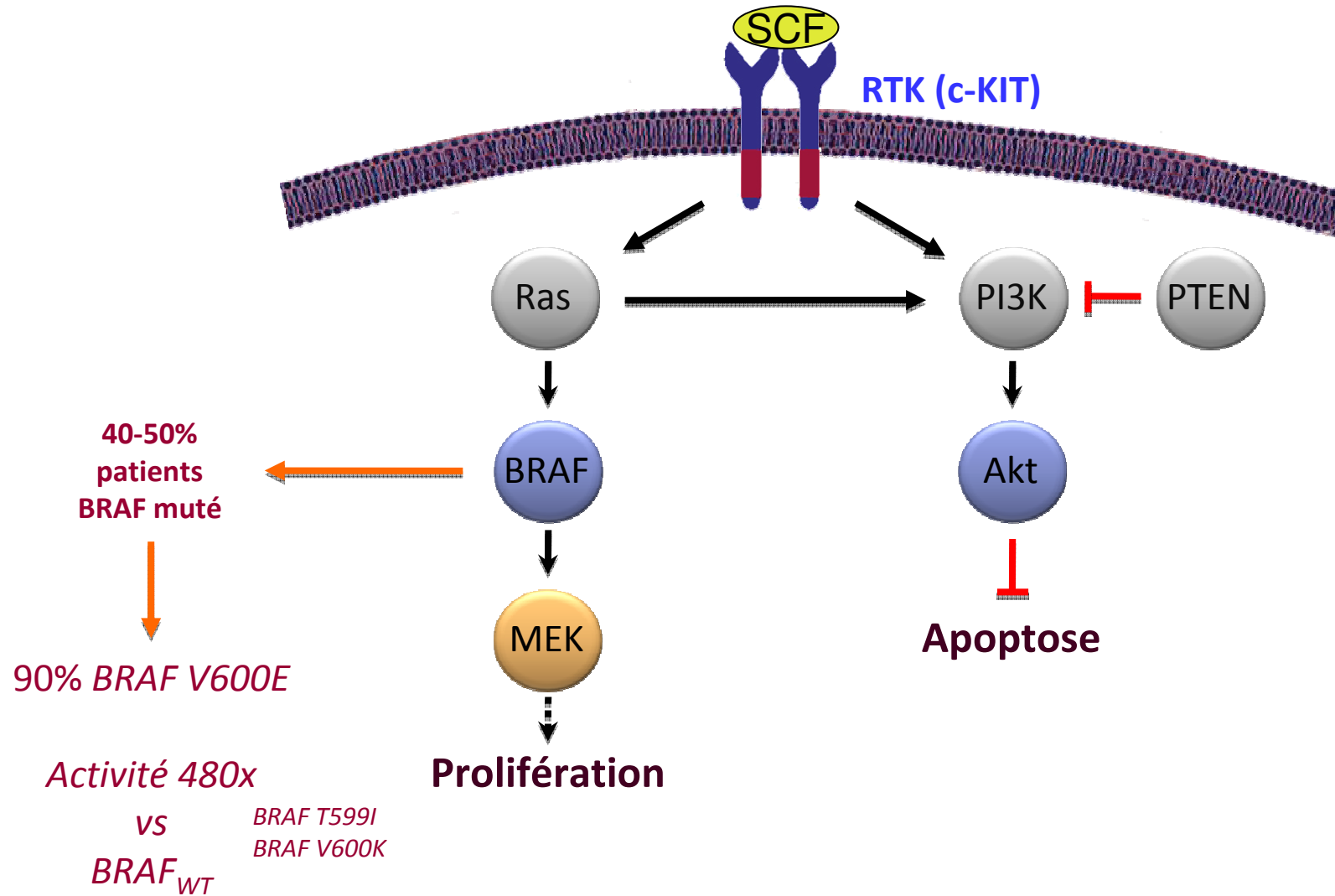
Ces deux voies sont exclusives

Soit tumeur Non mutée;
Soit mutée Braf;
Soit mutée Ckit



Davies et al., Nature, 2002;
Larue and Delmas, Front Biosci. 2006;
Ibrahim and Haluska, Annu Rev Pathol Mech Dis, 2009

1) Voie RTK – Ras – BRAF

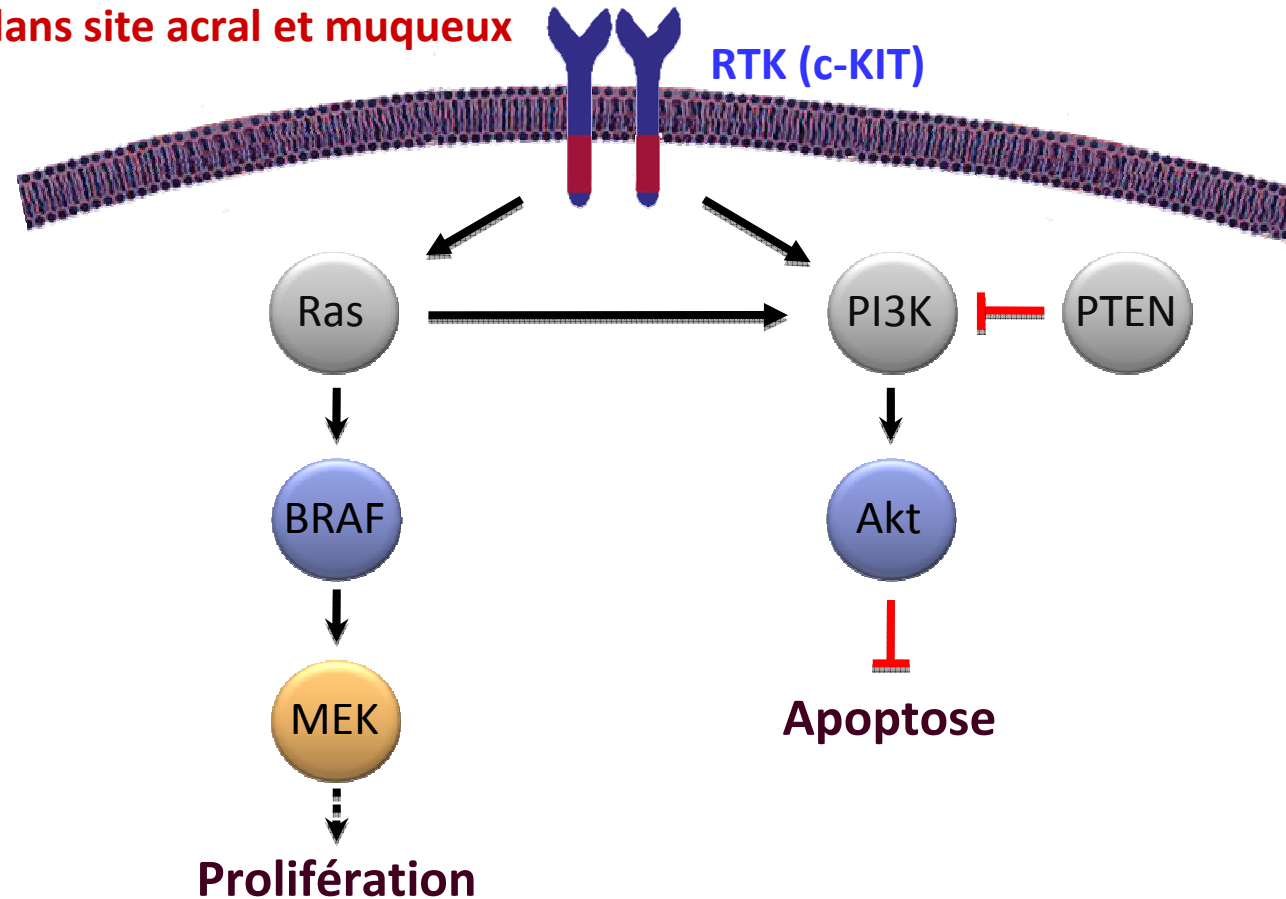


1. Smalley K and Sondak V, Melanoma — An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy, N Engl J Med, 2010
2. Davies MA and Samuels Y, Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma, Oncogene, 2010

