Cartographie multi-élémentaire de peaux saines et de tumeurs cutanées humaines par technologie LIBS : comparaison à l'histologie standard

Marion Sabatier-Vincent

▶ **To cite this version:**

Marion Sabatier-Vincent. Cartographie multi-élémentaire de peaux saines et de tumeurs cutanées humaines par technologie LIBS : comparaison à l'histologie standard. Médecine humaine et pathologie. 2016. dumas-01310538

HAL Id: dumas-01310538

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01310538

Submitted on 20 Jun 2016

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.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

SICD1 Bibliothèques de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE GRENOBLE ALPES FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Année : 2016 N°

CARTOGRAPHIE MULTI-ÉLÉMENTAIRE DE PEAUX SAINES ET DE TUMEURS CUTANÉES HUMAINES PAR TECHNOLOGIE LIBS : COMPARAISON À L'HISTOLOGIE STANDARD

THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MEDECINE
DIPLÔME D'ETAT

Marion SABATIER-VINCENT

[Données à caractère personnel]

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE*
LE 29/04/2016

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Madame le Professeur MT. LECCIA

Membres :

Madame le Professeur J. CHARLES (directrice de thèse)

Monsieur le Docteur B. BUSSER (co-directeur de thèse)

Madame le Docteur N. PINEL

Monsieur le Professeur V. BONNETERRE

**La faculté de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

UFR de Médecine de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 76 63 71 44
FAX : +33 (0)4 76 63 71 70

UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Jean Paul ROMANET**

Année 2015-2016

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	**ALBALADEJO Pierre**	**Anesthésiologie réanimation**
PU-PH	**APTEL Florent**	**Ophtalmologie**
PU-PH	**ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine**	**Chirurgie générale**
PU-PH	**BALOSSO Jacques**	**Radiothérapie**
PU-PH	**BARONE-ROCHETTE Gilles**	**Cardiologie**
PU-PH	**BARRET Luc**	**Médecine légale et droit de la santé**
PU-PH	**BENHAMOU Pierre Yves**	**Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques**
PU-PH	**BERGER François**	**Biologie cellulaire**
MCU-PH	**BIDART-COUTTON Marie**	**Biologie cellulaire**
MCU-PH	**BOISSET Sandrine**	**Agents infectieux**
PU-PH	**BONAZ Bruno**	**Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie**
PU-PH	**BONNETERRE Vincent**	**Médecine et santé au travail**
PU-PH	**BOSSON Jean-Luc**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
MCU-PH	**BOTTARI Serge**	**Biologie cellulaire**
PU-PH	**BOUGEROL Thierry**	**Psychiatrie d'adultes**
PU-PH	**BOUILLET Laurence**	**Médecine interne**
MCU-PH	**BOUZAT Pierre**	**Réanimation**
PU-PH	**BRAMBILLA Christian**	**Pneumologie**
PU-PH	**BRAMBILLA Elisabeth**	**Anatomie et cytologie pathologiques**
MCU-PH	**BRENIER-PINCHART Marie Pierre**	**Parasitologie et mycologie**
PU-PH	**BRICAULT Ivan**	**Radiologie et imagerie médicale**
PU-PH	**BRICHON Pierre-Yves**	**Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire**
MCU-PH	**BRIOT Raphaël**	**Thérapeutique, médecine d'urgence**
PU-PH	**CAHN Jean-Yves**	**Hématologie**
MCU-PH	**CALLANAN-WILSON Mary**	**Hématologie, transfusion**
PU-PH	**CARPENTIER Françoise**	**Thérapeutique, médecine d'urgence**
PU-PH	**CARPENTIER Patrick**	**Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire**
PU-PH	**CESBRON Jean-Yves**	**Immunologie**
PU-PH	**CHABARDES Stephan**	**Neurochirurgie**

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	**CHABRE Olivier**	**Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques**
PU-PH	**CHAFFANJON Philippe**	**Anatomie**
PU-PH	**CHARLES Julie**	**Dermatologie**
PU-PH	**CHAVANON Olivier**	**Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire**
PU-PH	**CHIQUET Christophe**	**Ophtalmologie**
PU-PH	**CINQUIN Philippe**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
PU-PH	**COHEN Olivier**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
PU-PH	**COUTURIER Pascal**	**Gériatrie et biologie du vieillissement**
PU-PH	**CRACOWSKI Jean-Luc**	**Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique**
PU-PH	**CURE Hervé**	**Oncologie**
PU-PH	**DEBILLON Thierry**	**Pédiatrie**
PU-PH	**DECAENS Thomas**	**Gastro-entérologie, Hépatologie**
PU-PH	**DEMATTEIS Maurice**	**Addictologie**
MCU-PH	**DERANSART Colin**	**Physiologie**
PU-PH	**DESCOTES Jean-Luc**	**Urologie**
MCU-PH	**DETANTE Olivier**	**Neurologie**
MCU-PH	**DIETERICH Klaus**	**Génétique et procréation**
MCU-PH	**DOUTRELEAU Stéphane**	**Physiologie**
MCU-PH	**DUMESTRE-PERARD Chantal**	**Immunologie**
PU-PH	**EPAULARD Olivier**	**Maladies Infectieuses et Tropicales**
PU-PH	**ESTEVE François**	**Biophysique et médecine nucléaire**
MCU-PH	**EYSSERIC Hélène**	**Médecine légale et droit de la santé**
PU-PH	**FAGRET Daniel**	**Biophysique et médecine nucléaire**
PU-PH	**FAUCHERON Jean-Luc**	**Chirurgie générale**
MCU-PH	**FAURE Julien**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**FERRETTI Gilbert**	**Radiologie et imagerie médicale**
PU-PH	**FEUERSTEIN Claude**	**Physiologie**
PU-PH	**FONTAINE Éric**	**Nutrition**
PU-PH	**FRANCOIS Patrice**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
PU-PH	**GARBAN Frédéric**	**Hématologie, transfusion**
PU-PH	**GAUDIN Philippe**	**Rhumatologie**
PU-PH	**GAVAZZI Gaétan**	**Gériatrie et biologie du vieillissement**
PU-PH	**GAY Emmanuel**	**Neurochirurgie**
MCU-PH	**GILLOIS Pierre**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
MCU-PH	**GRAND Sylvie**	**Radiologie et imagerie médicale**
PU-PH	**GRIFFET Jacques**	**Chirurgie infantile**
PU-PH	**GUEBRE-EGZIABHER Fitsum**	**Néphrologie**
MCU-PH	**GUZUN Rita**	**Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique**
PU-PH	**HAINAUT Pierre**	**Biochimie, biologie moléculaire**
PU-PH	**HENNEBICQ Sylviane**	**Génétique et procréation**
PU-PH	**HOFFMANN Pascale**	**Gynécologie obstétrique**

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	**HOMMEL Marc**	**Neurologie**
PU-PH	**JOUK Pierre-Simon**	**Génétique**
PU-PH	**JUVIN Robert**	**Rhumatologie**
PU-PH	**KAHANE Philippe**	**Physiologie**
PU-PH	**KRACK Paul**	**Neurologie**
PU-PH	**KRAINIK Alexandre**	**Radiologie et imagerie médicale**
PU-PH	**LABARERE José**	**Epidémiologie ; Eco. de la Santé**
PU-PH	**LANTUEJOUL Sylvie**	**Anatomie et cytologie pathologiques**
MCU-PH	**LAPORTE François**	**Biochimie et biologie moléculaire**
MCU-PH	**LARDY Bernard**	**Biochimie et biologie moléculaire**
MCU-PH	**LARRAT Sylvie**	**Bactériologie, virologie**
PU-PH	**LECCIA Marie-Thérèse**	**Dermato-vénéréologie**
PU-PH	**LEROUX Dominique**	**Génétique**
PU-PH	**LEROY Vincent**	**Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie**
PU-PH	**LETOUBLON Christian**	**Chirurgie générale**
PU-PH	**LEVY Patrick**	**Physiologie**
MCU-PH	**LONG Jean-Alexandre**	**Urologie**
PU-PH	**MACHECOURT Jacques**	**Cardiologie**
PU-PH	**MAGNE Jean-Luc**	**Chirurgie vasculaire**
MCU-PH	**MAIGNAN Maxime**	**Thérapeutique, médecine d'urgence**
PU-PH	**MAITRE Anne**	**Médecine et santé au travail**
MCU-PH	**MALLARET Marie-Reine**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
MCU-PH	**MARLU Raphaël**	**Hématologie, transfusion**
MCU-PH	**MAUBON Danièle**	**Parasitologie et mycologie**
PU-PH	**MAURIN Max**	**Bactériologie - virologie**
MCU-PH	**MCLEER Anne**	**Cytologie et histologie**
PU-PH	**MERLOZ Philippe**	**Chirurgie orthopédique et traumatologie**
PU-PH	**MORAND Patrice**	**Bactériologie - virologie**
PU-PH	**MOREAU-GAUDRY Alexandre**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
PU-PH	**MORO Elena**	**Neurologie**
PU-PH	**MORO-SIBILOT Denis**	**Pneumologie**
MCU-PH	**MOUCHET Patrick**	**Physiologie**
PU-PH	**MOUSSEAU Mireille**	**Cancérologie**
PU-PH	**MOUTET François**	**Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brûlogie**
MCU-PH	**PACLET Marie-Hélène**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**PALOMBI Olivier**	**Anatomie**
PU-PH	**PARK Sophie**	**Hémato - transfusion**
PU-PH	**PASSAGGIA Jean-Guy**	**Anatomie**
PU-PH	**PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François**	**Anesthésiologie réanimation**
MCU-PH	**PAYSANT François**	**Médecine légale et droit de la santé**
MCU-PH	**PELLETIER Laurent**	**Biologie cellulaire**

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	**PELLOUX Hervé**	**Parasitologie et mycologie**
PU-PH	**PEPIN Jean-Louis**	**Physiologie**
PU-PH	**PERENNOU Dominique**	**Médecine physique et de réadaptation**
PU-PH	**PERNOD Gilles**	**Médecine vasculaire**
PU-PH	**PIOLAT Christian**	**Chirurgie infantile**
PU-PH	**PISON Christophe**	**Pneumologie**
PU-PH	**PLANTAZ Dominique**	**Pédiatrie**
PU-PH	**POIGNARD Pascal**	**Virologie**
PU-PH	**POLACK Benoît**	**Hématologie**
PU-PH	**POLOSAN Mircea**	**Psychiatrie d'adultes**
PU-PH	**PONS Jean-Claude**	**Gynécologie obstétrique**
PU-PH	**RAMBEAUD Jacques**	**Urologie**
MCU-PH	**RAY Pierre**	**Génétique**
PU-PH	**REYT Émile**	**Oto-rhino-laryngologie**
MCU-PH	**RIALLE Vincent**	**Biostatiques, informatique médicale et technologies de communication**
PU-PH	**RIGHINI Christian**	**Oto-rhino-laryngologie**
PU-PH	**ROMANET J. Paul**	**Ophtalmologie**
MCU-PH	**ROUSTIT Matthieu**	**Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie**
MCU-PH	**ROUX-BUISSON Nathalie**	**Biochimie, toxicologie et pharmacologie**
PU-PH	**SARAGAGLIA Dominique**	**Chirurgie orthopédique et traumatologie**
MCU-PH	**SATRE Véronique**	**Génétique**
PU-PH	**SAUDOU Frédéric**	**Biologie Cellulaire**
PU-PH	**SCHMERBER Sébastien**	**Oto-rhino-laryngologie**
PU-PH	**SCHWEBEL-CANALI Carole**	**Réanimation médicale**
PU-PH	**SCOLAN Virginie**	**Médecine légale et droit de la santé**
MCU-PH	**SEIGNEURIN Arnaud**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
PU-PH	**STAHL Jean-Paul**	**Maladies infectieuses, maladies tropicales**
PU-PH	**STANKE Françoise**	**Pharmacologie fondamentale**
MCU-PH	**STASIA Marie-José**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**TAMISIER Renaud**	**Physiologie**
PU-PH	**TERZI Nicolas**	**Réanimation**
PU-PH	**TONETTI Jérôme**	**Chirurgie orthopédique et traumatologie**
PU-PH	**TOUSSAINT Bertrand**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**VANZETTO Gérald**	**Cardiologie**
PU-PH	**VUILLEZ Jean-Philippe**	**Biophysique et médecine nucléaire**
PU-PH	**WEIL Georges**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
PU-PH	**ZAOUI Philippe**	**Néphrologie**
PU-PH	**ZARSKI Jean-Pierre**	**Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie**

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers

REMERCIEMENTS

A mon jury de thèse,

soyez assurés de toute ma gratitude et de mon profond respect,

A Mme le Professeur Leccia,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury et je vous en remercie.

Merci pour votre disponibilité et votre enseignement au cours de mon internat.

A Mme le Professeur Charles,

Pour avoir accepté de diriger ce travail, pour ton aide et ta disponibilité,

Pour tes encouragements et ta patience dans ce projet de thèse.

Merci pour ton encadrement, tes enseignements et ton sens du partage,

Tout au long de mon internat.

A Mr le Docteur Busser,

Pour avoir accepté de co-diriger ce travail, pour ta disponibilité et ta patience.

Pour ton aide dans la rédaction et la correction de cette thèse.

Pour nos débriefs fréquents, même chez les Pinocchios parfois...

A Mme le Docteur Pinel,

Pour avoir accepté d'être membre du jury.

Pour ton enseignement et ta disponibilité au cours de mes semestres en Anapath.

Pour la confiance que tu m'accorde en dermatopathologie.

A Mr le Professeur Bonneterre,

Pour avoir immédiatement accepté d'être membre du jury.

Vous me faites l'honneur de juger ce travail.

J'espère qu'il contribuera à développer ce projet dans votre discipline.

A mes chefs et collègues,

pour votre collaboration et votre présence,

Aux dermatologues ayant participé à ma formation,

Pr Beani, Dr Templier, Dr Claeys, Dr Brun-Lévèque,

Dr Trabelsi, Dr Pralong, Dr Tardieu, Dr Cozzi,

Pour vos enseignements,

Vos qualités humaines

Et votre disponibilité.

Au Dr Motto-Ros, au Dr Sancey, à Mr Trichard,

Pour m'avoir fait apprécier le monde obscur

De la physique et de la chimie.

Merci pour votre aide régulière

Et votre disponibilité.

A mes co-internes,

Isabelle, Laure, Camille, Julia, Amélie, Damien (1st) , Laura (Tac),

Et tous les autres, avec qui j'ai partagé tant de bons moments,

Que ce soit en stage, en congrès, en séminaires, en DU,

En journée de DES... et lors de bonnes bouffes !

Aux équipes

de Rhumatologie,

d'Anatomopathologie,

et de Dermatologie de Lyon Sud,

Pour ces semestres enrichissants et votre gentillesse.

***Aux équipes para-médicales et administratives**,*

Pour votre bonne humeur au quotidien

Et votre soutien.

A ma famille,

pour votre amour, votre inconditionnel soutien et vos encouragements constants,

A Maman,

Pour m'avoir supporté au quotidien, ça n'a pas dû être facile...

Pour avoir cru en moi quand j'ai abandonné l'IFSI pour Médecine sans prévenir ;-)

Pour ton soutien au quotidien, pour la fierté que je lis dans tes yeux...

A Marcel et toi, pour votre relecture minutieuse…

A Papa,

Pour ton soutien,

Pour avoir cru en moi dès le début.

Et oui, ça y est, ta fille va être toubib ;-)

Tu es probablement l'un des plus fiers de moi...

Aux mamies,

Qui me disent souvent « si un jour on m'avait dit que tu serais Docteur… ».

Aux papis,

Là-haut… je sais que vous êtes fiers de votre petite fille...

A Benoît,

Merci de me supporter au quotidien.

Je ne serais pas arrivée à bout de ce projet sans toi, sans ta patience.

Merci d'avoir supporté les études de médecine et de tout gérer depuis si longtemps...

Merci pour ton aide précieuse, surtout dans la dernière ligne droite...

Merci de n'avoir pas jeté l'ordinateur par la fenêtre et de m'en avoir empêché...

Merci pour l'amour que tu me portes...

Merci d'être là... Jtm...

A Hugo,

Mon petit amour, mon rayon de soleil...

Merci d'avoir éclairé mes journées depuis ta naissance...

Merci d'avoir supporté l'éloignement lors de mon inter-CHU, les WE de travail...

Merci à toi d'avoir interprété ce travail de thèse un peu comme de l'art <3...

Tu y as vu des lézards, des tortues, des poissons, des chenilles, des skis, des ombres, des gâteaux d'anniversaire, des sandwichs, des pistolets, des coquilloux, des avions, des étoiles et des ours, et ça c'est fort !

A mes amis,

Pour votre amitié, votre soutien, votre présence même absents...

A Béné et Cédric,

Amis exceptionnels depuis la P2,

Compagnons de sous-colles, de voyages, de soirées, de champagne :-p !

L'externat n'aurait pas été pareil sans vous... Vous me manquez !

Restés dans le sud et déjà docteurs... la dernière du trio rejoint enfin le clan ;-) !

Quel bonheur de vous retrouver en ayant l'impression qu'on ne s'est jamais quitté...

A Linda, Julie, Clémentine, Valérie, Christelle,

Pour votre inconditionnelle amitié,

Malgré l'éloignement...

A Perrine,

Pour avoir été une assistante hors-pair.

Pour ton enthousiasme, ton enseignement et tes qualités humaines.

Pour nos drôles de consult' avec nos gros ventres et le partage de nos neurones ;-).

Pour ton amitié, ton soutien et tous les bons moments que l'on partage.

Pour tes bons conseils dans la rédaction de ce travail !

A Alexia,

Pour ton amitié et ta sincérité.

Tu es toujours là pour moi et avoir une amie comme toi n'a pas de prix...

J'ai passé un semestre formidable avec toi, et ça a été le début d'une belle amitié !

Merci d être là !

A tous, Merci !

« Rester immobile ne sert à rien.

Il faut choisir entre progresser ou régresser.

Allons donc de l'avant et le sourire aux lèvres »

Baden-Powell

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AE1-AE3	Pancytokératines
AFA	Alcool Formol Acide acétique
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	Protein kinase B
Al	Aluminium
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
ATP2A2	ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca2+ transporting 2
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
C	Carbone
Ca	Calcium
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
c-KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte associated protein 4
Cu	Cuivre
EMA	Antigène de membrane épithéliale
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fe	Fer
Gd	Gadolinium
GNAQ/11	G protein subunit alpha q/11
H	Hydrogène
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
HMB45	Anticorps monoclonal Human Melanoma Black 45
ICCD	Intensified charge-coupled device
ICP	Inductively Coupled Plasma
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
KI67	Antigène de surface des cellules prolifératives
LA-ICP-MS	Spectrométrie à plasma à couplage inductif
LAST	Laser Ablation Spectroscopy for Tumor characterization
LIBS	Laser-Induced Breakdown Spectroscopy
MAGE	Melanoma antigen family

ABREVIATIONS

MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MC1R	Melanocortin 1 receptor
MEK	Mitogen-activated protein kinases
Mg	Magnésium
MIB1	Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1
Micro-XRF	Micro-X-ray fluorescence
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
Mn	Manganèse
N	Azote
Na	Sodium
Nano-SIMS	Nano-ions secondaires en spectrométrie de masse
Nd:YAG	Laser neodymium-doped yttrium aluminium garnet
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homologue
NSE	Non specific enolase
O	Oxygène
P	Phosphore
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
PDL1	Programmed death-ligand 1
PI3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
pRB	Protéine du rétinoblastome
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Si	Silicium
S100	S100 calcium binding protein
Se	Sélénium
SLC39A4	Solute carrier family 39 member 4
SXRF	Microanalyse de rayonnement synchrotron
TIFF	Tagged image file format
TNM	Tumor Node Metastasis
TTF1	Thyroïd Transcription Factor 1
UV	Ultra-violet
ZIP4	Solute carrier family 39 member 4
Zn	Zinc

TABLE DES MATIÈRES

1 INTRODUCTION 15

1.1 Rôle des éléments chimiques 15

1.2 Éléments chimiques et pathologies non tumorales 17

1.2.1 Maladie de Darier 18

1.2.2 Acrodermatite entéropathique 18

1.3 Méthodes d'étude élémentaire des tissus biologiques 19

1.3.1 En routine au laboratoire d'anatomo-pathologie 19

1.3.2 Au sein de laboratoires de recherche 19

1.4 Exemples d'applications de l'analyse élémentaire en Médecine 20

1.4.1 En neurosciences 20

1.4.2 En cancérologie 21

1.4.3 En dermatologie 21

1.5 Technique LIBS : outil de cartographie multi-élémentaire 22

1.6 Intérêt de l'étude des éléments dans les cancers cutanés 26

1.7 Objectif de l'étude 28

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES 29

2.1 Population et période 29

2.2 Méthode de récupération des données cliniques 30

2.3 Sélection du matériel nécessaire à l'étude 31

2.4 Dispositif expérimental et d'acquisition de données LIBS 31

2.5 Méthode d'édition des images LIBS 33

2.6 Méthode d'édition des images histologiques 33

2.7 Méthode de comparaison des images LIBS versus Histologie 33

2.8 Définition des termes utilisés 34

3 RÉSULTATS 35

3.1 Population de l'étude 35

3.2 Description des cartographies 40

3.2.1 Patient 1 : peau saine (Figure 7) 40

3.2.2 Patient 2 : peau saine (Figure 8) 42

3.2.3 Patient 3 : peau saine (Figure 9) 44

3.2.4 Patient 4 : mélanome nodulaire (figure 10) 46

3.2.5 Patient 5 : mélanome nodulaire (figure 11) 48

3.2.6 Patient 6 : métastase de mélanome (Figure 12) 50

3.2.7 Patient 7 : métastase de mélanome (Figure 13) 52

3.2.8 Patient 8 : métastase de mélanome (Figure 14) 54

3.2.9 Patient 9 : tumeur de Merkel (Figure 15) 56

3.2.10 Patient 10 : tumeur de Merkel (figure 16). 58

3.2.11 Patient 11 : carcinome épidermoïde (Figure 17)....60
3.2.12 Patient 12 : carcinome basocellulaire (Figure 18)....62
3.2.13 Patient 13 : carcinome basocellulaire (Figure 19)....64
3.2.14 Patient 14 : nævus naevocellulaire (Figure 20)....66
3.3 Analyses complémentaires....68
3.3.1 Analyse du milieu d'inclusion....68
3.3.2 Test d'échantillons (emballage Para-film versus Aluminium)....68
3.3.3 Détection de l'aluminium....70
3.4 Synthèse....71
3.4.1 Peau normale et annexes....71
3.4.2 Mélanomes....72
3.4.3 Métastases sous-cutanées de mélanome....73
3.4.4 Tumeurs de Merkel....74
3.4.5 Carcinome épidermoïde....74
3.4.6 Carcinomes basocellulaires....74
3.4.7 Nævus....75
3.4.8 Cas particulier de l'aluminium....75
4 DISCUSSION 77
4.1 Limites de l'étude....77
4.1.1 Population....77
4.1.2 Analyse....77
4.1.3 Échantillon....78
4.2 Intérêts de l'étude....79
4.2.1 Généralités....79
4.2.2 Cuivre....81
4.2.3 Magnésium....82
4.2.4 Calcium....83
4.2.5 Perspectives....84
5 CONCLUSION 85
6 BIBLIOGRAPHIE 87
7 ANNEXES 91
7.1 Annexe 1 : Principes de l'analyse anatomo-pathologique....91
7.2 Annexe 2 : Histologie cutanée : généralités....95
7.3 Annexe 3 : Rappels sur le mélanome....97
7.4 Annexe 4 : Rappels sur le carcinome de Merkel....101
7.5 Annexe 5 : Rappels sur le carcinome épidermoïde et le carcinome basocellulaire....103
7.6 Annexe 6 : Principales voies de signalisation intervenant dans le mélanocyte....105
7.7 Annexe 7 : Population sélectionnée en vue du projet LAST....107

1 INTRODUCTION

Les éléments chimiques sont constitutionnels de l'être vivant et jouent un rôle essentiel dans les systèmes biologiques. Ils sont nécessaires au développement et à la survie.

L'organisation de la matière vivante repose sur les atomes (1). Les principaux atomes constitutifs du vivant sont le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. D'autres éléments sont présents dans le corps humain de façon ubiquitaire en moindre quantité, et ont une grande importance biologique (sodium, potassium, calcium, magnésium, fer, cuivre, zinc, ...).

La structure de la cellule est le témoin de cette organisation (2). Sa membrane est composée de lipides, de protéines et de glucides, tous composés de l'association de carbone, d'hydrogène, d'oxygène et d'azote. Le cytosol contient de l'eau, des ions (sodium, potassium, chlore, magnésium, calcium, zinc...), des molécules (dioxygène, dioxyde de carbone, glucides, lipides, acides aminés, nucléotides...) et des macromolécules (protéines, polysaccharides, acides nucléiques...).

1.1 RÔLE DES ÉLÉMENTS CHIMIQUES

Les fonctions métaboliques des éléments chimiques (3–7) dans les cellules humaines sont si nombreuses qu'elles ne sont pas traitées ici de manière exhaustive, mais un rappel de quelques unes de leurs implications semble nécessaire. Le rôle majeur que jouent les éléments dans le fonctionnement du corps humain explique l'intérêt que leur porte la communauté scientifique (8–10).

Plusieurs articles, livres (5–7) et revues de la littérature (11) rappellent l'importance des éléments chimiques :

- Le calcium est le plus abondant des cations. Il est principalement situé dans l'os sous forme de sels mais est ubiquitaire. Il active certaines enzymes et est impliqué dans la modulation de l'expression des gènes et des fonctions cellulaires. Il intervient également dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épiderme (12). Certaines protéines de liaison au calcium comme les protéines S100 et les

Cadhérines sont importantes dans l'homéostasie de la peau. Enfin, le calcium intervient dans l'apoptose.

- Le phosphore participe aux processus énergétiques aérobies. Il est impliqué dans le stockage et le transfert d'énergie. Il est au centre du groupe phosphate permettant la phosphorylation de protéines (mécanisme de régulation important et fréquent impliqué dans la glycolyse et la chaîne respiratoire). Il entre dans la composition des acides nucléiques, des protéines, des phospholipides et de l'ATP notamment.
- Le sodium, principalement extracellulaire, fonctionne le plus souvent en binôme avec le potassium, principalement intracellulaire. Ils sont essentiels à l'équilibre du potentiel membranaire et au contrôle de la pression osmotique.
- Le magnésium (11,13,14) est principalement intracellulaire. Il intervient dans de nombreux processus (métabolisme énergétique, réplication cellulaire) et est le cofacteur de plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Il sert de cofacteur dans les réactions auxquelles l'ATP participe (7). Il sert aussi de cofacteur d'enzymes (glucokinase, hexokinase, phosphofructokinase...) lors de la glycolyse, une voie préférentiellement utilisée par les cellules cancéreuses pour produire de l'énergie.
- Le silicium joue un rôle structural en reliant les fibres de collagène aux glycosaminoglycanes des tissus conjonctifs. Son rôle est peu connu et très peu abordé dans la littérature.
- Le cuivre sert de cofacteur à de nombreuses enzymes. Son association à la Tyrosinase est essentielle à la production de mélanine. Le cuivre est par ailleurs impliqué dans les processus tumoraux, comme en témoignent certains articles (15). Il est également impliqué dans le processus d'oxydoréduction du fer. Un article (16) rappelle son importance au niveau cérébral, le cuivre jouant un rôle dans la régulation de la transmission synaptique, le fonctionnement des canaux ioniques et la protection contre le stress oxydatif.
- Le zinc (11) représente le cofacteur principal de nombreuses enzymes et intervient dans un grand nombre de réactions biochimiques. Il joue un rôle structural dans diverses protéines (doigt de zinc, gène suppresseur de tumeur, facteur de transcription). Étant indispensable à certains facteurs de croissance et de différenciation, il a un impact sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Il sert de cofacteur à des

métalloprotéines impliquées dans le signal de transduction, la synthèse d'ADN et d'ARN.

- Le fer joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions biologiques. Il intervient dans la constitution de l'hème de l'hémoglobine. Il circule lié à la transferrine dans le sang en étant stocké sous forme d'hémosidérine et de ferritine. Il est un composant du cytochrome P450 intervenant dans les réactions d'oxydoréduction. Une étude (17) a montré que les taux de fer étaient significativement plus élevés dans l'épiderme des peaux exposées au soleil que dans les peaux non-exposées.
- Le cuivre, le zinc et le fer sont des cofacteurs impliqués dans le métabolisme cellulaire notamment dans la chaîne respiratoire et dans la protection contre les espèces réactives de l'oxygène. En effet, il existe des systèmes enzymatiques anti-radicalaires (superoxydes dismutases, catalases…) qui utilisent les oligo-éléments antioxydants pour leur fonctionnement. Les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans les phénomènes de cytotoxicité et de mutagenèse rencontrés, entre autres, dans la peau.

