



HAL
open science

Performances diagnostiques de l'immunohistochimie BRAF dans le mélanome

Elicia Molines

► **To cite this version:**

Elicia Molines. Performances diagnostiques de l'immunohistochimie BRAF dans le mélanome. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02922863

HAL Id: dumas-02922863

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02922863v1>

Submitted on 26 Aug 2020

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.



Faculté des sciences
médicales et paramédicales
Aix-Marseille Université

Performances diagnostiques de l'immunohistochimie BRAF dans le mélanome

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DES SCIENCES MÉDICALES ET PARAMÉDICALES

DE MARSEILLE

Le 21 Février 2020

Par Madame Elicia MOLINES

Née le 15 décembre 1991 à Narbonne (11)

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. d' ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

Membres du Jury de la Thèse :

Madame le Professeur FIGARELLA-BRANGER Dominique	Président
Monsieur le Professeur GROB Jean-Jacques	Assesseur
Monsieur le Professeur OUAFIK L'Houcine	Assesseur
Monsieur le Docteur (MCU-PH) MACAGNO Nicolas	Directeur

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

Président : Yvon BERLAND

FACULTE DES SCIENCES MEDICALES ET PARAMEDICALES

Doyen Georges LEONETTI

Vice-doyen aux Affaires Générales et aux Sciences Médicales : Patrick DESSI
Vice-doyen aux Sciences Paramédicales : Philippe BERBIS

Direction d'école :

- **Ecole de Médecine** : Jean-Michel VITON
- **Ecoles de Maïeutique** : Carole ZAKARIAN
- **Ecoles des Sciences de la Réadaptation** : Philippe SAUVAGEON
- **Ecoles des Sciences Infirmières** : Sébastien COLSON

Assesseurs :

- aux Etudes : Kathia CHAUMOITRE
- à la Recherche : Jean-Louis MEGE
- aux Prospectives Hospitalo-Universitaires : Frédéric COLLART
- aux Enseignements Hospitaliers : Patrick VILLANI
- à l'Unité Mixte de Formation Continue en Santé : Fabrice BARLESI
- pour le Secteur Nord : Stéphane BERDAH
- aux centres hospitaliers non universitaires : Jean-Noël ARGENSON

Chargés de mission :

- 1^{er} cycle : Jean-Marc DURAND et Marc BARTHET
- 2^{ème} cycle : Marie-Aleth RICHARD
- 3^{ème} cycle DES/DESC : Pierre-Edouard FOURNIER
- Licences-Masters-Doctorat : Pascal ADALIAN
- DU-DIU : Véronique VITTON
- Stages Hospitaliers : Franck THUNY
- Sciences Humaines et Sociales : Pierre LE COZ
- Préparation à l'ECN : Aurélie DAUMAS
- Démographie Médicale et Filiation : Roland SAMBUC
- Relations Internationales : Philippe PAROLA
- Etudiants : Arthur ESQUER

Chef des services généraux : Déborah ROCCHICCIOLI

Chefs de service :

- Communication : Laetitia DELOUIS
- Examens : Caroline MOUTTET
- Intérieur : Joëlle FAVREGA
- Maintenance : Philippe KOCK
- Scolarité : Christine GAUTHIER

DOYENS HONORAIRES

M. Yvon BERLAND
M. André ALI CHERIF
M. Jean-François PELLISSIER

PROFESSEURS HONORAIRES

MM	AGOSTINI Serge	MM	FAVRE Roger
	ALDIGHIERI René		FIECHI Marius
	ALESSANDRINI Pierre		FARNARIER Georges
	ALLIEZ Bernard		FIGARELLA Jacques
	AQUARON Robert		FONTES Michel
	ARGEME Maxime		FRANCOIS Georges
	ASSADOURIAN Robert		FUENTES Pierre
	AUFFRAY Jean-Pierre		GABRIEL Bernard
	AUTILLO-TOUATI Amapola		GALINIER Louis
	AZORIN Jean-Michel		GALLAIS Hervé
	BAILLE Yves		GAMERRE Marc
	BARDOT Jacques		GARCIN Michel
	BARDOT André		GARNIER Jean-Marc
	BERARD Pierre		GAUTHIER André
	BERGOIN Maurice		GERARD Raymond
	BERNARD Dominique		GEROLAMI-SANTANDREA André
	BERNARD Jean-Louis		GIUDICELLI Roger
	BERNARD Pierre-Marie		GIUDICELLI Sébastien
	BERTRAND Edmond		GOUDARD Alain
	BISSET Jean-Pierre		GOUIN François
	BLANC Bernard		GRILLO Jean-Marie
	BLANC Jean-Louis		GRISOLI François
	BOLLINI Gérard		GROULIER Pierre
	BONGRAND Pierre		HADIDA/SAYAG Jacqueline
	BONNEAU Henri		HASSOUN Jacques
	BONNOIT Jean		HEIM Marc
	BORY Michel		HOUEL Jean
	BOTTA Alain		HUGUET Jean-François
	BOURGEADE Augustin		JAQUET Philippe
	BOUVENOT Gilles		JAMMES Yves
	BOUYALA Jean-Marie		JOUVE Paulette
	BREMOND Georges		JUHAN Claude
	BRICOT René		JUIN Pierre
	BRUNET Christian		KAPHAN Gérard
	BUREAU Henri		KASBARIAN Michel
	CAMBOULIVES Jean		KLEISBAUER Jean-Pierre
	CANNONI Maurice		LACHARD Jean
	CARTOUZOU Guy		LAFFARGUE Pierre
	CAU Pierre		LAUGIER René
	CHABOT Jean-Michel		LE TREUT Yves
	CHAMLIAN Albert		LEVY Samuel
	CHARREL Michel		LOUCHET Edmond
	CHAUVEL Patrick		LOUIS René
	CHOUX Maurice		LUCIANI Jean-Marie
	CIANFARANI François		MAGALON Guy
	CLEMENT Robert		MAGNAN Jacques
	COMBALBERT André		MALLAN- MANCINI Josette
	CONTE-DEVOLX Bernard		MALMEJAC Claude
	CORRIOL Jacques		MARANINCHI Dominique
	COULANGE Christian		MARTIN Claude
	DALMAS Henri		MATTEI Jean François
	DE MICO Philippe		MERCIER Claude
	DESSEIN Alain		METGE Paul
	DELARQUE Alain		MICHOTEY Georges
	DEVIN Robert		MILLET Yves
	DEVRED Philippe		MIRANDA François
	DJIANE Pierre		MONFORT Gérard
	DONNET Vincent		MONGES André
	DUCASSOU Jacques		MONGIN Maurice
	DUFOUR Michel		MONTIES Jean-Raoul
	DUMON Henri		NAZARIAN Serge
	ENJALBERT Alain		NICOLI René

MM NOIRCLERC Michel
OLMER Michel
OREHEK Jean
PAPY Jean-Jacques
PAULIN Raymond
PELOUX Yves
PENAUD Antony
PENE Pierre
PIANA Lucien
PICAUD Robert
PIGNOL Fernand
POGGI Louis
POITOUT Dominique
PONCET Michel
POUGET Jean
PRIVAT Yvan
QUILICHINI Francis
RANQUE Jacques
RANQUE Philippe
RICHAUD Christian
RIDINGS Bernard
ROCHAT Hervé
ROHNER Jean-Jacques
ROUX Hubert
ROUX Michel
RUFO Marcel
SAHEL José
SALAMON Georges
SALDUCCI Jacques
SAN MARCO Jean-Louis
SANKALE Marc
SARACCO Jacques
SASTRE Bernard
SCHIANO Alain
SCOTTO Jean-Claude
SEBAHOUN Gérard
SERMENT Gérard
SERRATRICE Georges
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TARANGER-CHARPIN Colette
THOMASSIN Jean-Marc
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIALETTES Bernard
WEILLER Pierre-Jean

PROFESSEURS HONORIS CAUSA

1967

MM. les Professeurs DADI (Italie)
CID DOS SANTOS (Portugal)

1974

MM. les Professeurs MAC ILWAIN (Grande-Bretagne)
T.A. LAMBO (Suisse)

1975

MM. les Professeurs O. SWENSON (U.S.A.)
Lord J.WALTON of DETCHANT (Grande-Bretagne)

1976

MM. les Professeurs P. FRANCHIMONT (Belgique)
Z.J. BOWERS (U.S.A.)

1977

MM. les Professeurs C. GAJDUSEK-Prix Nobel (U.S.A.)
C.GIBBS (U.S.A.)
J. DACIE (Grande-Bretagne)

1978

M. le Président F. HOUPHOUET-BOIGNY (Côte d'Ivoire)

1980

MM. les Professeurs A. MARGULIS (U.S.A.)
R.D. ADAMS (U.S.A.)

1981

MM. les Professeurs H. RAPPAPORT (U.S.A.)
M. SCHOU (Danemark)
M. AMENT (U.S.A.)
Sir A. HUXLEY (Grande-Bretagne)
S. REFSUM (Norvège)

1982

M. le Professeur W.H. HENDREN (U.S.A.)

1985

MM. les Professeurs S. MASSRY (U.S.A.)
KLINSMANN (R.D.A.)

1986

MM. les Professeurs E. MIHICH (U.S.A.)
T. MUNSAT (U.S.A.)
LIANA BOLIS (Suisse)
L.P. ROWLAND (U.S.A.)

1987

M. le Professeur P.J. DYCK (U.S.A.)

1988

MM. les Professeurs R. BERGUER (U.S.A.)
W.K. ENGEL (U.S.A.)
V. ASKANAS (U.S.A.)
J. WEHSTER KIRKLIN (U.S.A.)
A. DAVIGNON (Canada)
A. BETTARELLO (Brésil)

1989

M. le Professeur P. MUSTACCHI (U.S.A.)

1990

MM. les Professeurs J.G. MC LEOD (Australie)
J. PORTER (U.S.A.)

1991

MM. les Professeurs J. Edward MC DADE (U.S.A.)
W. BURGDORFER (U.S.A.)

1992

MM. les Professeurs H.G. SCHWARZACHER (Autriche)
D. CARSON (U.S.A.)
T. YAMAMURO (Japon)

1994

MM. les Professeurs G. KARPATI (Canada)
W.J. KOLFF (U.S.A.)

1995

MM. les Professeurs D. WALKER (U.S.A.)
M. MULLER (Suisse)
V. BONOMINI (Italie)

1997

MM. les Professeurs C. DINARELLO (U.S.A.)
D. STULBERG (U.S.A.)
A. MEIKLE DAVISON (Grande-Bretagne)
P.I. BRANEMARK (Suède)

1998

MM. les Professeurs O. JARDETSKY (U.S.A.)

1999

MM. les Professeurs J. BOTELLA LLUSIA (Espagne)
D. COLLEN (Belgique)
S. DIMAURO (U. S. A.)

2000

MM. les Professeurs D. SPIEGEL (U. S. A.)
C. R. CONTI (U.S.A.)

2001

MM. les Professeurs P-B. BENNET (U. S. A.)
G. HUGUES (Grande Bretagne)
J-J. O'CONNOR (Grande Bretagne)

2002

MM. les Professeurs M. ABEDI (Canada)
K. DAI (Chine)

2003

M. le Professeur Sir T. MARRIE (Canada)
G.K. RADDI (Grande Bretagne)

2004

M. le Professeur M. DAKE (U.S.A.)

2005

M. le Professeur L. CAVALLI-SFORZA (U.S.A.)

2006

M. le Professeur A. R. CASTANEDA (U.S.A.)

2007

M. le Professeur S. KAUFMANN (Allemagne)

PROFESSEURS EMERITE

2008

M. le Professeur	LEVY Samuel	31/08/2011
Mme le Professeur	JUHAN-VAGUE Irène	31/08/2011
M. le Professeur	PONCET Michel	31/08/2011
M. le Professeur	KASBARIAN Michel	31/08/2011
M. le Professeur	ROBERTOUX Pierre	31/08/2011

2009

M. le Professeur	DJIANE Pierre	31/08/2011
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2012

2010

M. le Professeur	MAGNAN Jacques	31/12/2014
------------------	----------------	------------

2011

M. le Professeur	DI MARINO Vincent	31/08/2015
M. le Professeur	MARTIN Pierre	31/08/2015
M. le Professeur	METRAS Dominique	31/08/2015

2012

M. le Professeur	AUBANIAC Jean-Manuel	31/08/2015
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2015
M. le Professeur	CAMBOULIVES Jean	31/08/2015
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2015
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2015
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2015
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2015

2013

M. le Professeur	BRANCHEREAU Alain	31/08/2016
M. le Professeur	CARAYON Pierre	31/08/2016
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2016
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2016
M. le Professeur	HENRY Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	LE GUICHAOUA Marie-Roberte	31/08/2016
M. le Professeur	RUF0 Marcel	31/08/2016
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2016

2014

M. le Professeur	FUENTES Pierre	31/08/2017
M. le Professeur	GAMERRE Marc	31/08/2017
M. le Professeur	MAGALON Guy	31/08/2017
M. le Professeur	PERAGUT Jean-Claude	31/08/2017
M. le Professeur	WEILLER Pierre-Jean	31/08/2017

2015

M. le Professeur	COULANGE Christian	31/08/2018
M. le Professeur	COURAND François	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2016
M. le Professeur	MATTEI Jean-François	31/08/2016
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2016
M. le Professeur	VERVLOET Daniel	31/08/2016

2016

M. le Professeur	BONGRAND Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2017
M. le Professeur	BRUNET Christian	31/08/2019
M. le Professeur	CAU Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Patrick	31/08/2017
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2017
M. le Professeur	FONTES Michel	31/08/2019
M. le Professeur	JAMMES Yves	31/08/2019
M. le Professeur	NAZARIAN Serge	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2017
M. le Professeur	POITOUT Dominique	31/08/2019
M. le Professeur	SEBAHOUN Gérard	31/08/2017
M. le Professeur	VIALETTES Bernard	31/08/2019

2017

M. le Professeur	ALESSANDRINI Pierre	31/08/2020
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2018
M. le Professeur	CHAUVEL Patrick	31/08/2020
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2018
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2018
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2018
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2018
M. le Professeur	SEBBAHOUN Gérard	31/08/2018

2018

M. le Professeur	MARANINCHI Dominique	31/08/2021
M. le Professeur	BOUVENOT Gilles	31/08/2019
M. le Professeur	COZZONE Pierre	31/08/2019
M. le Professeur	DELMONT Jean	31/08/2019
M. le Professeur	FAVRE Roger	31/08/2019
M. le Professeur	OLIVER Charles	31/08/2019

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI FERRANDES Aubert	CHINOT Olivier	GRIMAUD Jean-Charles
ALBANESE Jacques	CHOSSEGROS Cyrille	GROB Jean-Jacques
ALIMI Yves	<i>CLAVERIE Jean-Michel Surnombre</i>	GUEDJ Eric
AMABILE Philippe	COLLART Frédéric	GUIEU Régis
AMBROSI Pierre	COSTELLO Régis	GUIS Sandrine
ANDRE Nicolas	COURBIERE Blandine	GUYE Maxime
ARGENSON Jean-Noël	COWEN Didier	GUYOT Laurent
ASTOUL Philippe	CRAVELLO Ludovic	GUYS Jean-Michel
ATTARIAN Shahram	CUISSET Thomas	HABIB Gilbert
AUDOUIN Bertrand	CURVALE Georges	HARDWIGSEN Jean
AUQUIER Pascal	DA FONSECA David	HARLE Jean-Robert
AVIERINOS Jean-François	DAHAN-ALCARAZ Laetitia	<i>HOFFART Louis Disponibilité</i>
AZULAY Jean-Philippe	DANIEL Laurent	HOUVENAEGHEL Gilles
BAILLY Daniel	DARMON Patrice	JACQUIER Alexis
BARLESI Fabrice	D'ERCOLE Claude	JOURDE-CHICHE Noémie
BARLIER-SETTI Anne	D'JOURNO Xavier	JOUVE Jean-Luc
BARTHET Marc	DEHARO Jean-Claude	KAPLANSKI Gilles
BARTOLI Christophe	DELAPORTE Emmanuel	KARSENTY Gilles
BARTOLI Jean-Michel	DELPERO Jean-Robert	KERBAUL François
BARTOLI Michel	DENIS Danièle	KRAHN Martin
BARTOLOMEI Fabrice	DISDIER Patrick	LAFFORGUE Pierre
BASTIDE Cyrille	DODDOLI Christophe	LAGIER Jean-Christophe
BENSOUSSAN Laurent	DRANCOURT Michel	LAMBAUDIE Eric
BERBIS Philippe	DUBUS Jean-Christophe	LANCON Christophe
BERDAH Stéphane	DUFFAUD Florence	LA SCOLA Bernard
<i>BERLAND Yvon Surnombre</i>	DUFOUR Henry	LAUNAY Franck
BERNARD Jean-Paul	DURAND Jean-Marc	LAVIEILLE Jean-Pierre
BEROUD Christophe	DUSSOL Bertrand	LE CORROLLER Thomas
BERTUCCI François	EUSEBIO Alexandre	LECHEVALLIER Eric
BLAISE Didier	FAKHRY Nicolas	LEGRE Régis
BLIN Olivier	<i>FAUGERE Gérard Surnombre</i>	LEHUCHER-MICHEL Marie-Pascale
BLONDEL Benjamin	FELICIAN Olivier	LEONE Marc
BONIN/GUILLAUME Sylvie	FENOLLAR Florence	LEONETTI Georges
BONELLO Laurent	FIGARELLA/BRANGER Dominique	LEPIDI Hubert
BONNET Jean-Louis	FLECHER Xavier	LEVY Nicolas
<i>BOTTA/FRIDLUND Danielle Surnom</i>	FOURNIER Pierre-Edouard	MACE Loïc
BOUBLI Léon	<i>FRANCES Yves Surnombre</i>	MAGNAN Pierre-Edouard
BOUFI Mourad	FRANCESCHI Frédéric	<i>MATONTI Frédéric Disponibilité</i>
BOYER Laurent	FUENTES Stéphane	MEGE Jean-Louis
BREGEON Fabienne	GABERT Jean	MERROT Thierry
BRETELLE Florence	GABORIT Bénédicte	METZLER/GUILLEMAIN Catherine
BROUQUI Philippe	GAINNIER Marc	MEYER/DUTOUR Anne
BRUDER Nicolas	GARCIA Stéphane	MICCALEF/ROLL Joëlle
BRUE Thierry	GARIBOLDI Vlad	MICHEL Fabrice
BRUNET Philippe	GAUDART Jean	MICHEL Gérard
BURTEY Stéphane	GAUDY-MARQUESTE Caroline	MICHEL Justin
CARCOPINO-TUSOLI Xavier	GENTILE Stéphanie	MICHELET Pierre
CASANOVA Dominique	GERBEAUX Patrick	MILH Mathieu
CASTINETTI Frédéric	GEROLAMI/SANTANDREA René	MOAL Valérie
CECCALDI Mathieu	GILBERT/ALESSI Marie-Christine	MONCLA Anne
CHAGNAUD Christophe	GIORGI Roch	MORANGE Pierre-Emmanuel
CHAMBOST Hervé	GIOVANNI Antoine	MOULIN Guy
CHAMPSAUR Pierre	GIRARD Nadine	MOUTARDIER Vincent
CHANEZ Pascal	GIRAUD/CHABROL Brigitte	<i>MUNDLER Olivier Surnombre</i>
CHARAFFE-JAUFFRET Emmanuelle	GONCALVES Anthony	NAUDIN Jean
CHARREL Rémi	GORINCOUR Guillaume	NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier
<i>CHARPIN Denis Surnombre</i>	GRANEL/REY Brigitte	NICOLLAS Richard
CHAUMOITRE Kathia	GRANVAL Philippe	OLIVE Daniel
CHIARONI Jacques	GREILLIER Laurent	OUAFIK L'Houcine

PAGANELLI Franck	ROCHE Pierre-Hugues	THOMAS Pascal
PANUEL Michel	ROCH Antoine	THUNY Franck
PAPAZIAN Laurent	ROCHWERTGER Richard	TREBUCHON-DA FONSECA Agnès
PAROLA Philippe	ROLL Patrice	TRIGLIA Jean-Michel
<i>PARRATTE Sébastien Disponibilité</i>	ROSSI Dominique	TROPIANO Patrick
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure	ROSSI Pascal	TSIMARATOS Michel
PELLETIER Jean	ROUDIER Jean	TURRINI Olivier
PERRIN Jeanne	SALAS Sébastien	VALERO René
PETIT Philippe	<i>SAMBUC Roland Surnombre</i>	VAROQUAUX Arthur Damien
PHAM Thao	SARLES Jacques	VELLY Lionel
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique	SARLES/PHILIP Nicole	VEY Norbert
PIQUET Philippe	SARLON-BARTOLI Gabrielle	VIDAL Vincent
PIRRO Nicolas	SCAVARDA Didier	VIENS Patrice
POINSON François	SCHLEINITZ Nicolas	VILLANI Patrick
RACCAH Denis	SEBAG Frédéric	VITON Jean-Michel
RANQUE Stéphane	SEITZ Jean-François	VITTON Véronique
RAOULT Didier	SIELEZNEFF Igor	VIEHWEGER Heide Elke
REGIS Jean	SIMON Nicolas	VIVIER Eric
REYNAUD/GAUBERT Martine	STEIN Andréas	XERRI Luc
REYNAUD Rachel	TAIEB David	
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth	THIRION Xavier	

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal
 AGHABABIAN Valérie
 BELIN Pascal
 CHABANNON Christian
 CHABRIERE Eric
 FERON François
 LE COZ Pierre
 LEVASSEUR Anthony
 RANJEVA Jean-Philippe
 SOBOL Hagay

PROFESSEUR CERTIFIE

BRANDENBURGER Chantal

PRAG

TANTI-HARDOUIN Nicolas

PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE A MI-TEMPS

ADNOT Sébastien
 FILIPPI Simon

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIEN HOSPITALIER

ACHARD Vincent (<i>disponibilité</i>)	EBBO Mikaël	NGUYEN PHONG Karine
AHERFI Sarah	FABRE Alexandre	NINOVE Laetitia
ANGELAKIS Emmanouil (<i>dispo oct 2018</i>)	FAURE Alice	NOUGAIREDE Antoine
ATLAN Catherine (<i>disponibilité</i>)	FOLETTI Jean- Marc	OLLIVIER Matthieu
BARTHELEMY Pierre	FOUILLOUX Virginie	OVAERT Caroline
BEGE Thierry	FROMNOT Julien	PAULMYER/LACROIX Odile
BELIARD Sophie	GASTALDI Marguerite	PESENTI Sébastien
BERBIS Julie	GELSI/BOYER Véronique	RESSEGUIER Noémie
BERGE-LEFRANC Jean-Louis	GIUSIANO Bernard	REY Marc
BERTRAND Baptiste	GIUSIANO COURCAMBECK Sophie	ROBERT Philippe
BEYER-BERJOT Laura	GONZALEZ Jean-Michel	SABATIER Renaud
BIRNBAUM David	GOURIET Frédérique	SARI-MINODIER Irène
BONINI Francesca	GRAILLON Thomas	SAVEANU Alexandru
BOUCRAUT Joseph	GRISOLI Dominique	SECQ Véronique
BOULAMERY Audrey	GUERIN Carole	SUCHON Pierre
BOULLU/CIOCCA Sandrine	GUENOUN MEYSSIGNAC Daphné	TABOURET Emeline
BUFFAT Christophe	GUIDON Catherine	TOGA Caroline
CAMILLERI Serge	HAUTIER/KRAHN Aurélie	TOGA Isabelle
CARRON Romain	HRAIECH Sami	TOMASINI Pascale
CASSAGNE Carole	KASPI-PEZZOLI Elise	TOSELLO Barthélémy
CHAUDET Hervé	L'OLLIVIER Coralie	TROUSSE Delphine
CHRETIEN Anne-Sophie	LABIT-BOUVIER Corinne	TUCHTAN-TORRENTS Lucile
COZE Carole	LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina	VELY Frédéric
CUNY Thomas	LAGIER Aude (<i>disponibilité</i>)	VION-DURY Jean
DADOUN Frédéric (<i>disponibilité</i>)	LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude	ZATTARA/CANNONI Hélène
DALES Jean-Philippe	LEVY/MOZZICONACCI Annie	
DAUMAS Aurélie	LOOSVELD Marie	
DEGEORGES/VITTE Joëlle	MANCINI Julien	
DELLIAUX Stéphane	MARY Charles	
DESPLAT/JEGO Sophie	MASCAUX Céline	
DEVILLIER Raynier	MAUES DE PAULA André	
DUBOURG Grégory	MILLION Matthieu	
DUFOUR Jean-Charles	MOTTOLA GHIGO Giovanna	

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

ABU ZINEH Mohammad	DEGIOANNI/SALLE Anna	RUEL Jérôme
BARBACARU/PERLES T. A.	DESNUES Benoît	THOLLON Lionel
BERLAND/BENHAIM Caroline	MARANINCHI Marie	THIRION Sylvie
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise	MERHEJ/CHAUVEAU Vicky	VERNA Emeline
BOYER Sylvie	MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte	
COLSON Sébastien	POGGI Marjorie	

MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

CASANOVA Ludovic
GENTILE Gaëtan

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS

BARGIER Jacques
BONNET Pierre-André
CALVET-MONTREDON Céline
GUIDA Pierre
JANCZEWSKI Aurélie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à MI-TEMPS

MATHIEU Marion
REVIS Joana

ANATOMIE 4201

CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)
LE CORROLLER Thomas (PU-PH)
PIRRO Nicolas (PU-PH)

GUENOUN-MEYSSIGNAC Daphné (MCU-PH)
LAGIER Aude (MCU-PH) disponibilité

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section)

ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES 4203

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)
DANIEL Laurent (PU-PH)
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)
GARCIA Stéphane (PU-PH)
XERRI Luc (PU-PH)

DALES Jean-Philippe (MCU-PH)
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)
MAUES DE PAULA André (MCU-PH)
SECQ Véronique (MCU-PH)

**ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ;
MEDECINE URGENCE 4801**

ALBANESE Jacques (PU-PH)
BRUDER Nicolas (PU-PH)
LEONE Marc (PU-PH)
MICHEL Fabrice (PU-PH)
VELLY Lionel (PU-PH)