2) Voie de C-kit

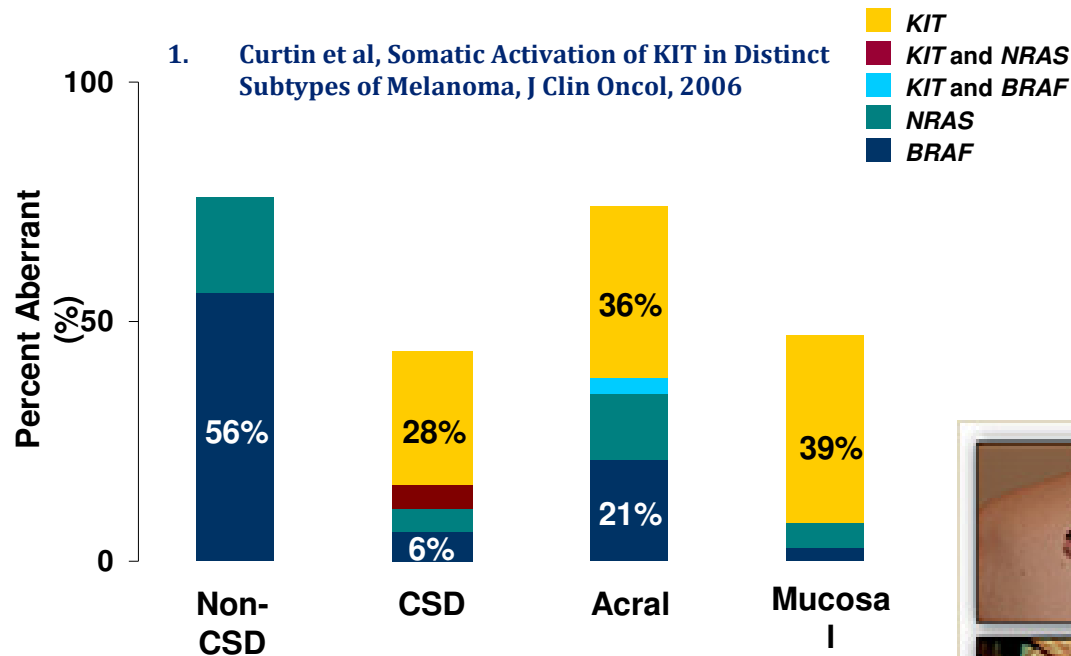
2 à 6% mutation Mélanome Malin

Mais 10-20% dans site acral et muqueux



1. Smalley K and Sondak V, Melanoma — An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy, N Engl J Med, 2010
2. Davies MA and Samuels Y, Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma, Oncogene, 2010

Incidence des mutations dans les mélanomes

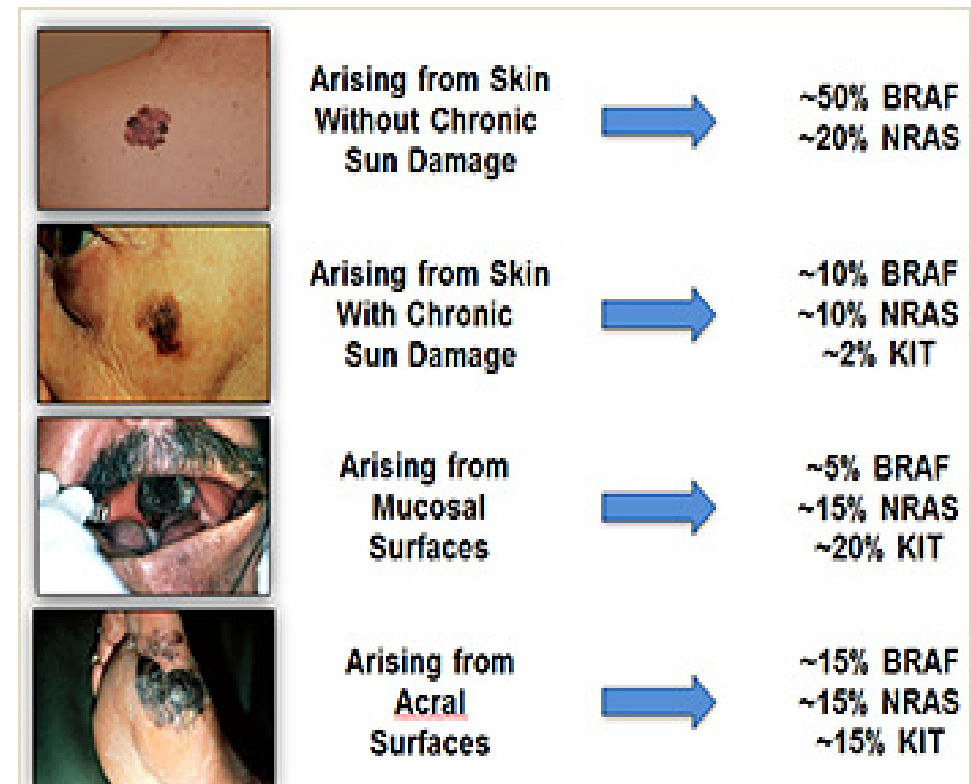


CSD: Chronic Sun Disease

Peau sans dommage solaire chronique mais exposée = SSM - plutôt mutation de *BRAF*

Peau avec dommage solaire chronique = Mélanome de Dubreuilh - plutôt mutation *cKIT*; mais tout peut se voir! (cf. publications)

