



**HAL**  
open science

# Mutation V600E de BRAF dans le mélanome : comparaison de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire

Alexandrine Bay

► **To cite this version:**

Alexandrine Bay. Mutation V600E de BRAF dans le mélanome : comparaison de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01236187

**HAL Id: dumas-01236187**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01236187>**

Submitted on 1 Dec 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE PICARDIE JULES VERNE  
FACULTE DE MEDECINE D'AMIENS

ANNEE 2015

N°2015-10

**MUTATION V600E DE BRAF DANS LE MELANOME  
COMPARAISON DE L'IMMUNOHISTOCHEMIE  
ET DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE**

THESE  
POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE (DIPLOME D'ETAT)  
PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE  
9 février 2015

PAR

ALEXANDRINE BAY

Président du jury :  
Monsieur le Professeur SEVESTRE

Juges :  
Madame le Professeur LOK  
Monsieur le Professeur CHATELAIN  
Monsieur le Professeur CHAUFFERT  
Madame le Docteur GUBLER  
Monsieur le Docteur BENDJABALLAH

## **A Monsieur le Professeur Henri Sevestre**

### **Président du jury et directeur de thèse**

Professeur d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques à l'UFR de Médecine d'Amiens

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU d'Amiens Picardie

Adjoint au chef de l'Oncopôle

Je vous remercie d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse, de m'avoir encadré pendant mon internat avec bienveillance et patience.

Veillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

## **A Madame le Professeur Catherine Lok**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (Dermatologie-Vénérologie)

Assesseur du 3<sup>ème</sup> cycle

Chef du Service de Dermatologie

Chef du Pôle des 5 Sens

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

## **A Monsieur le Professeur Denis Chatelain**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
(Anatomie et cytologie pathologique)

Je vous remercie d'accepter de juger ma thèse, de nous faire bénéficier de votre compétence dans cette spécialité et pour les bibliographies, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

## **A Monsieur le Professeur Bruno CHAUFFERT**

Professeur des Universités-Praticien Hospitalier  
(Oncologie médicale)  
Responsable du service d'Oncologie médicale  
Oncopôle

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

## **A Madame le Docteur Brigitte GUBLER**

Maître de Conférences-Praticien Hospitalier  
(Immunologie)  
Responsable du Centre d'Activité « Oncobiologie moléculaire »  
Pôle « Biologie, pharmacie et santé des populations »

Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et d'accepter de juger ce travail, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

## **Monsieur le Docteur Sif BENDJABALLAH**

Chef du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CH  
Beauvais Picardie

Chef du pôle imagerie, pathologie digestive et oncologie

Je vous remercie d'accepter de juger ma thèse, mon semestre dans votre service fut très enrichissant humainement et professionnellement, veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect

Au Docteur Thomas Petit pour avoir mis les cas de son laboratoire à disposition pour ma thèse et pour son intérêt pour ce travail

Au Docteur Cordonnier pour sa rigueur constante

Au Docteur Ikoli

Au docteur Benzerdjeb

A mes co-internes, Christophe, Wajd, joanna, Alexandra, Lewis, Soufiane

A toute l'équipe du service d'anatomie et cytologie pathologique du CHU d'Amiens

A toute l'équipe du centre de pathologie Amiens-Picardie

A ma mère

A mon père

A ma sœur

A Mayssane, Aude, Samira

## **ABREVIATIONS**

**A** : Adénine

**AA** : Absence d'Amplification

**Ac** : Anticorps

**AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché

**ATP** : Adénosine Tri Phosphate

**BM**: Biologie Moléculaire

**C** : Cytosine

**CPAP** : Centre de Pathologie Amiens-Picardie

**D** (V600D): Acide aspartique

**DHPLC**: denaturing high-performance liquid chromatography

**E** : Glutamate

**G** : Guanine

**HRM**: high-resolution melting

**IHC**: ImmunoHistoChimie

**INCa** : Institut National du Cancer

**K** (V600K): Lysine

**NGS**: Next generation sequencing

**NI** : Non Interprétable

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**PPi**: pyrophosphate inorganique

**RNC** : résultats non contributifs

**SNP**: SNaPshot

**T** : Thymine

**V** : Valine

**WT** : Wild Type



# SOMMAIRE

<b>I-INTRODUCTION</b> .....	p9
<b>II-MATERIELS ET METHODES</b> .....	p15
<b>III-RESULTATS</b> .....	p17
<b>IV-DISCUSSION</b> .....	p22
- Cas discordants :	
- IHC-/BM+	
- IHC+/BM-	
- Cas des marquages hétérogènes	
- Causes d'absence d'amplification en BM	
<b>V-CONCLUSION</b> .....	p26
<b>V-REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	p38
<b>VI-RESUME</b> .....	p41

## INTRODUCTION

Avec environ 11 176 nouveaux cas estimés en France et 1672 décès en 2012, dont 48% survenant chez l'homme, le mélanome représente 3,1% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers et 1,1% des décès dus à des cancers (estimés en 2012).

L'incidence du mélanome cutané est en augmentation de manière notable entre 1980 et 2012 : elle passe de 2,5 à 10,8 pour 100 000 hommes et de 4,0 à 11,0 pour 100 000 femmes. De même, la mortalité (standardisé monde) chez l'homme liée au mélanome cutané a augmenté passant de 0,9 à 1,7 pour 100 000 entre 1980 et 2012. Toutefois, la croissance s'est ralentie à partir des années 2000.

Chez la femme, le taux de mortalité (standardisé monde) a également augmenté passant de 0,8 à 1,1 (en 2000) pour 100 000 puis s'est stabilisé à 1,0/100 000. (Données de l'INCa) [1].

Le mélanome cutané est un cancer de bon pronostic avec une survie relative à 5 ans, toutes formes confondues, de plus de 90 %. Cependant, pour les formes métastatiques, peu de traitements avaient jusque récemment fait la preuve de leur efficacité et la survie à 5 ans était estimée à 15 % jusqu'à l'arrivée de la thérapie ciblée.

Les thérapies ciblées sont des traitements qui ciblent spécifiquement une protéine ou un mécanisme impliqué dans le développement de la tumeur.

Ces mécanismes correspondent à une accumulation de mutations sur des gènes critiques codant pour des protéines ayant un rôle dans la croissance, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire telles les protéines de la voie RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinase [2] (**figure 1**).

BRAF, qui appartient à la famille des gènes RAF, est ainsi retrouvé muté dans de nombreuses tumeurs : en plus du mélanome, on compte les carcinomes colorectaux,

les cholangiocarcinomes, les carcinomes papillaires de la thyroïde, les xanthoastrocytomes pléomorphes, les histiocytoses des cellules de Langerhans, les tumeurs borderlines de l'ovaire, les gangliogliomes, les astrocytomes pilocytiques et les tumeurs prostatiques [3].

Le gène BRAF se trouve sur le chromosome 7 du génome humain. La plupart des mutations du gène BRAF sont localisées sur l'exon 11 ou l'exon 15 (**figure 2**) qui correspondent au domaine kinase de la protéine. Une mutation sur ces exons aboutit à une activation constitutive de la protéine BRAF. La mutation la plus fréquente de BRAF est celle d'un nucléotide : la thymine qui mute en adénine (1799T->A). Cette mutation est localisée sur le codon 600 et aboutit à la substitution de l'acide aminé valine (V) en acide aminé glutamate (E) d'où le nom V600E. Il existe aussi d'autres mutations du gène BRAF : V600M qui correspond à la mutation d'une guanine en adénine (1798G>A) ; V600K, V600D, V600E complexe et V600R qui correspondent chacune à la mutation de 2 nucléotides (respectivement 1798\_1799GT>AA, 1799\_1800TG>AT, 1799\_1800TG>AA et 1798\_1799GT>AG).

Dans les mélanomes, on trouve la mutation du gène BRAF dans 40% à 57% des cas [4, 5]: les résultats varient en fonction du type de mélanome et de l'exposition solaire [6]. Les mutations du codon 600 sont les plus fréquentes et représentent à elles seules 90% des mutations observées : dans 75-90% des cas, il s'agit de la mutation V600E [7], dans 16 à 29% de cas, il s'agit de la mutation V600K [8,9], dans 5% V600R, dans 4% V600M [10] et rarement V600D. Ces mutations induisent une activation constitutionnelle de la protéine kinase [11]. Au total, une trentaine de mutations de BRAF sont recensées. A noter que la mutation BRAF est aussi retrouvée dans de nombreux nævi : d'après Pollock et al. elle est présente dans 82% des nævi [12]; la mutation de BRAF n'est donc pas suffisante pour évoquer un mélanome.

Ces mutations présentes dans les cancers sont les cibles des thérapies ciblées : la présence de la mutation V600 du gène BRAF dans le mélanome métastatique a une implication thérapeutique et pronostique rendant la tumeur sensible au

traitement par vemurafenib, un inhibiteur de kinase qui bloque la forme mutée V600 de la protéine BRAF [13]. Ce traitement entraîne une meilleure survie sans progression et une meilleure survie globale chez les patients ayant un mélanome métastatique par rapport à la chimiothérapie [14]. En France, le vemurafenib a l'AMM depuis le 17/02/2012 [15, 16] en monothérapie dans les mélanomes métastatiques hors métastases cérébrales et les mélanomes non résecables porteurs d'une mutation BRAF V600. Le traitement doit être poursuivi jusqu'à progression de la maladie ou survenue d'une toxicité inacceptable. Le taux de remboursement est de 100%.

Avant le début du traitement par le vemurafenib, la présence de la mutation BRAF V600 doit être confirmée par un test validé [16].