GUIDON Catherine (MCU-PH)

ANGLAIS 11

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

**BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT
ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5405**

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (PU-PH)
PERRIN Jeanne (PU-PH)

BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE 4301

GUEDJ Eric (PU-PH)
GUYE Maxime (PU-PH)
MUNDLER Olivier (PU-PH) Surnombre
TAIEB David (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)
RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)
VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Téodora Adriana (MCF) (69ème section)

**BIostatistiques, Informatique Médicale
ET TECHNOLOGIES DE COMMUNICATION 4604**

CLAVERIE Jean-Michel (PU-PH) Surnombre
GAUDART Jean (PU-PH)
GIORGI Roch (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)
DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)
GIUSIANO Bernard (MCU-PH)
MANCINI Julien (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section)
BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

ANTHROPOLOGIE 20

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)
VERNA Emeline (MCF)

BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE 4501

CHARREL Rémi (PU PH)
DRANCOURT Michel (PU-PH)
FENOLLAR Florence (PU-PH)
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)
LA SCOLA Bernard (PU-PH)
RAOULT Didier (PU-PH)

AHERFI Sarah (MCU-PH)
ANGELAKIS Emmanouil (MCU-PH) disponibilité octobre 2018
DUBOURG Grégory (MCU-PH)
GOURIET Frédérique (MCU-PH)
NOUGAIREDE Antoine (MCU-PH)
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)
LEVASSEUR Anthony (PR) (64ème section)
DESNUES Benoit (MCF) (65ème section)
MERHEJ/CHAUVEAU Vicky (MCF) (87ème section)

BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE 4401

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)
GABERT Jean (PU-PH)
GUIEU Régis (PU-PH)
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BUFFAT Christophe (MCU-PH)
FROMNOT Julien (MCU-PH)
MOTTOLA GHIGO Giovanna (MCU-PH)
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

BIOLOGIE CELLULAIRE 4403

ROLL Patrice (PU-PH)

GASTALDI Marguerite (MCU-PH)
KASPI-PEZZOLI Elise (MCU-PH)
LEVY-MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)

CARDIOLOGIE 5102

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)
BONELLO Laurent (PU PH)
BONNET Jean-Louis (PU-PH)
CUISSSET Thomas (PU-PH)
DEHARO Jean-Claude (PU-PH)
FRANCESCHI Frédéric (PU-PH)
HABIB Gilbert (PU-PH)
PAGANELLI Franck (PU-PH)
THUNY Franck (PU-PH)

CHIRURGIE DIGESTIVE 5202

BERDAH Stéphane (PU-PH)
HARDWIGSEN Jean (PU-PH)
SIELEZNEFF Igor (PU-PH)

BEYER-BERJOT Laura (MCU-PH)

CHIRURGIE GENERALE 5302

DELPERO Jean-Robert (PU-PH)
MOUTARDIER Vincent (PU-PH)
SEBAG Frédéric (PU-PH)
TURRINI Olivier (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)
BIRNBAUM David (MCU-PH)

CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE 5002

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)
 BLONDEL Benjamin (PU-PH)
 CURVALE Georges (PU-PH)
 FLECHER Xavier (PU PH)
PARRATTE Sébastien (PU-PH) Disponibilité
 ROCHWERGER Richard (PU-PH)
 TROPIANO Patrick (PU-PH)

OLLIVIER Matthieu (MCU-PH)

CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE 4702

BERTUCCI François (PU-PH)
 CHINOT Olivier (PU-PH)
 COWEN Didier (PU-PH)
 DUFFAUD Florence (PU-PH)
 GONCALVES Anthony (PU-PH)
 HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)
 LAMBAUDIE Eric (PU-PH)
 SALAS Sébastien (PU-PH)
 VIENS Patrice (PU-PH)

SABATIER Renaud (MCU-PH)
 TABOURET Emeline (MCU-PH)

CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE 5103

COLLART Frédéric (PU-PH)
 D'JOURNO Xavier (PU-PH)
 DODDOLI Christophe (PU-PH)
 GARIBOLDI Vlad (PU-PH)
 MACE Loïc (PU-PH)
 THOMAS Pascal (PU-PH)

FOUILLOUX Virginie (MCU-PH)
 GRISOLI Dominique (MCU-PH)
 TROUSSE Delphine (MCU-PH)

CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE 5104

ALIMI Yves (PU-PH)
 AMABILE Philippe (PU-PH)
 BARTOLI Michel (PU-PH)
 BOUFI Mourad (PU-PH)
 MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)
 PIQUET Philippe (PU-PH)
 SARLON-BARTOLI Gabrielle (PU PH)

HISTOLOGIE, EMBRYOLOGIE ET CYTOGENETIQUE 4202

LEPIDI Hubert (PU-PH)

ACHARD Vincent (MCU-PH) disponibilité
 PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE 5003

BERBIS Philippe (PU-PH)
 GAUDY/MARQUESTE Caroline (PU-PH)
 GROB Jean-Jacques (PU-PH)
 RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

DUSI

COLSON Sébastien (MCF)

ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5404

BRUE Thierry (PU-PH)
 CASTINETTI Frédéric (PU-PH)
 CUNY Thomas (MCU PH)

EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION 4601

AUQUIER Pascal (PU-PH)
 BOYER Laurent (PU-PH)
 GENTILE Stéphanie (PU-PH)
SAMBUC Roland (PU-PH) Surnombre
 THIRION Xavier (PU-PH)

BERBIS Julie (MCU-PH)
 LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)
 RESSEGUIER Noémie (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)
 TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

CHIRURGIE INFANTILE 5402

GUYS Jean-Michel (PU-PH)
 JOUVE Jean-Luc (PU-PH)
 LAUNAY Franck (PU-PH)
 MERROT Thierry (PU-PH)
 VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)
 FAURE Alice (MCU PH)
 PESENTI Sébastien (MCU-PH)

CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE 5503

CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)
 GUYOT Laurent (PU-PH)

FOLETTI Jean-Marc (MCU-PH)

CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛOLOGIE 5004

CASANOVA Dominique (PU-PH)
 LEGRE Régis (PU-PH)

BERTRAND Baptiste (MCU-PH)
 HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE 5201

BARTHET Marc (PU-PH)
 BERNARD Jean-Paul (PU-PH)
BOTTA-FRIDLUND Danielle (PU-PH) Surnombre
 DAHAN-ALCARAZ Laetitia (PU-PH)
 GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)
 GRANDVAL Philippe (PU-PH)
 GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)
 SEITZ Jean-François (PU-PH)
 VITTON Véronique (PU-PH)

GONZALEZ Jean-Michel (MCU-PH)

GENETIQUE 4704

BEROUD Christophe (PU-PH)
 KRAHN Martin (PU-PH)
 LEVY Nicolas (PU-PH)
 MONCLA Anne (PU-PH)
 SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

NGYUEN Karine (MCU-PH)
 TOGA Caroline (MCU-PH)
 ZATTARA/CANNONI Héléne (MCU-PH)

GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE 5403

AGOSTINI Aubert (PU-PH)
 BOUBLI Léon (PU-PH)
 BRETELLE Florence (PU-PH)
 CARCOPINO-TUSOLI Xavier (PU-PH)
 COURBIERE Blandine (PU-PH)
 CRAVELLO Ludovic (PU-PH)
 D'ERCOLE Claude (PU-PH)

IMMUNOLOGIE 4703

KAPLANSKI Gilles (PU-PH)
 MEGE Jean-Louis (PU-PH)
 OLIVE Daniel (PU-PH)
 VIVIER Eric (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)
 CHRETIEN Anne-Sophie (MCU PH)
 DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)
 DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)
 ROBERT Philippe (MCU-PH)
 VELY Frédéric (MCU-PH)

BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES 4503

BROUQUI Philippe (PU-PH)
 LAGIER Jean-Christophe (PU-PH)
 PAROLA Philippe (PU-PH)
 STEIN Andréas (PU-PH)

MILLION Matthieu (MCU-PH)

MEDECINE D'URGENCE 4805

KERBAUL François (PU-PH)
 MICHELET Pierre (PU-PH)

**MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU
 VEILLISSEMENT ; MEDECINE GENERALE ; ADDICTOLOGIE 5301**

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)
 DISDIER Patrick (PU-PH)
 DURAND Jean-Marc (PU-PH)
 FRANCES Yves (PU-PH) *Surnombre*
 GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)
 HARLE Jean-Robert (PU-PH)
 ROSSI Pascal (PU-PH)
 SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH)

EBBO Mikael (MCU-PH)

GENTILE Gaëtan (MCF Méd. Gén. Temps plein)

ADNOT Sébastien (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)
 FILIPPI Simon (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

BARGIER Jacques (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)
 BONNET Pierre-André (MCF associé Méd. Gén à mi-temps)
 CALVET-MONTREDON Céline (MCF associé Méd. Gén. à temps plein)
 GUIDA Pierre (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
 JANCZEWSKI Aurélie (MCF associé Méd. Gén. À mi-temps)

NUTRITION 4404

DARMON Patrice (PU-PH)
 RACCAH Denis (PU-PH)
 VALERO René (PU-PH)

ATLAN Catherine (MCU-PH) *disponibilité*
 BELIARD Sophie (MCU-PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)

CHABANNON Christian (PR) (66ème section)
 SOBOL Hagay (PR) (65ème section)

IMMUNOLOGIE ; TRANSFUSION 4701

BLAISE Didier (PU-PH)
 COSTELLO Régis (PU-PH)
 CHIARONI Jacques (PU-PH)
 GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)
 MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)
 VEY Norbert (PU-PH)

DEVILLIER Raynier (MCU PH)
 GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)
 LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)
 LOOSVELD Marie (MCU-PH)
 SUCHON Pierre (MCU-PH)

POGGI Marjorie (MCF) (64ème section)

MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE 4603

BARTOLI Christophe (PU-PH)
 LEONETTI Georges (PU-PH)
 PELISSIER-ALICOT Anne-Laure (PU-PH)
 PIERCECCHI-MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

TUCHTAN-TORRENTS Lucile (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)

MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION 4905

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)
 VITON Jean-Michel (PU-PH)

MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL 4602

LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (PU-PH)

BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)
 SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

NEPHROLOGIE 5203

BERLAND Yvon (PU-PH) *Surnombre*
 BRUNET Philippe (PU-PH)
 BURTEY Stéphanne (PU-PH)
 DUSSOL Bertrand (PU-PH)
 JOURDE CHICHE Noémie (PU PH)
 MOAL Valérie (PU-PH)

NEUROCHIRURGIE 4902

DUFOUR Henry (PU-PH)
 FUENTES Stéphane (PU-PH)
 REGIS Jean (PU-PH)
 ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)
 SCAVARDA Didier (PU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)
 GRAILLON Thomas (MCU PH)

NEUROLOGIE 4901

ATTARIAN Sharham (PU PH)
 AUDOIN Bertrand (PU-PH)
 AZULAY Jean-Philippe (PU-PH)
 CECCALDI Mathieu (PU-PH)
 EUSEBIO Alexandre (PU-PH)
 FELICIAN Olivier (PU-PH)
 PELLETIER Jean (PU-PH)

OPHTALMOLOGIE 5502

DENIS Danièle (PU-PH)
 HOFFART Louis (PU-PH) *Disponibilité*
 MATONTI Frédéric (PU-PH) *Disponibilité*

PEDEPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE 4904

DA FONSECA David (PU-PH)
 POINSO François (PU-PH)

OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE 5501

DESSI Patrick (PU-PH)
 FAKHRY Nicolas (PU-PH)
 GIOVANNI Antoine (PU-PH)
 LAVIEILLE Jean-Pierre (PU-PH)
 MICHEL Justin (PU-PH)
 NICOLLAS Richard (PU-PH)
 TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)
 DEVEZE Arnaud (MCU-PH) *Disponibilité*
 REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)

**PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE -
PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE 4803**

BLIN Olivier (PU-PH)
 FAUGERE Gérard (PU-PH) *Surnombre*
 MICALLEF/ROLL Joëlle (PU-PH)
 SIMON Nicolas (PU-PH)
 BOULAMERY Audrey (MCU-PH)

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE 4502

RANQUE Stéphane (PU-PH)

CASSAGNE Carole (MCU-PH)
 L'OLLIVIER Coralie (MCU-PH)
 MARY Charles (MCU-PH)
 TOGA Isabelle (MCU-PH)

PHILOSOPHIE 17

LE COZ Pierre (PR) (17ème section)

MATHIEU Marion (MAST)

PEDIATRIE 5401

ANDRE Nicolas (PU-PH)
 CHAMBOST Hervé (PU-PH)
 DUBUS Jean-Christophe (PU-PH)
 GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH)
 MICHEL Gérard (PU-PH)
 MILH Mathieu (PU-PH)
 REYNAUD Rachel (PU-PH)
 SARLES Jacques (PU-PH)
 TSIMARATOS Michel (PU-PH)

PHYSIOLOGIE 4402

BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH)
 BREGEON Fabienne (PU-PH)
 GABORIT Bénédicte (PU-PH)
 MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)
 TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (PU-PH)

COZE Carole (MCU-PH)
 FABRE Alexandre (MCU-PH)
 OVAERT Caroline (MCU-PH)
 TOSELLO Barthélémy (MCU-PH)

BARTHELEMY Pierre (MCU-PH)
 BONINI Francesca (MCU-PH)
 BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH)
 DADOUN Frédéric (MCU-PH) (*disponibilité*)
 DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)
 REY Marc (MCU-PH)

PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE 4903

BAILLY Daniel (PU-PH)
 LANCON Christophe (PU-PH)
 NAUDIN Jean (PU-PH)

RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)
 THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

PSYCHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PCYCHOLOGIE SOCIALE 16

AGHABABIAN Valérie (PR)

PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE 5101**RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE 4302**

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)
 CHAGNAUD Christophe (PU-PH)
 CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)
 GIRARD Nadine (PU-PH)
 GORINCOUR Guillaume (PU-PH)
 JACQUIER Alexis (PU-PH)
 MOULIN Guy (PU-PH)
 PANUEL Michel (PU-PH)
 PETIT Philippe (PU-PH)
 VAROQUAUX Arthur Damien (PU-PH)
 VIDAL Vincent (PU-PH)

ASTOUL Philippe (PU-PH)
 BARLESI Fabrice (PU-PH)
 CHANEZ Pascal (PU-PH)
 CHARPIN Denis (PU-PH) *Surnombre*
 GREILLIER Laurent (PU PH)
 REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

MASCAUX Céline (MCU-PH)
 TOMASINI Pascale (MCU-PH)

REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE 4802

GAINNIER Marc (PU-PH)
 GERBEAUX Patrick (PU-PH)
 PAPAIZIAN Laurent (PU-PH)
 ROCH Antoine (PU-PH)

THERAPEUTIQUE; MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE 4804

AMBROSI Pierre (PU-PH)
 VILLANI Patrick (PU-PH)

HRAIECH Sami (MCU-PH)

DAUMAS Aurélie (MCU-PH)

RHUMATOLOGIE 5001

GUIS Sandrine (PU-PH)
 LAFFORGUE Pierre (PU-PH)
 PHAM Thao (PU-PH)
 ROUDIER Jean (PU-PH)

UROLOGIE 5204

BASTIDE Cyrille (PU-PH)
 KARSENTY Gilles (PU-PH)
 LECHEVALLIER Eric (PU-PH)
 ROSSI Dominique (PU-PH)

REMERCIEMENTS

Madame la Professeure Dominique Figarella-Branger, Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider ce jury et d'apporter votre expérience à la critique de cette thèse. Merci pour votre soutien et votre engagement au cours de ma formation dans le service d'anatomie et cytologie pathologiques de La Timone. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance.

Monsieur le Professeur Jean-Jacques Grob, Je vous remercie de m'accorder l'honneur de participer à ce jury de thèse et de porter votre jugement sur ce travail. Merci pour l'enrichissement que vous apportez à la belle collaboration entre dermatologues et pathologistes.

Monsieur le Professeur L'houcine Ouafik, Vous me faites l'honneur d'être parmi mes juges. Je vous remercie des enseignements et des conseils apportés lors de la réalisation de ce travail. Soyez assuré de ma respectueuse gratitude et de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Nicolas Macagno, C'est avec une grande reconnaissance & immense admiration que je te remercie d'avoir dirigé ce travail. Merci de t'être rendu disponible pour endosser ce rôle de guide. Merci pour tes conseils rendus avec gentillesse & bonne humeur permanente. Encore une fois, merci de partager tes précieuses connaissances & compétences, avec nous, internes.

Merci à mes parents Christine et Didier, sans qui bien sûr, je ne serai pas là.
Merci pour votre intelligence et votre humour, pour ne citer que deux qualités parmi tant.

Merci à mes grands-parents que je chéris par dessus-tout.

A Alice, douceur incarnée,

A Paul, jardinier de haut vol et homme passionné,

A Rose, fleur parmi les fleurs au fou rire contagieux,

A Jean, tempête de neige,

Merci à Lola, ma très chère sœur que j'aime et au lien que nous prenons grand soin d'entretenir.

A Luciole, Amande, Douce et Lilou, mes sœurs à fourrure.

Merci à Christine, la plus grande amie de cette famille.

Merci à mes oncles et tantes.

A Marie-Ange, première nourrice et adorable muchacha,

A Jackie, femme de caractère et modèle,

A Jean-Paul, ancien tireur d'élite et gymnaste,

A Régis, grand médecin,

A Lili et Jean-Pierre, merci pour votre gentillesse et votre soutien permanent.

Merci à ma marraine Martine.

A mon parrain Roger.

Merci à Anna, Dédé, Lulu et Pierrot,

A Denise.

Merci à mes cousins et cousines,

A Rémi, Philippe, Myriam, Maxime et Marjorie.

A Sylvie, entre autres, fan de BB et femme que j'admire.

Merci à Paul, mon amour et à Darcy, mon félin, hommes de ma vie.

Merci à mes grands amis, rencontrés sur les bancs de la Faculté de médecine de
Nîmes,
A Jennifer, calme, sagesse et bonté, étonnée qu'avec de telles qualités tu n'aies pas
fini bonne sœur dans une léproserie.
A Elisabeth, Pétou, fine mouche au grand cœur, incollable et pourtant tellement nulle
en sous-colle,
A Anissa, adorable étourdie à l'immense pouvoir de persuasion dont il faut se méfier
(règle n°1)
A Rémi, Rémichou, inclassable, hilarant, moqueur et caustique, je te souhaite les
millions de tes rêves.
Merci pour ces soirées, nuits, journées, matinées ou après-midis avec vous, j'en
veux davantage.

Une pensée pour tous les autres étudiants nîmois, à nos manades, soirées internes,
carnaval et galas en tout genre.

Merci à mes belles sirènes de l'internat d'Avignon,
Reine Claire, aphyosemion ogoense, chercheuse d'objets ou d'arts insolites, au beau
caractère non conventionnel.
Reine Chloé, hippocampe ou poisson-chat mais avant tout lyonnaise, nez, gourmet
et skieuse de talent.
Reine Nathy, poisson-ange des Caraïbes ou Beyoncé pour les maçons du chantier
de Carémeau, merci pour ton sourire, ton côté aventurier que tu le veuilles ou non et
ta motivation.
Reine Noémie, chaetodon bennetti, comique, humaine, présente et attentionnée, un
bonheur. Merci pour ces parties endiablées de jeux de société.
Reine Oumnia, raie léopard, élégante et secrète pour qui la médiation est une
philosophie de vie. Merci pour tes conseils essentiels de Marseillaise établie à savoir
le parking sauvage.
Merci à vos tritons respectifs, Arthur, Gauthier, Jean-Gabriel et Abdel.
J'espère que vous ne me tiendrez pas rigueur de ce bestiaire aquatique, il faut bien
s'amuser. A nos futurs week-ends, concerts, cinés, restau et moments partagés.

A Pauline, maman tortue, dont le cynisme est toujours la bienvenue.

A la famille Farno, avec qui je garde le souvenir des plus beaux fous rires.
Fuck le chat.
Inès et Maylis il est indispensable de repartir pieds-nus dans les Pyrénées.

A la famille Moreno, d'une gentillesse inouïe malgré les piques et moqueries incessantes de José.

A la famille Daubin, merci Patricia et Bruno de m'avoir aidée. Un soutien que je n'oublierai pas.

A Violaine, Elvira, Marion et Alix que j'aimerais voir plus souvent.

A Oli, Justine et Nahina copines nîmoises et maintenant copines pathologistes.

A Marine, Betty, Camille, Marion et Aurélie, que je peine à croiser mais dont je me réjouis de suivre l'actualité via la modernité de nos réseaux sociaux.

A l'ensemble de l'équipe d'anapath d'Avignon, merci Anne-Laure, Anne-Marie, Guillaume et Carole de m'avoir si gentiment encadrée lors de mon premier semestre. Merci aussi à toute l'équipe de techniciennes, une famille au travail, je ne vous oublie pas.

A l'équipe de l'IPC, merci Jeanne, Flora, Maria, Marie-Mélanie, Cécile, Lénaïg et Sébastien pour votre enseignement. Je garde de très bons souvenirs à vos côtés. Tout particulièrement, un grand merci Jeanne pour ton implication, le savoir que tu partages et ton aide pour la réalisation de mon interCHU.

Merci au Pr Xerri pour votre soutien et votre intérêt dans la transmission des connaissances d'hématopathologie

A l'équipe de La Timone, merci Nicolas, Laurent, Corinne, Radia, Wassim et Jean pour le partage de vos connaissances dans la joie et la bonne humeur. Nicolas, je te dois beaucoup dans la réalisation de ce travail, tu en es le ciment, les fondations et même les fioritures. J'ai découvert à tes côtés un amour pour la dermatopathologie et ta science est immense qu'elle soit médicale ou personnelle. Parfois cru voire tranchant tu restes une personne fondamentalement bienveillante. Encore merci capitaine Haddock.

Merci à Fred et Doriane pour votre aide lors de la mise en œuvre de ma thèse.

A l'équipe de l'HEGP, merci Cécile pour ton humour et ces franches rigolades tout en lisant des cas bien sûr. Merci de m'avoir fait confiance et transmis autre chose que de la médecine pure. A Laure, artiste pathologiste, merci.

A l'équipe de Nord, LaboratoireTransOncoBio ou LTOB pour les intimes. Merci Isabelle, Annick, Christine, Eric pour votre présence et gentillesse.

Enfin passage que vous attendiez tous mais qui chronologiquement et hiérarchiquement parlant se doit d'être ici, merci à l'ensemble de mes co-internes.

Merci à Nicolas, Firdaouss, Kim et Kévin premiers co-internes, heureusement que vous étiez là, parce que « ça m'vénère ».

Merci à Agathe, coup de cœur de pathologiste. Pensée pour ta Léna et ta magnifique famille.

Merci à Julien, grand gentil et à Morgan, doux dingue, mes deux piliers de l'IPC pour ce second choix.

Merci tout particulièrement à Coralie, dont la générosité et la disponibilité m'ont permis d'avancer ma thèse lors de mon interCHU.

Merci à Julie, ancienne grenobloise heureusement redevenue marseillaise.

Merci à Aurélie, ex co-interne devenue mon mentor de digestif, toujours à l'écoute, la Potter est une patte. Miaou.

Merci à Marie, Paola et Christopher pour ce semestre d'été à la Timone.

Merci à Anaïs, Fanny, Alice, Ahlem, Dounia et Hussein j'ai passé 6 merveilleux mois de stage à Paris grâce à vous. J'espère pouvoir continuer à vous voir.

Merci à Gregory et Maxime pour cet été au LTOB.

Merci à mes co-internes actuels avec qui je passe d'excellents moments.

Merci Marie pour ta douceur et pour le partage de nos phobies (elles sont nombreuses). Je suis contente d'enfin pouvoir passer un semestre avec toi en tant que co-interne, c'est une chance.

Merci Loïc, tu décoiffes, tu es drôle et charmant, ne change pas. Très heureuse de partager ce semestre à tes côtés.

Merci Alexandra, je me suis enrichie à tes côtés, merci pour ta bienveillance.

Merci Géraldine, une co-interne précieuse, non tu n'es jamais fatiguée et toujours d'humeur égale, un plaisir.

Merci à mes deux sbires révolutionnaires, en la qualité de Clément, débonnaire aux épaules larges et d'Amine toujours tiré à quatre épingle, n'oubliez pas : la peau en bas et faites des coupes fines !

Merci Romain, pour ta gentillesse et l'aide que tu m'as apportée. J'espère avoir l'occasion de mieux te connaître.

Enfin merci à tous les co-internes avec qui je n'ai pas partagé de stages ce qui est regrettable mais que je n'oublie pas, à Donatienne, à Anaïs, à Alexandre, à Hugo, à Hugo bis, à Bastien, à Thomas et à Hussam.