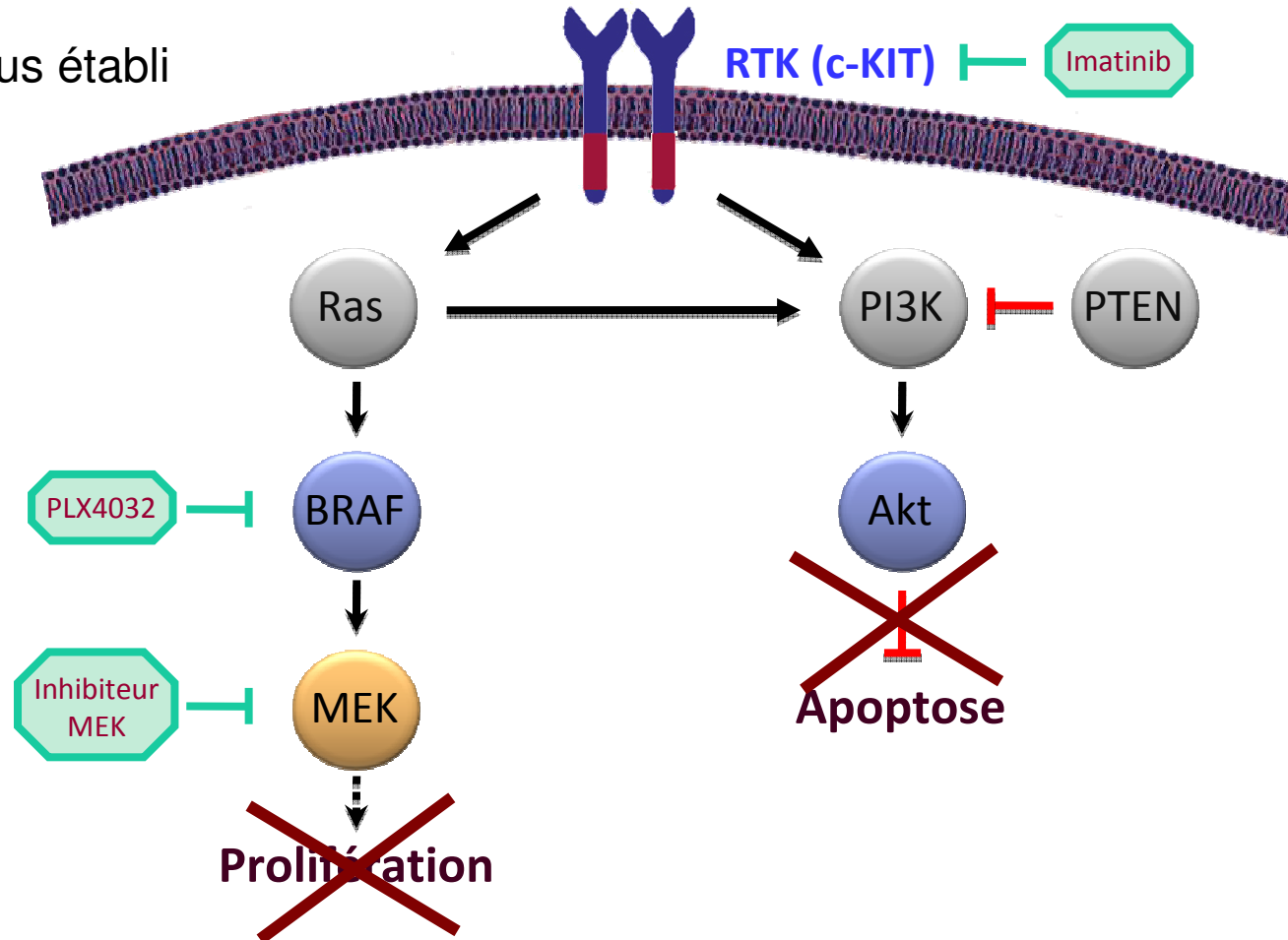
Peau sans exposition solaire- acral et muqueux = Mélanome acro-lentigineux – plutôt mutation *cKIT*



mycancergenome.org/

Thérapies ciblées dans les mélanomes

Essais Clinique
Pas de consensus établi



1. Smalley K and Sondak V, Melanoma — An Unlikely Poster Child for Personalized Cancer Therapy, N Engl J Med, 2010
2. Davies MA and Samuels Y, Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma, Oncogene, 2010

Rappel Mutations

(Cours Dr Ilie)

Une mutation est une variation du matériel génétique (ADN) par rapport à la séquence de référence

Amino acid No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sequence	ATG	ACT	GAA	TAT	AAA	CTT	GTG	GTA	GTT	GGA	GCT	GGT	GGC	GTA	GGC
												Gly			
				10			20			30			40		

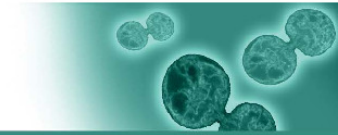
Amino acid No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sequence	ATG	ACT	GAA	TAT	AAA	CTT	GTG	GTA	GTT	GGA	GCT	GTT	GGC	GTA	GGC
												Val			
				10			20			30			40		

c.34G>T
p.G12V

- Deux types de mutations:
 - Germinales (affectent les gamètes , transmissibles)
 - **Somatiques** (ne touchent pas les cellules destinées à la reproduction, elles ne seront donc jamais héréditaires, une cause importante de cancers)

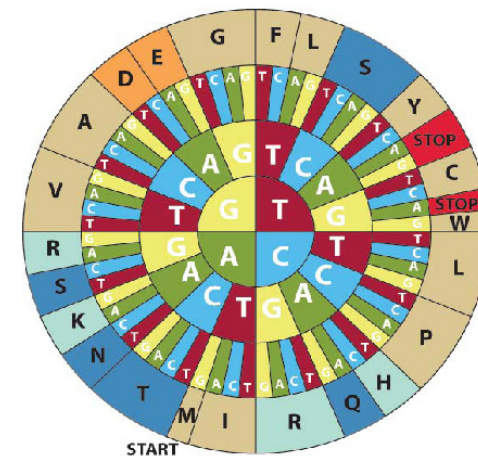
Codon Wheel

Decoding DNA



Use the codon wheel to translate DNA codons into amino acids.

To decode a codon find the first letter of your sequence in the inner circle and work outwards to see the corresponding amino acid. For example: CAT codes for H (Histidine)



Amino acid code

A - Alanine	G - Glycine	M - Methionine	S - Serine
C - Cysteine	H - Histidine	N - Asparagine	T - Threonine
D - Aspartic Acid	I - Isoleucine	P - Proline	V - Valine
E - Glutamic acid	K - Lysine	Q - Glutamine	W - Tryptophan
F - Phenylalanine	L - Leucine	R - Arginine	Y - Tyrosine

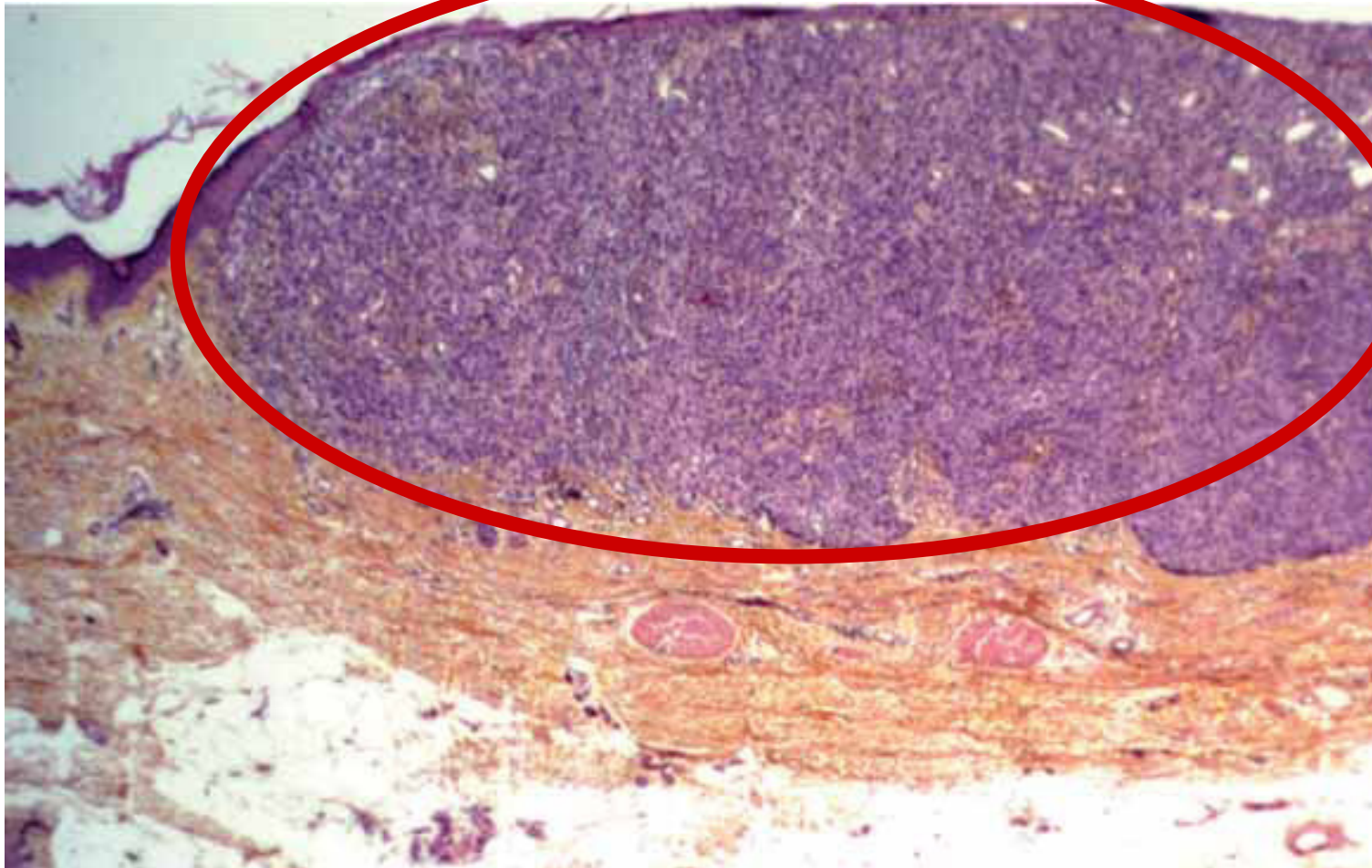
Image: C. Brooksbank, European Bioinformatics Institute