D'autres molécules ciblées peuvent être utilisées : le dabrafénib qui est aussi un inhibiteur des protéines kinases RAF a l'AMM depuis le 26/08/2013 [17], le trametinib, un inhibiteur de MEK inhibe une protéine kinase appartenant à la cascade des MAP kinases située en aval de BRAF ; ce traitement est en cours d'étude.

Les autres traitements actuels sont moins efficaces que BRAF (traitements chimiothérapeutiques : dacarbazine, lomustine, témozolomide; thérapie biologique : interleukine 2, interféron alpha-2b et l'ipilimumab qui est un anticorps qui interagit avec l'antigène 4 des lymphocytes cytotoxiques (CTLA-4) dont l'utilisation est réservée aux patients en situation d'échappement non agressif [18]).

En France, l'organisation de la prise en charge des cancers fait intervenir l'INCa (Institut National du Cancer). Parmi ses rôles, l'INCa participe au financement des 28 plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers réparties sur l'ensemble du territoire où sont recherchées les mutations présentes dans les cancers dont BRAF fait partie[19]. A Amiens, il s'agit de la plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers de Picardie (**figure 3**).

Actuellement, selon les recommandations de l'INCa : 'Tout mélanome cutané métastatique doit aujourd'hui bénéficier d'un génotypage pour recherche mutationnelle dans l'une des plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers financées par l'INCa et la Direction générale de l'offre de soins (DGOS). Il est rappelé que cette recherche mutationnelle est effectuée par des techniques de biologie moléculaire réalisées sur matériel fixé en formol tamponné et inclus en paraffine' [20].

Parmi les techniques de biologie moléculaire existantes, plusieurs ont été rapportées dans la littérature pour détecter la mutation BRAF V600E sur différents types de cancer: la dénaturation chromatographie liquide à haute performance (DHPLC), high-resolution melting (HRM), la PCR en temps réel [21], la spectrométrie de masse, le SNaPshot (technique d'extension d'amorce), le mismatch ligation assay, ligase detection reaction [22], le séquençage de Sanger et le pyroséquençage. La plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers de Picardie utilisant le pyroséquençage pour détecter la mutation BRAF V600E dans le mélanome, nous allons décrire cette méthode.

Le pyroséquençage est une technique de séquençage de l'ADN utilisée pour détecter des mutations sur des séquences limitées et prédéterminées. Après extraction du matériel tumoral et amplification ciblée de la séquence d'ADN voulue (ici la séquence contenant BRAF), l'ADN obtenu est séparé en simple brin, puis on réalise une synthèse complémentaire. Durant cette synthèse, chaque nucléotide incorporé dans le séquençage de l'ADN libère un PPI. Ce PPI est converti en ATP par une ATP sulfurylase, puis l'ATP fournit l'énergie pour oxyder la luciférine et générer une lumière qui est transformée en signal sous forme de pic sur le pyrogramme (**figure 4**). Les nucléotides sont incorporés un à un. S'il est incorporé dans la séquence, un pic apparaît sur le pyrogramme, sinon le nucléotide est détruit et un autre nucléotide est incorporé.

Lorsque le même nucléotide est répété à la suite dans la séquence (par exemple GG), le pic est plus haut sur le pyrogramme.

Cette technique est moins coûteuse que celles précédemment utilisées en biologie moléculaire et est plus spécifique. En effet, Colomba et al. ont comparé différentes méthodes (IHC, pyroséquençage, PCR en temps réel et séquençage de Sanger) et ont trouvé que le pyroséquençage était la seule technique avec une sensibilité et une spécificité de 100% [22].

L'inconvénient de cette technique est qu'elle peut séquencer une longueur limitée d'ADN car le système enzymatique n'est pas assez stable et qu'il y a un risque d'erreur d'incorporation [23]. Mais elle est adaptée pour la recherche de mutation ciblée comme c'est le cas pour BRAF V600.

Par ailleurs, la technique de pyroséquençage est capable de détecter les mutations des 3 nucléotides du codon V600 de l'exon 15 avec une bonne sensibilité (5-10% cellules tumorales).

L'autre avantage est qu'elle peut évaluer le pourcentage d'allèle sauvage et d'allèle muté au sein du prélèvement (évaluation semi quantitative).

Les résultats tels qu'ils apparaissent sur le pyrogramme sont présentés sur les **figures 5 et 6**; ils représentent respectivement V600 WT et V600E.

Parallèlement à la biologie moléculaire, en immunohistochimie un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme mutée V600E de la protéine BRAF a été développé : il s'agit d'un anticorps monoclonal murin (VE1).

La protéine mutée BRAF V600E peut être détectée en IHC avec l'anticorps VE1. L'avantage de cette méthode est que 2 lames seulement sont nécessaires (une pour l'IHC et une pour l'HPS) : les résultats sont disponibles en quelques heures, aucun matériel spécialisé n'est nécessaire et l'analyse peut être faite même sur une aspiration à l'aiguille fine. Plusieurs études ont trouvées une bonne sensibilité et spécificité de l'anticorps VE1 : dans leur étude Colomba et al. ont même conclu à une sensibilité et une spécificité de 100% de l'anticorps monoclonal

VE1 pour la détection de la mutation V600E dans le mélanome [22]. Une autre étude a trouvé une sensibilité et une spécificité respectivement de 97% et 98% [24]. Par ailleurs, on trouve aussi des mutations V600E qui n'ont pas été vues par d'autres méthodes de BM tels la high-resolution melting (HRM) [24]. L'inconvénient est que les mutations BRAF autres que V600E ne sont pas détectées.

Un autre avantage de l'immunohistochimie est une bonne reproductibilité inter observateurs [25] [26].

Devant ces résultats encourageants, nous avons voulu comparer les résultats de la mutation BRAF V600E dans le mélanome en utilisant l'immunohistochimie avec l'anticorps VE1 et la biologie moléculaire avec le pyroséquençage et la SNaPshot.

Nous présentons les résultats obtenus dans une étude bicentrique, sur les recherches de mutations prescrites pour les patients du CHU d'Amiens Picardie et du Centre de Pathologie Amiens-Picardie (CPAP) recherchés par IHC, pyroséquençage et SNaPshot de janvier 2012 à décembre 2014 par les plateformes hospitalières de Génétique Moléculaire des Cancers de Picardie, de Lille et de Reims.

## II- MATERIEL ET METHODES

Nous avons recensé 188 observations de 2012 à décembre 2014.

Parmi elles 20 sont exclues : 12 cas de recherche de mutation BRAF sur des cancers autres que mélanome, 3 observations envoyées dans d'autres centres et non retournées et 5 cas provenant d'autres structures d'anatomie et cytologie pathologique.

Les 168 prélèvements intéressent 158 patients : 116 proviennent du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique (ACP) du CHU d'Amiens pour lesquels tous les cas ont été envoyés au Laboratoire d'Oncobiologie Moléculaire du CHU d'Amiens plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers de Picardie ( INCa) et les 42 autres proviennent du Centre de Pathologie Amiens-Picardie : 40 cas ont été envoyés à la plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers de Picardie, 1 cas à la plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers du Nord-Pas-de-Calais (INCa), installée au Centre de Bio-Pathologie du CHRU de Lille et 1 cas à la plateforme hospitalière de Génétique Moléculaire des Cancers de Champagne-Ardennes (INCa) installée au Laboratoire de Biologie Médicale de l'Institut Jean-Godinot de Reims.

La recherche de mutation BRAF est réalisée sur des coupes tissulaires:

- en BM: l'ADN génomique tumoral a été extrait à partir de tissu fixé au formol puis inclus en paraffine (trois fois trois coupes non macro-disséquées à 15 microns) avec le coffret QIAamp DNA FFPE tissue (Qiagen). La recherche des mutations du codon 600 du gène BRAF a été réalisée par pyroséquençage avec le coffret CE-IVD Therascreen BRAF Pyro (Qiagen) dans 108 cas et par SNaPshot dans 59 cas.

- en IHC: on a utilisé un anticorps murin monoclonal V600E Spring Bioscience correspondant à un peptide synthétique représentant la séquence en acides aminés de la mutation BRAF



V600E des acides aminés 596 à 606, clone VE1, isotype IgG2a, Marquage cytoplasmique [27].

Dilution 1/50, coupes de 4 microns, automate Benchmark Ultra (Roche), technique Optiview (qui n'utilise pas la biotine).

Les coupes pour IHC ont été faites avant les coupes pour BM dans 49 cas et après dans 119 cas.

L'IHC a été pratiquée dans le service d'ACP du CHU d'Amiens pour tous les patients du CHU et du CPAP.

### III- RESULTATS

Les 168 observations analysées incluent 158 patients : 87 hommes et 71 femmes âgés de 23 à 95 ans avec une moyenne d'âge de 65,7 ans (médiane à 67 ans). Parmi eux, 10 patients ont été prélevés 2 fois; les prélèvements concernaient 2 localisations différentes du mélanome dans 9 cas.

Les prélèvements incluait des mélanomes cutanés primitifs (52 cas), un mélanome cutané inclassable, un mélanome choroïdien, des métastases localisées dermiques (6 cas), hypodermiques (13 cas), dermo-hypodermiques (11 cas) et des métastases à distance ganglionnaires (67 cas), pulmonaires (6 cas), pleurales (2 cas), hépatiques (2 cas), cérébrales (4 cas), pancréatique (1 cas), vaginal ( 1 cas ) et des tissus mous (1 cas).

Est considérée comme positif en IHC la présence d'un marquage diffus cytoplasmique marron doré ou marron. Un marquage nucléaire, quelque soit l'intensité, un marquage cytoplasmique faible ou l'absence de marquage sont considérés comme négatifs (**figure 7**). La coloration de l'immunomarquage étant distincte des pigments de mélanine, leur présence ne gêne pas l'interprétation des résultats. En cas de doute, l'immunomarquage était refait avec un témoin externe positif.