1. INTRODUCTION	4
1.1 BRAF, l'oncogène	4
1.1.1 BRAF dans la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)	5
1.2 Indications de BRAF à visée théranostique	7
1.3 Indications de BRAF à visée diagnostique	8
1.3.1 Classification histomoléculaire	8
1.4 Méthodes de détermination du statut BRAF V600E	11
1.5 Hétérogénéité ou homogénéité du statut BRAF	13
1.5.1 Contexte	13
1.5.2 BRAF : mutation « driver », évolution génétique du naevus au mélanome	14
2. OBJECTIFS	19
3. MATERIELS ET METHODES	19
3.1 Critères d'inclusion	19
3.2 Technique immunohistochimique BRAF V600E	20
3.3 Interprétation de l'immunohistochimie BRAF V600E	22
3.3.1 Interprétation 0= négative	22
3.3.2 Interprétation 1= positive	23
3.3.4 Interprétation 2= douteuse	24
3.4 Validation moléculaire	25
3.5 Statistiques	27
4. RESULTATS	28
4.1 Description de la cohorte	28
4.2 Résultats de l'immunodétection BRAF V600E	29
4.3 Exploration des discordances : immunohistochimie BRAF V600E versus biologie moléculaire	30
4.4 Performances diagnostiques : immunohistochimie BRAF V600E versus biologie moléculaire	31
4.5 Exploration de l'évolution du statut BRAF V600E	33
4.6 Bilan d'impact décalcification	35
4.7 Importance d'un témoin négatif	36

5. DISCUSSION	36
5.1 Performances diagnostiques de l'anticorps BRAF VE1 & revue de la littérature	37
5.2 Discordances	39
5.3 Analyse des 9 cas discordants : immunodétection positive mais biologie moléculaire négative	40
5.3.1 Cas discordants en PCR-HRM, séquençage SANGER	40
5.3.2 Cas discordants en séquençage NGS, IonS5 - ThermoFischer : panel OST/OST+	41
5.3.3 Cas discordant en digital PCR	41
5.4 Analyse du cas discordant : immunodétection BRAF V600E négative mais biologie moléculaire positive	42
5.5 Limites de sensibilité de chacune des techniques moléculaires	43
5.6 Homogénéité du statut BRAF V600E	44
5.7 Avantages de l'IHC BRAF V600E	46
5.8 Limites de l'IHC BRAF V600E	47
5.9 En synthèse : positionnement proposé de l'IHC BRAF V600E	49
6. CONCLUSION	50
7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	51
8. ANNEXES	61
8.1 Prise en charge thérapeutique du mélanome	61
8.1.1 Recommandations de l'INCa mélanome stade III non résécable ou stade IV	61
8.1.2 Essais cliniques & prise en charge des patients atteints d'un mélanome stade II à IIIb	61
8.2 Entités selon leur statut BRAF V600E	63
8.2.1 Entités BRAF mutées V600E	63
Ø Bénignes	63
· Naevus commun	63
· Mélanocytome épithélioïde pigmenté ou PEM (Pigmented Epithelioid Melanocytoma)	63
· BAPome	64
· Naevus à extension profonde ou DPN (Deep Penetrating Naevus)	65
Ø Malignes	67
· Mélanome de type SSM ou "Low-CSD"	67
8.2.2 Entités BRAF non-mutées	68
Ø Bénignes	68
· Naevus de Spitz & naevus bleu	68
Ø Malignes	68
· Mélanome de Dubreuilh ou "High-CSD"	68
· Mélanome uvéal	69
· Mélanome de type bleu	70

· Tumeur de Spitz maligne	70
8.2.3 Entités avec un faible pourcentage de cas mutés BRAF ^{V600E}	72
· Mélanome acro-lentigineux	72
· Mélanome muqueux	72
· Mélanome issu d'un naevus congénital	73
8.3 Comparaisons coût & délai des différentes méthodes de détermination du statut BRAF V600E	75
9. ABREVIATIONS	76

1. INTRODUCTION

L'analyse moléculaire a permis d'identifier au début des années 2000 les gènes mutés impliqués dans les mélanomes cutanés. Initialement, ce sont les mutations somatiques des gènes de la voie MAPK (Mitogen-activated protein kinase) qui ont été identifiées. C'est le cas du gène *BRAF*, dont la mutation oncogène est présente dans 40 à 50% des mélanomes (Davies et al., 2002), (Govender and Chetty, 2012), (Long et al., 2011). La mise en évidence de la mutation *BRAF* implique de multiples répercussions tant diagnostiques que thérapeutiques. Plusieurs méthodes permettent de la détecter avec des performances variables. Ce travail vise à évaluer une technique en particulier, la méthode immunohistochimique.

1.1 BRAF, l'oncogène

L'importance des mutations du gène *BRAF* dans les processus néoplasiques a été reconnue il y a 18 ans lorsque ces mutations ont été identifiées dans un large panel de cancers (Solit and Rosen, 2010). La première mise en évidence de mutations du gène *BRAF* dans le mélanome résulte de l'étude génétique somatique réalisée par l'équipe de l'institut Sanger en 2002 à partir de lignées cellulaires tumorales et d'échantillons tumoraux (Brose et al., 2002). La mutation la plus fréquente de ce gène correspond à la mutation *BRAF*^{V600E}. Le gène *BRAF* est composé de 18 exons et à ce jour, plus de 30 mutations différentes ont déjà été identifiées. Néanmoins, la mutation communément appelée V600E, correspond à 69% voire 94% des mutations du gène *BRAF* dans le mélanome selon l'histotype considéré (Edlundh-Rose et al., 2006), (Rubinstein et al., 2010) (Davies et al., 2002). Cette mutation se produit au niveau de l'exon 15, à la position nucléotidique 1799, et implique une transversion d'une thymine en adénine, entraînant la substitution de l'acide glutamique par la valine à la position 600. Cette mutation est qualifiée d'oncogène car elle apparaît au niveau d'un domaine codant pour l'activité kinase de la protéine B-Raf. La mutation entraîne une activation constitutive du domaine tyrosine kinase avec phosphorylation et activation des acteurs d'aval de la voie des MAP-kinases.

1.1.1 BRAF dans la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

La protéine B-Raf mutée active anormalement la voie de signalisation MAPK. Cette voie de signalisation intracellulaire joue un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation cellulaire, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse. Cette voie est anormalement activée dans de nombreux cancers. Plusieurs mécanismes participent à l'activation de cette voie : principalement l'activation des récepteurs membranaires tels que l'EGFR, mais aussi l'apparition de mutations somatiques, notamment au niveau des gènes d'aval codant pour les protéines Ras et Raf (Lièvre and Laurent-Puig, 2010).

La voie des MAPK, activée par la liaison d'un facteur de croissance à son récepteur membranaire, est constituée d'une cascade de phosphorylation des protéines sérine/thréonine kinases (Raf, Mek et Erk) physiologiquement régulées par Ras. Un schéma explicatif de cette voie est représenté en **Figure 1**. L'activation du récepteur entraîne le recrutement membranaire par Ras de la protéine Raf-1. Cette protéine active par phosphorylation la protéine Mek, qui à son tour active la protéine Erk, par une double phosphorylation, induisant sa relocalisation nucléaire où elle va exercer son activité régulatrice sur des facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC, c-JUN ou c-JUNB), impliqués notamment dans la stimulation des gènes du cycle cellulaire (Cycline D1 ou CDK6).

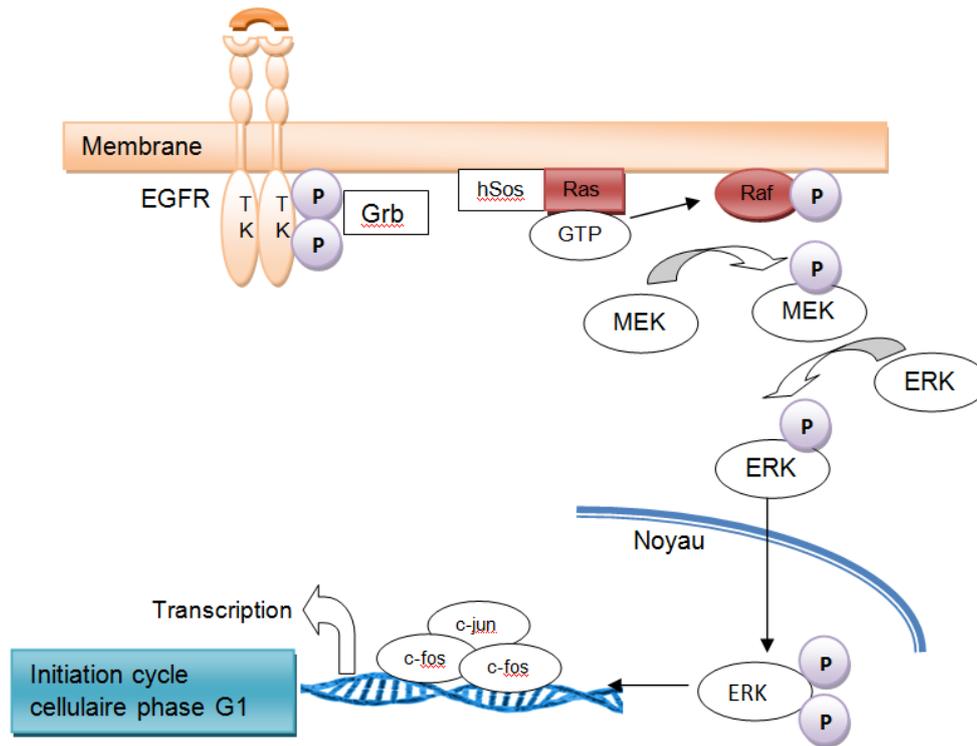


Figure 1 - Schéma simplifié de la voie RAS/MAPK

B-Raf appartient à la famille protéique Raf-1 comprenant trois isoformes correspondant aux sérine/thréonine kinases A-Raf, B-Raf et C-Raf. L'isoforme B-Raf est particulière car présentant l'activité enzymatique kinase la plus marquée conduisant à une plus grande capacité d'activation de la voie MAPK, comparativement aux deux autres isoformes.

Il est important de préciser que seules certaines néoplasies mélanocytaires, indépendamment de leur malignité, sont associées à une mutation *BRAF V600*. La détection de celle-ci endosse une valeur diagnostique et thérapeutique : la connaissance de cette voie de signalisation et de ses altérations oncogéniques a permis l'identification de cibles thérapeutiques anticancéreuses.

1.2 Indications de BRAF à visée théranostique

À un stade précoce, le mélanome cutané *in situ* traité chirurgicalement est d'excellent pronostic. Pour le mélanome invasif, le pronostic en termes de récurrence locale, d'évolution métastatique et de survie est plus sombre et est proportionnel à l'épaisseur d'infiltration et la présence d'une ulcération. Avant l'avènement des bio- et immunothérapies, les traitements étaient décevants car le mélanome est un cancer peu chimio- et radiosensible. La prise en charge reposait initialement sur une chimiothérapie conventionnelle utilisant, en monothérapie ou en thérapie combinée, des traitements cytotoxiques ou cytostatiques tels que dacarbazine, paclitaxel, cisplatine, fotémustine, témozolomide, interleukine voire de l'interféron. A cette période, le mélanome invasif au stade métastatique était associé à un pronostic sombre en raison de l'efficacité modeste de ces approches, avec des taux de réponse de l'ordre de 20% et de rémission complète <5% (Source : Haute Autorité de Santé).

L'essor de la caractérisation moléculaire des cancers associé au développement de la recherche pharmaceutique a permis la synthèse de molécules inhibant les enzymes cellulaires dérégulées lors de la tumorigénèse. Ces nouvelles thérapies ciblent spécifiquement certaines protéines anormales, généralement des kinases qui participent à l'activation des réseaux moléculaires oncogènes, à l'origine du concept de thérapie ciblée. Depuis 2011 et 2013, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé deux inhibiteurs de B-Raf pour les patients atteints de mélanomes métastatiques (stade IV) ou non-résécables, dont les cellules tumorales renferment une mutation *BRAF* V600E pour le Vemurafenib (Kim et al., 2014) ou présentant les mutations V600E ou V600K pour le Dabrafenib (Ballantyne and Garnock-Jones, 2013). En première ligne ces traitements ont permis d'obtenir une augmentation moyenne de survie de 5 mois. Des inhibiteurs de Mek, un acteur d'aval de la voie MAPK, sont actuellement utilisés en association avec les inhibiteurs de B-Raf : le Cobimetinib et le Trametinib peuvent être associés respectivement avec le Vemurafenib et le Dabrafenib. L'inhibition conjointe de B-Raf & Mek augmente encore les taux de réponse et la survie globale. Les recommandations de l'INCa

concernant la thérapie ciblée anti-BRAF sont détaillées en annexe. Les indications d'un traitement anti-BRAF s'élargissent et un rapide point sur les essais cliniques étudiant cette thérapie pour les mélanomes de stade II ou IIIb est présenté en annexe. La mise en évidence d'une mutation ciblable du gène *BRAF* est une condition *sine qua none* à l'introduction de ces thérapeutiques ciblées, impliquant un screening systématique.

En plus de son intérêt théranostique majeur, la recherche d'une mutation *BRAF* présente aussi une utilité diagnostique.

1.3 Indications de BRAF à visée diagnostique

Pour comprendre les indications diagnostiques, une connaissance approfondie de la classification histomoléculaire et des différentes voies de signalisation des néoplasies mélanocytaires est nécessaire : en effet, nævus de type commun et congénitaux, mélanomes SSM et tumeurs mélanocytaires intermédiaires (mélanocytomes) sont associés à des mutations dans la voie des MAPK (*RAS*, *RAF*, *KIT*), le spectre des lésions bleues et uvéales est associé à des mutations de protéines G (*GNAQ*, *GNA11*), alors que le spectre Spitz est associé à des translocations de kinase (*TRK*, *ALK*, *ROS*, *MET*, *RET*...) et plus rarement des mutations/amplifications de *HRAS*. Détecter la mutation *BRAF*^{V600E} au moment du diagnostic permet d'aider le pathologiste à positionner une lésion mélanocytaire dans une de ces catégories, ce qui conditionne notamment les critères utilisés pour apprécier leur agressivité.

1.3.1 Classification histomoléculaire

La voie de signalisation MAPK, pouvant être activée par une mutation de *BRAF* ou *NRAS* est l'une des voies les plus activées dans le mélanome. Cependant, les mécanismes mutationnels perturbant cette voie d'activation sont distribués

différemment selon le type et la localisation du mélanome. Ainsi en 2014, l'équipe de Bastian a proposé une nouvelle nomenclature des tumeurs cutanées, basée sur la présentation clinique, l'aspect histologique, le fond moléculaire et le pronostic (Bastian, 2014). La classification des tumeurs cutanées de l'organisation mondiale de la santé (OMS) a par la suite adopté cette approche en 2018. L'ancienne classification OMS des tumeurs cutanées se basait depuis 30 ans sur la nomenclature proposée par Clark et ses collègues (Clark et al., 1986), nomenclature qui reposait sur le site d'origine du mélanome et sur sa phase de croissance précoce. Ainsi, quatre types de mélanomes existaient : SSM (Superficial Spreading Melanoma), LMM (Lentigo Maligna Melanoma), NM (Nodular Melanoma) et ALM (Acral-Lentiginous Melanoma). Dans cette ancienne classification, il n'existait pas de distinction entre les mélanomes selon l'exposition solaire ou selon les drivers moléculaires. L'analyse récente des données de séquençages a révélé des différences en termes de signature moléculaire UV entre les différents types de mélanomes : cette signature UV correspond à une plus grande prépondérance des mutations C>T pour les lésions UV-induites (Brash, 2015). Ces différences de signature moléculaire UV ont permis la distinction de mélanomes associés à une exposition solaire chronique, une exposition solaire par intermittence et ceux sans exposition solaire. Au sein des mélanomes liés à une exposition solaire, deux catégories principales sont identifiées : les mélanomes « Low-CSD (Chronically Sun Damaged) », anciens SSM, se traduisant par « mélanomes apparaissant sur peau insolée par intermittence » et les mélanomes « High-CSD », anciens mélanomes de Dubreuilh se traduisant par « mélanomes apparaissant sur peau fortement insolée de manière chronique ». Histologiquement et cliniquement, il est possible d'apprécier le degré d'insolation de la peau par la localisation, l'aspect cutané et l'élastose dermique.

Comme dit précédemment certains mélanomes ne sont pas liés à une exposition solaire tels que les mélanomes uvéaux, les mélanomes de type bleu, les tumeurs de Spitz malignes, les mélanomes acro-lentigineux, les mélanomes muqueux et les mélanomes pré-pubertaires sur nævus congénital géant. Ces mélanomes présentent un profil moléculaire particulier, sans signature UV, avec une charge mutationnelle

plus faible. La transformation dans ces cas-là est due à d'autres mécanismes, comme des mutations ponctuelles (*GNAQ*, *GNA11*, *CKIT*), des inactivations de gènes suppresseurs de tumeurs (*BAP1*) ou des translocations chromosomiques avec transcrit de fusion oncogénique.

La proportion de mutation *BRAF*^{V600E} est radicalement différente selon l'entité considérée et bien que cette nouvelle classification histomoléculaire utilise l'exposition solaire pour hiérarchiser les différentes entités, afin d'illustrer notre propos concernant l'implication de la mutation *BRAF*^{V600E}, nous avons plutôt choisi d'aborder cette nosologie avec d'un côté, les entités pouvant présenter la mutation canonique de *BRAF* et d'un autre côté, la pathologie mélanique n'incluant généralement pas de mutation *BRAF* dans ses mécanismes moléculaires. Il existe une 3^{ème} catégorie pour laquelle l'impact de la mutation *BRAF*^{V600E} dans le processus oncogénique reste peu documenté, celle-ci étant identifiée de façon plus ponctuelle. Ci-dessous, le **Tableau 1** résume et hiérarchise les entités selon leur statut BRAF V600E. Le détail des anomalies moléculaires retrouvées au sein de chaque catégorie est plus amplement décrit en annexe.

Présence mutation <i>BRAF</i>^{V600E}	<i>Bénignes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Naevus commun • Mélanocytome épithélioïde pigmenté (PEM) • BAPome • Naevus à extension profonde (DPN)
	<i>Malignes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanome de type SSM ou « Low-CSD »
Absence mutation <i>BRAF</i>^{V600E} -	<i>Bénignes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Naevus de Spitz • Naevus bleu
	<i>Malignes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanome de Dubreuilh ou « High-CSD » • Tumeur maligne de Spitz • Mélanome de type bleu • Mélanome uvéal • Mélanome muqueux
Faible % de cas mutés <i>BRAF</i>^{V600E}	<i>Malignes</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Mélanome acro-lentigineux • Mélanome muqueux • Mélanome issu d'un naevus congénital

Tableau 1 - Résumé des entités selon leur statut *BRAF* V600E

De nombreuses méthodes de déterminations du statut *BRAF* V600E existent. A visée théranostique, le gold-standard, recommandé par l'INCa est la méthode moléculaire mais à visée diagnostique, il n'y a pas de recommandation et l'immunohistochimie *BRAF* V600E est privilégiée par les pathologistes.

1.4 Méthodes de détermination du statut *BRAF* V600E

A ce jour, la mise en place d'une thérapie ciblée requiert la recherche de cette mutation par une technique de BM. Plusieurs méthodes de BM sont actuellement validées : PCR quantitative, pyroséquençage, séquençage Sanger et NGS (séquençage de nouvelle génération). Une approche par immunohistochimie (IHC)

première utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la protéine B-Raf mutée V600E a été récemment proposée. De nombreuses études ont prouvé que la méthode immunohistochimique détecte avec une même sensibilité et une même spécificité la mutation *BRAF*^{V600E} que les méthodes de BM (Long et al., 2013), (Colomba et al., 2013), (Fisher et al., 2014)(Ihle et al., 2014). L'efficacité similaire et le faible coût de l'IHC en font un outil indispensable de détection des mutations *BRAF*^{V600E}. La valeur prédictive positive de l'IHC étant de 100%, elle peut être proposée seule pour le diagnostic positif de la mutation *BRAF*^{V600E} même s'il existe des ambiguïtés dans les recommandations HAS pour initier un traitement. La technique immunohistochimique est une technique rapide, réalisable dans un délai court. A contrario les techniques de BM nécessitent dans le meilleur des cas 2 à 3 jours. Par conséquent, l'immunohistochimie a toute sa place dans les situations d'urgence où une thérapie ciblée doit être initiée sans délai (INCa 2017). Cependant, en présence d'un résultat négatif de l'IHC *BRAF* V600E, une étude par BM complémentaire est nécessaire afin d'identifier les rares faux-négatifs et les variants non-V600E qui ne sont pas forcément détectés par l'anticorps.

L'immunohistochimie présente une place de choix dans les situations où les cellules tumorales représentent une faible proportion du prélèvement. Elle permettrait de détecter une mutation là où la BM échouerait par manque ou dilution de l'ADN tumoral.

1.5 Hétérogénéité ou homogénéité du statut BRAF

1.5.1 Contexte

La présence d'une hétérogénéité inter- ou intratumorale du statut BRAF dans le cadre du mélanome a été le sujet de nombreux débats au cours de ces dernières années (Grzywa et al., 2017). L'hétérogénéité intertumorale correspondrait à une différence du statut mutationnel de BRAF entre les métastases et la lésion primitive. Les études réalisées présentent des résultats discordants et il est difficile d'avoir une certitude scientifique pour le moment alors qu'un statut mutationnel hétérogène intertumorale est déterminant d'un point de vue théranostique. Notre hypothèse est que l'hétérogénéité tumorale, dans un certains nombres de cas, est factice et liée à des différences de sensibilité entre les techniques moléculaires. Nous souhaitons évaluer si la meilleure sensibilité de l'IHC BRAF V600E pour les lésions paucicellulaires permettrait d'attester ou non d'une homogénéité du statut BRAF V600E entre un mélanome primitif et ses différentes métastases. L'hétérogénéité inter-tumorale donnée par les études ayant recours à une méthode moléculaire, utilisaient majoritairement une amplification par PCR dont la sensibilité est imparfaite (Birkeland et al., 2018). L'argument mécanistique majeur sur lequel se base notre hypothèse est la description de la mutation *BRAF* comme une mutation « driver », en d'autres termes précoce et nécessaire et qui doit rester présente au cours du temps, de la tumeur primitive jusqu'aux métastases tant qu'une nouvelle pression de sélection n'intervient pas. Cela est plus amplement détaillé dans le paragraphe suivant.

1.5.2 BRAF : mutation « driver », évolution génétique du naevus au mélanome

Le profil mutationnel du mélanome est connu depuis quelques décennies, cependant l'ordre d'apparition des mutations dans le temps restait inconnu. La classification OMS 2018 des tumeurs cutanées a intégré la notion de chronologie des événements mutationnels pour classer les lésions mélanocytaires. Il s'avère que la majorité des nævus bénins acquis présentent une mutation de *BRAF* ou de *NRAS*. Cependant, ces mutations sont communes à toutes les étapes de progression du mélanocytome jusqu'au mélanome ce qui suggère que ces événements oncogéniques sont « driver ». Cependant, chaque prolifération mélanocytaire n'évolue pas systématiquement vers le mélanome. Les mutations « driver » peuvent voir leur effet oncogénique stoppé par la mise en œuvre de mécanismes de sénescence. En cas de défaillance de ces mécanismes de sénescence (ex : activation de la télomérase par mutation du promoteur de *hTERT*, perte d'activité de p16 par inactivation du gène *CDKN2A*, perte des activités de *TP53*, de *PTEN*, etc.), la prolifération tumorale se poursuit avec une accumulation d'altérations moléculaires et l'acquisition de caractéristiques de cellules cancéreuses, capables d'invasion (Shain and Bastian, 2016).

La notion de mutation « driver » s'étend aux mélanomes uvéaux, mélanomes de type bleu ou encore mélanomes de Spitz : en effet, lésions bénignes & malignes présentent la même anomalie génétique (mutation de *GNAQ*, *GNA11*, translocation, etc) comme l'illustre la **Figure 2** suivante.

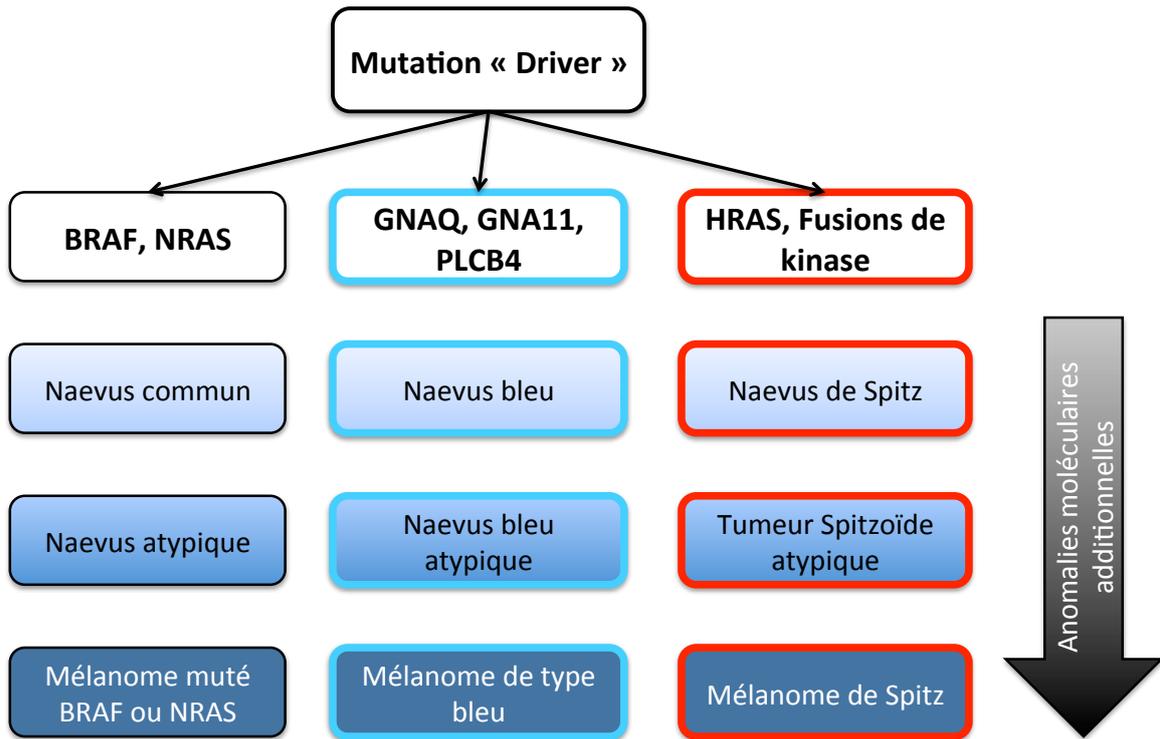


Figure 2 - Les mutations de *NRAS* et *BRAF* sont retrouvées dans les nævus communs, les nævus congénitaux et les mélanomes des zones insolées. Les mutations des gènes *GNAQ*, *GNA11*, *PLCB4* et *CYSLR2* sont identifiées dans les nævus bleus, les mélanomes de type bleu, les nævus et mélanomes uvéaux. Les mutations de *HRAS* et les fusions de gènes codant pour des protéines à activités tyrosine kinase sont caractérisées dans les nævus de Spitz et mélanomes de Spitz.