Exemple C-KIT: Séquençage direct

1. Diagnostic Histologique
 - Evaluer le % de cellules tumorales
2. Extraction de l'ADN tumoral
 - Macrodissection sur bloc
 - Coupes entières
3. Amplification de l'ADN tumoral extrait par une technique de PCR (Polymerase chain reaction)
4. Détection de la mutation (techniques de biologie moléculaire):
 - Séquençage direct
 - Pyroséquençage
 - Autres: Digestion enzymatique (polymorphisme de longueur des fragments de restriction-RFLP); SnapShot, etc...

1- Diagnostic Histologique

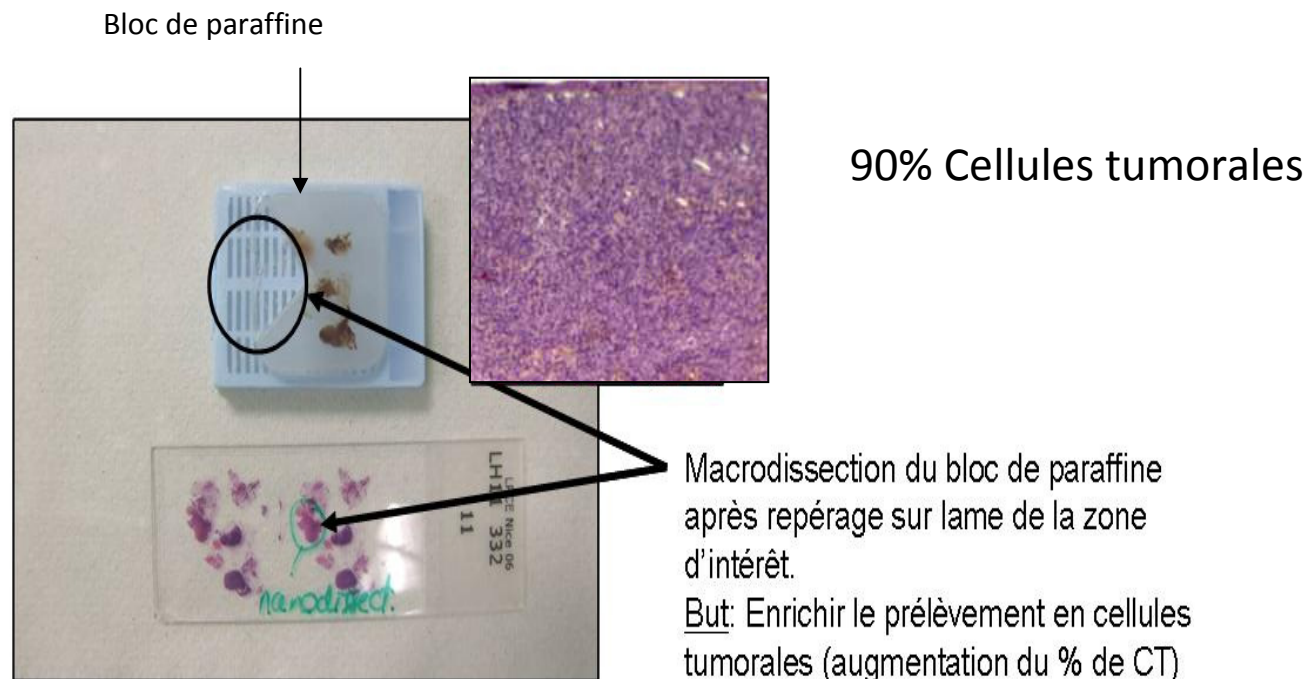
Evaluer le % de cellules tumorales



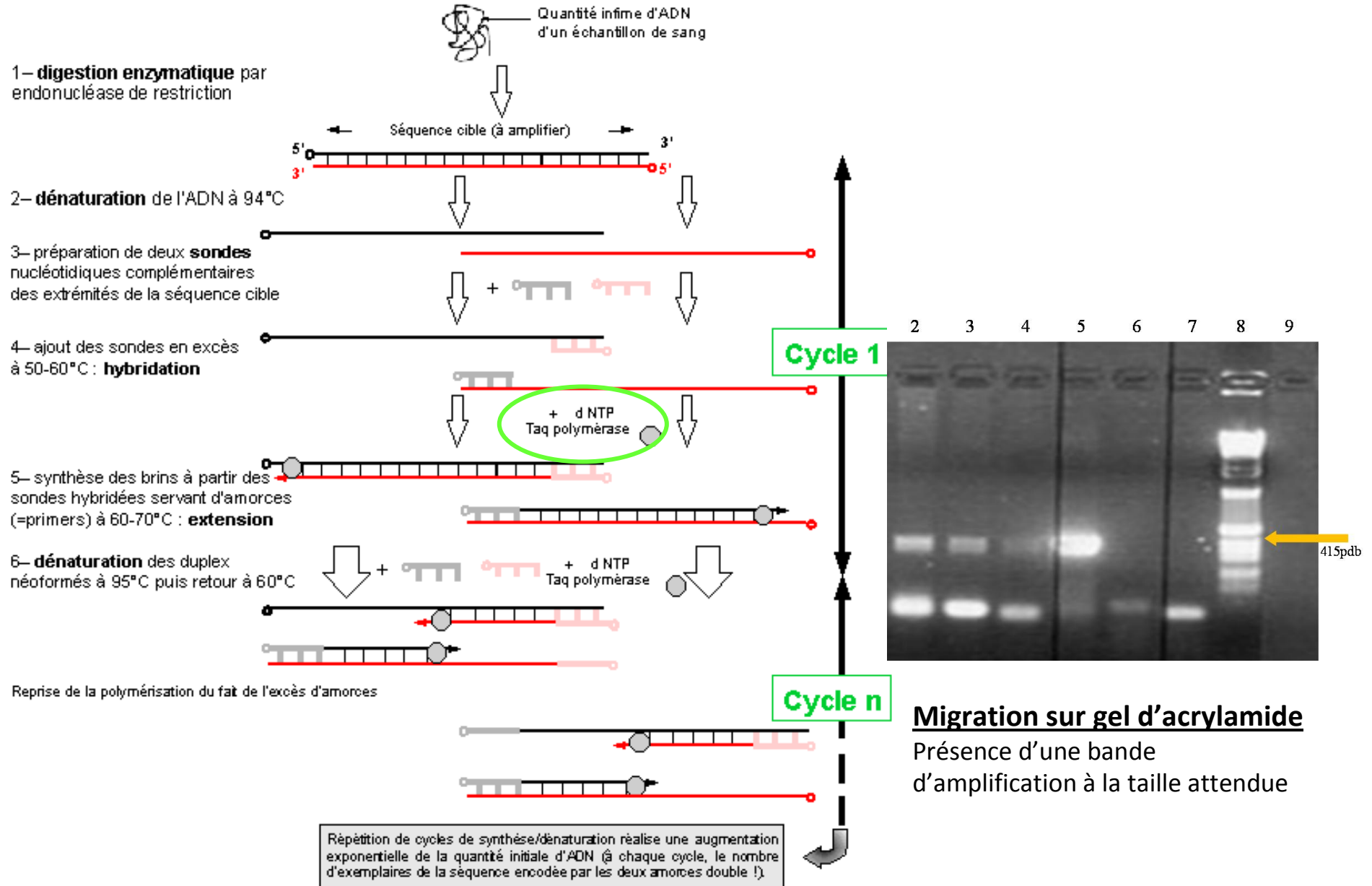
2- Extraction de l'ADN tumoral

Macrodissection sur bloc/ Coupes entières

Biopsie fixée au **formol** +++ (seul fixateur permettant l'analyse en biologie moléculaire)
Ou tissu congelé si disponible (Tumorothèque)



3- Amplification par PCR



4- Détection de la mutation

Séquençage direct

1. Réaction de Séquence:

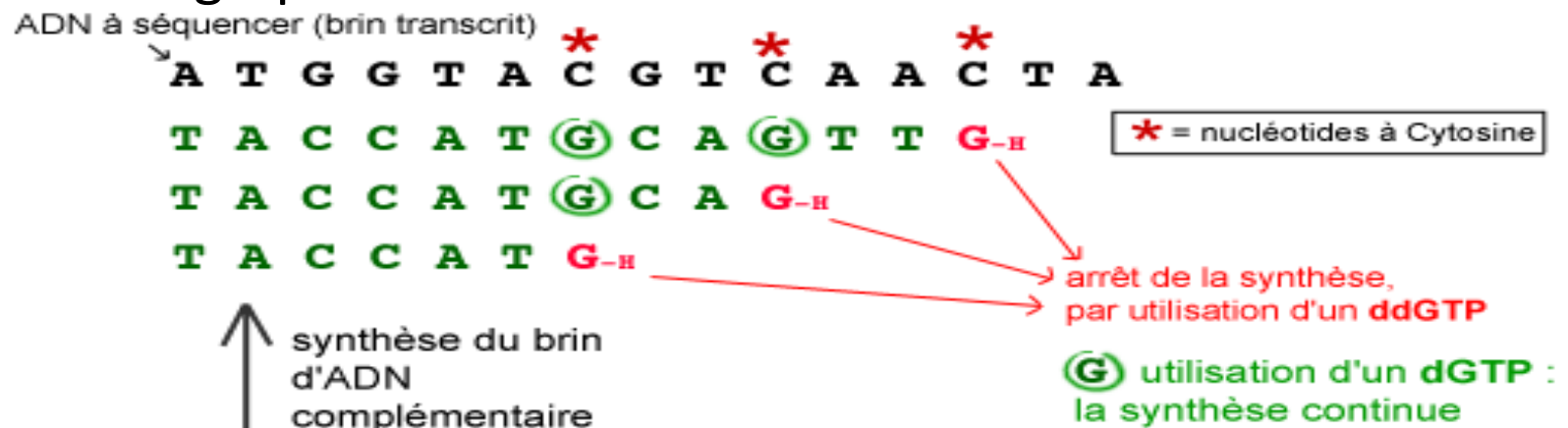
- Même principe que le PCR