Tableau 1 :

	négatif	Positif (dont hétérogène)	Non Interprétable	TOTAL
IHC	108	59(5)	1	168

Recherche de la mutation V600E en immunohistochimie: 35,1% des cas présentent la mutation V600E. Les cas où le marquage est hétérogène ont été considérés comme positifs dans notre étude.

Tableau 2 :

	WT	V600E	V600Ecomplex	V600K	AA	TOTAL
SNaPshot	33	21	0	0	5	59
Pyroséquençage	70	32	2	3	2	109
Total BM	103	53	2	3	7	168

	V600DK601DEL
BM (séquençage de Sanger)	1

Recherche de la mutation V600E en biologie moléculaire: 31,5% des cas présentent la mutation V600E (35,6% en SNaPshot et 29,3% au pyroséquençage). 4,2% d'absence d'amplification (AA) (8,5% avec SNaPshot, 1,8% au pyroséquençage). Parmi les 103 WT, un cas avait ensuite été testé par la technique de séquençage de Sanger qui a mis en évidence une mutation V600DK601DEL qui n'avait été détectée ni par le pyroséquençage ou la snapshot, ni par l'IHC.

Tableau 3 :

SNP	WT	BRAF V600E	AA	TOTAL
IPH -	33	0	3	<b>36</b>
+	0	21 (4 hétéro)	1	<b>22</b>
NI	0	0	1	<b>1</b>
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>21</b>	<b>5</b>	<b>59</b>

Comparaison de l'IHC vs SNaPshot dans la recherche de la mutation V600E :100% de concordance (54 cas) entre la SNaPshot et l'IHC. 5 cas d'AA . Un cas non interprétable (NI) en IHC car il n'y avait plus de matériel tumoral sur le bloc.

Tableau 4 :

pyro IPH	WT	BRAF V600E	BRAF Autre	AA	TOTAL
-	64	2	2V600Ecp 3V600K	1	<b>72</b>
+	6	30	0	1	<b>37</b>
<b>TOTAL</b>	<b>70</b>	<b>32</b>	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>109</b>

Comparaison de l'IHC vs pyroséquençage dans la recherche de la mutation V600E :86,2% de concordance (94 cas) entre le pyroséquençage et l'IHC. 2 cas d'AA .

Tableau 5 :

BM IPH	WT	BRAF V600E	BRAF Autre	AA	TOTAL
-	97	2	2V600Ecpx 3V600K	4	<b>108</b>
+	6	51 (5hétéro)	0	2	<b>59</b>
NI	0	0	0	1	<b>1</b>
TOTAL	<b>103</b>	<b>53</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>168</b>

Comparaison de l'IHC vs biologie moléculaire dans la recherche de la mutation V600E :88% de concordance (148 cas) entre la biologie moléculaire et l'IHC. 7 cas d'absence d'amplification (AA) en BM. Un cas non interprétable (NI) en IHC car il n'y avait plus de matériel tumoral sur le bloc.

En IHC :

La mutation V600E est retrouvée sur 59 des 168 prélèvements (dont 3 doublons) soit 35,1% des cas. En enlevant les doublons, nous obtenons 33,9%.

En BM :

La mutation V600E est retrouvée sur 53 prélèvements sur 168 soit 31,5% des cas (dont 3 doublons). En enlevant les doublons, nous aboutissons à 30,3%.

Sur les 168 cas étudiés :

**148 cas** étaient concordants (soit 88%) : 97 IHC-/BM- et 51 IHC+/BM+

**13 cas** étaient discordants (soit 7,7%) : 7 IHC-/BM+ (2 V600E complexe, 3 V600K, 2 cas V600E), 6 IHC+/BM-

Les cas discordants vont être discutés plus bas.

**7 cas** (4,2%) n'étaient pas interprétables en BM par absence d'amplification: dans 4 cas l'IHC est négative, dans 2 cas l'IHC est positive et dans un cas le résultat n'était pas interprétable en IHC.

A noter que parmi les cas concordants IHC-/BM-, un cas s'est avéré être en fait une mutation complexe V600DK601del au séquençage de Sanger. Cette mutation n'est pas reconnue par le pyroséquençage car elle est localisée sur l'amorce. Seuls les allèles non mutés sont donc amplifiés.

Pour les 10 patients ayant eu 2 prélèvements différents : les mêmes résultats étaient retrouvés sur les 2 prélèvements (6 cas WT, 3 cas de mutation V600E et 1 cas de mutation V600E complexe).

Il s'agissait respectivement de prélèvements :

- sur le mélanome primitif et une métastase ganglionnaire (un cas muté V600E et un cas WT),
- sur une métastase dermohypodermique et une métastase ganglionnaire (un cas muté V600E complexe),
- sur une métastase dermohypodermique et hypodermique (un cas muté V600E et un cas WT),
- sur deux ganglions métastatiques (deux cas WT),
- sur une métastase ganglionnaire et une métastase cérébrale (un cas WT),
- sur 2 localisations hypodermiques différentes (un cas WT),
- sur une même localisation (un cas WT).

Dans notre étude, les mélanomes et leur métastases ont le même statut mutationnel BRAF quelque soit le site, mais ce n'est pas toujours le cas : en recherchant la présence de la mutation BRAF sur la tumeur primitive vs la métastase, Colombino et al. ont trouvé une légère augmentation de la mutation V600E sur les métastases, qui n'est cependant pas significative [28]. Les auteurs en déduisent malgré tout qu'il est préférable d'utiliser le tissu métastatique lorsque l'on a le choix.

Dans notre cohorte, nous avons un cas de mélanome choroïdien qui ne présente pas de mutation BRAF : ce résultat rejoint une étude portant sur 30 cas de mélanome oculaire qui avait mis en évidence l'absence de mutation BRAF dans tous les cas [29].

## IV- DISCUSSION

### Cas discordants :

#### - IHC-/BM+ :

Dans 7 cas, la biologie moléculaire met en évidence une mutation de BRAF tandis que l'immunohistochimie est négative :

Dans 5 cas, cela est dû à la présence de mutations autres que V600E (respectivement 2 cas V600E complex et 3 cas V600K) qui sont détectées par le pyroséquençage mais qui ne sont pas reconnues par l'anticorps VE1 en immunohistochimie.

Dans 2 autres cas, la cause de la négativité en IHC n'a pu être expliquée : il y avait assez de matériel tumoral, la BM et l'IHC ont été réalisés sur le même bloc.

Nous avons donc réalisé une deuxième IHC sur ces 2 cas. Dans les deux cas l'IHC de contrôle s'est révélée positive pour la mutation V600E. La première IHC qui était négative avait été demandée avant la biologie moléculaire. Le 2<sup>ème</sup> cas qui provenait du CPAP, était plus ancien (novembre 2013), il y avait donc un écart de 7 mois entre la BM et l'IHC. Ces cas montrent la nécessité de réaliser l'IHC avec un contrôle externe positif afin d'éviter les cas de faux négatifs.

Dans une étude similaire comparant l'anticorps VE1 en IHC et le pyroséquençage pour la mutation BRAF V600E dans les mélanomes, Pearlstein et al. ont eu 5 cas IHC-/BM+. Après contrôle en BM, un cas V600E en BM correspondait à une mutation V600K, les autres cas ont été considérés comme étant soit des faux négatifs en IHC soit des faux positifs en BM sans trouver d'explication aux discordances. Il n'y a pas eu de contrôle en IHC. Au total, ils ont déduit une sensibilité de 85% et une spécificité de 100% pour l'Ac VE1 [26].

- **IHC+/BM- :**

Dans 6 cas, l'immunohistochimie est positive tandis que la biologie moléculaire est négative.

Le pyroséquençage a été refait pour un cas et s'est avéré muté V600E. Il y avait eu une erreur au niveau de l'extraction la première fois.

Dans un second cas où le pyroséquençage est refait, il est trouvé une mutation au seuil de la sensibilité ce qui ne permet pas de trancher avec la biologie moléculaire seule.

Dans 5 cas, l'IHC a été refaite avec un contrôle externe. Elle fut secondairement réévaluée comme négative dans 3 cas et s'est révélée à nouveau positive dans 2 cas : dans ces 2 cas les prélèvements comportaient respectivement 10% et 20% de matériel tumoral. Un de ces cas correspond au résultat équivoque du pyroséquençage.

Les études comparant le pyroséquençage à l'IHC telles celles de Pearlstein et al. et Colomba et al. n'ont pas eu de cas IHC +/BM- [22] [26]. Ihle et al. ont eu un cas où l'IHC était positive pour une mutation V600R [30] qu'ils interprètent comme une réaction croisée. Une mutation V600R n'a pas été reconnue par contre par l'Ac VE1 dans l'étude menée par Pearlstein [26]. Heinzerling et al ont eu deux cas où l'IHC était positive pour d'autres mutations (pour les mutations V600EK601del et V600K) [31]. Les cas d'IHC+/BM- concernent une autre technique de BM : Long et al. ont comparé l'IHC et l'HRM (high-resolution melting); ils ont trouvé 3 cas positifs en IHC et négatifs en BM. Après contrôle par une autre technique de BM considérée plus sensible (la spectrométrie de masse), 2 des prélèvements ont été finalement positifs pour V600E [24]. Thiel et al. ont comparé l'IHC et le cyclic minisequencing analysis et ont trouvé deux cas IHC+/BM- qui se sont révélés négatifs lorsque l'immunomarquage est refait [32]. Dans notre étude, l'immunomarquage refait reste positif dans deux cas sur cinq.