L'ordre d'apparition des mutations successives perturbant ces voies de signalisation n'est pas complètement élucidé et peut varier. Cependant la présence de certaines mutations pathogéniques identifiées au sein de lésions précurseurs et l'association de ces lésions précurseurs avec des types spécifiques de mélanome apportent d'importantes informations quant à la répartition temporelle.

Ainsi les mélanomes SSM ou « Low-CSD » présentent comme mutations « driver » et ce de façon exclusive, la mutation $BRAF^{V600E}$ ou $V600K$ ou des mutations du gène *NRAS*. Les mélanomes de Dubreuilh ou « High-CSD » diffèrent par des mutations « driver » des gènes *NF1*, *NRAS*, *KIT* ou $BRAF^{nonV600E}$. La mutation secondaire la

plus commune dans le mélanome touche le promoteur *TERT*. Cette mutation précoce dans l'oncogénèse permet à la cellule tumorale d'échapper au phénomène naturel de sénescence. Par la suite, d'autres mutations secondaires des gènes suppresseurs de tumeur tels que *CDNK2A*, *TP53*, *PTEN* ou *BAP1* sont observées.

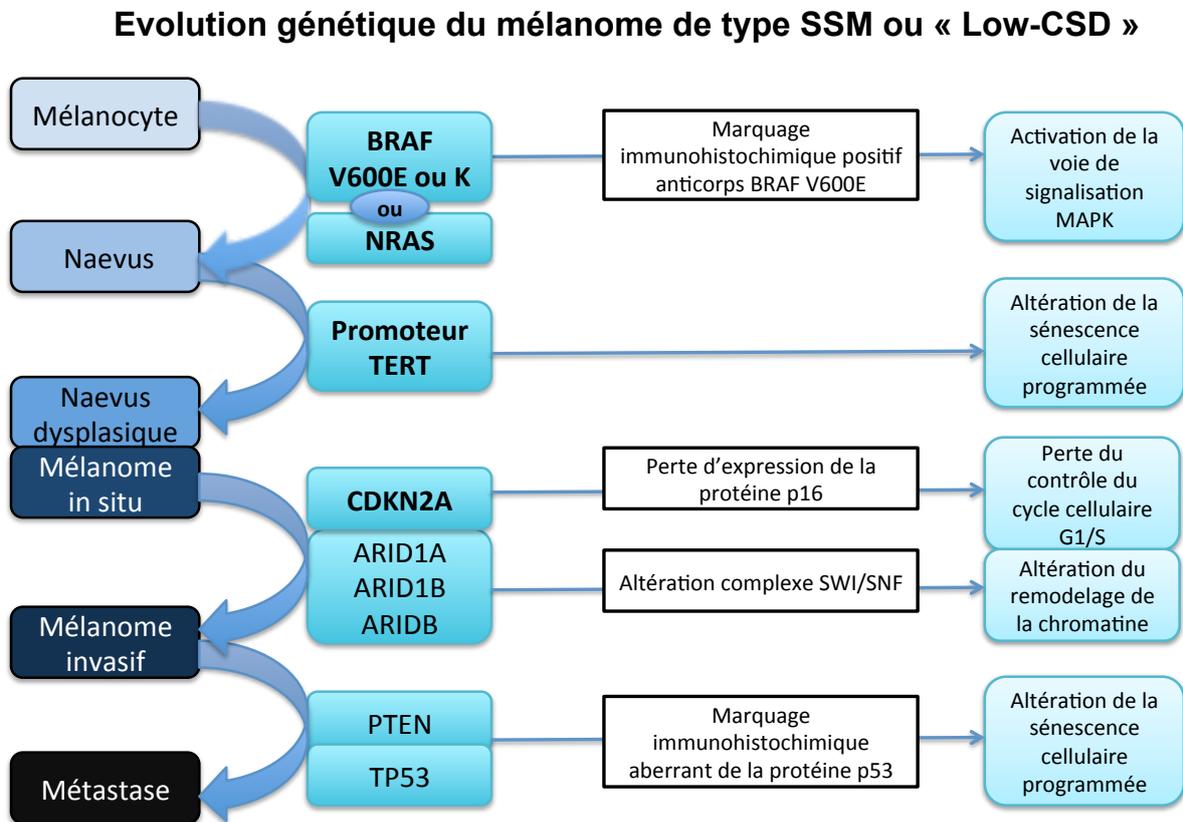


Figure 3 – Evolution génétique du mélanocyte au mélanome sur peau insolaée dans le cas du mélanome SSM ou « low-CSD » d'après l'article de Shain et Bastian « From melanocytes to melanoma »

Evolution génétique du mélanome de Dubreuilh ou « High-CSD »

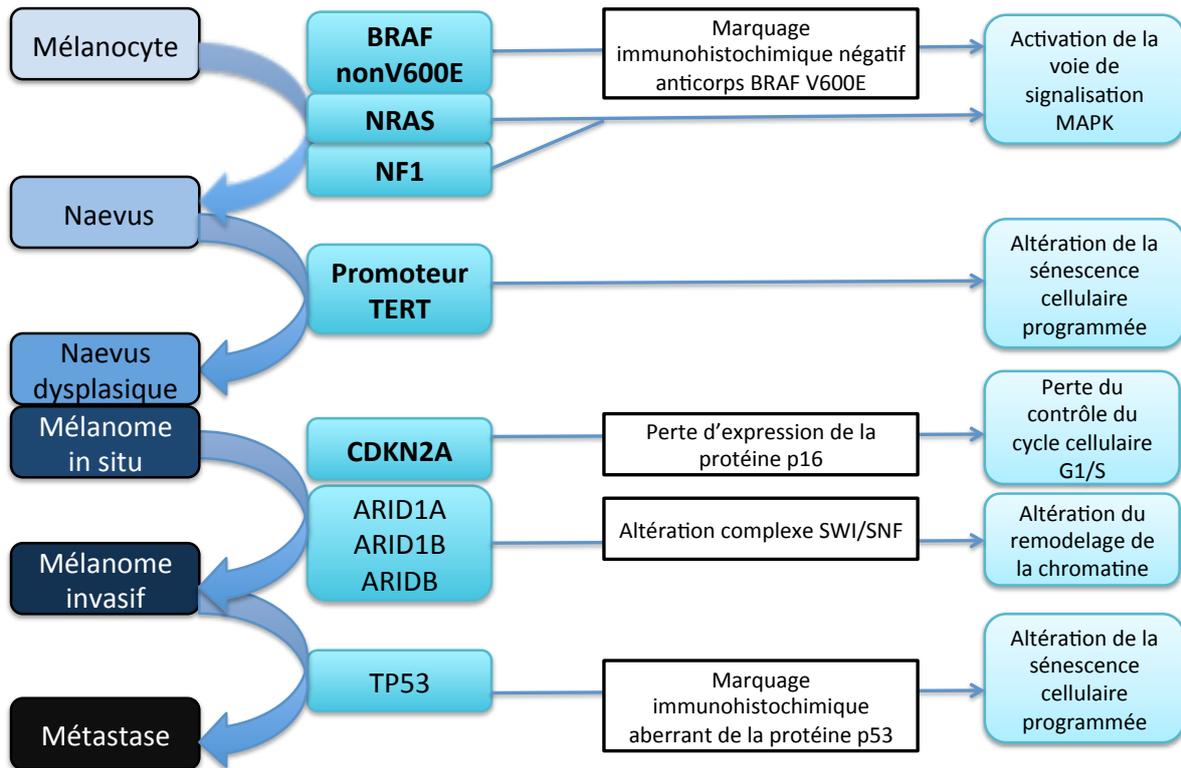


Figure 4 – Evolution génétique du mélanocyte au mélanome sur peau insolaée dans le cas du mélanome de Dubreuilh ou « high-CSD » d'après l'article de Shain et Bastian « From melanocytes to melanoma »

SYNTHESE DE L'INTRODUCTION

- *Le gène BRAF fait partie de la voie de signalisation MAPK.*
- *La mutation BRAF^{V600E} est une mutation « driver » présente dans 80% des naevus commun et dans 40 à 50% des mélanomes.*
- *Cette mutation est théranostique : sa présence ouvre la voie aux thérapies ciblées anti-BRAF (Vemurafenib/Dabrafenib).*
- *La classification histomoléculaire est basée en partie sur le statut BRAF des lésions mélanocytaires.*
- *Pour le diagnostic, la recherche de la mutation BRAF^{V600E} permet d'exclure les lésions bleues ou Spitzziennes qui miment des mélanomes*
- *La recherche de cette mutation BRAF peut être réalisée par de nombreuses méthodes, notamment moléculaires. Cependant la méthode immunohistochimique est aussi performante et nécessite moins de temps. Par ailleurs, il semblerait que cette méthode soit plus efficace lorsqu'il existe peu de cellules tumorales.*
- *L'homogénéité ou l'hétérogénéité du statut BRAF V600E inter-tumoral est un sujet controversé avec des études discordantes. Le caractère « driver » de cette mutation est plutôt en faveur d'une homogénéité de ce statut entre primitif & métastases. Notre hypothèse est que l'hétérogénéité tumorale, dans un certains nombres de cas, est factice et liée à une sensibilité imparfaite des techniques moléculaires historiquement utilisées.*

2. OBJECTIFS

L'objectif principal de ce travail était de définir les **performances diagnostiques** de l'IHC dirigée contre la forme mutée V600E de la protéine B-Raf (clone VE1), avec les conditions techniques propres à notre laboratoire, sur une cohorte rétrospective de prélèvements de mélanomes diagnostiqués au sein du service d'anatomie et cytologie pathologiques & neuropathologie du CHU de La Timone de l'AP-HM (Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille) : la technique a été validée en utilisant les résultats obtenus avec une ou des techniques externes de biologie moléculaire.

Lorsque plusieurs prélèvements différents étaient disponibles, une analyse de l'homogénéité du statut BRAF V600E entre les prélèvements a aussi été réalisée. Comme l'immunohistochimie est une technique morphologique interprétée par un observateur, cette cohorte était l'occasion d'établir des recommandations claires et didactiques concernant son interprétation et ses pièges.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1 Critères d'inclusion

Sur la période de 2017 à 2018, dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques de l'hôpital de La Timone, les patients pour lesquels un diagnostic de mélanome a été posé et pour lesquels une analyse moléculaire a été réalisée, ont été retenus pour cette étude : au total, 141 patients ont été intégrés dans la base de données, en accord avec le Règlement Général européen relatif à la Protection des Données personnelles (RGPD, Fiche de déclaration n°2019-100 auprès de l'AP-HM).

Pour chacun de ces patients, un recueil de données cliniques, histologiques & moléculaires a été réalisé, répertoriant : sexe, âge au diagnostic, décès, histotype du mélanome, localisation du primitif, localisation du prélèvement (si métastase), épaisseur selon Breslow, statut du ganglion sentinelle, curage ganglionnaire & mise en place d'une thérapie ciblée ou d'une immunothérapie.

Pour chaque prélèvement, le type de lésion est précisé, s'il s'agit d'une lésion primitive, d'une métastase cutanée, d'une métastase viscérale, d'une métastase osseuse ou d'un ganglion. Pour chaque ganglion, lorsque l'information était disponible, il est indiqué s'il s'agit d'un ganglion sentinelle ou d'un ganglion issu d'un curage ainsi que la taille de la métastase.

Pour chaque patient, un ou plusieurs prélèvements ont été intégrés au recueil de données afin de nous donner un aperçu de l'évolution du statut mutationnel de BRAF entre différentes cibles et dans le temps.

3.2 Technique immunohistochimique BRAF V600E

Pour chacun des prélèvements, l'immunohistochimie BRAF V600E, a été réalisée dans des conditions standards : une lame d'épaisseur 4 µm a été fraîchement coupée à partir du bloc de paraffine tumoral utilisé pour la biologie moléculaire. Cette lame a été colorée par un automate d'immunohistochimie Benchmark ULTRA (Ventana, Roche Diagnostics), après déparaffinage, en utilisant l'anticorps anti-BRAFV600E (clone VE1, Eurobio Scientific), un prétraitement par la chaleur avec un tampon CC1 de 224 minutes, l'incubation de l'anticorps était de 32 minutes à 37°C avec une dilution de 1/250. La révélation de l'anticorps utilise un chromogène DAB avec un système d'amplification par polymères (OptiView ventana). Par la suite, une goutte d'hématoxyline est déposée suivie d'une incubation de 4 minutes afin d'obtenir une contre-coloration. Toutes les lames étaient réalisées en incluant un témoin interne extrinsèque, constitué d'un punch tissulaire échantillonné à partir d'un mélanome présentant une forte immunoréactivité pour la protéine B-Raf mutée V600E, préalablement confirmée par biologie moléculaire :

l'évaluation du signal du témoin permet de déterminer si la lame peut être interprétée ou non. L'interprétation de la technique était rigoureuse : les lames dont le signal du témoin était négatif ou faible étaient considérées comme non-contributives et re-contrôlées sur une nouvelle lame par une nouvelle technique.

L'immunomarquage BRAF V600E pouvait être classé en positif, négatif et douteux. La positivité était définie par la présence d'un marquage marron, intense, finement granuleux intra-cytoplasmique, dont l'intensité était comparable à celle du témoin interne : aucun seuil de nombre de cellules était défini car le marquage était toujours global avec cependant des hétérogénéités en termes d'expression. Tous les cas hyperpigmentés ou dont l'intensité de marquage était inférieure au témoin ont été considérés comme douteux, réévalués par deux pathologistes et contrôlés sur une nouvelle lame. Les cas négatifs étaient définis par une absence complète de marquage, définie par une teinte bleutée, sans bruit de fond, car seule l'hématoxyline de la contre-coloration pouvait être visualisée. Toutes les lames d'immunohistochimie BRAF V600E ont été évaluées en double aveugle par deux pathologistes (EM et NM) et les lames discordantes ont été ré-interprétées au microscope multi-tête afin d'établir un consensus – toutes les lames classées douteuses ont été réévaluées sur une nouvelle lame et après consensus.

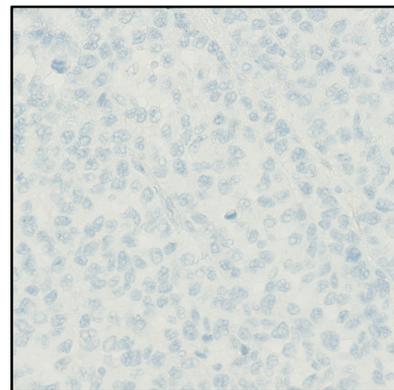
Chaque prélèvement a alors été codé en fonction de l'interprétation : 0=négatif, 1=positif, 2=douteux.

3.3 Interprétation de l'immunohistochimie BRAF V600E

3.3.1 Interprétation 0= négative

Pour rappel, la méthodologie d'interprétation des marquages permettait de rendre un résultat négatif qu'en cas d'absence totale de coloration avec la présence d'un témoin interne, fortement positif. Cette interprétation pouvait nettement être gênée par le pigment mélanique et dans ce cas, le résultat était douteux donc ininterprétable.

Illustrations d'une IHC BRAF V600E négative de type 0



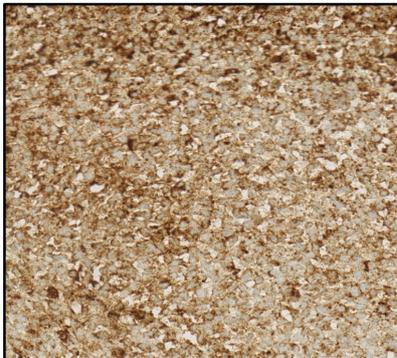
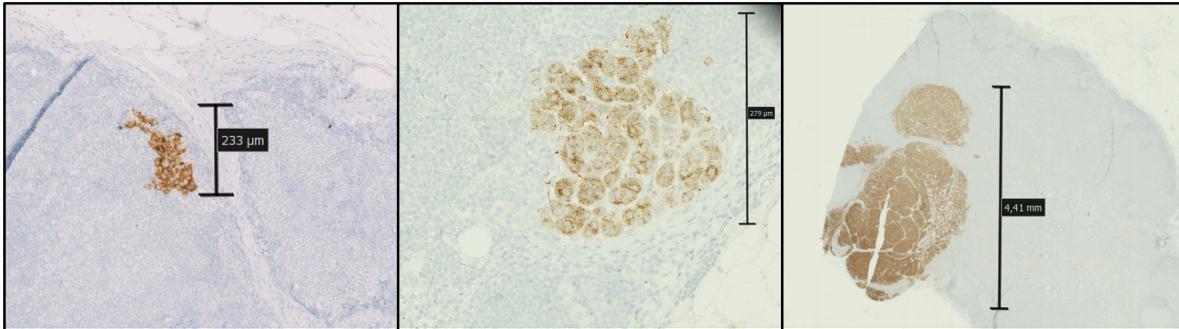
ABSENCE totale de marquage avec un **TEMOIN** interne extrinsèque positif intense



3.3.2 Interprétation 1= positive

L'immunohistochimie BRAF V600E était interprétée comme positive si le marquage était intense, cytoplasmique et granuleux sans bruit de fond ou artéfacts sur la lame, son intensité devait être d'une intensité équivalente à celle du témoin interne.

Illustrations d'une IHC BRAF V600E positive de type 1

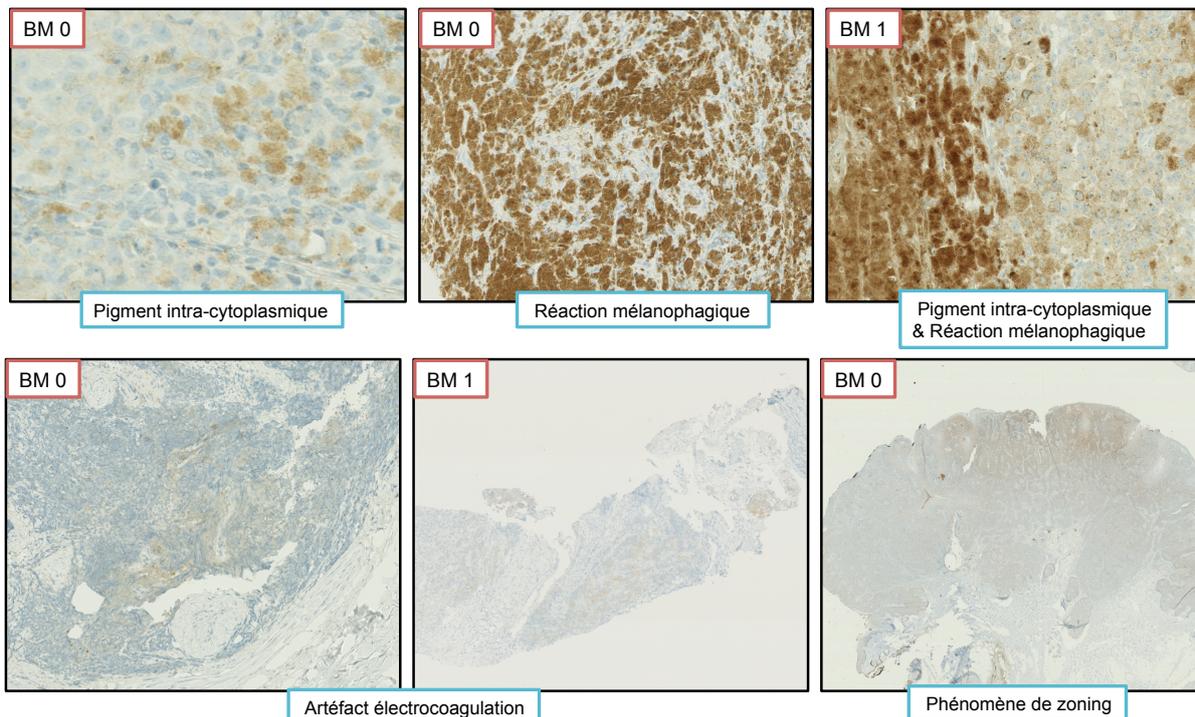


Marquage GRANULEUX, CYTOPLASMIQUE, INTENSE

3.3.4 Interprétation 2= douteuse

Dans certains cas, l'interprétation formelle était impossible car le marquage équivoque : ces cas ont été classés comme douteux. Les motifs d'interprétation douteuse sont nombreux au premier rang desquels la présence d'un pigment mélanique intra-cytoplasmique. Cette pigmentation peut être évaluée par la réalisation d'une lame blanche ou d'une contre-coloration Optiview mais prend plus de temps et ne permet pas toujours de résoudre l'incertitude. De même, une importante infiltration par des mélanophages peut gêner l'analyse des cellules tumorales. Enfin, un marquage hétérogène, faible ou avec un phénomène de zoning complique l'interprétation. Ces anomalies peuvent être dues à un défaut de fixation formolée. Par ailleurs, la présence d'artéfacts d'électrocoagulation, d'écrasement ou la nécrose tumorale peut rendre la lecture délicate.

Illustrations d'une IHC BRAF V600E douteuse de type 2



3.4 Validation moléculaire

Pour les prélèvements ayant bénéficié d'une analyse moléculaire de l'exon 15 du gène *BRAF*, le pourcentage cellulaire, le type d'analyse et les résultats d'analyse ont été colligés – le statut mutationnel BRAF V600E était codé suivant la nomenclature suivante : 0= non muté, 1=muté. Trois types d'approches analytiques ont été évaluées : PCR-HRM séquençage SANGER, Séquençage NGS et PCR digitale.

Pour les cas présentant une discordance entre le statut immunohistochimique BRAF V600E et l'analyse de biologie moléculaire que ce soit PCR-HRM-SANGER ou NGS, une seconde analyse a été réalisée en utilisant une technique plus sensible, et ce à partir du même ADN extrait, exception faite des cas présentant de rares cellules tumorales qui furent d'emblée analysées par technique de PCR digitale.

L'ensemble des analyses moléculaires, exceptées les analyses en PCR digitale, a été réalisé au laboratoire de transfert d'oncologie biologique de l'hôpital Nord (AP-HM) du Pr L'Houcine OUAFIK. L'extraction d'ADN a été réalisée après macrodissection des lames blanches, préalablement cerclée par le pathologiste avec évaluation semi-quantitative de la cellularité tumorale. Toute analyse d'ADN de tissu tumoral aussi bien pour la PCR-HRM que pour le séquençage, s'accompagne de deux contrôles qualité interne (CQI), un ADN ayant un profil non-muté connu et un ADN ayant un profil muté connu. La technique PCR-HRM criblant les mutations par analyse des profils de dissociation d'amplicons après qPCR a été réalisée sur le thermocycleur enregistreur Roche LightCycler 480. Cette technique est plus sensible que le séquençage direct Sanger dont la sensibilité est de 20% (Wojdacz and Dobrovic, 2007). Cependant, selon l'analyse des profils donnés par la technique HRM, cette dernière peut être complétée par un séquençage direct utilisant la méthode Sanger. Ce complément d'analyse Sanger correspond au Gold Standard et fait foi, il est réalisé sur le séquenceur 3500DX d'Applied Biosystem™. Le seuil de sensibilité du criblage par qPCR-HRM a été déterminé sur des ADN mutés dilués avec de l'ADN non-muté. Ainsi, pour le gène *BRAF* la dernière dilution permettant la détermination du statut génétique est à 10%. La même chose a été accomplie pour le séquençage direct dont le seuil de détection est à 20%. Ainsi la sensibilité dans

des conditions optimales pour le HRM et le séquençage SANGER peut être évaluée à 90% et 80%, respectivement.

Les analyses par séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été réalisées sur le séquenceur IonS5™ XL System de ThermoFisher à l'aide du panel OST et OST+ et disposent d'un contrôle interne. La sensibilité du NGS dans les conditions techniques optimales et propres au laboratoire d'oncologie biologique a été évaluée à 98%.

La technique de PCR digitale, qui consiste à répartir le volume réactionnel dans environ 20 000 chambres réactionnelles, où chaque réaction de PCR sera isolée et ciblée sur un brin d'ADN, est capable de détecter des allèles très rares (rapport mutant/sauvage de l'ordre de 1/10 000). De fait, cette technique est considérée actuellement comme l'une des techniques ciblées les plus sensibles. Nous avons utilisé le kit de PCR digitale ID-BRAF développé par l'entreprise Id-Solution (Grabels, France). Les gouttelettes ont été générées en utilisant le système AutoDGTM (Bio-Rad). Après incubation de l'émulsion de gouttelettes dans un thermocycleur, les produits de PCR ont été analysés sur un automate QX200™ Droplet Digital™ (Bio-Rad). Enfin, l'analyse qualitative et quantitative, basée sur l'application de la loi de Poisson, a été réalisée en utilisant le logiciel Quantasoft™ PRO (Bio-Rad). Après analyse et quantification du nombre de gouttelettes positives dans chaque canal, un résultat de mutation est considéré comme positif lorsque 1) le nombre d'évènements mutés positifs est supérieur ou égal à la limite de détection (LoD) de 3 gouttelettes 2) la concentration d'ADN non-muté est supérieure ou égale à 10 copies/μL et 3) le nombre total de gouttelettes est supérieur ou égal à 10 000.

Cas témoins négatifs

Afin de valider la négativité de la technique immunohistochimique, six cas négatifs en immunohistochimie BRAF V600E et en séquençage NGS ont bénéficié d'une analyse supplémentaire par la technique moléculaire la plus sensible, à savoir la PCR digitale, sur les mêmes ADN extraits.

3.5 Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism version 8.0e (Graphpad software). Les intervalles de confiance des paramètres de performance diagnostique ont été obtenus grâce à la méthode Wilson-Brown.

4. RESULTATS

4.1 Description de la cohorte

Caractéristiques de la cohorte		
Caractéristiques cliniques des 141 patients		
Sexe	Femme	73 (52%)
	Homme	68 (48%)
Âge médian		68 ans
Type du primitif	SSM	63 (45%)
	Dubreuilh	3 (2%)
	Acro-lentigineux	22 (16%)
	Muqueux	8 (6%)
	Nodulaire	20 (14%)
	Autres*	25 (18%)
Nombre de prélèvements	1	66 (47%)
	>2	75 (53%)
	>3	30 (21%)
	>4	16 (11%)
Caractéristiques des 277 prélèvements		
Type de prélèvement	Primitif	59 (21%)
	Ganglion	96 (35%)
	Métastase cutanée	84 (30%)
	Métastase viscérale	29 (10%)
	Métastase osseuse	9 (3%)
* : Primitifs inconnus, mélanome uvéal, mélanomes inclassables, mélanome desmoplastique et mélanome naevoïde		

Tableau 2 - Résumé des caractéristiques cliniques

Parmi les 141 patients : 75 soit 53% disposaient d'au moins deux prélèvements différents.

