



**HAL**  
open science

# Détermination du statut BRAF dans les mélanomes : comparaison des techniques immunohistochimiques et moléculaires sur une série de 223 cas issus du CHU de Caen

Audrey Colin

► **To cite this version:**

Audrey Colin. Détermination du statut BRAF dans les mélanomes : comparaison des techniques immunohistochimiques et moléculaires sur une série de 223 cas issus du CHU de Caen. Médecine humaine et pathologie. 2021. dumas-03537502

**HAL Id: dumas-03537502**

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03537502v1>

Submitted on 20 Jan 2022

**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.

UNIVERSITÉ de CAEN NORMANDIE

-----  
UFR SANTÉ

FACULTÉ de MÉDECINE

Année 2020/2021

**THÈSE POUR L'OBTENTION**  
**DU GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

Présentée et soutenue publiquement le : 15 septembre 2021

par

Mme Audrey COLIN

Née le 09/09/1992 à Caen (*Calvados*)

**TITRE DE LA THÈSE :**

**Détermination du statut BRAF dans les mélanomes : comparaison des techniques immunohistochimiques et moléculaires sur une série de 223 cas issus du CHU de Caen.**

**Président : Monsieur le Professeur BIBEAU Frédéric**

Membres : Madame le Docteur LEVALLET Guénaëlle

Monsieur le Docteur COMOZ François

Monsieur le Docteur L'ORPHELIN Jean-Matthieu

**Directeur de thèse : Monsieur le Professeur BIBEAU Frédéric**

**Année Universitaire 2020/2021****Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

**Assesseurs**

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3<sup>ème</sup> cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

M.	AGOSTINI Denis	Biophysique et médecine nucléaire
M.	AIDE Nicolas	Biophysique et médecine nucléaire
M.	ALEXANDRE Joachim	Pharmacologie clinique
M.	ALLOUCHE Stéphane	Biochimie et biologie moléculaire
M.	ALVES Arnaud	Chirurgie digestive
M.	AOUBA Achille	Médecine interne
M.	BABIN Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
M.	BÉNATEAU Hervé	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie
M.	BENOIST Guillaume	Gynécologie - Obstétrique
M.	BERGER Ludovic	Chirurgie vasculaire
M.	BERGOT Emmanuel	Pneumologie
M.	BIBEAU Frédéric	Anatomie et cytologie pathologique
Mme	BRAZO Perrine	Psychiatrie d'adultes
M.	BROUARD Jacques	Pédiatrie
M.	BUI Thanh-huy Eric	Psychiatrie d'adultes
M.	BUSTANY Pierre	Pharmacologie
Mme	CHAPON Françoise	Histologie, Embryologie
Mme	CLIN-GODARD Bénédicte	Médecine et santé au travail
M.	DAMAJ Ghandi Laurent	Hématologie
M.	DAO Manh Thông	Hépatologie-Gastro-Entérologie
M.	DEFER Gilles	Neurologie
M.	DELAMILLIEURE Pascal	Psychiatrie d'adultes
M.	DENISE Pierre	Physiologie
Mme	DOLLFUS Sonia	Psychiatrie d'adultes

<b>Mme DOMPMARTIN-BLANCHÈRE Anne</b>	Dermatologie
<b>M. DREYFUS Michel</b>	Gynécologie - Obstétrique
<b>M. DU CHEYRON Damien</b>	Réanimation médicale
<b>Mme ÉMERY Evelyne</b>	Neurochirurgie
<b>M. ESMAIL-BEYGUI Farzin</b>	Cardiologie
<b>Mme FAUVET Raffaèle</b>	Gynécologie – Obstétrique
<b>M. FISCHER Marc-Olivier</b>	Anesthésiologie et réanimation
<b>M. GÉRARD Jean-Louis</b>	Anesthésiologie et réanimation
<b>M. GUÉNOLÉ Fabian</b>	Pédopsychiatrie
<b>Mme GUITTET-BAUD Lydia</b>	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
<b>M. HAMON Martial</b>	Cardiologie
<b>Mme HAMON Michèle</b>	Radiologie et imagerie médicale
<b>M. HANOUS Jean-Luc</b>	Anesthésie et réa. médecine péri-opératoire
<b>M. HITIER Martin</b>	Anatomie –ORL Chirurgie Cervico-faciale
<b>M. HULET Christophe</b>	Chirurgie orthopédique et traumatologique
<b>M. ICARD Philippe</b>	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
<b>M. JOIN-LAMBERT Olivier</b>	Bactériologie - Virologie
<b>Mme JOLY-LOBBEDEZ Florence</b>	Cancérologie
<b>M. JOUBERT Michael</b>	Endocrinologie
<b>M. LAUNOY Guy</b>	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
<b>M. LE HELLO Simon</b>	Bactériologie-Virologie
<b>Mme LE MAUFF Brigitte</b>	Immunologie
<b>M. LOBBEDEZ Thierry</b>	Néphrologie
<b>M. LUBRANO Jean</b>	Chirurgie viscérale et digestive
<b>M. MAHE Marc-André</b>	Cancérologie
<b>M. MANRIQUE Alain</b>	Biophysique et médecine nucléaire
<b>M. MARCÉLLI Christian</b>	Rhumatologie
<b>M. MARTINAUD Olivier</b>	Neurologie
<b>M. MAUREL Jean</b>	Chirurgie générale
<b>M. MILLIEZ Paul</b>	Cardiologie
<b>M. MOREAU Sylvain</b>	Anatomie/Oto-Rhino-Laryngologie
<b>M. MOUTEL Grégoire</b>	Médecine légale et droit de la santé
<b>M. NORMAND Hervé</b>	Physiologie
<b>M. PARIENTI Jean-Jacques</b>	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication

