

Mots clés :
mélanome, BRAF,
C-Kit, mutation,
thérapie ciblée.

Keywords :
melanoma, BRAF,
C-Kit, mutation,
target therapy.

Prise en charge du mélanome par le pathologiste et thérapies ciblées au stade métastatique

Résumé

Le mélanome au stade métastatique est de très mauvais pronostic. Auparavant, les traitements reposant sur la chirurgie, l'immunothérapie et la chimiothérapie (CT) n'ont pu améliorer de façon significative la survie. Récemment, de nombreuses études portant sur la carcinogénèse du M ont permis de développer de nouvelles thérapies. En 2002, Davies a montré que 40 % des M présentaient une mutation du gène BRAF, et, le développement d'une thérapie ciblée (TC) anti-BRAF a pour la 1^{re} fois démontré une efficacité significative de la survie chez les patients métastatiques. Par la suite, il a été découvert que de nombreux gènes (CKIT, NRAS, CDKN2a, CDK4) étaient impliqués à un stade précoce de la survenue du mélanome. Cet article fait le point sur les connaissances actuelles de la carcinogénèse du mélanome, et illustre le rôle du pathologiste dans la prise en charge des MM et son implication dans les tests prédictifs de traitement (TC). De nombreuses molécules visant des cibles thérapeutiques impliquées dans la carcinogénèse du M sont en cours de développement et vont probablement enrichir le panel thérapeutique.

Introduction

Bien que le mélanome ne représente qu'environ 1 % des cancers cutanés, il est responsable de 75 % des décès pour ces cancers. L'agressivité est liée au fort potentiel métastatique du M (survie de 8 à 18 mois). Récemment, il a été démontré que plusieurs gènes étaient impliqués dans la survenue du mélanome, et, que leur mutation intervenait à des stades précoces de leur développement. La mutation du gène BRAF est la plus fréquente et joue un rôle prépondérant dans la carcinogénèse du M. Les patients porteurs de la mutation bénéficient d'une TC anti-BRAF (Vemurafenib®).

Épidémiologie

L'incidence des mélanomes cutanés varie selon les pays, l'ethnie, l'âge, le sexe et le mode de vie. Sa fréquence est en hausse. En Europe, le taux annuel des nouveaux cas est d'environ 10/100 000 individus. Le rapport de l'INCa 2013 (x) estime environ 11 000 nouveaux cas en France en 2012. Le M survient chez l'adulte (pic de fréquence 40-49 ans) avec une légère prédominance féminine. Il est

Abstract

The metastatic melanoma is very poor prognosis. Previously, treatments based on surgery, immunotherapy and chemotherapy (CT) were unable to improve significantly the survival. Recently, many studies on carcinogenesis M led to the development of new therapies. In 2002, Davies showed that 40% of M had a mutation in the BRAF gene, and the development of a targeted therapy (TC) anti-BRAF for the first time demonstrated significant efficacy in survival in metastatic patients. Subsequently, it was discovered that many genes (CKIT, NRAS, CDKN2A, CDK4) were involved at an early stage of the occurrence of melanoma. This article focuses on current knowledge of melanoma carcinogenesis, and illustrates the role of the pathologist in the management of MM and its involvement in tests predictive of treatment (TC). Many molecules for therapeutic targets involved in carcinogenesis M are under development and will probably enhance the therapeutic panel.

rare avant la puberté (plutôt sur naevus congénital). Des cas exceptionnels sont décrits à la naissance. Des mélanomes multiples contemporains ou non (jusqu'à plus de 15 ans d'intervalle) se voient dans un peu moins de 5 % des cas. Les patients qui ont présenté un mélanome auraient 25 % de risque de développer un autre mélanome.

Facteurs de risque

Dans la survenue des mélanomes on distingue :

- les facteurs de risque externes, liés à l'environnement, aux modes et conditions de vie. L'exposition au soleil et aux UV artificiels (lampe de bronzage) est un facteur majeur dans le développement des cancers de la peau. On estime que deux tiers des mélanomes sont dus à une exposition excessive au soleil, en particulier chez les personnes à la peau claire (phototype I et II), et, notamment en cas d'exposition durant l'enfance (« coup de soleil »). Les mécanismes de développement des cancers ne sont pas connus avec précision, on sait cependant que les rayons UV, en cas d'exposition excessive, entraînent des cassures de l'ADN et des mutations cellulaires irréversibles.

