

BASES CLINIQUES, HISTOLOGIQUES, ET MOLECULAIRES DES MELANOMES

❖ Epidémiologie

- ~ Problème de santé pub : top 15 des cancers ♀/♂
- ~ Tous les âges, **adulte jeune** +++, rare chez l'enfant
- ~ 7000 nouveaux cas / an
- ~ L'incidence double tous les 10 ans (PACA +++)

❖ Formes métastatiques

- ~ La plus **agressive** et la plus mortelle des cancers de la peau
- ~ Espérance de vie courte
- ~ Survie à 1 an < 1% si plus de 2 sites métastatiques
- ~ Très peu d'options et de progrès thérapeutiques jusqu'à récemment
- ~ Cible des **thérapies ciblées**

❖ Facteurs de risque

- ~ **Exposition solaire** au cours de l'**enfance**
- ~ **UV artificiels**
- ~ Personnes à **phototype clair**
- ~ Existence d'un **mélanome** augmente le risque de survenue d'un deuxième
- ~ Mélanomes **familiaux** (5-10%) : **mutations germinales** (CDKN2A, CDK4)

I. ASPECTS CLINIQUES

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

L'histologie permet d'affirmer, de poser le diagnostic, grâce à des critères morphologiques.

1) La règle ABCDE

- ~ **Asymétrique**
- ~ **Bords irréguliers**
- ~ **Coloration hétérogène**
- ~ **Diamètre important** (> 6mm)

- ~ **Evolutif**, dont l'aspect se modifie avec le temps (≠ TB naevus)

2) Mélanome et mélanocytes

- ~ Peau = 3 couches : épiderme, derme, hypoderme
- ~ Le mélanome se développe à partir des **mélanocytes**
- ~ Les mélanocytes sont situés dans la **couche basale** de l'**épiderme**
- ~ Les kératinocytes produisent la kératine, impliquée dans la formation de l'épiderme et constituant une couche protectrice d'épaisseur variable
- ~ Les mélanocytes synthétisent et transfèrent le pigment mélanique aux kératinocytes avoisinants, via leurs expansions dendritiques
- ~ Unité fonctionnelle de la mélanisation : **1 mélanocyte pour 36 kératinocytes** (jamais 2 mélanocytes côte à côte physiologiquement)
- ~ La mélanogénèse est un processus enzymatique long, comprenant la synthèse et la répartition de la mélanine dans l'épiderme ; la synthèse de la mélanine se fait à partir de la tyrosine, en présence de tyrosinase et de Cu^{2+}
- ~ 2 types de mélanine
 - **Eumélanine** : pigment noir, protège la peau des UV
 - **Phéomélanine** : pigment jaune/roux, protège très peu, se décompose facilement sous l'action des UV, libérant des radicaux libres cancérogènes
- ~ Les mélanocytes normaux peuvent être mis en évidence par plusieurs techniques ; ils sont clairs, avec de petits pigments mélaniques ; seules une coloration spéciale ou l'IHC permettent d'individualiser les ramifications dendritiques
- ~ Transformation maligne **de novo** (sur peau normale) ou sur une **tumeur bénigne (naevus)** (25%)

II. ASPECTS HISTOLOGIQUES

- ~ **2 modes d'extension**, caractérisant 3 types histologiques de mélanomes
 - **Horizontale**, dans un premier temps, au niveau de l'**épiderme**
 - **Verticale**, dans un second temps, au niveau de l'**hypoderme**
- ~ Le mélanome nodulaire, le plus invasif, où l'extension verticale se développe d'emblée

1) Ce que permet l'analyse histologique des mélanomes

- ~ Confirmer le **diagnostic** en se basant sur des **critères cytologiques** et **architecturaux**
- ~ Déterminer l'**épaisseur** par l'indice de **Breslow** (facteur pronostic ++), à l'aide d'un micromètre oculaire
- ~ Déterminer le caractère **ulcéré** ou non (facteur pronostic)
- ~ Evaluer la présence de **mitoses**
- ~ Déterminer le degré d'**invasion** de la peau par l'indice de **Clark**, càd quelle structure est envahie en profondeur, indépendamment de l'épaisseur de la lésion, dépendant uniquement des zones anatomiques ; permet de définir le **traitement complémentaire**