 - Utilise les ADN polymérases pour synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice
- Mais incorporation de **nucléotide marqué**, les didésoxyribonucléotides (ddNTP) en plus de dNTP
 - différent des dNTP par l'absence d'un groupement OH
 - Incorporés dans la séquence
 - 1 ddNTP pour chaque base (ddATP; ddGTP; ddCTP; ddTTP)
 - Sont des terminateurs de chaîne
 - l'ADNpol n'est plus capable de rajouter le moindre nucléotide à sa suite : la synthèse du brin d'ADN s'arrête

4- Détection de la mutation

Séquençage direct

2. Séquenceur Abiprism

- Émission d'une fluorescence (pic)
- Couleur spécifique à chaque base (ATGC)
- La taille des fragments obtenus est déterminée par chromatographie.



dATP dCTP
dGTP ddGTP (un peu) dTTP

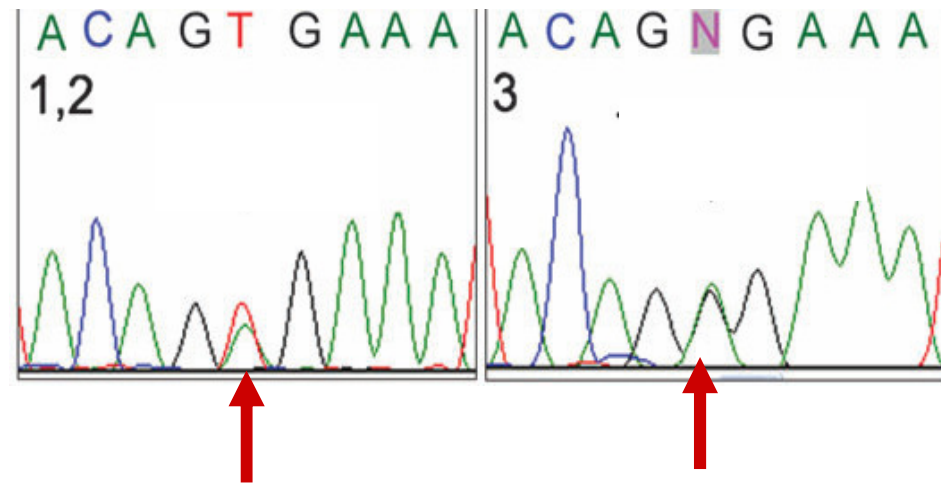
Conclusion :
de manière aléatoire, obtention d'un ensemble de fragments (de différentes tailles), arrêtés au niveau des Cytosines (complémentaires de G) du brin transcrit de l'ADN (donc des **Guanines** du brin codant).