Auteurs



Joël CUCHEROUSSET

Anatomopathologiste,
chef de service au GH
le Raincy-Montfermeil.
jcucherousset@
ch-montfermeil.fr

Coécrit avec :



Nahla CUCHEROUSSET

Anatomopathologiste,
CHU Paul Brousse
Villejuif.
nahla.cucherousset@bct.
aphp.fr

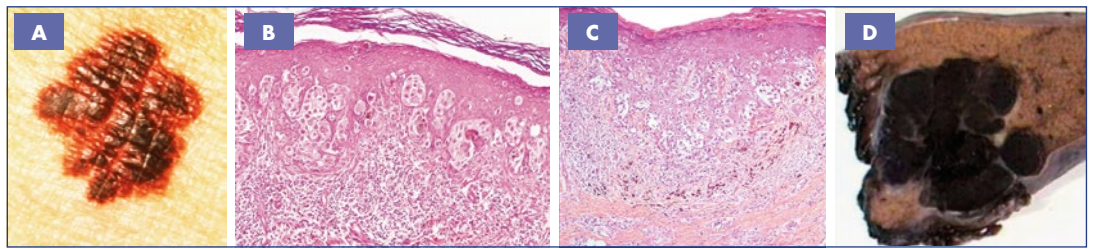


Figure 1 : **A** Mélanome SSM – photo peau, **B** SSM histologie HES, **C** Régression (fibrose avec mélanophages en profondeur), **D** Métastase pulmonaire de MM Régression (fibrose avec mélanophages en profondeur).

- les facteurs de risque internes, constitutifs des individus :
 - le mélanome familial ou héréditaire (au moins 2 mélanomes dans une même famille) ;
 - le mélanome développé sur *naevus* préexistant (25 %).

Embryologie et origine des mélanocytes

Les mélanocytes dérivent de la crête neurale, puis vont migrer vers la peau, les annexes cutanées, les muqueuses, l'œil (rétine, cellules de la choroïde et de l'iris) et les leptoméninges. Seuls les mélanocytes de la peau et des muqueuses élaborent la mélanine de façon continue et la transfère quasi complètement aux kératinocytes, constamment renouvelés. Les autres cellules mélanogènes ont acquis leur pigmentation définitive dès la naissance ou peu après.

Les mélanocytes siègent dans la couche basale épidermique (1 mélanocyte/10 voire 4 kératinocytes selon la race, environ 2 000/mm²). Ils sont plus nombreux sur la face et les organes génitaux, les bulbes pileux, la couche basale de l'épithélium malpighien des muqueuses (génitales, anales, buccales, nasales et œsophagiennes).

Diagnostic histologique

Quatre-vingt quinze pour cent des mélanomes sont d'origine cutanée.

Les mélanomes cutanés primitifs naissent soit sur *naevus* préexistant (congénital ou acquis) ou « *de novo* » en peau saine. Ils se développent soit en 2 temps (phase horizontale puis verticale), soit en même temps (verticale et horizontale).

La classification histologique (Sydney 1972) distingue 4 formes et 4 sous-types :

- formes avec composantes intra-épidermiques, 4 types :
 - SSM (*Superficial Spreading Melanoma*) sont les plus fréquents (60 à 65 %) (**figure 1**),
 - le mélanome de Dubreuilh (*Lentigo Malignant Melanoma*) ou HFM (*Hutchinson Melanotic Freckle-Melanoma*) du sujet âgé (5 à 12 %), ALM (*Acral lentiginous Melanoma*) ou mélanome acrolentigineux ou palmo-plantaire, péri-unguéal et des muqueuses (2 à 13 %), mélanome avec composante latérale inclassable (< 10 %).
- formes sans composante latérale : mélanome nodulaire (*Nodular Melanoma*), 10 % ;
- mélanome non classables (1 à 2 %).

L'histopronostic des mélanomes primitifs est corrélé à leur évolution et risque métastatique, 5 critères sont définis :

- l'épaisseur maximale (Breslow) ;
- l'ulcération ;
- les phénomènes de régression ;
- la profondeur d'invasion (niveau de Clark) ;
- l'activité mitotique.

Les 3 premiers critères ont un impact pronostic et guident la prise en charge thérapeutique.