2) Les critères architecturaux : faible grossissement

- ~ **Asymétrie** de la lésion
- ~ **Mauvaise délimitation** latérale
- ~ **Thèques mélanocytaires épidermiques confluentes**, variables en taille et forme, disposées de façon désordonnée (« pontage »)
- ~ Prédominance de **mélanocytes isolés intra-épidermiques**, d'extension **pagétoïde**, disposés de façon désordonnée
- ~ **Composante dermique invasive** sans gradient de maturation

3) Les critères cytologiques : fort grossissement

- ~ **Pléomorphisme nucléaire** (variabilité dans la taille)
- ~ **Nucléole proéminent**
- ~ **Mitoses atypiques**
- ~ **Pigment mélanique poussiéreux**, verdâtre

4) Mélanomes : formes anatomo-cliniques

a) Mélanome à extension superficielle (SSM)

- ~ Mélanocytes **atypiques**, **isolés** ou groupés en **thèques** (nids de cellules mélanocytaires en position basale)
- ~ **Toute la hauteur de l'épiderme**
- ~ **Migration intra-épidermique pagétoïde**

b) Mélanome acral lentigineux (ALM)

- ~ Peau **glabre** (paume, plante, doigts)

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

c) Mélanome de Dubreuilh

- ~ **Lésion d'élastose solaire marquée**
- ~ Composante **intra-épidermique latérale lentigineuse**, surtout au niveau de la basale
- ~ Contexte de **dommages actiniques sévères** : bande dermique au niveau du derme superficiel, de couleur rose, épaisse, formée de fibres de collagène qui ont subi une **dégénérescence élastoïque** dans un contexte d'exposition solaire

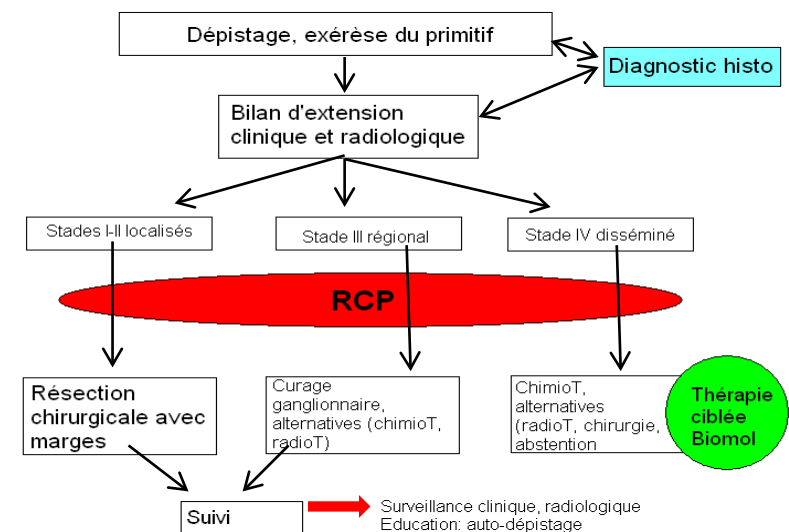
d) Mélanome nodulaire

- ~ **Pas de composante intra-épidermique latérale**
- ~ Composante **dermique**
- ~ **Très invasif**, car l'extension verticale se développe d'emblée
- ~ Macro : nodule tumoral pas toujours pigmenté, qui s'ulcère très rapidement en surface

5) Classification TNM des mélanomes

- ~ 4 stades dépendants de
 - o La **taille** de la tumeur
 - o L'**invasion** des **ganglions lymphatiques**
 - o La présence de **métastases**

III. SCHEMA DE PRISE EN CHARGE D'UN PATIENT PRESENTANT UN MELANOME



IV. BIOLOGIE MOLECULAIRE DES MELANOMES

- ~ Un **cancer** est une **tumeur maligne** formée à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme grâce à une **accumulation d'événements moléculaires délétères** (instabilité génétique, mutations de gènes)
- ~ Une **mutation** est une **variation** du **matériel génétique** par rapport à la **séquence de référence** ; les mutations **germinales** touchent les gamètes, les mutations **somatiques**, jamais héréditaires, sont une cause importante de cancers
- ~ La **transformation cellulaire tumorale** se traduit par
 - o **Perte du contrôle du cycle cellulaire** (prolifération tumorale)
 - o **Insensibilité à l'apoptose**
 - o **Anomalies de réparation de l'ADN**
 - o **Migration, invasion, métastase**
- ~ Les **voies oncogéniques** sont activées de façon permanente dans la cellule, et **hyperactivées** dans les tumeurs à cause de mutations somatiques affectant les protéines impliquée, avec **activation en cascade** des **voies de signalisation intra-cellulaire**, ↗ **prolifération**, ↗ **angiogenèse**, **perte du contrôle du cycle cellulaire**
- ~ Les deux principales voies oncogéniques impliquées dans les mélanomes sont la voie **B-Raf** et la voie **C-kit** ; elles sont **exclusives**

