

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2021

N°

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES Dermatologie - Vénérologie

par

Anouk SOENEN

Née le 5 avril 1991 à Joigny

Présentée et soutenue publiquement le 30 mars 2021

Evolution du Lentigo Maligna Score en microscopie confocale après un mois de traitement par imiquimod dans la prise en charge du mélanome de Dubreuilh

Présidente et directrice de thèse : Madame le Professeur Brigitte Dréno



UNIVERSITÉ DE NANTES

COMPOSITION DU JURY

Présidente du jury et Directrice de thèse : Madame Le Professeur Brigitte DRENO

MEMBRES DU JURY :

Madame Le Professeur Brigitte DRENO

Madame Le Professeur Lise BOUSSEMARY

Monsieur Le Professeur Olivier MALARD

Madame Le Docteur Morgane VOUREC'H



REMERCIEMENTS AUX MEMBRES DU JURY

A Madame le Professeur Brigitte Dréno,

Vous me faites l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous remercie pour votre soutien et votre implication dans la réalisation de ce travail qui ont permis son aboutissement. Je vous remercie également pour tout ce que vous m'avez appris tout au long de mon internat.

A Madame le Professeur Lise Boussemart,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Vos compétences en oncodermatologie et la justesse de vos remarques apporteront un jugement pertinent à ce travail.

A Monsieur le Professeur Olivier Malard,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde estime.

A Madame le Docteur Morgane Vourc'h

Merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de ta présence. Ton aide précieuse tout le long de mon internat, tes compétences et ta passion pour la microscopie confocale m'auront beaucoup appris. Merci pour tout.



REMERCIEMENTS

Du service de dermatologie du CHU de Nantes

Merci à tous les médecins du service de dermatologie du CHU de Nantes.

A Hélène, pour ton soutien et pour toutes les connaissances que tu transmets au quotidien. A Sébastien, pour toute ton aide pour la réalisation de mon mémoire et pour ta pédagogie sans limite. A Claire, pour tout ce que tu m'as appris aux consultations CeGGID et en allergologie. A Ibtiham pour tes conseils et tes encouragements. A Gaëtan, pour ton aide précieuse. Au Pr Quéreux, pour la qualité de vos enseignements. A Lucie et Mélanie pour votre soutien pour mes débuts en HDJ, votre gentillesse et votre humour.

A mes chefs de clinique, sans qui mon internat n'aurait pas été le même : Marie, Anne, Cécile, Charlotte et Sarah.

Merci à toute l'équipe ASH, aide-soignante et infirmière.

Merci particulièrement à Isabelle, de la première visite en HDS à maintenant, tu m'as tant appris. Merci à Françoise et à Laurence, vous avez changé mes journées d'HDJ ! Merci à Séverine, Chloé, Virginie et toutes celles que je ne peux pas citer par manque de place.

Merci à Isabelle B pour ton humour et tes gâteaux, à Evelyne, à Nathalie et à toutes les autres.

Merci à Mylène, pour ton soutien, ton écoute et tes bons plans nantais. Merci particulièrement à Carole et Elodie, pour votre aide précieuse et toutes nos (nombreuses) conversations.

Travailler à vos côtés a été un réel plaisir durant ces 5 années. Merci pour tout.



UNIVERSITÉ DE NANTES

Du service de médecine polyvalente au CH de Saint-Nazaire

Merci à Albane, Fanny, Pauline et Sanda pour vos connaissances, votre enthousiasme et vos qualités humaines. Vous m'avez tant appris.

Du service de cancérologie à l'ICO Gauducheau de Saint-Herblain

Merci à tous les médecins et à toute l'équipe paramédicale qui ont fait de ces 6 mois un tournant dans ma vie.

Du service de médecine interne du CHU de Nantes

Au Pr Hamidou, pour votre savoir inépuisable et pour votre bienveillance.

A Cécile, à Olivier et à Jérôme pour votre enthousiasme, vos qualités humaines, vos connaissances et votre goût pour les transmettre.



REMERCIEMENTS PERSONNELS

A tous mes co-internes :

Aux dermatos : Cécile F, Justine, Louise, Barbara, Charlotte, Edouard, Marion, Solène, Sarah, Diane, Estel, Camille S, Fanny, Camille B, Marie P, Romain, Marie-Emeline, Noémie, Marie S, Edgar-Pierre et Casandra. Merci pour tout ! Vous avez fait de mon internat, 5 années de folie. Merci à Eve, mon binôme allergo/dermato, que de fous-rire... ! Tu es un vrai rayon de soleil.

Merci à ma Berthille, tu m'es si chère et merci à mon Guigui : Samba di djeumbé !

Merci ma Laurette pour nos covoiturages, nos restos, nos badmintons endiablés et nos racines icaunaises ! Merci ma Lina pour nos questions philosophiques (et ton couscous !).

A la promotion 2015 et leurs « +1 »

Ma Kékile, je pourrais te mettre dans toutes les cases de mes remerciements tellement tu peux aller dans chacune d'elles ! Merci la corposki de nous avoir fait rencontrer. Merci d'être là et d'être toi.

Mon Microbe et ma Perrinette, merci d'avoir choisi Nantes en 2015, là où tout a commencé. Le pois chiche band a de longs jours devant lui.

Merci à Quentichou, à Antho et à Oussama, pour votre patience, votre recul et votre humour. Vive les cotillons, les sèche-cheveux et les vélos !

Et merci ma Lison d'avoir fait de mes meilleurs amis, une famille.



Aux dijonnais :

Mon PLF, tu sais déjà tout. Je remercie notre AAA de nous avoir permis de nous rencontrer. J'ai tant de souvenirs avec toi : du café vanille, à nos toilettes préférées en passant par les buffets sucrés/salés (et le ballotin de haricots verts !) Merci d'être toi et d'être là.

Ma Estelle/Rathichoucroute, ma Adou, ma Peuchot, ma Alice, ma Soso, ma Isa, ma Jeanne : merci pour tout. Vous rencontrer a été à l'origine de tellement de souvenirs : nos apéros/soirées, nos vacances, nos potins. Longue vie à notre amitié !

Mon bichon, mon Moreno et ma Chomimille. De notre voyage australien en van, en passant par les TP de biochimie, notre rêve de soirée-jambon et nos dîners presque parfaits... Que de souvenirs. J'espère que l'on se verra un peu plus désormais.

Aux toucycois :

Ma Elo et Arthur, merci pour les soirées jeux et vive les charlatans !

Ma Fio et Jo', merci pour tous nos papotages (et vos avis toujours éclairés !), nos balades taingycoises ou toucycoises.

Ma Clo, ma Mimille, ma Zouk : merci pour tout. Merci de faire partie de ma vie. Vous êtes des vraies perles et de supers tantines.

A ma Charlouk, mon poivron. Merci d'être là malgré la distance. Merci à nos parents d'avoir choisi la crique pour y poser leur rabane. En espérant que 2021 soit l'année d'un énorme débriefing sur le rocher des vautours !



Aux Chambons

Merci à Sandrine et Daniel de m'avoir si bien accueillie dans votre famille depuis plus de 13 ans. Merci pour tout.

Merci à Jeannine, Paul et Claudio, merci pour tous les repas, pour toute votre gentillesse et pour votre soutien.

Ma Juju, ma deuxième sœur, merci d'être toi ! Merci pour ton soutien, tes histoires improbables, pour tout ce que tu es. Merci mon Paulo pour tes conseils avisés (en informatique ou autre !).

Tom et Emma, merci pour nos papotages du week-end, merci d'être les tata/tonton que vous êtes.

A ma famille :

Merci à mon TTM et ma TTM.

Merci Mamie pour ton soutien, ta fierté et tous les kinders que tu m'as donnés petite !

A Papou, Mémé et Papa. J'espère que vous êtes fiers de moi.

A Camille, ma Bibille, merci pour tout ! Merci pour ton soutien permanent, pour les conférences téléphoniques quotidiennes, pour être si drôle en toute circonstance, tu es la meilleure sœur que je puisse avoir.

A mon Doudou, le plus beau, gentil et drôle doudouchon : je suis si heureuse d'être ta tata !



Merci Dada, notamment pour tous tes conseils d'herboriste avisé.

A Maman, ma Banban. Je ne sais pas ce que je ferais sans toi. Merci de me soutenir et de m'écouter quotidiennement, d'être si drôle... Tu es mon modèle ! Merci pour tout ce que tu es et tout ce que tu fais pour moi : si j'en suis là aujourd'hui c'est grâce à toi avant tout.

A Stanislas, mon Stan. La vie est si belle à tes côtés. Merci d'être toi, d'être là chaque jour, de m'écouter et de me faire rire. Je mesure chaque jour la chance que j'ai de t'avoir dans ma vie. Merci d'être un papa si exceptionnel.

A mon Lou, merci de m'avoir choisie pour être ta maman. Depuis toi, ma vie a pris tout son sens.



TABLES DES MATIÈRES

Composition du Jury	1
Remerciements	3
Liste d'abréviations	10
I- INTRODUCTION	11
a- Généralités sur le mélanome de Dubreuilh	11
b- La microscopie confocale par réflectance in vivo	13
<i>Principe général</i>	13
<i>LM score</i>	15
c- Les traitements du mélanome de Dubreuilh	18
<i>Chirurgie</i>	18
<i>Imiquimod</i>	20
<i>Autre traitement</i>	22
d- Objectifs	23
II- ARTICLE : Lentigo maligna score modification in Reflectance Confocal Microscopy after one month of imiquimod in lentigo maligna management	24
III- CONCLUSION	47
IV- BIBLIOGRAPHIE	49



LISTE D'ABRÉVIATIONS

BM	Benign Macules
CD8	Cytotoxic T lymphocyte
CXCL10	CXC Chemokine Ligand 10
CXCR6	CXC Chemokine Receptor 6
F	Female
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IFN	Interferon
LM	Lentigo Maligna
LMM	Lentigo Maligna Melanoma
LMS	Lentigo Maligna Score
M	Male
MCR	Microscopie Confocale par Réflectance
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
OR	Odds Ratio
PD-1	Programmed cell Death 1
PD-L1	Programmed cell Death Ligand 1
RCM	Reflectance Confocal Microscopy
SD	Standard Deviation
SSM	Superficial Spreading Melanoma
TH	T-Helper
TLR	Toll-Like Receptor



I- INTRODUCTION

a) Généralités sur le mélanome de Dubreuilh

La mélanose de Dubreuilh, appelée Lentigo Maligna (LM) dans la littérature est une prolifération mélanocytaire maligne s'étendant dans la couche basale de l'épiderme. Cette prolifération peut devenir invasive en infiltrant le derme le long des follicules pileux, ce qui correspond au mélanome sur mélanose de Dubreuilh ou Lentigo Maligna Melanoma (LMM). Le LMM peut alors métastaser avec, dans ce cas, un pronostic comparable aux autres types de mélanomes. Dans la plupart des cas, le LM reste in situ pendant plusieurs années avant de devenir invasif (1).

Les LM et LMM diffèrent des autres mélanomes et notamment du mélanome à extension superficielle, Superficial Spreading Melanoma (SSM), par leur évolution, leurs caractéristiques histologiques ou encore leur génétique. Ils nécessitent une prise en charge spécifique et adaptée.

Le LM est considéré comme un précurseur du LMM. Le LMM représente entre 4 et 15% de tous les mélanomes invasifs (1).

Le taux de LM évoluant en LMM est difficile à estimer. Dans une étude récente, le risque cumulé de développer un LMM après un LM est estimé à 2 % pour les hommes et à 2,6 % pour les femmes après un suivi de 25 ans (2).