## **Cas des marquages hétérogènes**

Dans 4 cas en IHC, le marquage V600E était hétérogène : ils étaient tous V600E positifs en biologie moléculaire. Busam et al. avaient eu 6 cas de marquage hétérogène et tous étaient aussi V600E à la BM [33]. Dans notre étude, nous avons considéré les marquages hétérogènes comme positifs. La présence d'un marquage parfois hétérogène en immunohistochimie peut être considérée comme pouvant bénéficier du traitement inhibiteur de BRAF. L'intensité de l'expression de la protéine BRAF V600E en IHC ne prédit pas de la réponse de l'inhibiteur de BRAF dans les mélanomes métastatiques [34].

## **Causes d'absence d'amplification en BM**

Dans 7 cas, il n'y a pas eu d'amplification de l'ADN au pyroséquençage.

Les principales causes d'absence d'amplification sont :

- Une mauvaise qualité de l'ADN extrait : en biologie moléculaire, la qualité de l'ADN est évaluée par une PCR multiplex qui amplifie 5 fragments d'ADN sur des gènes répartis sur des chromosomes différents, et de tailles différentes (100, 200, 300, 400 et 600 paires de bases (pb)). Après analyse des fragments par électrophorèse capillaire (pour chaque amplicon, une des amorces d'amplification est associée à un fluorochrome), on examine les fragments. Si les 5 fragments sont présents (5/5) = très bonne qualité d'ADN, si seuls les amplicons de 100 et 200 pb sont présents, l'ADN est considéré comme de mauvaise qualité (ADN dégradé). Il est difficile de savoir pourquoi l'ADN est de mauvaise qualité (dégradation liée à la fixation ?).
- La présence de mélanine qui est parfois un inhibiteur de PCR.

- La possibilité d'un rôle possible d'inhibiteurs de PCR dans le prélèvement, du à des traitements reçus par le patient a été évoqué.

Dans ces cas, l'IHC a l'avantage de ne pas être gêné par la présence de mélanine pour l'interprétation des résultats car la coloration est suffisamment différente (les pigments de mélanine sont noirs tandis que l'IHC est marron/doré). De plus, en cas de doute, on s'aide de l'HPS (**figure 8**) ainsi que d'un contrôle externe.

En tenant compte des différentes corrections apportées, nous obtenons 154 cas concordants soit 91,7% et 7 cas discordants soit 4,2%.

## V- CONCLUSION

Ces résultats permettent d'apprécier les rôles de l'IHC et de la BM avec ses différentes techniques dans le bilan pré-thérapeutique des mélanomes métastatiques.

Dans notre étude, nous avons comparé l'immunohistochimie et la biologie moléculaire avec la SNaPshot pour 59 cas et le pyroséquençage pour 109 cas qui est la technique de biologie moléculaire actuellement considérée comme la plus spécifique et la plus sensible pour détecter les mutations de BRAF [22]. C'est aussi la technique de routine utilisée au laboratoire d'Oncobiologie Moléculaire du CHU d'Amiens depuis le 2<sup>ème</sup> trimestre 2013. Avant elle, on utilisait la technique de SNaPshot pour la recherche de la mutation V600E associée au séquençage de Sanger pour chercher d'autres mutations si la SNaPshot était négative. Dans l'expérience limitée que l'on a de la SNaPshot, on a une meilleure corrélation entre IHC et BM mais la capacité de détection de la SNaPshot paraît plus faible car on a 8,5% d'AA contre 1,8% d'AA avec le pyroséquençage. La taille de l'échantillon ne permet pas d'interprétation statistique valable. L'avantage du pyroséquençage par rapport à la SNaPshot est que cette technique est plus rapide et détecte plus de mutations.

Au total, nous avons trouvé une concordance dans 88% des cas (148 cas), une discordance dans 7,7% des cas (13 cas) et 4,3% des cas non évaluables (7 cas) (par absence d'amplification dans 5 cas et résultats non contributifs dans 2 cas).

Les cas discordants étaient dus à différentes raisons : l'IHC ne reconnaît que les mutations V600E de BRAF, certains cas ont été réévalués négatifs après un deuxième immunomarquage avec un témoin externe positif ; pour le pyroséquençage un matériel tumoral insuffisant avec amplification du matériel non tumoral seulement ou la présence de mélanine qui empêche l'amplification de l'ADN. Nous avons aussi eu un cas où la BM s'est révélée positive la seconde fois, due à un problème d'extraction la première fois. Dans ces cas, les deux méthodes sont complémentaires, l'IHC permet de voir la mutation car elle est visible même sur quelques cellules tumorales et peut être

interprétée en présence de mélanine. Nous avons aussi eu deux cas où l'IHC a été refaite devant la discordance IHC/BM et s'est révélée positive la 2<sup>ème</sup> fois, soulignant l'intérêt de réaliser l'IHC avec un contrôle externe positif pour éviter les cas de faux négatifs et de faux positifs. A noter qu'il n'y a pas eu de discordance entre l'IHC et la SNaPshot.

L'anticorps monoclonal VE1 n'a pas mis en évidence d'autres mutations que V600E.

Dans notre étude apparaissent 6 cas IHC+/BM- et 7 cas non évaluables en BM : cette situation n'a jusqu'à présent pas été décrite dans d'autres articles comparant l'IHC au pyroséquençage dans le mélanome.

Ces situations montrent l'intérêt de la complémentarité des deux techniques pour optimiser la prise en charge des patients et ne pas priver de traitements les patients chez qui on ne trouve pas la mutation BRAF V600E au pyroséquençage.

Ni l'IHC, ni le pyroséquençage ne sont 100% sensibles : la technique de SNaPshot a montré une mutation là où les 2 techniques ont échoué.

Ces résultats invitent à une organisation des techniques par coopération entre cliniciens, pathologistes et biologistes moléculaires, qui pourrait être déclinée en protocole et procédures : IHC sur demande du clinicien : si positivité (40% d'après la littérature), autorisation du traitement ; si négativité : BM, dont on attend 10% de positivité. Dans le cadre de cette étude, nous avons réalisé la recherche de BRAF V600E en IHC en prospectif dans les mélanomes métastatiques : la rapidité des résultats permet de les transmettre aux oncobiologistes qui peuvent ainsi avoir une référence : dans les cas où le pyroséquençage donne un résultat ambigü, l'IHC peut être une aide au résultat. Ce protocole simple à mettre en route est facilité au plan régional si les structures d'ACP adressent le bloc d'inclusion à la structure d'ACP de la plateforme régionale. Des contrôles de qualité interne et inter-plateformes participent à la démarche qualité. Il nous paraît préférable de disjoindre les deux structures ACP et BM pour assurer leur indépendance d'interprétation des résultats.