1) Voie RTK – Ras – B-Raf

- ~ Voie activée de façon permanente, hyperactivée dans les tumeurs à cause de mutations somatiques des protéines impliquées
- ~ Mutation **en aval du RTK**
- ~ **40-50%** des patients sont B-Raf mutés
- ~ 90% des mutations concernent le **gène V600E** (les autres sont moins fréquentes et moins actives)

2) Voies C-kit

- ~ C-kit est un **RTK** particulier
- ~ **2-6%** des mutations des mélanomes malins
- ~ Voie surtout hyperactive dans les sites **acro-lentigineux** (10-20%)

3) Autres voies

- ~ Voies de **CDKN2A / p16** : impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire
- ~ Voie **β-caténine / MITF** : impliquée dans le développement et la survie des mélanocytes

4) Classification moléculaire des mélanomes

- ~ **Exposition solaire intermittente** : mutation **B-Raf**, mélanome à **extension superficielle (SSM)**
- ~ **Exposition solaire chronique** : mutation **C-kit**, mélanome de **Dubreuilh**
- ~ **Exposition solaire faible** : mutation de **C-kit** ou **B-Raf**, mélanome **acro-lentigineux**

V. THERAPIES CIBLEES

- ~ Intérêt de chercher des inhibiteurs spécifiques des protéines mises en jeu
- ~ Il existe une **corrélation** entre la **présence des mutations B-Raf ou C-kit** et la **réponse aux thérapies** ; on augmente la probabilité de réponse aux traitements en identifiant les patients porteurs de ces mutations : c'est la **médecine personnalisée**. On **évite** ainsi une **toxicité inutile** pour les patients susceptibles de ne pas répondre aux traitements
- ~ Jusqu'à l'arrivée des thérapies ciblées, on utilisait principalement deux molécules et la chimiothérapie, mais il n'y avait guère de différence avec l'évolution naturelle des mélanomes sans traitements. Depuis ont été découverts des thérapies ciblées des mutations C-kit et B-Raf qui ont pallié à cette impasse thérapeutique
- ~ **Résultats encourageants** des études faites au sujet des thérapies ciblées
- ~

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Réponse rapide	Développement d'un carcinome épidermoïde
Disparition des métastases	Résistance aux inhibiteurs de B-Raf car cette protéine n'est pas la seule responsable
Diminution de la tumeur	Toxicité cutanée
Taux de rémission globale ↗	Evolution plus agressive chez les patients non mutés



- ~ Résultats spectaculaires qui permettent de **sortir de l'inefficacité thérapeutique**
- ~ Caractère crucial du **phénotypage B-Raf**, car le traitement entraîne une **évolution plus agressive chez les patients B-Raf sauvage**

VI. TECHNIQUES DE DETECTION DES MUTATIONS

1) Exemple du gène C-kit : séquençage direct

a) Diagnostic histologique

- ~ Evaluer le **pourcentage** de **cellules tumorales**

b) Extraction de l'ADN tumoral

- ~ **Macrodissection** sur bloc de **paraffine**, après repérage de la zone d'intérêt (enrichir le prélèvement en cellules tumorales)
- ~ **Coupes entières** (biopsie fixée au **formol**)

c) Amplification de l'ADN tumoral extrait

- ~ **PCR**
 - o **Digestion enzymatique** par endonucléase de restriction
 - o **Dénaturation** de l'ADN
 - o Préparation de deux **sondes nucléotidiques** complémentaires des extrémités de la séquence cible
 - o **Hybridation** : ajout des sondes en excès
 - o **Extension** : synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces
 - o **Dénaturation** des duplex néoformé
- ~ **Migration** sur **gel d'acrylamide** : présence d'une bande d'amplification à la taille attendue

d) Détection de la mutation (biomol) : séquençage direct

- ~ **Réaction de séquence**
 - o Même principe que le PCR : utilise des ADN polymérase pour synthétiser un brin complémentaire d'ADN à partir d'un brin matrice
 - o Mais incorporation de **nucléotides marqués** : les **didésoxyribonucléotides** (ddNTP) en plus des sNTP (∅ gpt OH, incorporés dans la séquence, 1 ddNTP / chaque base, terminateurs de chaîne)