Diverses études ont décrit une incidence accrue de LM au cours des dernières années (de 0,54 LM/100 000 patients-années à 1,99 LM/100 000 patients-années) (3)(4).

Cliniquement, le LM correspond en général à une macule pigmentée hétérogène avec une bordure irrégulière. Ils siègent avec prédilection sur les zones photo-exposées : le visage et notamment les joues, le cuir chevelu, le dos des mains chez les patients caucasiens et âgés. Leur taille est très variable, souvent plus étendue que les autres types de mélanomes. En moyenne,



leur diamètre est de 15 mm avec des extrêmes entre 4 et 40 mm (5). Leurs limites sont très difficiles à définir. En effet, la prolifération mélanocytaire périphérique anormale peut passer inaperçue cliniquement étant parfois très peu pigmentée voire achromique. Selon certaines études, la surface lésionnelle évaluée cliniquement peut ne représenter que 40% de la taille définitive de la lésion (6).

Hormis l'aspect clinique, plusieurs outils diagnostiques peuvent être utilisés pour aider le praticien : la dermatoscopie notamment et la microscopie confocale par réflectance in vivo.

Dans les années 2000, Stolz et al. ont défini les principaux signes dermoscopiques du LM (7). Quatre types d'images sont significativement retrouvés dans les LM avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 96% : images en grains de poivre, images en grains gris foncé, les structures rhomboïdales et les structures annulaires-granulaires. Les images en grains de poivre apparaissent précocement. Elles correspondent aux agrégats de mélanine dans les macrophages au niveau du derme superficiel. Quatre images successives correspondant à son extension périfolliculaire ont été décrites (figure 1). La première image correspond à l'apparition d'une hyperpigmentation des orifices folliculaires (extension des mélanocytes le long des annexes pilo-sébacées). Ensuite, des structures rhomboïdales se forment autour de cette hyperpigmentation. Puis, on observe une oblitération des orifices folliculaires et la densification de l'hyperpigmentation.

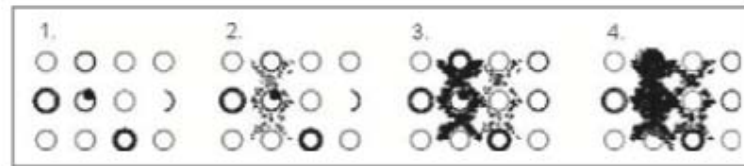


Fig 1. The four stages of the 'progression model for lentigo maligna', adapted from *Atlas de Dermoscopie*:¹⁹ (1) hyperpigmented follicular opening; (2) annular-granular pattern; (3) pigmented rhomboidal structures; and (4) obliterated hair follicles.

Figure 1 : Modèle de progression des images dermoscopiques du mélanome de Dubreuilh selon Stolz *et al.* (7)(8)

D'autres critères ont ensuite été décrits : la majoration du réseau vasculaire, l'apparition de structures rhomboïdales rouges et la présence d'une image en cible (8).

Malheureusement, d'autres études ont montré la présence de ces signes dans des lésions bénignes du visage notamment les kératoses actiniques pigmentées et kératoses lichénoïdes du visage (9)(10).

b) La microscopie confocale par réflectance in vivo

Principe général

La microscopie confocale par réflectance (MCR) est une technique d'imagerie cutanée non invasive inventée par Minsky en 1955 (figure 2). Elle permet d'obtenir des images horizontales de la peau in vivo avec une résolution cellulaire depuis l'épiderme jusqu'au derme superficiel, jusqu'à une profondeur de 200 à 300 microns. Le principe de la MCR repose sur la réflexion de la lumière par les molécules contenues dans la peau. L'utilisation de colorant n'est pas nécessaire. La source lumineuse est un laser focalisé par un objectif. La lumière émise par le laser est réfléchiée par le tissu puis recueillie et transmise à un détecteur après un passage par un diaphragme qui permet de recueillir sélectivement la lumière provenant de la région d'intérêt à

l'exclusion de la lumière des régions sus et sous-jacentes. L'image complète est ensuite reconstruite point par point par balayage du laser à la surface cutanée. Les images obtenues correspondent à des coupes horizontales d'une épaisseur de 5 microns parallèles à la surface cutanée, contrairement à l'histologie standard. Les images sont produites en niveaux de gris et mesurent individuellement 0,5 x 0,5 mm (11) (12) (figure 3).



Figure 2 : Vivascope® 1500 : microscope couplé à un dermatoscope (12)

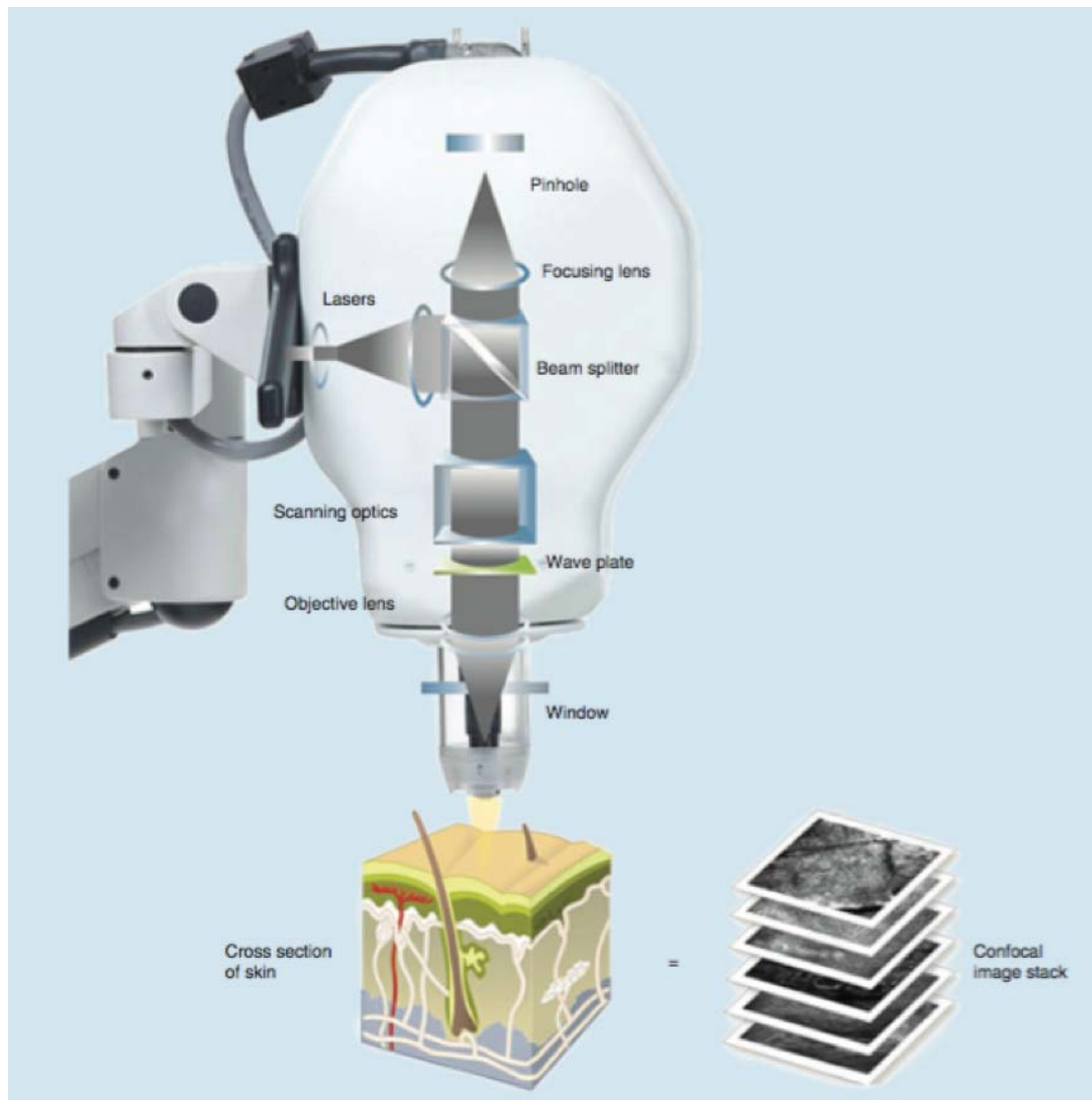


Figure 3 : Principes optiques de la microscopie confocale. (12)

LM score

Les critères en faveur du diagnostic de LM sont : au niveau de l'épiderme, la perte de l'architecture en nid d'abeille et la présence de cellules pagétoïdes rondes. A la jonction dermo-épidermique, la présence de papilles non bordées est évocatrice de LM. En MCR, Guitera *et al.* (13) ont analysé rétrospectivement et à l'aveugle 284 macules équivoques du visage (81 LM et 203 macules bénignes). Ils ont alors proposé un algorithme diagnostique de LM : le LM score.

Le score est composé de :

- 2 critères majeurs (chacun valant 2 points)
 - Papilles non bordées
 - Cellules pagétoïdes rondes et $> 20 \mu\text{m}$
- 3 critères mineurs (chacun valant 1 point)
 - Plus de 3 cellules atypiques à la jonction dans 5 images (figure 4)
 - Localisation folliculaire de cellules pagétoïdes et/ou de cellules atypiques jonctionnelles (figure 5)
 - Cellules nucléées dans les papilles dermiques
- 1 critère négatif (-1)
 - Réseau en nid d'abeille élargi

L'obtention d'un score ≥ 2 a une sensibilité de 93 % et une spécificité de 82% pour le diagnostic de LM (13).

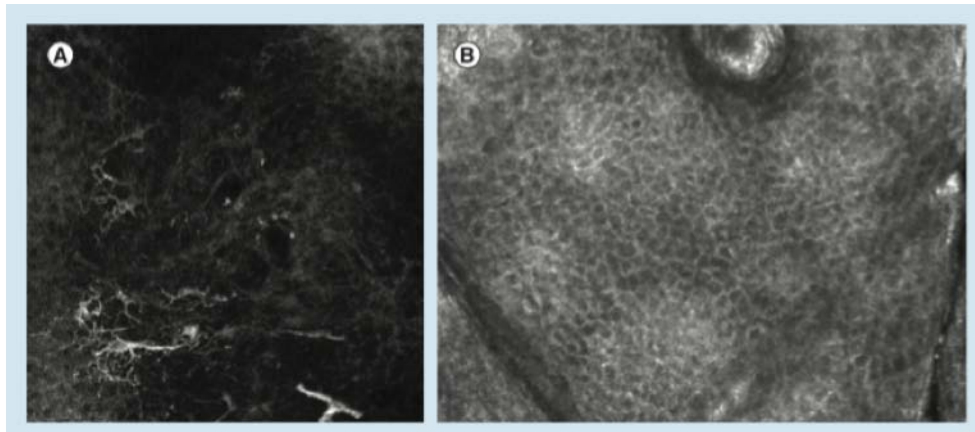


Figure 4 : (A) Grandes cellules dendritiques au niveau de l'épiderme superficiel comparé avec (B) : épiderme superficiel normal : patron en nid d'abeille. (12)

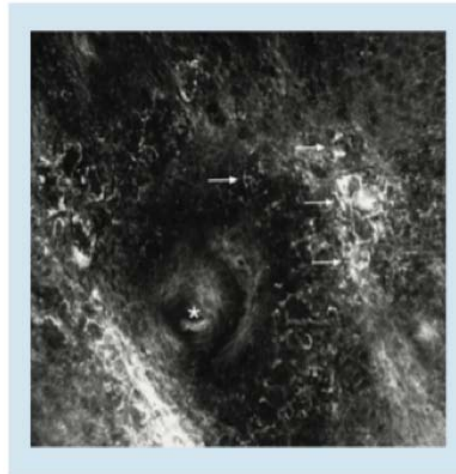


Figure 5 : Cellules atypiques autour des follicules pileux : image typique des LM correspondant au mélanocytes atypiques descendant le long du follicule pileux. (12)

La MCR peut également être un outil dans l'évaluation in vivo de l'extension réelle en surface et donc des marges tumorales d'un LM (14) (6).