<b>M. PELAGE Jean-Pierre</b>	Radiologie et imagerie médicale
<b>Mme PIQUET Marie-Astrid</b>	Nutrition
<b>M. QUINTYN Jean-Claude</b>	Ophtalmologie
<b>Mme RAT Anne-Christine</b>	Rhumatologie
<b>M. REPESE Yohann</b>	Hématologie
<b>M. REZNIK Yves</b>	Endocrinologie
<b>M. ROD Julien</b>	Chirurgie infantile
<b>M. ROUPIE Eric</b>	Médecine d'urgence
<b>Mme THARIAT Juliette</b>	Radiothérapie
<b>M. TILLOU Xavier</b>	Urologie
<b>M. TOUZÉ Emmanuel</b>	Neurologie
<b>Mme VABRET Astrid</b>	Bactériologie - Virologie
<b>M. VERDON Renaud</b>	Maladies infectieuses
<b>Mme VERNEUIL Laurence</b>	Dermatologie
<b>M. VIVIEN Denis</b>	Biologie cellulaire

#### **PROFESSEURS ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS**

<b>Mme BELLOT Anne</b>	Pédiatrie
<b>M. DE LA SAYETTE Vincent</b>	Neurologie
<b>M. GUILLAUME Cyril</b>	Médecine palliative
<b>M. LE BAS François</b>	Médecine Générale
<b>M. SABATIER Rémi</b>	Cardiologie

#### **PRCE**

<b>Mme LELEU Solveig</b>	Anglais
--------------------------	---------

#### **PROFESSEURS ÉMÉRITES**

<b>M. DERLON Jean-Michel</b>	Neurochirurgie
<b>M. GUILLOIS Bernard</b>	Pédiatrie
<b>M. HABRAND Jean-Louis</b>	Cancérologie option Radiothérapie
<b>M. HURAUULT de LIGNY Bruno</b>	Néphrologie
<b>Mme KOTTLER Marie-Laure</b>	Biochimie et biologie moléculaire
<b>M. LE COUTOUR Xavier</b>	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
<b>M. LEPORRIER Michel</b>	Hématologie
<b>M. RAVASSE Philippe</b>	Chirurgie infantile

**M. TROUSSARD Xavier**

Hématologie

**M. VIADER Fausto**

Neurologie

**Année Universitaire 2020/2021****Doyen**

Professeur Emmanuel TOUZÉ

**Assesseurs**

Professeur Paul MILLIEZ (pédagogie)

Professeur Guy LAUNOY (recherche)

Professeur Sonia DOLLFUS & Professeur Evelyne EMERY (3<sup>ème</sup> cycle)**Directrice administrative**

Madame Sarah CHEMTOB

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme BENHAÏM Annie	Biologie cellulaire
M. BESNARD Stéphane	Physiologie
Mme BONHOMME Julie	Parasitologie et mycologie
M. BOUVIER Nicolas	Néphrologie
M. BROSSIER David	Pédiatrie
M. COULBAULT Laurent	Biochimie et Biologie moléculaire
M. CREVEUIL Christian	Biostatistiques, info. médicale et tech. de communication
M. DE BOYSSON Hubert	Médecine interne
Mme DINA Julia	Bactériologie - Virologie
Mme DUPONT Claire	Pédiatrie
M. ÉTARD Olivier	Physiologie
M. GABEREL Thomas	Neurochirurgie
M. GRUCHY Nicolas	Génétique
M. ISNARD Christophe	Bactériologie Virologie
M. JUSTET Aurélien	Pneumologie
Mme KRIEGER Sophie	Pharmacie
M. LEGALLOIS Damien	Cardiologie
Mme LELONG-BOULOUARD Véronique	Pharmacologie fondamentale
Mme LEVALLET Guénaëlle	Cytologie et Histologie
M. MACREZ Richard	Médecine d'urgence
M. MITTRE Hervé	Biologie cellulaire
M. MOLIN Arnaud	Génétique
M. SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie

<b>M. SESBOÛÉ Bruno</b>	Physiologie
<b>M. TOUTIRAIS Olivier</b>	Immunologie
<b>M. VEYSSIERE Alexis</b>	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

**MAITRE DE CONFERENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE**

**M. HUMBERT Xavier**

**MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIÉS DES UNIVERSITÉS A MI-TEMPS**

<b>Mme ABBATE-LERAY Pascale</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>M. BANSARD Mathieu</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>M. COUETTE Pierre-André</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>Mme NOEL DE JAEGHER Sophie</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>M. PITHON Anni</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>M. SAINMONT Nicolas</b>	<b>Médecine générale</b>
<b>Mme SCHONBRODT Laure</b>	<b>Médecine générale</b>

**MAITRES DE CONFERENCES ÉMÉRITES**

<b>Mme DEBRUYNE Danièle</b>	Pharmacologie fondamentale
<b>Mme DERLON-BOREL Annie</b>	Hématologie
<b>Mme LEPORRIER Nathalie</b>	Génétique

## Remerciements

En premier lieu, je remercie le Professeur Frédéric BIBEAU d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et président du jury. Merci pour votre encadrement tout au long de ce travail et de mes années d'internat.

Je remercie le Docteur François COMOZ de m'avoir proposé ce sujet de thèse, pour sa bienveillance et le suivi de ce travail.

Merci au Docteur Guénaëlle LEVALLET pour son aide précieuse concernant la biologie moléculaire et de me faire l'honneur de juger ce travail.

Je remercie le Docteur Jean-Matthieu L'ORPHELIN de me faire l'honneur d'être membre du jury et de m'avoir apporté les précisions nécessaires concernant la prise en charge clinique des mélanomes.

Merci au Docteur Fatéméh DUBOIS pour ses précieux conseils et son aide.

Je remercie tous les médecins, techniciens et secrétaires des services d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Caen, de Cherbourg, du Centre François Baclesse, de Tahiti et du laboratoire Normapath de Caen. Vous avez tous contribué à ma formation et au médecin pathologiste que je vais devenir. Merci pour votre bienveillance, votre temps et votre aide.

Merci à tous mes co-internes. Adèle (pour ta patience, ton compagnonnage depuis le début de mon internat et ta gentillesse), Alexandre (binôme de promo, toujours à se serrer les coudes), Ruben (pour m'avoir aidé avec Excel), Gauthier (pour ton humour), Maxime (pour tes conseils fitness), Tanguy (qui m'a fait adorer la dermatologie), Marc, Anne-Laure, Félix, Arthur, Camille, Gwladys...

Je remercie ma famille. Mes parents, et tout particulièrement ma maman, mon éternel soutien depuis toujours. Ma sœur et mon frère, Clara et Alexis, toujours à mes côtés.

Merci à Murielle et Guillaume pour leur gentillesse et leur soutien depuis toutes ces années. A Marin, Gabriel et Léopold pour toutes ces sorties au B.

Merci à mes meilleures amies Amandine, Daisy, Mathilda et Enora, pour toutes ces années et moments de bonheur passés ensemble et ceux à venir.

Je remercie la team Cherbourg qui a largement contribué à rendre ces années d'internat beaucoup plus joyeuses et agréables. Chloé et Maxime (les ptits pères Niçois), Pauline, Luca, JB, Ahn-Claire, Mathilde, Claire, Mayane, Paul, Soso, Margaux, Raph, Inès et Jojo.

Merci aux autres copains toujours présents et partants pour des moments de retrouvailles, Anto, Juju, Antoine, Alexiane, Val, Mathilde, Bapt, Colin, Nathan, Coco, Christophe, Marjo, Xav, Lucie, Chloé, Clémentine...

Et bien sûr, merci à toi Clément, de rendre ma vie si belle, tu seras un père formidable.

## Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique  
AJCC : American joint committee on cancer  
ALM : Acral lentiginous melanoma  
AMM : Autorisation de mise sur le marché  
ARMS : Amplification refractory mutation system  
BM : Biologie moléculaire  
CCR : Cancer colorectal  
CHU : Centre hospitalier universitaire  
CSD : Cumulative sun damage  
HES : Hématoxyline eosine safran  
HIS : Hybridation in situ  
HL : Histiocytose langerhansienne  
HRM : High resolution melt  
IHC : Immunohistochimie  
IMS : Instabilité micro-satellitaire  
InCa : Institut national du cancer  
LMM : Lentigo malignant melanoma  
MML : Mucosal lentiginous melanoma  
MMR : Mismatch repair  
NGS : Next generation sequencing  
NM : Nodular melanoma  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
PCR : Polymerase chain reaction  
RCP : Réunion de concertation pluridisciplinaire  
SCF : Stem cell factor  
Se : Sensibilité  
Sp : Spécificité  
SSM : Superficial spreading melanoma  
TIL : Tumor infiltrating lymphocytes  
TNM : Tumor node metastasis  
TSM : Taux standardisés monde  
UICC : Union internationale contre le cancer  
VPN : Valeur prédictive négative  
VPP : Valeur prédictive positive  
WT : Wild type