Sur 277 prélèvements, seuls 229 étaient exploitables pour l'étude immunohistochimique. Les cas inexploitablement étaient liés soit à un épuisement du matériel soit à une indisponibilité de celui-ci. Ainsi 229 prélèvements, soit 83% de l'ensemble des prélèvements, ont bénéficié d'un marquage immunohistochimique BRAF V600E et 232 prélèvements, soit 84% des cas d'une analyse moléculaire.

4.2 Résultats de l'immunodétection BRAF V600E

Globalement, parmi les 229 prélèvements exploitables, l'immunohistochimie dirigée contre la forme mutée V600E de la protéine B-Raf était interprétée comme positive dans 34% des cas.

IHC BRAF V600E			
0 = Négatif	1 = Positif	2 = Douteux	Total
130 (57%)	79 (34%)	20 (9%)	229

Tableau 3 - Résultats de l'immunohistochimie BRAF V600E sur 229 prélèvements

Les résultats de l'immunohistochimie BRAF V600E selon l'histotype du mélanome sont détaillés dans le **Tableau 3** ci-contre.

Type de primitif	IHC Négatif (-)	IHC Positif (+)	IHC Douteux
LMM (high-CSD)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
SSM (low-CSD)	20 (41%)	27 (55%)	2 (4%)
Nodulaire	5 (36%)	7 (50%)	2 (14%)
ALM (no-CSD)	15 (79%)	2 (11%)	2 (11%)
Muqueux	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Autres	11 (58%)	8 (42%)	0(0%)

Tableau 4 – Résultats de l'immunohistochimie BRAF V600E selon l'histotype du mélanome

Parmi 19 cas dont l'interprétation était douteuse : la mutation $BRAF^{V600E}$ fut néanmoins étayée en biologie moléculaire pour 8 cas et la mutation $BRAF^{V600K}$ pour 2 cas. Pour les 9 autres cas, aucune mutation $BRAF$ ne fut identifiée par la BM. La concordance entre IHC BRAF V600E et BM était quasi-parfaite pour les cas négatifs & positifs avec un seul cas discordant dans chaque catégorie. Il existait cependant de nombreuses discordances entre IHC BRAF V600E et biologie moléculaire selon

la sensibilité de l'approche moléculaire utilisée, discordances qui sont explorées et détaillées ci-après.

4.3 Exploration des discordances : immunohistochimie BRAF V600E versus biologie moléculaire

Pour 9 cas discordants ayant un immunomarquage BRAF V600E positif mais une biologie moléculaire négative, de nouvelles analyses moléculaires plus sensibles ont été réalisées par technique NGS ou PCR digitale.

Tableau 5 - Résumé des cas discordants : immunodétection BRAF V600E positive mais biologie moléculaire négative

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% cellulaire	100	100	100	5	20	20	50	90	10
Taille lésion (mm)	4,41	4	10	5	0,2	0,47	1	2,5	0,3
Type de prélèvement	G	M	GS	GS	GS	G	M	G	GS
IHC BRAFV600E positive	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui
Primitif BRAF ^{V600E}	oui	-	-	-	-	oui	-	-	-
Autre* BRAF ^{V600E}	oui	non	oui	-	-	oui	oui	oui	oui
HRM BRAF ^{V600E}	non	non	non	non	non	non	non	non	-
NGS BRAF ^{V600E}	-	oui	non	-	-	-	oui	non	non
PCR digitale BRAF ^{V600E}	oui	-	oui	non**	oui	oui	-	oui	oui
Fréquence allélique (%)	0,89	97,98	1,38	-	0,28	1,80	4,82	1,65	0,38

G : Ganglion, GS : Ganglion Sentinelle M : Métastase ; * Autre prélèvement analysé ** après grattage de la lame IHC BRAF et HPS

Pour ces 9 cas, la taille moyenne de la lésion est < 3 mm et le pourcentage cellulaire moyen est de 55%.

Pour les cas n°2 et n°7 l'analyse NGS redresse le diagnostic de mutation *BRAF*^{V600E}, avec des fréquences alléliques de 97,98% et 4,82%. Pour les 6 autres cas exception faite du cas n°4, l'analyse par PCR digitale rétablit le diagnostic de mutation avec des fréquences alléliques très faibles, inférieures à 2%. Exceptés pour les cas n°4 et n°5 nous disposons d'un second prélèvement tumoral concordant avec l'IHC BRAF V600E.

Pour le cas n° 4, bien que le statut IHC BRAF V600E rendu soit positif, aucune mutation *BRAF*^{V600E} après analyse HRM ou PCR digitale n'a pu être confirmée. Pour ce cas, nous ne disposons que de très peu de matériel, correspondant à une métastase ganglionnaire inférieure à 1 mm, comprenant moins de 30 cellules, et d'aucun autre prélèvement tumoral. C'est pourquoi une seconde analyse par PCR digitale a été réalisée après cerclage et microdissection des lames déjà colorées par IHC et HPS afin de cumuler le matériel disponible : cette analyse a révélé de façon surprenante une duplication du gène *BRAF*.

4.4 Performances diagnostiques : immunohistochimie BRAF V600E versus biologie moléculaire

Les données obtenues par l'immunohistochimie BRAF V600E ont été comparées, cas par cas, aux résultats obtenus par la biologie moléculaire car, d'après l'HAS la BM représente le test « gold standard » avant toute mise en place d'un traitement inhibiteur BRAF. Dans notre étude, les résultats obtenus en biologie moléculaire prennent en compte l'exploration des cas discordants.

Tableau 6 - Comparaison de l'IHC BRAF V600E vs BM (toutes techniques confondues), NGS, HRM et digital PCR pour 164 cas

Gold Standard	Sensibilité		Spécificité	
	Estimation	IC 95%	Estimation	IC 95%
BM (toutes techniques confondues)	98%	(IC95 = 92-100)	99%	(IC95 = 95-100)
NGS	100%	(IC95 = 87-100)	93%	(IC95 = 82-98)
HRM	100%	(IC95 = 90-100)	88%	(IC95 = 78-94)
PCR digitale	86%	(IC95 = 49-99)	75%	(IC95 = 30-99)

Gold Standard	Valeur prédictive positive		Valeur prédictive négative	
	Estimation	IC 95%	Estimation	IC 95%
BM (toutes techniques confondues)	98%	(IC95 = 92-100)	99%	(IC95 = 95-100)
NGS	90%	(IC95 = 74-96)	100%	(IC95 = 91-100)
HRM	80%	(IC95 = 66-90)	100%	(IC95 = 94-100)
PCR digitale	86%	(IC95 = 49-99)	75%	(IC95 = 30-99)

L'expression immunohistochimique de BRAF V600E présentait une excellente sensibilité pour la détermination du statut muté V600E : 98% (IC95 : 92-100). La spécificité était remarquable à 99% (IC95 : 95-100). Ces résultats ont été obtenus en utilisant comme gold-standard le résultat de la technique de biologie moléculaire la plus sensible utilisée pour chaque cas. Pour mémoire, un cas faussement négatif et un cas faussement positif sont rapportés.

Les performances diagnostiques, et notamment la spécificité de l'immunohistochimie BRAF V600E, étaient biaisées lorsque le gold-standard sélectionné était une technique de biologie moléculaire de sensibilité imparfaite : ainsi, à titre illustratif, les

spécificités de l'immunohistochimie BRAF V600E en utilisant PCR-HRM comme comparateur puis le NGS étaient respectivement de 88% et de 93%, variations qui sont amplement développées dans la discussion.

Avec la PCR digitale en test référent, la sensibilité et spécificité étaient respectivement de 86% ((IC95 = 49-99) et 75% (IC95 = 30-98) mais ces résultats ont aussi été biaisés par le faible nombre d'échantillons testés et par la sélection d'échantillons problématiques avec les autres techniques.

4.5 Exploration de l'évolution du statut BRAF V600E

Pour 69 patients, nous disposons d'un statut $BRAF^{V600E}$, donné soit par IHC BRAF V600E, soit par BM pour au moins deux sites tumoraux différents, que ce soit de type primitif/métastase ou de type métastase/métastase. Pour 26 patients nous disposons du statut BRAF V600E pour 3 à 7 sites tumoraux différents. Les résultats IHC BRAF V600E rendus douteux ont été exclus de cette analyse.

Parmi les 69 patients, deux patients présentaient une hétérogénéité du statut BRAF V600E entre plusieurs échantillons : les prélèvements de ces deux patients bénéficièrent d'analyses de biologie moléculaire complémentaires.

Tableau 7 - Exploration hétérogénéité du statut BRAF V600E

	1	2
% cellulaire	90%	70%
Taille lésion	12 mm	-
Type de prélèvement	Ganglion	Os
IHC BRAF V600E positive	-	non
Primitif $BRAF^{V600E}$	-	-
Autre prélèvement $BRAF^{V600E}$	oui	oui
HRM $BRAF^{V600E}$	non	non
NGS $BRAF^{V600E}$	oui	-
digital PCR $BRAF^{V600E}$	-	oui
Fréquence allélique	4,21%	37,00%

Pour le cas n°1, il existait une discordance entre un ganglion métastatique dont le statut BRAF V600E analysé par BM (HRM) était négatif et une métastase cutanée pour laquelle l'IHC et la BM révélèrent une mutation *BRAF*^{V600E}. L'analyse IHC BRAF V600E ne pouvant être réalisée sur le ganglion métastatique, une analyse par technique NGS a été faite sur le même ADN extrait. Ceci permit d'identifier la présence d'une mutation *BRAF*^{V600E} avec une fréquence allélique de 4,21% non détectée par technique HRM et Sanger : ainsi l'hétérogénéité du statut BRAF V600E était en fait liée à un défaut de détection de la technique moléculaire initialement utilisée, alors que l'immunohistochimie BRAF V600E était positive dans tous les cas.

Pour le cas n°2, il subsistait une discordance entre une métastase cutanée ayant une IHC BRAF V600E et une analyse NGS en faveur de la mutation et une métastase osseuse ayant une IHC BRAF V600E négative et une analyse HRM non muté. S'agissant d'un prélèvement osseux, une décalcification fut réalisée avant la réalisation des lames blanches. Cette décalcification peut entraîner une altération de la structure de l'ADN et des protéines et engendrer des résultats immunohistochimiques et génotypiques faux. L'analyse PCR digitale réalisée fait état d'une mutation *BRAF*^{V600E} avec une fréquence allélique à 37%, mutation qui n'a pas été détectée par l'immunohistochimie BRAF V600E.

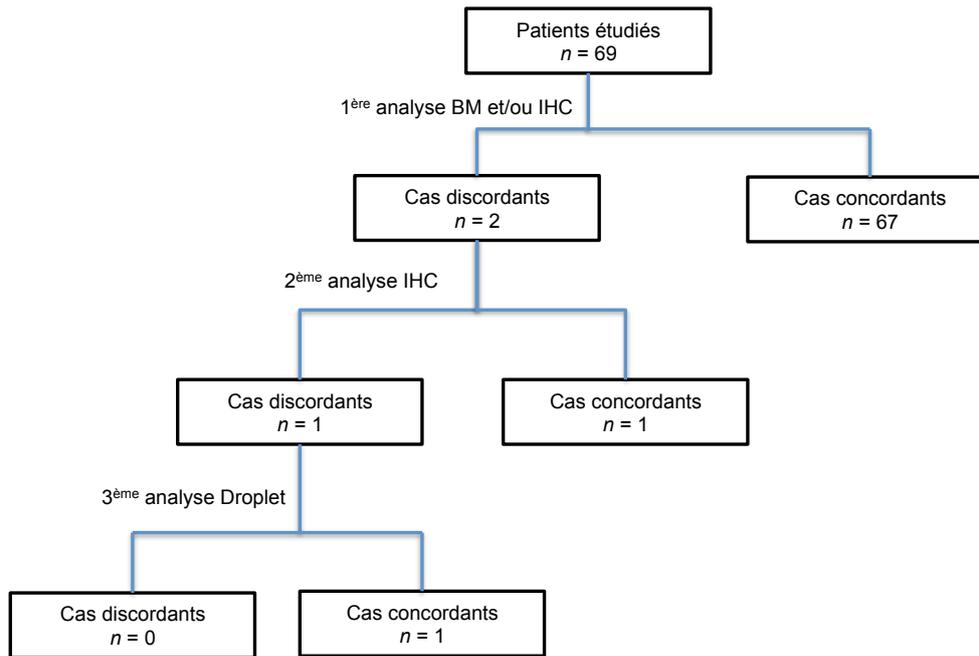


Figure 5 - Flow-chart des patients ayant de multiples échantillons tumoraux.

En conclusion, l'utilisation de l'IHC BRAF V600E et de la PCR digitale a révélé l'homogénéité de l'expression $BRAF^{V600E}$ dans 100% des échantillons appariés étudiés ($n=69$).

4.6 Bilan d'impact décalcification

Afin d'expliquer la perte d'expression de la protéine B-Raf mutée dans la métastase osseuse un bilan d'impact consistant à plonger dans du décalcifiant un bloc de paraffine comportant un naevus muté $BRAF^{V600E}$ et à réaliser à J0, J1, J2 et J3 une nouvelle immunohistochimie a été réalisé. Ceci n'a pas permis d'identifier de diminution de l'intensité du marquage immunohistochimique BRAF V600E. Aucune corrélation entre le temps de décalcification et le marquage n'a été mise en évidence. Au contraire, ceci permet d'illustrer la variabilité de l'intensité de marquage selon la technique. En effet, l'intensité était plus forte à J2 ou J3 qu'elle ne l'était à

J1. Cette variabilité est inhérente à la réalisation de la technique et implique de nombreux biais externes.

4.7 Importance d'un témoin négatif

Tableau 8 - Témoins négatifs par technique PCR digitale

	1	2	3	4	5	6
% cellulaire	30%	>80%	<5%	>80%	100%	100%
Type de prélèvement	G	G	GS	G	M	M
IHC BRAF V600E positive	non	non	-	non	non	non
HRM <i>BRAF</i> ^{V600E}	-	non	non	non	non	non
NGS <i>BRAF</i> ^{V600E}	non	-	-	-	-	-
PCR digitale <i>BRAF</i> ^{V600E}	non	non	non	non	non	non
Sensibilité maximale	0,03	0,03	0,002	0,01	0,58	2,25

L'utilisation de la technique PCR digitale comme technique « gold standard » pour les cas discordants ayant un immunomarquage BRAF V600E positif et une biologie moléculaire négative a imposé que plusieurs témoins négatifs soient réalisés. Ces cas ont été choisis pour leurs immunomarquages BRAF V600E négatifs ou douteux cohérents les résultats négatifs de l'analyse moléculaire correspondante. Après PCR digitale, aucun cas n'a révélé de mutation *BRAF*^{V600E} avec des sensibilités maximales allant de 0,002 à 2,25%.

5. DISCUSSION

Établir parfaitement le statut mutationnel du gène *BRAF* d'un mélanome à des implications diagnostiques & thérapeutiques importantes : en effet, l'introduction d'un traitement BRAF-inhibiteur chez un patient dont la tumeur ne renfermerait pas de

mutation activatrice peut conduire à une progression paradoxale (Hatzivassiliou et al., 2010), à l'inverse un manque de sensibilité risque d'empêcher un patient potentiellement éligible de bénéficier de ce type de thérapie. Notre travail a porté sur les performances diagnostiques de l'immunohistochimie BRAF V600E par rapport à différentes techniques moléculaires, l'analyse des discordances et des échecs techniques, l'analyse de l'hétérogénéité du statut BRAF chez un même patient, et surtout les points critiques liés à l'interprétation du marquage. Chacun de ces points sera discuté individuellement.

5.1 Performances diagnostiques de l'anticorps BRAF VE1 & revue de la littérature

L'ensemble des données discutées & les références associées sont synthétisées dans le **Tableau 6** : l'immunohistochimie détectant la forme mutée V600E de la protéine B-Raf en utilisant l'anticorps VE1 dans notre étude présentait une sensibilité de **98%** en utilisant comme gold-standard la synthèse de toutes les analyses moléculaires réalisées, utilisant des techniques de sensibilité croissante. Ces résultats sont cohérents voire légèrement meilleurs que les données de sensibilité rapportées dans la littérature, où la sensibilité moyenne est de 94%. La spécificité, évaluée à **99%** dans notre cohorte, est supérieure aux données de la littérature, dont la spécificité moyenne est de 96%. Le premier anticorps disponible, clone VE1, a été commercialisé en 2011 par plusieurs fournisseurs : Spring Biosciences, Roche Ventana, NewEast Biosciences. Un autre anticorps, utilisant le clone RM8 a été commercialisé depuis, mais aucune donnée n'est disponible sur ses performances diagnostiques dans la littérature.

La revue de la littérature réalisée reprend les caractéristiques du clone VE1, le plus largement utilisé, indépendamment du fournisseur (SpringBiosciences, Roche Ventana & NewEast Biosciences).

Auteur	Année	Cas	IHC BRAF VE1		Comparateur : gold standard
			Sen.	Spé.	
Capper et al.	2011	47	100%	100%	Western Blot
Long et al.	2011	100	97%	98%	HRM, MALDI-TOF
Skorokhod et al.	2012	29	86%	100%	Séquençage Sanger
Boursault et al.	2013	230	97%	100%	HRM, Séquençage Sanger
Busam et al.	2013	51	100%	100%	MALDI-TOF*
Colomba et al.	2013	111	100%	100%	Séquençage Sanger, PCR cobas, pyroséquençage
Feller et al.	2013	35	100%	97%	Séquençage Sanger, Allele specific PCR
Hofman et al.	2013	98	96%	100%	Pyroséquençage
Lade-Keller et al.	2013	28	93%	100%	PCR cobas
Routhier et al.	2013	31	90%	95%	SNaP-shot
Chen et al.	2014	38	100%	93%	Pyroséquençage
Ehsani et al.	2014	25	100%	47%	PCR cobas
Fisher et al.	2014	122	89%	98%	PCR cobas
Ihle et al.	2014	63	100%	98%	HRM, Sanger, Allele specific PCR, Pyroséquençage, NGS
Just et al.	2014	101	95%	100%	NGS
Liu et al.	2014	84	72%	100%	Séquençage Sanger
Pearlstein et al.	2014	76	85%	100%	Pyroséquençage
Eriksson et al.	2015	200	97%	95%	Pyroséquençage
Jabbar et al.	2015	115	97%	99%	NGS
Knol et al.	2015	63	96%	100%	Allele specific PCR
Loes et al.	2015	64	87%	100%	HRM, Sanger, Pyroséquençage
Qiu et al.	2015	41	100%	100%	Sanger, PCR cobas
Thiel et al.	2015	102	100%	97%	Cyclic minisequencing analysis
Harlé et al.	2016	59	82%	100%	NGS
Huang et al.	2016	73	100%	98%	Séquençage sanger
Kakavand et al.	2016	754	100%	99%	MALDI-TOF*, PCR directe
Lo et al.	2016	219	94%	95%	PCR cobas, Séquençage Sanger
Manfredi et al.	2016	161	99%	98%	HRM
Lyu et al.	2017	50	97%	100%	Séquençage
Sener et al.	2017	98	83%	94%	PCR cobas, Pyroséquençage
Bisshop et al.	2018	39	94%	95%	HRM, Sanger, NGS
Etienne et al.	2018	207	100%	99%	Sanger
Orchard et al.	2019	71	81%	100%	Sanger
Vallée et al.	2019	55	82%	100%	Sanger, digital PCR

*HRM : Highly Resolution Melting, NGS : Next Generation Sequencing, PCR : Polymerase Chain Reaction, MALDI-TOF : Spectrométrie de masse (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) - (TOF = time-of-flight), RT-PCR : Real Time PCR,

Tableau 9 - Caractéristiques individuelles de chaque étude rapportant les performances diagnostiques de l'immunohistochimie BRAF de 2011 à 2019

En synthétisant toutes les données de la littérature, soit 34 études, soit 3640 tests immunohistochimiques : l'immunohistochimie BRAF V600E utilisant le clone VE1 présente une sensibilité et spécificité moyenne de respectivement 94% et 97% : ces résultats sont sensiblement comparables aux nôtres.

5.2 Discordances

De manière générale, 10 cas (6%) présentaient des résultats discordants entre immunohistochimie BRAF V600E et une technique de biologie moléculaire, mais seulement deux cas avec toutes techniques confondues, 19 cas (10%) présentaient un marquage douteux ou non-interprétable et 10 cas (5%) présentaient une mutation *BRAF^{nonV600E}*. Les cas indubitablement positifs ou négatifs ont été utilisés pour calculer les performances diagnostiques de l'immunohistochimie par rapport à la biologie moléculaire et notamment explorer les discordances.

Sur les 10 cas discordants, 9 cas présentaient une immunohistochimie BRAF V600E positive mais sans qu'une mutation soit mise en évidence en biologie moléculaire et 1 cas présentait une immunodétection BRAF V600E négative alors qu'une des analyses moléculaires rapportait la présence d'une mutation V600E.

A visée exploratoire, nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire de sensibilité croissante – en effet, l'évaluation de la performance d'un test diagnostique repose sur la comparaison à un gold-standard, or selon l'approche moléculaire utilisée la sensibilité peut être imparfaite. De fait, lorsqu'un cas était discordant avec une technique donnée, une technique de biologie moléculaire plus sensible a été utilisée : nous allons détailler la sensibilité respective de chacune des approches techniques, puis nous détaillerons les 10 cas discordants.

5.3 Analyse des 9 cas discordants : immunodétection positive mais biologie moléculaire négative

5.3.1 Cas discordants en PCR-HRM, séquençage SANGER

Cinq cas discordants entre IHC BRAF V600E et PCR-HRM sont synthétisés dans le tableau suivant : deux cas ont pu être rattrapés par séquençage NGS et trois cas par PCR digitale.

Discordance IHC & HRM	IHC BRAF V600E	HRM-séquençage	Séquençage NGS	Digital PCR
1	Positif	Négatif	4.82%	-
2	Positif	Négatif	97.98%	-
3	Positif	Négatif	-	0.28%
4	Positif	Négatif	-	0.89%
5	Positif	Négatif	-	1.80%

Pour le cas n°2, avec une fréquence allélique de 97,98%, la mutation n'avait pas été détectée par technique HRM en raison de l'aspect inhabituel de la courbe de fusion, secondaire à la présence quasiment unique du clone muté et à l'absence de cellules non tumorales sur le prélèvement. La méthode Sanger réalisée par la suite a permis d'identifier la mutation. Trois autres cas étaient discordants, mais caractérisés par une faible densité tumorale (cas n°3, 4 et 5) – ces cas ont été vérifiés par digital PCR, qui a mis en évidence la mutation *BRAF*^{V600E} avec des fréquences alléliques très faibles, inférieures aux seuils de détection du séquençage NGS.

5.3.2 Cas discordants en séquençage NGS, IonS5 - ThermoFischer : panel OST/OST+

Discordance IHC & HRM	IHC BRAF V600E	HRM-séquençage	Séquençage NGS	Digital PCR
1	Positif	-	Négatif	0.38%
2	Positif	-	Négatif	1.38%
3	Positif	-	Négatif	1.65%

La technique de PCR digitale a permis de révéler une mutation $BRAF^{V600E}$, avec des fréquences alléliques de 0,38%, 1,38% et 1,65%, respectivement, pour trois cas négatifs par séquençage NGS.

5.3.3 Cas discordant en digital PCR

Discordance IHC & HRM	IHC BRAF V600E	HRM-séquençage	Séquençage NGS	Digital PCR
1	Positif	Négatif	-	Négatif

La PCR digitale n'a pas mis en évidence de mutation $BRAF^{V600E}$ pour un cas, malgré deux analyses successives et plusieurs ré-extraction d'ADN tumoral : ce cas est inhabituel car l'analyse révéla une duplication du domaine kinase du gène $BRAF$, altération génomique rencontrée principalement aux niveaux des tumeurs du système nerveux central et notamment des astrocytomes de bas grade. Une analyse *in vivo*, utilisant la technique de « patients-derived xenografts » a montré l'apparition de cette anomalie dans 10% des cas ayant initialement la mutation $BRAF^{V600E}$, comme mécanisme de résistance au traitement (Kemper et al., 2016). En l'occurrence, concernant ce prélèvement, aucun traitement n'est relevé dans le dossier médical du patient au moment où le prélèvement a été effectué. Bien qu'aucune mutation n'ait été identifiée par biologie moléculaire pour notre cas, on peut émettre deux hypothèses : soit un manque de sensibilité de la technique

moléculaire dans ce cas précis, soit un manque de spécificité de l'immunohistochimie avec un immunomarquage trompeur, lié à une modification conformationnelle de la protéine B-Raf.

5.4 Analyse du cas discordant : immunodétection BRAF V600E négative mais biologie moléculaire positive

Ce seul cas discordant correspondait à une métastase osseuse, qui a bénéficié d'une décalcification : l'immunomarquage BRAFV600E était négatif, malgré des témoins internes positifs, et ce à plusieurs reprises - ce traitement chimique pré-analytique est connu pour altérer à la fois l'immunohistochimie mais aussi les résultats de biologie moléculaire. Or l'analyse en digital PCR a confirmé la présence d'une mutation *BRAF*^{V600E} avec 37% de fraction allélique mutée.

Afin de vérifier l'impact de la décalcification sur les tissus fixés et inclus en paraffine, nous avons étudié l'expression de l'IHC BRAFV600E sur un bloc de paraffine faisant l'objet de durée de décalcification croissante. Aucun impact majeur n'a été mis en évidence. Ces résultats sont discordants avec une étude antérieure, portant sur 4 tumeurs, à la mutation *BRAF*^{V600E} confirmée, sur échantillons jumelés non décalcifiés et décalcifiés, qui rapportait une disparition de l'immunomarquage sur les prélèvements décalcifiés (Bourhis et al., 2019). Cette étude suggère qu'une nouvelle analyse d'impact soit réalisée directement sur tissus non-inclus en paraffine, en conditions réelles.