Navarrete-Dechent *et al.* (15) ont réalisé une étude prospective sur 72 patients ayant un LM. Ils ont effectué un examen par MCR au niveau de la marge chirurgicale cliniquement définie suivi d'une intervention par étapes avec un contrôle des marges. Le résultat histologique a été corrélé aux résultats de la MCR. La précision diagnostique pour la détection du LM résiduel après biopsie avait une sensibilité de 96.7% et une spécificité de 66.7% par rapport à l'histologie. L'évaluation de la marge en MCR a révélé un accord global avec l'histologie finale à 85.9% (kappa 0.71 ; $p < 0.001$).

Dans une autre étude, Champin *et al.* (16) ont combiné la MCR et la technique chirurgicale des « spaghettis ». 33 patients ont été inclus : ils ont bénéficié d'une délimitation des marges guidée par un examen en RCM suivie d'une chirurgie employant la technique des « spaghettis » (technique qui consiste à analyser toute la zone marginale de la tumeur, excisée en bande). L'excision des premiers « spaghettis » dans une zone sans tumeur a été obtenue chez 28 des 33



patients. Dans les autres cas, la persistance des foyers de LM a été constatée sur moins de 5% de la longueur des « spaghettis ». Cette procédure permettait de définir avec précision les marges chirurgicales avec un faible taux d'excisions multiples.

La MCR a aussi un intérêt dans le suivi des patients atteints de LM, notamment le suivi sous traitement alternatif, chez ces patients pour qui la prise en charge standard est difficile (sujets âgés, présentant des comorbidités). Par exemple, Brand *et al.* (17) ont analysé le suivi en MCR de 34 patients atteints d'un LM et traité par imiquimod. 27 des 34 patients ont présenté une régression totale de la tumeur. Dans la zone traitée, le nombre de cellules atypiques a diminué de manière significative en MCR.

c) Les traitements du mélanome de Dubreuilh

Les difficultés de prise en charge thérapeutique du LM sont liées au terrain du patient (patients souvent âgés), à leur localisation (préférentiellement au niveau visage), à l'extension volontiers achromique de la lésion, à leur taille ainsi que leur tendance à récidiver.

Chirurgie

Le traitement de choix du LM et du LMM est la chirurgie. Selon les recommandations européennes, le traitement optimal de la LM est l'excision chirurgicale avec des marges de 5 à 10 mm (18), 10 mm en chirurgie classique et 5 mm en chirurgie micrographique de Mohs. Pour les recommandations américaines, les LM nécessitent des marges $> 0,5$ cm (19). L'exérèse en profondeur nécessite d'enlever l'hypoderme et l'ensemble des annexes, jusqu'au plan musculaire en conservant le fascia profond si cela est possible. Dans plusieurs études, les marges latérales à 5 mm semblent insuffisantes (20). En effet, la lésion histologique est parfois plus grande que les marges cliniques avec des mélanocytes atypiques présents au-delà de la lésion pigmentée (21). Dans ce contexte, le risque de rechute est important, ce qui conduit à des



chirurgies itératives (22). La rançon cicatricielle des interventions chirurgicales peut avoir des conséquences esthétiques et fonctionnelles importantes, notamment sur le visage. Le taux de récurrence après chirurgie classique est estimé à 8-20% (23). En 2003, Zalaudek et al. (24) ont montré sur une série de 1351 mélanomes in situ (LM et SMM in situ), opérés avec une marge de sécurité de 1cm que le taux de récurrence locale à 5 ans était de 6.8 +/- 1.3%.

Une revue systématique a considéré la chirurgie micrographique de Mohs comme le traitement le plus performant pour diminuer les récurrences des LM et des LMM (25). La chirurgie micrographique a pour but d'assurer l'exérèse complète du LM en sacrifiant un minimum de tissus sains. Elle s'effectue sur tissu congelé dans la plupart des cas. Concernant les LM, il est recommandé de pratiquer la technique de « slow-Mohs » avec inclusion en paraffine. En effet, la congélation rend plus difficile l'analyse histologique notamment pour le repérage des mélanocytes atypiques (26)(27). Des techniques de chirurgies micrographiques alternatives existent : chirurgie micrographique en collerette (28), technique du gâteau dite de Tubingen (28) ou encore la chirurgie micrographique en spaghetti (29).

La chirurgie de Mohs est associée au plus bas taux de récurrence après chirurgie dans la prise en charge du LM : entre 0.5 et 5% (23).

Dans leur étude, Hou *et al.* (30) ont comparé rétrospectivement la chirurgie conventionnelle et la chirurgie micrographique de Mohs. 423 LM ont été inclus : le taux de récurrence après la chirurgie conventionnelle était à 1.9% versus 5.9% après chirurgie classique.



Imiquimod

L'imiquimod est une seconde alternative dans la prise en charge du LM. C'est un traitement immunomodulateur topique appartenant à la famille des imidazoquinolines. Il présente une activité antivirale et anti-tumorale. Son activité anti-tumorale est expliquée par 2 mécanismes. Tout d'abord, il existe un mécanisme immunomodulateur qui par la stimulation des monocytes, des macrophages et des cellules dendritiques (via les récepteurs TLR7 et TLR8) entraîne l'activation du facteur nucléaire-kappa B (NF-κB). Cette activation conduit à une augmentation de la production d'interféron, de TNF et d'interleukines 2, 6, 8, 10, 12 stimulant ainsi la voie TH1 aux dépens de TH2. Ensuite, un mécanisme apoptotique est décrit : l'imiquimod active la voie des caspases (31)(32)(33).

L'efficacité de l'imiquimod pour le traitement des LM a été démontrée dans plusieurs études (34)(35)(36)(37). L'imiquimod est utilisé comme option de traitement alternatif lorsque la chirurgie n'est pas possible, notamment chez des patients âgés et/ou avec des lésions étendues, non résécables. L'imiquimod est parfois utilisé comme thérapie adjuvante (38) ou néo-adjuvante (35)(36).

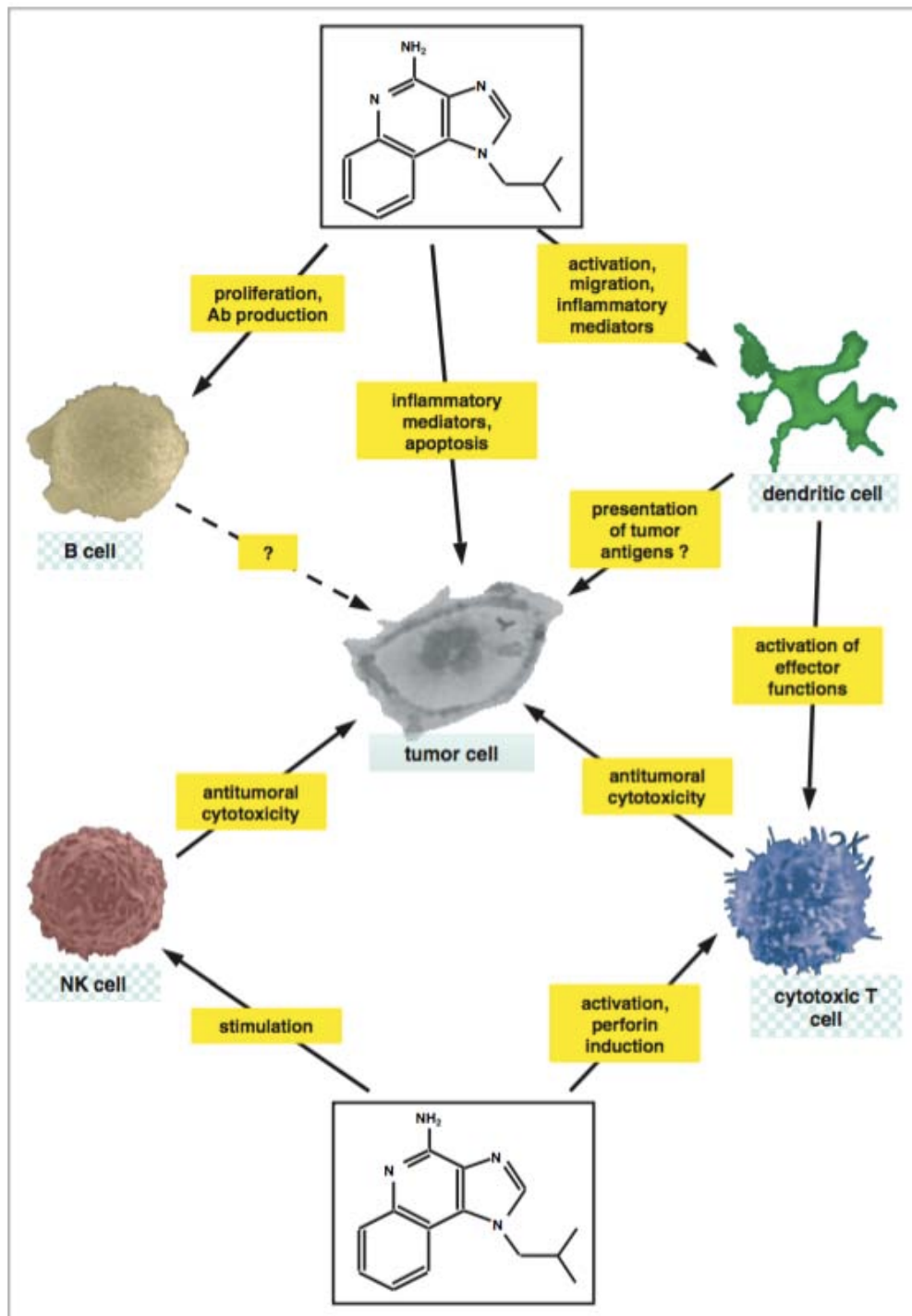


Figure 6 : mode d'action de l'imiquimod (31)

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la variabilité de la réponse au traitement par imiquimod dans le traitement du LM. Mora *et al.* (39) ont analysé 347 LM provenant de 45 études et ont ainsi montré un taux de régression tumorale histologique de 76.2% et un taux de



rémission clinique de 78.3%. Un traitement de plus de 60 applications (ou de 5 applications minimum par semaine) était significativement plus efficace (odds ratio, 8.4 [95% CI, 2.9-24.1] et odds ratio, 6.0 [95% CI, 2.4-14.7], respectivement). Induire une inflammation clinique semble corrélé à une meilleure efficacité du traitement. Dans leur étude prospective sur 24 patients, Kirtschig *et al.* (40) ont cherché à induire une inflammation cutanée pendant 10 semaines avec une application quotidienne d'imiquimod et ont obtenu une rémission complète histologique pour leurs 24 patients, avec une récurrence pour l'un d'entre eux. Dans leur essai contrôlé et randomisé, Hyde *et al.* (37) ont traité 91 patients atteints de LM par imiquimod en monothérapie ou imiquimod associé à du tazarotène en gel à 0.1% en se basant sur l'hypothèse que les rétinoïdes topiques pouvaient améliorer l'absorption de l'imiquimod par la perturbation de la couche cornée. Les patients traités avec la thérapie combinée avaient un taux de rémission histologique plus élevé que ceux traités avec l'imiquimod seul (78% contre 64%) mais cette différence n'était pas statistiquement significative.