## Tableaux et figures

**Tableau 1** : Survie selon l'indice de Breslow

**Tableau 2** : Marges chirurgicales selon Breslow

**Tableau 3** : Classification des mélanomes selon les caractéristiques génomiques, le type histologique et l'exposition solaire (CSD)

**Tableau 4** : Amorces et sondes utilisées pour l'ARMS PCR

**Tableau 5** : Caractéristiques clinico-histologiques des prélèvements inclus dans l'étude

**Tableau 6** : Cas discordants

**Figure 1** : taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année (taux standardisation monde-TSM) du mélanome

**Figure 2** : Mélanome de type SSM (Superficial Spreading Melanoma) avec nodule invasif

**Figure 3** : Image en dermoscopie d'un mélanome de type SSM. Flèches blanches : lignes blanches brillantes « chrysalides », cercle rouge : réticulations grossières atypiques, carré bleu : dépigmentation pseudo-cicatricielle

**Figure 4** : Indice de Breslow

**Figure 5** : Niveaux de Clark

**Figure 6** : Schéma représentatif des différents types de régression. A-Si régression épidermique, diagnostic différentiel avec une métastase dermique B-Si régression latérale, mauvaise classification en mélanome nodulaire C-Si régression sous le mélanome, diminution de l'épaisseur du Breslow

**Figure 7** : Schéma représentatif du score de Clark ; A : profil « absent » ; B : profil « non-brisk » ; C : profil « brisk »

**Figure 8** : Modèle de progression des mélanomes proposé par *Shain* et al.

**Figure 9** : Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK et PI3K/AKT

**Figure 10** : Prise en charge thérapeutique des mélanomes

**Figure 11** : PCR en temps réel avec sonde Taqman

**Figure 12** : Organigramme des demandes de détermination du statut BRAF

**Figure 13** : Évolution des demandes IHC/BM par année (N=715)

**Figure 14** : Flowchart montrant les échantillons analysés avec les cas concordants et discordants.

**Figure 15** : (Grossissement x20) Métastase dermique de mélanome avec un marquage positif intense et diffus cytoplasmique par IHC (BRAFFV600E+)

**Figure 16** : (Grossissement x30) Métastase dermique de mélanome sans marquage en IHC (BRAFFV600E-)

**Figure 17 :** (Grossissements x30 et x40) Cas discordant n°10, IHC+/BM- : Mélanome cutané primitif avec pigmentation intense, marquage positif en IHC (BRAFFV600E+). Faux négatif en BM.

**Figure 18 :** (Grossissement x10) Cas discordant n°9, IHC+/BM- : Localisation métastatique ganglionnaire, marquage positif en IHC (BRAFFV600E+). Faux négatif en BM.

**Figure 19 :** Profil moléculaire du cas discordant n°6, IHC+/BM- : Absence de mutation en BM (qPCR). Faux positif en IHC.

**Figure 20 :** Profil moléculaire du cas discordant n°1, IHC-/BM+ : Présence de la mutation BRAFFV600R en BM.

**Figure 21 :** Schéma représentatif des 5 cas discordants BM+/IHC-

**Figure 22 :** Schéma représentatif des 5 cas discordants BM-/IHC+

**Figure 23 :** Algorithme de la place de l'IHC dans la prise en charge des mélanomes

**Figure 24 :** Algorithme de la place de l'IHC pour HER2 dans le cancer du sein

# Sommaire

<b>Introduction</b>	p.1
I-Généralités sur le mélanome	p.1
1. Épidémiologie	p.1
2. Facteurs de risque	p.2
3. Diagnostic clinique	p.2
4. Diagnostic histologique	p.4
5. Classification histologique	p.6
6. Facteurs histopronostiques	p.7
7. Classification morpho-moléculaire	p.11
II-Oncogénétique du mélanome	p.15
1. Mutation de BRAF et voie des MAP kinases	p.15
2. Autres altérations moléculaires du mélanome	p.16
III-Prise en charge thérapeutique	p.17
1. Principes généraux	p.17
2. Thérapies ciblées	p.17
IV-Recherche de la mutation BRAF	p.18
<b>Matériel et méthode</b>	p.23
I-Patients	p.23
II-Immunohistochimie	p.24
III-PCR en temps réel	p.24
1. Extraction de l'ADN	p.24
2. ARMS PCR : recherche des mutations de l'exon 15, codon 600 du gène BRAF	p.25
<b>Résultats</b>	p.26
<b>Discussion</b>	p.34
<b>Conclusion</b>	p.43
<b>Bibliographie</b>	p.44
<b>Annexes</b>	p.49