Pour faire le diagnostic des M primitifs la morphologie peut être suffisante. En revanche, l'immunohistochimie (IHC) est indispensable pour le diagnostic de métastases, notamment en l'absence de notion de M primitif connu ou régressif, afin de les différencier des T primitives ou métastatiques d'autres origines : T indifférenciées (carcinomes, sarcomes, lymphomes...), T à cellules rondes, T à cellules fusiformes, et, pour les métastases de mélanomes achromiques. Le panel d'anticorps (AC) à utiliser :

- dans un 1^{er} temps (S100+, CD45, CKAE1/3) ;
- puis en fonction du marquage : HMB45, MélanA, NF-, GFAP-, Desmine, Chromogranine A...

Les mélanomes sont S100+, HMB45+, MélanA+, NF-, GFAP-.

Oncogenèse et classification moléculaire des mélanomes

Les anomalies moléculaires initiales intéressent les gènes BRAF (V600E), CKit, NRas, CDKN2A, CDK4 soit des mélanocytes ou des cellules souches progénitrices qui vont donner naissance au *naevus* (phase réplivative). Puis c'est l'apparition d'anomalies moléculaires secondaires, modifications d'oncogènes : CCND1, MYB1, RREB1 entraînant l'instabilité génique et le passage à la sénescence réplivative (phase prolifératrice). Les mutation BRAF (V600E), CKit, NRas sont des mutations oncogéniques d'intérêt théranostic^[1,2].

Vvajapeye et coll. démontrent que les mélanomes mutés BRAF perdent la capacité à exprimer l'IGFBP7 nécessaire au maintien des cellules en sénescence réplivative.

De nombreux travaux ont contribué à faire progresser les connaissances sur la génétique moléculaire des mélanomes. La technique d'hybridation génomique comparative (CGH), notamment, a permis l'ébauche d'une classification moléculaire qui se calque en partie sur la morphologie^[4], proposant 3 grands groupes :

- les M liés à une exposition solaire intermittente (coup de soleil sur peau habituellement non exposée) sont les plus fréquents, en majorité de type histologique SSM, associés à des mutations de BRAF ou NRAS ;
- les M liés à une exposition solaire chronique (effet cumulatif) sont plutôt de type M de Dubreuilh/*lentigo melanoma*/LMM, et, sont associés à des mutations de BRAF.

- Les M liés à une exposition solaire minime (région palmo-plantaire) sont de type acrolentigineux (*acral lentiginous melanoma*, ALM), de même que le groupe des mélanomes des muqueuses (zones non exposées) sont associés à des anomalies complexes différentes. Les gènes CK1t et cycline D1 sont fréquemment impliqués.

Le gène BRAF

BRAF est une sérine/thréonine kinase codée par le chromosome 7q34 qui active les voies des MAPkinases/ERK (impliquées dans la prolifération, différenciation, survie, motilité cellulaire, angiogenèse), en réponse aux récepteurs à activité tyrosine kinase (TK), elle est activée par RAS.

Le gène BRAF comporte 18 exons, 40 % des M⁽¹⁾ présentent une mutation concernant majoritairement l'exon 15 du codon qui code pour la protéine V600E (97 %) siégeant dans le segment d'activation de la kinase (5 à 15 % p.V600K). La protéine V600E a une activité 500 fois supérieure à la protéine sauvage. Elle est exclusive de RAS et de Kit. Ces derniers étant également mutuellement exclusifs et peuvent être associés à une inactivation de PTEN.

Le pourcentage de mutations BRAF est fonction du type de mélanome primitif, et, apparaît lié à l'exposition solaire. Ainsi elle est observée dans :

- 49 % des SSM ;
- 41 % des M nodulaire ;
- 22 % des M de Dubreuilh ;
- 20 % des M acrolentigineux ;
- 5 % des mélanomes extracutanés – aucune mutation n'a été révélée dans l'uvéa.

De nombreuses tumeurs présentent une mutation de BRAF [carcinomes papillaires thyroïdien (49 %) ; histiocytoses LCH et ECD (50 %) ...]. Cependant, l'inhibition de BRAF apparaît plus efficace dans le M probablement :

- en raison du caractère prépondérant de cette voie dans le M ;
- dans les autres T d'autres voies de signalisation prennent rapidement le relais (Ex. colon). L'inhibition de RAF peut en effet induire l'activation de la voie des MAP Kinases (prolifération) de façon indépendante de RAS dans les cellules non mutées.