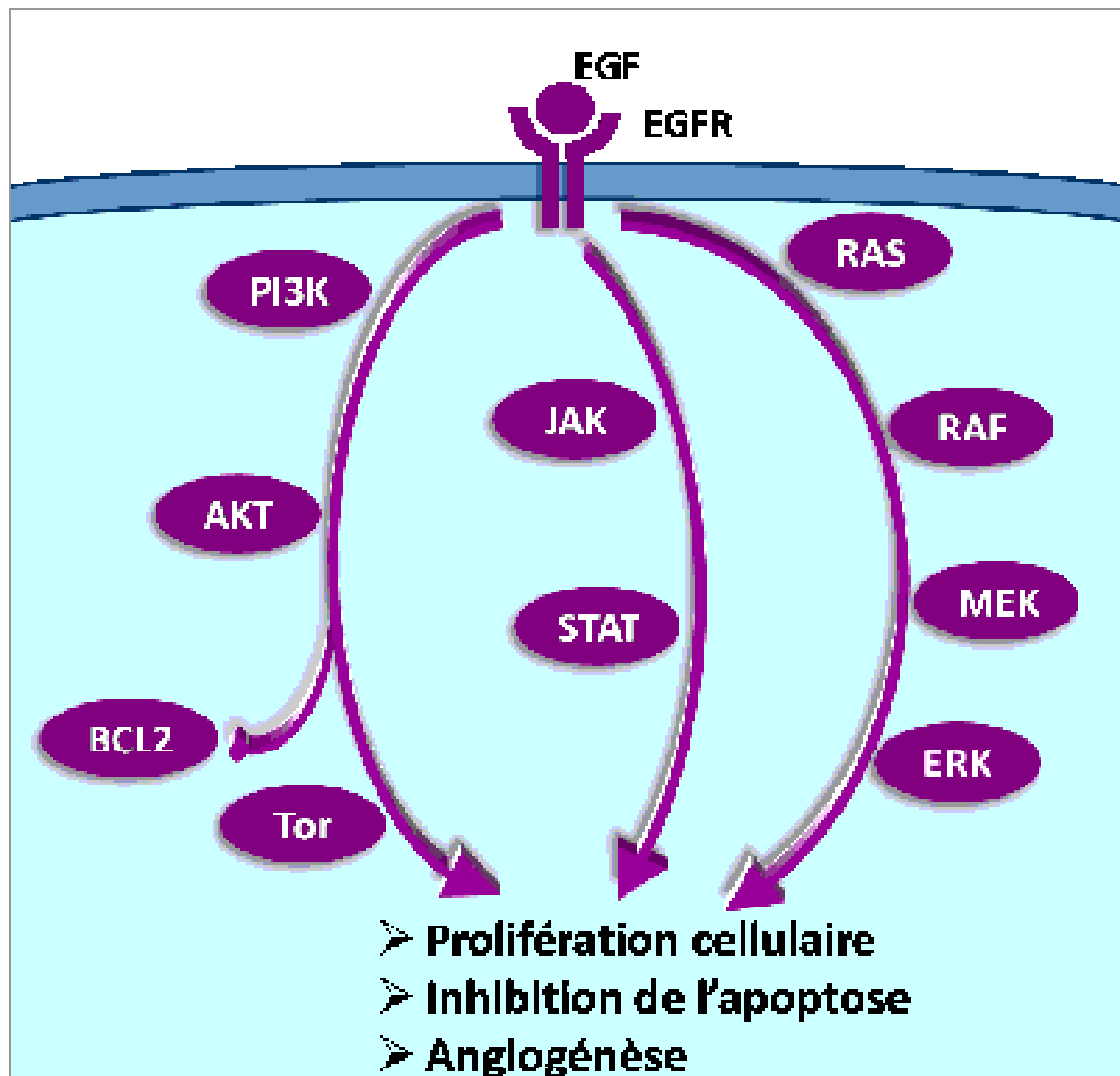


Figure 1: voie RAS-RAF-MEK-ERK-MAP kinase

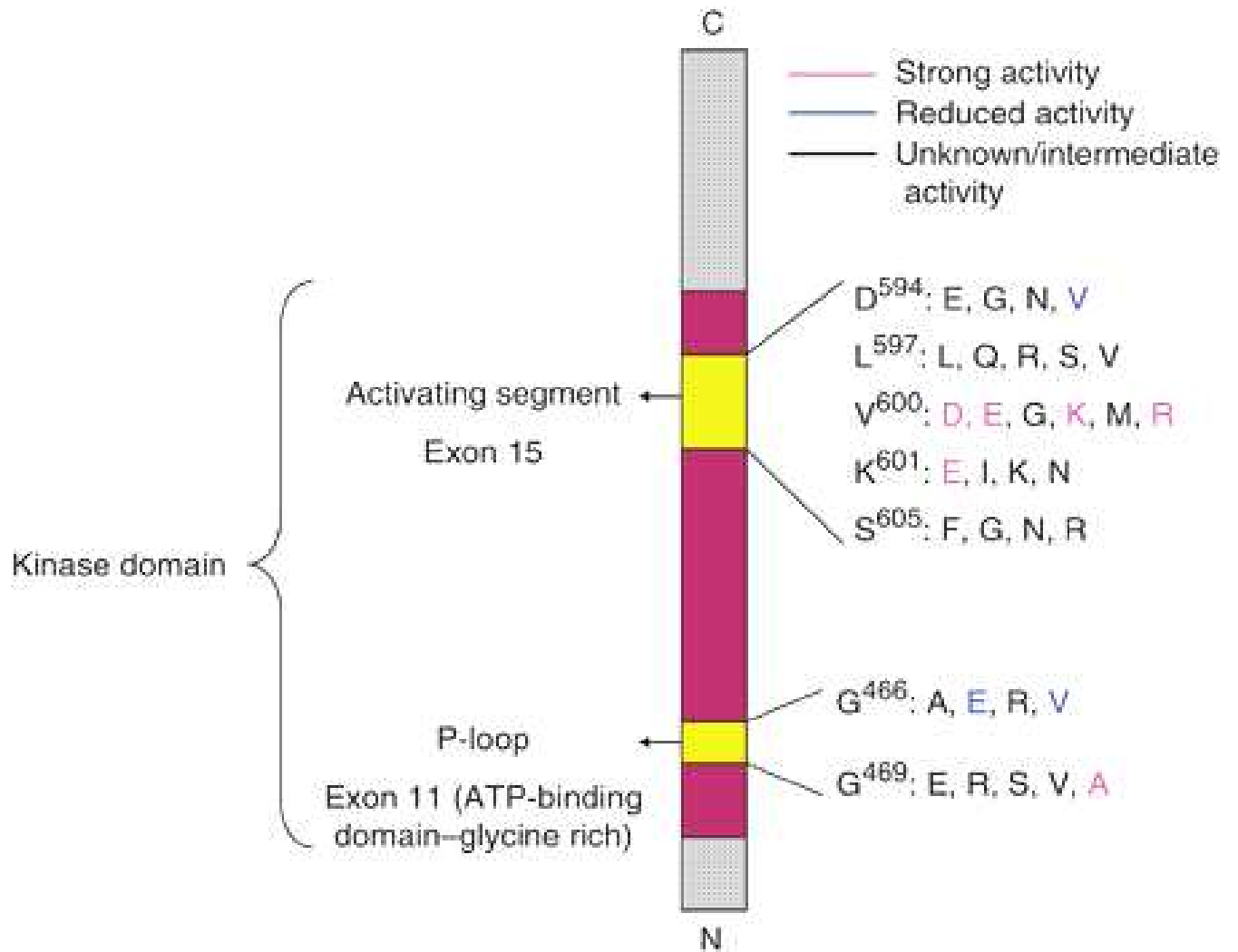


Figure 2: mutations BRAF dans le mélanome (Wan *et al*, 2004) [11]



Figure 3 : plateformes hospitalières de génétique moléculaire des cancers financées par l'INCa [35]

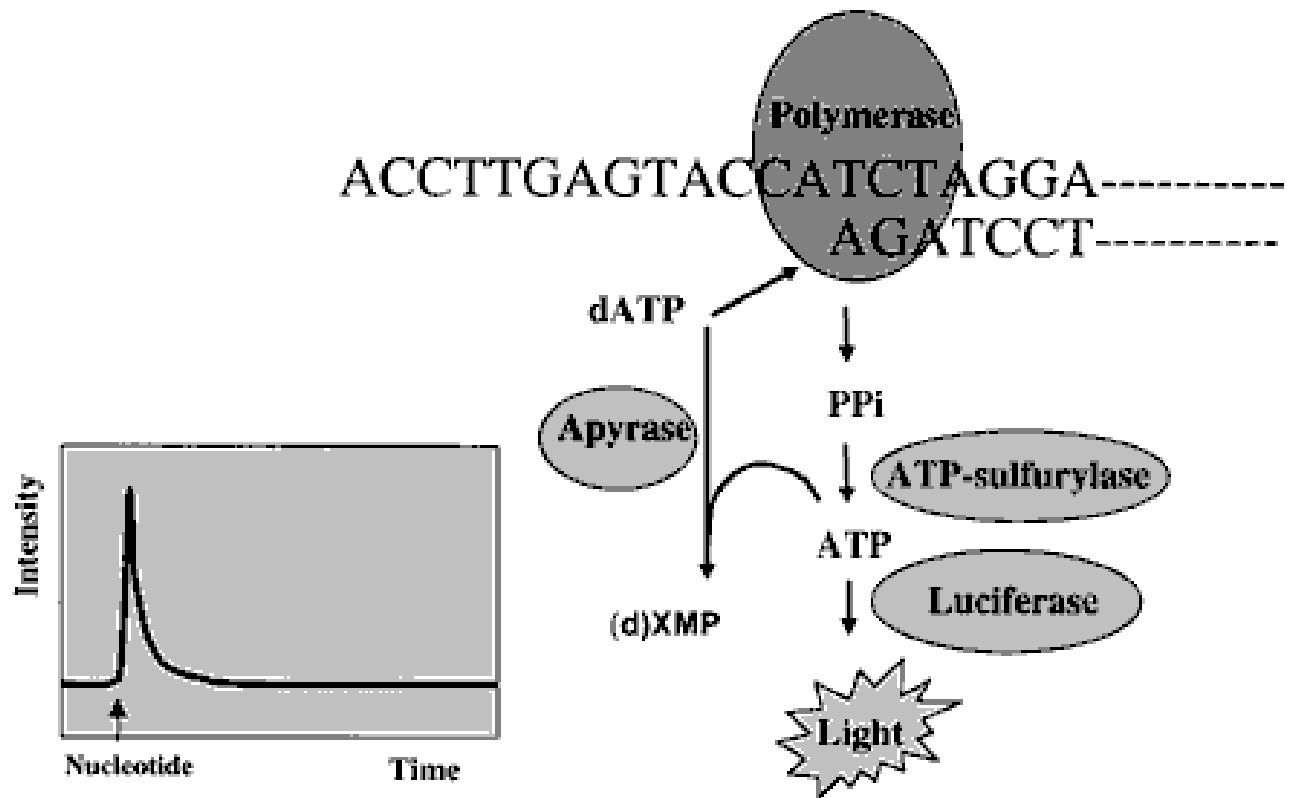


Figure 4 : représentation de la progression de la réaction enzymatique du pyroséquençage en phase liquide. Une amorce d'ADN et les quatre enzymes sont placées dans un puit d'une plaque microtitrée. Les quatre nucléotides sont ajoutés les uns après les autres et l'incorporation est suivie de l'activation des enzymes ATP sulfurylase et de la luciférase [23].