# Introduction

## I. Généralités sur le mélanome

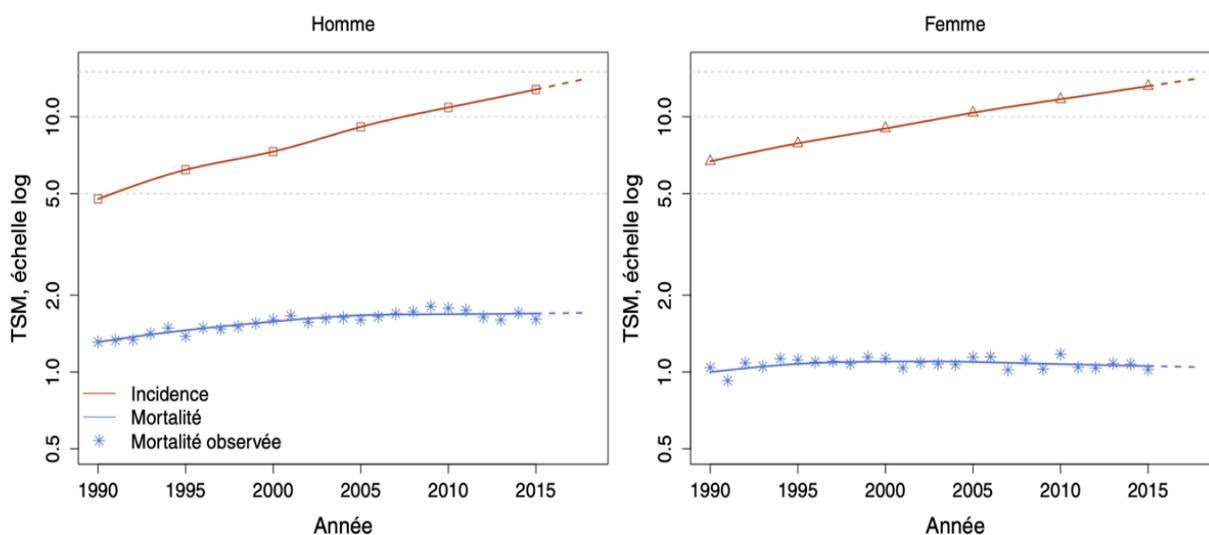
### 1. Épidémiologie :

Les mélanomes cutanés concernent 10 % des cancers de la peau. Cela représente un enjeu de santé publique majeur en France car c'est l'un des cancers dont l'incidence comme la mortalité ont significativement augmenté sur la période 1980-2012(1).

En France métropolitaine en 2018, le nombre de nouveaux cas de mélanomes est estimé à 15 513 dont 51% chez l'homme et le nombre de décès est estimé à 1975 dont 57% chez l'homme.

Les âges médians au diagnostic et au décès sont respectivement de 66 et 71 ans chez l'homme et de 60 et 73 ans chez la femme.

Malgré un léger ralentissement de l'incidence sur la période récente (grâce aux campagnes de prévention et de dépistage précoce effectuées depuis 1996), on constate toujours une augmentation du risque avec les générations successives (2).



**Figure 1 :** Taux d'incidence et de mortalité en France selon l'année (taux standardisés monde (TSM)) du mélanome

Le mélanome cutané est un cancer de bon pronostic s'il est détecté assez tôt. Le taux de survie relative à 5 ans est de 88 % pour les stades localisés et de 18 % dans les situations métastatiques. Un diagnostic précoce est nécessaire pour la guérison du patient (3).

## 2. Facteurs de risque :

Plusieurs facteurs de risques sont identifiés (4) :

- Les facteurs de risque externes (liés à l'environnement) :
  - L'exposition au soleil et aux ultraviolets artificiels.
  - Les antécédents de coups de soleil reçus pendant l'enfance.
  
- Les facteurs de risque internes (constitutifs des individus) :
  - Le phototype, qui caractérise la sensibilité de la peau aux rayonnements ultraviolets. Le plus à risque est celui de la peau claire avec cheveux roux ou blonds, yeux clairs et taches de rousseur.
  - Un nombre élevé de grains de beauté (plus de 50), la présence de nævi d'aspect inhabituel ou congénitaux de grande taille.
  - Les antécédents personnels ou familiaux (parents au 1<sup>er</sup> degré) de mélanome.
  - Une immunodépression.