Les thérapies anti-BRAF dans le mélanome

En 2011, Chapman et coll.^(3,4) publient un essai de phase III randomisé (675 patients) comparant 2 groupes de malades : l'un traité par chimiothérapie (CT) conventionnelle par Dacarbazine et l'autre traité par Vemurafénib®. Il montre que les patients ayant une mutation BRAF V600E (> 50 %) présentent une réponse significative après 2 semaines de traitement : 84 % des patients sont vivants 6 mois après le début de l'étude contre 64 % pour les patients traités par Dacarbazine (figure 2). De même, la survie sans progression était supérieure (5,3 mois vs 1,6 mois). Cet essai a été à l'origine de l'ATU en 2011. Les dernières études cliniques⁽⁵⁾ montrant une médiane de survie de 13,6 mois contre 9,7 mois (Vemurafinib/Dacarbazine) ont permis d'obtenir l'AMM en février 2012. L'inhibition de BRAF entraîne des effets secondaires : 20 % des patients vont présenter des tumeurs cutanées bénignes ou malignes (kérato-acanthome, carcinome épidermoïde).

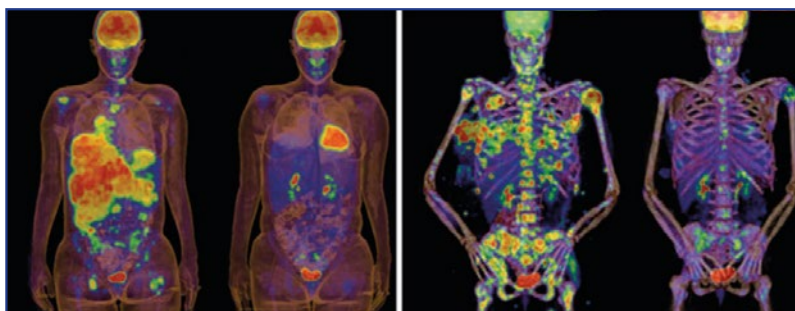


Figure 2 : Tep-Scan : images après 2 semaines de traitement par vemurafénib (étude de Chapman et coll.).

C-Kit

La mutation C-Kit est plus rare et concerne les mélanomes acrolentigineux et des muqueuses (peau non exposée). Ces M sont rares dans les populations à peau blanche, en revanche, il constitue le principal type dans les populations asiatiques. La mutation activatrice recherchée est la même que dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) et concerne principalement le domaine TK des exon 11 et plus rarement 13 et 17.

L'Imatinib est le traitement utilisé (comme pour les GIST).

Rôle de l'ACP

Lorsque le diagnostic de métastase de M est porté par le pathologiste, une recherche de mutation de BRAF doit être demandée. Étant donné qu'elle intervient à une phase précoce du développement tumoral (voir oncogenèse), et touche de façon homogène les cellules tumorales, elle peut s'effectuer indifféremment au niveau de la T primitive ou de la métastase. L'essentiel est de disposer de matériel de bonne qualité, avec une richesse en cellules tumorales suffisante, ce qui est souvent le cas. En effet, les métastases sont souvent riches en cellules tumorales et homogènes. Une macro-dissection est parfois nécessaire en cas de larges plages de nécrose tumorale. Une fixation au formol exclusive (à PH neutre) de durée suffisante (24 à 48 h) est une condition essentielle de la phase pré-analytique afin de permettre l'extraction d'un ADN de bonne qualité nécessaire à la fiabilité des techniques de BM.

Le matériel adressé aux plates formes (PF) de BM s'effectue soit par envoi de lames blanches (avec ou sans macro-dissection) ou soit par envoi de copeaux dans des tubes d'Eppendorf (*DNA free*) (figure 3).

L'IHC peut être utilisé pour la détection de la mutation de BRAF. L'AC monoclonal murin anti-BRAF muté V600E (clone VE1) a montré une sensibilité de 97 % et une spécificité de 98 %⁽²⁾ (figure 3 IHC).

Pour CKIT, un marquage franc en IHC peut être corrélé à la présence de mutations. L'AC anti-CKIT n'est pas aussi sensible que l'AC anti-BRAF.

Biologie moléculaire

La mélanine est un problème limitant l'extraction d'ADN qui a un effet inhibiteur, variable suivant les tumeurs, mais en général il est possible de s'affranchir de cette difficulté.



Figure 3 : **A** Prélèvement du ruban de paraffine sur lame. **B** Délimitation de la zone tumorale sur lame pour effectuer une macrodissection à partir du bloc. **C** Copeau dans tube Eppendorf pour extraction ADN. **D** IHC avec AC anti-BRAF : **1** aucun marquage (sauvage-wt), **2** marquage + : mutation BRAF.