Concernant la tolérance de l'imiquimod topique, Papanikolaou *et al.* (41) ont rapporté une réaction inflammatoire chez 29 des 33 patients inclus (88%), et parmi ceux-ci, 4 patients ont arrêté le traitement plus tôt que prévu parce que la réaction inflammatoire était intolérable. Dans leur étude, Tio *et al.* (42) ont décrit d'autres effets secondaires : des symptômes de type grippaux (11 patients), un lymphœdème de la joue (3 patients), des maux de tête (7 patients) et une conjonctivite stérile (3 patients) parmi les 57 patients inclus.

Autres traitements

D'autres traitements ont été rapportés dans la littérature pour le traitement du LM (23).



La radiothérapie est un traitement utilisé dans la prise en charge des LM (Grenz rays therapy et radiothérapie superficielle). En traitement adjuvant, le taux de récurrence moyen est estimé à 11.5% (suivi moyen de 20 mois) dans la méta-analyse de Read *et al.*

La cryothérapie/cryochirurgie consiste à l'application d'azote liquide permettant de détruire les mélanocytes en épargnant les kératinocytes.

Les lasers sont également utilisés et notamment le laser CO₂.

d- Objectifs

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude réalisant un suivi du LM score en MCR pendant le traitement par imiquimod versus placebo. De même, un profil immunohistochimique des patients répondeurs à l'imiquimod n'a pas été décrit dans la littérature.

L'objectif principal de notre étude était de comparer le LM score global en MCR avant et après un mois d'imiquimod par rapport au placebo. Trois autres objectifs secondaires étaient investigués. Premièrement, nous souhaitons identifier l'item ou le groupe d'items du LM score significativement modifiés après un mois d'imiquimod par rapport au placebo. Ensuite, nous voulions vérifier la concordance du diagnostic final et de l'évaluation des marges entre la MCR et l'histologie. Enfin, nous souhaitons identifier des facteurs immunohistochimiques corrélés à une diminution du score LM après un mois de traitement par imiquimod topique.



II) Article

Change in lentigo maligna score assessed by *in vivo* reflectance confocal microscopy after one month of imiquimod treatment for lentigo maligna management

A. Soenen¹, M. Vourc'h^{1*}, A. Khammari¹, JM. Nguyen², C. Bossard³, M. Denis Musquer³, B. Vergier⁴, B. Dréno¹

¹ Nantes University, Department of Dermatology, CHU Nantes, CIC 1413, CRCINA, Nantes university F-44000 Nantes, France

² Nantes University, Department of Epidemiology and Biostatistics, CHU Nantes, CRCINA, Nantes, France.

³ Nantes University, Pathology Department, CHU Nantes, CRCINA, Nantes, France

⁴ Bordeaux University, Pathology Department, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

* Groupe Imagerie Cutanée Non Invasive de la Société Française de Dermatologie

Submitted to the *Journal of American Academy of Dermatology*



Abstract

Background: Treatment of Lentigo Maligna (LM) is challenging because of the potential functional and esthetic surgical sequelae. Imiquimod has been proposed as an alternative treatment for LM. Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive tool used for the diagnosis of LM and margin assessment.

Objective: To compare the overall LM score assessed by RCM before and after one month of imiquimod compared to placebo and to define the immunohistochemical (IHC) profile of responders to imiquimod.

Methods: A controlled randomized study was conducted. Patients underwent a RCM examination with calculation of the LM score at baseline and after 1 month of treatment. An IHC analysis of excised tissues was performed.

Results: Forty patients were included. The 1-month LM score was significantly lower in patients treated with imiquimod compared to those treated with placebo ($p < 0.001$). The significantly different criteria were: non-edged papillae, large round pagetoid cells, atypical cells at the dermoepidermal junction, follicular location of atypical cells. The IHC analysis showed a higher level of Interferon gamma in the resected specimens of patients responding to imiquimod ($p = 0.04$).

Limitations: The sample size was small.

Conclusion: Assessing the LM score by RCM was useful to monitor accurately LM response to imiquimod.



Capsule summary

- Reflectance confocal microscopy (RCM) can help in the diagnosis of lentigo maligna (LM) based on the LM score and to better define the extent of the infraclinical lesion.
- Imiquimod treatment followed by an assessment of the LM score by RCM allow monitoring treatment response.

Introduction

Lentigo maligna^{1,2,3} has an increased incidence over the last few years.^{4,5,6} Because of its infraclinical spread^{10, 11}, its treatment is often challenging. Mohs micrographic surgery⁹ is not always available and 5mm margins or more^{7,8} can lead a substantial cosmetical burden.¹²

In cosmetic-sensitive areas, a complete margin assessment is of major importance. *In vivo* Reflectance Confocal Microscopy (RCM) is a non-invasive technique allowing imaging the skin with an almost cellular resolution. RCM allows characterizing pigmented cells since melanin and melanosomes appear bright.¹³⁻¹⁵ RCM is a reliable tool to diagnose LM with a specificity of 76% and a sensitivity of 85% using the LM score (LMS).^{16,17} Moreover, RCM has already been used to assess LM margins.¹⁸⁻²⁰

Imiquimod has been shown to be an appropriate alternative treatment when surgery is not feasible.²¹⁻²³ Imiquimod is a topical immunomodulator of the imidazoquinoline family with antiviral and antitumor activities.^{24,25}

The primary objective of this study was to compare the overall LMS assessed by RCM before and after one month of imiquimod treatment compared to placebo. Secondary objectives were



to identify the criteria of the LMS significantly changed after one month of imiquimod treatment compared to placebo, to assess the consistency between the RCM examination and the histology in terms of diagnosis and margin assessment, and to identify immunological factors correlated with a decreased LMS after one month of imiquimod treatment.

Material and methods

A prospective, placebo-controlled, randomized, RCM evaluator-blinded study was conducted in Nantes University Hospital between 2012 and 2019.

Subjects

Inclusion criteria were: patients ≥ 18 years with LM on the face, neck or scalp confirmed by cutaneous biopsy, with a lesion surface $\geq 1 \text{ cm}^2$ and $\leq 20 \text{ cm}^2$ and having signed an informed consent.

Exclusion criteria were patients with LM on the eyelids or invasive melanoma, patients with a lesion surface $< 1 \text{ cm}^2$ or $> 20 \text{ cm}^2$, patients with known allergy to the excipients of imiquimod, patients who underwent surgery or received another treatment for their LM, patients with active infection or HIV infection, patients treated with corticosteroids or immunosuppressors, and pregnant patients.

Patients were randomized to receive the placebo or imiquimod with 5 applications per week for 4 weeks.



Instrument and acquisition procedure

Confocal imaging was performed with a reflectance confocal laser scanning microscope (Vivascope® 1500 and 3000, MAVIG, Munich, Germany),¹³ that uses an 830nm laser source. Images were acquired and analyzed by a single observer (>5 years of experience), blinded to treatment and anamnestic data.

At the first visit (M0, before treatment), the lesion center was imaged with the Vivascope 1500. For each lesion, Vivacubes® were acquired to explore 3x3mm fields of view. Images were analyzed to identify LM features using the LMS.¹⁷ As described in table I, this algorithm is composed of 6 items. This score varies from -1 to 7: the diagnosis of LM is based on a $LMS \geq 2$ with a sensitivity of 85% and a specificity of 76%.¹⁷ The presence of inflammatory cells was also recorded.

Then, at the surgical visit (at M1), the lesion center was again imaged with the Vivascope 1500, and the 5-mm surgical margin was imaged with the Vivascope 3000 to identify remnant abnormal cells.

Other data collected

Clinical data

Cutaneous treatment tolerance was graded from 0 to 4, with Grade 0: no skin reaction, Grade 1: mild skin reaction (erythema without discomfort), Grade 2: moderate skin reaction (erythema associated with a discomfort without impact on daily activities), Grade 3: severe skin reaction (erythema and erosion significantly impacting daily activities), and Grade 4: very severe skin reaction (erythema and erosion impacting daily activities and requiring medical treatment).

Immunohistochemical and histological data

The immunohistochemical method used was a manual semi-quantitative and qualitative



immunoenzymatic method allowing locating the antigens on tissue sections as previously described.^{26,27} The following monoclonal antibodies were used to stain paraffin-embedded biopsy sections and complete excision specimens: anti-TLR7, anti-TLR8, anti-Interferon Gamma (IFN γ), anti-PDL-1, anti-PD-1, anti-CXCL10 (IP-10), anti-CXCR6 (granulocyte chemoattractant chemokine) and anti-CD8 (cytotoxic T lymphocyte) (table II). Slides were read and graded using a Leica microscope by a blinded observer as follows: 0: no expression; 1: weak expression (1–25% of positive cells); 2: moderate expression (25–50% of positive cells); 3: high expression (50–75% of positive cells); and 4: strong expression (>75% of positive cells).

Surgery was performed using a macroscopic surgical margin of 5 mm outside the residual pigmentation limit 1 month after treatment cessation.

Finally, histological data were collected: inflammation and persistence or clearance of malignant cells. Moreover, the histological slides were reviewed by a second expert dermatopathologist (BV).

Statistics

After unblinding of the study, the changes in LMS were compared between the imiquimod and control groups using non-parametric Wilcoxon's tests. McNemar's tests were used to assess the consistency between RCM findings and excision. R 4.0 software was used.

Results

Patients' characteristics

Forty patients with a mean age of 60.5 ± 10.5 years were included. There were 24 women (60%) and 16 men (40%).



Twenty-one patients received imiquimod and 19 patients received the placebo.

LM features

LM were located on the upper part of the face in 7 patients (17.5%), on the lower part of the face in 32 patients (80%), and on the ear in 1 patient (2.5%). The mean lesion surface was $182 \pm 270 \text{ mm}^2$. The mean lesion size was $18 \pm 11.5 \text{ mm}$.

Tolerance of treatment

No side effect was experienced by the 19 patients receiving the placebo. Among the patients treated with imiquimod, 6 patients (28.6%) did not experience any side effect, 9 patients (42.5%) experienced a grade 1 side effect, 3 patients (14.3%) experienced a grade 2 side effect, and 3 patients (14.3%) experienced a grade 3 side effect. These results are summarized in table III.

Change in LMS between M0 and M1

At M0, the 21 patients treated with imiquimod had a $\text{LMS} \geq 2$. At M1, 10 of these patients had a $\text{LMS} < 2$ and 11 had a $\text{LMS} \geq 2$. Images of a RCM examination of a patient who has responded to imiquimod therapy are shown in supplemental figures 1, 1A, 1B and 2. At M0 and M1, the 19 patients receiving the placebo had a $\text{LMS} \geq 2$.

The change in LMS between M0 and M1 between patients receiving the placebo and those treated with imiquimod was statistically significant ($p < 0.001$). The difference was significant for the following LMS criteria: non-edged papillae, large round pagetoid cells $> 20 \mu\text{m}$, ≥ 3 atypical cells at the dermoepidermal junction in five $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ fields, and a follicular location of atypical cells. These results are summarized in table IV.



Histological results

Imiquimod group

Histologically, 8 lesions were classified as LM, 0 as LMM and 13 were in complete remission among the 21 excised lesions. The results were consistent with the RCM examination in 16 patients and discordant in 5 patients: one patient had a LMS <2 and a histologically-confirmed LM and in 4 patients, the LMS was ≥ 2 but the histology did not confirm the diagnosis of LM. This discrepancy was not statistically significant ($p=0.8$, McNemar's test).

After a second reading by another blinded dermatopathologist (BV), the results were finally considered consistent between the RCM examination and the histology in 19 out of the 21 patients (90%).