B2-CWCTGTAGC

A: 100%  
T: 0%

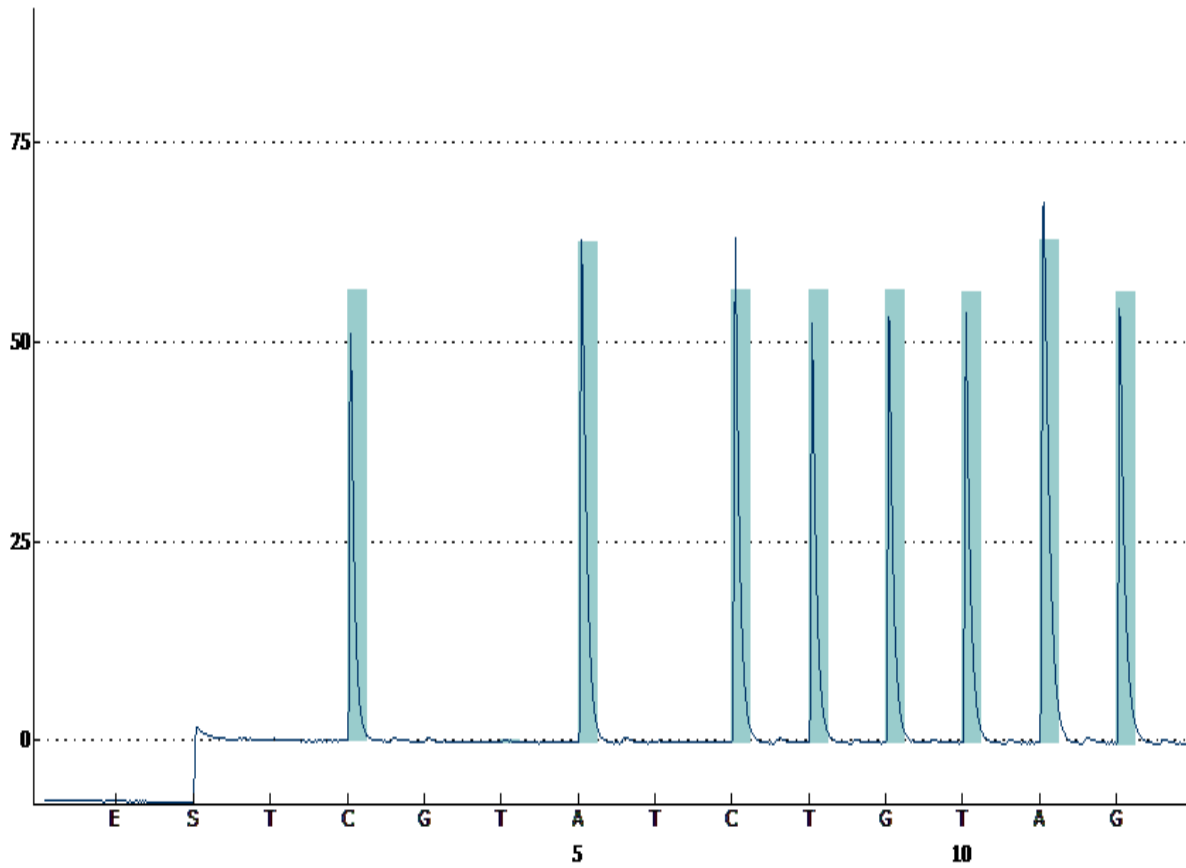


Figure 5 : pyrogramme d'une séquence non mutée (WT) du codon 600 (exon 15) du gène BRAF par la technique de pyroséquençage

Abscisse : séquence d'incorporation des nucléotides  
ordonnée : intensité de luminescence proportionnelle à la quantité de nucléotides incorporés

C3: CWCTGTAGC

A: 67%  
T: 33%

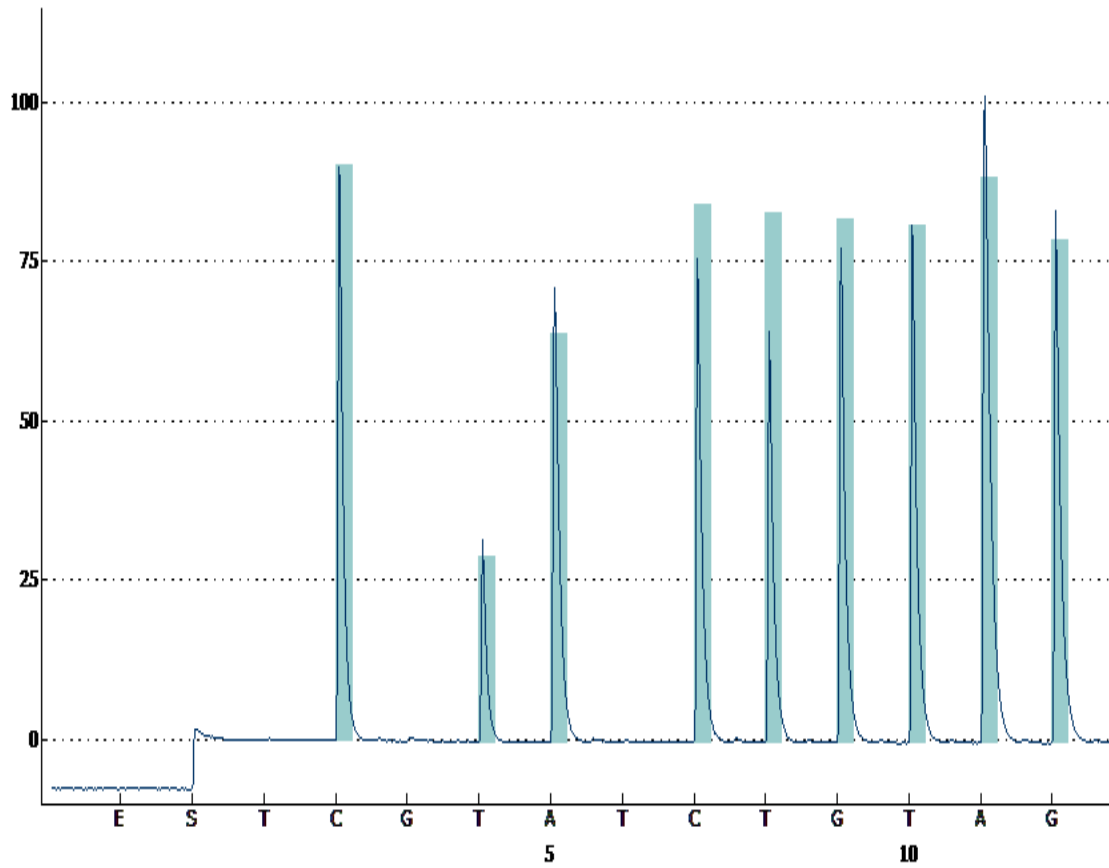


Figure 6 : pyrogramme d'une séquence mutée V600E du codon 600 (exon 15) du gène BRAF par la technique de pyroséquenceur

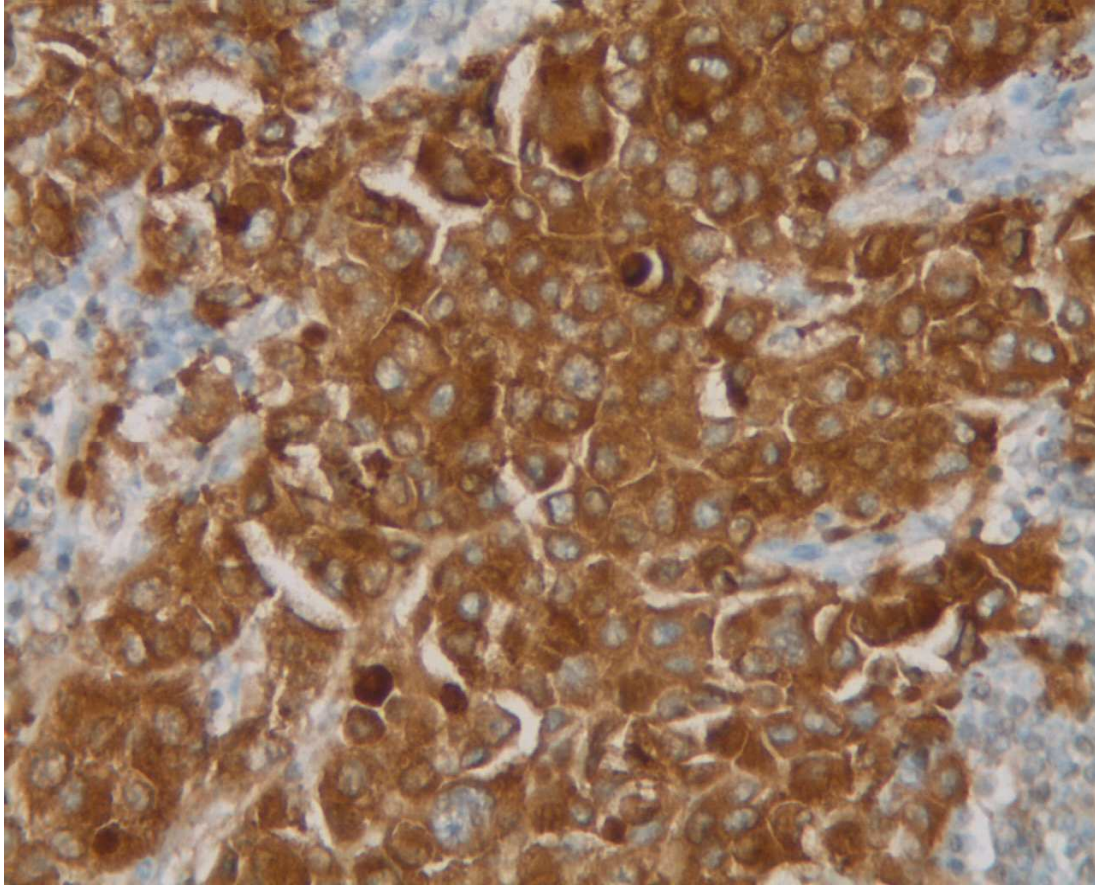


Figure 7a : IHC V600E : marquage positif marron (x20)