1.2 ÉLÉMENTS CHIMIQUES ET PATHOLOGIES NON TUMORALES

Certaines pathologies non tumorales soulignent l'importance physiologique des éléments chimiques dans les cellules humaines. Différents organes sont affectés par des troubles du métabolisme liés aux éléments : le cuivre est impliqué dans la maladie de Wilson et dans la maladie de Menkes, et le fer dans l'hémochromatose.

En dermatologie, les pathologies suivantes sont concernées par des anomalies de transports des éléments chimiques.

1.2.1 Maladie de Darier

Il s'agit d'une dermatose acantholytique (18) autosomique dominante due à la mutation du gène ATP2A2 codant pour une pompe à calcium kératinocytaire. Elle se manifeste par des lésions papulokératosiques prédominantes dans les zones séborrhéiques. Il s'y associe une atteinte acrale avec des lésions unguéales caractéristiques.

Fig.1 : maladie de Darier (19) : atteinte profuse du tronc (à gauche) ; bandes longitudinales rouges et blanches parcourant la tablette et kératoses sous-unguéales distales (à droite).

1.2.2 Acrodermatite entéropathique

Il s'agit d'une dermatose autosomique récessive liée à une anomalie de l'absorption du zinc (20) au niveau de la muqueuse intestinale, par mutation du gène SLC39A4 codant pour ZIP4, un transporteur du zinc. Elle se manifeste par des lésions péri-orificielles et acrales, une diarrhée chronique et des troubles psychiques (Figure 2).

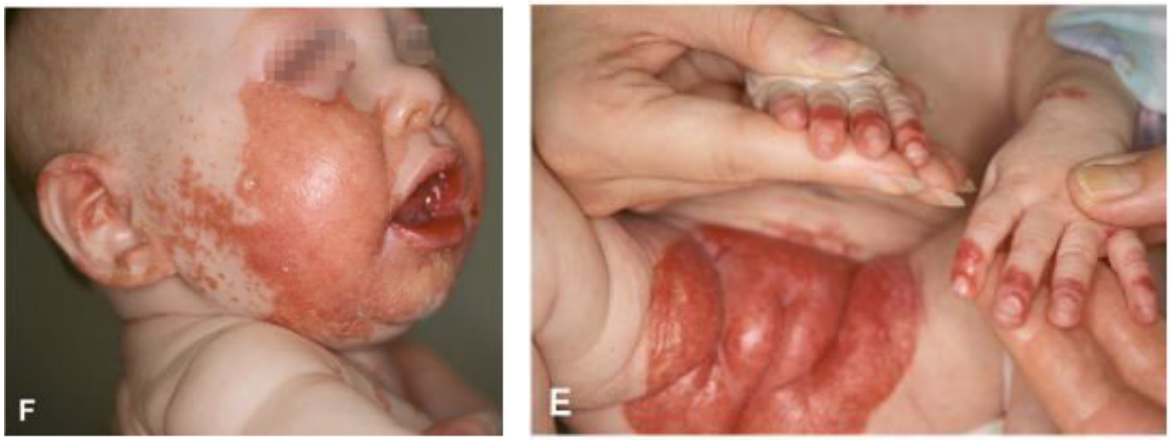


Fig.2 : acrodermatite entéropathique : lésions érythémateuses érosives symétriques des zones péri-orificielles et acrales (20).

1.3 MÉTHODES D'ÉTUDE ÉLÉMENTAIRE DES TISSUS BIOLOGIQUES

1.3.1 En routine au laboratoire d'anatomo-pathologie

En pratique, au laboratoire d'anatomopathologie, l'étude de la présence des éléments dans les tissus nécessite l'utilisation de colorations spéciales (21,22). Elles permettent la détection d'un seul élément à la fois. Ces techniques sont encore utilisées en routine diagnostique. Les principales colorations spéciales sont :

- La coloration de Perls : utilisée pour mettre en évidence l'hémosidérine, colorée en bleu (mise en évidence du fer).
- La coloration de Von Kossa : colore le phosphate de calcium en noir.
- La rhodamine : permet la coloration du cuivre.

La coloration de Morin, qui met en évidence la présence d'aluminium, n'est plus pratiquée actuellement.

Ces colorations sont donc utilisées dans un but diagnostique mais ne sont pas utilisées en recherche. Elles révèlent la présence d'éléments métalliques mais ne permettent pas leur détection dans leur forme chimique élémentaire. Elles ne mettent pas en évidence les atomes par leurs caractéristiques propres (spectre d'émission). Ceci limite l'intérêt d'utilisation de ces techniques en laboratoire de recherche.

1.3.2 Au sein de laboratoires de recherche

En recherche, différentes technologies existent pour détecter les atomes.

Diverses techniques permettent de déterminer la composition élémentaire des échantillons. Par exemple la spectrométrie de fluorescence X (microanalyse de rayonnement synchrotron) (SXRF) (23–25), les nano-ions secondaires en spectrométrie de masse (nano-SIMS) (26) ou la spectrométrie à plasma à couplage inductif (LA-ICP-MS) (27–32). Bien que ces approches offrent de hautes performances, la complexité de l'équipement rend l'application difficile aussi bien dans les laboratoires de recherche qu'en routine. Également, il faut noter la destruction des échantillons et la non superposition possible à l'histologie dans la plupart de ces techniques.

Ceci constitue un obstacle majeur au développement de nouvelles recherches concernant les molécules chimiques jouant un rôle central dans le métabolisme cellulaire.

Cette thèse a pour vocation d'évaluer le potentiel d'une nouvelle technique d'imagerie élémentaire associant la technique de Spectrométrie sur Plasma Induit par Laser ou LIBS (« Laser-Induced Breakdown Spectroscopy ») à un système de microscopie optique. La technique LIBS a été développée dans les années 1960. Elle sera détaillée dans la partie méthode, mais un court descriptif est nécessaire avant d'en rappeler les applications. Un faisceau laser crée un plasma à partir d'une petite quantité de matière vaporisée (nanogrammes). Ce plasma émet des rayonnements collectés par un système optique et transmis au spectromètre par fibre optique. Le spectromètre analyse le spectre de cette lumière. Les espèces présentes dans le plasma (ions, atomes, molécules) émettent des raies caractéristiques. L'analyse du spectre collecté conduit à la détermination des concentrations élémentaires de l'échantillon. La quasi-totalité des éléments chimiques, répertoriés dans la classification périodique des éléments ou « table de Mendeleïev », peut-être détectée par cette méthode.

1.4 EXEMPLES D'APPLICATIONS DE L'ANALYSE ÉLÉMENTAIRE EN MÉDECINE

Les données bibliographiques disponibles correspondent à des cas isolés ou de petites séries, souvent sur modèles animaux, constituant une limite à l'interprétation et à la généralisation des données.

1.4.1 En neurosciences

L'analyse de la distribution des éléments (Cu, Mn, Zn, Fe, Mg, Se) a été testée dans le domaine des neurosciences notamment par la technique de LA-ICP-MS. Des corrélations entre des concentrations cérébrales anormales de fer et de cuivre ont pu être faites dans des contextes de pathologies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson, Alzheimer, Menkes ou Wilson. Il a été montré que la concentration de fer est nettement plus élevée dans le cerveau d'une souris parkinsonienne, et que le cuivre est présent en plus grande concentration dans les neurones métaboliquement actifs (27).

1.4.2 En cancérologie

Il a été montré en imageant du tissu cérébral tumoral chez la souris par la technique LA-ICP-MS, que les zones tumorales étaient plus riches en cuivre, zinc et phosphore (28). On peut donc penser que ces éléments ont un rôle dans la cancérogenèse.

La technique LIBS a été utilisée pour analyser la présence de calcium et magnésium, en répétant des mesures sur de petites zones de tissus, malignes (cancers du sein et cancers colo-rectaux) ou non malignes (29). Dans cette étude, des différences d'intensités entre les tissus pathologiques et les tissus sains ont été montrées. Le calcium et le magnésium étaient plus intenses en terme de raies d'émission dans les tissus tumoraux, mais ni leur concentration dans les tissus ni leur localisation n'ont pu être déterminées.

Une étude comparant le LIBS et la spectrométrie sur plasma à couplage inductif (30) caractérisant du tissu tumoral (hémangiosarcome) chez le chien a permis d'observer des différences d'intensité des éléments en comparaison avec du tissu sain. Le calcium était plus intense en LIBS avec une concentration augmentée en spectrométrie sur plasma à couplage inductif dans le tissu tumoral, à l'inverse du cuivre qui était diminué.

Ces études montrent l'intérêt de l'étude élémentaire avec cependant comme principale limite l'absence de cartographie de l'échantillon.

1.4.3 En dermatologie

Les concentrations cutanées de fer, cuivre et zinc ont été explorées par la technique non invasive de spectrométrie de rayons X (31). Les taux de ces trois éléments étaient plus élevés en zones photo-exposées qu'en zones couvertes. Dans 3 mélanomes analysés, les taux de fer étaient plus élevés que dans les zones contrôles controlatérales.

Les concentrations de cuivre et de zinc ont été explorées dans le sérum de patients ayant des pathologies dermatologiques (32). Il a ainsi été observé sur un nombre réduit de patients que le cuivre était augmenté de façon significative chez des patients atteints de cancers cutanés (carcinomes épidermoïdes et mélanomes, tous stades et tous types confondus). Par contre les dosages sériques de zinc n'étaient pas différents des sujets contrôles.

Sun *et al.* (33) ont étudié en 2000 la faisabilité de l'utilisation de la technique LIBS comme une méthode rapide et simple pour analyser les concentrations d'éléments chimiques dans la couche cornée de la peau humaine. Ils ont pour cela déposé des solutions de zinc de concentration différente sur la peau de volontaires sains et ont analysé la couche cornée après l'avoir décollée grâce à une méthode de type scotch-test. Ils ont ainsi pu déterminer la concentration de zinc en fonction de sa profondeur dans la couche cornée, témoignant de son absorption. L'analyse a été effectuée par un spot laser analysant une surface de 100x125 micromètres puis la cible était déplacée horizontalement entre 2 tirs. L'analyse en profondeur s'est faite par scotch test successifs avec obtention de couches de 2 à 3 micromètres d'épaisseur. La concentration par couche était obtenue en calculant la moyenne de 100 tirs laser.

En 2015, la technique LIBS a été utilisée pour différencier des mélanomes et le derme normal adjacent chez la souris, après prélèvement et conditionnement séparé de ces 2 zones (34). Il a ainsi été mis en évidence que les concentrations de magnésium et de calcium étaient plus élevées dans les mélanomes que dans le derme sain correspondant. L'hypothèse étiologique à ces constatations était la prolifération rapide des mélanocytes, contenant comme toute cellule des organites stockeurs de calcium (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi notamment). Concernant le magnésium, son rôle dans la biosynthèse des protéines et dans la prolifération cellulaire, ainsi que son rôle de cofacteur d'enzymes était souligné.

Ces différentes études apportent de nouvelles informations sur la présence des éléments chimiques en pathologie cutanée, mais ne permettent pas de les localiser précisément. Ceci est une limite dans la compréhension des processus physiopathologiques sous-jacents.

1.5 TECHNIQUE LIBS : OUTIL DE CARTOGRAPHIE MULTI-ÉLÉMENTAIRE

La technique d'imagerie élémentaire de spectrométrie sur plasma induit par laser est utilisée dans de nombreux domaines (35) comme l'archéologie, l'étude de la contamination de l'eau (36), l'exploration d'échantillons microbiologiques notamment bactériens (37) et l'exploration spatiale (38). Cette technique est actuellement utilisée par le robot Curiosity sur la planète Mars afin d'analyser la composition élémentaire des roches.

Dans le domaine médical, cette technique est peu développée mais il existe un intérêt croissant pour l'étude de la distribution des éléments dans les tissus biologiques.

Depuis 2012, il a été montré qu'une cartographie élémentaire quantitative des tissus biologiques était possible, en associant la microscopie optique et la spectrométrie sur plasma induit par laser (39–41).

Il s'agit d'une nouvelle méthode d'imagerie élémentaire permettant la détection simultanée des différents éléments contenus dans un tissu biologique. Cette méthode repose sur l'approche de spectroscopie sur plasma induit par laser décrite précédemment. Contrairement aux méthodes classiques d'analyse élémentaire telles que la spectrométrie de fluorescence synchrotron (micro-XRF) ou le LA-ICP-MS, cette méthode est rapide et simple à mettre en œuvre. Elle fonctionne de plus à température ambiante et à pression atmosphériques en étant compatible avec la microscopie optique « classique ». Le principe de l'instrumentation repose d'ailleurs sur un montage de type microscope. Elle permet d'imager des échantillons de tailles très différentes (<mm² à plusieurs dizaines de cm²) et offre ainsi une grande diversité d'études de l'échelle cellulaire à l'organe de petit animal. Ces différents avantages, couplés aux résolutions (~10 µm) et aux sensibilités (~ppm) accessibles actuellement en font une méthodologie unique au potentiel très fort pour les applications biomédicales.

En 2014, l'imagerie multi-élémentaire a été réussie sur tissu biologique. Ainsi, la bio-distribution des éléments chimiques dans un rein de souris (Figure 3) a pu être étudiée (42).

Sancey *et al.* (42) ont également appliqué la méthode LIBS avec une résolution de 10µm pour analyser la clairance rénale de nanoparticules dans les reins de souris (image 2). Ainsi, la distribution de gadolinium (couplé à des nanoparticules) a pu être étudiée en fonction du temps. La composition quantitative en Na et Gd a pu être cartographiée selon un rendu d'images avec une résolution de 40µm (Figure 4a). La stratégie de quantification a été validée par des analyses combinées en ICP (Figure 4b).

Avec cette même équipe, Busser *et al.* ont pu mettre en évidence dans un échantillon en paraffine au sein d'un granulome à corps étranger une haute concentration en aluminium, accumulé après une vaccination comportant de l'aluminium comme adjuvant, avec une corrélation anatomopathologie-LIBS (Figure 5).

Une haute résolution spatiale (10 micromètres) a pu être mise en œuvre, en air ambiant, permettant de rendre une cartographie à une échelle proche de l'histologie (42) puisqu'une cellule humaine mesure une dizaine de microns. Il faut noter que la résolution est meilleure après inclusion en époxy qu'en paraffine en raison de la taille plus étroite du cratère créé par le faisceau laser.

Comme vu précédemment, analyser la composition chimique des tissus biologiques nécessitait jusqu'alors un équipement de haute complexité, ce qui limitait le champ des recherches, mais le développement de cette technique innovante a permis d'obtenir des résultats probants.

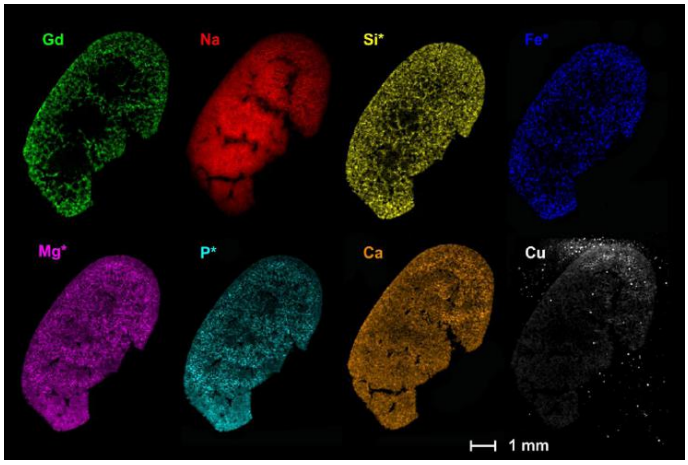


Fig.3 : résultats obtenus en LIBS : cartographie multi-élémentaire d'un rein de souris 4h après l'injection intraveineuse de nanoparticules à base de gadolinium (Gd), Supplementary data (42).

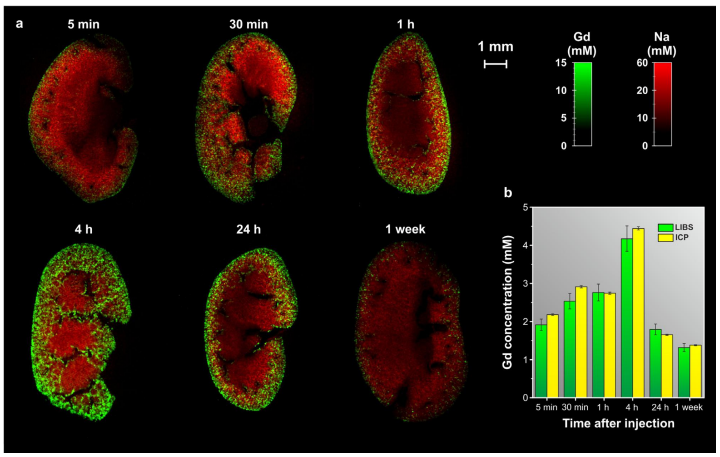


Fig.4 : étude de la clairance rénale de nano-particules au sein de reins de souris : composition quantitative en Na et Gd après analyse en LIBS en fonction du temps (42).

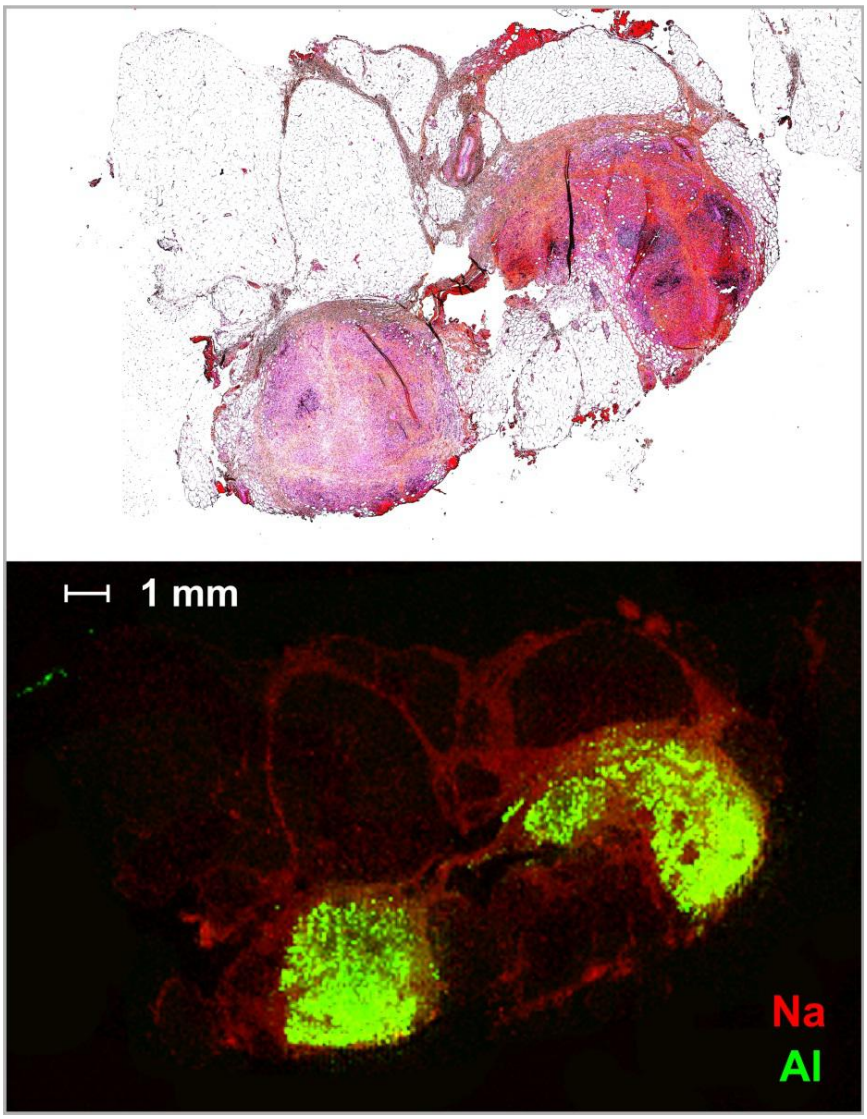


Fig.5 : granulome à corps étranger sous-cutané (inclus en paraffine) après coloration HES (en haut) et après analyse en LIBS (en bas). Les distributions du sodium (élément représentatif du tissu) et de l'aluminium (principal élément du corps étranger) sont visibles à une résolution de 40 µm dans cet exemple. (En cours de publication, Busser *et al.)*

1.6 INTÉRÊT DE L'ÉTUDE DES ÉLÉMENTS DANS LES CANCERS CUTANÉS

A ce jour, la composition élémentaire précise des cancers cutanés n'est pas connue.

La fréquence et la morbi-mortalité des tumeurs en cancérologie cutanée nous incitent à vouloir une meilleure caractérisation de ces cancers. Il s'agit en effet d'un problème de santé publique.

L'incidence du mélanome est en perpétuelle augmentation (43). Plus de 132000 nouveaux cas de mélanomes sont diagnostiqués chaque année dans le monde. Environ 48000 personnes meurent chaque année d'un mélanome à un stade avancé (44,45). Plus de 1500 décès ont été attribués au mélanome en 2012 en France (46). Nous sommes dans l'attente d'une réévaluation des courbes de survie compte-tenu des avancées thérapeutiques récentes. Le pronostic de ce cancer est sombre au stade métastatique, avec une survie à 5 ans estimée à 15.2% en cas de métastases à distance, aux États-Unis en 2012 (47,48) et il existe encore un manque de connaissance sur les processus initiateurs de la cancérogenèse et de la dissémination métastatique.

Les tumeurs cutanées épithéliales, carcinome basocellulaire et carcinome épidermoïde, sont les cancers les plus fréquents à l'âge adulte (49). La prévalence et l'incidence de ces carcinomes augmentent du fait du vieillissement de la population et des habitudes d'exposition solaire. L'incidence des carcinomes basocellulaires est estimée à plus de 150 cas pour 100 000 habitants par an en France (50). Cette tumeur a un potentiel évolutif local et loco-régional, ce qui rend difficile sa prise en charge lorsqu'elle est tardive. Le carcinome épidermoïde est également fréquent et son incidence annuelle en France est estimée à 30/100 000 dans la population générale (50). Cette tumeur a un potentiel métastatique non négligeable.

Le carcinome de Merkel est un carcinome neuroendocrine rare probablement développé à partir des cellules de Merkel, qui jouent le rôle de récepteurs tactiles intra-épidermiques. C'est un cancer à croissance rapide et à fort potentiel métastatique, associé à un pronostic sombre à court terme (51). Aux États-Unis, le risque de récidive locale est estimé entre 25 et 33%. Le risque métastatique à distance est évalué à 33%. Il n'existe pas de chiffre d'incidence dans la population française.

Les méthodes d'analyse de ces tumeurs cutanées malignes reposent sur l'histologie, l'immunohistochimie et la biologie moléculaire essentiellement. Il n'existe pas de méthodes standardisées et automatisées permettant une classification des tumeurs cutanées malignes selon leur type et leur stade, qui pourraient être une aide pour le pathologiste.

Des précisions sont apportées en Annexe 1 concernant les étapes effectuées au laboratoire d'anatomopathologie entre la réception du prélèvement et son observation au microscope. L'histologie de la peau normale est détaillée en Annexe 2. Des précisions sont également apportées en annexe concernant le diagnostic histologique du mélanome (Annexe 3), du carcinome de Merkel (Annexe 4), du carcinome épidermoïde et du carcinome basocellulaire (Annexe 5).

Les thérapeutiques des différents cancers, basées sur les voies de signalisation, sont au cœur de la recherche avec des progrès remarquables notamment dans les domaines du mélanome et du carcinome basocellulaire sur les dernières années : inhibiteurs de BRAF (52), inhibiteurs de MEK (53), anti-PD1 (54) et anti-CTLA4 (55,56) dans le traitement du mélanome, inhibiteurs de la voie Hedgehog pour le carcinome basocellulaire (57,58).

Les progrès en termes de traitement du mélanome reposent principalement sur une meilleure compréhension des processus physiopathologiques à l'origine de la tumorigenèse. Ces processus correspondent à des mutations somatiques, pouvant intéresser diverses voies (Annexe 6) :

- Mutations de la voie des MAPK uniques et exclusives : B-RAF (40-60%), N-RAS (20%)
- Anomalies sur les voies associées : amplification d'AKT, perte de PTEN, mutations de CDKN2A (p16).
- Mutations des gènes codants pour les protéines GNAQ et GNA11 (80% de cas de mutation de l'une ou l'autre dans les mélanomes de l'uvée).
- Mutations activatrices ou amplification de c-KIT (mélanome acro-lentigineux et des muqueuses (20%) et mélanomes en peau avec dommages actiniques sévères).

Ces anomalies constituent des cibles thérapeutiques avec de nouvelles molécules validées et utilisées en clinique ou en développement.

1.7 OBJECTIF DE L'ÉTUDE

De nos jours, de nombreuses inconnues persistent quant aux différents profils tumoraux, notamment dans le domaine de la cancérologie cutanée. La récidive locale des tumeurs malgré leur exérèse complète et élargie, l'atteinte ganglionnaire secondaire malgré un ganglion sentinelle négatif, les profils d'agressivité variables pour un même profil mutationnel, sont des phénomènes mal expliqués.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet global, le projet « Laser Ablation Spectroscopy for Tumor characterization » (LAST), développé dans le cadre du plan cancer 2014-2019 par une équipe de recherche INSERM et coordonnée par Dr Lucie Sancey (59). Le projet LAST a pour objectif d'identifier des éléments d'intérêt et/ou une empreinte multi-élémentaire spécifique pour un type de cancer cutané et/ou son stade (signature biochimique) sur une large série de patients.

Tout comme l'expression des gènes ou des protéines, les éléments chimiques sont susceptibles de varier tant en localisation qu'en quantité en fonction de la topographie et du stade de développement d'une tumeur. L'analyse de la distribution des éléments chimiques dans les échantillons biologiques, notamment leur potentielle hétérogénéité, pourrait permettre d'acquérir une meilleure compréhension des processus physiologiques et pathologiques.

La découverte d'une signature biochimique d'un type de cancer ou du stade d'un cancer pourrait apporter des informations sur le mécanisme qui amène à la cancérogenèse mais également suggérer un processus précédant la division cellulaire et apporter des informations supplémentaires, par exemple sur les marges d'exérèse nécessaires afin d'éviter la récidive tumorale. De plus, la mise en évidence d'une empreinte élémentaire spécifique pourrait-être intéressante afin d'aider le pathologiste pour une confirmation diagnostique voire pour proposer un élément pronostique en fonction du stade.

L'objectif de cette étude était d'identifier la composition chimique des structures normales de la peau puis celle de différentes tumeurs cutanées grâce à la technique LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy) et de la comparer à l'histologie standard.

2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 POPULATION ET PÉRIODE

Cette étude monocentrique rétrospective a été réalisée au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble.

Les tumeurs d'intérêt ont été sélectionnées rétrospectivement sur des dossiers de patients dont la tumeur d'intérêt a été diagnostiquée avant 2016, soit à partir des fiches de consentement, soit à partir des codes spécifiques de cotation des diagnostics au sein du logiciel de gestion utilisé dans le service d'anatomopathologie.

Le recrutement portait sur des patients dont le consentement éclairé, validé par le comité de protection des personnes, avait été obtenu.

Les critères de sélection étaient les suivants :

- Consentement éclairé signé, obtenu lors d'une hospitalisation de jour de dermatologie, d'une consultation de dermatologie, ou d'un acte de chirurgie réalisé en dermatologie, en chirurgie maxillo-faciale ou en chirurgie plastique.
- Patient ayant été pris en charge en dermatologie, chirurgie plastique ou chirurgie maxillo-faciale au CHU de Grenoble, dont le dossier médical est disponible directement ou après désarchivage.
- Prise en charge chirurgicale correspondant à une exérèse.
- Tumeur cutanée de diagnostic certain, typique sur le plan histologique, dont le compte rendu histologique est finalisé.
- Matériel suffisant disponible, ne compromettant pas les études qui pourraient être nécessaires à la prise en charge diagnostique ou thérapeutique ultérieure.

Les critères d'exclusion étaient :

- Absence de consentement
- Exérèse incomplète ou biopsie cutanée.

La cohorte constituée avait pour but de mettre à disposition de notre étude et du projet LAST une base de données clinique et histologique exhaustive.

2.2 MÉTHODE DE RÉCUPÉRATION DES DONNÉES CLINIQUES

Toutes les données ont été recueillies à partir des dossiers médicaux en support papier et informatique des patients et à partir des différents comptes rendus histologiques.