En synthèse, un seul cas testé par immunohistochimie était faussement positif, alors que 9 cas étaient faussement négatifs en utilisant une technique moléculaire : il apparaît donc intéressant d'utiliser les résultats combinés pour évaluer les performances diagnostiques, dans notre étude, des tests moléculaires que sont la PCR-HRM et le NGS. Pour mémoire, 20 cas, soit 9% ont été considérés comme ayant un marquage douteux, non-interprétable en immunohistochimie, et peuvent être considérés comme des échecs techniques : tous ces cas ont pu cependant être détectés par biologie moléculaire.

5.5 Limites de sensibilité de chacune des techniques moléculaires

Nous avons souhaité évaluer les performances diagnostiques de la PCR-HRM et du séquençage NGS contre l'immunohistochimie et la PCR digitale : cette dernière étant une technique moléculaire très sensible permettant de détecter des mutants très rares de l'ordre de 0,0001 %.

Tableau 10 - Comparaison de la PCR-HRM et du séquençage NGS aux résultats combinant l'IHC BRAF V600E et la digital PCR.

	Sensibilité		Spécificité	
	Estimation	IC 95%	Estimation	IC 95%
HRM	82%	(IC= 68- 91)	100%	(IC95 = 94-100)
NGS	90%	(IC95 = 74-97)	100%	(IC95 = 91-100)

	Valeur prédictive positive		Valeur prédictive négative	
	Estimation	IC 95%	Estimation	IC 95%
HRM	100%	(IC95 = 90-100)	89%	(IC95 = 80-95)
NGS	100%	(IC95 = 87-100)	93%	(IC95 = 82-98)

En utilisant la PCR-HRM avec séquençage Sanger, la sensibilité de la biologie moléculaire a été évaluée à 82%. Le laboratoire de transfert d'oncologie biologique de l'hôpital Nord ayant déterminé pour seuil de détection la mutation *BRAF*^{V600E} avec une fréquence allélique à 10% : en deçà, la détection de la mutation n'est pas validée ou identifiée. Par conséquent, les discordances de la comparaison de l'IHC BRAF V600E à la PCR-HRM sont relatives à la sensibilité de la technique PCR-HRM et à ses limites de détections intrinsèques.

Le séquençage NGS présente une sensibilité évaluée à 90%: le seuil de détection mutationnel du séquençage NGS réalisé au laboratoire de transfert d'oncologie biologique de l'hôpital Nord est de 2%.

Les limites de détection de la biologie moléculaire sont multifactorielles, amplement liées à la phase pré-analytique et à la quantité d'ADN analysée : les seuils de détection sont donnés dans des conditions optimales – ainsi, ils dépendent de la fréquence allélique du mutant au sein de la tumeur (hétérogénéité intra-tumorale), à la qualité et quantité d'ADN extrait, à la quantité de noyaux tumoraux sélectionnés sur la lame blanche, à la qualité du cerclage de la lame par le pathologiste, à l'épuisement éventuel du matériel tumoral avec les plans de coupe successifs pour préparer le matériel à extraire et à la contamination par des cellules à l'ADN non-muté (stroma, micro-environnement tumoral, inflammation, etc...) en d'autres termes, au ratio ADN mutés / ADN *wild-type*. L'ensemble de ces facteurs peut limiter la sensibilité de chacune des techniques moléculaires – à noter qu'hormis les conditions de fixation et d'épuisement de matériel, les autres facteurs n'interfèrent que très peu sur la technique immunohistochimique, qui est morphologique et permet d'identifier au microscope la mutation *BRAF* même s'il n'existe que très peu de cellules mutées.

Compte-tenu des performances diagnostiques de l'immunohistochimie, les résultats ont permis d'évaluer l'homogénéité du statut *BRAF* V600E sur plusieurs prélèvements pour un même patient.

5.6 Homogénéité du statut *BRAF* V600E

L'ère de la thérapie ciblée a introduit une nouvelle perspective thérapeutique pour les patients atteints de mélanome. Compte-tenu de l'impact thérapeutique majeur que cela impliquerait, l'absence de certitude concernant l'évolution du statut *BRAF* et la supposée homogénéité de ce statut entre différentes localisations tumorales génèrent de nombreuses interrogations : est-ce que le statut *BRAF* reste identique au cours du temps ? Si ce dernier change, dans quel sens ? Les métastases acquièrent-elles la mutation *BRAF*^{V600E} ou la perdent-elles ? Et enfin, sera-t-il nécessaire de rechercher le statut *BRAF* V600E sur la métastase si l'on a le statut du primitif ? Bien que la mutation *BRAF*^{V600E} soit un événement précoce et

semble avoir un rôle critique dans l'initiation de la tumeur (mutation driver), son expression au cours de la progression tumorale reste controversée (Davies et al., 2002). Nos résultats suggèrent une homogénéité du statut BRAF V600E entre primitifs et métastases chez un même patient et alimentent la discussion autour de cette question.

De nombreux auteurs affirment que l'hétérogénéité est évidente (Saint-Jean et al., 2014), (Valachis and Ullenhag, 2017). Des taux de discordances de 15 à 55%, entre le statut BRAF V600E de deux localisations tumorales ont été décrits dans plusieurs études (Bradish et al., 2015), (Lee et al., 2018), (Yancovitz et al., 2012), (Heinzerling et al., 2013), (Colombino et al., 2013). Par ailleurs, l'existence d'une hétérogénéité inter-tumorale de la mutation $BRAF^{V600E}$ pourrait servir les mécanismes de résistance au traitement.

A contrario, quelques auteurs soulignent l'homogénéité du statut BRAF V600E inter-tumoral. Récemment, (Nielsen et al., 2018) a comparé le statut IHC BRAF V600E de 82 mélanomes primitifs à 224 métastases associées, chez des patients sans mélanome multiple. Cette étude révèle une homogénéité du statut mis à part pour un cas dont la lésion primitive était $BRAF^{V600E}$ mutée et la métastase $BRAF^{V600K}$ mutée & $BRAF^{V600E}$ non-mutée. Bien que les patients présentant des mélanomes multiples aient été exclus de cette étude, il est suggéré que pour ce cas un second mélanome encore ignoré avec un statut BRAF différent soit présent. Par ailleurs, dans l'article de (Riveiro-Falkenbach et al., 2015) qui compare 140 cas de primitifs appariés à une métastase, le test moléculaire cobas rapportait une hétérogénéité du statut dans 16,4% des cas alors qu'à l'inverse, l'immunohistochimie anti-BRAF V600E montrait un statut homogène dans 100% des cas.

En synthèse, ces données soulèvent des interrogations sur la sensibilité des techniques moléculaires utilisées, qui ont pu induire une fausse impression d'hétérogénéité tumorale.

Cela peut être expliqué par les approches techniques utilisées : en effet, les études suggérant une hétérogénéité du statut BRAF V600E ont recours à des analyses moléculaires nécessitant une amplification par PCR. Or la PCR est essentielle pour

générer les bibliothèques d'ADN à séquencer. La qualité de ces bibliothèques est inhérente à la réalisation du protocole de PCR, important générateur de biais de méthode (van Dijk et al., 2014). Par ailleurs, comme dit précédemment l'efficacité de telles méthodes moléculaires dépend du ratio ADN mutés / ADN *wild-type* relatif à la phase pré-analytique (précédemment détaillée au chapitre 5.3 intitulé « limites de sensibilité de chacune des techniques moléculaires »). A l'inverse, les études qui proposent une homogénéité du statut BRAF reposent sur le statut BRAF V600E donné par l'immunohistochimie. Cette information souligne l'important avantage que représente l'analyse morphologique des prélèvements, contrairement à la biologie moléculaire qui dépend de nombreux autres facteurs, comme la cellularité et la sélection rigoureuse des zones tumorales à analyser.

Bien que notre étude rejoigne l'hypothèse d'une homogénéité du statut BRAF V600E, il faut noter que ces données sont souvent basées sur des prélèvements soumis à l'examen pathologique ; or, pour de nombreux patients il est impossible de pratiquer la documentation histomoléculaire de l'ensemble des métastases et de confirmer définitivement le concept.

5.7 Avantages de l'IHC BRAF V600E

Pour conclure la technique immunohistochimique comporte de nombreux avantages : son caractère morphologique & sa sensibilité, son vaste champ d'utilisation, ainsi que ses avantages logistiques à savoir sa rapidité de réalisation, d'interprétation, et son coût.

Le principal avantage de l'IHC BRAF V600E repose sur l'analyse morphologique des prélèvements, c'est-à-dire visualiser *in situ* si la protéine anormale est présente au sein d'une cellule, même si le nombre de cellules est très restreint : a priori, il serait théoriquement possible d'établir la positivité dès qu'une seule cellule est marquée. L'immunohistochimie BRAF V600E présente une sensibilité supérieure pour les prélèvements pauci-cellulaires contrairement aux techniques moléculaires qui, bien que les zones tumorales soient cerclées et macro-disséminées sur la lame, manquent

en sensibilité pour identifier le statut de quelques cellules baignant dans un environnement non-tumoral riche en ADN *wild-type*. De plus, contrairement aux autres techniques de détermination moléculaire du statut BRAF V600E, l'IHC ne requiert pas d'amplification par PCR, génératrice de biais.

L'immunohistochimie BRAF V600E présente de nombreuses indications et n'est pas restreinte au seul mélanome. Comme développé dans le chapitre « indications de BRAF à visée diagnostique », de nombreux mélanocytomes sont diagnostiqués à l'aide du statut BRAF V600E. Au-delà de la pathologie mélanocytaire, l'immunohistochimie BRAF V600E est désormais utilisée dans le diagnostic différentiel de tumeurs thyroïdiennes de type NIFT-P versus carcinome papillaire, dans les lésions améloblastiques de la région ORL et dans certaines tumeurs annexielles comme le syringocystadénome papillifère. Son évaluation est importante pour déterminer le pronostic et les voies moléculaires du cancer colorectal.

Enfin, l'un des avantages de l'IHC tient à la rapidité d'obtention du résultat et à son implémentation rapide sur une plateforme d'anatomie pathologique. Dans notre service de pathologie, le délai minimal pour obtenir un statut BRAF V600E en IHC est de 4h – en moyenne dans des conditions de routine normale, il est de 24h. Le délai pour l'obtention des résultats en biologie moléculaire dépend de la technique utilisée (PCR-HRM ou séquençage NGS) et il est augmenté par le temps nécessaire à la préparation des lames, leur transfert, l'enregistrement, l'extraction et les étapes ultérieures. Par ailleurs la lecture est rapide lorsque le pathologiste est formé et ne nécessite pas d'évaluation de l'intensité de marquage. A noter que les coûts sont aussi différents (Annexe).

5.8 Limites de l'IHC BRAF V600E

La principale limite de l'immunohistochimie est qu'elle identifie uniquement la mutation $BRAF^{V600E}$. Or les patients mutés $BRAF^{V600K}$ sont aussi éligibles à la thérapie ciblée anti-BRAF. Par conséquent, tous les cas négatifs en immunohistochimie BRAF V600E devront toujours bénéficier d'une analyse moléculaire complémentaire. Par ailleurs, les limites du recours seul, à

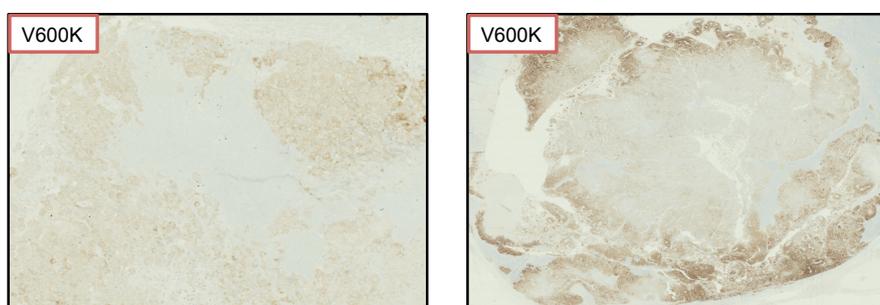
l'immunohistochimie pour déterminer le statut BRAF V600E sont aussi relatives à son impact clinique. A ce jour, aucune étude d'impact utilisant uniquement l'analyse IHC BRAF V600E comme indication à la mise en place d'un traitement par thérapie ciblée anti-BRAF n'a été réalisée. Le bénéfice clinique à retirer d'une détermination immunohistochimique unique du statut BRAF V600E est incertain. Il y aurait un risque majeur à rendre des résultats faux positifs étant donné le caractère compliqué de sa lecture & la possibilité de progressions paradoxales. Ces patients subiraient alors les effets néfastes d'un traitement inutile. Néanmoins, dans ces circonstances et surtout au vu de l'excellente sensibilité de cette technique, un pourcentage non négligeable de mutations V600E non détectées par analyse moléculaire permettrait à des patients éligibles d'en bénéficier. Ces suppositions suggèrent qu'une situation optimale nécessite un algorithme décisionnel utilisant systématiquement l'immunohistochimie BRAF V600E comme méthode de pré-screening.

L'un des écueils de l'immunohistochimie BRAF V600E tient à sa difficulté d'interprétation. Celle-ci est relative d'une part, à la qualité du prélèvement lui-même mais aussi inhérente à la technique elle-même. La qualité d'interprétation d'un prélèvement est liée à la présence d'une nécrose des cellules tumorales, à des artefacts d'écrasement ou d'électro-coagulation, à la présence d'une réaction mélanophagique péri-tumorale mais surtout à l'existence d'un pigment mélanique au sein du cytoplasme des cellules tumorales. Quant à la qualité de la technique, celle-ci relève initialement du temps d'ischémie froide, de la durée de fixation, de la quantité de formol utilisée ainsi que de la taille des prélèvements inclus. Par la suite l'épaisseur de la coupe réalisée, l'absence de plis lors de la réalisation de la lame entrent en jeu. Le protocole de réalisation de l'immunohistochimie est impliqué. Enfin, les compétences d'interprétation de chaque pathologiste, relative à sa formation entrent en jeu.

Cas particuliers, mutés $BRAF^{V600K}$

Dans 2 cas, l'IHC BRAF V600E était positive alors que l'analyse moléculaire révélait la présence d'une mutation $BRAF^{V600K}$. La fixation de l'IHC BRAF V600E est adaptée à la conformation de la forme mutée V600E de la protéine B-Raf cependant on observe, ponctuellement, une fixation de la forme mutée V00K de la protéine B-Raf. En effet, la conformation des deux protéines mutées est proche ce qui peut induire une erreur de fixation par l'anticorps.

Illustrations d'une IHC BRAF V600E positive de type 1 mutation V600K



5.9 En synthèse : positionnement proposé de l'IHC BRAF V600E

Les techniques moléculaires pourraient n'être nécessaires qu'en cas d'immunohistochimie BRAF V600E négative afin de ne pas méconnaître une mutation $BRAF^{nonV600E}$, alors seuls 40% à 60% des prélèvements feraient l'objet d'une détermination du statut mutationnel BRAF par biologie moléculaire. Néanmoins, ne pas confirmer le résultat positif de l'IHC BRAF V600E par une méthode moléculaire suppose des critères histologiques d'interprétation très rigoureux, encadrés et validés à l'instar du statut HER2 dans les cancers du sein et de l'estomac. Dans ces conditions, la phase pré-analytique correspondant aux techniques de réalisation de l'IHC BRAF V600E devra répondre aux critères de qualité COFRAC suivant la norme ISO 15189.

6. CONCLUSION

Cette étude permet de valider la technique immunohistochimique BRAF V600E employée dans le service d'ACP de La Timone et confirme la qualité de ce test diagnostique. Néanmoins, sa lecture n'est pas facile et nécessite une habilitation du pathologiste impliqué. Dans notre étude, l'immunohistochimie a permis de détecter plus de mutation $BRAF^{V600E}$ que la biologie moléculaire. Cette meilleure sensibilité sur les prélèvements pauci-cellulaires en fait un atout majeur dans la détermination du statut BRAF V600E et suggère qu'une confirmation moléculaire systématique, lorsque l'immunohistochimie est positive, est superflue. Cependant, la délivrance des thérapies ciblées par la pharmacie et l'inclusion dans certains essais thérapeutiques impliquent actuellement une validation moléculaire.

A l'instar de plusieurs articles, notre étude souligne une homogénéité du statut BRAF V600E, concordant avec son statut de gène « driver ». Cette mise en lumière est un argument supplémentaire pour un screening systématique du statut BRAF du primitif afin de limiter la documentation histo-moléculaire des métastases pour mettre en place une thérapie anti-BRAF.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alrabadi, N., Gibson, N., Curless, K., Cheng, L., Kuhar, M., Chen, S., Warren, S.J.P., and Alomari, A.K. (2019). Detection of driver mutations in BRAF can aid in diagnosis and early treatment of dedifferentiated metastatic melanoma. *Modern Pathology* 32, 330–337.

Amaria, R.N., Prieto, P.A., Tetzlaff, M.T., Reuben, A., Andrews, M.C., Ross, M.I., Glitza, I.C., Cormier, J., Hwu, W.-J., Tawbi, H.A., et al. (2018). Neoadjuvant plus adjuvant dabrafenib and trametinib versus standard of care in patients with high-risk, surgically resectable melanoma: a single-centre, open-label, randomised, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 19, 181–193.

Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., et al. (2009). Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology* 27, 6199–6206.

Ballantyne, A.D., and Garnock-Jones, K.P. (2013). Dabrafenib: First Global Approval. *Drugs* 73, 1367–1376.

Bastian, B.C. (2014). The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 9, 239–271.

Bastian, B.C., LeBoit, P.E., and Pinkel, D. (2000). Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am. J. Pathol.* 157, 967–972.

Beadling, C., Jacobson-Dunlop, E., Hodi, F.S., Le, C., Warrick, A., Patterson, J., Town, A., Harlow, A., Cruz, F., Azar, S., et al. (2008). KIT Gene Mutations and Copy Number in Melanoma Subtypes. *Clinical Cancer Research* 14, 6821–6828.

Birkeland, E., Zhang, S., Poduval, D., Geisler, J., Nakken, S., Vodak, D., Meza-Zepeda, L.A., Hovig, E., Myklebost, O., Knappskog, S., et al. (2018). Patterns of genomic evolution in advanced melanoma. *Nature Communications* 9.

Bisschop, C., ter Elst, A., Bosman, L.J., Platteel, I., Jalving, M., van den Berg, A., Diepstra, A., van Hemel, B., Diercks, G.F.H., Hospers, G.A.P., et al. (2018). Rapid BRAF mutation tests in patients with advanced melanoma: comparison of immunohistochemistry, Droplet Digital PCR, and the Idylla Mutation Platform. *Melanoma Research* 28, 96–104.

Botton, T., Yeh, I., Nelson, T., Vemula, S.S., Sparatta, A., Garrido, M.C., Allegra, M., Rocchi, S., Bahadoran, P., McCalmont, T.H., et al. (2013). Recurrent BRAF kinase fusions in melanocytic tumors offer an opportunity for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 26, 845–851.

Bourhis, A., Le Flahec, G., and Uguen, A. (2019). Decalcification can cause the failure of *BRAF* molecular analyses and anti-BRAFV600E VE1 immunohistochemistry. *Pathology International* 69, 219–223.

Boursault, L., Haddad, V., Vergier, B., Cappellen, D., Verdon, S., Bellocq, J.-P., Jouary, T., and Merlio, J.-P. (2013). Tumor homogeneity between primary and metastatic sites for BRAF status in metastatic melanoma determined by immunohistochemical and molecular testing. *PLoS ONE* 8, e70826.

Bradish, J.R., Richey, J.D., Post, K.M., Meehan, K., Sen, J.D., Malek, A.J., Katona, T.M., Warren, S., Logan, T.F., Fecher, L.A., et al. (2015). Discordancy in BRAF mutations among primary and metastatic melanoma lesions: clinical implications for targeted therapy. *Modern Pathology* 28, 480–486.

Brose, M.S., Volpe, P., Feldman, M., Kumar, M., Rishi, I., Gerrero, R., Einhorn, E., Herlyn, M., Minna, J., Nicholson, A., et al. (2002). BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res.* 62, 6997–7000.

Busam, K.J., Hedvat, C., Pulitzer, M., von Deimling, A., and Jungbluth, A.A. (2013). Immunohistochemical Analysis of BRAFV600E Expression of Primary and Metastatic Melanoma and Comparison With Mutation Status and Melanocyte Differentiation Antigens of Metastatic Lesions: *The American Journal of Surgical Pathology* 37, 413–420.

Busam, K.J., Shah, K.N., Gerami, P., Sitzman, T., Jungbluth, A.A., and Kinsler, V. (2017). Reduced H3K27me3 Expression Is Common in Nodular Melanomas of Childhood Associated With Congenital Melanocytic Nevi But Not in Proliferative Nodules: *The American Journal of Surgical Pathology* 41, 396–404.

Capper, D., Preusser, M., Habel, A., Sahm, F., Ackermann, U., Schindler, G., Pusch, S., Mechtersheimer, G., Zentgraf, H., and von Deimling, A. (2011). Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathologica* 122, 11–19.

Chen, Q., Xia, C., Deng, Y., Wang, M., Luo, P., Wu, C., Yue, J., Fang, N., Wang, M., and Wei, S. (2014). Immunohistochemistry as a quick screening method for clinical detection of BRAF(V600E) mutation in melanoma patients. *Tumor Biology* 35, 5727–5733.

Clark, W.H., Elder, D.E., and Van Horn, M. (1986). The biologic forms of malignant melanoma. *Human Pathology* 17, 443–450.

Cohen, J.N., Joseph, N.M., North, J.P., Onodera, C., Zembowicz, A., and LeBoit, P.E. (2017). Genomic Analysis of Pigmented Epithelioid Melanocytomas Reveals Recurrent Alterations in PRKAR1A, and PRKCA Genes: *The American Journal of Surgical Pathology* 41, 1333–1346.

Colomba, E., Hélias-Rodzewicz, Z., Von Deimling, A., Marin, C., Terrones, N., Pechaud, D., Sured, S., Côté, J.-F., Peschaud, F., Capper, D., et al. (2013). Detection of BRAF p.V600E mutations in melanomas: comparison of four methods argues for sequential use of immunohistochemistry and pyrosequencing. *J Mol Diagn* 15, 94–100.

Colombino, M., Lissia, A., Capone, M., De Giorgi, V., Massi, D., Stanganelli, I., Fonsatti, E., Maio, M., Botti, G., Caracò, C., et al. (2013). Heterogeneous distribution of BRAF/NRAS

mutations among Italian patients with advanced melanoma. *Journal of Translational Medicine* 11, 202.

Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P.E., et al. (2005). Distinct Sets of Genetic Alterations in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 353, 2135–2147.

Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic Activation of KIT in Distinct Subtypes of Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 24, 4340–4346.

Dai, J., Tetzlaff, M.T., Schuchter, L.M., Elder, D.E., and Elenitsas, R. (2016). Histopathologic and mutational analysis of a case of blue nevus-like melanoma: Analysis of a case of BNLM. *Journal of Cutaneous Pathology* 43, 776–780.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.

van Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., and Thermes, C. (2014). Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research* 322, 12–20.

Edlundh-Rose, E., Egyházi, S., Omholt, K., Månsson-Brahme, E., Platz, A., Hansson, J., and Lundeberg, J. (2006). NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res.* 16, 471–478.

Ehsani, L., Cohen, C., Fisher, K.E., and Siddiqui, M.T. (2014). BRAF Mutations in Metastatic Malignant Melanoma: Comparison of Molecular Analysis and Immunohistochemical Expression. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 22, 648–651.

Eriksson, H., Zebary, A., Vassilaki, I., Omholt, K., Ghaderi, M., and Hansson, J. (2015). BRAF^{V600E} Protein Expression in Primary Cutaneous Malignant Melanomas and Paired Metastases. *JAMA Dermatology* 151, 410.

Etchevers, H.C., Rose, C., Kahle, B., Vorbringer, H., Fina, F., Heux, P., Berger, I., Schwarz, B., Zaffran, S., Macagno, N., et al. (2018). Giant congenital melanocytic nevus with vascular malformation and epidermal cysts associated with a somatic activating mutation in *BRAF*. *Pigment Cell & Melanoma Research* 31, 437–441.

Etienne, M., Oca, F., Prunier-Mirebeau, D., Croué, A., and Martin, L. (2018). L'immunohistochimie (clone VE1) est une méthode économique, spécifique et sensible pour détecter la présence d'une mutation BRAFV600E dans le mélanome. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 145, 159–165.

Faries, M.B., Thompson, J.F., Cochran, A.J., Andtbacka, R.H., Mozzillo, N., Zager, J.S., Jahkola, T., Bowles, T.L., Testori, A., Beitsch, P.D., et al. (2017). Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *New England Journal of Medicine* 376, 2211–

2222.

Feller, J.K., Yang, S., and Mahalingam, M. (2013). Immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody as a screening tool for the BRAFV600E mutational status in primary cutaneous malignant melanoma. *Modern Pathology* 26, 414–420.

Fisher, K.E., Cohen, C., Siddiqui, M.T., Palma, J.F., Lipford, E.H., and Longshore, J.W. (2014). Accurate detection of BRAF p.V600E mutations in challenging melanoma specimens requires stringent immunohistochemistry scoring criteria or sensitive molecular assays. *Hum. Pathol.* 45, 2281–2293.

Furney, S.J., Pedersen, M., Gentien, D., Dumont, A.G., Rapinat, A., Desjardins, L., Turajlic, S., Piperno-Neumann, S., de la Grange, P., Roman-Roman, S., et al. (2013). SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov* 3, 1122–1129.

Govender, D., and Chetty, R. (2012). Gene of the month: BRAF. *J. Clin. Pathol.* 65, 986–988.

Griewank, K.G., Müller, H., Jackett, L.A., Emberger, M., Möller, I., van de Nes, J.A., Zimmer, L., Livingstone, E., Wiesner, T., Scholz, S.L., et al. (2017). SF3B1 and BAP1 mutations in blue nevus-like melanoma. *Mod. Pathol.* 30, 928–939.