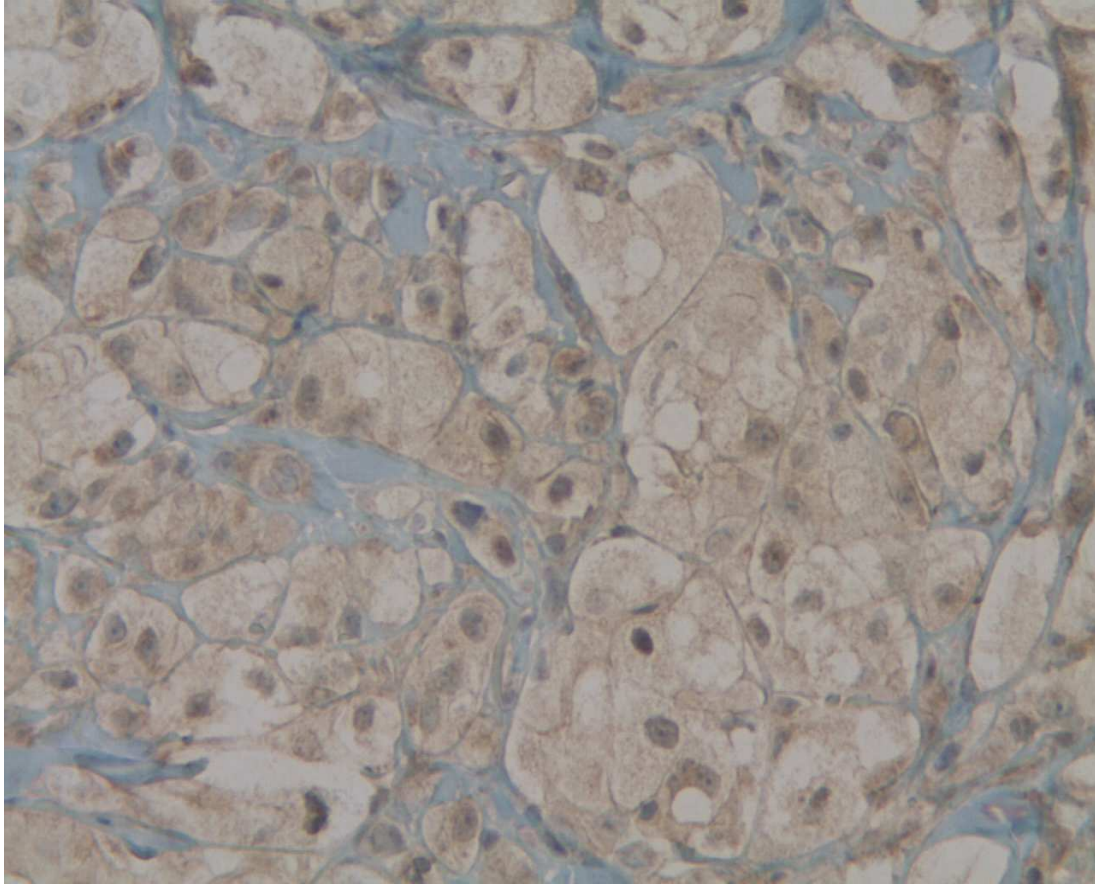


Figure 7b : IHC V600E : marquage discret négatif (x20)

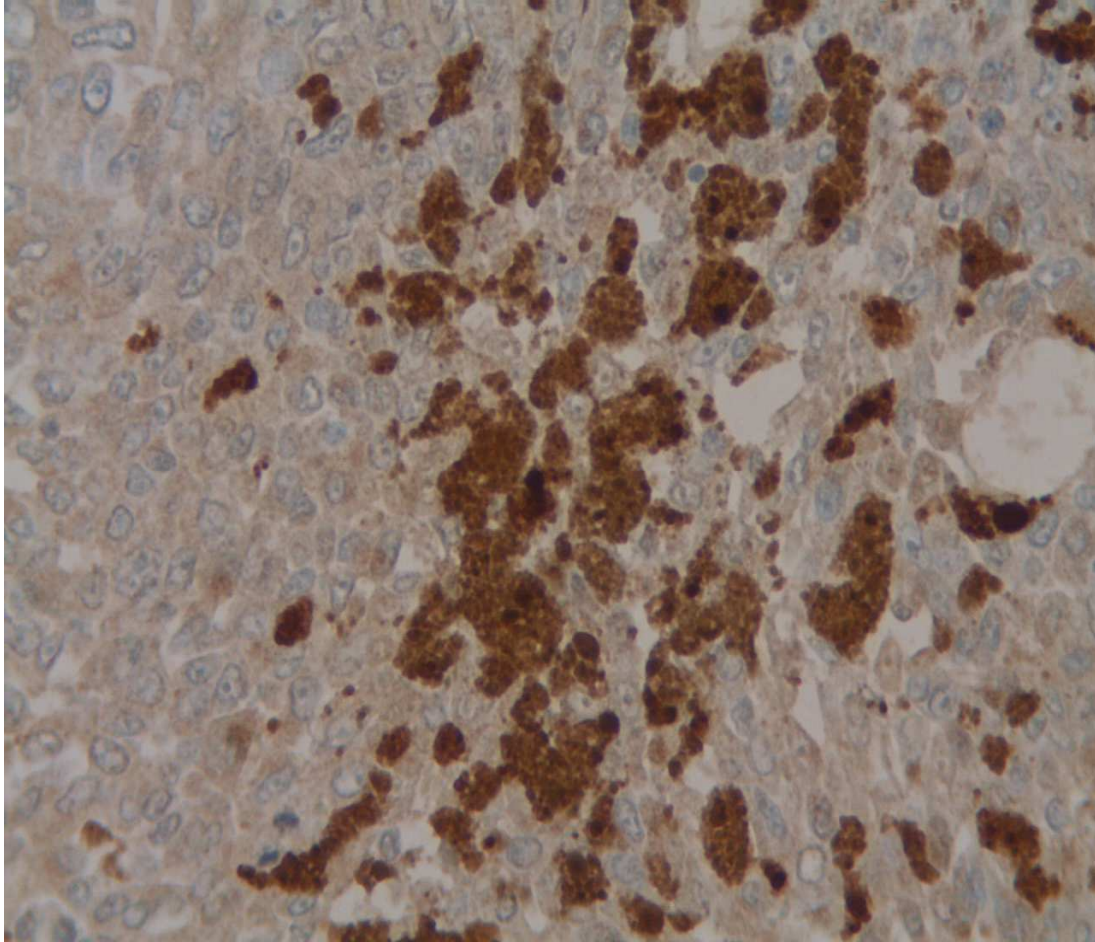


Figure 8a : pigment de mélanine sur l'IHC (x20)

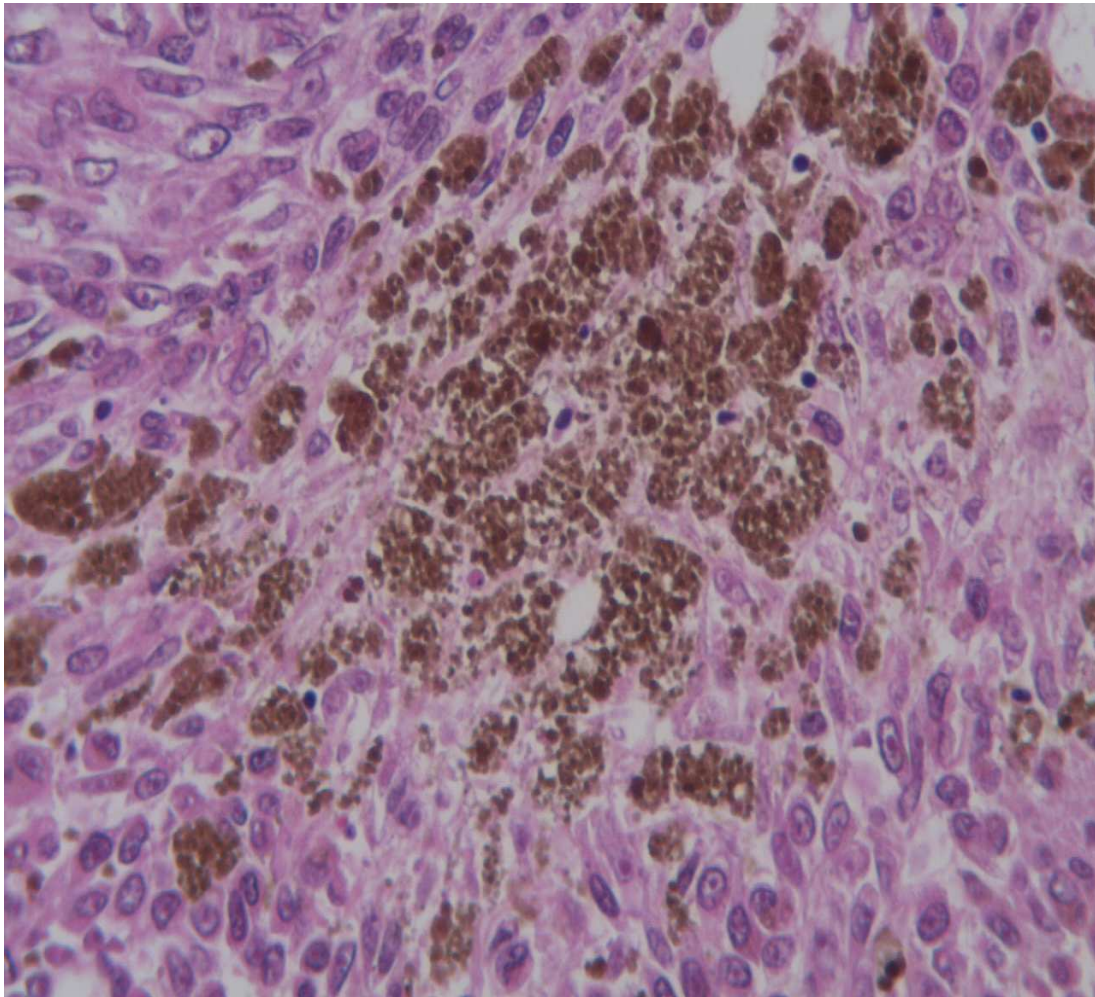


Figure 8b : pigment de mélanine (même bloc que 8a) (HE, x20)