## 3. Diagnostic clinique

Le diagnostic clinique de mélanome cutané repose sur l'analyse sémiologique d'une lésion pigmentée, à l'aide de la règle ABCDE. On suspecte un mélanome si  $\geq 2$  critères parmi (5):

- Asymétrie : lésion de forme asymétrique
- Bordure : bords irréguliers, encochés, polycycliques
- Couleur : couleur hétérogène, c'est-à-dire associant plusieurs couleurs (brun clair ou foncé, rouge, bleuté, noir...)
- Diamètre : une taille supérieure à 6 mm (critère non spécifique)
- Évolution : changement d'aspect, de taille, de couleur, d'épaisseur (critère le plus important)

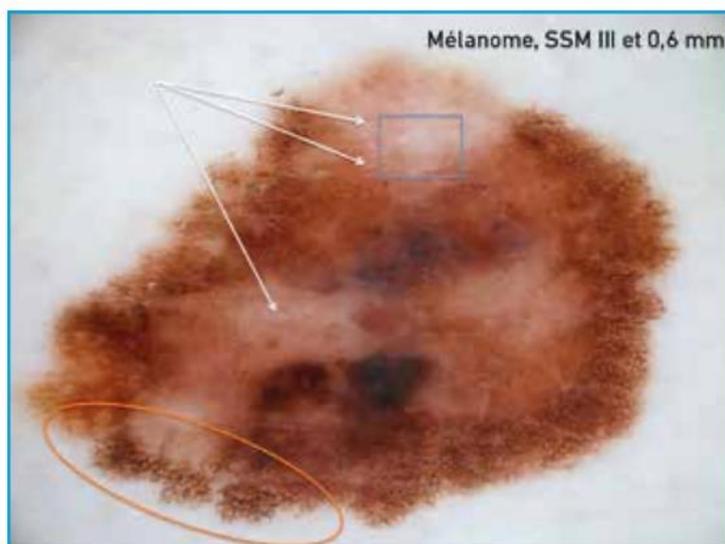


**Figure 2 :** Mélanome de type SSM (Superficial Spreading Melanoma) avec nodule invasif (5)

En complément de l'inspection visuelle seule, la dermoscopie ou microscopie de surface est un outil très utile. Il s'agit d'un appareil comprenant une ou plusieurs lentilles permettant un grossissement x10 et ainsi une analyse plus précise des lésions. Les critères suivants sont évocateurs de malignité et indiquent l'exérèse de la lésion (6) :

- Un réseau pigmenté irrégulier
- Une asymétrie du patron
- Des globules bruns inégalement répartis et inhomogènes en taille
- Un voile blanc/ bleu
- Des pseudopodes et stries radiaires
- Des aspects vasculaires atypiques
- Des zones pseudo-cicatricielles blanches
- Une « tache d'encre » correspondant à une zone sans structure pigmentée

Pour les personnes à haut risque (predisposition génétique, antécédents personnels de mélanome, nombre élevé de nævi...) la vidéodermoscopie contribue de manière significative à la détection précoce des mélanomes et à réduire le nombre d'exérèses inutiles. C'est un processus en deux étapes : tout d'abord une cartographie avec photographies du corps entiers puis une dermoscopie séquentielle (7).



**Figure 3 :** Image en dermoscopie d'un mélanome de type SSM. Flèches blanches : lignes blanches brillantes « chrysalides », cercle rouge : réticulations grossières atypiques, carré bleu : dépigmentation pseudo-cicatricielle (6)

La confirmation du diagnostic de mélanome est anatomopathologique. Il se fait sur une exérèse complète de la lésion et non sur une biopsie (sauf en cas de délabrement important du visage). L'examen anatomopathologique précise s'il s'agit bien d'un mélanome, son type histologique, les critères histopronostiques et le caractère complet ou non de l'exérèse.

#### 4. Diagnostic histologique

Le mélanome correspond à une prolifération mélanocytaire maligne. La malignité de la lésion est parfois difficile à déterminer (nævus vs mélanome), le pathologiste doit alors s'appuyer sur un faisceau d'arguments.

Tout d'abord, le contexte clinique est indispensable : connaître l'âge du patient (pour éviter les faux positifs avant 20 ans et les faux négatifs après 45-50 ans), le siège lésionnel, l'aspect clinique (les critères ABCDE) et l'anamnèse (la modification récente d'une lésion ancienne est suspecte).

L'analyse microscopique de la lésion commence par le faible grossissement avec la taille, le type de peau et surtout la silhouette lésionnelle (une lésion asymétrique et irrégulière est évocatrice de malignité).

On analyse ensuite l'architecture de la lésion : sa situation dans la peau (épidermique, dermo-épidermique, dermique, hypodermique), les limites lésionnelles (nettes ou floues),

l'architecture de la composante épidermique (une architecture pagétoïde avec des thèques ou des cellules isolées ascensionnées est suspecte), la composante dermique (une densité cellulaire élevée avec des cellules cohésives est en faveur d'une lésion maligne), la présence d'une « grenz-zone » (un espace sous épidermique comblé est aussi évocateur de malignité).

Les mitoses ne sont à évaluer que sur la composante dermique, un nombre élevé est en faveur d'un mélanome.