Regarding the margins, in 1 out 21 patients, the final histology was intralesional. The RCM examination at M1 of this patient was concordant with the intralesional excision: abnormal cells were identified on the margins. However, RCM at M1 allowed the identification abnormal cells on programmed margins in 2 patients whereas the final histology was extralesional.

This discrepancy was not statistically significant ($p=0.48$, McNemar's test).

Placebo group

Of the 19 excised lesions, 16 were LM and 3 were LMM. The histology was consistent with the RCM examination in all patients.

Regarding the margins, in 2 out of 19 patients, the final histology was intralesional. The RCM examination at M1 of these patients was concordant and found abnormal cells on the margins before surgery. However, RCM at M1 identified abnormal cells on expected margins in 2 patients whereas the final histology was extralesional.



This discrepancy was not statistically significant ($p=0.48$, McNemar's test).

In addition, there was no statistically significant difference regarding the presence of histologically-proven inflammation between both groups.

Immunohistochemical findings

The expression of TLR7, TLR8, IFN γ , CXCL10, PD-L1, PD-1, CXCR6 and CD8 did not correlate with a decrease in LMS after one month of placebo or imiquimod treatment ($p > 0.05$). However, in the imiquimod group, the level of IFN γ in resected specimens was significantly increased in responder patients with a LMS < 2 on the RCM examination compared to non-responder patients ($p = 0.04$).

Discussion

Several studies have already reported the efficacy of imiquimod treatment in LM.²⁸⁻³¹ It is used as an alternative treatment option when surgery is not feasible (in elderly patients, in case of non-resectable tumor) as well as adjuvant³² or neoadjuvant therapy.^{29,30}

In our study, the patients were treated with imiquimod or placebo prior to surgery. The LMS difference at M1 was statistically significant ($p < 0.001$) between patients treated with imiquimod and those treated with placebo. In addition, when the criteria of the LMS were compared separately, 4 were significantly decreased at M1 in the imiquimod group: non-edged papillae, large round pagetoid cells $> 20 \mu\text{m}$, ≥ 3 atypical cells at the dermoepidermal junction in five $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ fields, and a follicular location of atypical cells. These results are in line with the literature. Indeed, Guitera et al.¹⁷ have detailed each criterion when they have developed the LMS. The 4 most robust criteria for LM were respectively: non-edged papillae



(68% of LM; Odds Ratio (OR): 10.5), large round pagetoid cells $>20\ \mu\text{m}$ (37% of LM; OR: 10.3), ≥ 3 atypical cells at the dermoepidermal junction in five images (86% of LM; OR: 13.8) and a follicular spread of pagetoid cells (59% of LM; OR: 7.8). Two criteria are less robust for the diagnosis of LM which could explain the lack of significance in our study: the presence of nucleated cells within the papilla (15% of LM; OR: 8.7) and a broadened honeycomb pattern (5% of LM, 16% of benign macules; OR: 0.3).

Regarding the tolerance of topical imiquimod, 15 out of our 21 patients (71%) experienced side effects and 3 patients (14.3%) experienced a severe skin reaction. In the literature, Papanikolaou et al.²³ have reported an inflammatory reaction in 29 out of the 33 patients included (88%), and among them, early treatment discontinuation was needed in 4 patients. In their study, Tio et al.²² have described other side effects: flu-like symptoms (11 patients), lymphoedema of the cheek (3 patients), headache (7 patients) and sterile conjunctivitis (3 patients) in the 57 patients included.

In their study, Alarcon et al.³³ have assessed the use of *in vivo* RCM to precisely monitor LM response to non-surgical treatment with topical imiquimod. They have found a histological clearance of the tumor in 75% of patients and RCM allowed identifying 70% of these responders. There were no false-negative results. In our study, a histological clearance of the tumor was observed in 52% of patients and the RCM examination showed a LMS <2 in 48% of patients. We also did not identify any false negative results by RCM. In their study, the mean LMS decreased from 2.86 ± 0.8 before treatment to 0 ± 0 after imiquimod treatment in responders and from 2.2 ± 0.4 to 2 ± 0 in non-responders. The study by Alarcon et al. was an open-label study without control group. In our study, the results of the imiquimod group were very similar, confirming the efficacy of imiquimod and the interest of RCM in the follow-up of these patients. In our study, the mean LMS decreased from 5.5 ± 1.4 before treatment to 0 ± 0.6



after imiquimod treatment in responders and from 4.9 ± 1.5 to 3.8 ± 1.4 in non-responders, although it remained high after treatment. However, the 2 studies have shown that not all patients achieve a complete response to imiquimod, stressing the importance of the follow-up.

In our study, 52% of patients still had a LMS >2 after one month of imiquimod treatment. In previous studies, the clearance rate varied from 60 to 100%.^{34,35} Several hypotheses have been proposed to explain this variability of the clinical response to imiquimod.^{36,37} The first hypothesis is based on a non-standardization of the treatment regimens. In the review conducted by Mora et al.³⁷, the cumulative dose and the number of applications were significantly related to the tumor clearance. Kirtschig et al.³⁸ have also demonstrated that the use of intensive treatment (imiquimod applied daily for at least 10 weeks) correlated with a higher clearance.

Our immunohistochemical study showed a relationship between the *in situ* production of IFN γ and the response to imiquimod. These results are in line with previous studies showing that the local activation of IFN γ pathways, for example with TVEC, is crucial to induce clinical responses.³⁹ The IFN γ level in the final resected specimens was significantly higher in 10 out of the 21 patients treated with imiquimod and this could be explained by the induction of an apoptotic mechanism through the activation of the caspase pathway by imiquimod.^{24,25,40}

Furthermore, in our study, we verified the result consistency between the RCM examination and the histology and it was excellent. There was no false negative result obtained by RCM regarding the diagnosis of LM and the analysis of the margins. In the 2 patients with discordant results between the RCM examination and the histology, the histological conclusion was a benign junctional melanocytic hyperplasia.



These slight discrepancies highlighted the difficulty to differentiate LM from melanocytic hyperplasia with actinic damage for both anatomopathologists based on the histology and physicians using RCM.

The main limitation of our study is its small sample size. A larger complementary study would allow gathering more data to check RCM analysis and final histopathology concordance. This would allow to better identify an imiquimod responder profile. A different treatment regimen, with an increased frequency of imiquimod applications and a longer duration of treatment should modify results. Indeed, previous studies have highlighted a better tumor clearance rate with an intensified imiquimod regimen.^{36, 37}

Finally, the results obtained in our study showed that a follow-up of the LMS allowed confirming the efficacy of imiquimod in some of the patients. The assessment of LM response to imiquimod treatment by RCM was consistent with the histological findings. We also found that the IFN γ level in resected specimens was higher in responders compared to non-responders. RCM remains a complementary tool of choice for LM assessment with clinical benefits for patients in terms of presurgical evaluation and treatment follow-up.

References

1. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:923-36.
2. Smalberger GJ, Siegel DM, Khachemoune A. Lentigo maligna. *Dermatol Ther* 2008;21:439-46.
3. McKenna JK, Florell SR, Goldman GD, Bowen GM. Lentigo maligna/Lentigo maligna melanoma: Current state of diagnosis and treatment. *Dermatol Surg* 2006;32:493-504.
4. Vilar-Coromina N, Vilardell L, Cano A, Marcos-Gragera R. Rapid increase in incidence of melanoma in situ in Girona (Spain), 1994-2005. Effectiveness of public education campaigns about early diagnosis. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2010;101:561-3.
5. Mirzoyev SA, Knudson RM, Reed KB, Hou JL, Lohse CM, Frohm ML, et al. Incidence of lentigo maligna in Olmsted County, Minnesota, 1970 to 2007. *J Am Acad Dermatol* 2014;70:443-8.
6. Greveling K, Wakkee M, Nijsten T, van den Bos RR, Hollestein LM. Epidemiology of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in the Netherlands, 1989–2013. *J Invest Dermatol* 2016;136:1955-60.
7. Star P, Guitera P. Lentigo maligna, macules of the face, and lesions on sun-damaged skin confocal makes the difference. *Dermatol Clin* 2016;34:421-9.
8. Huilgol SC, Selva D, Chen C, Hill DC, James CL, Gramp A, et al. Surgical margins for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: The technique of mapped serial excision. *Arch Dermatol* 2004;140:1087-92.
9. Sharma AN, Foulad DP, Doan L, Lee PK, Atanaskova Mesinkovska N. Mohs surgery for the treatment of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma – a systematic review. *J Dermatol Treat* 2019;1-7.
10. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment – Update 2019. *Eur J Cancer* 2020;126:159-77.
11. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2019;80:208-50.
12. Hill DC, Gramp AA. Surgical treatment of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Australas J Dermatol* 1999;40:25-30.
13. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Rox Anderson R, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol* 1999;113:293-303.
14. Scope A, Benvenuto-Andrade C, Agero A-LC, Malvehy J, Puig S, Rajadhyaksha M, et al. In vivo reflectance confocal microscopy imaging of melanocytic skin lesions: Consensus terminology glossary and illustrative images. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:644-58.
15. Dinnes J, Deeks JJ, Saleh D, Chuchu N, Bayliss SE, Patel L, et al. Reflectance confocal microscopy for diagnosing cutaneous melanoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2018.
16. Waddell A, Star P, Guitera P. Advances in the use of reflectance confocal microscopy in melanoma. *Melanoma Manag* 2018.
17. Guitera P, Pellacani G, Crotty KA, Scolyer RA, Li L-XL, Bassoli S, et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and

equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol* 2010;130:2080-91.

18. Guitera P, Moloney FJ, Menzies SW, Stretch JR, Quinn MJ, Hong A, et al. Improving management and patient care in lentigo maligna by mapping with in vivo confocal microscopy. *JAMA Dermatol* 2013;149:692-8.
19. Champin J, Perrot J-L, Cinotti E, Labeille B, Douchet C, Parrau G, et al. In vivo reflectance confocal microscopy to optimize the spaghetti technique for defining surgical margins of lentigo maligna: *Dermatol Surg* 2014;40:247-56.
20. Yélamos O, Cordova M, Blank N, Kose K, Dusza SW, Lee E, et al. Correlation of handheld reflectance confocal microscopy with radial video mosaicing for margin mapping of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *JAMA Dermatol* 2017;153:1278.
21. Tio D, van der Woude J, Prinsen CAC, Jansma EP, Hoekzema R, van Montfrans C. A systematic review on the role of imiquimod in lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: need for standardization of treatment schedule and outcome measures. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2017;31:616-24.
22. Tio D, Montfrans C, Ruijter C, Hoekzema R, Bekkenk M. Effectiveness of 5% topical imiquimod for lentigo maligna treatment. *Acta Derm Venereol* 2019;99:884-8.
23. Papanikolaou M, Lawrence CM. Long-term outcomes of imiquimod-treated lentigo maligna. *Clin Exp Dermatol* 2019;44:631-6.
24. Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* 2007;157:8-13.
25. Schön MP, Schön M. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis* 2004;9:291-8.
26. Chebassier N, El Houssein O, Viegas I, Dreno B. In vitro induction of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 expression in keratinocytes by boron and manganese. *Exp Dermatol* 2004;13:484-90.
27. Saint-Jean M, Knol A-C, Nguyen J-M, Khammari A, Dréno B. TLR expression in human melanoma cells. *Eur J Dermatol* 2011;21:899-905.
28. Fleming CJ, Bryden AM, Evans A, Dawe RS, Ibbotson SH. A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream. *Br J Dermatol* 2004;151:485-8.
29. Donigan JM, Hyde MA, Goldgar DE, Hadley ML, Bowling M, Bowen GM. Rate of recurrence of lentigo maligna treated with off-label neoadjuvant topical imiquimod, 5%, cream prior to conservatively staged excision. *JAMA Dermatol* 2018;154:885.
30. Cotter MA, McKenna JK, Bowen GM. Treatment of lentigo maligna with imiquimod before staged excision. *Dermatol Surg* 2007;34:147-51.
31. Hyde MA, Hadley ML, Tristani-Firouzi P, Goldgar D, Bowen GM. A randomized trial of the off-label use of Imiquimod, 5%, cream with vs without Tazarotene, 0.1%, Gel for the treatment of lentigo maligna, followed by conservative staged excisions. *Arch Dermatol* 2012;148:582-596.
32. Ellis LZ, Cohen JL, High W, Stewart L. Melanoma in situ treated successfully using imiquimod after nonclearance with surgery: review of the literature: *Dermatol Surg* 2012;38:937-46.
33. Alarcon I, Carrera C, Alos L, Palou J, Malvehy J, Puig S. In vivo reflectance confocal microscopy to monitor the response of lentigo maligna to imiquimod. *J Am Acad Dermatol* 2014;71:7.
34. Borucki U, Metze D. Topical treatment of lentigo maligna melanoma with Imiquimod 5% Cream. *Dermatology* 2003;207:326-8.
35. Ahmed I, Berth-Jones J. Imiquimod: a novel treatment for lentigo maligna. *Br J Dermatol* 2000;143:843-5.