Les données récupérées pour chaque patient étaient à la fois cliniques et histologiques :

- Date de naissance / Date de décès (si concerné)
- Dernières nouvelles (vivant ou décédé)
- Date de signature du consentement
- Sexe
- Profession
- Région de résidence
- Phototype
- Exposition solaire naturelle / aux UV artificiels à but esthétique / à but thérapeutique
- Tabac / Alcool
- Date de diagnostic du primitif (si concerné)
- Age au moment du prélèvement
- Topographie de la biopsie
- Diagnostic histologique (type histologique, Breslow, Clark, engainements périneuraux, emboles vasculaires, etc…)
- Ganglion sentinelle
- Stade TNM au moment du prélèvement
- Statut mutationnel du mélanome BRAF / NRAS / CKIT
- Statut mutationnel génétique (CDKN2A, CDK4, variant MC1R, autre…)
- Traitements reçus dans le cadre de la tumeur
- Immunodépression / Comorbidités / Syndrome parkinsonnien associé
- Antécédent personnel de cancer cutané antérieur au diagnostic actuel
- Antécédent familial de mélanome
- Antécédent personnel ou familial d'autre cancer (Sein-Rein-Thyroïde)

2.3 SÉLECTION DU MATÉRIEL NÉCESSAIRE À L'ÉTUDE

La sélection des lames histologiques a été faite au sein du service d'Anatomopathologie et les blocs ont été recoupés afin d'obtenir une lame HES correspondante.

Du tissu sain a été recensé sur des échantillons d'exérèse élargie de tumeurs pour lesquelles le diagnostic de tissu sain a été posé histologiquement et également sur du revêtement cutané issu de réduction mammaire à but esthétique.

Les blocs ont rapidement été emballés pour éviter toute contamination externe. Du para-film, un film plastique utilisé en laboratoire, a été utilisé pour permettre un transport hermétique des blocs.

Un échantillon provenant d'un même patient en peau saine a été emballé dans du papier aluminium afin de tester différents milieux potentiellement non contaminant.

L'encre utilisée quotidiennement par les pathologistes a également été recueillie, ainsi que le matériel utilisé en chirurgie.

Chaque bloc de paraffine a été sélectionné après analyse des lames afin d'obtenir un échantillon représentatif de la lésion à observer.

2.4 DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL ET D'ACQUISITION DE DONNÉES LIBS

La configuration instrumentale repose sur un microscope optique qui combine une ligne laser d'injection (LIBS), un dispositif optique d'imagerie standard, et une plate-forme motorisée sur 3 axes pour le positionnement de l'échantillon (Figure 6). La technique LIBS utilise un laser nanoseconde impulsionnel Nd:YAG de longueur d'onde 1064 nm, verticalement focalisé sur l'échantillon par un objectif de grossissement x15 ayant une ouverture numérique de 0,32. La durée d'impulsion est de 5 ns et la fréquence de répétition de 10 Hertz. Les mesures ont été effectuées à température ambiante avec un flux de gaz Argon soufflant vers le plasma (débit 1,5/min). Pendant le balayage de l'échantillon, un système d'autofocus reposant sur l'utilisation de pointeur laser a été utilisé pour compenser les éventuelles anomalies de planéité et contrôler avec précision la distance de focalisation (la distance objectif-échantillon). Un obturateur de faisceau est utilisé pour contrôler l'arrivée des impulsions laser sur l'échantillon de sorte qu'un seul plasma soit créé à chaque posi-

tion. La lumière émise par le plasma a été recueillie par des systèmes de collection munie d'une lentille de quartz et permettant de collecter et concentrer la lumière sur l'entrée d'une fibre optique reliée à un spectromètre. Deux spectromètres de type Czerny-Turner ont été utilisés simultanément pour chaque analyse. Ces deux spectromètres étaient équipés de caméra ICCD synchronisée avec les impulsions laser. L'acquisition des spectres a été réalisée avec un retard de 300 ns et une fenêtre de 3 µs. Le premier spectromètre (Shamrock 303, Andor) couvrait la gamme entre 195 et 240 nm (raies d'émission du Zn, P), le deuxième la gamme comprise entre 280 et 350 nm (Mg, Si, Al, Fe, Cu, Ca, Na). La résolution spectrale des 2 spectromètres était de l'ordre de 0,15 nm. L'énergie du laser est stabilisée pendant toute l'expérience en utilisant une boucle d'asservissement ce qui permet d'améliorer la stabilité de l'énergie pour réaliser des expériences sur de longues périodes. Un logiciel contrôlant l'ensemble du système a été utilisé, autorisant l'exécution de séquences automatisées pour balayer la région d'intérêt de l'échantillon de tissu avec une résolution latérale spécifique. Enfin, un logiciel permettait de restituer une image LIBS comparable et quasi-superposable à l'histologie afin d'en permettre l'analyse et la comparaison.

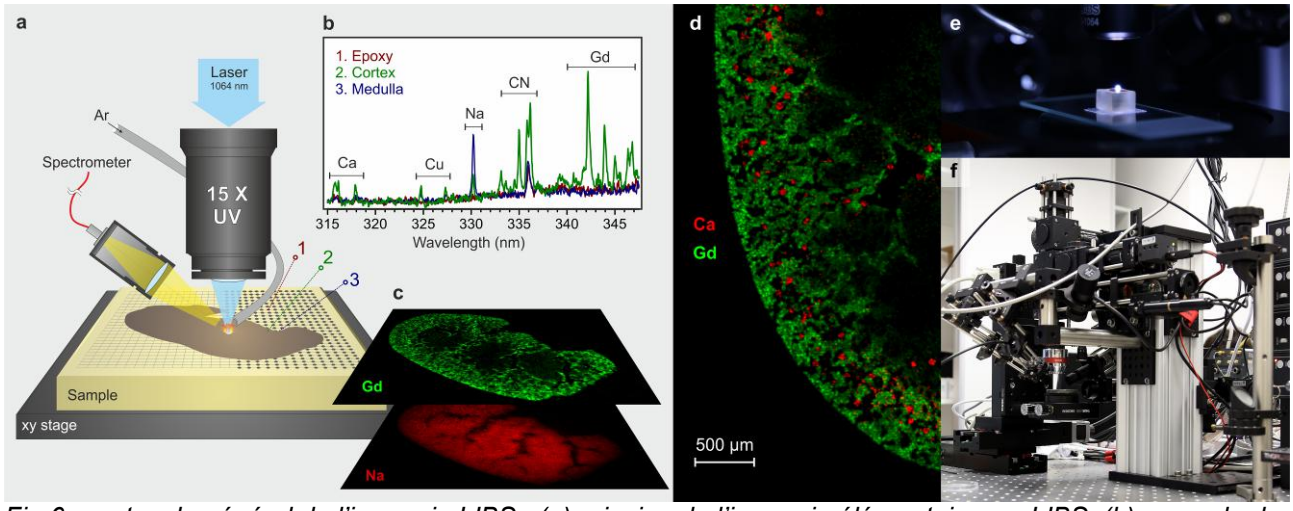


Fig.6 : protocole général de l'imagerie LIBS : (a) principe de l'imagerie élémentaire par LIBS, (b) exemple de spectres mono-tirs dans 3 régions différentes du rein avec les émissions spécifiques du Gd, Na, Cu, et Ca, (c) exemple d'images d'abondance relative obtenues pour le Gd et le Na, (d) exemple d'images élémentaires haute définition d'une portion de rein de souris (résolution 10 µm), (e) photo d'un plasma induit par laser durant l'expérience, (f) photo du système instrumental Bio-LIBS.

Le choix des éléments chimiques d'intérêt s'est fait au regard des données bibliographiques énumérées précédemment (Cu, Ca, Zn, Fe, Mg, Na, P) et en fonction de leur détectabilité en procédure LIBS sur la gamme spectrale du spectromètre choisi.

2.5 MÉTHODE D'ÉDITION DES IMAGES LIBS

Les blocs inclus en paraffine ciblés pour notre étude ont été analysés en LIBS, en les plaçant au centre du dispositif précédemment décrit, en air ambiant. Ensuite, à partir des fichiers textes issus de l'analyse par le spectromètre, les images de cartographie de chaque élément chimique en LIBS ont été éditées.

Le logiciel FIJI (IMAGE J) a été utilisé et la procédure a été la suivante pour chaque élément chimique de chaque bloc analysé : importation du fichier texte, rotation adaptée de l'image dans un but de comparaison à l'histologie, application de la couleur choisie (Rainbow). Le contraste a été ajusté, en veillant à ne pas trop saturer l'image et à garder une homogénéité pour tous les éléments chimiques. Puis, l'image a été modifiée en 8-bit. Ensuite chaque fichier a été enregistré en format TIFF.

2.6 MÉTHODE D'ÉDITION DES IMAGES HISTOLOGIQUES

Les lames obtenues ont été numérisées de façon anonyme par la société Histalim pour permettre ensuite une exploitation optimale des images lors de l'analyse, avec utilisation du logiciel NDP.view2. Ensuite, chaque image a été téléchargée à partir de la plateforme Histalim.

Pour être exploitable, chaque image histologique a dû être enregistrée à partir du logiciel NDP.view2. Cet enregistrement a été fait en format original, en TIFF. Un second enregistrement, également en format TIFF, a été réalisé avec marquage des zones d'intérêt afin de faciliter la comparaison ultérieure (zone tumorale, zone inflammatoire, zone pigmentée, zone hémorragique…).

2.7 MÉTHODE DE COMPARAISON DES IMAGES LIBS VERSUS HISTOLOGIE

Une superposition de l'image LIBS sur l'image histologique annotée a été faite grâce à un logiciel d'édition de présentation. La rotation et la modification d'échelle ont permis de superposer les images. La modification de transparence a permis de comparer la présence plus ou moins intense de l'élément chimique identifié en LIBS en fonction des zones histologiques visualisées. Un tableau a été rempli, décrivant les zones normales et pathologiques observées en peau saine et tumorale.

2.8 DÉFINITION DES TERMES UTILISÉS

Il est nécessaire de définir précisément les termes utilisés par la suite dans l'étude :

- Peau saine : patient sain, pas de tumeur au sein du bloc analysé
- Peau normale : structures histologiquement normales sur un bloc sain ou tumoral
- Systématisation : correspondance entre structures histologiques et images LIBS
- Mib1 = Ki67 : marqueur de prolifération cellulaire
- Les couleurs observées sur les images LIBS correspondent à l'intensité de l'élément représenté, reflet de sa concentration dans le tissu :

Minimum Maximum

3 RÉSULTATS

3.1 POPULATION DE L'ÉTUDE

35 patients ont été sélectionnés afin d'obtenir une cohorte de pathologies cutanées tumorales bénignes et malignes ainsi que de la peau saine pour le projet LAST.

Pour chaque patient, une ou plusieurs tumeurs cutanées ont été sélectionnées, ainsi que des échantillons de peau saine, permettant d'obtenir 88 blocs analysables (Annexe 7).

Les blocs sélectionnés ont été coupés au microtome puis emballés dans du parafilm (hormis un bloc qui a été emballé dans du papier aluminium).

Les 88 lames obtenues ont été numérisées de façon anonyme puis les images ont étés enregistrées selon la procédure décrite précédemment.

14 blocs (tableau 1) ont été analysés dans notre étude.

Pathologie	Sous-type	Nombre (Total : N = 14)
Peau saine	Non encrée - Emballage Para-film - Emballage Aluminium	3 2 1
Mélanome	Primitif nodulaire Métastase sous-cutanée	2 (BRAF mutés) 3 (2 BRAF sauvages/1 BRAF muté)
Nævus	Composé	1
Carcinome basocellulaire	Nodulaire	2
Carcinome épidermoïde	Infiltrant	1
Tumeur de Merkel	Primitive	2

Tableau 1 : échantillons analysés.

Au total, 105 images de cartographies LIBS mono-élémentaires ont été éditées puis comparées à l'image histologique préalablement annotée.

Les données socio-démographiques et clinico-histologiques des patients, pour les 14 blocs analysés dans notre étude, sont détaillées dans les tableaux 2 et 3 (des précisions concernant ces tableaux sont apportées en page 38).

Patient	1	2	3	4	5	6	7
Sexe (H/F)	H	F	F	F	H	H	F
Age	77	28	28	64	46	46	76
DN	V (77)	V (28)	V (28)	V (66)	D (47)	V (49)	D (77)
Phototype	II	/	/	III	III	III	II
Exposition solaire	Modérée	/	/	Modérée	Intense	Intense	Faible
UV artificiels	Non	/	/	Non	Non	Non	Non
Tabac	Sevré	Non	Non	/	Non	/	oui
Alcool	/	0	0	/	/	/	/
Profession	Ébéniste	Sans emploi	Sans emploi	Enseignant	Sans emploi	Affréteur	Aide-soignant
Échantillon	Peau saine	Peau saine	Peau saine	Mélanome	Mélanome	Métastase de mélanome	Métastase de mélanome
Histologie	Peau normale	Peau normale	Peau normale	Nodulaire, B :16mm, ulcéré, sans régression, nombreuses mitoses	Nodulaire, B : 8mm, ulcéré, sans régression, emboles vasculaires, nombreuses mitoses	Sous-cutanée, nodulaire, nombreuses mitoses	Sous-cutanée, nodulaire, nombreuses mitoses
Localisation	Para-lombaire droit	Sein	Sein	Vertex	Épaule gauche	Pectoral gauche	Cuisse droite
TNM	/	/	/	T4bN0M0 stade IIC	T4bN0M0 stade IIC	T2aN2cM0 stade IIIB	T4bN2bM1 stade IV
Traitements antérieurs	Protocole Derma	0	0	0	0	0	Déticène, Témodal, Fotémustine
Statut mutationnel	/	/	/	BRAF+ NRAS-	BRAF+ NRAS-	BRAF- NRAS+	BRAF- NRAS-
Cancer personnel ou familial (sein-rein-thyroïde)	Cancer du sein au 1er degré	/	/	Non	Cancer du sein au 2nd degré	Non	Non
Immunosuppression/ Greffe	Non	Non	Non	Non	Greffe pulmonaire	Non	Non
Comorbidités	0	Épilepsie	Épilepsie	0	Mucoviscidose DID	NF1	DNID

Tableau 2 : données clinico-histologiques et socio-démographiques des patients 1 à 7.

Patient	8	9	10	11	12	13	14
Sexe (H/F)	F	F	H	H	H	F	F
Age	82	64	65	72	67	62	29
DN	V (85)	D (65)	V (66)	V (75)	V (68)	V (64)	V (30)
Phototype	III	III	III	/	/	III	/
Exposition solaire	Intense	Intense	Intense	Intense	/	Intense	Intense
UV artificiels	Non	/	PUVA > 200 s.	/	/	/	/
Tabac	Non	/	Sevré	/	Sevré	/	Oui
Alcool	/	/	Non	/	Chronique	/	/
Profession	Agriculteur	Retraité /enseignant	Directeur société	Consultant militaire	Retraité/ mécanicien	Assistant direction	/
Échantillon	Métastase de mélanome	Tumeur de Merkel	Tumeur de Merkel	Carcinome épidemoïde	Carcinome basocellulaire	Carcinome basocellulaire	Nævus naevocellulaire
Histologie	Intramusculaire, nodulaire, nombreuses mitoses	Nodulaire, ulcéré, emboles vasculaires, nombreuses mitoses	Lobulée (amas de cellules tumorales), dermique	Ulcéré, infiltrant le derme, bien différencié, mitoses nombreuses	Nodulaire, infiltrant le derme, élastose	Nodulaire, infiltrant le derme	Tubéreux, composé à prédominance dermique, une mitose
Localisation	Cuisse droite	Susclaviculaire gauche	Coude droit	Susclaviculaire gauche	Frontal gauche	Temporal gauche	Sous-mammaire gauche
TNM	TxN3M1 : stade IV	T1N1bM0 : stade IIIB	T1N0M0 : stade IA	N0M0	/	/	/
Traitements antérieurs	0	0	0	0	0	0	0
Statut mutationnel	BRAF+ NRAS-	/	/	/	/	BRAF- NRAS+	/
Cancer personnel ou familial	Non	Non	Non	Non	/	/	Non
Immunosuppression/Greffe	Non	Greffe hépatorénale	Ustekinumab	Greffe rénale	Non	Non	Non
Comorbidités	Psoriasis	Polykystose hépato-rénale	Psoriasis	Polykystose rénale	DNID Exposition amiante	0	0

Tableau 3 : données clinico-histologiques et socio-démographiques des patients 8 à 14.

Les données suivantes sont applicables aux tableaux 2 et 3 :

- Aucun patient ayant un mélanome n'avait eu une analyse génétique
- Aucun patient ayant un mélanome n'avait un syndrome parkinsonnien connu
- Aucun patient ayant un mélanome n'avait un antécédent familial de mélanome
- Tous les patients vivaient dans l'Isère
- Traitements antérieurs : traitements en lien avec la tumeur étudiée
- Statut mutationnel : ne concerne que les patients ayant un mélanome
- Age : au moment du prélèvement de l'échantillon analysé
- B : Breslow
- D : décédé (âge de décès). Les décès étaient tous liés à la tumeur étudiée.
- DID/DNID : diabète insulino-dépendant / non insulino-dépendant
- DN : dernières nouvelles
- F : femme
- GS : ganglion sentinelle
- H : homme
- NF1 : neurofibromatose de type 1
- PUVA : photothérapie par rayonnement ultra-violet A après la prise d'un médicament photosensibilisant (S : séances)
- V : vivant (âge au moment des dernières nouvelles)
- / : donnée non disponible ou patient non concerné

Description des cartographies

3.2.1 Patient 1 : peau saine (Figure 7).....page 40

3.2.2 Patient 2 : peau saine (Figure 8).....page 42

3.2.3 Patient 3 : peau saine (Figure 9).....page 44

3.2.4 Patient 4 : mélanome nodulaire (figure 10).....page 46

3.2.5 Patient 5 : mélanome nodulaire (figure 11).....page 48

3.2.6 Patient 6 : métastase de mélanome (Figure 12).....page 50

3.2.7 Patient 7 : métastase de mélanome (Figure 13).....page 52

3.2.8 Patient 8 : métastase de mélanome (Figure 14).....page 54

3.2.9 Patient 9 : tumeur de Merkel (Figure 15).....page 56

3.2.10 Patient 10 : tumeur de Merkel (figure 16).....page 58

3.2.11 Patient 11 : carcinome épidermoïde (Figure 17).....page 60

3.2.12 Patient 12 : carcinome basocellulaire (Figure 18).....page 62

3.2.13 Patient 13 : carcinome basocellulaire (Figure 19).....page 64

3.2.14 Patient 14 : nævus naevocellulaire (Figure 20).....page 66

3.2 DESCRIPTION DES CARTOGRAPHIES

3.2.1 Patient 1 : peau saine (Figure 7)

HES : épiderme et derme histologiquement normaux. Pas d'hypoderme visible. Pas de follicules pileux visibles sur ce prélèvement.

Epiderme: calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc.

Derme :

- Stroma :
  - Calcium et zinc : présents et faibles.
  - Sodium : présent hétérogène : plus intense en périphérie surtout à droite sans support histologique.
  - Phosphore : présent hétérogène : intense dans la zone nodulaire gauche et plus faible en périphérie du côté droit.
  - Magnésium : présent hétérogène : absent dans la zone nodulaire gauche, plus intense en périphérie surtout à droite sans support histologique.
- Vaisseaux : non différenciables du stroma dermique.
- Zones hémorragiques :
  - Zinc présent et intense.
  - Les autres éléments sont absents.

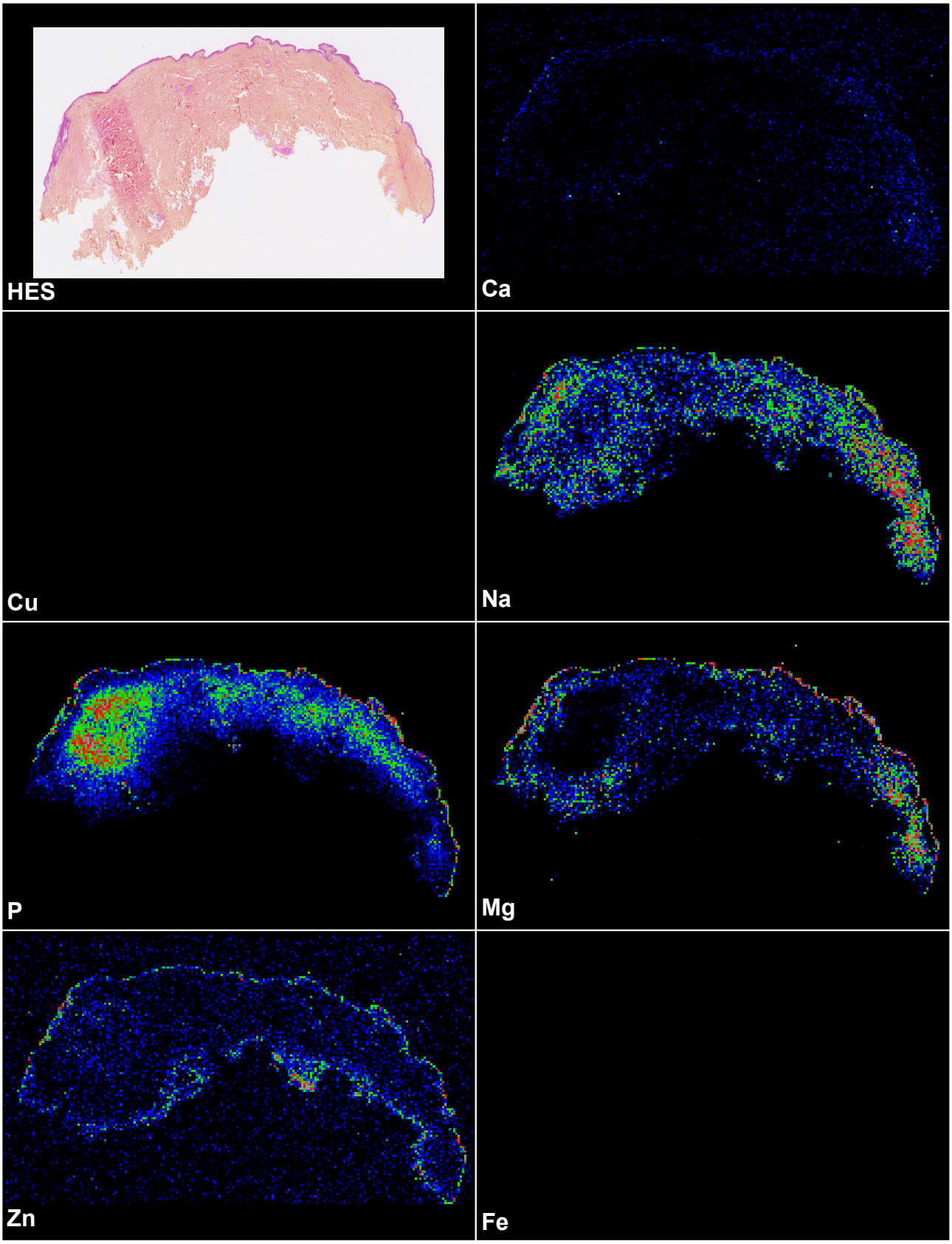


Fig.7 : patient 1 : peau saine non encrée représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.2 Patient 2 : peau saine (Figure 8)

HES : épiderme, derme et hypoderme histologiquement normaux. Pas de follicules pileux visibles sur ce prélèvement.

Épiderme : non visible sur les images LIBS (hors zone d'analyse).

Derme :

- Stroma :
  - Calcium et zinc : présents, diffus et faibles.
  - Cuivre : intensité focale de la portion inférieure du derme à droite.
  - Sodium : présent et diffus. Plus intense en profondeur à proximité de l'hypoderme.
  - Phosphore et magnésium : présents et diffus.
- Vaisseaux : non différenciables du stroma dermique.
- Zones hémorragiques : sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Hypoderme : présence de zinc et de cuivre de façon légère et diffuse.

- Septums :
  - Calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.
  - Cuivre : au niveau d'un septum hypodermique.
- Vaisseaux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

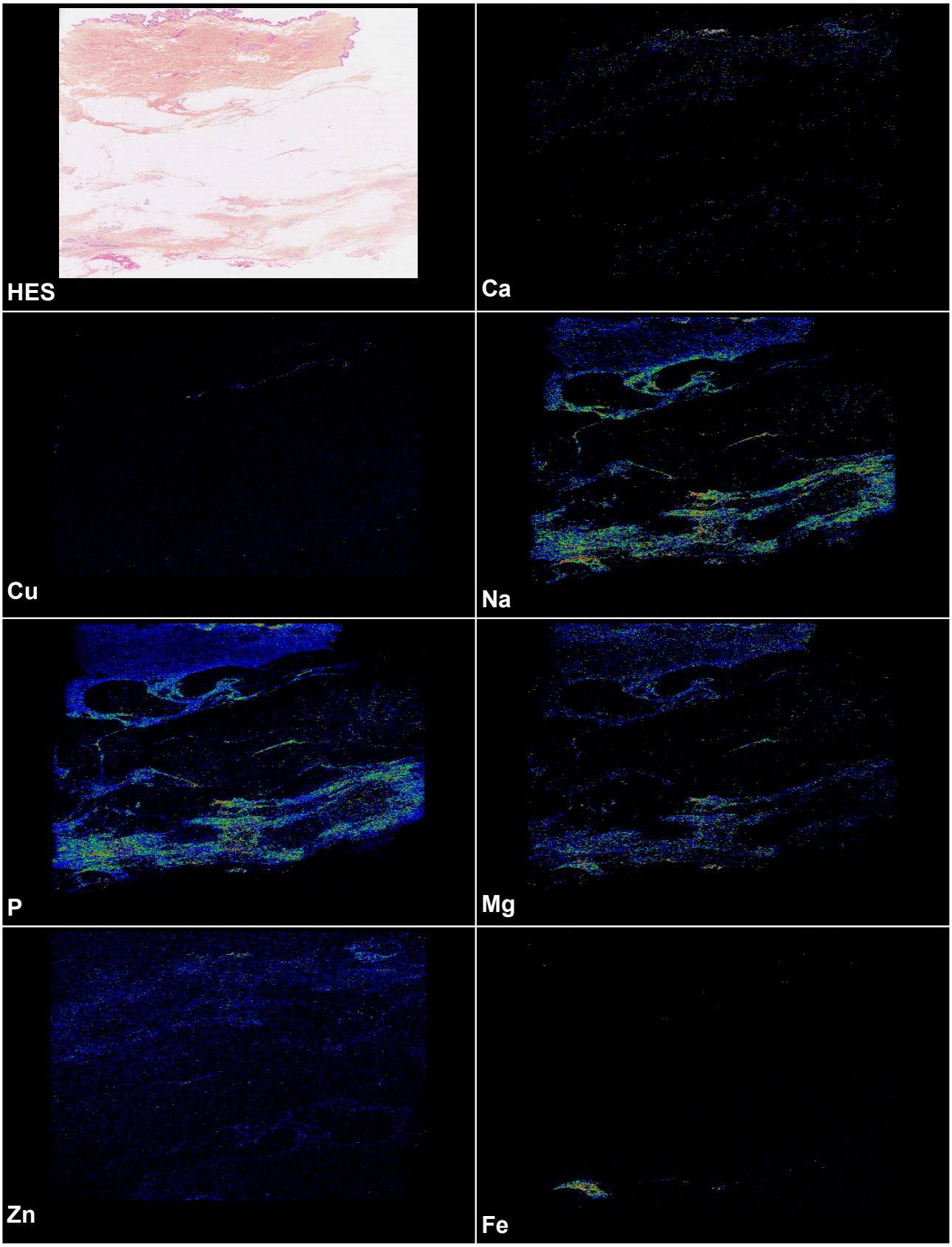


Fig.8 : patient 2 : peau saine non encrée représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.3 Patient 3 : peau saine (Figure 9)

HES : épiderme, derme et hypoderme histologiquement normaux.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme :

- Stroma :
  - Calcium : présent, diffus et faible.
  - Sodium, magnésium, zinc : présents.
  - Phosphore : présent, prédominant dans la moitié inférieure.
- Follicule pileux : discrète supériorité d'intensité des éléments calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.
- Vaisseaux : non différenciables du stroma dermique.

Hypoderme :

- Septums : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.
- Vaisseaux :
  - Calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc : paroi et contenu.
  - Fer : contenu.