~ Séquenceur Abiprism

- o Emission d'un **pic de fluorescence**
- o **Couleur spécifique** à chaque **base**
- o La **taille** des fragments obtenus est déterminée par **chromatographie**
- o Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise
- o Le résultat est présenté par la machine sous forme de **courbes**, présentant la fluorescence détectée, et l'**interprétation** est faite en termes de **nucléotides**

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Recherche globale des mutations	Long, fastidieux
Séquence d'une grande zone d'intérêt	Non ou partiellement automatisée
Permet de détecter de nouvelles mutations	

2) Exemple du gène B-Raf : pyroséquençage

a) Diagnostic histologique

- ~ Evaluer le **pourcentage** de **cellules tumorales**

b) Extraction de l'ADN tumoral

- ~ **Macrodissection** sur bloc de **paraffine**, après repérage de la zone d'intérêt (enrichir le prélèvement en cellules tumorales)
- ~ **Coupes entières** (biopsie fixée au **formol**)

c) Amplification de l'ADN tumoral extrait

- ~ **PCR**
 - o **Digestion enzymatique** par endonucléase de restriction
 - o **Dénaturation** de l'ADN
 - o Préparation de deux **sondes nucléotidiques** complémentaires des extrémités de la séquence cible
 - o **Hybridation** : ajout des sondes en excès
 - o **Extension** : synthèse des brins à partir des sondes hybridées servant d'amorces
 - o **Dénaturation** des duplex néoformé

- ~ Migration sur gel d'acrylamide : présence d'une bande d'amplification à la taille attendue
- d) Détection de la mutation (biomol) : pyroséquençage**
- ~ Synthèse d'un brin complémentaire à partir d'un brin matrice
- ~ Introduction des nucléotides l'un après l'autre ; si le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse (d'élongation), et on a libération d'un signal lumineux (par un processus enzymatique), qui est capté et qui va donner un pic sur le pyrogramme, dont la hauteur est fonction de l'intensité du signal lumineux
- ~ Déduction de la séquence à partir de la taille des pics obtenus
- ~ La séquence que l'on cherche est prédéterminée par le logiciel

- o Médecin prescripteur, labo de pathologie responsable du prélèvement
- o Nature du prélèvement, conditionnement (diag histo, site anatomique, % de cellules tumorales)

- ~ Techniques utilisées
 - o Pour l'ADN : extraction ADN, quantité et qualité
 - o Seuils de détection de la technique utilisée et les différentes mutations recherchées
- ~ Les résultats
 - o Nomenclature internationale
 - o Absence de mutation ± réserve en cas de faible % de cellules tumorales
 - o Résultats non interprétables : impossibilité d'amplification de l'exon ou de séquences illisibles
 - o Etude moléculaire impossible : matériel insuffisant
- ~ Prédications thérapeutiques de réponse au traitement associé à chaque mutation
- ~ Signataires et date

AVANTAGES	INCONVENIENTS
Séquence en temps réel, rapide	Détection ciblée
Simple	Ne permet pas de trouver de nouvelles mutations
Robuste	
Sensible	
Automatisé	

3) Intérêts de la recherche de mutations

- ~ Dans les thérapies moléculaires ciblées :
 - o Réponse aux inhibiteurs de B-Raf si B-Raf muté
 - o Réponse aux AC monoclonaux si C-kit muté
 - o Les mutations de B-Raf et de C-kit sont activatrices
 - o Pour B-Raf, on met en évidence la mutation V600E ; pour C-kit on est contraint de rechercher la présence de mutations dans plusieurs zones
 - o Traitements nocifs si absence de mutations (préférer la chimioT)
- ~ Meilleure réponse thérapeutique si génotype identifié : cibler les patients
- ~ Détections des mutations de résistance secondaire
- ~ Mais pas de consensus établi pour les indications (essais cliniques)

❖ Compte rendu type de biologie moléculaire

- ~ Renseignements cliniques
 - o dates de prélèvement, de prescription, de la demande d'analyse moléculaire, d'analyse des séquences