Morphologiquement, le mélanome présente des caractéristiques très variables. Les cellules peuvent être de taille moyenne à très grande, de forme polygonale, fusiforme, dendritique, ovale, ronde... Elles ont souvent un cytoplasme éosinophile ou finement granuleux comportant le plus souvent un pigment mélanique (sauf les mélanomes achromiques) poussiéreux, variant de très fin à très grossier, et donnant une teinte brunâtre, mauve ou grisâtre au cytoplasme. Les atypies cytonucléaires ne sont pas déterminantes pour le diagnostic de mélanome, certains nævi (comme le nævus de Spitz) présentent des atypies cytonucléaires marquées.

En revanche, la présence d'un gradient de maturation des cellules peut être un argument en faveur de la bénignité d'une lésion. Dans un nævus, de la surface vers la profondeur, on observe des nævocytes épithélioïdes puis plus basophiles et enfin plutôt neuroïdes. Dans les mélanomes, il n'est pas observé de gradient de maturation (8).

Enfin, on peut s'aider de l'immunohistochimie. Les marqueurs Melan-A, Sox-10 et PS100 peuvent confirmer la nature mélanocytaire de la prolifération. HMB45 peut participer à déterminer la nature maligne d'une lésion s'il y a un marquage hétérogène et plurifocal des cellules. Le Ki67 (index de prolifération mitotique) est évalué seulement sur la composante dermique, il détermine la prolifération cellulaire (si > 20%, plutôt en faveur d'un mélanome). Plus récemment, le marqueur PRAME (PReferentially expressed Antigen in MElanoma) est une aide supplémentaire au diagnostic de mélanome, s'il existe un marquage nucléaire intense et diffus (9).

Le mélanome peut se développer à partir d'un nævus préexistant qu'il soit congénital (géant ou non) ou acquis (banal ou dysplasique) ou de « novo » en peau saine ; soit en deux temps (phase horizontale puis verticale) soit en un temps (phases verticale et horizontale synchrones). La composante mélanocytaire intra-épidermique latérale est le témoin d'un développement en deux phases. C'est sur l'aspect histologique de cette composante que repose la classification histologique des mélanomes (Classification de Sydney 1972).

## 5. Classification histologique :

- Forme avec composante intra-épidermique latérale :
  - Mélanome de Dubreuil ou LMM (Lentigo Malignant Melanoma) : Il représente 5 à 12% des cas. Siégeant sur les zones photo-exposées et principalement le visage, chez les sujets de plus de 60 ans. La composante latérale est lentigineuse (prolifération mélanocytaire le long de la membrane basale épidermique). Il a souvent une évolution horizontale pendant des mois ou des années.
  - Mélanome superficiel extensif ou SSM (Superficial Spreading Melanoma) : Le plus fréquent, il représente 60 à 65% des cas. Il siège sur tous les types de peau. Il présente une composante latérale pagétoïde (migration monocellulaire ou thécale transépidermique des mélanocytes).
  - Mélanome acrolentigineux ou ALM (Acral Lentiginous Melanoma) et mélanome des muqueuses ou MLM (Mucosal Lentiginous Melanoma) : Ils représentent seulement 2 à 13% des mélanomes, mais la majorité des cas de mélanomes chez les sujets à peau noire. Ce sont des lésions se développant sur peau glabre (paume des mains, plante des pieds, ongles...) ou sur une muqueuse. La composante latérale est lentigineuse.
- Forme sans composante latérale :
  - Mélanome nodulaire ou NM (Nodular Melanoma) : Moins de 10% des cas. Évolution rapidement verticale, invasive d'emblée.

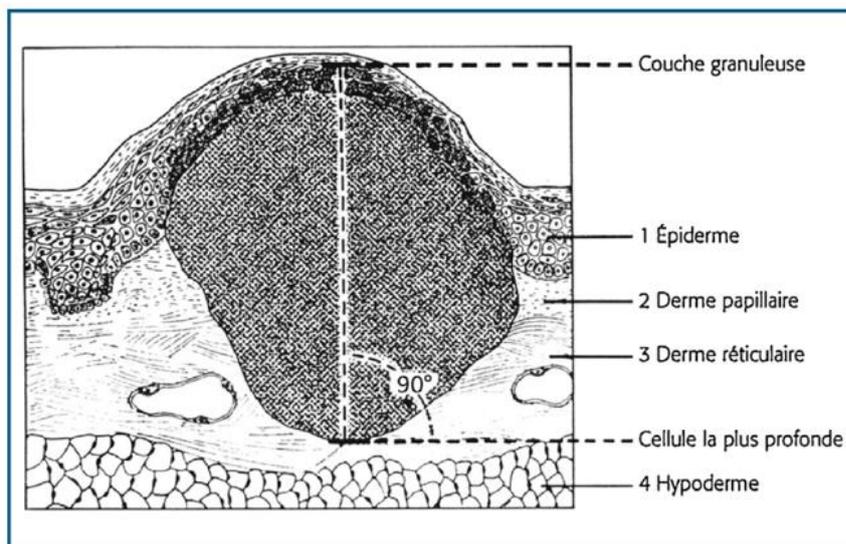
Il existe d'autres formes histologiques plus rares : mélanome desmoplastique, mélanome sur nævus bleu, mélanome de Spitz, mélanome uvéal...