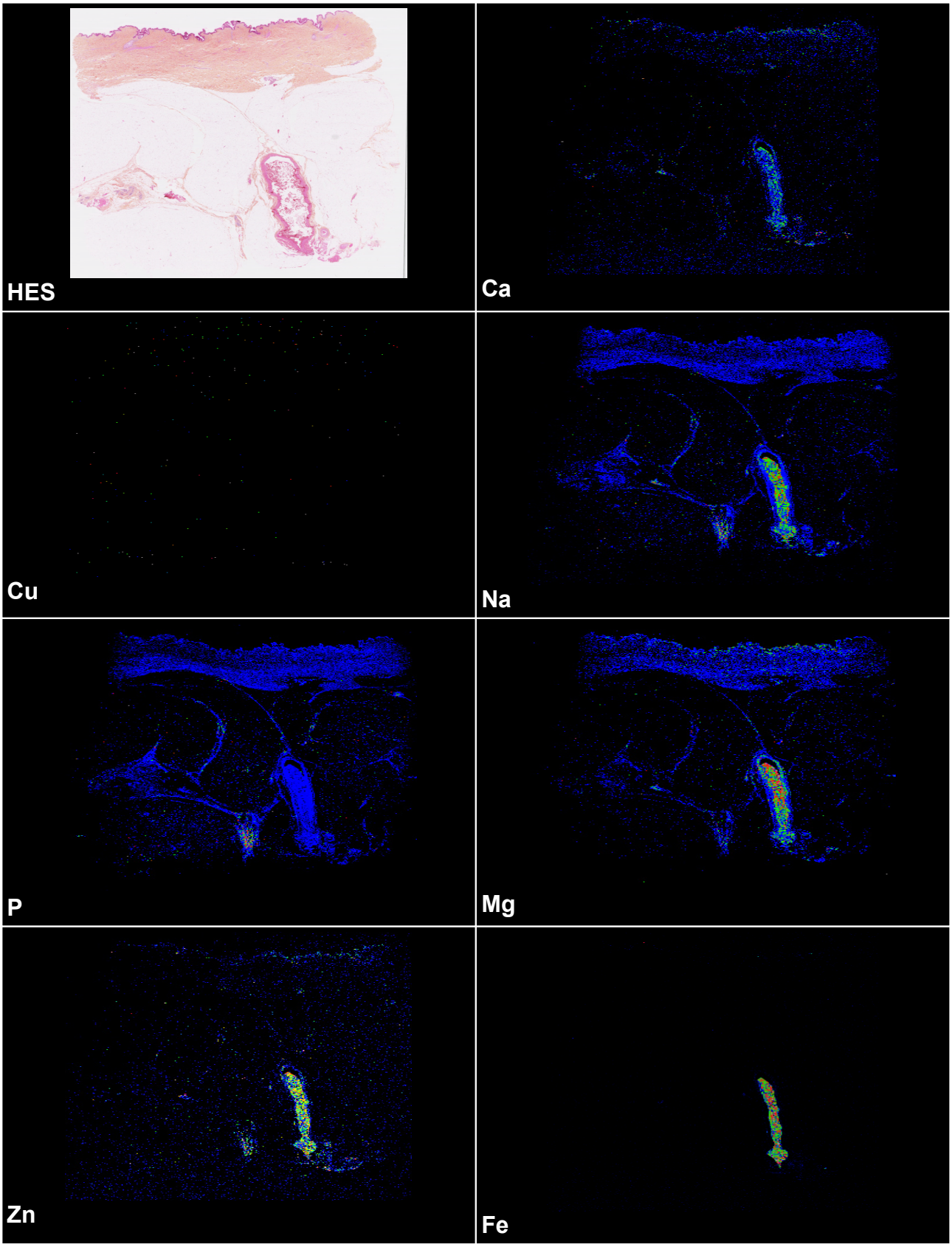


Fig.9 : patient 3 : peau saine non encrée représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.4 Patient 4 : mélanome nodulaire (figure 10)

HES : mélanome nodulaire, muté BRAF, Breslow 16 mm : nodule ulcéré en surface, composé de cellules mélanocytaires parfois pigmentées. Ailleurs, derme et hypoderme histologiquement normaux, avec de nombreuses sections de tiges pilaires.

Encre verte : calcium, cuivre, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc. (Phosphore, sodium et magnésium sont plus intenses dans le derme péri-tumoral).

Follicules pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Stroma inter-folliculaire : à droite, sodium et phosphore plus intense.

Zones hémorragiques : fer.

Vaisseaux et septums hypodermiques : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc.

Tumeur :

- Calcium : diffus, plus intense dans les zones les plus pigmentées. Plus intense en bande étroite au bord inférieur droit de la tumeur.
- Cuivre : absent.
- Sodium : diffus, hormis une zone tumorale au pôle inférieur qui en est dépourvue, sans aspect histologique différent. Les zones les plus pigmentées sont plus intenses.
- Phosphore : diffus, avec des zones plus intenses sans différence histologique.
- Magnésium : gradient d'intensité : signal plus intense au cœur de la tumeur, diminuant d'intensité vers la périphérie. Les zones les plus pigmentées sont plus intenses.
- Zinc : diffus. Les zones les plus pigmentées sont plus intenses.

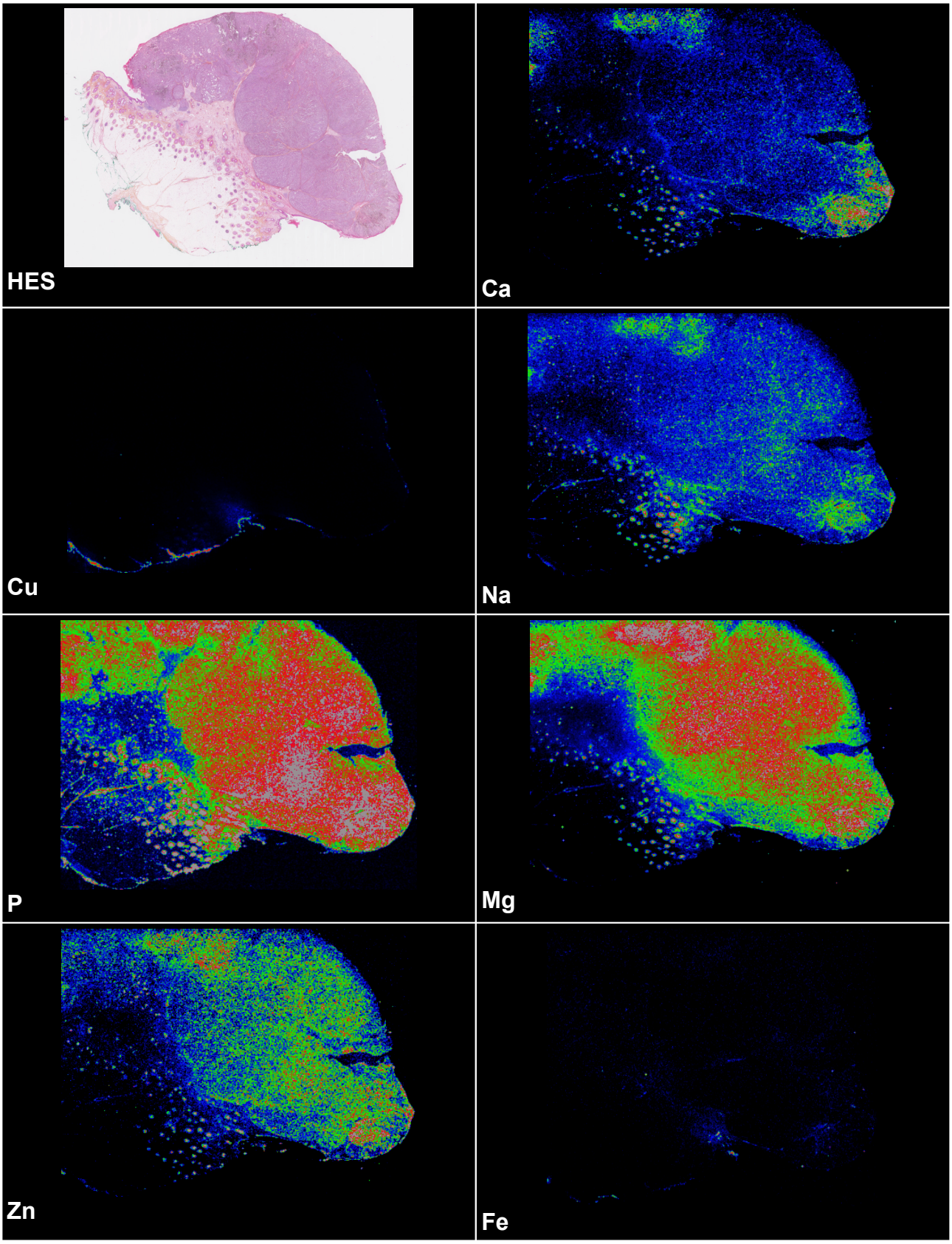


Fig.10 : patient 4 : mélanome nodulaire muté BRAF représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.5 Patient 5 : mélanome nodulaire (figure 11).

HES : mélanome nodulaire, muté BRAF, Breslow 8 mm : nodule ulcéré en surface sans zones pigmentées. Ailleurs, derme et hypoderme histologiquement normaux.

Encre bleue : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Derme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc. Une zone arrondie sous-tumorale inférieure droite est plus intense en sodium, phosphore et magnésium.

Vaisseaux et septums hypodermiques : calcium, sodium, phosphore et magnésium. Sodium et phosphore plus intenses au niveau des vaisseaux.

Tumeur :

- Calcium : présent. Plus intense sur les bords, faible au centre.
- Cuivre : absent.
- Sodium, phosphore, magnésium et zinc : présents. Plus marqués sur 2 zones nodulaires droite et gauche, sans aspect histologique différent.
- Zones nécrotiques : calcium, magnésium et zinc d'intensité équivalente au reste de la tumeur. Phosphore plus intense. Sodium légèrement moins intense.

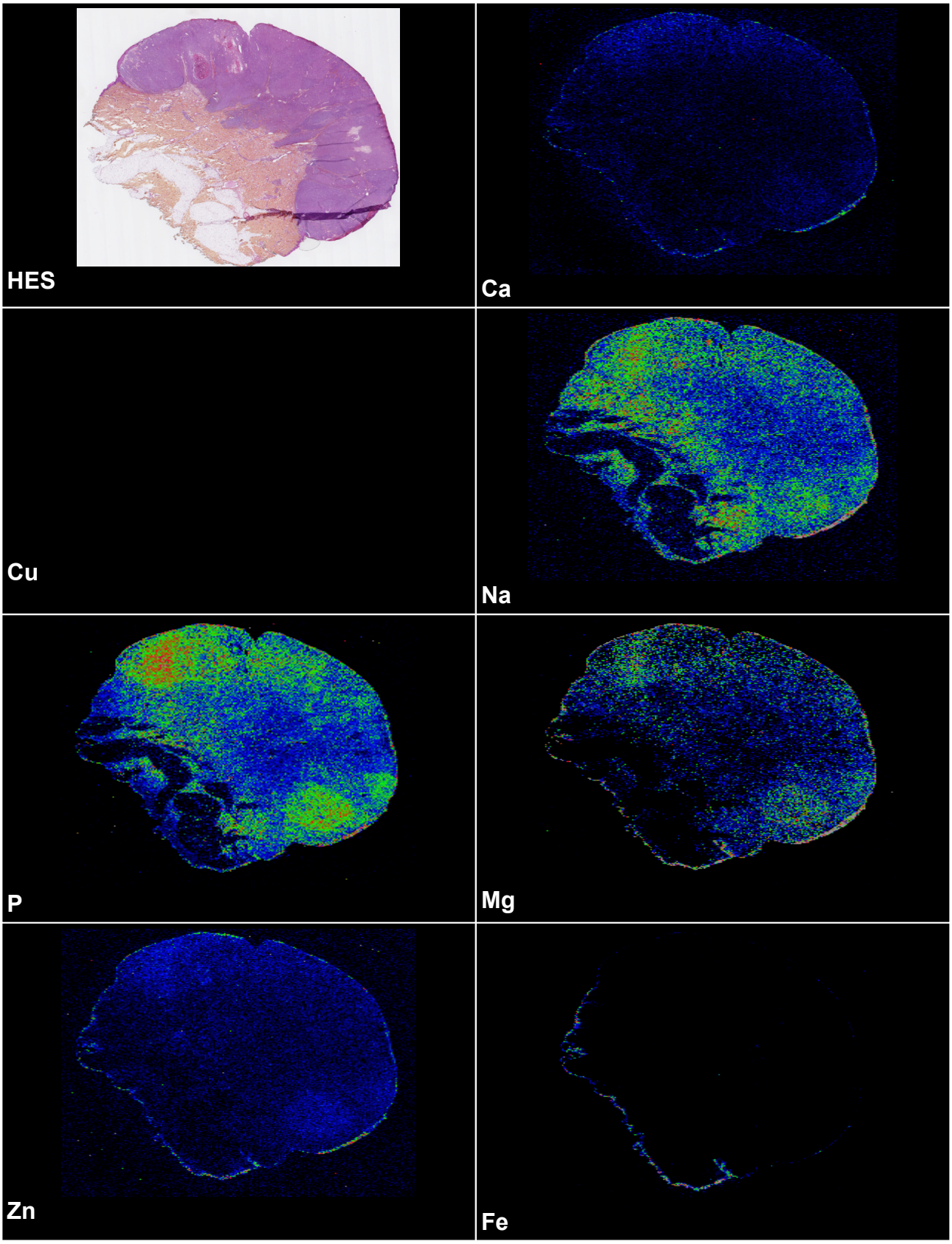


Fig.11 : patient 5 : mélanome nodulaire muté BRAF représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.6 Patient 6 : métastase de mélanome (Figure 12)

HES : métastase de mélanome, BRAF sauvage, formant un nodule dermo-hypodermique. Inflammation lymphocytaire intra et péri-tumorale. Derme sus-jacent fibro-cicatriciel (site d'exérèse élargie du mélanome primitif). Hypoderme histologiquement normal par ailleurs.

Encre bleue et verte mêlées : calcium, cuivre, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, cuivre, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

- Derme inflammatoire et zones fibro-cicatricielles : cuivre intense dans certaines zones.

Septums et vaisseaux hypodermiques : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc.

Tumeur :

- Cuivre et fer : absents.
- Phosphore, magnésium, zinc (et de façon moins nette le calcium et le sodium) :
  - Superposables avec deux zones nodulaires intenses au pôle inférieur de la tumeur et une zone au pôle supérieur de la tumeur (ces zones sont inflammatoires, centrées par des cellules tumorales). D'autres zones inflammatoires sont dépourvues d'éléments.
  - Zone linéaire oblique à gauche sans aspect histologique différent.
- Calcium, sodium et zinc : présents en bande périphérique peu intense, en continuité avec l'inflammation péri-tumorale. Absents au centre de la tumeur.
- Phosphore et magnésium : présents sur quelques zones tumorales.
- Certaines zones intra-tumorales ne comportent aucun élément, sans aspect histologique différent.

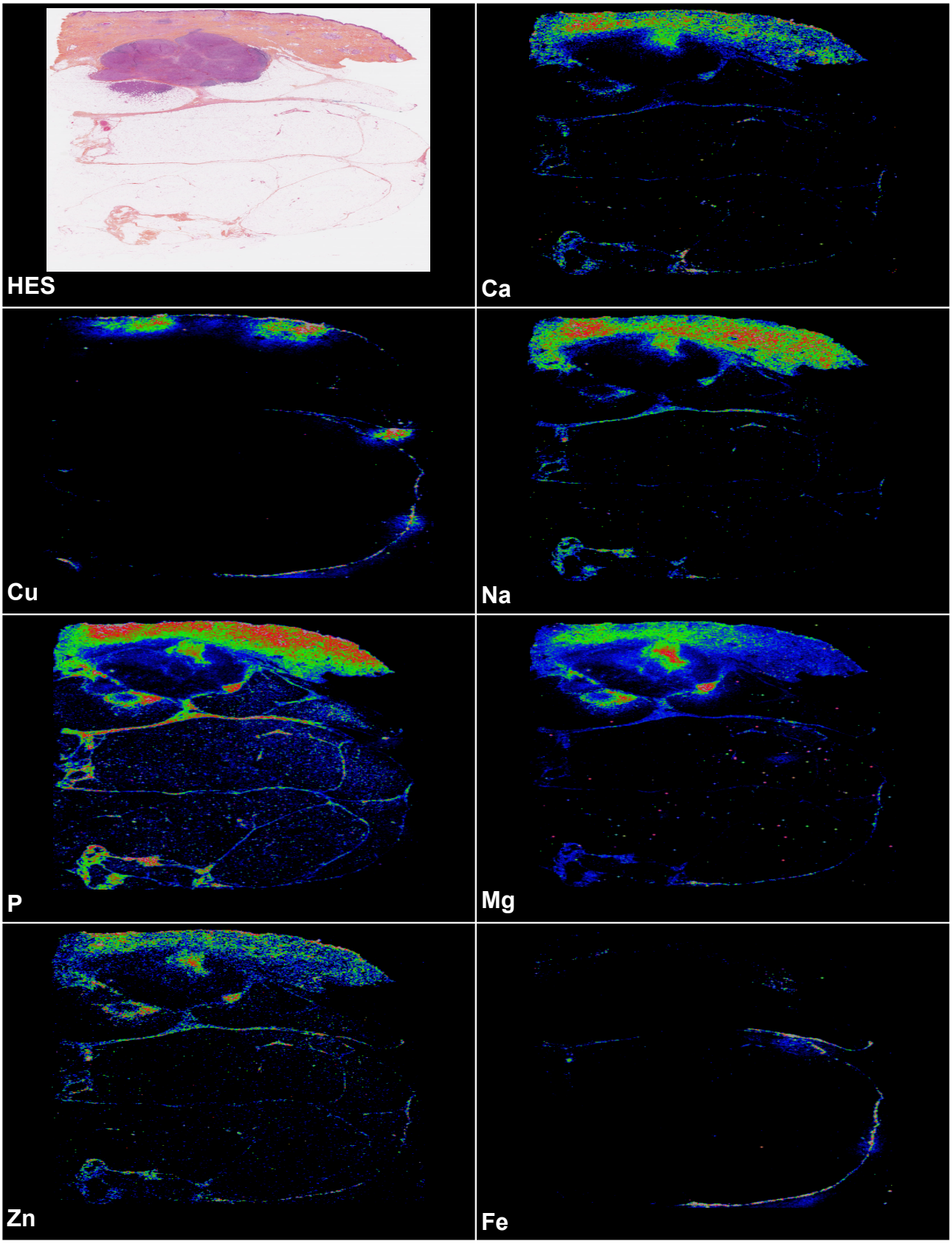


Fig.12 : patient 6 : métastase sous-cutanée de mélanome non mutée BRAF en HES en haut à gauche, les autres images représentent les éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.7 Patient 7 : métastase de mélanome (Figure 13).

HES : métastase de mélanome, BRAF sauvage, formant un nodule dermo-hypodermique (foyers pigmentés, remaniements nécrotiques et hémorragiques). Le derme sus-jacent est d'aspect plus fibreux à gauche et inflammatoire de façon diffuse. Inflammation lymphocytaire péri-tumorale. Hypoderme histologiquement normal.

Encre verte : calcium, cuivre, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme :

- Stroma : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc : présents, diffus, hétérogènes, sans différence histologique. Le sodium est plus intense à droite sans différence histologique hormis une fibrose un peu moindre.
- Follicules pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Vaisseaux et septums hypodermiques : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc.

Inflammation péri-tumorale : présence de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc d’intensité identique à la tumeur.

Tumeur :

- Calcium, sodium : diffus. Intenses dans les zones hémorragiques et pigmentées.
- Cuivre : absent.
- Phosphore, zinc : diffus hétérogènes, non corrélés aux zones hémorragiques et pigmentées.
- Magnésium : présent, diffus et intense dans la tumeur. Moins intense dans les zones hémorragiques. Pas de corrélation au pigment.
- Fer : dans les zones hémorragiques intra-tumorales.

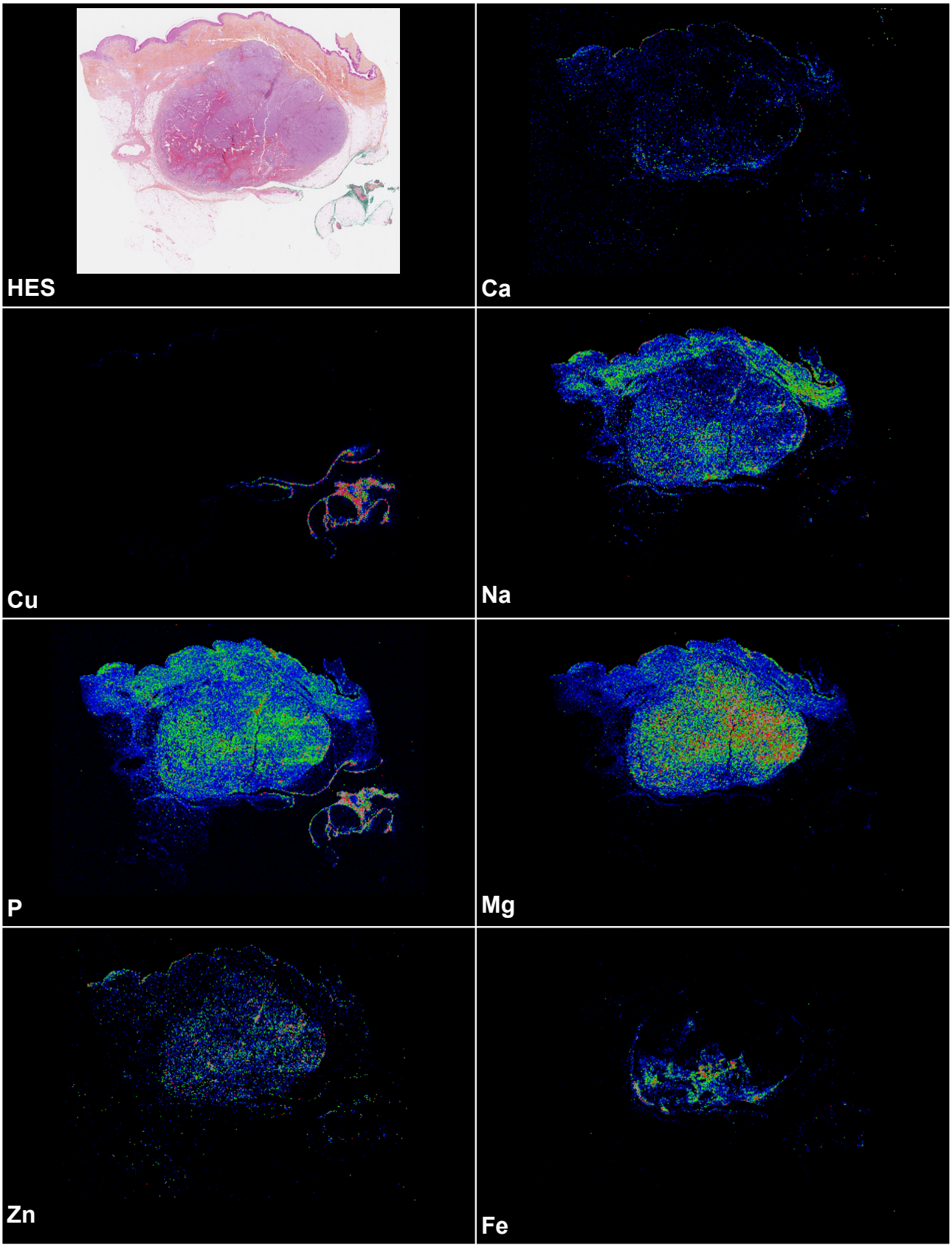


Fig.13 : patient 7 : métastase de mélanome non mutée BRAF en HES en haut à gauche, les autres images représentent les éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.8 Patient 8 : métastase de mélanome (Figure 14).

HES : métastase de mélanome, mutée BRAF, intra-musculaire. Inflammation lymphocytaire péri-tumorale, intra-musculaire et intra-tumorale. Plages de nécrose intra-tumorale. Plages hémorragiques intramusculaires. Pas d'encre visible.

Muscle :

- Calcium, sodium et zinc : diffus. Les zones intenses n'ont pas de support histologique spécifique. Zones peu intenses, proches ou à distance de la tumeur, sans aspect histologique différent.
- Cuivre : modéré, au niveau péri-tumoral en fine bande.
- Magnésium et phosphore : diffus, plus intenses en péri tumoral dans des zones plus inflammatoires et à droite à distance sans aspect histologique différent. D'autres zones sont moins intenses, proches et à distance de la tumeur.
- Fer : diffus et modéré (plages hémorragiques).

Vaisseaux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Inflammation : (des zones inflammatoires ne sont pas intenses).

- Calcium, sodium et zinc : une zone intra-tumorale en bas à droite plus intense.
- Magnésium et phosphore : au niveau musculaire, dans certaines zones inflammatoires, notamment en péri-tumoral.

Zones hémorragiques : sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Tumeur :

- Calcium, sodium et zinc : présents, diffus. Moindres que dans le muscle.
- Cuivre : diffus et faible (bruit de fond).
- Fer : absent.
- Phosphore et magnésium : diffus, faibles plus intenses à droite sans aspect histologique différent.

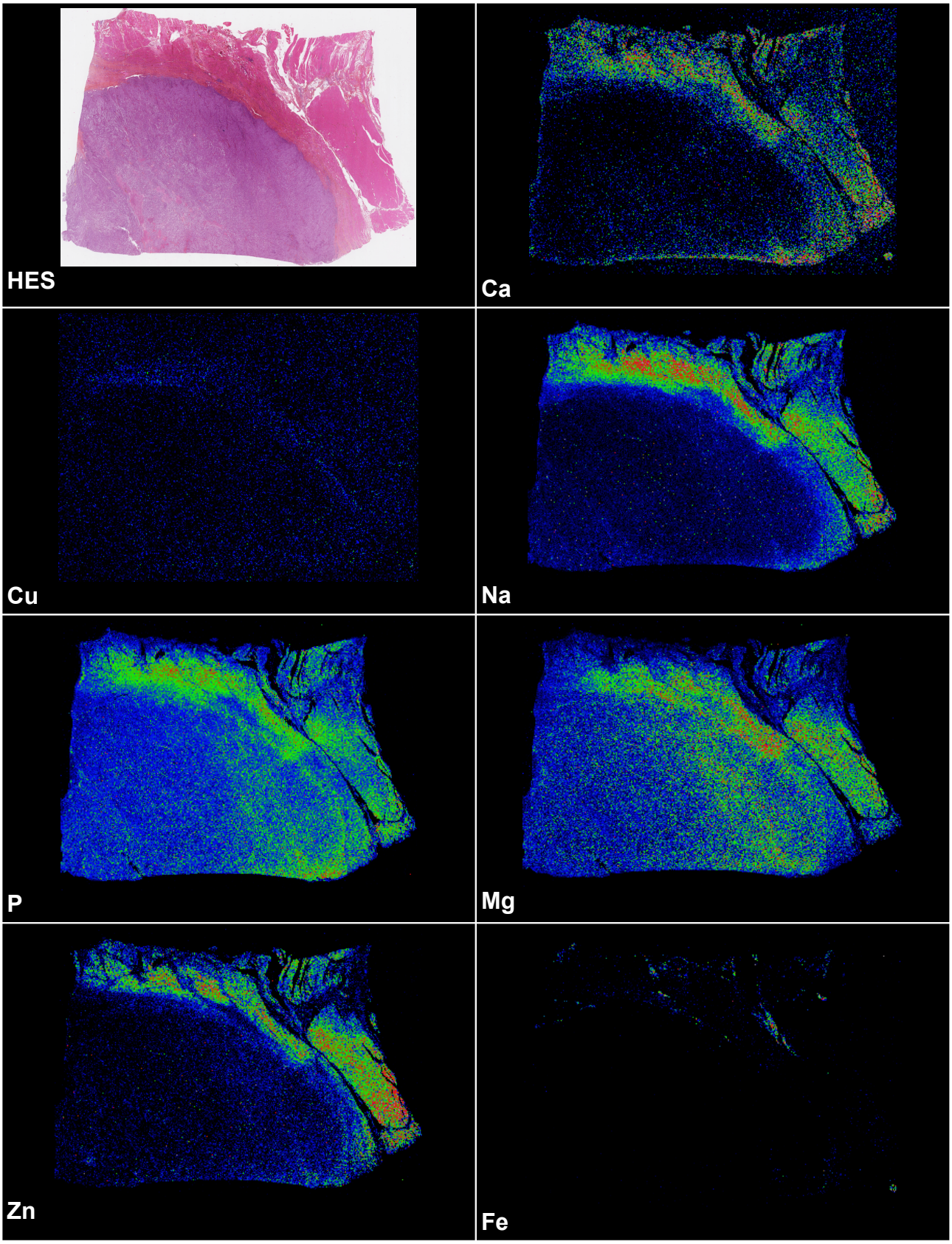


Fig.14 : patient 8 : métastase de mélanome mutée BRAF représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.9 Patient 9 : tumeur de Merkel (Figure 15)

HES : tumeur nodulaire dermique ulcérant l'épiderme, allant au contact de l'hypoderme. Hypoderme histologiquement normal.

Encre bleue : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc (phosphore, magnésium et zinc sont moins marqués en péri-tumoral droit).

Follicule pileux et inflammation adjacente (péri-tumorale gauche) : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Zone péri-tumorale droite : phosphore et zinc de moindre intensité.

Zones hémorragiques : fer.

Septums et vaisseaux hypodermiques : calcium, sodium, phosphore et zinc.

Tumeur :

- Calcium : diffus. Plus intense en superficie (inflammation lymphocytaire).
- Cuivre : absent.
- Magnésium et phosphore : gradient d'intensité : plus intense au centre de la tumeur, puis l'intensité diminue en périphérie.
- Sodium : diffus (un peu plus intense que le stroma dermique).
- Zinc : diffus.