Mutation de BRAF

La mutation gène BRAF est présente sur un seul allèle. La 1^{re} étape est une amplification par PCR des régions d'intérêt avec amorces spécifiques, puis identification de la mutation. Différentes techniques sont employées suivant les PF (« techniques maisons ») :

- le séquençage par la technique Sanger est la technique de référence préconisée par l'INCa. Elle utilise des dNTP fluorescents incorporés durant les phases de PCR, puis après purification, la lecture se fait par électrophorèse capillaire. On observe une mutation de type r c. 1799T > A , p.Val600Glu. Cette technique a une sensibilité de 20 % ;
- le pyroséquençage est plus sensible. Il s'agit également d'une technique PCR utilisant un primer avec incorporation des nucléotides 1 par 1 associée à une pyrophosphate qui en présence de sulfurylase va incorporer de l'ATP, la présence de luciférine va entraîner un signal lumineux qui est mesuré, ensuite le nucléotide est dégradé, puis injection d'une autre nucléotide et ainsi de suite. Puis interprétation du pyrogramme pour déterminer la séquence. Sa sensibilité (supérieure à la technique de Sanger) permet de détecter ≈ 5 % d'allèles mutés, et une quantification précise des allèles ;
- PCR en temps réel de type Taqman. C'est une technique PCR en temps réel qui amplifie un fragment d'ADN spécifique délimité par des amorces (sondes d'hydrolyse), elle permet une bonne discrimination entre allèles mutés et non mutés.

Les patients présentant la mutation BRAF sont éligibles pour la TC (inhibiteur de BRAF -Vemurafénib).

Mutation CKIT

Les mutations sont les mêmes que pour les GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales) et concernent les gènes KIT et PDGFRA. Le gène CKIT situé sur le chr4 (4q11q12) code pour une protéine TK transmembranaire, les principales mutations concernent les exons 9, 11, 13, 17 et pour PDGFRA les exons 12, 14, 18.

Discussion

Une étude suggère que l'évolution d'un mélanome pourrait se faire en 2 temps avec une 1^{re} phase d'invasion *in situ*, inaperçue (situation anatomique cryptique) et une 2^e phase invasive. Ces dernières années ont vu l'émergence de nouvelles molécules pour les formes métastatiques avec un bénéfice significatif sur la survie des patients. En particulier, le vémurafénib (inhibiteur de BRAF) et l'ipilimumab (anticorps monoclonal dirigé contre la protéine CTLA-4 située à la surface des lymphocytes cytotoxiques) ont apporté de nouvelles perspectives dans la prise en charge de ces cancers. D'autres molécules ou associations de molécules sont également en cours d'évaluation (ex : anticorps anti-PD1 ou anti-PDL1, inhibiteurs de MEK, associations d'inhibiteurs de BRAF et de MEK, inhibiteurs de KIT, etc.).

Conclusion

Pour la 1^{re} fois des thérapies ciblées apportent un espoir dans le traitement des mélanomes métastatiques dont le pronostic est resté longtemps l'un des plus péjoratifs.

Le rôle du pathologiste se situe à deux niveaux :

- confirmer le diagnostic de mélanome métastatique, parfois difficile en particulier dans les formes achromiques ;
- assurer une classification histologique de la tumeur primitive ayant un impact sur le type de mutation.

Ainsi la mutation du gène BRAF, la plus fréquente (40 %) doit être systématiquement recherchée, notamment pour les métastases des mélanomes de type SSM et de Dubreuilh. Celle de CKIT est beaucoup plus rare elle concerne les métastases des mélanomes de types acro-lentiginieux et des muqueuses, elle est plus fréquente dans certaines ethnies.

NB : Ce thème faisait partie du programme de la 3^e JPHG (Journée des Pathologistes des Hôpitaux Généraux), du 22 mars 2013 à Paris, CHU Hôtel Dieu. Nous remercions chaleureusement les Pr Karen Leroy et Nicolas Ortonne qui ont abordé ce sujet.

1. Davies MA et coll. *Oncogene* 2010 ; 29 : 5545-55.
 2. Long GV et al. *Am J Surg Pathol* 2013 ; 37 : 61.
 3. Romano E et coll. *Lancet Oncol* 2011 ; 1-6.
 4. Chapman P et coll. *NCI cancer* 2011, juin 2011.
 5. Chapman P et coll. *N Engl J Med*, 2011.
 6. Viros et coll. *Plos Med* 2008 ; vol5 : 0941-52.