4- Détection de la mutation

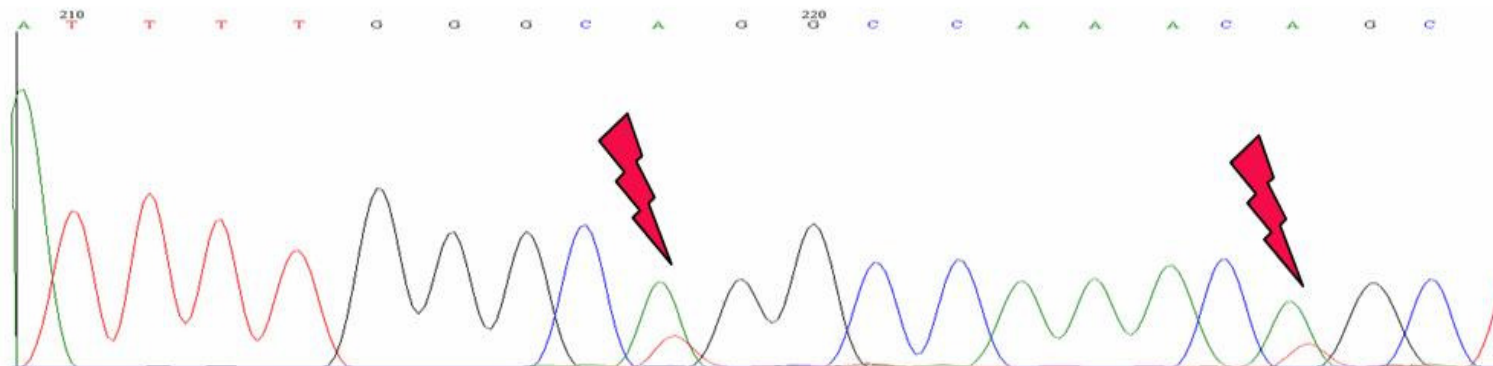
Séquençage direct

2. Séquenceur Abiprism

- Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise
- Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui est faite en terme de nucléotides

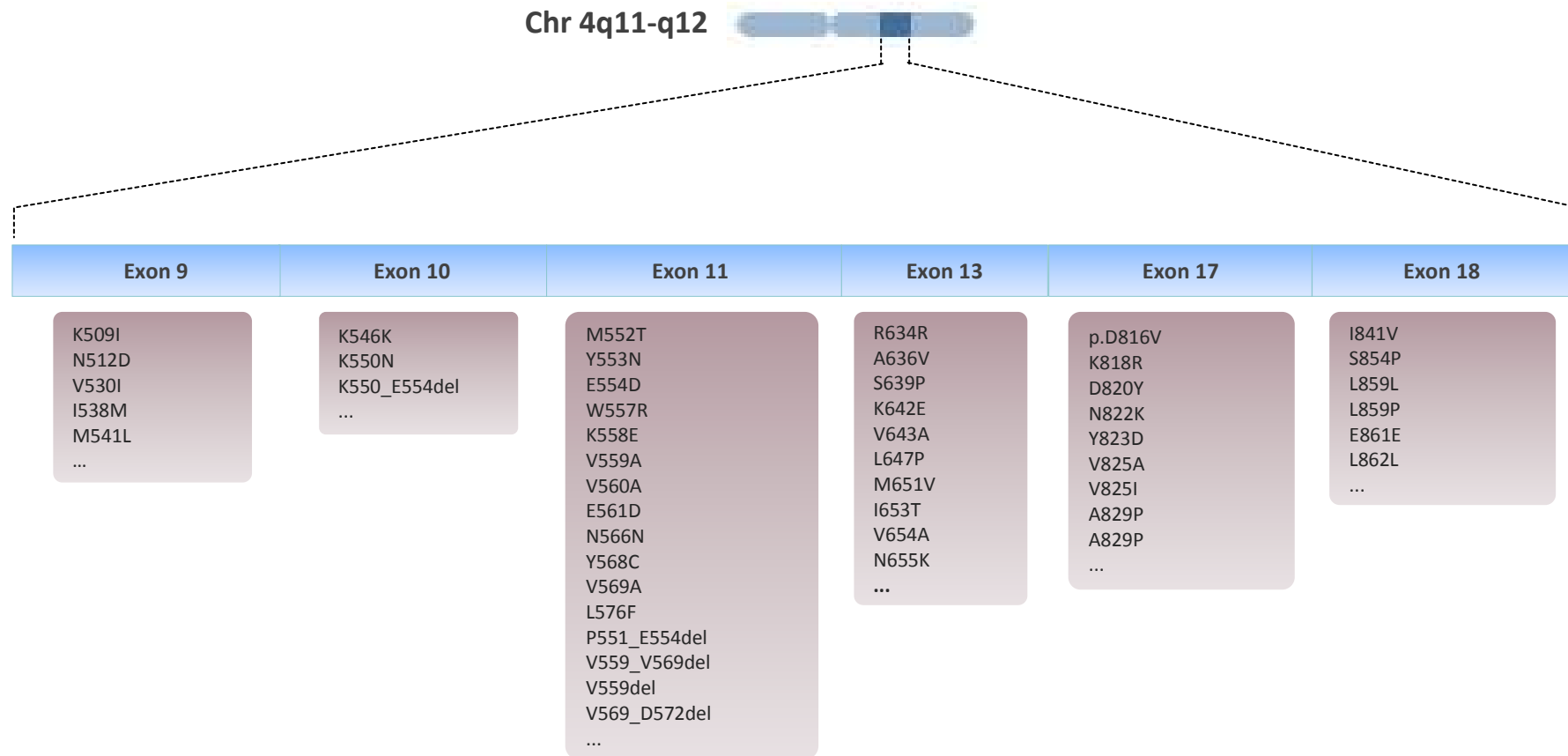


Double Pic = Présence de mutation
(ou polymorphisme)



NB: les séquences ici présentes servent d'illustration et ne correspondent pas au gène C-kit

Interprétation des Résultats



Recherche globale des mutations par séquençage direct

1. Sanger Cosmic Database (<http://www.sanger.ac.uk/>)
2. Beadling et al, KIT Mutations and Copy Number in Melanoma Subtypes, Clin Cancer Res, 2008

Interprétation des résultats

- Avantages
 - Séquence d'une grande zone d'intérêt
 - Permet de détecter de nouvelles mutations
- Inconvénients:
 - Long, fastidieux
 - Non ou partiellement automatisé

Exemple Braf:Pyroséquençage

1. Diagnostic Histologique
 - Evaluer le % de cellules tumorales
2. Extraction de l'ADN tumoral
 - Macrodissection sur bloc
 - Coupes entières
3. Amplification de l'ADN tumoral extrait par une technique de PCR (Polymerase chain reaction)
4. Détection de la mutation (techniques de biologie moléculaire):
 - Séquençage direct
 - **Pyroséquençage**
 - Autres: Digestion enzymatique (polymorphisme de longueur des fragments de restriction-RFLP); SnapShot, etc...

4- Détection de la mutation: Pyroséquençage

*Sequencing by Synthesis: Ronaghi M., Uhlén M., Nyrén P. (1998)
Real-Time Pyrophosphate Detection for DNA Sequencing. Science
281:363-365*



Séquence en temps réel :

Simple, robuste, rapide et sensible

Une solution (CE-IVD) pour la
recherche de mutation :

- BRAF

4- Détection de la mutation: Pyroséquençage

1- Principe



PCR

Region of interest amplified with a biotinylated primer (~100-300 bp)

Amorces Biotinillées



Sample prep

Separation to single stranded DNA using streptavidin-coated beads.

Annealing of sequencing primer



Pyrosequencing

Sequencing-by-synthesis. Sequence data generated from the first base next to the sequencing primer.

Sequence context as built in control

Elegant chemistry and sensitive technology enable quantification of sequence variation

Step 1

A DNA segment is amplified and the strand to serve as the Pyrosequencing template is biotinylated. After denaturation, the biotinylated single-stranded PCR amplicon is isolated and allowed to hybridize with a sequencing primer.

Step 2

The hybridized primer and single-stranded template are incubated with the enzymes DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, and apyrase, as well as the substrates adenosine 5' phosphosulfate (APS) and luciferin.

Step 3

The first deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) is added to the reaction. DNA polymerase catalyzes addition of the dNTP to the sequencing primer, if it is complementary to the base in the template strand. Each incorporation event is accompanied by the release of pyrophosphate (PPi) in a quantity equimolar to the amount of incorporated nucleotide.