## V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] INCa. Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/14-melanome-cutane/44-epidemiologie-melanome-cutane-france-metropolitaine-incidence-mortalite.html>
- [2] Robinson, M.J and Cobb, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180–186.
- [3] Cho NY, Choi M, Kim BH, Cho YM, Moon KC, Kang GH. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2006; 119: 1858-1862.
- [4] Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 27: 949-54.
- [5] Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2006 ;126:154-60.
- [6] Han J, Colditz GA, Hunter DJ. Risk factors for skin cancers: a nested case-control study within the Nurses' Health Study. *Int J Epidemiol*. 2006; 35:1514–1521.
- [7] Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol*. 2008; 1: 395–405.
- [8] Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Res*. 2006; 16: 97–103.
- [9] Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LL, Hamilton AL, Mann G, et al. Clinico-pathologic correlates of BRAF mutation status in 207 consecutive patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 15.
- [10] Christine M. Lovly, Dahlman, Fohn, Zengliu Su, Dora Dias-Santagata, Donna J. Hicks, et al. Routine Multiplex Mutational Profiling of Melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012; 7.
- [11] Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell*. 2004; 116: 855–867.
- [12] Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33 :19.
- [13] Bock C, Berchem G, Bruch Y, Genoux-Hames J, Meyer S, Rauh S et al. Vemurafenib (zelboraf). [http://www.conseil-scientifique.lu/fileadmin/files/GT\\_oncologie/Vemurafenib.pdf](http://www.conseil-scientifique.lu/fileadmin/files/GT_oncologie/Vemurafenib.pdf)

- [14] Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011; 364:2507-16.
- [15] HAS. Zelboraf. Commission de la transparence [http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_1329823/en/zelboraf](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_1329823/en/zelboraf)
- [16] HAS. Zelboraf. Commission de la transparence. Avis 3 octobre 2012 [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-10/zelboraf\\_03102012\\_avis\\_ct12121.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2012-10/zelboraf_03102012_avis_ct12121.pdf)
- [17] ansm. Taniflar 50 mg, gélule. [http://www.ansm.sante.fr/searchengine/detail/\(cis\)/61477322](http://www.ansm.sante.fr/searchengine/detail/(cis)/61477322)
- [18] HAS. Commission de la transparence avis 6 novembre 2013. [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-12741\\_YERVOY\\_PIC\\_REEV\\_Avis3\\_CT12741.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-12741_YERVOY_PIC_REEV_Avis3_CT12741.pdf).
- [19] INCa. Missions et domaines d'intervention. <http://www.e-cancer.fr/linstitut-national-du-cancer/presentation/missions-et-domaines-dintervention>.
- [20] Mélanome cutané métastatique, rapport intégral, recommandations professionnelles de l'INCa sept 2013, p9.
- [21] Chapman PB, Hauschild A, Sondak VK. Frontline approach to metastatic BRAF-mutant melanoma diagnosis, molecular evaluation, and treatment choice. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2014:e412-21.
- [22] Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn*. 2013; 15:94-100.
- [23] Ronaghi. Pyrosequencing shed light on DNA sequencing. *Genome Research*. 2001; 11: 3-11.
- [24] Long GV, JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2013 ; 37:61-5.
- [25] Marin C, Beauchet A, Capper D, Zimmermann U, Julié C, Ilie M, et al. Detection of BRAF p.V600E mutations in melanoma by immunohistochemistry has a good interobserver reproducibility. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138:71-5.
- [26] Pearlstein MV, Zedek DC, Ollila DW, Treece A, Gully ML, Groben PA, et al. Validation of the VE1 immunostain for the BRAF V600E mutation in melanoma. *Cutan Pathol*. 2014; 41:724-32.
- [27] anticorps-en ligne.fr. <http://www.anticorps-enligne.fr/antibody/1686860/anti-BRAF+V600E/>
- [28] Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu, Rubino, De Giorgi V, et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol*. 2012 ;30:2522-9.



- [29] Populo H, Soares P, Rocha AS, Silva P, Lopes JM Evaluation of the mTOR pathway in ocular (uvea and conjunctiva) melanoma. *Melanoma Res.* 2010; 20: 107–117.
- [30] Ilhe MA, Fassunke J, König K, Grünewald I, Schlaak M, Kreuzberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* 2014,14:13.
- [31] Heinzerling L , Kühnapfel S , Meckbach D, Baiter M, Kaempgen E , Keikavoussi P, et al. Rare BRAF mutations in melanoma patients: implications for molecular testing in clinical practice. *British Journal of Cancer.* 2013; 108: 2164–2171.
- [32] Thiel A, Moza M, Kytölä S, Orpana A, Jahkola T, Hernberg M et al. Prospective immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in melanoma. *Hum Pathol.* 2015 ; 46:169-75.
- [33] Busam KJ, Hedvat C, Pulitzer M, von Deimling A, Jungbluth AA. Immunohistochemical analysis of BRAF(V600E) expression of primary and metastatic melanoma and comparison with mutation status and melanocyte differentiation antigens of metastatic lesions. *Am J Surg Pathol.* 2013 ; 37:413-20.
- [34] Wilmott J S, Menzies A M, Haydu L E, Capper D, Preusser M, Zhang Y E et al. BRAF V600E protein expression and outcome from BRAF inhibitor treatment in BRAF V600E metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 2013 ; 108 : 924-931.
- [35] INCa. Missions et localisation des plateformes. <http://www.e-cancer.fr/soins/laces-aux-therapies-ciblees/les-plateformes-de-genetique-moleculaire-des-cancers/missions-et-localisation-des-plateformes>

## VI- RESUME

Le développement de la thérapie ciblée a permis une avancée dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers. Dans le cadre du mélanome métastatique, le vemurafenib, un inhibiteur de kinase qui bloque la forme mutée V600 de la protéine BRAF a prouvé son efficacité chez les patients présentant cette mutation. Parmi les différentes méthodes existantes pour détecter la mutation, nous avons comparé l'immunohistochimie avec l'anticorps VE1 et la biologie moléculaire avec le pyroséquençage et la SNaPshot. Sur les 168 prélèvements testés, nous avons trouvé une concordance de 88%, soit 148 cas. Les cas discordants étaient dus soit aux limites du pyroséquençage comme l'absence d'amplification due à la présence de mélanine ou du matériel tumoral insuffisant soit à celles de l'IHC avec des cas de faux négatifs ou non interprétables par absence de matériel tumoral résiduel. Nous avons eu un cas négatif avec les 3 techniques alors qu'une mutation était trouvée par le séquençage de Sanger. Nous en concluons que l'immunohistochimie et la biologie moléculaire sont complémentaires pour détecter la mutation et optimiser la prise en charge thérapeutique des patients présentant la mutation BRAF V600E.

Mots clés : V600E, BRAF, immunohistochimie, mélanome, pyroséquençage

The development of targeted therapies led to a progress in the therapeutic care of patients affected by cancers. In metastatic melanoma, vemurafenib, an inhibitor of kinase which blocks the mutated form of the BRAF protein proved its efficiency in patients having the mutation. Among the various existing methods to detect the mutation, we compared immunohistochemistry with the VE1 antibody with pyrosequencing and SNaPshot. Among the 168 tissues tested we found a 88% concordance (148 cases) between molecular biology and immunohistochemistry. The discordant cases were due to the limits of either pyrosequencing such as the absence of amplification due to the presence of melanin or insufficient tumoral tissue or immunohistochemistry with cases of false negatives or absence of residual tumoral tissue. We also had one negative case with both techniques which happened to have a mutation detected with the Sanger sequencing. We conclude that the immunohistochemistry and molecular biology are complementary to detect BRAF V600E mutation and enhance therapeutic care of patients having the mutation.

Keywords : V600E, BRAF, immunohistochemistry, melanoma, pyrosequencing

## MUTATION V600E DE BRAF DANS LE MELANOME COMPARAISON DE L'IMMUNOHISTOCHIMIE ET DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

Le développement de la thérapie ciblée a permis une avancée dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints de cancers. Dans le cadre du mélanome métastatique, le vemurafenib, un inhibiteur de kinase qui bloque la forme mutée V600 de la protéine BRAF a prouvé son efficacité chez les patients présentant cette mutation. Parmi les différentes méthodes existantes pour détecter la mutation, nous avons comparé l'immunohistochimie avec l'anticorps VE1 et la biologie moléculaire avec le pyroséquençage et la SNaPshot. Sur les 168 prélèvements testés, nous avons trouvé une concordance de 88%, soit 148 cas. Les cas discordants étaient dus soit aux limites du pyroséquençage comme l'absence d'amplification due à la présence de mélanine ou du matériel tumoral insuffisant soit à celles de l'IHC avec des cas de faux négatifs, de faux positifs ou des cas non interprétables par absence de matériel tumoral résiduel. Nous avons eu un cas négatif avec les 3 techniques alors qu'une mutation était trouvée par le séquençage de Sanger. Nous en concluons que l'immunohistochimie et la biologie moléculaire sont complémentaires pour détecter la mutation et optimiser la prise en charge thérapeutique des patients présentant la mutation BRAF V600E.

Mots clés : V600E, BRAF, immunohistochimie, mélanome, pyroséquençage

## BRAF V600E MUTATION IN MELANOMA COMPARISON BETWEEN IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY

The development of targeted therapies led to a progress in the therapeutic care of patients affected by cancers. In metastatic melanoma, vemurafenib, an inhibitor of kinase which blocks the mutated form of the BRAF protein proved its efficiency in patients having the mutation. Among the various existing methods to detect the mutation, we compared immunohistochemistry with the VE1 antibody with pyrosequencing and SNaPshot. Among the 168 tissues tested we found a 88% concordance (148 cases) between molecular biology and immunohistochemistry. The discordant cases were due to the limits of either pyrosequencing such as the absence of amplification due to the presence of melanin or insufficient tumoral tissue or immunohistochemistry with cases of false negatives or absence of residual tumoral tissue. We also had one negative case with both techniques which happened to have a mutation detected with the Sanger sequencing. We conclude that the immunohistochemistry and molecular biology are complementary to detect BRAF V600E mutation and enhance therapeutic care of patients having the mutation.

Keywords : V600E, BRAF, immunohistochemistry, melanoma, pyrosequencing