36. Gautschi M, Oberholzer PA, Baumgartner M, Gadaldi K, Yawalkar N, Hunger RE. Prognostic markers in lentigo maligna patients treated with imiquimod cream: A long-term follow-up study. *J Am Acad Dermatol* 2016;74:81-7.
37. Mora AN, Karia PS, Nguyen BM. A quantitative systematic review of the efficacy of imiquimod monotherapy for lentigo maligna and an analysis of factors that affect tumor clearance. *J Am Acad Dermatol* 2015;73:205-12.
38. Kirtschig G, Meurs T, Doorn R. Twelve-week treatment of lentigo maligna with Imiquimod results in a high and sustained clearance rate. *Acta Derm Venereol* 2015;95:83-5.
39. Ribas A. Oncolytic virotherapy promotes intratumoral T Cell infiltration and improves anti-PD-1 immunotherapy. *Cell* 2017;170:1109-19.
40. Weeks CE, Gibson SJ. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J Interferon Res* 1994;14:81-5.



Table I: Lentigo Maligna Score

Criteria	RCM features	Point(s)
Major criteria	Non-edged dermal papillae	+2
	Large round pagetoid cells >20 μm	+2
Minor criteria	≥ 3 atypical cells at the dermoepidermal junction in five 0.5x0.5mm ² fields	+1
	Follicular location of atypical cells	+1
	Nucleated cells within the dermal papillae	+1
	Broadened honeycomb pattern	-1

RCM: Reflectance Confocal Microscopy



Table II: Summary of the antibodies used for immunohistochemistry experiments

Target	Manufacturer	Reference
Anti-TLR7	Atlas Ac	HPA059613
Anti-TLR8	Atlas Ac	HPA001608
Anti-IFN gamma	Cell signaling	8455S
Anti-PD-L1	Cell signaling	E1L3N
Anti-PD-1	Abcam	ab52587
Anti-CXCL10 = Anti-IP 10	Abcam	ab9807
Anti-CXCR6	Abcam	ab89261
Anti-CD8	Dako	M7103

TLR: Toll-Like Receptor

IFN: Interferon

PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1

PD-1: Programmed cell Death 1

CXCL10: CXC Chemokine Ligand 10

CXCR6: CXC Chemokine Receptor 6

CD8: cytotoxic T lymphocyte

Table III: Patients' characteristics and LM features

Variable		Imiquimod n=21	%	Placebo n=19	%
Gender	F	13	61.9	11	57.9
	M	8	38.1	8	42.1
Age	Mean	68.7		70.4	
	Median	66		72	
	SD	11.9		8.8	
	Range	42 - 87		56 - 86	
Location	1	4	19.0	3	15.8
	2	17	81.0	15	78.9
	3	0	0.0	1	5.3
Surface (mm²)	Mean	337.0		254.7	
	Median	188		172	
	SD	326.4		189.9	
	Range	100 - 1099		100 - 687	
Main axis (mm)	Mean	22.2		19.4	
	Median	16		18	
	SD	14.7		6.4	
	Range	10 - 74		10 - 35	
Tolerance	0	6	28.6	19	100.0
	1	9	42.9	0	0.0
	2	3	14.3	0	0.0
	3	3	14.3	0	0.0
	4	0	0.0	0	0.0

F: Female

M: Male

SD: Standard Deviation

Location 1: upper part of the face (above the nose)

Location 2: lower part of the face (below the nose)

Location 3: ears



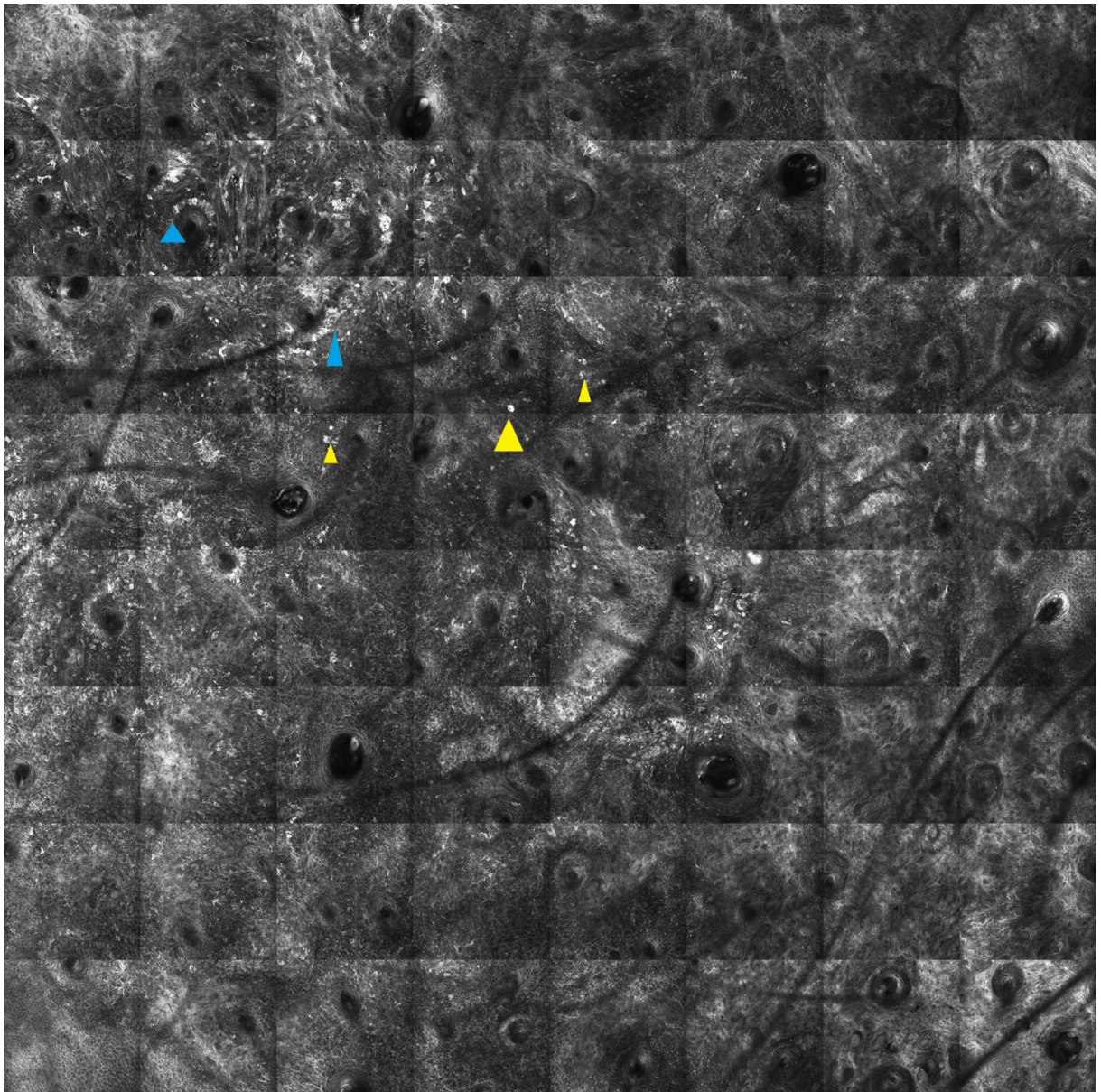
Table IV: Change in LM score per criterion between M0 and M1 seen by reflectance confocal microscopy (RCM) before and after one month of imiquimod treatment compared to the placebo.

	Placebo					Imiquimod					p-value
	Mean	SD	Median	Min	Max	Mean	SD	Median	Min	Max	
Non-edged papillae	0	0	0	0	0	-0.952	1.024	0	-2	0	<0.001
Large round pagetoid cells >20 mm	-0.105	0.809	0	-2	2	-0.952	1.024	0	-2	0	0.009
≥3 atypical cells at the dermoepidermal junction in five 0.5x0.5mm ² fields	-0.053	0.229	0	-1	0	-0.381	0.498	0	-1	0	0.015
Follicular location of atypical cells	-0.105	0.315	0	-1	0	-0.524	0.602	-1	-1	1	0.007
Nucleated cells within the dermal papillae	-0.158	0.501	0	-2	0	-0.286	0.463	0	-1	0	0.205
Broadened honeycomb pattern	-0.158	0.688	0	-3	0	-0.048	0.384	0	-1	1	0.959
Overall LM score	-0.053	0.621	0	-2	1	-3.143	2.670	-3	-7	0	<0.001