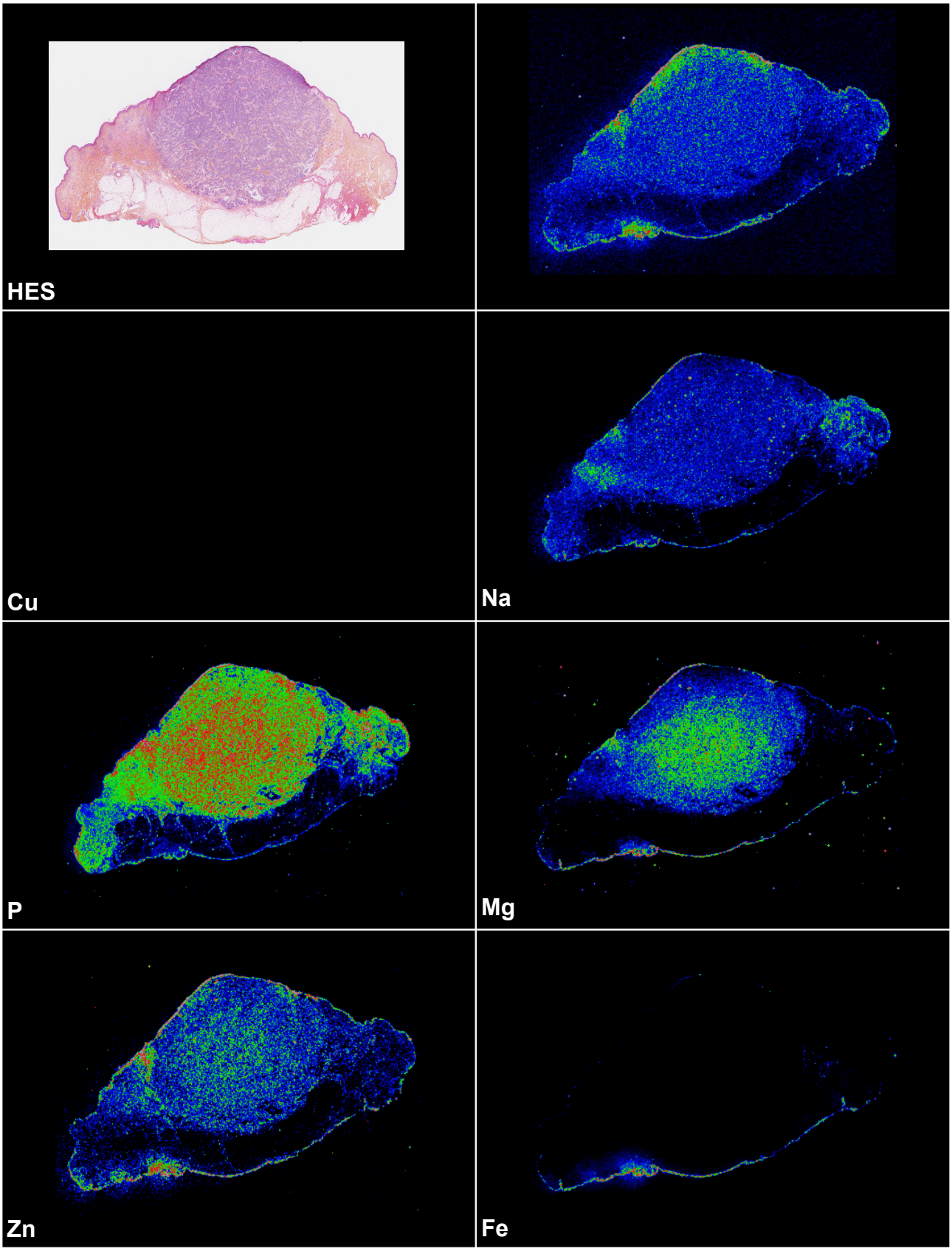


Fig.15 : patient 9 : tumeur de Merkel représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.10 Patient 10 : tumeur de Merkel (figure 16).

HES : tumeur dermique composée d'amas de cellules tumorales au sein d'un stroma fortement inflammatoire. Petite zone d'hypoderme histologiquement normal visible en profondeur. La tumeur est visible sur les 2 coupes supérieures.

Encre bleue : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme :

- Calcium, magnésium et zinc: présents, hétérogènes et faibles.
- Sodium et phosphore: diffus, hétérogènes. Intenses sur la coupe inférieure droite sans support histologique spécifique.

Follicule pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Zones hémorragiques : pas d'élément visible.

Septums et vaisseaux dermo-hypodermiques : calcium, sodium, phosphore et zinc.

Tumeur et inflammation : les 2 composantes ne sont pas différenciables.

- Calcium et zinc : présents, faibles.
- Cuivre : absent.
- Magnésium : présent.
- Sodium : présent et hétérogène.
- Phosphore : présent et intense.

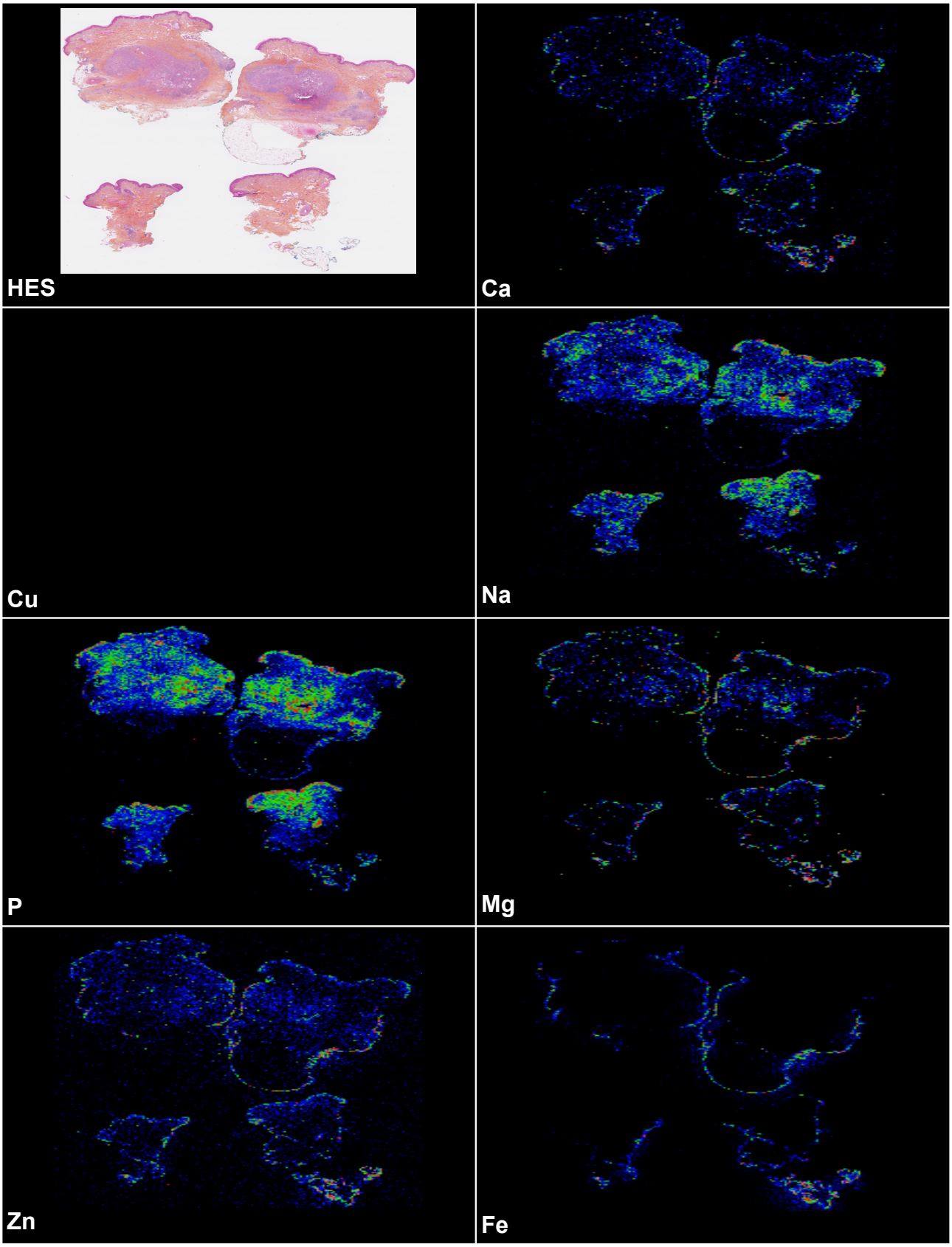


Fig.16 : patient 10 : tumeur de Merkel représentée en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.11 Patient 11 : carcinome épidermoïde (Figure 17)

HES : carcinome épidermoïde infiltrant bien différencié, bien limité, ulcéré. Inflammation lymphocytaire péri-tumorale inférieure. La tumeur est présente sur la coupe supérieure.

Encre verte : calcium, cuivre, fer, sodium ; Encre noire : aucun élément identifié.

Épiderme : calcium, cuivre, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Squame-croûte en regard de l'ulcération : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme :

- Calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc : moins marqués en péritumoral droit que dans le reste du derme sain.
- Sodium, phosphore, magnésium et zinc : plus intenses sous la tumeur, non systématisés en histologie.

Follicules pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium, et zinc : un follicule comblé de fibrine et de polynucléaires intense à droite sur la coupe du milieu.

Zones hémorragiques : fer.

Vaisseaux et septums hypodermiques : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Tumeur :

- Calcium : présent dans la partie gauche. Absent dans la zone nodulaire droite.
- Cuivre et fer : absents.
- Sodium, phosphore, magnésium et zinc : présents dans la partie gauche. Faibles dans la zone nodulaire droite.

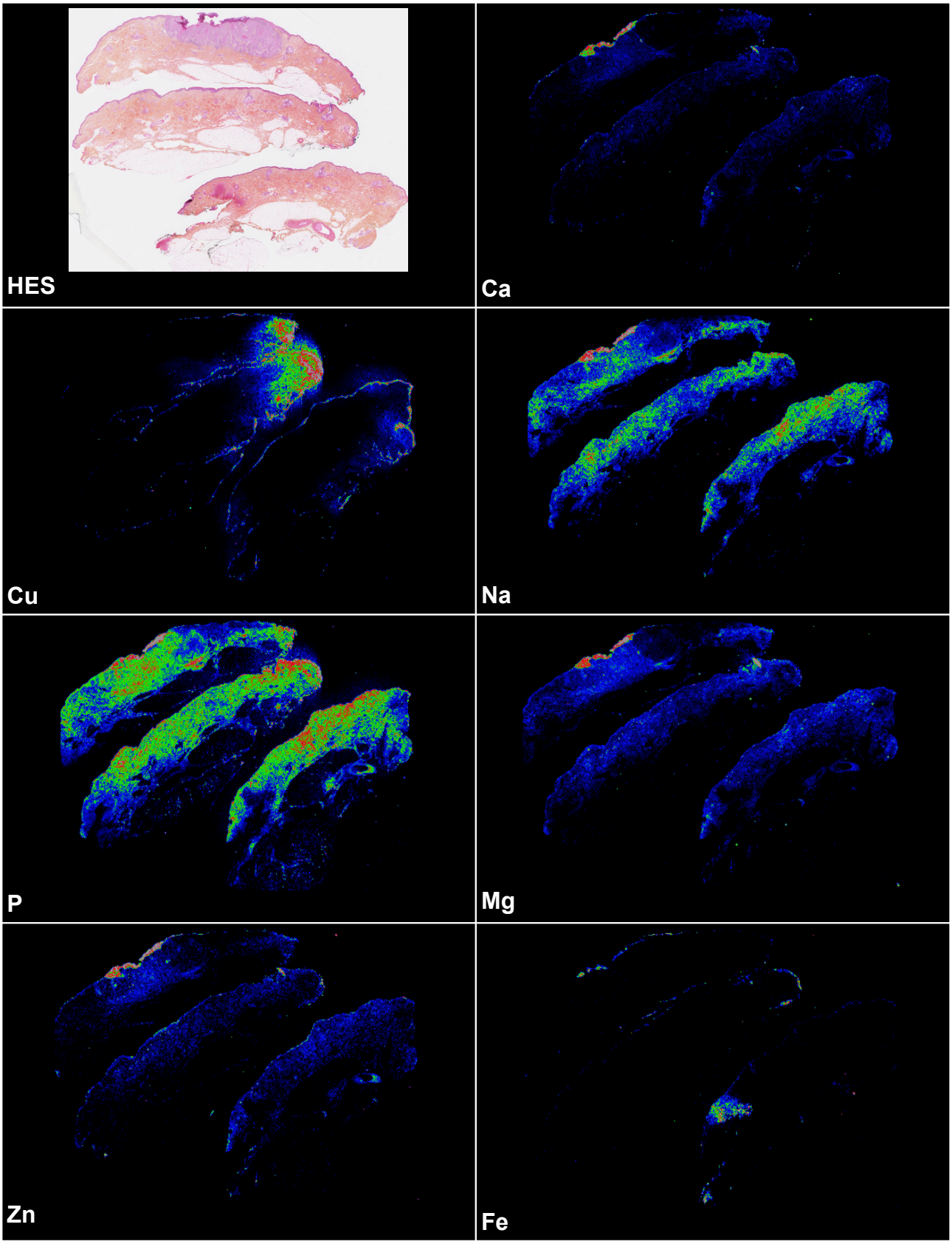


Figure 17 : patient 11 : carcinome épidermoïde infiltrant représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.12 Patient 12 : carcinome basocellulaire (Figure 18)

HES : carcinome basocellulaire nodulaire, pigmenté par endroits, présent sur les 2 coupes supérieures, où il est centré par un follicule pileux. Zones d'élastose (dommages actiniques) marquées dans le derme. Inflammation peu marquée. Très peu d'hypoderme (histologiquement normal).

Encre : bleue : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer. Noire : calcium.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Derme :

- Calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc.
- Elastose : aucun élément visible.

Follicules pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

- Follicules intra-tumoraux dilatés contenant de la kératine : calcium, magnésium et zinc plus intenses. Absence de sodium et phosphore.
- Follicules extra-tumoraux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Tumeur :

- Calcium : présent et hétérogène (intensité moindre au pôle supérieur sur la coupe supérieure et aux pôles supérieurs et inférieurs sur la coupe du milieu).
- Cuivre : absent.
- Phosphore : intense et diffus.
- Magnésium : diffus et hétérogène.
- Sodium : présent et intense, surtout dans la moitié inférieure.
- Zinc : diffus et hétérogène.
- Zones pigmentées intra-tumorales : pas d'élément plus intense.

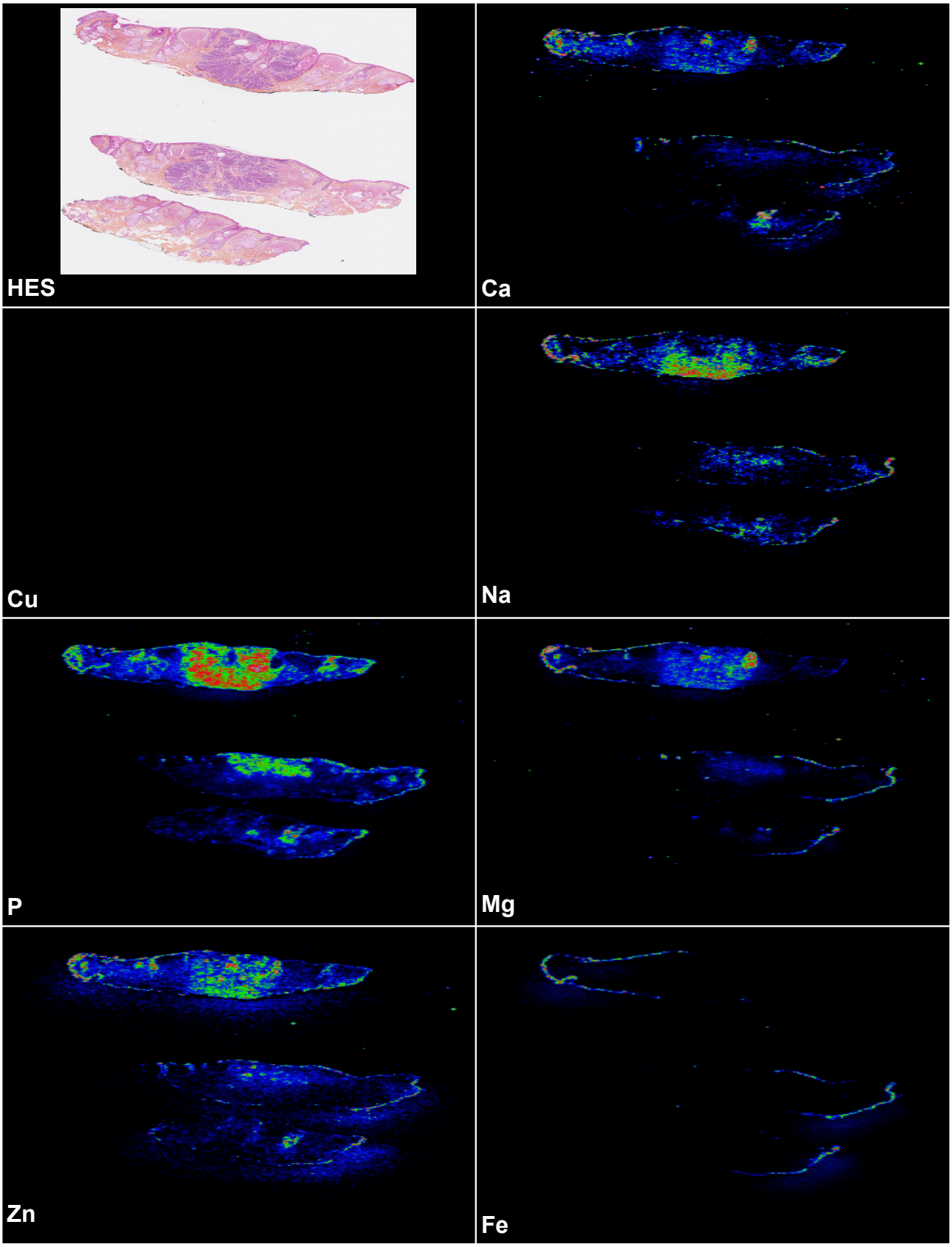


Fig.18 : patient 12 : carcinome basocellulaire nodulaire représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.13 Patient 13 : carcinome basocellulaire (Figure 19)

HES : carcinome basocellulaire nodulaire. Remaniements fibro-inflammatoires du derme. Inflammation lymphocytaire péri-tumorale modérée. Pseudo-kystes d'origine folliculaire s'ouvrant à la surface cutanée. Hypoderme histologiquement normal.

Encre bleue : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Derme :

- Calcium : présent. Plus intense à droite.
- Sodium, magnésium, zinc : présents, diffus.
- Phosphore : présent. Plus intense sur les bords.

Follicules pileux : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc (ces éléments sont aussi présents et intenses dans une zone partiellement dépourvue de prélèvement sur la lame HES, correspondant probablement à un follicule pileux dilaté).

Septums et vaisseaux hypodermiques : calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Tumeur :

- Calcium : présent et diffus. Plus intense du coté droit.
- Cuivre : absent.
- Magnésium, sodium et zinc : présent et diffus.
- Phosphore : diffus et intense.
- Cavité de désintégration : Aucun élément.

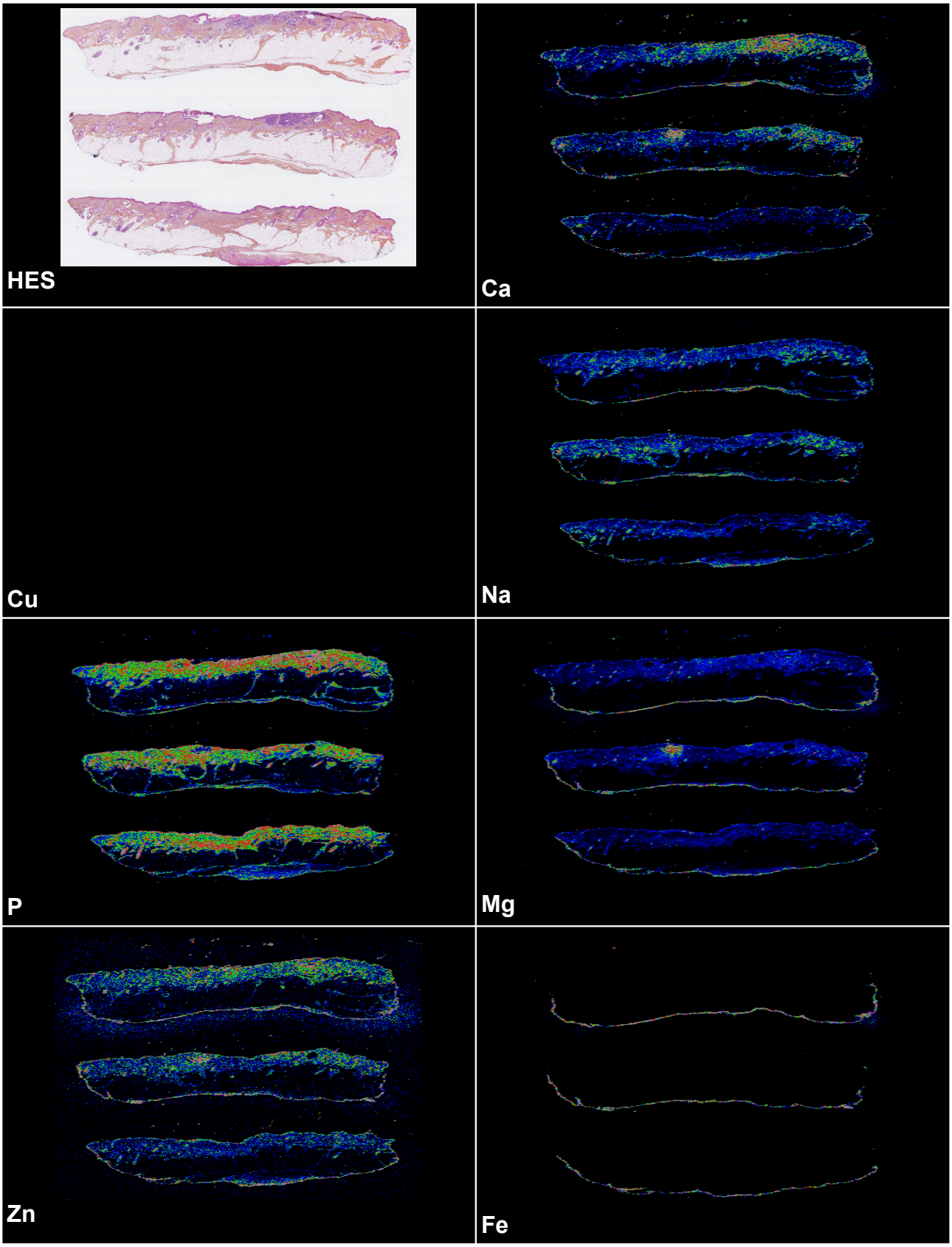


Fig.19 : patient 13 : carcinome basocellulaire nodulaire représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.2.14 Patient 14 : nævus naevocellulaire (Figure 20)

HES : nævus naevocellulaire composé à prédominance dermique, pigmenté par endroit, visible sur les 4 coupes. Le derme est d'aspect normal. Très peu d'hypoderme (histologiquement normal). Pas d'inflammation.

Encre bleu : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Épiderme : calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer.

Derme: calcium (faible et hétérogène), magnésium (coupe supérieure droite), sodium (coupe supérieure droite et inférieure gauche), phosphore (4 coupes), zinc (faible et hétérogène, surtout sur les coupes inférieures).

Tumeur :

- Calcium : coupe supérieure droite, hétérogène et modéré. Plus intense dans les zones pigmentées.
- Cuivre : absent.
- Sodium : sur une coupe. Plus intense dans les zones pigmentées.
- Phosphore et zinc : essentiellement sur une coupe. Plus intense dans les zones pigmentées.
- Magnésium : hétérogène et diffus sur une coupe. Plus intense dans les zones pigmentées.

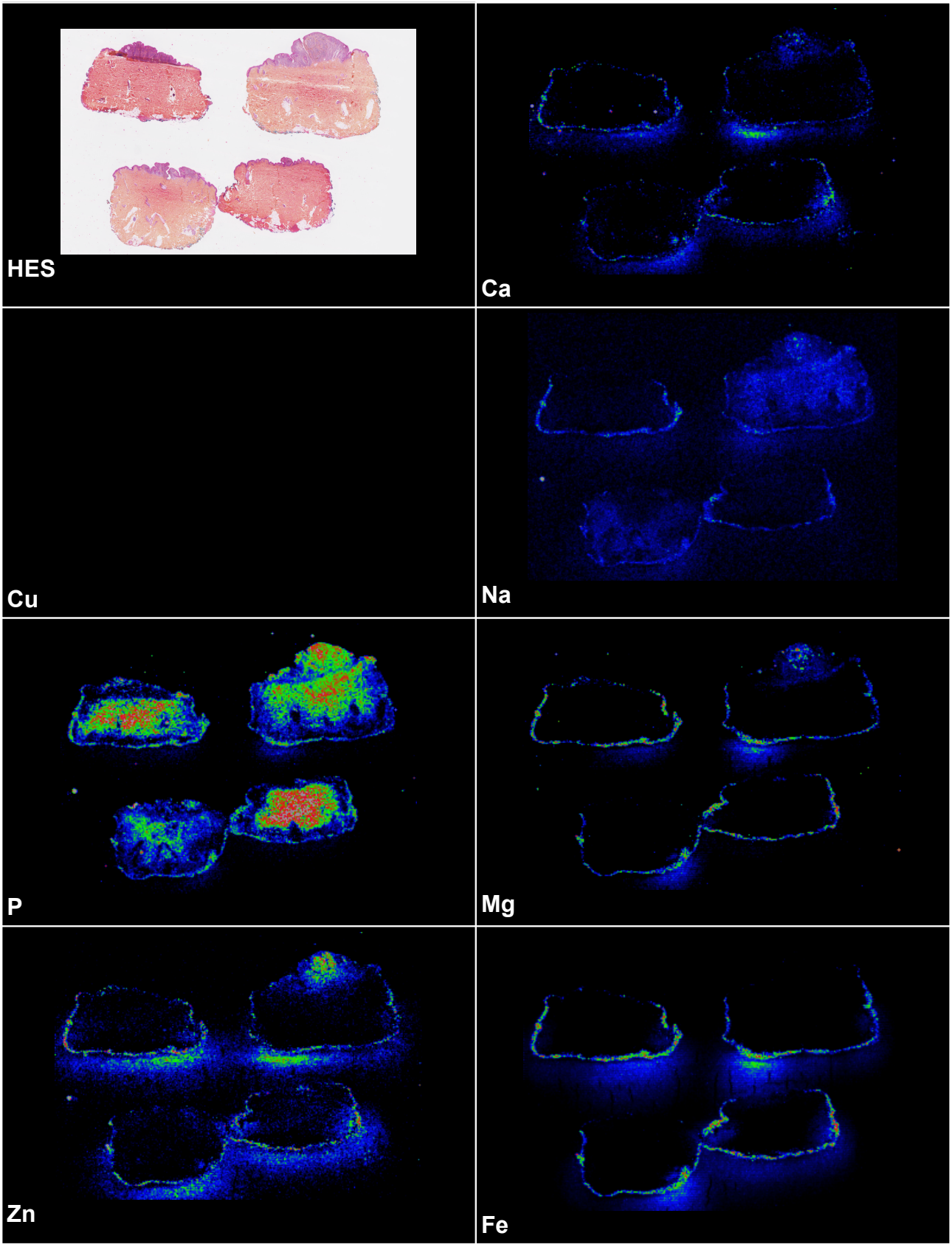


Fig.20 : patient 14 : nævus naevocellulaire composé représenté en HES en haut à gauche, les autres images représentent les différents éléments chimiques (Ca, Cu, Na, P, Mg, Zn, Fe) cartographiés en LIBS.

3.3 ANALYSES COMPLÉMENTAIRES

3.3.1 Analyse du milieu d'inclusion

Le milieu d'inclusion était la paraffine. En analyse LIBS, celle-ci est composée de carbone et d'hydrogène (données non représentés). Aucun autre élément chimique n'y a été détecté.

La paraffine est donc un matériel pur, n'apportant pas d'interférence dans l'analyse.

3.3.2 Test d'échantillons (emballage Para-film versus Aluminium)

Les figures 21 et 22 montrent que le papier aluminium ne contamine pas l'échantillon contrairement au Para-film. En effet, on observe du silicium non systématisé en histologie lorsque l'échantillon est emballé dans du Para-film, alors que l'on n'en retrouve pas dans l'échantillon emballé dans du papier aluminium.

Le Para-film transfère de nombreux composés organiques (C, H, N, O) au tissu (données non représentées) et laisse une couche de matière sur la surface analysée.

Les échantillons de peau saine représentés en figure 7 sont issus de la même patiente ayant été opérée pour une réduction mammaire. Les 2 échantillons proviennent de la même région anatomique, la seule différence étant le conditionnement du prélèvement.

Concernant le bloc emballé en papier aluminium, on observe la présence de cuivre au niveau de la portion inférieure du derme à droite et d'un septum hypodermique.