Step 4

ATP sulfurylase converts PPi to ATP in the presence of APS. This ATP drives the luciferase-mediated conversion of luciferin to oxyluciferin that generates visible light in amounts that are proportional to the amount of ATP. The light produced in the luciferase-catalyzed reaction is detected by CCD sensors and seen as a peak in the raw data output (Pyrogram®). The height of each peak (light signal) is proportional to the number of nucleotides incorporated.

Step 5

Apyrase continuously degrades unincorporated nucleotides and ATP. When degradation is complete, another nucleotide is added.

Step 6

Addition of dNTPs is performed sequentially. It should be noted that deoxyadenosine alfa-thio triphosphate (dATPαS) is used as a substitute for natural deoxyadenosine triphosphate (dATP) since it is efficiently used by DNA polymerase, but not recognized by luciferase. As the process continues, the complementary DNA strand is elongated and the nucleotide sequence is determined from the signal peaks in the Pyrogram trace.

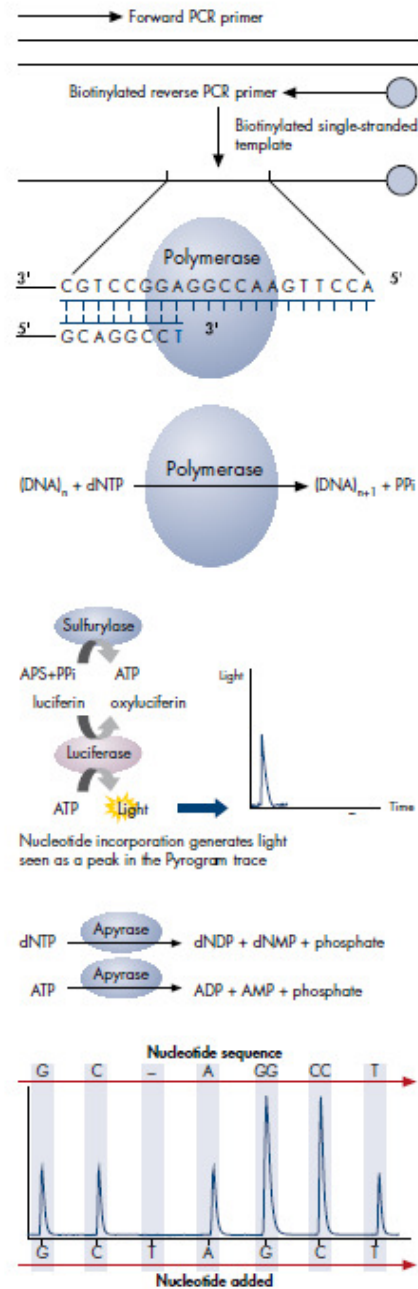
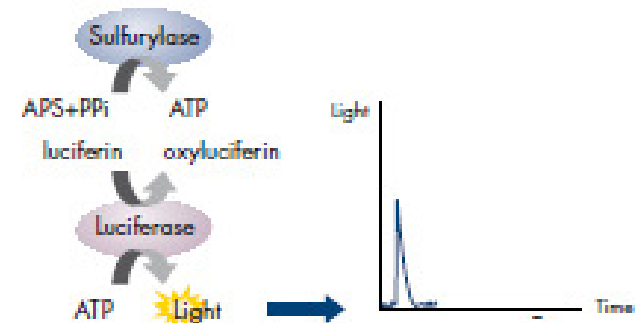


Figure 2. The Pyrosequencing reaction cascade.

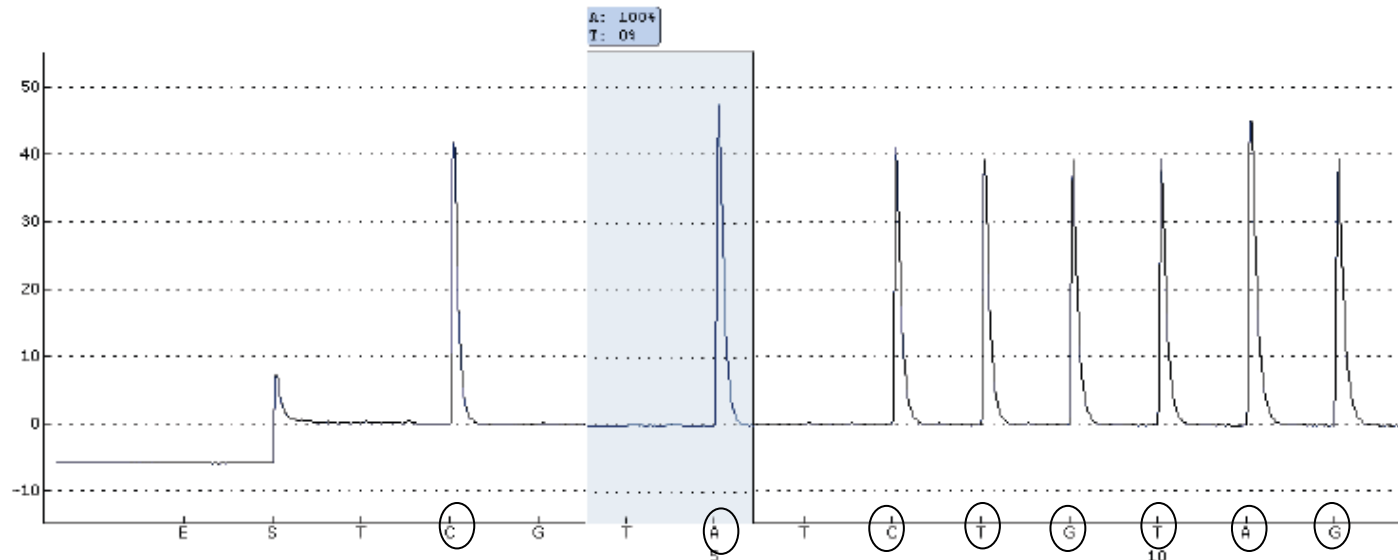


Nucleotide incorporation generates light seen as a peak in the Pyrogram trace



Emission d'un pic lumineux

2- Interprétation: Pyrogramme Brab



Bases entourées
correspondent à la
séquence normale

Echantillon non muté

Séq. de Référence CACTGTAG

Séq lue CACTGTAG

NB: la séquence que l'on cherche est prédéterminée par le logiciel.