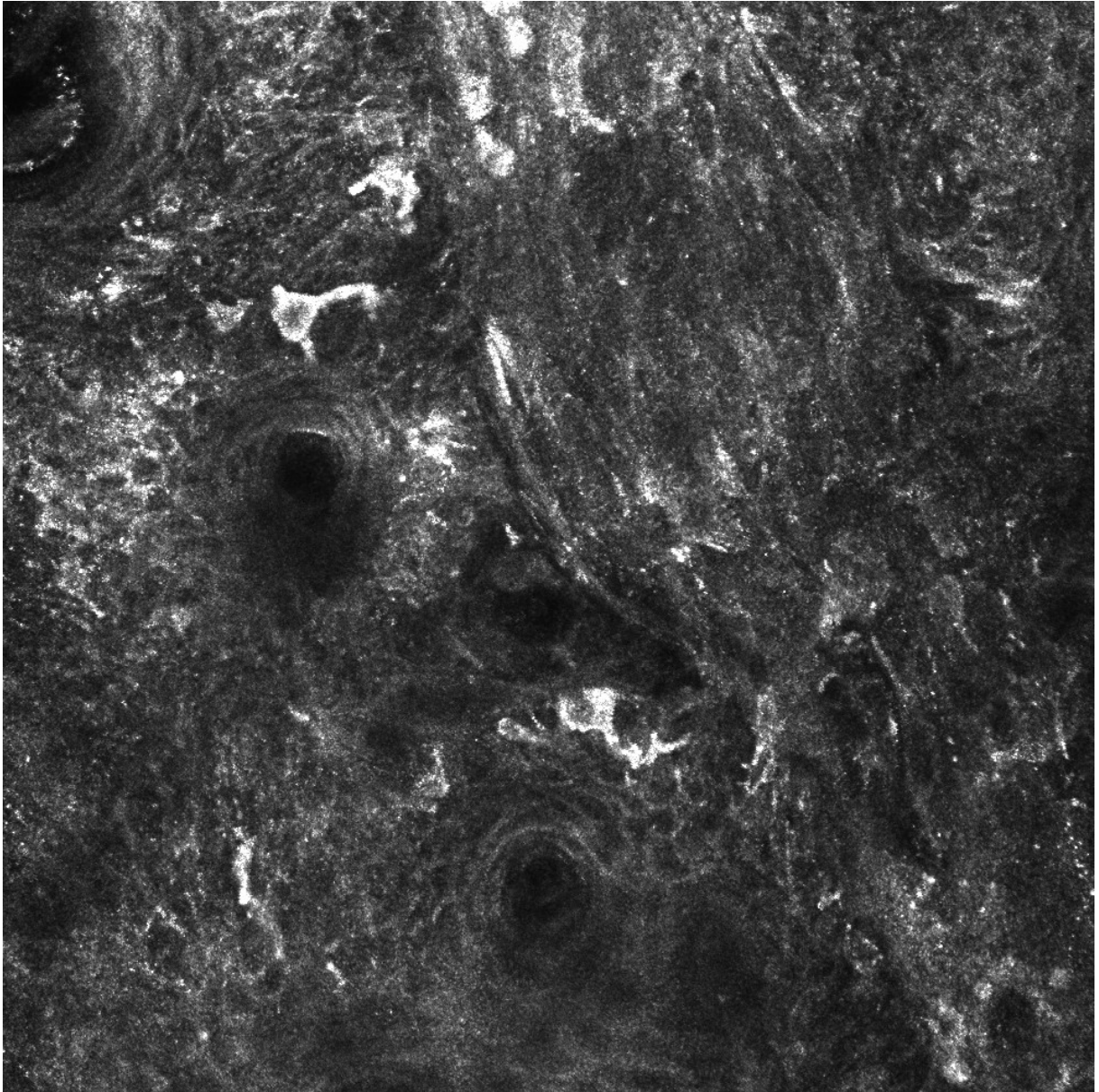
SD: Standard Deviation

Supplemental figure 1. Lentigo Maligna before Imiquimod treatment.

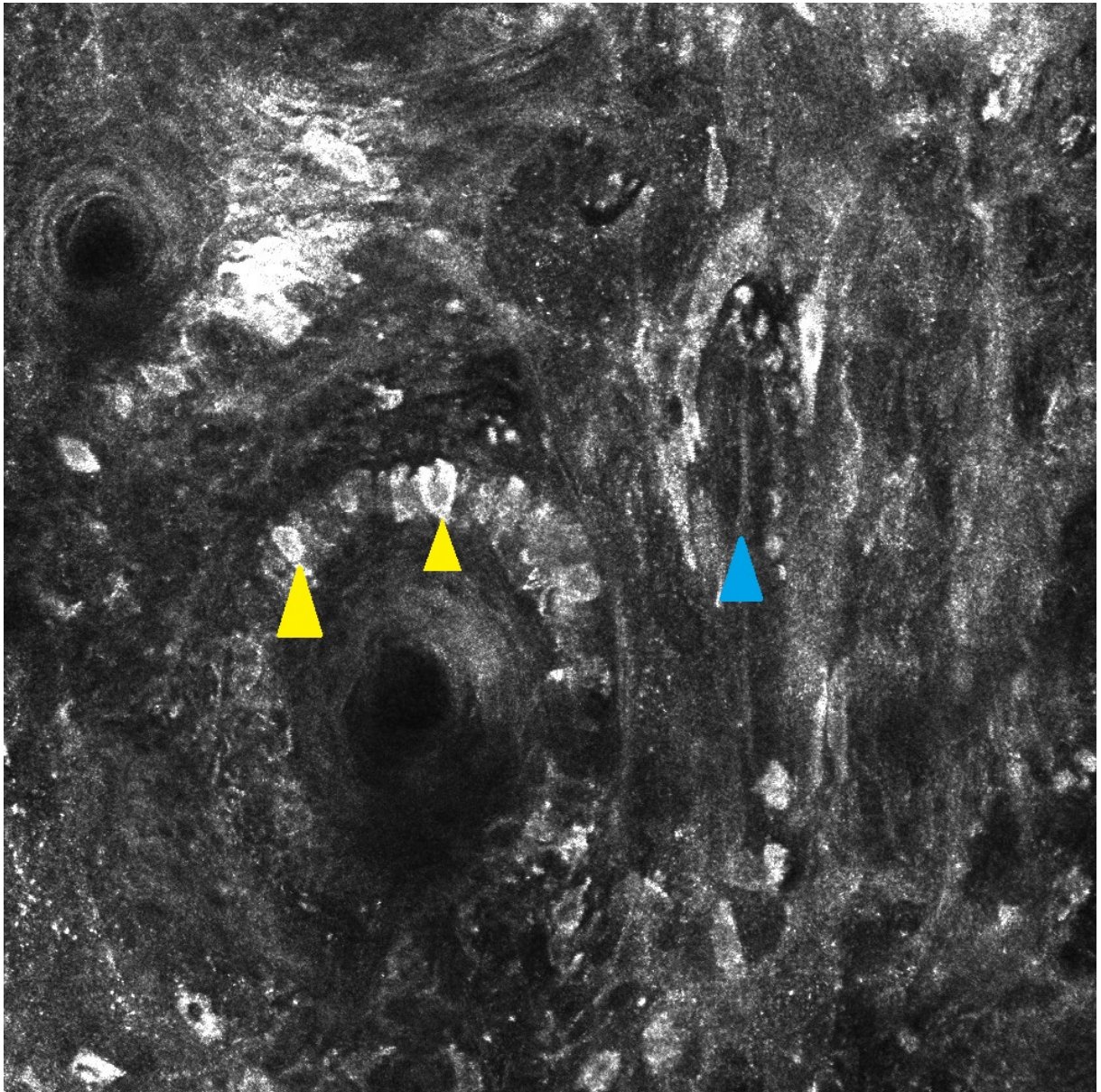
Confocal Microscopy mosaic images at the dermoepidermal junction. The mosaic shows signs of lentigo maligna with numerous bright atypical cells, even round, pagetoid (yellow arrowhead) and follicular localization of some atypical cells (blue arrowheads).



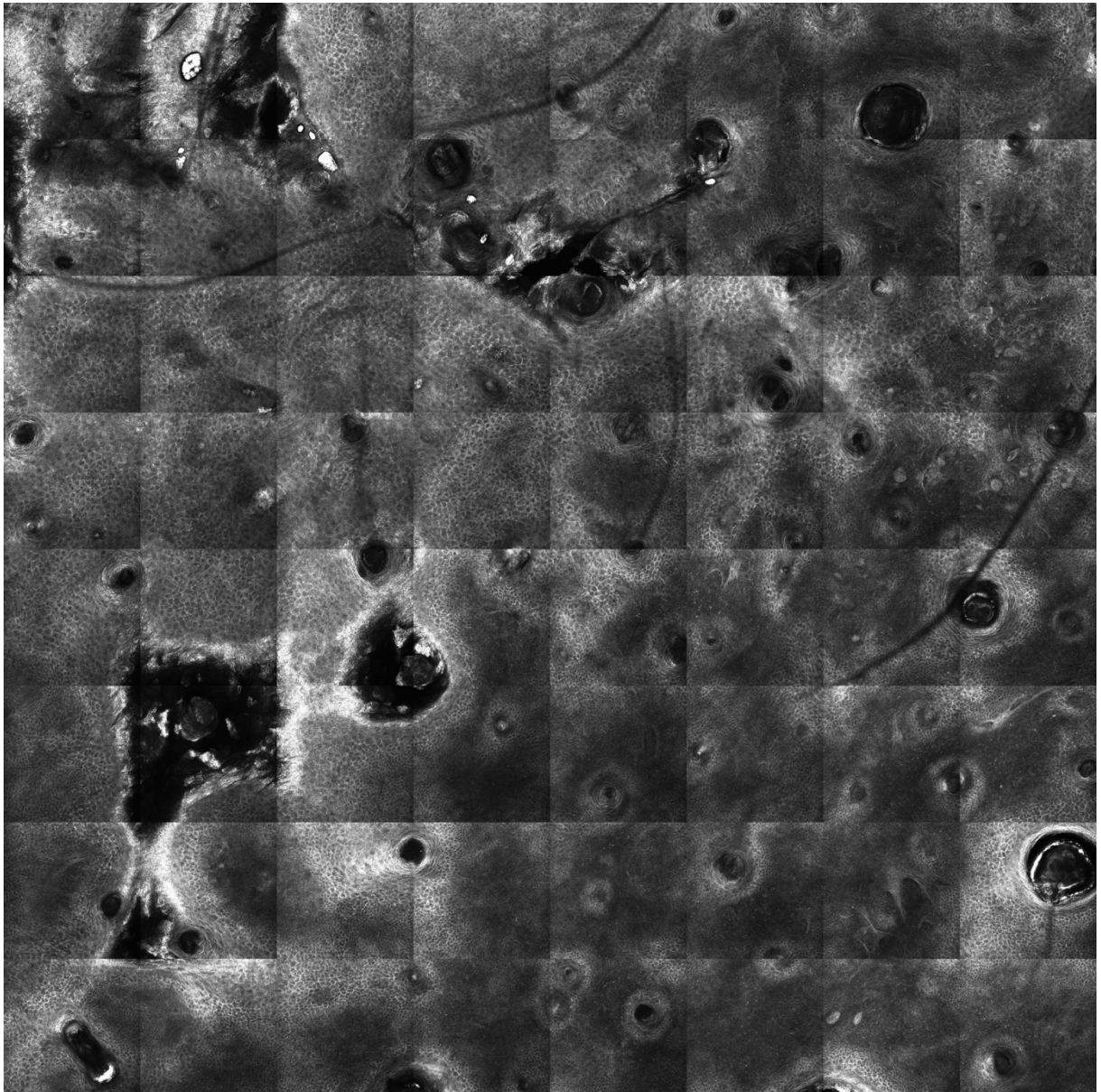
Supplemental figure 1A. Numerous bright hyperreflective atypical cells.



Supplemental figure 1B. Follicular localization of numerous atypical cells (yellow arrows). Non edged papillae with nucleated cells in the papilla.



Supplemental figure 2. Lentigo maligna after 1 month of imiquimod treatment. Images of the mosaic reveal a restored honeycombed pattern with preserved follicular openings.





III) Conclusion

Plusieurs études ont déjà montré l'efficacité de l'imiquimod topique dans le traitement du LM. L'imiquimod a été utilisé comme option thérapeutique lorsque la chirurgie n'était pas indiquée (patient âgé, ayant des comorbidités, tumeur non résécable). Ce traitement a également été appliqué comme thérapie adjuvante ou néo-adjuvante.

Dans notre étude, l'imiquimod ou le placebo ont été utilisés avant la chirurgie. Les 40 patients inclus ont bénéficié d'un examen MCR à l'inclusion (M0, avant traitement) et avant la chirurgie (M1, après 1 mois de traitement). La différence de LM score entre M0 et M1 entre les patients ayant reçu l'imiquimod et ceux ayant reçu le placebo était statistiquement significative ($p < 0.0001$). En effet, les LM scores des patients ayant reçu l'imiquimod ont significativement diminués.

Les 4 items du LM score significativement diminués étaient : papilles non bordées, présence de cellules pagétoïdes rondes de grande taille $> 20 \mu\text{m}$, trois cellules atypiques ou plus au niveau de la jonction dermo-épidermique dans cinq champs de $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$, une localisation folliculaire des cellules atypiques.