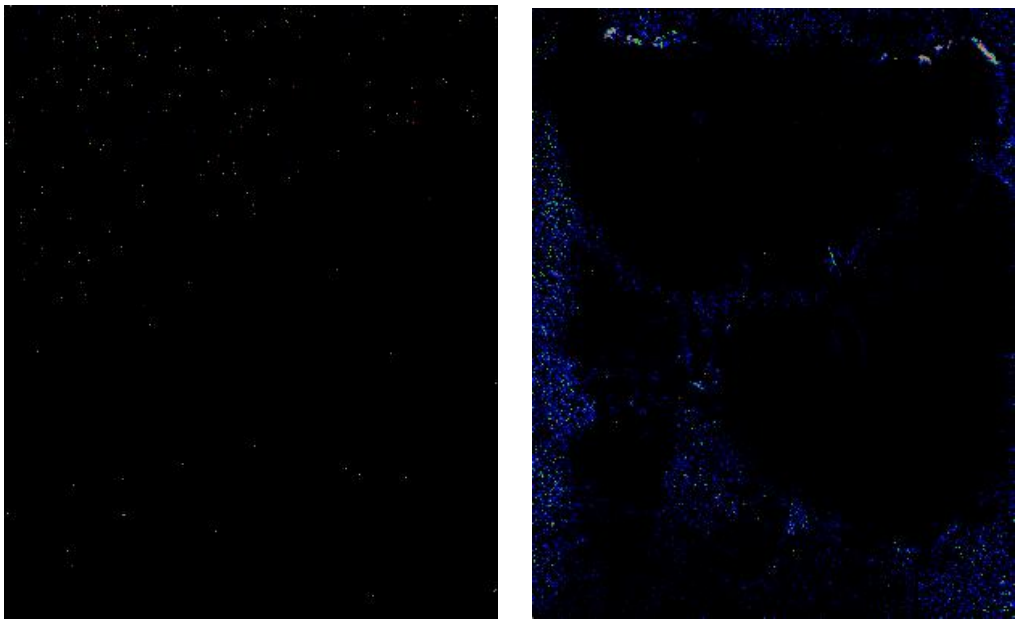


Fig.21 : comparaison de la présence de silicium dans des blocs de peau saine du même patient emballés soit dans du papier aluminium (à gauche) soit dans du Para-film (à droite).

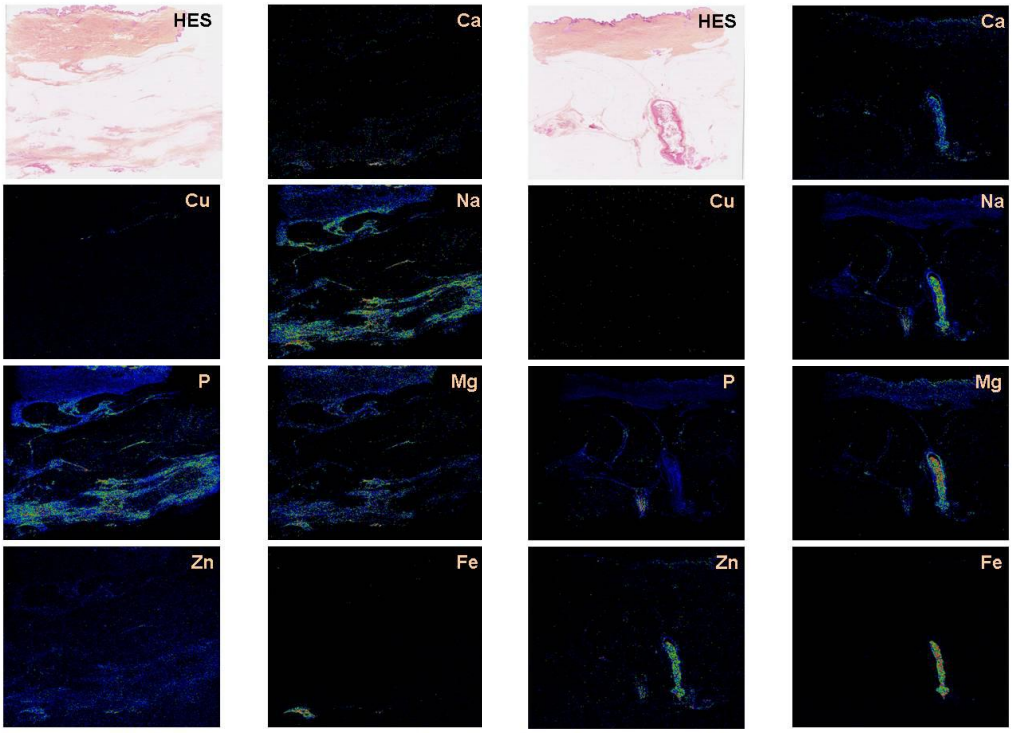


Fig.22 : comparaison de la présence des éléments calcium, cuivre, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer dans des blocs de peau saine du même patient emballés soit dans du papier aluminium (image de gauche) soit dans du Para-film (image de droite). (Correspond aux figures 8 et 9, pages 43 et 45).

3.3.3 Détection de l'aluminium

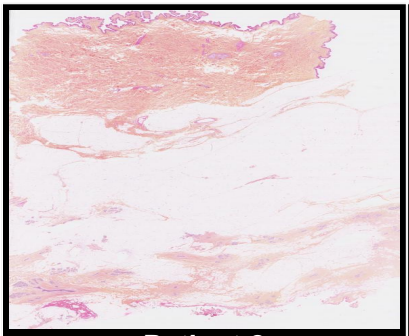
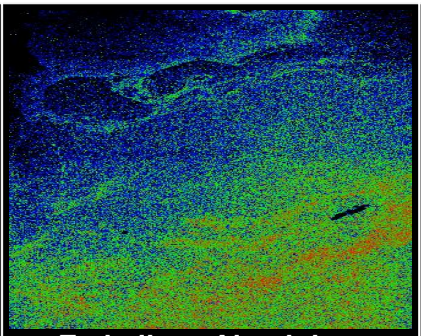
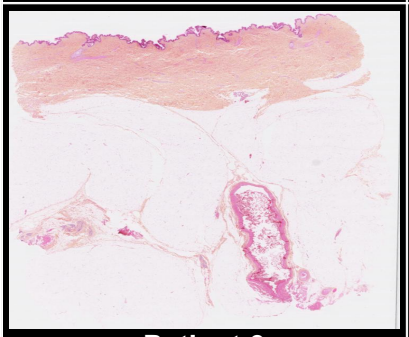
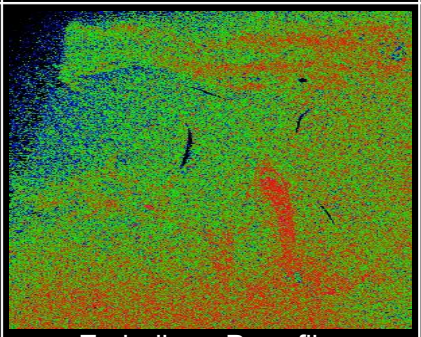
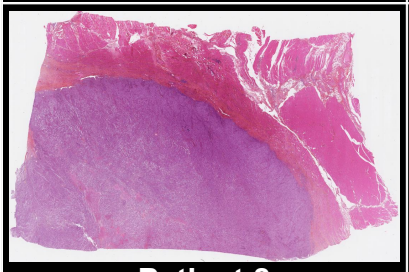
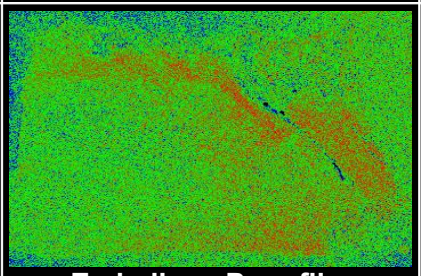
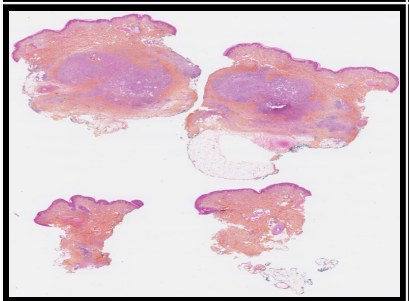
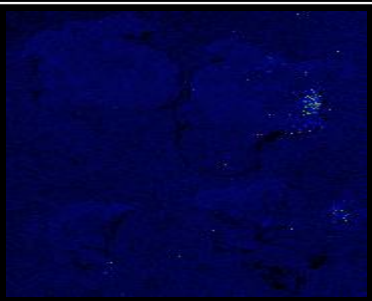
 Patient 2	 Emballage Aluminium	Signal diffus Épiderme : non visible Derme : intensité faible Hypoderme : intense et hétérogène
 Patient 3	 Emballage Para-film	Signal diffus Épiderme : non individualisable Derme : intense Hypoderme : intense Vaisseau hypodermique : intense
Patient 7	Emballage Para-film	Intensité faible diffuse Signal plus intense au niveau de l'encre
 Patient 8	 Emballage Para-film	Signal diffus Muscle : intensité péri-tumorale, mais pas dans l'ensemble du muscle Tumeur : signal plus intense en bas à droite, non systématisé
 Patient 10	 Emballage Para-film	Signal diffus dans l'ensemble du bloc Signal plus intense sur la partie droite du prélèvement, non systématisé

Figure 23 : comparaison entre l'HES et l'analyse LIBS, pour les prélèvements au sein desquels l'élément aluminium a été détecté.

3.4 SYNTHÈSE

3.4.1 Peau normale et annexes

- Épiderme

Les éléments de base de l'épiderme sont le calcium, le sodium, le phosphore, le magnésium et le zinc. Ils sont constamment retrouvés et sont les seuls identifiés sur les peaux saines non encrées.

- Derme

Au niveau du stroma et des follicules pileux normaux, on retrouve le calcium, le sodium, le phosphore, le magnésium et le zinc.

En raison des nombreux éléments chimiques présents dans le derme, il n'est pas possible de distinguer la composition élémentaire propre des vaisseaux. De plus, leur petite taille rend leur visualisation difficile en LIBS.

- Hypoderme

En peau saine, les septums et les vaisseaux hypodermiques sont composés de calcium, de sodium, de phosphore, de magnésium et de zinc.

Le fer visible sur la peau saine du patient 3 (page 44) est présent dans le contenu et non sur la paroi du vaisseau. Il correspond au fer présent dans l'hémoglobine.

Sur les peaux tumorales, les septums et vaisseaux hypodermiques normaux ont la même composition qu'en peau saine, sauf pour les carcinomes de Merkel dans lesquels le magnésium est absent. (Patients 9 et 10, pages 56 et 58)

Concernant les 2 mélanomes, mutés BRAF, un seul (patient 4, page 46) présente du zinc au niveau des vaisseaux hypodermiques. Concernant le patient 5 (page 48), les vaisseaux sont difficilement analysables en raison de la qualité moindre de l'image obtenue en LIBS.

- Encres

L'encre verte est composée de calcium, cuivre, phosphore, magnésium, zinc et fer sur 2 prélèvements. Sur un autre prélèvement il y a seulement du calcium, du cuivre et du fer.

L'encre bleue est composée de calcium, sodium, phosphore, magnésium, zinc et fer sur tous les prélèvements en comportant.

L'encre noire est composée de calcium sur un prélèvement et aucun élément n'est identifié sur l'autre.

De l'encre était souvent retrouvée sur l'épiderme. Ainsi, on y observait parfois du cuivre et du fer en plus des éléments de base.

Du cuivre est retrouvé sur la peau saine du patient 2 (page 42) : il s'agit d'encres verte et noire présentes au niveau de la portion inférieure du derme à droite et d'un septum hypodermique. Ce prélèvement n'ayant pas été encré, il s'agit probablement d'une contamination.

3.4.2 Mélanomes

Les deux mélanomes étudiés sont composés de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Chez le patient 4 (page 46), il existe un gradient de magnésium intra-tumoral, avec une intensité nettement plus marquée au centre. Cet aspect n'est pas observé chez le patient 5 (page 48).

Les zones pigmentées intra-tumorales, composées de mélanine, sont plus intenses en calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

3.4.3 Métastases sous-cutanées de mélanome

Toutes les métastases de mélanome sont composées de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc (totalement ou en partie).

Un profil commun se dégage pour les tumeurs du patient 6 (page 50) et du patient 8 (page 54), qui sont respectivement BRAF sauvage et BRAF muté. Les éléments calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc sont nettement moins intenses au sein de la tumeur que dans le tissu adjacent. Ces mêmes éléments sont au contraire intenses dans les zones péri-tumorales, avec quelques zones de moindre intensité en continuité ou à distance, sans aspect histologique différent. Nos résultats confortent et complètent les données de l'article de Hare *et al.* (60) décrivant une présence atténuée du phosphore au sein de métastases ganglionnaires de mélanomes. Cet article sera détaillé dans la partie discussion.

Chez le patient 6 (page 50), on observe que le calcium, le sodium, le phosphore, le magnésium et le zinc sont intenses dans certaines zones tumorales inflammatoires. Cet aspect (non retrouvé dans les autres zones inflammatoires) évoque la possibilité de zones d'invasion. Une analyse immunohistochimique par Ki67 puis une lame HES complémentaire, suivies d'une nouvelle analyse LIBS seront réalisées ultérieurement.

Du cuivre d'intensité modérée est mis en évidence dans le tissu péri-tumoral de la métastase du patient 8 (page 54), porteur de la mutation BRAF. Il faut être prudent sur cette donnée car il existe un bruit de fond important, mais l'analyse spectrale confirme qu'une partie de cette image correspond bien à un signal effectif du cuivre (donnée non représentée). La mise en évidence de cuivre autour d'une métastase de mélanome muté BRAF corrobore l'hypothèse de Brady et al (61), publiée dans la revue Nature, selon laquelle le cuivre est nécessaire à la prolifération tumorale dans la voie de signalisation oncogène BRAF. Cette étude sera abordée plus en détails dans la partie discussion.

Chez le patient 6 (page 50), porteur d'une métastase sous-cutanée de mélanome non mutée BRAF, on note la présence de 2 zones nodulaires intenses en cuivre de localisation dermique superficielle. Dans certaines de ces zones, il y a quelques points d'encre et du pigment formolique, sans systématisation nette, ne permettant pas de les corréler.

3.4.4 Tumeurs de Merkel

Les 2 tumeurs de Merkel sont composées de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Le phosphore est intense au niveau intra-tumoral dans les 2 carcinomes de Merkel.

Chez le patient 9 (page 56), il existe un gradient d'intensité du magnésium intra-tumoral, avec une plus forte concentration au centre de la tumeur.

Chez les patients 9 et 10 (pages 56 et 58), l'intensité du magnésium au niveau tumoral contraste avec leur faible intensité dermique. Le magnésium est spécifiquement absent pour les carcinomes de Merkel étudiés, au sein des septums et des vaisseaux hypodermiques.

3.4.5 Carcinome épidermoïde

Le carcinome épidermoïde du patient 11 (page 60) est composé de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Dans la partie droite de la tumeur, on observe une zone nodulaire où le calcium, le sodium, le phosphore, le magnésium et le zinc sont d'intensité plus faible que dans le reste de la tumeur. Il en est de même au sein du derme péri-tumoral droit. Une analyse immunohistochimique par Ki67 puis une lame HES complémentaire, suivies d'une nouvelle analyse LIBS seront réalisées ultérieurement.

3.4.6 Carcinomes basocellulaires

Les deux carcinomes basocellulaires sont composés de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc.

Concernant le zinc et le magnésium, ils sont présents et diffus au sein des deux carcinomes basocellulaires étudiés.

En revanche, le sodium et le phosphore sont absents des follicules pileux intra-tumoraux chez le patient 12 (page 62).

3.4.7 Nævus

Comme pour le mélanome nodulaire du patient 14 (page 66) le calcium, le sodium, le phosphore, le magnésium et zinc sont plus intenses dans les zones pigmentées,

Pour les autres paramètres étudiés, ce prélèvement est peu informatif. En effet, la tumeur est présente sur toutes les coupes, pourtant la plupart des résultats sont discordants.

Il peut s'agir d'un problème de planéité du prélèvement suite à la coupe car il existe en HES des différences d'épaisseur de coupe.

De plus, il faut noter que le signal de l'encre est intense. Comme attendu, le fer est retrouvé uniquement au niveau de l'encre.

3.4.8 Cas particulier de l'aluminium

Sur l'ensemble des images concernant l'élément aluminium (figure 23, page 70), l'augmentation du contraste a augmenté le bruit lors de la saturation. L'analyse spectrale permet de conclure à la présence de bruit et non pas de signal effectif (données non représentées). On peut donc conclure à l'absence de contamination par l'élément aluminium du bloc emballé par du papier aluminium. Seules les images où quelques zones ressortent nettement ont un sens. Concernant le patient 7, cela correspond à une zone d'encre. Concernant le patient 10, il s'agit de 2 zones périphériques non systématisées en histologie, mais dans lesquelles il y a bien de l'aluminium détecté.

4 DISCUSSION

4.1 LIMITES DE L'ÉTUDE

4.1.1 Population

La petite taille de la cohorte constituait une limite. La population comportait un effectif volontairement réduit en raison du caractère préliminaire de notre étude. Compte tenu de la taille de cette cohorte et du risque de variabilité interindividuelle, il n'a pas été possible de réaliser une analyse statistique des données socio-démographiques et clinico-histologiques, ni de chercher à identifier des signatures multi-élémentaires propres aux zones tumorales. Nous avons cependant pu déceler des tendances qui seront à préciser par des analyses complémentaires sur une série de plus grande envergure.

Le caractère rétrospectif de la sélection des échantillons induit des données manquantes (par l'investigation de certains dossiers médicaux incomplets). Cependant, cela nous a permis d'obtenir une population représentative des pathologies que nous souhaitions étudier.

4.1.2 Analyse

La méthode est plus rapide et plus complète que les autres techniques d'analyse élémentaire. Cependant, la durée d'acquisition des spectres qui est d'environ 3 heures par bloc et implique de mobiliser une équipe formée, reste un point faible.

Les images obtenues avaient pour la plupart une très bonne résolution. Cependant, le bruit de fond peut constituer une limite à l'identification des éléments. Une solution serait de pouvoir améliorer le signal sur bruit en optimisant encore les performances du système d'analyse. Ceci n'est pas possible sur les échantillons sélectionnés, en raison de leur hétérogénéité (tumeurs et taille d'échantillons variables). La réalisation d'échantillons-tests homogènes pourrait être une expérience utile à réaliser avant de prochaines études.

La méthode d'édition et d'analyse des images LIBS a induit un biais de classement :

- La saturation de l'image a été réalisée manuellement. Il y avait donc une part de subjectivité en cas de signal faible ou de bruit de fond. Après une première sélection par le physicien, seuls les fichiers textes traduisant un signal effectif ont été

analysés. Ce mode manuel de saturation rend non comparables les intensités d'un échantillon à l'autre. L'intensité de 2 éléments distincts d'un même échantillon ne peut pas non plus être comparée. L'accès aux spectres et la maîtrise de leur analyse, idéalement en binôme avec le physicien, pourraient permettre de rendre l'analyse plus précise. Nous avons tout de même pu comparer les variations d'intensité pour un même élément dans un même échantillon, et déterminer sa présence ou son absence.

- L'analyse en double aveugle n'a pas été possible dans notre étude. En effet, l'équipe réalisant la technique LIBS avait été informée du diagnostic afin de pouvoir cibler les zones d'intérêt. Par ailleurs, ayant une formation en dermatopathologie et ayant sélectionné les échantillons, je connaissais le diagnostic au moment de la comparaison.
- Une légère différence existant entre le bloc et la lame colorée en HES, la superposition des images n'était pas parfaite. En effet, lors du dépôt de la coupe sur la lame, le prélèvement ne reste pas dans la configuration initiale exacte. Ainsi, certaines structures n'ont pas été analysables en raison de la difficulté à les individualiser des structures adjacentes (vaisseaux dermiques par exemple). Un logiciel adapté serait nécessaire, afin de pouvoir superposer correctement les images puis faire varier la transparence de l'image LIBS.

4.1.3 Échantillon

Une anomalie de planéité d'un échantillon de peau saine (patient 1, page 40) et du nævus (patient 14, page 66) a induit une hétérogénéité de distribution des éléments au niveau du derme, sans systématisation. La planéité du bloc est donc un préalable indispensable à l'analyse.

Le conditionnement des échantillons en para-film induit une limite dans l'analyse. Nous avons montré dans notre étude que le para-film induisait un dépôt exogène de silicium. Le papier aluminium ne générant aucune contamination, ce mode d'emballage sera à privilégier à l'avenir. Cela permettra l'analyse de la distribution du silicium car cet élément peut avoir une importance, notamment en pathologie pulmonaire professionnelle.

L'encre utilisée est source de contaminations et induit un signal intense sur certains blocs (notamment le cuivre contenu dans l'encre verte). Il conviendra d'en déterminer la composition exacte en LIBS. Une technique de traitement de l'image permettant de s'affranchir du signal de l'encre pourrait s'avérer utile car elle est limitative dans l'analyse précise des tissus. L'utilisation de l'Analyse en Composante Principale serait une solution. Il s'agit d'une méthode d'analyse de données multivariées. L'objectif est de construire un nouveau système de représentation qui permet de synthétiser l'information et d'observer la corrélation entre les raies d'émission d'éléments différents en regroupant les pixels présentant des spectres LIBS similaires. Ceci a pour but l'obtention de signatures multi-élémentaires.

Il faut enfin noter que toutes les étapes (prélèvement au bloc opératoire, encrage puis coupe de la pièce, coupe au microtome du bloc en paraffine, etc : Annexe 1) sont potentiellement contaminantes. Il est difficile cependant de les contrôler en pratique.

4.2 INTÉRÊTS DE L'ÉTUDE

4.2.1 Généralités

Il s'agit de la première cartographie multi-élémentaire de la peau humaine, saine et tumorale, réalisée grâce à la technique LIBS. Cette méthode permet de décrire finement la localisation des éléments comme nous avons pu le démontrer.

La technique est utilisable et reproductible, confirmant son applicabilité sur les tissus humains cutanés et extra-cutanés, sains et pathologiques. De plus, l'inclusion en paraffine ne contamine pas les échantillons et n'empêche pas leur analyse LIBS.

Nous avons mis en évidence que toutes les structures normales de la peau et toutes les tumeurs sont constituées de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc, avec des intensités variables. Il n'a pas été mis en évidence de fer ni de cuivre dans la plupart des échantillons, hormis au niveau de l'encre, ce qui est surprenant compte-tenu de leur implication en physiologie.

Un profil commun d'hétérogénéité d'intensité des éléments calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc a été observé au sein de métastases de mélanome et dans le tissu péri-tumoral (patients 6 et 8 : pages 50 et 54). Ceci conforte et complète les données de l'article de Hare *et al.* (60). Cette équipe a imagé par la technique LA-ICP-MS des ganglions lymphatiques métastatiques de mélanome.

Elle a montré la diminution de concentration de phosphore dans le stroma tumoral et son augmentation dans le stroma péri-tumoral d'apparence normale. Ils observèrent également par endroits, comme dans notre étude, des zones de moindre intensité dans le tissu péri-tumoral d'apparence normale. Leur hypothèse est une modification biochimique en réponse au développement tumoral. Cet aspect particulier pourrait sous-tendre un mécanisme physiopathologique ou orienter vers des zones d'extensions tumorales, non encore détectées par l'analyse histologique (standard et immunohistochimique).

L'étude d'une plus grande série pourrait permettre de savoir si cet aspect est spécifique aux métastases sous-cutanées de mélanome chez des patients naïfs de tout traitement ou s'il pourrait être prédictif de la médiane de survie. En effet, les 2 patients ayant ce profil commun n'avaient pas eu de traitement systémique avant le prélèvement, et étaient encore vivants à plus de 3 ans du diagnostic de la première métastase de mélanome. L'autre patient (patient 7, page 52), porteur d'une métastase de mélanome, n'avait pas ce profil. Or, il avait reçu plusieurs lignes de traitement au moment du prélèvement et est décédé 3 ans après le diagnostic de sa première métastase de mélanome.

Ce profil commun pourrait également être rapproché de celui observé dans le carcinome épidermoïde, au sein duquel ces 5 mêmes éléments sont diminués dans le stroma tumoral et péri-tumoral droit. Il pourrait s'agir d'une modification biochimique en réponse au développement tumoral. Ceci est à explorer sur plusieurs tumeurs afin de confirmer ou infirmer cet aspect.

Les zones élastosiques du derme sont dépourvues de tout élément chimique (patient 12, page 62). L'élastose est fréquemment retrouvée sur le plan histologique en zones insolées. Cela correspond à la dégradation de l'élastine, due aux dommages actiniques. L'élastose est souvent présente dans le derme adjacent aux carcinomes basocellulaires et épidermoïdes. Il s'agit d'un élément diagnostique obligatoire pour le diagnostic de méla-

nome de Dubreuilh. Ceci rappelle le profil commun précédemment décrit. On peut donc se demander si cette carence en éléments chimiques pourrait être une modification biochimique faisant le lit du développement tumoral.

4.2.2 Cuivre

Nous avons mis en évidence la présence de cuivre dans l'environnement d'une métastase de mélanome mutée BRAF (patient 8, page 54). Ceci corrobore l'hypothèse de Brady et al (61), publiée dans la revue Nature, selon laquelle le cuivre est nécessaire à la prolifération tumorale dans la voie de signalisation oncogénique où intervient BRAF. Dans cette étude, il s'agissait de lignées cellulaires de mélanome injectées à des souris, et non pas de tumeurs primitives de patients. Pour rappel, BRAF phosphoryle et active MEK qui phosphoryle ERK, activant ainsi la voie des MAPK, promotrice du cancer (Annexe 6). Or, le cuivre augmenterait la phosphorylation d'ERK par MEK par interaction Cuivre-MEK1. Ils ont montré dans leur étude que la perte d'affinité du transporteur du cuivre (Ctr1) ou une mutation de MEK1 rompant la liaison au cuivre réduisait la signalisation induite par BRAFV600E et ainsi la tumorigenèse. Ils montrèrent également que les chélateurs du cuivre (utilisés dans le traitement de la maladie de Wilson) réduisaient la croissance tumorale des cellules mutées BRAFV600E et des cellules résistantes à l'inhibition de BRAF. La mutation de BRAF intervient dans un grand nombre de mélanomes. Elle est également impliquée dans d'autres cancers comme les cancers du poumon non à petites cellules, le carcinome papillaire de la thyroïde et le cancer colorectal. L'exploration et la démonstration de la présence effective de cuivre dans ces tumeurs par la technique LIBS pourraient être utile pour des projets de recherche scientifique afin d'envisager l'utilisation des chélateurs du cuivre en association aux traitements conventionnels.

L'absence de cuivre dans la peau, et particulièrement dans les mélanomes primitifs mutés BRAF est une donnée surprenante. En effet, la quasi-totalité des prélèvements est dépourvue de cuivre, sauf la métastase intramusculaire de mélanome. Ce dernier bloc était de grande taille et a donc pu être moins fixé que les autres. Nous pourrions suggérer que l'intensité du signal de l'encre sous-estime celle de la tumeur ou bien que certains éléments (le cuivre en particulier) pourraient être dégradés par la fixation ou par l'ischémie froide.

Concernant les zones pigmentées intra-tumorales, elles sont plus intenses en calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc dans les zones contenant de la mélanine. Il est étonnant de ne pas y retrouver de cuivre alors que l'enzyme impliquée dans la synthèse, la tyrosinase, en contient. Ce signal ne provient pas à priori de la mélanine car sa composition élémentaire est différente. L'eumélanine est composée de carbone, d'hydrogène et d'azote. La phaeomélanine, quant à elle, comporte du soufre en plus. Les éléments détectés proviendraient donc de son environnement (stroma sous-jacent, cellules mélanocytaires).

Concernant une métastase sous-cutanée de mélanome non mutée BRAF (patient 6, page 50), l'observation de 2 zones nodulaires intenses en cuivre pose de nouvelles questions. Il n'y a pas de systématisation nette avec les zones fibro-cicatricielles et inflammatoires du bloc. Il ne s'agit pas à priori des modalités anesthésiques car ce n'est observé que chez ce patient. Cela pourrait provenir de l'application d'une crème réparatrice contenant du cuivre mais cette donnée n'est pas connue. Ce patient est porteur également d'une neurofibromatose de type 1. L'aspect histologique n'est pas celui de neurofibromes superficiels, et les données de la littérature ne rapportent pas de lien entre la présence de cuivre et cette maladie. Il serait intéressant d'analyser les autres blocs disponibles pour ce même patient, pour la même métastase et les autres prélèvements, tumoraux ou non. Si la présence de cuivre se confirme, son étude dans la peau de patients atteints de neurofibromatose de type 1 serait un sujet intéressant à explorer avec la technique LIBS.