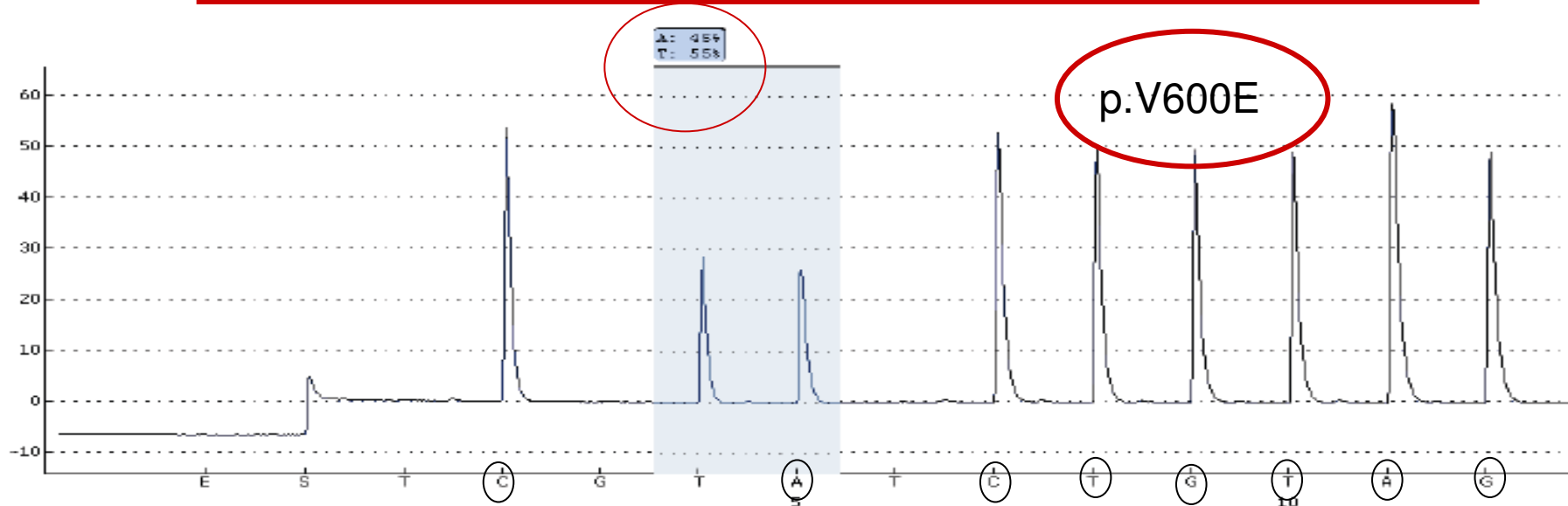
Ici elle est la suivante: **TCGTATCTGTAG**

En gras: séquence de référence

En rouge: zone potentielle de survenue de mutation

Si un pic supplémentaire apparaît en regard d'une des zones suspectes de mutation: l'échantillon est muté

2- Interprétation: Pyrogramme Braff



Echantillon muté: Apparition d'un pic au niveau de la position T

Séq. de référence **C**ACTGTAG

Séq. Lue **C**TCTGTAG

Avantages

Séquence en temps réel- Rapide
Simple, robuste, rapide et sensible
Automatisé

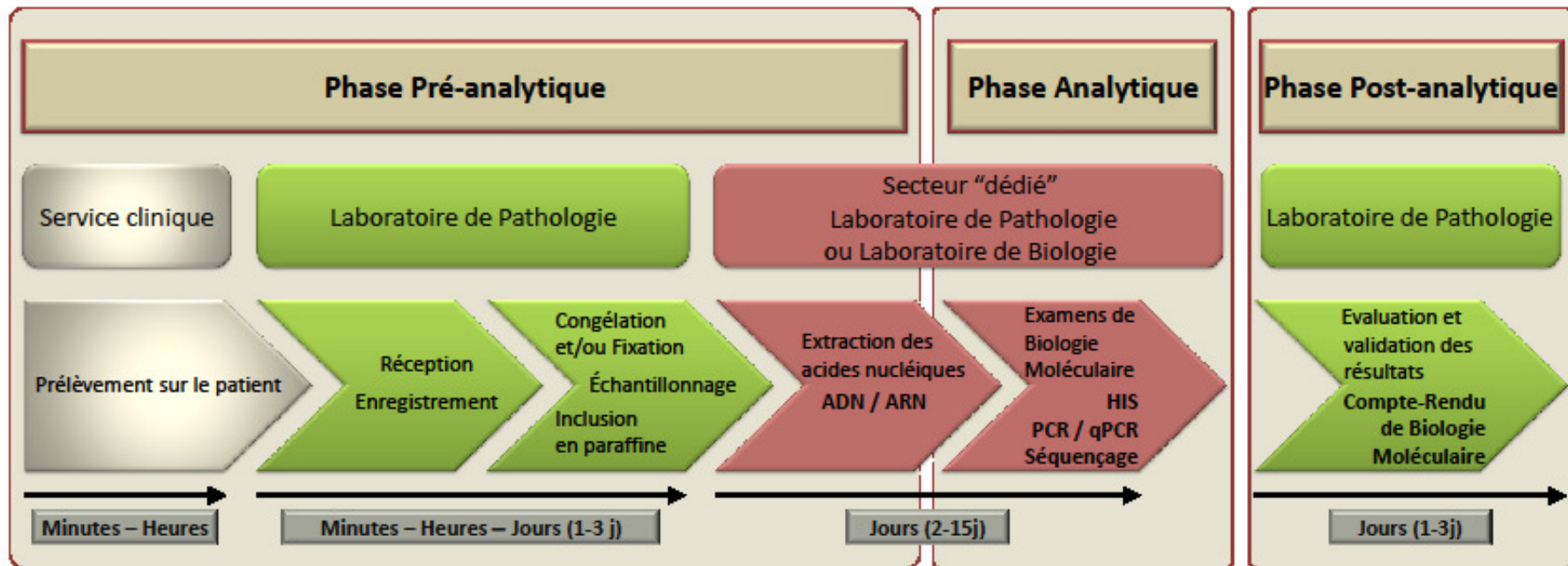
Inconvénients

Détection ciblée
Ne permet pas de trouver de nouvelles mutations

Intérêt de la recherche de mutation

- Thérapie moléculaire ciblée +++
 - Réponse aux Inhibiteurs de Braf (PLX4032) si Braf muté
 - Réponse aux Ac monoclonaux (Imatinib) si Ckit muté
 - Les mutations de Braf et Ckit sont activatrices
- Meilleure réponse thérapeutique si génotype identifié: cibler les patients
- Détection des mutations de résistance secondaire
- Pas de consensus établi pour les indications:
Essai Clinique

Conclusion: Circuit de Biologie Moléculaire au LPCE



Conclusion:

Compte-rendu type de biologie moléculaire

- Renseignements cliniques
 - **Dates** de prélèvement, de prescription, de la demande d'analyse moléculaire, d'analyse des séquences
 - **Médecin prescripteur** et le laboratoire de pathologie responsable du prélèvement
 - Nature du prélèvement et son **conditionnement** (diagnostic histologique, site anatomique, **% de cellules tumorales**)
- Les techniques utilisées
 - Pour l'ADN : extraction ADN, quantité et qualité
 - **Seuils de détection de la technique utilisée** et les différentes mutations recherchées
- Les résultats
 - **En nomenclature internationale** (base de données «COSMIC database Sanger»
<http://www.sanger.ac.uk/perl/genetics/CGP/cosmic?action=bygene>)
 - Absence de mutation +/- **réserve en cas de faible % de cellules tumorales**
 - Résultat non interprétable : impossibilité d'amplification de l'exon ou de séquences illisibles (arrêt technique en phase analytique)
 - Etude moléculaire impossible : matériel insuffisant
- Prédications thérapeutiques de réponse au traitement associé à chaque mutation
- Signataires + date de signature

Conclusion: Marqueurs tissulaires des thérapies ciblées

- Importance de la technique de détection
 - Sensible
 - Reproductible et Robuste
- Importance de la qualité de l'échantillon
 - Fixation
 - Quantité de cellules tumorales
- Facteur liés à la tumeur
 - Hétérogénéité intra-tumorale
 - Site primitif, secondaire
- Facteurs cliniques
 - Influence des thérapies antérieures
 - Résistances Secondaires

Ce qu'il faut retenir

- Mélanome Malin:
 - Formes anatomo-clinique
 - Exposition solaire et mutation
- Techniques de détection des mutations
 - Etapes communes
 - Séquençage direct
 - Pyroséquençage
- Éléments indispensable du compte-rendu