Les résultats histologiques étaient concordants avec les résultats en MCR, aussi bien pour le diagnostic final (exérèse finale après 1 mois de traitement) que pour les marges analysées. Il n'y avait pas de faux négatif en MCR dans notre étude.

Enfin, en immunohistochimie, il existait un taux plus élevé d'interferon Gamma dans les pièces d'exérèse des patients répondeurs à l'imiquimod par rapport aux patients non répondeurs, ce qui s'explique par le mode d'action même de ce traitement topique.

Les résultats obtenus dans notre étude montrent qu'un suivi du LM score permet d'affirmer l'efficacité de l'imiquimod chez la majorité des patients. La MCR reste un outil non



invasif de choix pour l'évaluation des LM, avec des avantages cliniques pour le patient en termes d'évaluation pré-chirurgicale (évaluation des marges) et de suivi thérapeutique (efficacité et récurrence).



IV) Références :

1. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33:923-36.
2. Greveling K, Wakkee M, Nijsten T, van den Bos RR, Hollestein LM. Epidemiology of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in the Netherlands, 1989–2013. *J Invest Dermatol*. 2016;136:1955-60.
3. Vilar-Coromina N, Vilardell L, Cano A, Marcos-Gragera R. Rapid increase in incidence of melanoma in situ in Girona (Spain), 1994-2005. Effectiveness of public education campaigns about early diagnosis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2010;101:561-3.
4. Mirzoyev SA, Knudson RM, Reed KB, Hou JL, Lohse CM, Frohm ML, et al. Incidence of lentigo maligna in Olmsted County, Minnesota, 1970 to 2007. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70:443-8.
5. Swetter SM, Chen FW, Kim DD, Egbert BM. Imiquimod 5% cream as primary or adjuvant therapy for melanoma in situ, lentigo maligna type. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72:1047-53.
6. Guitera P, Moloney FJ, Menzies SW, Stretch JR, Quinn MJ, Hong A, et al. Improving management and patient care in lentigo maligna by mapping with in vivo confocal microscopy. *JAMA Dermatol*. 2013;149:692.
7. Stolz W, Schiffner R, Burgdorf WHC. Dermatoscopy for facial pigmented skin lesions. *Clin Dermatol*. 2002;20:276-8.
8. Pralong P, Bathelier E, Dalle S, Poulalhon N, Debarbieux S, Thomas L. Dermoscopy of lentigo maligna melanoma: report of 125 cases. *Br J Dermatol*. 2012;167:280-7.
9. Bugatti L, Filosa G. Dermoscopy of lichen planus-like keratosis: a model of inflammatory regression. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2007;21:1392-7.
10. Akay BN, Kocyigit P, Heper AO, Erdem C. Dermatoscopy of flat pigmented facial lesions: diagnostic challenge between pigmented actinic keratosis and lentigo maligna. *Br J Dermatol*. 2010;163:1212-7.
11. Rajadhyaksha M, González S, Zavislan JM, Rox Anderson R, Webb RH. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology. *J Invest Dermatol*. 1999;113:293-303.
12. Waddell A, Star P, Guitera P. Advances in the use of reflectance confocal microscopy in melanoma. *Melanoma Manag*. 2018.
13. Guitera P, Pellacani G, Crotty KA, Scolyer RA, Li L-XL, Bassoli S, et al. The impact of in vivo reflectance confocal microscopy on the diagnostic accuracy of lentigo maligna and equivocal pigmented and nonpigmented macules of the face. *J Invest Dermatol*. 2010;130:2080-91.



14. Chen C-SJ, Elias M, Busam K, Rajadhyaksha M, Marghoob AA. Multimodal in vivo optical imaging, including confocal microscopy, facilitates presurgical margin mapping for clinically complex lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol*. 2005;153:1031-6.
15. Navarrete-Dechent C, Cordova M, Aleissa S, Liopyris K, Dusza SW, Kose K, et al. Lentigo maligna melanoma mapping using reflectance confocal microscopy correlates with staged excision: A prospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2019
16. Champin J, Perrot J-L, Cinotti E, Labeille B, Douchet C, Parrau G, et al. In vivo reflectance confocal microscopy to optimize the spaghetti technique for defining surgical margins of lentigo maligna. *Dermatol Surg*. 2014;40:247-56.
17. Brand FL, Seyed Jafari SM, Hunger RE. Confocal microscopy and lentigo maligna: an in vivo pilot study for the assessment of response to imiquimod therapy. *Dermatology*. 2019;235:150-5.
18. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment – Update 2019. *Eur J Cancer*. 2020;126:159-77.
19. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019;80:208-50.
20. Star P, Guitera P. Lentigo maligna, macules of the face, and lesions on sun-damaged skin confocal makes the difference. *Dermatol Clin*. 2016;34:421-9.
21. Huilgol SC, Selva D, Chen C, Hill DC, James CL, Gramp A, et al. Surgical margins for lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: the technique of mapped serial excision. *Arch Dermatol*. 2004;140:1087-92.
22. Hill DC, Gramp AA. Surgical treatment of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *Australas J Dermatol*. 1999;40:25-30.
23. McKenna JK, Florell SR, Goldman GD, Bowen GM. Lentigo maligna/lentigo maligna melanoma: current state of tiagnosis and treatment. *Dermatol Surg*. 2006;32:493-504.
24. Zalaudek I, Horn M, Richtig E, Hödl S, Kerl H, Smolle J. Local recurrence in melanoma in situ: influence of sex, age, site of involvement and therapeutic modalities. *Br J Dermatol*. 2003;7.
25. Sharma AN, Foulad DP, Doan L, Lee PK, Atanaskova Mesinkovska N. Mohs surgery for the treatment of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma – a systematic review. *J Dermatol Treat*. 2019;1-7.
26. Barlow RJ, White CR, Swanson NA. Mohs' micrographic surgery using frozen sections alone may be unsuitable for detecting single atypical melanocytes at the margins of melanoma in situ. *Br J Dermatol*. 2002;146:290-4.



27. Dawn ME, Dawn AG, Miller SJ. Mohs surgery for the treatment of melanoma in situ: a review. *Dermatol Surg.* 2007;33:395-402.
28. Ly A, Habib F, Zimmermann U, Gentil-Perret A, Joujoux J-M, Clerici T, et al. Les chirurgies micrographiques : techniques, indications et applications pratiques en cabinet. *Ann Dermatol Vénéréologie.* 2013;140:647-55.
29. Gaudy-Marqueste C. The « spaghetti technique » : An alternative to Mohs surgery or staged surgery for problematic lentiginous melanoma (lentigo maligna and acral lentiginous melanoma). *J Am Acad Dermatol.* 2011;64:6.
30. Hou JL, Reed KB, Knudson RM, Mirzoyev SA, Lohse CM, Frohm ML, et al. Five-year outcomes of wide excision and Mohs micrographic surgery for primary lentigo maligna in an academic practice cohort. *Dermatol Surg.* 2015;41:211-8.
31. Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol.* 2007;157:8-13.
32. Schön MP, Schön M. Immune modulation and apoptosis induction: Two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis.* 2004;9:291-8.
33. Weeks CE, Gibson SJ. Induction of interferon and other cytokines by imiquimod and its hydroxylated metabolite R-842 in human blood cells in vitro. *J Interferon Res.* 1994;14:81-5.
34. Fleming CJ, Bryden AM, Evans A, Dawe RS, Ibbotson SH. A pilot study of treatment of lentigo maligna with 5% imiquimod cream. *Br J Dermatol.* 2004;151:485-8.
35. Donigan JM, Hyde MA, Goldgar DE, Hadley ML, Bowling M, Bowen GM. Rate of recurrence of lentigo maligna treated with off-Label neoadjuvant topical imiquimod, 5%, cream prior to conservatively staged excision. *JAMA Dermatol.* 2018;154:885.
36. Cotter MA, McKenna JK, Bowen GM. Treatment of lentigo maligna with imiquimod before staged excision. *Dermatol Surg.* 2007;34:147-51.
37. Hyde MA, Hadley ML, Tristani-Firouzi P, Goldgar D, Bowen GM. A randomized trial of the off-label use of imiquimod, 5%, cream with vs without tazarotene, 0.1%, gel for the treatment of lentigo maligna, followed by conservative staged excisions. *Arch Dermatol.* 2012
38. Ellis LZ, Cohen JL, High W, Stewart L. Melanoma in situ treated successfully using imiquimod after nonclearance with surgery: review of the literature. *Dermatol Surg.* 2012;38:937-46.
39. Mora AN, Karia PS, Nguyen BM. A quantitative systematic review of the efficacy of imiquimod monotherapy for lentigo maligna and an analysis of factors that affect tumor clearance. *J Am Acad Dermatol.* 2015;73:205-12.
40. Kirtschig G, Meurs T, Doorn R. Twelve-week treatment of lentigo maligna with imiquimod results in a high and sustained clearance rate. *Acta Derm Venereol.* 2015;95:83-5.



41. Papanikolaou M, Lawrence CM. Long-term outcomes of imiquimod-treated lentigo maligna. *Clin Exp Dermatol*. 2019;44:631-6.
42. Tio D, Montfrans C, Ruijter C, Hoekzema R, Bekkenk M. Effectiveness of 5% topical imiquimod for lentigo maligna treatment. *Acta Derm Venereol*. 2019;99:884-8.



Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés.

Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances.

Je ne prolongerai pas abusivement les agonies.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.



UNIVERSITÉ DE NANTES

Vu, le Président du Jury,
(tampon et signature)

Pr Brigitte DRENO

Vu, le Directeur de Thèse,
(tampon et signature)

Pr Brigitte DRENO

Vu, le Doyen de la Faculté,

Professeur Pascale JOLLIET



NOM : SOENEN

PRÉNOM : Anouk

Titre de Thèse : Evolution du Lentigo Maligna Score en microscopie confocale après un mois de traitement par imiquimod dans la prise en charge du mélanome de Dubreuilh

RESUMÉ

Le traitement du mélanome de Dubreuilh est difficile en raison des éventuelles séquelles fonctionnelles et esthétiques de la chirurgie. L'imiquimod a été proposé comme traitement alternatif à la chirurgie. La microscopie confocale par réflectance (MCR) est un outil non invasif utilisé pour le diagnostic de mélanome de Dubreuilh et l'évaluation de ses marges d'exérèse. Les objectifs de notre étude étaient de comparer le Lentigo Maligna score (LM score) en MCR avant et après un mois de traitement par imiquimod par rapport au placebo et de définir le profil immunohistochimique des patients répondeurs à l'imiquimod. Une étude randomisée et contrôlée a été menée. Les patients ont bénéficié d'un examen en MCR avec calcul du LM score avant et après 1 mois de traitement par imiquimod ou par placebo. Une analyse immunohistochimique a été réalisée sur les exérèses. 40 patients ont été inclus. Le LM score à 1 mois était significativement plus bas chez les patients traités par imiquimod par rapport à ceux traités par placebo ($<0,001$). Les critères significativement différents étaient la présence de papilles non bordées, la présence de grandes cellules pagétoïdes rondes, la présence de cellules atypiques à la jonction dermo-épidermique et la localisation folliculaire des cellules atypiques. L'analyse immunohistochimique a montré un taux plus élevé d'interféron gamma dans les pièces d'exérèse chez les patients répondeurs à l'imiquimod ($p = 0,04$). Malgré un échantillon de petite taille, l'évaluation du LM score par MCR semble utile pour suivre avec précision la réponse des mélanomes de Dubreuilh à l'imiquimod.

MOTS-CLÉS

MELANOME DE DUBREUILH, LENTIGO MALIGNA, LENTIGO MALIGNA SCORE, MICROSCOPIE CONFOCALE PAR REFLECTANCE, IMIQUIMOD