4.2.3 Magnésium

Le magnésium est présent au cœur de plusieurs tumeurs, en particulier dans les carcinomes de Merkel, où l'on note un gradient d'intensité (patient 9, page 56). En effet, l'intensité du magnésium est majeure au cœur de la tumeur, mais est nettement diminuée dans le derme adjacent tout en étant absente dans l'hypoderme (patients 9 et 10, pages 56 et 58). Les données de la littérature ne révèlent pas de lien connu entre les carcinomes de Merkel et le magnésium. En revanche, un article montre que des taux faibles de magnésium moduleraient les fonctions des cellules normales du micro-environnement tumoral (62). De faibles taux induiraient ainsi la sénescence des fibroblastes.

Dans cette étude, il a été montré que dans un milieu faiblement concentré en magnésium, la durée de vie des fibroblastes humains en culture était diminuée, avec une augmentation de la béta-galactosidase (biomarqueur de la sénéscence). Les protéines p16 et p51 (intervenant dans les voies de p53 et pRB, protéines synthétisées grâce aux gènes suppresseurs de tumeur du même nom) étaient également majorées. Ceci permettrait une modification de l'environnement pour promouvoir la progression du cancer (63), notamment via la sécrétion de facteurs de croissance épidermique, par les fibroblastes sénescents. De plus la teneur en magnésium sérique est souvent abaissée chez les patients porteurs de tumeurs solides, indépendamment de leur traitement, et diminue de façon corrélée au stade de malignité (64). Ceci pourrait être dû à la séquestration de magnésium par les tumeurs (14).

4.2.4 Calcium

Enfin, le métabolisme du calcium est complexe. Les explications de ses variations ainsi que les publications tendant à leur donner un sens en pathologie sont nombreuses. Des tendances observées dans nos résultats pourraient être corrélées à l'expression de certaines protéines de liaison au calcium (12).

La diminution du calcium, au niveau tumoral et péri-tumoral droit du carcinome épidermoïde et dans sa périphérie, pourrait être expliquée par son métabolisme. En effet, il a été démontré que les cellules les plus indifférenciées des carcinomes épidermoïdes expriment plus faiblement la protéine S100A2 (protéine de liaison au calcium) que les cellules normales (65).

On peut également se demander si cet aspect pourrait être corrélé à l'expression des E-cadhérines. Celle-ci est réduite à la surface cellulaire de nombreuses cellules tumorales et pourrait être un facteur pronostic important dans la progression tumorale et les métastases (66,67). Les E-cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires qui médient l'interaction calcium-dépendante entre les cellules et l'adhésion au niveau des desmosomes. Dans les tissus, les cellules inhibent leur propre croissance en interagissant les unes avec les autres et ceci grâce à la présence des cadhérines qui sont responsables de ce phénomène d'inhibition de contact.

4.2.5 Perspectives

Cette méthode ouvre la voie à de nouveaux projets de recherche sur les différents tissus humains et pourrait potentiellement devenir une nouvelle technique d'aide au diagnostic, par exemple :

- pour les pathologies pulmonaires par exposition professionnelle comme la silicose (silicium) ou la béryllose (béryllium).
- pour la mise en évidence de cuivre dans une maladie de Wilson, et l'exploration des autres pathologies à expression hépatique comme l'hémochromatose.
- pour identifier un élément chimique dans un granulome, tel que l'aluminium.
- pour caractériser un élément dans un ganglion lymphatique ou une autre structure histologique, comme du pigment de tatouage ou du titane provenant d'une prothèse.
- pour explorer des pathologies « inflammatoires » en dermatologie (lichen, lupus, eczéma, psoriasis...).

La recherche fondamentale par cartographie grâce à la technique LIBS pourrait également déboucher sur des stratégies de chélations ou de supplémentation de certains éléments en fonction de leur présence ou de leur absence.

5 CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Marion SABATIER-VINCENT

Titre : Cartographie multi-élémentaire de peaux saines et de tumeurs cutanées humaines par technologie LIBS : comparaison à l'histologie standard.

Les éléments chimiques sont constitutionnels de l'être vivant mais sont relativement peu explorés en Médecine. La cartographie multi-élémentaire des tissus biologiques par la technique LIBS (technique d'imagerie élémentaire de spectrométrie sur plasma induit par laser) est une approche innovante récemment développée par une équipe française.

Cette méthode d'analyse tissulaire permet d'obtenir des informations complémentaires à l'analyse histologique. Nous avons cherché à identifier la présence des différents éléments dans les tissus cutanés humains. Quatorze échantillons comportant de la peau saine et des tumeurs cutanées ont été analysés. Ensuite, 105 cartographies LIBS ont été éditées puis comparées à l'analyse histologique standard. Ce travail exploratoire s'intégrait dans un projet de recherche translationnel sur les pathologies cutanées tumorales financé par l'INSERM dans le cadre du plan cancer.

Le but et l'originalité de ce travail consistaient à effectuer la première description de la composition en éléments de la peau saine et de tumeurs cutanées chez l'Homme.
Nous avons montré que la peau histologiquement normale et les tumeurs cutanées étudiées sont principalement composées de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc. La localisation et l'intensité des éléments retrouvés ont permis de différencier les principales structures qui composent la peau.

Dans le domaine du mélanome, nos résultats confortent certaines données de la littérature. Nous avons détecté un profil multi-élémentaire commun à deux métastases sous-cutanées de mélanome. De plus, nous avons mis en évidence la présence de cuivre dans l'environnement d'une métastase de mélanome muté BRAF.
Concernant les carcinomes de Merkel, nous avons trouvé du magnésium, avec un gradient d'intensité au sein de la tumeur. La diminution voire l'absence de magnésium dans le stroma péri-tumoral constitue une découverte surprenante encore non décrite dans la littérature.

Notre étude aura permis de faire les premières cartographies chimiques de peaux saine et tumorale, validant ainsi la faisabilité et l'intérêt de cette technologie pour caractériser des tissus biologiques, tout en en précisant les limites.
D'autres cohortes complémentaires plus importantes vont être analysées afin de confirmer ces résultats.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses :
Tout d'abord, la technique LIBS comme méthode de cartographie multi-élémentaire des tissus humains semble avoir sa place en Médecine. La possibilité d'utiliser cet outil de haute technologie sur des échantillons inclus en paraffine est un avantage majeur, étant donné que c'est le mode de conservation de la plupart des banques de tissus.
En effet, l'imagerie multi-élémentaire possède de nombreuses applications, notamment pour l'étude des maladies de surcharges endogènes ou exogènes, des pathologies granulomateuses et des expositions professionnelles et environnementales à des agents pathogènes toxiques (poussières, métaux, etc...).
De plus, la présence de signatures multi-élémentaires, identifiées sur de larges cohortes pourrait potentiellement constituer une aide à l'identification et à la stadification pour les pathologistes notamment dans le cas des pathologies tumorales.
Par ailleurs, la présence ou l'absence de certains éléments dans des structures ou tissus pathologiques serviront de base à des investigations plus fondamentales afin de comprendre les processus physiologiques et/ou pathologiques responsables de ces profils. Il serait par exemple intéressant de pouvoir anticiper des zones de récidives des tumeurs, avant l'apparition histologique de la prolifération tumorale.
Enfin, la présence ou l'absence d'éléments tels le cuivre ou le magnésium dans certains échantillons pathologiques pourraient conduire à de nouvelles approches thérapeutiques de type chélation ou supplémentation, en association aux thérapeutiques usuelles.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le 12/04/16

LE DOYEN

Pour la Présidente
et par délégation
Le Doyen de Médecine
Pr. Jean-Paul ROMANET

J.P. ROMANET

LE PRESIDENT DE LA THESE

PROFESSEUR MT. LECCIA

6 BIBLIOGRAPHIE

1. McQuarrie CH, McQuarrie DA, Rock PA. Chimie générale. Bruxelles: De Boeck Université; 1992.
2. Santelli M. Chimie bioorganique. 2nd édition. Médecine sciences publications ; 2012. 367 p.
3. Heath JW. Atlas d'histologie fonctionnelle de Wheater. Bruxelles: De Boeck; 2008.
4. Collège des enseignants de nutrition (France), Bertin É, Boirie Y, Schneider S. Nutrition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2014.
5. Delattre J, Durand G, Jardillier J-C. Biochimie pathologique: aspects moléculaires et cellulaires. Paris: Flammarion médecine-sciences; 2003.
6. Murray RK, Harper HA. Biochimie de Harper. Bruxelles: De Boeck; 2011.
7. Horn F. Biochimie humaine. Paris: Flammarion médecine-sciences; 2005.
8. Becker JS, Matusch A, Wu B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements - recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review. Anal Chim Acta. 4 juill 2014;835:1-18.
9. Sabine Becker J, Matusch A, Palm C, Salber D, Morton KA, Susanne Becker J. Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. Metallomics. 2010;2(2):104-11.
10. Becker JS, Zoriy M, Becker JS, Dobrowolska J, Matusch A. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2007;22(7):736.
11. Polefka TG, Bianchini RJ, Shapiro S. Interaction of mineral salts with the skin: a literature survey. International Journal of Cosmetic Science. oct 2012;34(5):416-23.
12. Lansdown ABG. Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. Wound Repair Regen. oct 2002;10(5):271-85.
13. Adhikari S, Toretsky JA, Yuan L, Roy R. Magnesium, essential for base excision repair enzymes, inhibits substrate binding of N-methylpurine-DNA glycosylase. J Biol Chem. 6 oct 2006;281(40):29525-32.
14. Castiglioni S, Maier JAM. Magnesium and cancer: a dangerous liaison. Magnes Res. sept 2011;24(3):S92-100.
15. MacDonald G, Nalvarte I, Smirnova T, Vecchi M, Aceto N, Dolemeyer A, *et al.* Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis. Sci Signal. 2014;7(329):ra56.
16. Zatta P, Frank A. Copper deficiency and neurological disorders in man and animals. Brain Research Reviews. avr 2007;54(1):19-33.
17. Bissett DL, McBride JF. Iron content of human epidermis from sun-exposed and non-exposed body sites. J Soc Cosmet Chem. 1992;(43):215-7.
18. Savignac M, Edir A, Simon M, Hovnanian A. Darier disease : a disease model of impaired calcium homeostasis in the skin. Biochim Biophys Acta. mai 2011;1813(5):1111-7.
19. Saurat J-H, Lachapelle J-M, Lipsker D, Thomas L. Dermatologie et infections sexuellement transmissibles. Masson; 2009. 1176 p.
20. Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael DJ, Ruben B, *et al.* Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. J Am Acad Dermatol. janv 2007;56(1):116-24.
21. Langeron M. Précis de microscopie. Masson; 1934.
22. Locquin M, Langeron M. Manuel de microscopie. Masson; 1978.
23. Chao W, Harteneck BD, Liddle JA, Anderson EH, Attwood DT. Soft X-ray microscopy at a spatial resolution better than 15 nm. Nature. 30 juin 2005;435(7046):1210-3.

24. Pascolo L, Gianoncelli A, Schneider G, Salomé M, Schneider M, Calligaro C, *et al.* The interaction of asbestos and iron in lung tissue revealed by synchrotron-based scanning X-ray microscopy. Sci Rep. 2013;3:1123.

25. Sakdinawat A, Attwood D. Nanoscale X-ray imaging. Nature Photonics. déc 2010;4(12):840-8.

26. Kraft ML, Klitzing HA. Imaging lipids with secondary ion mass spectrometry. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids. août 2014;1841(8):1108-19.

27. Becker JS, Zoriy M, Matusch A, Wu B, Salber D, Palm C, *et al.* Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). Mass Spectrometry Reviews. 2009;n/a - n/a.

28. Becker JS, Zoriy MV, Dehnhardt M, Pickhardt C, Zilles K. Copper, zinc, phosphorus and sulfur distribution in thin section of rat brain tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: possibility for small-size tumor analysis. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. 2005;20(9):912.

29. El-Hussein A, Kassem AK, Ismail H, Harith MA. Exploiting LIBS as a spectrochemical analytical technique in diagnosis of some types of human malignancies. Talanta. 15 juill 2010;82(2):495-501.

30. Kumar A, Yueh F-Y, Singh JP, Burgess S. Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy. Appl Opt. 1 oct 2004;43(28):5399-403.

31. Gorodetsky R, Sheskin J, Weinreb A. Iron, copper, and zinc concentrations in normal skin and in various nonmalignant and malignant lesions. Int J Dermatol. sept 1986;25(7):440-5.

32. Tasaki M, Hanada K, Hashimoto I. Analyses of serum copper and zinc levels and copper/zinc ratios in skin diseases. J Dermatol. janv 1993;20(1):21-4.

33. Sun Q, Tran M, Smith BW, Winefordner JD. Zinc analysis in human skin by laser induced-breakdown spectroscopy. Talanta. 21 juin 2000;52(2):293-300.

34. Han JH, Moon Y, Lee JJ, Choi S, Kim Y-C, Jeong S. Differentiation of cutaneous melanoma from surrounding skin using laser-induced breakdown spectroscopy. Biomed Opt Express. 1 janv 2016;7(1):57-66.

35. Gaudiuso R, Dell'Aglio M, De Pascale O, Senesi GS, De Giacomo A. Laser induced breakdown spectroscopy for elemental analysis in environmental, cultural heritage and space applications: a review of methods and results. Sensors (Basel). 2010;10(8):7434-68.

36. Rai NK, Rai AK. LIBS-an efficient approach for the determination of Cr in industrial wastewater. J Hazard Mater. 11 févr 2008;150(3):835-8.

37. Baudelet M, Yu J, Bossu M, Jovelet J, Wolf J-P, Amodeo T, *et al.* Discrimination of microbiological samples using femtosecond laser-induced breakdown spectroscopy. Applied Physics Letters. 2006;89(16):163903.

38. ExoMars [Internet]. Disponible sur: http://www.esa.int/esapub/bulletin/bulletin126/bul126c_vago.pdf

39. Motto-Ros V, Sancey L, Ma QL, Lux F, Bai XS, Wang XC, *et al.* Mapping of native inorganic elements and injected nanoparticles in a biological organ with laser-induced plasma. Applied Physics Letters. 2012;101(22):223702.

40. Motto-Ros V, Sancey L, Wang XC, Ma QL, Lux F, Bai XS, *et al.* Mapping nanoparticles injected into a biological tissue using laser-induced breakdown spectroscopy. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. sept 2013;87:168-74.

41. Sancey L, Motto-Ros V, Kotb S, Wang X, Lux F, Panczer G, *et al.* Laser-induced Breakdown Spectroscopy: A New Approach for Nanoparticle's Mapping and Quantification in Organ Tissue. Journal of Visualized Experiments [Internet]. 18 juin 2014 [cité 29 févr 2016];(88). Disponible sur: http://www.jove.com/video/51353/laser-induced-breakdown-spectroscopy-new-approach-for-nanoparticle-s

42. Sancey L, Motto-Ros V, Busser B, Kotb S, Benoit JM, Piednoir A, *et al.* Laser spectrometry for multi-elemental imaging of biological tissues. Scientific Reports. 14 août 2014;4:6065.

43. Mayer JE, Swetter SM, Fu T, Geller AC. Screening, early detection, education, and trends for melanoma: current status (2007-2013) and future directions: Part I. Epidemiology, high-risk groups, clinical strategies, and diagnostic technology. J Am Acad Dermatol. oct 2014;71(4):599.e1-599.e12; quiz 610, 599.e12.

44. Skin cancers [Internet]. Disponible sur: http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html

45. Cancer Facts [Internet]. Disponible sur: http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf

46. Incidence nationale du mélanome cutané [Internet]. Disponible sur: http://lesdonnees.e-cancer.fr/lesfiches-de-synthese/29-incidence-mortalite/37-melanomes-cutanes/50-epidemiologie-du-melanome-cutane-en-france-metropolitaine-incidence.html

47. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. CA Cancer J Clin. août 2012;62(4):220-41.

48. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, *et al.* Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. Lancet Oncol. mars 2014;15(3):323-32.

49. Almahroos M, Kurban AK. Ultraviolet carcinogenesis in nonmelanoma skin cancer. Part I: incidence rates in relation to geographic locations and in migrant populations. Skinmed. févr 2004;3(1):29-35; quiz 35-6.

50. Cedef. Item 299 – UE 9 – Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie. juin 2015;142:S201-24.

51. Albores-Saavedra J, Batich K, Chable-Montero F, Sagy N, Schwartz AM, Henson DE. Merkel cell carcinoma demographics, morphology, and survival based on 3870 cases: a population based study. J Cutan Pathol. janv 2010;37(1):20-7.

52. 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. 30 juin 2011;364(26):2507-16.

53. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. N Engl J Med. 1 janv 2015;372(1):30-9.

54. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. N Engl J Med. 22 janv 2015;372(4):320-30.

55. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob J-J, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, *et al.* Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): a randomised, double-blind, phase 3 trial. Lancet Oncol. mai 2015;16(5):522-30.

56. Maio M, Grob J-J, Aamdal S, Bondarenko I, Robert C, Thomas L, *et al.* Five-year survival rates for treatment-naive patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial. J Clin Oncol. 1 avr 2015;33(10):1191-6.

57. Ally MS, Aasi S, Wysong A, Teng C, Anderson E, Bailey-Healy I, *et al.* An investigator-initiated open-label clinical trial of vismodegib as a neoadjuvant to surgery for high-risk basal cell carcinoma. J Am Acad Dermatol. nov 2014;71(5):904-11.e1.

58. Chang ALS, Solomon JA, Hainsworth JD, Goldberg L, McKenna E, Day B, *et al.* Expanded access study of patients with advanced basal cell carcinoma treated with the Hedgehog pathway inhibitor, vismodegib. J Am Acad Dermatol. janv 2014;70(1):60-9.

59. AAP- « Physique Cancer / Physics Cancer » 2015.

60. Hare D, Burger F, Austin C, Fryer F, Grimm R, Reedy B, *et al.* Elemental bio-imaging of melanoma in lymph node biopsies. Analyst. mars 2009;134(3):450-3.

61. Brady DC, Crowe MS, Turski ML, Hobbs GA, Yao X, Chaikuad A, *et al.* Copper is required for oncogenic BRAF signalling and tumorigenesis. Nature. 9 avr 2014;509(7501):492-6.

62. Killilea DW, Ames BN. Magnesium deficiency accelerates cellular senescence in cultured human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 15 avr 2008;105(15):5768-73.

63. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? Nat Rev Cancer. mai 2003;3(5):339-49.

64. Sartori S, Nielsen I, Tassinari D, Mazzotta D, Vecchiatti G, Sero A, *et al.* Serum and erythrocyte magnesium concentrations in solid tumours: relationship with stage of malignancy. Magnes Res. sept 1992;5(3):189-92.

65. Nagy N, Brenner C, Markadieu N, Chaboteaux C, Camby I, Schäfer BW, *et al.* S100A2, a putative tumor suppressor gene, regulates in vitro squamous cell carcinoma migration. Lab Invest. avr 2001;81(4):599-612.

66. Shiozaki H, Oka H, Inoue M, Tamura S, Monden M. E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. Cancer. 15 avr 1996;77(8 Suppl):1605-13.

67. Wu H, Lotan R, Menter D, Lippman SM, Xu XC. Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. Anticancer Res. juin 2000;20(3A):1385-90.

68. Structure de la peau et de ses annexes. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie. nov 2005;132(11):33-46.

69. Boccara O, Girard C, Mortier L, Bens G, Saiag P, Guillot B. Recommandations du groupe de cancérologie cutanée de la Société française de dermatologie pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique du carcinome à cellules de Merkel. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie Volume 138, Issues 6–7, June–July 2011, Pages 475–482;

70. Lebbe C, Becker JC, Grob J-J, Malvehy J, del Marmol V, Pehamberger H, *et al.* Diagnosis and treatment of Merkel Cell Carcinoma. European consensus-based interdisciplinary guideline. European Journal of Cancer. nov 2015;51(16):2396-403.

71. Charles J, Martel C, de Fraipont F, Leccia M-T, Robert C, Busser B. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie. nov 2014;141(11):671-81.

7 ANNEXES

7.1 ANNEXE 1 : PRINCIPES DE L'ANALYSE ANATOMO-PATHOLOGIQUE

Pour permettre l'analyse des tissus biologiques au microscope optique, il est nécessaire de suivre plusieurs étapes :

Examen macroscopique : Le prélèvement est reçu soit à l'état frais, soit dans un milieu fixateur. S'il s'agit d'une pièce opératoire, un schéma est réalisé puis la pièce est mesurée et décrite. La pièce est parfois orientée par un fil. L'application d'encre sur les bords latéraux et la profondeur du prélèvement avant la coupe permet de conserver des repères après l'ablation du fil. L'encrage est une procédure habituelle (figure 24) pour les analyses en dermatologie mais est utilisé également dans d'autres disciplines .

Fixation en formol ou en AFA (Alcool Formol Acide Acétique) : La fixation permet la conservation des pièces en limitant l'auto-dégénérescence du tissu. Elle doit donc être réalisée rapidement après le prélèvement, afin de limiter le temps d'ischémie froide. Il s'agit du temps écoulé entre le moment du prélèvement tissulaire et le moment où il est mis dans le fixateur. On recommande un volume de fixateur dix fois supérieur au volume de la pièce. La durée de fixation varie en fonction du volume du prélèvement. Le fixateur recommandé est le formol neutre tamponné à 10%.

La pièce est échantillonnée sous contrôle macroscopique avec selon le cas une sélection des zones d'intérêt. La coupe est réalisée au scalpel avant la mise en cassette. Chaque cassette réalisée correspondra à un bloc de paraffine (figure 25).

Inclusion en paraffine : Elle a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Dans les laboratoires d'anatomopathologie, le milieu d'inclusion universellement utilisé pour l'analyse en microscopie optique est la paraffine. La paraffine étant hydrophobe, une étape de déshydratation par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains de toluène est nécessaire. Ensuite, la paraffine fondue est coulée dans un moule en présence du prélèvement. Après refroidissement, un bloc de paraffine solide est obtenu, à l'intérieur duquel se trouve l'échantillon prélevé. Cela correspond à l'inclusion en paraffine.

Coupe : Les coupes du bloc en paraffine sont réalisées avec un microtome. Il s'agit d'un appareil permettant de réaliser des tranches de section fines, de 2 à 5 micromètres d'épaisseur. Les coupes sont ensuite recueillies sur une lame de verre.

Colorations : Des colorations standards et immunohistochimiques sont réalisées sur coupes afin d'accentuer les contrastes et affiner le diagnostic. Les colorants étant en solution aqueuse, il faut d'abord déparaffiner les coupes par la chaleur et des bains de toluène, puis réhydrater les coupes en les immergeant dans des bains d'alcool de degré décroissant et enfin dans de l'eau distillée.

Un colorant couramment utilisé est la coloration HES : Hématoxyline-Eosine-Safran : l'hématoxyline colore les structures acides en bleu violacé. Les noyaux, les ribosomes et le réticulum endoplasmique ont une forte affinité pour ce colorant en raison de leurs richesses respectives en ADN et en ARN. L'éosine colore les structures basiques en rouge ou en rose. Ainsi, le cytoplasme des cellules est habituellement coloré en rose. Le safran colore les fibres de collagène en jaune-orangé.

Montage : En dernier lieu intervient le montage, consistant à ajouter une lamelle sur la lame, fixée avec une résine synthétique dont l'indice de réfraction est proche de celui du verre. Ainsi, la « lame » finale obtenue est prête à être observée au microscope.

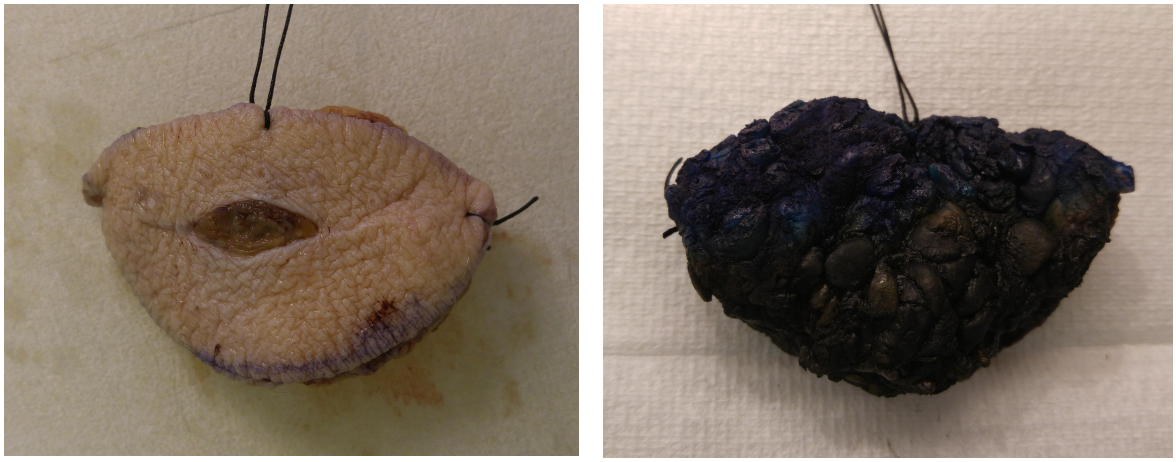


Fig. 24 : photographie d'une pièce non encrée (à gauche) puis encrée sur les bords latéraux et la profondeur (à droite).

Fig. 25 : photographie d'une pièce après échantillonnage (à gauche) puis mise en cassettes (à droite).

7.2 ANNEXE 2 : HISTOLOGIE CUTANÉE : GÉNÉRALITÉS

La structure de la peau (68) se divise en 4 régions superposées qui sont de la superficie vers la profondeur (figure 26 et 27) :

- Épiderme
- Jonction dermo-épidermique
- Derme
- Hypoderme

L'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié :

- Les kératinocytes représentent 80% de l'ensemble des cellules de l'épiderme.
- Les 20% d'autres cellules composant l'épiderme sont dispersées entre les kératinocytes. Elles sont mal vues sur les préparations histologiques standard : il s'agit des mélanocytes, des cellules immunocompétentes (cellules de Langerhans et lymphocytes) et des cellules de Merkel.

Le derme et l'hypoderme sont des tissus conjonctifs richement vascularisés :

- Le derme est constitué de fibres de collagène et de fibres élastiques ainsi que des fibroblastes.
- L'hypoderme est constitué de tissu adipeux compartimenté par des expansions de collagène d'origine dermique.

Les annexes de la peau sont d'origine épidermique et sont situées dans le derme et l'hypoderme : il s'agit des follicules pilo-sébacés et des glandes sudorales.

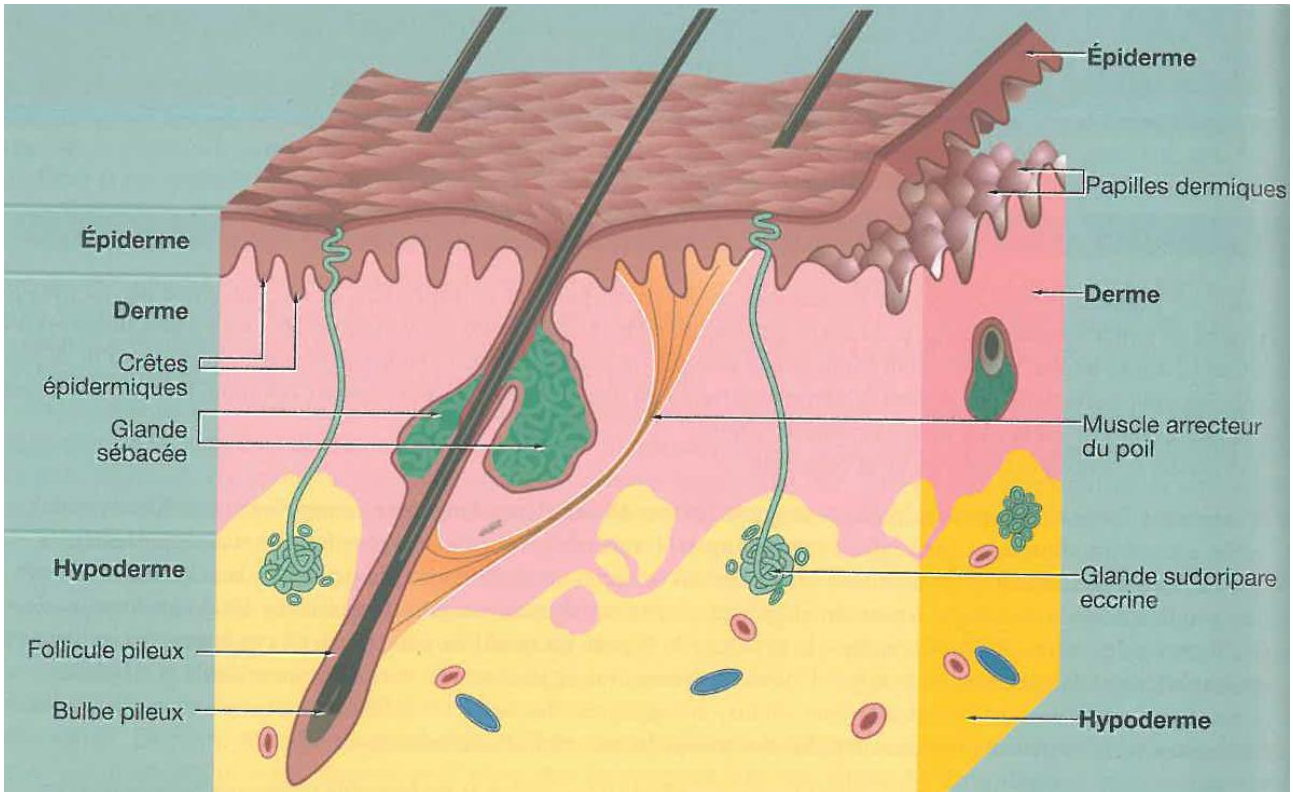


Fig.26 : architecture générale de la peau : représentation schématique (3).