Grzywa, T.M., Paskal, W., and Włodarski, P.K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Translational Oncology* 10, 956–975.

Harbour, J.W., Onken, M.D., Roberson, E.D.O., Duan, S., Cao, L., Worley, L.A., Council, M.L., Matatall, K.A., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2010). Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science* 330, 1410–1413.

Harlé, A., Salleron, J., Franczak, C., Dubois, C., Filhine-Tressarieu, P., Leroux, A., and Merlin, J.-L. (2016). Detection of BRAF Mutations Using a Fully Automated Platform and Comparison with High Resolution Melting, Real-Time Allele Specific Amplification, Immunohistochemistry and Next Generation Sequencing Assays, for Patients with Metastatic Melanoma. *PLOS ONE* 11, e0153576.

Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J.C., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 464, 431–435.

Heinzerling, L., Baiter, M., Kühnapfel, S., Schuler, G., Keikavoussi, P., Agaimy, A., Kiesewetter, F., Hartmann, A., and Schneider-Stock, R. (2013). Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *British Journal of Cancer* 109, 2833–2841.

Hofman, V., Ilie, M., Long-Mira, E., Giaccherio, D., Butori, C., Dadone, B., Selva, E., Tanga, V., Passeron, T., Poissonnet, G., et al. (2013). Usefulness of Immunocytochemistry for the Detection of the BRAFV600E Mutation in Circulating Tumor Cells from Metastatic Melanoma Patients. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 1378–1381.

Huang, W.-K., Kuo, T.-T., Wu, C.-E., Cheng, H.-Y., Hsieh, C.-H., Hsieh, J.-J., Shen, Y.-C., Hou, M.-M., Hsu, T., and Chang, J.W.-C. (2016). A comparison of immunohistochemical and molecular methods used for analyzing the *BRAF* V600E gene mutation in malignant melanoma in Taiwan: Detecting BRAF mutation in melanoma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology* 12, 403–408.

Ihle, M.A., Fassunke, J., König, K., Grünewald, I., Schlaak, M., Kreuzberg, N., Tietze, L., Schildhaus, H.-U., Büttner, R., and Merkelbach-Bruse, S. (2014). Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer* 14, 13.

Jabbar, K.J., Luthra, R., Patel, K.P., Singh, R.R., Goswami, R., Aldape, K.D., Medeiros, L.J., and Routbort, M.J. (2015). Comparison of Next-generation Sequencing Mutation Profiling With BRAF and IDH1 Mutation-specific Immunohistochemistry: The American Journal of Surgical Pathology 39, 454–461.

Johansson, P., Aoude, L.G., Wadt, K., Glasson, W.J., Warriar, S.K., Hewitt, A.W., Kiilgaard, J.F., Heegaard, S., Isaacs, T., Franchina, M., et al. (2016). Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in *PLCB4*. *Oncotarget* 7.

Just, P.-A., Audebourg, A., Pasmant, E., Clauser, E., Carlotti, A., Laurent, S., Avril, M.-F., Vacher-Lavenu, M.-C., Vidaud, M., and Terris, B. (2014). Immunohistochemistry versus next-generation sequencing for the routine detection of BRAF V600E mutation in melanomas. *Human Pathology* 45, 1983–1984.

Kakavand, H., Walker, E., Lum, T., Wilmott, J.S., Selinger, C.I., Smith, E., Saw, R.P.M., Yu, B., Cooper, W.A., Long, G.V., et al. (2016). *BRAF*^{V600E} and *NRAS*^{Q61L/Q61R} mutation analysis in metastatic melanoma using immunohistochemistry: a study of 754 cases highlighting potential pitfalls and guidelines for interpretation and reporting. *Histopathology* 69, 680–686.

Kemper, K., Krijgsman, O., Kong, X., Cornelissen-Steijger, P., Shahrabi, A., Weeber, F., van der Velden, D.L., Bleijerveld, O.B., Kuilman, T., Kluin, R.J.C., et al. (2016). BRAF V600E Kinase Domain Duplication Identified in Therapy-Refractory Melanoma Patient-Derived Xenografts. *Cell Reports* 16, 263–277.

Kim, G., McKee, A.E., Ning, Y.-M., Hazarika, M., Theoret, M., Johnson, J.R., Xu, Q.C., Tang, S., Sridhara, R., Jiang, X., et al. (2014). FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation. *Clin. Cancer Res.* 20, 4994–5000.

Kinsler, V.A., Thomas, A.C., Ishida, M., Bulstrode, N.W., Loughlin, S., Hing, S., Chalker, J., McKenzie, K., Abu-Amero, S., Slater, O., et al. (2013). Multiple Congenital Melanocytic Nevi and Neurocutaneous Melanosis Are Caused by Postzygotic Mutations in Codon 61 of NRAS. *Journal of Investigative Dermatology* 133, 2229–2236.

- Kinsler, V.A., O'Hare, P., Bulstrode, N., Calonje, J.E., Chong, W.K., Hargrave, D., Jacques, T., Lomas, D., Sebire, N.J., and Slater, O. (2017). Melanoma in congenital melanocytic naevi. *British Journal of Dermatology* 176, 1131–1143.
- Knol, A.-C., Pandolfino, M.-C., Vallée, A., Nguyen, F., Lella, V., Khammari, A., Denis, M., Puaux, A.-L., and Dréno, B. (2015). Comparative analysis of *BRAF*, *NRAS* and *c-KIT* mutation status between tumor tissues and autologous tumor cell-lines of stage III/IV melanoma. *Experimental Dermatology* 24, 70–73.
- Krengel, S., Hauschild, A., and Schafer, T. (2006). Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: a systematic review. *British Journal of Dermatology* 155, 1–8.
- Lade-Keller, J., Kristensen, L.S., Riber-Hansen, R., Guldborg, P., Hansen, L.L., Steiniche, T., and Hager, H. (2013). A role for immunohistochemical detection of BRAF V600E prior to BRAF-inhibitor treatment of malignant melanoma? *Journal of Clinical Pathology* 66, 723–725.
- Lee, S.-H., Kim, J.E., Jang, H.S., Park, K.H., Oh, B.H., Shin, S.J., Chung, K.Y., Roh, M.R., and Rha, S.Y. (2018). Genetic Alterations among Korean Melanoma Patients Showing Tumor Heterogeneity: A Comparison between Primary Tumors and Corresponding Metastatic Lesions. *Cancer Research and Treatment* 50, 1378–1387.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Digest II*.
- Liu, H., Li, Z., Wang, Y., Feng, Q., Si, L., Cui, C., Guo, J., and Xue, W. (2014). Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in melanoma patients with monoclonal antibody VE1. *Pathol. Int.* 64, 601–606.
- Lo, M.C.I., Paterson, A., Maraka, J., Clark, R., Goodwill, J., Nobes, J., Garioch, J., Moncrieff, M., Rytina, E., and Igali, L. (2016). A UK feasibility and validation study of the VE1 monoclonal antibody immunohistochemistry stain for BRAF-V600E mutations in metastatic melanoma. *British Journal of Cancer* 115, 223–227.
- Løes, I.M., Immervoll, H., Angelsen, J.-H., Horn, A., Geisler, J., Busch, C., Lønning, P.E., and Knappskog, S. (2015). Performance comparison of three BRAF V600E detection methods in malignant melanoma and colorectal cancer specimens. *Tumor Biology* 36, 1003–1013.
- Long, G.V., Menzies, A.M., Nagrial, A.M., Haydu, L.E., Hamilton, A.L., Mann, G.J., Hughes, T.M., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., and Kefford, R.F. (2011). Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 29, 1239–1246.
- Long, G.V., Wilmott, J.S., Capper, D., Preusser, M., Zhang, Y.E., Thompson, J.F., Kefford, R.F., von Deimling, A., and Scolyer, R.A. (2013). Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 61–65.
- Long, G.V., Hauschild, A., Santinami, M., Atkinson, V., Mandalà, M., Chiarion-Sileni, V., Larkin, J., Nyakas, M., Dutriaux, C., Haydon, A., et al. (2017). Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in

Stage III *BRAF* -Mutated Melanoma. *New England Journal of Medicine* 377, 1813–1823.

Lyu, J.J., Kong, Y.Y., Cai, X., Shen, X.X., Lu, Y.W., and Ren, M. (2017). [Utility and evaluation of immunohistochemical detection of *BRAF* V600E mutation in melanoma]. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 46, 548–552.

Maio, M., Lewis, K., Demidov, L., Mandalà, M., Bondarenko, I., Ascierto, P.A., Herbert, C., Mackiewicz, A., Rutkowski, P., Guminski, A., et al. (2018). Adjuvant vemurafenib in resected, *BRAF* V600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 19, 510–520.

Manfredi, L., Meyer, N., Tournier, E., Grand, D., Uro-Coste, E., Rochaix, P., Brousset, P., and Lamant, L. (2016). Highly Concordant Results Between Immunohistochemistry and Molecular Testing of Mutated V600E *BRAF* in Primary and Metastatic Melanoma. *Acta Dermato Venereologica* 96, 630–634.

Marino, P., Touzani, R., Borget, I., Rouleau, E., Durand-Zaleski, I., Perrier, L., Sika Kossi, D., and Baffert, S. (2017). Coût du séquençage NGS à visée diagnostique en génétique somatique et constitutionnelle : estimations issues de 15 laboratoires français de génétique moléculaire des cancers. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 65, S83–S84.

Martin, M., Maßhöfer, L., Temming, P., Rahmann, S., Metz, C., Bornfeld, N., van de Nes, J., Klein-Hitpass, L., Hinnebusch, A.G., Horsthemke, B., et al. (2013). Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in *EIF1AX* and *SF3B1* in uveal melanoma with disomy 3. *Nature Genetics* 45, 933–936.

Massi, G., and LeBoit, P.E. (2014). *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Möller, I., Murali, R., Müller, H., Wiesner, T., Jakkett, L.A., Scholz, S.L., Cosgarea, I., van de Nes, J.A., Sucker, A., Hillen, U., et al. (2017). Activating cysteinyl leukotriene receptor 2 (*CYSLTR2*) mutations in blue nevi. *Modern Pathology* 30, 350–356.

Moon, K.R., Choi, Y.D., Kim, J.M., Jin, S., Shin, M.-H., Shim, H.-J., Lee, J.-B., and Yun, S.J. (2018). Genetic Alterations in Primary Acral Melanoma and Acral Melanocytic Nevus in Korea: Common Mutated Genes Show Distinct Cytomorphological Features. *Journal of Investigative Dermatology* 138, 933–945.

Nielsen, L.B., Dabrosin, N., Sloth, K., Bønnelykke-Behrndtz, M.L., Steiniche, T., and Lade-Keller, J. (2018). Concordance in *BRAF* V600E status over time in malignant melanoma and corresponding metastases. *Histopathology* 72, 814–825.

Orchard, G., Wojcik, K., Rickaby, W., Martin, B., Semkova, K., Shams, F., and Stefanato, C. (2019). Immunohistochemical detection of V600E *BRAF* mutation is a useful primary screening tool for malignant melanoma. *British Journal of Biomedical Science* 76, 77–82.

Pavlova, O., Fraitag, S., and Hohl, D. (2016). 5-Hydroxymethylcytosine Expression in

Proliferative Nodules Arising within Congenital Nevi Allows Differentiation from Malignant Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 136, 2453–2461.

Pearlstein, M.V., Zedek, D.C., Ollila, D.W., Treece, A., Gulley, M.L., Groben, P.A., and Thomas, N.E. (2014). Validation of the VE1 immunostain for the *BRAF* V600E mutation in melanoma: VE1 immunostain for *BRAF* V600E mutant melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 41, 724–732.

Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., et al. (2003). High frequency of *BRAF* mutations in nevi. *Nature Genetics* 33, 19–20.

Qiu, T., Lu, H., Guo, L., Huang, W., Ling, Y., Shan, L., Li, W., Ying, J., and Lv, N. (2015). Detection of *BRAF* mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Scientific Reports* 5.

Raghavan, S.S., Peternel, S., Mully, T.W., North, J.P., Pincus, L.B., LeBoit, P.E., McCalmont, T.H., Bastian, B.C., and Yeh, I. (2020). Spitz melanoma is a distinct subset of spitzoid melanoma. *Modern Pathology*.

Riveiro-Falkenbach, E., Villanueva, C.A., Garrido, M.C., Ruano, Y., García-Martín, R.M., Godoy, E., Ortiz-Romero, P.L., Ríos-Martín, J.J., Santos-Briz, A., and Rodríguez-Peralto, J.L. (2015). Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of *BRAF*(V600E) Mutations in Melanoma Tumors. *J. Invest. Dermatol.* 135, 3078–3085.

Routhier, C.A., Mochel, M.C., Lynch, K., Dias-Santagata, D., Louis, D.N., and Hoang, M.P. (2013). Comparison of 2 monoclonal antibodies for immunohistochemical detection of *BRAF* V600E mutation in malignant melanoma, pulmonary carcinoma, gastrointestinal carcinoma, thyroid carcinoma, and gliomas. *Human Pathology* 44, 2563–2570.

Rubinstein, J.C., Sznol, M., Pavlick, A.C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H.M., Narayan, D., and Halaban, R. (2010). Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with *BRAF* mutations, and potential therapeutic response to the specific *BRAF* inhibitor PLX4032. *J Transl Med* 8, 67.

Saint-Jean, M., Quéreux, G., Nguyen, J.-M., Peuvrel, L., Brocard, A., Vallée, A., Knol, A.-C., Khammari, A., Denis, M.G., and Dréno, B. (2014). Is a Single *BRAF* Wild-Type Test Sufficient to Exclude Melanoma Patients from Vemurafenib Therapy? *Journal of Investigative Dermatology* 134, 1468–1470.

Sener, E., Yildirim, P., Tan, A., Gokoz, O., and Tezel, G.G. (2017). Investigation of *BRAF* mutation analysis with different technical platforms in metastatic melanoma. *Pathology - Research and Practice* 213, 522–530.

Shain, A.H., and Bastian, B.C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* 16, 345–358.

- Shitara, D., Nascimento, M.M., Puig, S., Yamada, S., Enokihara, M.M.S.S., Michalany, N., and Bagatin, E. (2014). Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features. *Am. J. Clin. Pathol.* *142*, 485–491.
- Singh, A.D., Turell, M.E., and Topham, A.K. (2011). Uveal Melanoma: Trends in Incidence, Treatment, and Survival. *Ophthalmology* *118*, 1881–1885.
- Skorokhod, A., Capper, D., von Deimling, A., Enk, A., and Helmbold, P. (2012). Detection of BRAF V600E mutations in skin metastases of malignant melanoma by monoclonal antibody VE1. *Journal of the American Academy of Dermatology* *67*, 488–491.
- Solit, D., and Rosen, N. (2010). Oncogenic RAF: a brief history of time. *Pigment Cell Melanoma Res* *23*, 760–762.
- Thiel, A., Moza, M., Kytölä, S., Orpana, A., Jahkola, T., Hernberg, M., Virolainen, S., and Ristimäki, A. (2015). Prospective immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in melanoma. *Human Pathology* *46*, 169–175.
- Valachis, A., and Ullenhag, G.J. (2017). Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. *European Journal of Cancer* *81*, 106–115.
- Vallée, A., Denis-Musquer, M., Herbreteau, G., Théoleyre, S., Bossard, C., and Denis, M.G. (2019). Prospective evaluation of two screening methods for molecular testing of metastatic melanoma: Diagnostic performance of BRAF V600E immunohistochemistry and of a NRAS-BRAF fully automated real-time PCR-based assay. *PLoS ONE* *14*, e0221123.
- Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., and Bastian, B.C. (2009a). Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* *457*, 599–602.
- Van Raamsdonk, C.D., Bezrookove, V., Green, G., Bauer, J., Gaugler, L., O'Brien, J.M., Simpson, E.M., Barsh, G.S., and Bastian, B.C. (2009b). Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature* *457*, 599–602.
- Van Raamsdonk, C.D., Griewank, K.G., Crosby, M.B., Garrido, M.C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A.C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., et al. (2010a). Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine* *363*, 2191–2199.
- Van Raamsdonk, C.D., Griewank, K.G., Crosby, M.B., Garrido, M.C., Vemula, S., Wiesner, T., Obenaus, A.C., Wackernagel, W., Green, G., Bouvier, N., et al. (2010b). Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma. *New England Journal of Medicine* *363*, 2191–2199.
- Wang, Y., Zhao, Y., and Ma, S. (2016). Racial differences in six major subtypes of melanoma: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* *16*, 691.
- Wiesner, T., Murali, R., Fried, I., Cerroni, L., Busam, K., Kutzner, H., and Bastian, B.C. (2012). A Distinct Subset of Atypical Spitz Tumors is Characterized by BRAF Mutation and Loss of

BAP1 Expression: *The American Journal of Surgical Pathology* 36, 818–830.

Wiesner, T., He, J., Yelensky, R., Esteve-Puig, R., Botton, T., Yeh, I., Lipson, D., Otto, G., Brennan, K., Murali, R., et al. (2014). Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun* 5, 3116.

Wojdacz, T.K., and Dobrovic, A. (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Research* 35, e41–e41.

Yancovitz, M., Litterman, A., Yoon, J., Ng, E., Shapiro, R.L., Berman, R.S., Pavlick, A.C., Darvishian, F., Christos, P., Mazumdar, M., et al. (2012). Intra- and Inter-Tumor Heterogeneity of BRAFV600E Mutations in Primary and Metastatic Melanoma. *PLoS ONE* 7, e29336.

Yeh, I., von Deimling, A., and Bastian, B.C. (2013). Clonal BRAF Mutations in Melanocytic Nevi and Initiating Role of BRAF in Melanocytic Neoplasia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 105, 917–919.

Yeh, I., Mully, T.W., Wiesner, T., Vemula, S.S., Mirza, S.A., Sparatta, A.J., McCalmont, T.H., Bastian, B.C., and LeBoit, P.E. (2014). Ambiguous Melanocytic Tumors With Loss of 3p21: *The American Journal of Surgical Pathology* 38, 1088–1095.

Yeh, I., Botton, T., Talevich, E., Shain, A.H., Sparatta, A.J., de la Fouchardiere, A., Mully, T.W., North, J.P., Garrido, M.C., Gagnon, A., et al. (2015). Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumours. *Nat Commun* 6, 7174.

Yeh, I., Tee, M.K., Botton, T., Shain, A.H., Sparatta, A.J., Gagnon, A., Vemula, S.S., Garrido, M.C., Nakamaru, K., Isoyama, T., et al. (2016). NTRK3 kinase fusions in Spitz tumours. *J. Pathol.* 240, 282–290.

Yeh, I., Lang, U.E., Durieux, E., Tee, M.K., Jorapur, A., Shain, A.H., Haddad, V., Pissaloux, D., Chen, X., Cerroni, L., et al. (2017). Combined activation of MAP kinase pathway and β -catenin signaling cause deep penetrating nevi. *Nature Communications* 8.

8. ANNEXES

8.1 Prise en charge thérapeutique du mélanome

8.1.1 Recommandations de l'INCa mélanome stade III non résecable ou stade IV

Actuellement, selon les recommandations de l'INCa 2017 concernant les patients atteints d'un mélanome de stade III non résecable ou de stade IV : « *La réalisation d'un génotypage à la recherche d'une mutation de BRAF V600 doit être systématique et est un préalable au choix thérapeutique. Elle peut être réalisée sur la biopsie d'une métastase accessible ou par défaut, des ganglions du curage ou de la tumeur primitive si ce sont les seuls tissus disponibles. Les techniques de biologie moléculaires restent le 'gold standard' pour la détermination du statut BRAF d'un mélanome. Cependant, dans les situations où un traitement doit être mis en route rapidement, il est possible d'utiliser l'IHC pour détecter une mutation V600E de BRAF et commencer ainsi sans délai un traitement par thérapie ciblée en cas de positivité de la technique. Par contre, en cas de négativité de l'IHC ou si le résultat est ininterprétable, il est impératif d'avoir recours aux techniques de biologie moléculaires. Seules ces techniques permettent d'identifier des mutations activatrices de BRAF plus rares ou des mutations ouvrant la porte à un essai thérapeutique.* »

Concernant la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un mélanome de stade III non résecable ou de stade IV, l'INCa 2017 recommande « *une association par anti-BRAF et anti-MEK* » en première ligne pour les patients mutés BRAF.

8.1.2 Essais cliniques & prise en charge des patients atteints d'un mélanome stade II à IIIb

Pour les mélanomes de stade II à IIIb la chirurgie demeure le principal traitement cependant elle ne permet pas d'augmentation de moyenne de survie. Ce traitement chirurgical consiste à réaliser une résection complète, en marges saines, de la lésion

parfois associée à la résection de métastase en transit ou ganglionnaire. Le pronostic de survie de ces patients à 5 ans est de 40 à 80% (Balch et al., 2009). La réalisation d'une biopsie du ganglion sentinelle permet d'avoir un bon aperçu pronostique. Néanmoins, cette biopsie n'est pas systématiquement complétée par un curage ganglionnaire, son intérêt dans l'amélioration de la survie étant controversé (Faries et al., 2017).

L'essai clinique de phase III COMBI-AD a prouvé l'intérêt d'un traitement adjuvant associant dabrafenib et trametinib chez les patients présentant un mélanome de stade III avec mutations *BRAF*^{V600E} ou *V600K*. En effet, ce traitement associant inhibiteurs BRAF-MEK entraînait une réduction du risque de récurrence par rapport au placebo (Long et al., 2017).

L'une des cohortes de l'essai clinique de phase III BRIM-8 a montré un bénéfice dans la survie sans événement chez les patients ayant un mélanome stade IIC-IIIA-IIIB muté *BRAF*^{V600E} après traitement adjuvant par vemurafenib par rapport au placebo (Maio et al., 2018).

Un essai clinique de phase II a montré l'amélioration significative de la survie sans événement après la mise en place d'un traitement associant dabrafenib et trametinib en néo-adjuvant et adjuvant pour les patients présentant un mélanome de stade III-IV à haut risque, résectable chirurgicalement (Amaria et al., 2018).

L'ensemble de ces essais sont très prometteurs et ouvrent la porte à un élargissement des indications du traitement des inhibiteurs BRAF, à la fois en adjuvant et néo-adjuvant.

8.2 Entités selon leur statut BRAF V600E

8.2.1 Entités BRAF mutées V600E

➤ **Bénignes**

- **Naevus commun**

Les nævus communs renferment une mutation *BRAF*^{V600E} dans 80 à 85% des cas (Pollock et al., 2003), (Yeh et al., 2013) et certains nævus congénitaux de petite à moyenne taille aussi (Etchevers et al., 2018).

Sur ce fond moléculaire, associé à une mutation des MAPK, peut survenir un second évènement moléculaire transformant le nævus bénin en une tumeur intermédiaire, qui n'est plus stricto sensu un nævus mais qui ne présente cependant pas encore toutes les caractéristiques d'un mélanome : un mélanocytome. La morphologie des mélanocytomes est très particulière, souvent composite car elle combine celle du nævus précurseur avec un nouvel aspect lié à la nature du second-hit mutationnel : le fond moléculaire sera commun avec le nævus sur lequel le mélanocytome est survenu : *BRAF* ou *NRAS*. Ainsi, le diagnostic des mélanocytomes est amélioré par la connaissance du statut BRAF V600E : tous les mélanocytomes surviennent sur un fond génétique muté de la voie des MAPK et préférentiellement BRAF : mélanocytome épithélioïde pigmenté (Pigmented Epithelioid Melanocytoma = PEM), nævus avec inactivation de *BAP1* (BAPome) et nævus à extension profonde (Deep Penetrating Naevus = DPN).

- **Mélanocytome épithélioïde pigmenté ou PEM (Pigmented Epithelioid Melanocytoma)**

Les PEM sont des mélanocytomes rares de diagnostic difficile pouvant aisément être confondus avec un nævus bleu ou un mélanome pigmentogène (Pigment Synthetised Melanoma = PSM). Ils surviennent dans le cadre d'un complexe de Carney, de façon sporadique voire sous forme de nodule de prolifération au sein d'un nævus congénital géant.

Le diagnostic de PEM peut être délicat et la recherche de la mutation *BRAF*^{V600E} est d'une grande utilité car elle permet de drastiquement restreindre les diagnostics différentiels car les lésions du spectre bleu ne sont pas associées à BRAF mais à des mutations de *GNAQ/GNA11*. La distinction entre un mélanome et un PEM est plus délicate car ces deux entités peuvent présenter une mutation *BRAF*^{V600E} mais les PEM contrairement aux PSM affichent une inactivation biallélique du gène *PRKAR1a* ou des fusions géniques de *PRKCA* alors que les PSM ont un fond moléculaire plus complexe. Une récente étude a montré que les PEM perdent l'expression immunohistochimique de la protéine PRKAR1α avec ou sans la présence d'altération du gène *PRKAR1a* (Cohen et al., 2017).

- **BAPome**

Les naevus avec inactivation de *BAP1* (BAPome), sont des lésions anciennement étiquetées naevus de Spitz avec mutation *BRAF*^{V600E}. Il s'agit en fait d'un mélanocytome développé sur un naevus commun avec fond moléculaire *BRAF* ou *NRAS*, en raison d'une inactivation secondaire du gène suppresseur de tumeur *BAP1*. Cette inactivation de *BAP1* peut se produire de façon sporadique ou dans le cadre d'un syndrome héréditaire. Histologiquement, l'inactivation de *BAP1* induit une cytologie différente, avec un cytoplasme éosinophile plus ample, un noyau nucléolé et un recrutement lymphocytaire expliquant la classification initiale de ces lésions dans le spectre Spitz. Ce concept n'est plus admis aujourd'hui car les BAPomes ne sont pas associés à des translocations de kinase comme c'est le cas des lésions Spitziennes. Le BAPome pose un problème de diagnostic différentiel avec un mélanome inclassable, une tumeur spitzienne voire une métastase de mélanome prévalente : dans ce contexte, une confrontation à l'anamnèse lésionnelle (naevus ancien subitement modifié), une recherche du statut BRAF V600E et de perte d'expression de BAP1 sont importantes pour correctement reclasser cette lésion (Wiesner et al., 2012).