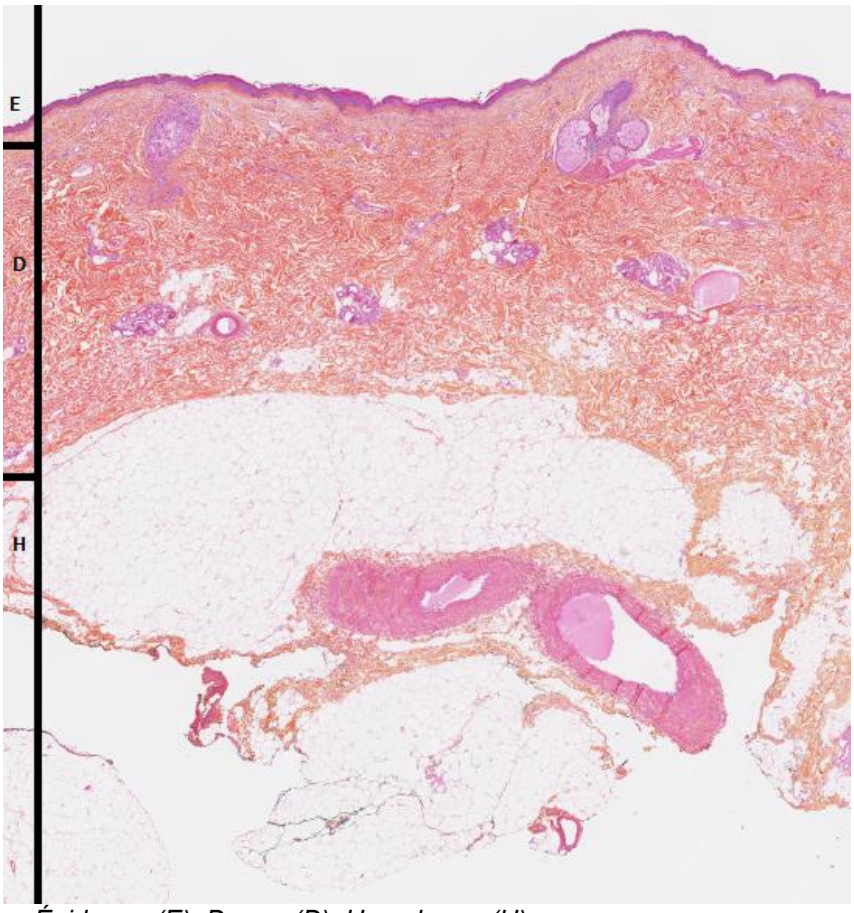


Fig.27 : peau saine : Épiderme (E), Derme (D), Hypoderme (H).

7.3 ANNEXE 3 : RAPPELS SUR LE MÉLANOME

Les principaux sous types de mélanome (figure 28) sont les suivants :

- Mélanome superficiel extensif
- Mélanome lentigineux (Dubreuilh)
- Mélanome acral lentigineux
- Mélanome lentigineux des muqueuses
- Mélanome nodulaire d'emblée

L'histogénèse du mélanome est classiquement décrite en 2 phases : une phase de croissance horizontale intra-épidermique (hormis pour le mélanome nodulaire d'emblée), et une phase de croissance verticale avec franchissement de la membrane basale et invasion du derme voire de l'hypoderme. La prolifération cellulaire est composée de mélanocytes disposés en thèques irrégulières, avec, lors de l'envahissement, une migration des cellules de façon isolée et anarchique.

La composante épidermique est lentigineuse, thécale et/ou pagétoïde. Cette composante est absente dans les mélanomes nodulaires. La composante lentigineuse évocatrice d'une lésion maligne est le plus souvent asymétrique, à limites latérales floues, désordonnée, avec migrations pagétoïdes et des atypies cytologiques diffuses.

La composante thécale suspecte est composée de thèques horizontales, irrégulières en taille et en forme avec présence de grandes thèques, confluentes et fusionnantes en « pont », localisées à l'extrémité des bourgeons épidermiques inter-papillaires.

La migration pagétoïde est évocatrice de malignité lorsqu'elle est diffuse et intense, avec une extension latérale et des atypies cytologiques franches.

La composante dermique est suspecte quand elle est asymétrique, comblant les papilles dermiques, avec formation de plages cohésives de cytologie homogène et l'absence de gradient cytologique de maturation.

Des remaniements inflammatoires peuvent survenir avec régression du mélanome. La régression est un processus inflammatoire dans lequel les mélanocytes sont détruits et qui peut atteindre toute la tumeur (régression totale) ou seulement une partie (régression partielle). Quand la régression est totale, on observe une plage de fibrose pseudo-cicatricielle éventuellement associée à des mélanophages. La régression peut entraîner de faux « bons pronostics » en modifiant l'épaisseur et le niveau. Il faut noter que lorsqu'il s'agit d'un mélanome sur nævus, la régression respecte le nævus préexistant.

Dans ces lésions malignes, l'analyse cytologique épidermique et dermique retrouve un pléomorphisme cellulaire, ou bien un monomorphisme surtout dans la composante dermique. Il existe des atypies nucléaires et une disparition du gradient de maturation cytologique. On note également des mitoses en profondeur.

L'analyse immuno-histochimique repose sur les marqueurs suivants :

- Protéine S100 : la plus efficace car la plus sensible (98%) mais peu spécifique (elle marque aussi les cellules nerveuses, les adipocytes, les cellules de Langerhans, les carcinomes mammaires et les glandes sudorales).
- HMB45 : moins sensible (30%) mais plus spécifique (les diagnostics différentiels sont rares : PECome/angiomyolipome…)
- MelanA : la sensibilité est intermédiaire entre PS100 et HMB45, la spécificité est identique à HMB45.
- MITF (Microphtalmia transcription factor) : il joue un rôle clé dans le développement embryonnaire du mélanocyte et dans la régulation du gène de la tyrosinase. Sa sensibilité est proche de HMB45 et de MelanA.
- Tyrosinase
- MAGE (melanoma antigen encoding gene)

Ces marqueurs ne sont pas tous effectués en routine. Les principaux utilisés sont PS100, HMB45, Tyrosinase et Mélan-A.

Les indications de l'analyse immunohistochimique sont limitées : celle-ci est nécessaire en cas de tumeur de nature mélanique équivoque et les lésions mélaniques occultes en coloration standard (ganglion sentinelle). Elle est également utile pour l'évaluation de l'extension d'une lésion et la distinction bénin/malin des lésions épaisses (HMB45 et Ki-67).

L'analyse histologique permet de déterminer les paramètres histopronostiques (Figure 29) :

- Indice de Breslow : il s'agit de l'épaisseur tumorale maximale mesurée, de la couche granuleuse à la cellule tumorale la plus profonde. Un indice de Breslow supérieur à 1mm est de moins bon pronostic.
- Ulcération
- Index mitotique : il s'agit du nombre de mitoses/mm2.
- Niveau de Clark : il s'agit du niveau anatomique d'invasion dans le derme et l'hypoderme. Ce paramètre est actuellement moins utilisé.
- Emboles vasculaires
- Neurotropisme

Fig.28: mélanome SSM (à gauche), de Dubreuilh (au centre(19)), nodulaire (à droite).

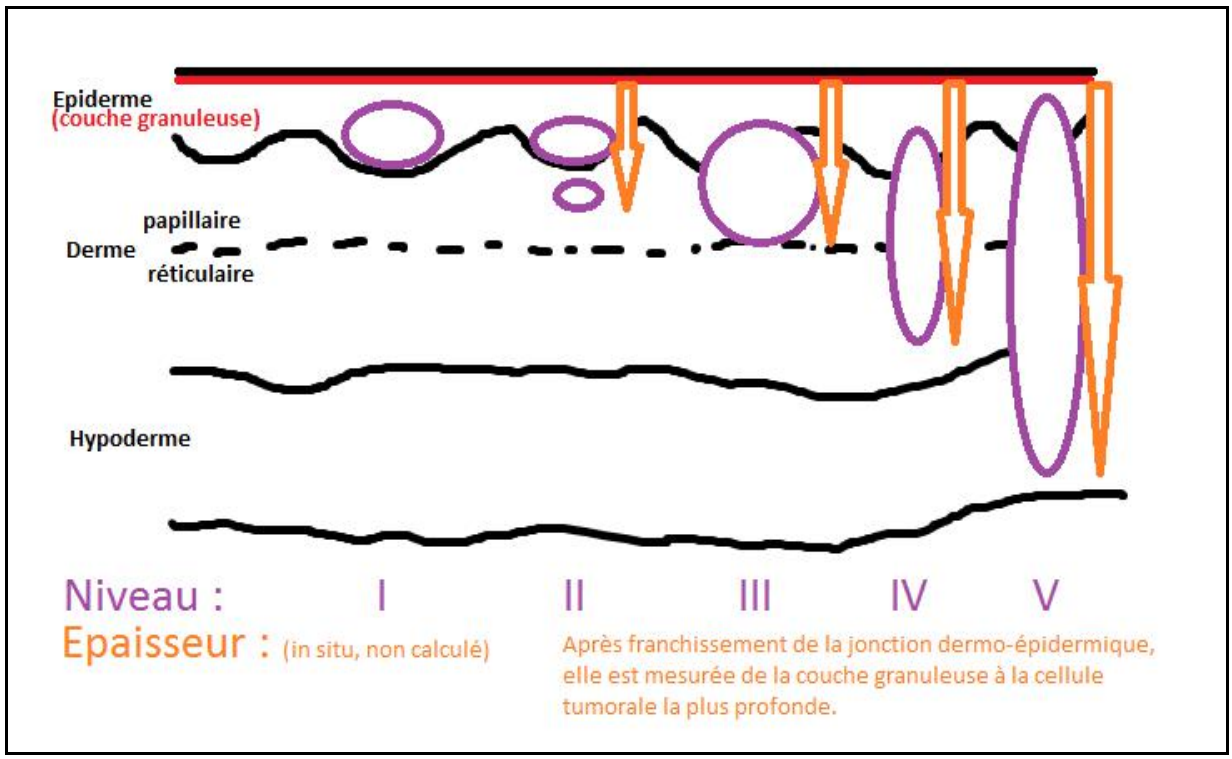


Fig.29: représentation schématique du niveau (Clark) et de l'épaisseur (Breslow) selon l'architecture du mélanome décrit (représenté à différents stades par les figures ovales en violet).

Stades	Critères
Stade 0	Tumeur *in situ*
Stade IA	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, sans ulcération et mitoses < 1/mm^2 (pT1a), N0, M0
Stade IB	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, avec ulcération et/ou mitoses ≥ 1/mm^2 (pT1b), N0, M0 Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a), N0, M0
Stade IIA	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b), N0, M0 Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a), N0, M0
Stade IIB	Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b), N0, M0 Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0
Stade IIC	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
Stade IIIA	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0
Stade IIIB	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0 Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0
Stade IIIC	Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0 Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3), M0
Stade IV	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

[18] Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification, Journal of Clinical Oncology, Vol 27, number 36, december 2009

Tableau 4 :classification pTNM de l'UICC et de l'AJCC : mélanome

7.4 ANNEXE 4 : RAPPELS SUR LE CARCINOME DE MERKEL

La tumeur de Merkel (69,70) forme le plus souvent un nodule unique rouge violacé de 2 cm de diamètre en moyenne, au maximum de 20cm, parfois ulcéré, et de croissance rapide en quelques semaines ou quelques mois (figure 30).

A l'analyse histologique, il s'agit d'une prolifération tumorale intra-dermique séparée de l'épiderme. Elle est composée de cellules peu différenciées regroupées en travées, massifs ou plages peu cohésives mal délimitées et infiltrantes avec de fréquents embols endo-lymphatiques. Le cytoplasme des cellules tumorales est peu abondant, basophile ou éosinophile dense. Il existe une anisocytose avec de nombreuses mitoses. La chromatine est grossière et le nucléole est bien visible.

A l'analyse immunohistochimique :

- Les cellules tumorales expriment la Cytokératine 20. Le marquage cytoplasmique est caractéristique en mottes juxta-nucléaires dit « polaire » dans 90% des cas.
- Les pan-cytokératines AE1-AE3 sont positives dans 100% des cas.
- Les autres anticorps positifs sont : EMA (antigène membranaire épithélial) (85%), la chromogranine B (100%) et la chromogranine A (70%), la synaptophysine (35%), la NSE (non specific enolase) (85%).
- Les cellules tumorales n'expriment jamais la Cytokératine 7, TTF1, PS100, HMB45.

Fig.30 : tumeur de Merkel jugale gauche.

Tableau 1 Classification AJCC 2010 (American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010. p. 318—9).

T	N	M
Tx : tumeur primitive non évaluable T0 : pas de tumeur primitive Tis : tumeur primitive in situ T1 : tumeur primitive ≤ 2 cm T2 : tumeur primitive > 2 cm mais ≤ 5 cm T3 : tumeur primitive > 5 cm T4 : tumeur primitive envahissant l'os/muscle/fascia/cartilage	Nx : ganglions de drainage non évaluables N0 : pas de métastase ganglionnaire régionale cN0 : ganglions non palpables cliniquement[a] cN1 : ganglions cliniquement palpables[a] pN0 : ganglions histologiquement négatifs pNx : ganglions non évalués histologiquement N1a : micrométastases[b] N1b : macrométastases[c] N2 : métastases en transit[d]	Mx : métastases à distance non évaluables M0 : pas de métastases à distance M1 : métastases à distance[e] M1a : cutanées, des tissus mous ou ganglionnaires à distance M1b : pulmonaires M1c : autres métastases viscérales

Stade	Critères		
0	Tis	N0	M0
IA	T1	pN0	M0
IB	T1	cN0	M0
IIA	T2/T3	pN0	M0
IIB	T2/T3	cN0	M0
IIC	T4	N0	M0
IIIA	Tous T	N1a	M0
IIIB	Tous T	N1b/N2	M0
IV	Tous T	Tous N	M1

[a] N0 signifie absence d'atteinte ganglionnaire clinique et/ou histologique. Le ganglion pathologique clinique peut être détecté à l'inspection, à la palpation ou par un examen radiologique ; cN0 est utilisé uniquement pour les patients n'ayant pas eu de biopsie-exérèse ou curage ganglionnaire avec analyse histologique.
[b] Les micrométastases sont identifiées par la technique du ganglion sentinelle.
[c] Les macrométastases correspondent aux ganglions pathologiques cliniquement, dont la nature pathologique est confirmée histologiquement.
[d] Une métastase en transit est une tumeur distincte de la tumeur primitive et localisée soit entre la lésion primitive et le territoire ganglionnaire de drainage.
[e] M1 a-c sont inclus dans le même groupe parce qu'il n'existe pas actuellement de données en faveur de sous-groupes pronostiques en fonction de la localisation des métastases.

Tableau 5 : classification AJCC 2010 : carcinome à cellules de Merkel (69).

7.5 ANNEXE 5 : RAPPELS SUR LE CARCINOME ÉPIDERMOÏDE ET LE CARCINOME BASOCELLULAIRE

Le carcinome épidermoïde cutané et le carcinome basocellulaire sont des tumeurs épithéliales cutanées primitives.

Le carcinome épidermoïde se présente cliniquement comme une ulcération croûteuse, une plaque ou un papulo-nodule infiltré de taille variable, souvent ulcéro-bourgeonnant, d'apparition généralement progressive (figure 31). Il existe plusieurs sous-types histologiques. Le carcinome épidermoïde invasif est étudié ici.

A l'analyse histologique, il s'agit d'une prolifération de cellules malphigiennes atypiques, regroupées en amas et cordons irrégulièrement anastomosés et invasifs nés de l'épiderme qui est souvent épaissi, parakératosique et parfois ulcéré. La prolifération tumorale pénètre le derme voire les structures sous-jacentes et il peut exister des engainements péri-nerveux et des emboles vasculaires. Les cellules tumorales ont un large cytoplasme éosinophile avec une anisocaryose et des mitoses en nombre variable. Elles forment souvent des enroulements accompagnés de troubles de la kératinisation (cellules dyskératosiques, globes cornés). Le stroma de la tumeur contient habituellement un infiltrat lymphocytaire de densité variable.

Le carcinome basocellulaire correspond cliniquement à une papule ou un nodule translucide et télangiectasique, pouvant être ulcéré. La lésion élémentaire est communément appelée « papule perlée ». La lésion connaît une croissance progressive jusqu'à atteindre une taille variable.

Il existe plusieurs sous-types cliniques et histologiques. Le sous-type analysé dans notre étude est le carcinome basocellulaire nodulaire (figure 32).

Histologiquement, le carcinome basocellulaire nodulaire est défini par la présence, dans le derme, d'un ou de plusieurs massifs ou lobules larges et bien circonscrits.

La prolifération est constituée de cellules basaloïdes dont les noyaux prennent un agencement palissadique en périphérie. Des fentes de rétraction périphériques sont habituellement présentes, séparant les massifs et lobules tumoraux du stroma adjacent.

Fig.31 : carcinome épidermoïde.

Fig 32 : carcinome basocellulaire nodulaire (19).

7.6 ANNEXE 6 : PRINCIPALES VOIES DE SIGNALISATION INTERVENANT DANS LE MÉLANOCYTE

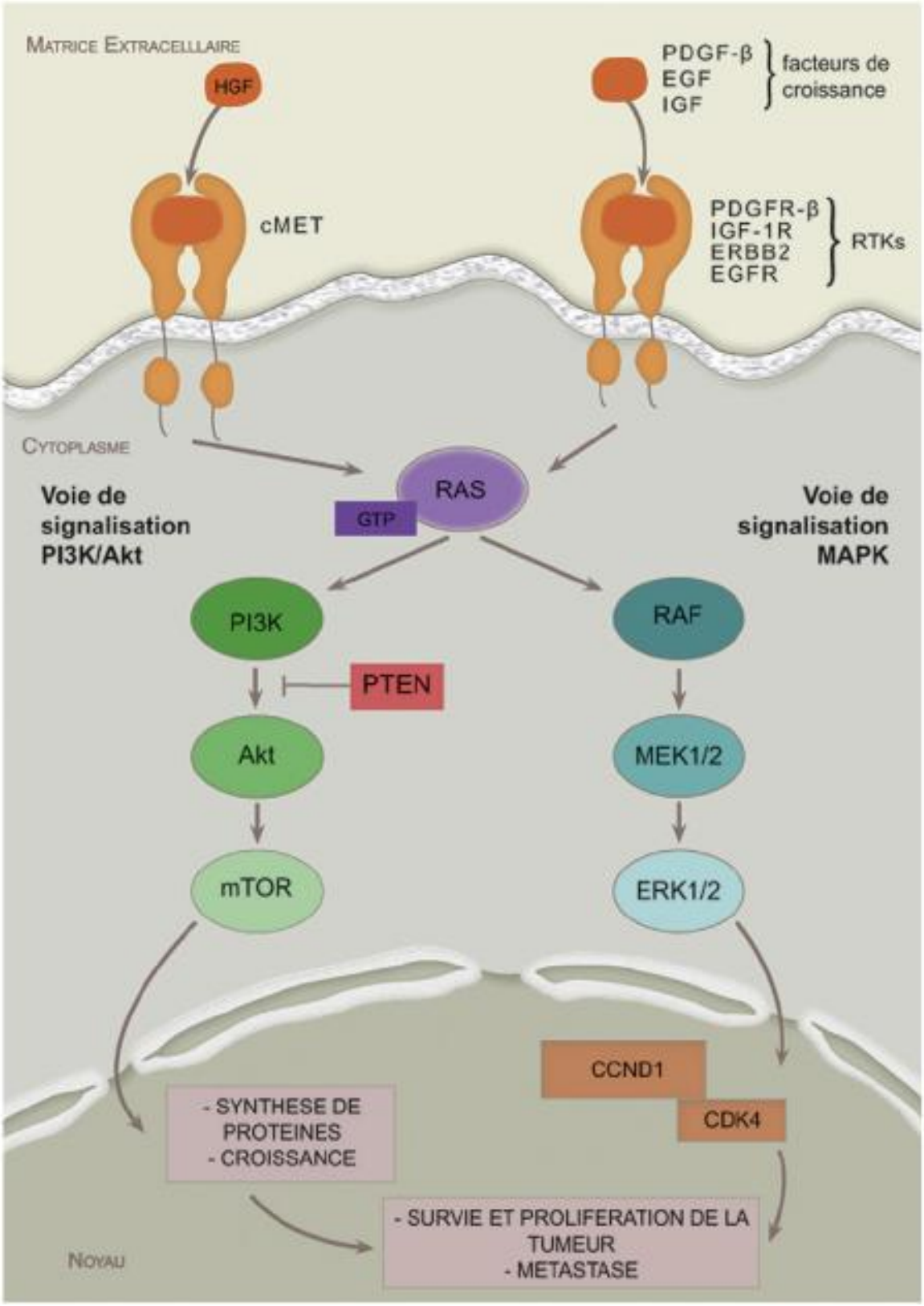
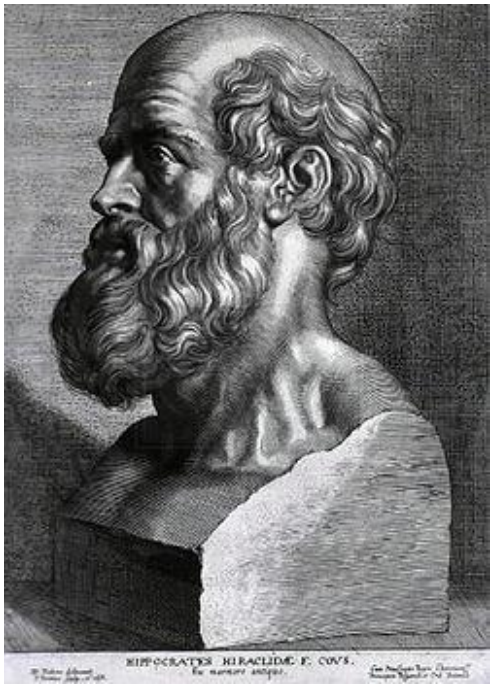


Fig.32 : principales voies de signalisation intervenant dans le mélanocyte normal ou malin : voie PI3K/AKT à gauche, voie des MAP Kinases à droite (71).

7.7 ANNEXE 7 : POPULATION SÉLECTIONNÉE EN VUE DU PROJET LAST

Pathologies	Sous-type	Nombre	Total (N=88)
Peau saine	Non encrée/Encre bleue/noire/verte	4/2/2/2	10
Mélanome primitif cutané	Nodulaire/SSM	3/3	6
Exérèse élargie négative (mélanome)			8
Curage négatif (mélanome)			4
Métastase ganglionnaire (mélanome)	Ganglion/Ganglion sentinelle	4/7	11
Métastase non ganglionnaire (mélanome)	Sous-cutanée/cérébrale/pulmonaire	8/1/1	10
Ganglion négatif (mélanome)	Ganglion/ganglion sentinelle	1/3	4
Tumeur de Merkel primitive			2
Métastase ganglionnaire (Merkel)			1
Ganglion négatif (Merkel)	Ganglion /ganglion sentinelle	1/1	2
Exérèse élargie négative (Merkel)			2
Carcinome basocellulaire	Polymorphe/superficiel	4/1	8
	Micro-nodulaire/nodulaire	1/2	
Carcinome épidermoïde	In situ/micro-invasif/infiltrant/kératoacanthome	2/3/3/1	9
Métastase non ganglionnaire (carcinome épidermoïde)	Sous-cutanée/cutanée	2/1	3
Métastase ganglionnaire (carcinome épidermoïde)			1
Exérèse élargie normale (carcinome épidermoïde)			2
Naevus	Composé/dermique/bleu	4/1/1	6



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

RESUME

Introduction :
Les éléments chimiques constitutionnels de l'être vivant sont relativement peu explorés en Médecine. L'analyse de la distribution des éléments chimiques pourrait permettre d'acquérir une meilleure compréhension des processus physiologiques et pathologiques. L'objectif de cette étude était d'identifier la composition chimique de la peau normale et de tumeurs cutanées grâce à la technique d'imagerie élémentaire de spectrométrie sur plasma induit par laser (LIBS), avec comparaison à l'histologie standard.

Matériels et méthodes :
Cette étude préliminaire rétrospective concernait des patients pris en charge au CHU de Grenoble. Les patients ayant bénéficié d'un prélèvement de peau saine ou d'une exérèse complète de tumeur cutanée de diagnostic certain et de présentation histologique typique ont été inclus (mélanome, métastase sous-cutanée de mélanome, tumeur à cellules de Merkel, carcinome épidermoïde, carcinome basocellulaire, nævus). Les comptes-rendus médicaux ont été étudiés pour recueillir les informations nécessaires à l'analyse. La cartographie LIBS a tout d'abord été réalisée, puis les images obtenues pour chaque élément chimique ont été comparées aux lames histologiques correspondantes. Au total, 14 échantillons ont été sélectionnés, et 105 cartographies mono-élémentaires LIBS ont été éditées.

Résultats :
La peau normale et les tumeurs cutanées sont toutes composées de calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc. L'intensité de ces éléments varie selon les structures histologiques.
Nous avons détecté un profil multi-élémentaire commun à deux métastases sous-cutanées de mélanome, BRAF muté et BRAF sauvage respectivement : les éléments calcium, sodium, phosphore, magnésium et zinc sont majoritaires dans les zones péri-tumorales par rapport aux zones intra-tumorales.
La présence de cuivre autour d'une métastase de mélanome muté BRAF a également été détectée.
Par ailleurs, nous avons trouvé du magnésium avec un gradient d'intensité dans une tumeur de Merkel. Dans le tissu adjacent il était diminué voire absent dans les 2 carcinomes de Merkel.

Conclusion :
La cartographie par technique LIBS est une méthode innovante et rapide à mettre en œuvre, complémentaire et compatible avec l'analyse histologique. Notre étude a permis de réaliser la première cartographie multi-élémentaire de tissus cutanés humains sains et tumoraux. Nous avons pu identifier des profils communs à certaines tumeurs. D'autres cohortes complémentaires plus importantes vont pouvoir être analysées afin de confirmer ces résultats.

Mots-clés : LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy), cartographie, multi-élémentaire, tumeurs cutanées, mélanome, carcinome de Merkel, cuivre, magnésium, BRAF.

ABSTRACT

Title : Multi-elemental imaging of human healthy and tumor skin by LIBS : comparison to standard histology

Introduction :
The chemical elements composing living organisms are poorly explored in Medicine.
The analysis of their distribution could be used to better understand the physiological and pathological processes. The objective of this study was to identify the chemical composition of normal skin and skin tumors through the elementary imaging technique "laser-induced breakdown spectroscopy" (LIBS), with comparison to standard histology.

Materials and Methods :
This retrospective preliminary study involved patients from Grenoble University Hospital. Patients who underwent a healthy skin sample excision or a complete excision of skin tumor were included, when their diagnosis was certain, and histologically typical (melanoma, subcutaneous metastatic melanoma, Merkel cell carcinoma, squamous cell carcinoma, basal cell carcinoma, nevi). Medical-records were studied to gather information needed for analysis. First, we performed the elemental maps with LIBS. Fourteen samples were selected, and 105 mono-elementary LIBS maps were edited then compared with standard histological analysis.

Results :
Normal skin and skin tumors were all composed of calcium, sodium, phosphorus, magnesium and zinc. The intensity of elements varied according to the histological structures.
We detected a multi-elemental pattern shared by to two metastases of subcutaneous melanoma, BRAF mutated and BRAF wild type respectively: the elements calcium, sodium, phosphorus, magnesium and zinc were mainly in peritumoral areas compared with intra-tumoral structures. The presence of copper in surrounding areas of a mutated BRAF melanoma metastasis was also detected.
We found magnesium with an intensity gradient in a Merkel cell carcinoma. It was reduced in the dermis and absent in the sub-cutaneous tissu of the 2 Merkel cell carcinomas.

Conclusion:
The elemental mapping with LIBS technology is an innovative and easy way to implement, complementary and compatible with histological analysis. Our study produced the first multi-elemental maps of tumors and healthy human skin tissues. We were able to identify common patterns in certain tumors. Other additional cohorts will be analyzed to confirm these results.

Key-words :
LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy), multi-elemental imaging, skin tumors, melanoma, Merkel cell carcinoma, copper, magnésium, BRAF.