- **Naevus à extension profonde ou DPN (Deep Penetrating Naevus)**

Les nævus à extension profonde (DPN) renferment pour leur part, outre une mutation activatrice de la voie MAPK dont la mutation *BRAF*^{V600E}, une mutation activatrice surajoutée de la voie β-caténine (mutation du gène *CTNNB1* ou *APC*) (Yeh et al., 2017) qui va drastiquement modifier leur cytologie et architecture : l'activation constitutionnelle de la voie des β-caténine active dans le mélanocyte la synthèse de pigment, la prolifération et l'agrégation en thèques, y compris en profondeur. Ce nævus présente alors des caractéristiques habituellement considérées comme inquiétantes avec une perte du gradient vertical de maturation, une irrégularité de sa silhouette et de son architecture, et un phénotype aberrant HMB-45. Cette morphologie peut conduire à tort à un diagnostic de mélanome inclassable, de nævus bleu, de métastase ou de PEM : dans ce contexte, la recherche de la mutation *BRAF*^{V600E} associée à une mutation d'un gène de la voie β-caténine permet de poser le diagnostic de DPN.

En conclusion, la connaissance du statut BRAF V600E couplée à d'autres techniques immunohistochimiques et moléculaires représente une voie d'entrée diagnostique dans une catégorie histomoléculaire donnée notamment au sein des mélanocytomes, synthétisée par l'arbre décisionnel suivant (**Figure 6**).

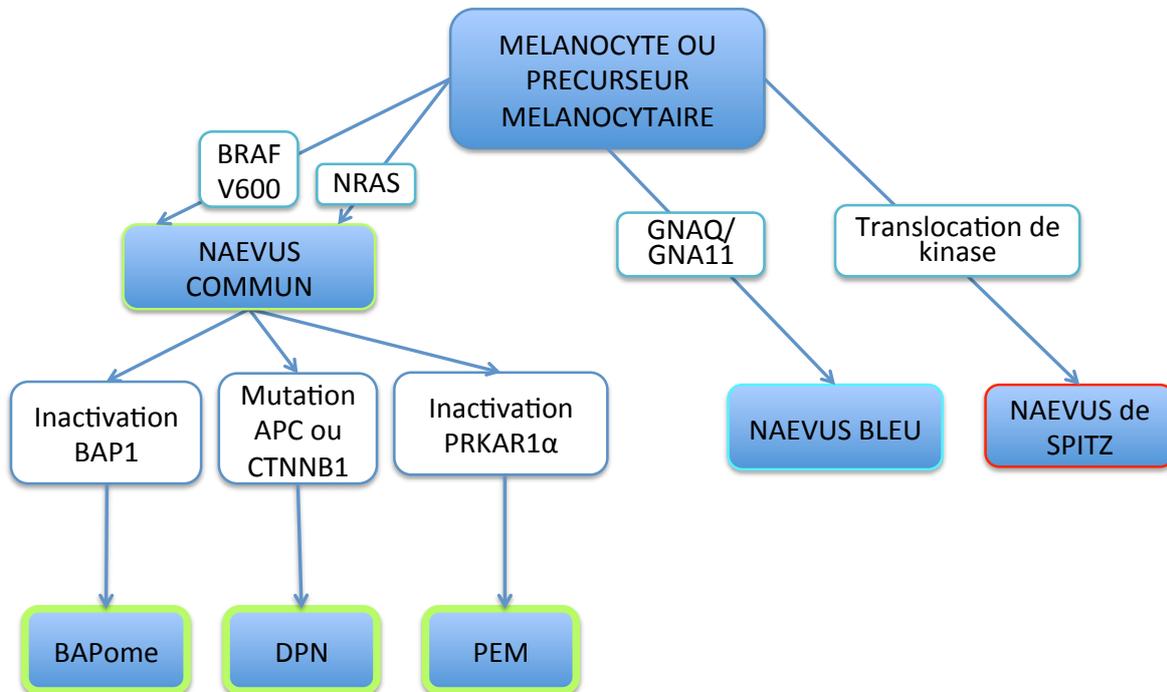


Figure 6 – Classification moléculaire des naevus et mélanocytomes

Sur le versant malin de la pathologie mélanocytaire, en ligne directe avec le nævus commun, le mélanome de type SSM, encore appelé mélanome « Low-CSD » est celui qui présente majoritairement la mutation $BRAF^{V600E}$.

➤ *Malignes*

- **Mélanome de type SSM ou “Low-CSD”**

Les mélanomes anciennement appelés SSM pour « Superficial Spreading Melanoma » et actuellement Low/no-CSD pour « Non-Chronically Sun-Damaged », affectent les zones insolées de façon intermittente, telles que le tronc et les extrémités proximales. Ces mélanomes peuvent survenir chez des patients jeunes de moins de 55 ans. Histologiquement, il n'existe généralement pas ou peu d'élastose solaire et les mélanocytes tumoraux sont épithélioïdes, parfois ballonisés et organisés selon une architecture intra-épithéliale pagétoïde. Les mélanocytes tumoraux se présentent sous la forme de grandes cellules épithélioïdes, claires, isolées ou regroupées en thèques. Les noyaux sont assez volumineux, pâles, nucléolés avec des pseudonucléoles. D'un point de vue moléculaire, on suppose que ces mélanomes dérivent de mélanocytes ayant acquis de façon précoce la mutation *BRAF*^{V600E} ou une mutation du gène *NRAS*. Ces mélanocytes mutés forment des nævus acquis qui au cours d'accumulations d'anomalies moléculaires peuvent se transformer progressivement en mélanome. C'est pourquoi dans 30 à 90% des cas un nævus préexistant serait associé (Shitara et al., 2014).

Devant un processus mélanocytaire pagétoïde, a priori malin, la présence de la mutation *BRAF*^{V600E} oriente préférentiellement le diagnostic vers un mélanome de type SSM. Les autres types de mélanomes n'incluent généralement pas cette mutation dans leurs processus oncogéniques comme c'est le cas des authentiques mélanomes de Dubreuilh (type « High-CSD »), des mélanomes acro-lentigineux et du mélanome muqueux.

Par ailleurs, dans le cadre d'un processus métastatique d'origine inconnue, la recherche du statut *BRAF* V600E peut se révéler précieuse car elle permettra de rattacher la métastase à son primitif si les gènes mutés sont les mêmes. De même, devant une tumeur franchement dédifférenciée, sarcomatoïde, avec un phénotype nul, c'est-à-dire ayant perdu tous ses marqueurs immunohistochimiques mélanocytaires (*Sox10*, *PS100*, *Hmb45*, *MelanA*), la présence d'une mutation *BRAF* permet d'orienter le diagnostic vers le mélanome (Alrabadi et al., 2019).

8.2.2 Entités BRAF non-mutées

➤ Bénignes

- **Naevus de Spitz & naevus bleu**

Les naevus de Spitz ainsi que les naevus bleus ne sont jamais mutés *BRAF*^{V600E}. Les voies de signalisation impliquées dans ces lésions sont plus amplement détaillées dans le chapitre concernant le versant malin de ces entités.

Sur le plan pratique, la détermination du statut BRAF V600E peut ainsi permettre de distinguer un naevus commun, un mélanome SSM d'un naevus bleu ou encore d'un naevus de Spitz. En effet, une lésion mélanocytaire d'interprétation difficile dont le statut immunohistochimique BRAF V600E est positif ne peut correspondre à aucune lésion du spectre Spitz ou du spectre bleu.

➤ Malignes

- **Mélanome de Dubreuilh ou "High-CSD"**

Les mélanomes liés à une exposition solaire chronique surviennent au niveau de la tête et du cou, apparaissent après 50 ans et ont une incidence exponentielle en rapport avec le vieillissement. D'un point de vue histologique, ce sont des mélanomes de grande taille, d'architecture lentigineuse, apparaissant sur une peau montrant des dommages actiniques marqués (élastose, atrophie et dysplasie épidermique). Aucun naevus précurseur n'est retrouvé dans ces mélanomes de Dubreuilh (Massi and LeBoit, 2014), (Shitara et al., 2014) et tous les cas apparaissent *de novo* suite à des lésions précurseurs intermédiaires et difficiles à distinguer d'une hyperplasie mélanocytaire d'origine actinique. Tout comme dans le mélanome acro-lentiginieux, les mélanocytes tumoraux prolifèrent le long de la basale épidermique et accompagnent les annexes en profondeur sur un mode lentiginieux et une cytologie plutôt dendritique. Lorsqu'ils infiltrent, la cytologie est volontiers fusiforme, parfois pléomorphe mais globalement moins atypique que dans les mélanomes pagétoïdes liés à BRAF. Sur le plan moléculaire, ils présentent une

charge mutationnelle plus importante, une signature UV et sont généralement associés à des mutations de *NF1* (neurofibromin 1), *NRAS*, ou *KIT* (Bastian, 2014). Des mutations *BRAF* peuvent être associées mais ne sont pas de type V600E. Ainsi, la mise en évidence d'une mutation *BRAF*^{V600E} n'est pas en faveur du diagnostic d'un mélanome lentigineux associé à des dommages solaires chroniques.

- **Mélanome uvéal**

Les mélanomes uvéaux correspondent à 3,1 % de l'ensemble des mélanomes et représentent néanmoins, la première cause de tumeur intraoculaire de l'adulte (Singh et al., 2011). Ils se développent à partir des mélanocytes de l'uvée, tissu entourant et protégeant la rétine. Au sein de l'uvée, les mélanomes se développent au niveau de la choroïde (90% des cas) et dans une moindre mesure au niveau de l'iris (4%) et du corps ciliaire (6%). Contrairement au mélanome de la peau, il ne semble pas y avoir de lien entre l'exposition au soleil et l'apparition du mélanome de l'uvée (Furney et al., 2013). Les anomalies moléculaires rencontrées dans les mélanomes uvéaux diffèrent des anomalies classiquement retrouvées dans les mélanomes cutanés. Leur charge mutationnelle reste faible et les mélanomes uvéaux présentent, de façon spécifique des mutations des protéines G. Les mutations de *GNAQ/GNA11*, sont respectivement retrouvées dans 50% et 34 % des mélanomes uvéaux primitifs (Van Raamsdonk et al., 2009a), (Van Raamsdonk et al., 2010a). Plus récemment, des mutations des gènes *PLCB4* et *CYSLTR2* ont été identifiées (Johansson et al., 2016). Les mutations inactivatrices des gènes *BAP1*, *SF3B1* et *EIF1AX* apparaissent de façon exclusive, plus tardivement, durant la progression tumorale (Harbour et al., 2010), (Martin et al., 2013). De manière intéressante, mélanomes uvéaux et tumeurs mélanocytaires du spectre bleu présentent un profil mutationnel, des second-hits et des profils cytogénétiques associés à la malignité et au pronostic, assez comparables.

- **Mélanome de type bleu**

Le nævus bleu et ses entités associées forment un groupe hétérogène de néoplasies mélanocytaires congénitales et acquises. Ce groupe comprend le nævus bleu commun, le nævus bleu cellulaire et le mélanome de type bleu. En plus de critères cliniques communs comme une teinte bleutée, des localisations préférentielles au niveau des extrémités, du cuir chevelu, de la racine des membres, ces entités « bleues » partagent des caractéristiques histologiques et moléculaires. Il s'agit en général d'une prolifération de cellules fusiformes/dendritiques hyperpigmentées sans maturation verticale. Par ailleurs, les mélanocytes « bleus » sont de localisation uniquement dermique et peuvent s'étendre jusqu'au tissu sous-cutané. Contrairement au nævus commun, les nævus bleus ne mûrissent pas en profondeur d'un point de vue morphologique & phénotypique : l'expression de HMB45 est diffuse et intense sur toute la hauteur de la lésion. D'un point de vue moléculaire les entités « bleues » ont un profil superposable à celui des mélanomes uvéaux. Les nævus bleus renferment des mutations de *GNAQ* ou *GNA11* dans respectivement 65-80% et 7% des cas (Van Raamsdonk et al., 2010b), (Van Raamsdonk et al., 2009b). Plus rarement des mutations de *CYSLTR2* (Möller et al., 2017) et *PLCB4* ont été identifiées. A ce jour, il est histologiquement difficile de distinguer un nævus bleu cellulaire d'un mélanome de type bleu sur l'histologie seule, mais leurs profils cytogénétiques seront différents. De récentes études ont montré que la transformation d'un nævus bleu en un mélanome de type bleu est liée à l'inactivation de *BAP1* et/ou du gène *SF3B1* (Dai et al., 2016), (Yeh et al., 2014). Par conséquent la recherche immunohistochimique de la perte d'expression de *BAP1* permet de diagnostiquer plus aisément une transformation maligne. Des mutations du gène *E1F1AX* ont aussi été identifiées, cependant, contrairement au mélanome uvéal, aucun lien avec un pronostic plus favorable n'a pu être établi (Griewank et al., 2017).

- **Tumeur de Spitz maligne**

Les tumeurs de Spitz forment un groupe initialement très hétérogène de néoplasies mélanocytaires dont le point commun est la grande taille de ses mélanocytes. Ces derniers peuvent être de forme ovalaire, polygonale ou fusiforme. Les découvertes récentes de biologie moléculaire, notamment les translocations de kinases,

permettent de mieux les démembrer et surtout de les différencier de mélanomes « spitzoïdes » qui présentent une biologie moléculaire et un pronostic plus proche des SSM (Bastian, 2020). En fonction des critères de malignité les tumeurs sont classées comme bénignes (nævus de Spitz), intermédiaires à récurrence locale (tumeur de Spitz atypique) ou malignes (tumeur de Spitz maligne). La distinction entre tumeur de Spitz maligne, qui est une entité *bona fide* associée à des translocations moléculaires spécifiques et mélanome Spitzoïde est importante : ce dernier terme est une catégorie purement descriptive et hétérogène, beaucoup moins stricte dans sa définition. La plupart des nævus de Spitz surviennent pendant l'enfance, l'adolescence ou chez le jeune adulte. Sur le plan moléculaire, les nævus de Spitz n'arborent pas de mutation de la voie des MAPK à l'instar des gènes *BRAF* ou *NRAS*, retrouvés spécifiquement dans les mélanomes survenant en peau insolaire, bien que des lésions actuellement classées dans le spectre Spitz révèlent des amplifications/mutations de *HRAS* (22%).

L'ensemble du spectre Spitz est caractérisé par des translocations chromosomiques induisant des transcrits de fusion impliquant les gènes de protéines kinases *ROS1*, *ALK*, *NTRK1*, *BRAF*, *RET*, *MET*, *NTRK3* (Botton et al., 2013), (Bastian et al., 2000), (Wiesner et al., 2014), (Yeh et al., 2015), (Yeh et al., 2016). La morphologie et le pronostic de ces tumeurs de Spitz varient selon le type de fusion génique primaire. La détection de la mutation *BRAF* est très importante pour écarter une lésion Spitzienne car les tumeurs de Spitz, bénignes, intermédiaires ou malignes n'arborent jamais de mutation *BRAF*. Cela présente des implications majeures en termes de malignité : en effet, certains mélanomes associés à des mutations des MAPK peuvent présenter une cytologie Spitzoïde, mais en réalité, seul 30% des mélanomes Spitzoïdes sont d'authentiques tumeurs de Spitz malignes, le reste correspond à des mélanomes liés au MAPK et potentiellement associés à une mutation *BRAF* (Raghavan et al., 2020). Devant une lésion de morphologie Spitzienne, la présence d'une mutation *BRAF* reclasse généralement la lésion en mélanome mimant une tumeur de Spitz.

8.2.3 Entités avec un faible pourcentage de cas mutés *BRAF*^{V600E}

Il existe une 3^{ème} catégorie de mélanomes pour lesquels la présence de la mutation *BRAF*^{V600E} a été authentifiée dans de faibles proportions, nécessitant à l'avenir un démembrement plus fin au sein même de ces entités.

- **Mélanome acro-lentigineux**

La localisation acrale c'est à dire palmo-plantaire et sous-unguéale est associée à un pronostic défavorable. C'est le mélanome le plus fréquent au sein des populations asiatiques, africaines et non-caucasiennes (Wang et al., 2016). Il existe une prépondérance chez les patients âgés et chez les femmes. Ces mélanomes des extrémités, apparaissant sur peau glabre uniquement, se distinguent par leurs facteurs étiologiques (rôle limité du soleil et rôle possible des traumatismes), leur histologie lentigineuse semblable sur quelques points à celle des mélanomes LMM de Dubreuilh et leurs caractéristiques moléculaires (fréquence plus faible des mutations de *BRAF* (SSM acraux ?) et plus élevée des mutations de *KIT* et de *NRAS*). Sur le plan histologique, au niveau de la composante intra-épithéliale les mélanocytes tumoraux, dendritiques, prennent une architecture lentigineuse continue. D'un point de vue moléculaire ces mélanomes renferment un faible taux de charge mutationnelle, sans signature UV, et entre autres, des mutations des gènes *BRAF*, *NRAS*, *NF1*, *GNAQ* et *KIT* (Moon et al., 2018) : cette hétérogénéité soulève la question de la définition même d'un mélanome « acro-lentigineux ». Il existe pour ces lésions une fréquence plus élevée de variations du nombre de copies se manifestant par des amplifications des gènes *CCND1*, *KIT*, *TERT* et *CDK4* (Curtin et al., 2005). Il est fort probable que ces données évoluent à l'avenir et que la classification de ces mélanomes acraux soit plus subtilement démembrée selon l'altération moléculaire impliquée.

- **Mélanome muqueux**

En dehors de la peau, il existe des mélanocytes au sein de la muqueuse respiratoire, intestinale et du tractus urogénital. Les mélanomes issus de ces mélanocytes émergent fréquemment au niveau de la muqueuse anogénitale et dans la cavité naso-sinusienne. Comme pour le mélanome acro-lentigineux, ces mélanomes ont

tendance à arborer d'importantes variations du nombre de copie et un faible taux de mutation ponctuelle, sans signature UV avec souvent amplification de *CDK4*. Des amplifications et des mutations de *KIT* sont observées dans 30-40% des mélanomes muqueux (Beadling et al., 2008). Les mutations de *BRAF* et *NRAS* sont plus rares et en plus faibles proportions que dans les mélanomes cutanés (Curtin et al., 2005) (Curtin et al., 2006) et là aussi la définition même d'un mélanome muqueux par rapport au statut BRAF mérite des investigations supplémentaires.

- **Mélanome issu d'un naevus congénital**

Les facteurs de risque concernant les mélanomes issus de naevus congénital de grande taille à géants sont peu connus. La présence et la taille d'un naevus congénital représentent, en soi, un risque non négligeable de développer un mélanome. (Krengel et al., 2006). La présence d'un syndrome de naevus congénital multiple majorerait ce risque. Ce syndrome est causé dans 80% des cas par une mutation post-zygotique du gène *NRAS* à l'origine d'un mosaïcisme (Kinsler et al., 2013). Concernant les autres facteurs de risque, il n'existe pas de liens formels entre une exposition solaire et la transformation maligne d'un naevus congénital. Des mutations des gènes *BRAF*, *TP53* et *GNAQ* sont aussi décrites au niveau des naevus congénitaux. La mutation *BRAF*^{V600E} a été rapportée plusieurs fois dans certains naevus congénitaux, mais aucun lien de causalité avec le risque de transformation maligne n'a été mis en évidence (Etchevers et al., 2018). Cependant la recherche systématique de cette mutation est fortement recommandée, étant données la disponibilité et l'efficacité des inhibiteurs BRAF (Kinsler et al., 2017).

Les données récentes soulignent pour cette population de mélanomes pédiatriques un rôle probable des modifications épigénétiques : cela est attesté par la perte de la triméthylation de l'histone H3K27 dans les mélanomes issus d'un naevus congénital – cette méthylation persiste dans le principal diagnostic différentiel à savoir les nodules de prolifération (Busam et al., 2017). Ces différences épigénétiques ont aussi été suggérées par l'expression différentielle de la 5-Hydroxymethylcytosine, avec perte

de la méthylation dans les mélanomes par rapport là aussi aux nodules de prolifération (Pavlova et al., 2016).

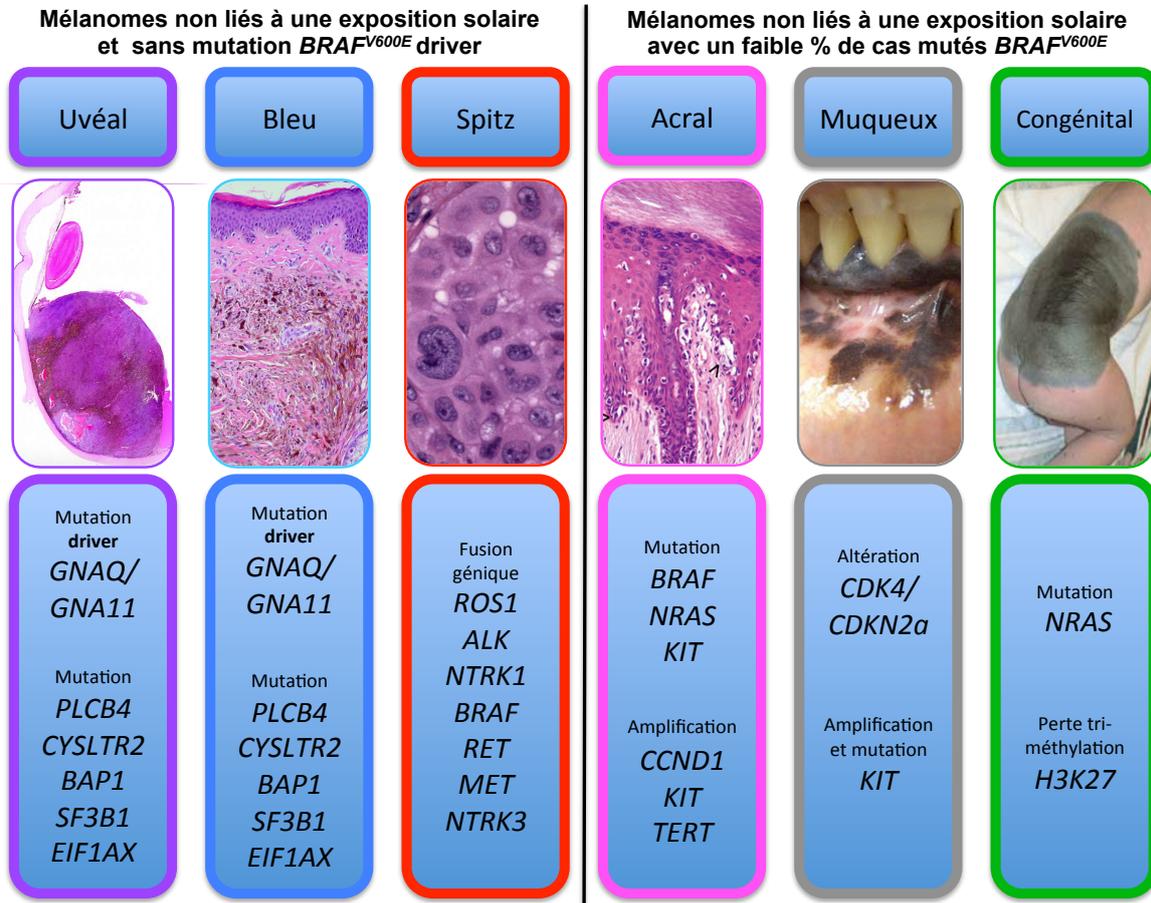


Figure 7 – Profils moléculaires des mélanomes non liés à une exposition solaire et des mélanomes pouvant présenter dans de rares cas une mutation *BRAF^{V600E}*

NB : le mélanome nodulaire ne correspond plus à une entité histologique dans la dernière classification OMS des tumeurs cutanées : en effet, sur le plan moléculaire cette lésion peut aussi bien être associée au profil moléculaire du mélanome high-CSD (mélanome de Dubreuilh) qu'à celui du low-CSD (SSM) et ne correspond pas à une entité en soi, mais plutôt à une présentation clinico-histologique particulière commune à tous les mélanomes d'emblée invasifs.

8.3 Comparaisons coût & délai des différentes méthodes de détermination du statut BRAF V600E

	PCR-HRM & Sanger	NGS	IHC BRAF V600E
<i>Coût</i>	116,10 euros	882,90 euros	48 euros
<i>Délai</i>	7 j 10 j si séquençage Sanger	10 j	4h
<i>Nomenclature RIHN et CCAM</i>	N501	N452	ZZQX069

Tableau 11 - Comparatif des coûts et délais des différentes techniques de détermination du statut BRAF

Tarifs d'après la liste complémentaire des actes de biologie médicale et d'anatomocytopathologie et du RIHN 2019 (Référentiels des actes Innovants Hors Nomenclature) et de la CCAM (Classification Commune des Actes Médicaux). Dans l'article de (Marino et al., 2017) paru en 2017, le coût d'une analyse NGS par patient en génétique somatique était évalué à 607 euros. Les délais d'obtention du résultat en biologie moléculaire sont évalués à compter de la réception des lames blanches.

Le coût global d'une immunohistochimie d'après le code ZZQX069 est évalué à 48 euros selon la CCAM. Ce coût inclue les frais adjacents au prix seul de réalisation de la lame. Cependant il est important de préciser que le prix d'une lame d'IHC BRAF V600E est de 10,552 euros, ce prix est élevé, le double du prix moyen d'un immunomarquage mais la technique reste bénéficiaire pour le service de pathologie (+38 euros).

	Prix kit IHC TTC	Nombre test	Prix de la lame
<i>Kit DAB Optiview</i>	1423 euros	250 euros	5,692 euros
<i>Anti-BRAF (500µL, 1/250)</i>	4860 euros	1000 euros	4,86 euros

Tableau 12 – Détail prix de l'immunohistochimie BRAF V600E

9. ABBREVIATIONS

CSD : Chronic Sun Damaged

DPN : Deep Penetrating Naevus

FDA : Food Drug Administration

HAS : Haute Autorité de Santé

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PEM : Pigmented Epithelioid Melanocytoma

PSM : Pigment Synthetised Melanoma

SERMENT D'HIPPOCRATE

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

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

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans **aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions**. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas **usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité**.

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

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

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

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. **Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers** et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

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

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.