À indice de Breslow identique (épaisseur tumorale), toutes ces formes anatomo-cliniques ont un pronostic comparable.

Le compte rendu finalisé d'anatomopathologie doit impérativement comporter les critères histologiques suivants, qui ont un impact sur la prise en charge et le pronostic du patient.

## 6. Facteurs histopronostiques :

- **Critères majeurs (pris en compte pour la classification TNM (Tumor Node Metastasis))**
  - **L'indice de Breslow** : C'est le critère ayant le plus d'impact, il est déterminant pour l'évaluation du « T » de la classification TNM. Il correspond à l'épaisseur maximale de la tumeur. La mesure se fait à l'aide d'un micromètre oculaire ou d'un logiciel image, sur une coupe HES (Hématoxyline Éosine Safran) standard. On mesure la zone la plus épaisse et non la plus invasive, verticalement (perpendiculairement à la surface cutanée), depuis la couche granuleuse épidermique la plus haute jusqu'à la cellule maligne la plus profonde. Si la lésion est ulcérée on effectue la mesure depuis le fond d'ulcération, seulement si la lésion est plus épaisse à ce niveau. La mesure du Breslow est le paramètre le mieux corrélé au pronostic (avec une corrélation linéaire entre l'épaisseur tumorale et la mortalité), il est nécessaire pour la prise en charge thérapeutique et le suivi des patients. La reprise chirurgicale des marges de la lésion va être effectuée en fonction du Breslow. Sauf exception, pour le mélanome de Dubreuilh intra-épidermique, une marge de 1 cm est indiquée.



**Figure 4** : Indice de Breslow

Épaisseur	n	Survie	
		5 ans	10 ans
0,01 – 0,50 mm	7,138	0,98	0,95
0,51 – 1,00 mm	8,680	0,95	0,88
1,01 mm – 2,00 mm	9,310	0,89	0,78
2,01 mm – 3,00 mm	3,847	0,77	0,68
3,01 mm – 4,00 mm	1,973	0,71	0,60
4,01 mm – 6,00 mm	1,605	0,66	0,54
6,01 mm – 8,00 mm	584	0,58	0,44
> 8 mm	535	0,55	0,40

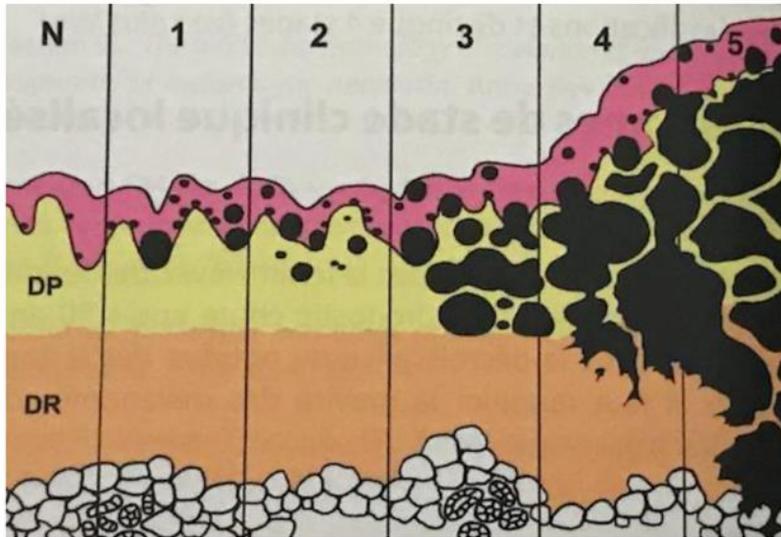
**Tableau 1** : Survie selon l'indice de Breslow

Épaisseur selon Breslow	Marges chirurgicales conseillées
Intra-épidermique	0,5 cm
0,1-1 mm	1 cm
1,1-2 mm	1 à 2 cm
> 2 mm	2 cm
Concernant la profondeur d'exérèse, en l'absence de données robustes, le GT propose de réaliser une exérèse jusqu'au fascia tout en le respectant	

**Tableau 2** : Marges chirurgicales selon Breslow

- **Le niveau de Clark et Mihm** : Il correspond à la profondeur d'invasion tumorale dans la peau et comprend 5 niveaux :
  - Niveau 1 : La prolifération siège uniquement dans l'épiderme et les annexes. La membrane basale est respectée. Cela correspond à un mélanome intra-épidermique ou mélanome in situ.
  - Niveau 2 : La lésion envahit partiellement le derme papillaire sans atteindre l'interface entre le derme papillaire et réticulaire. Absence de comblement du derme papillaire.
  - Niveau 3 : Comblement du derme papillaire, la prolifération est au contact du derme réticulaire sans l'envahir. Le front d'invasion est plutôt rectiligne.

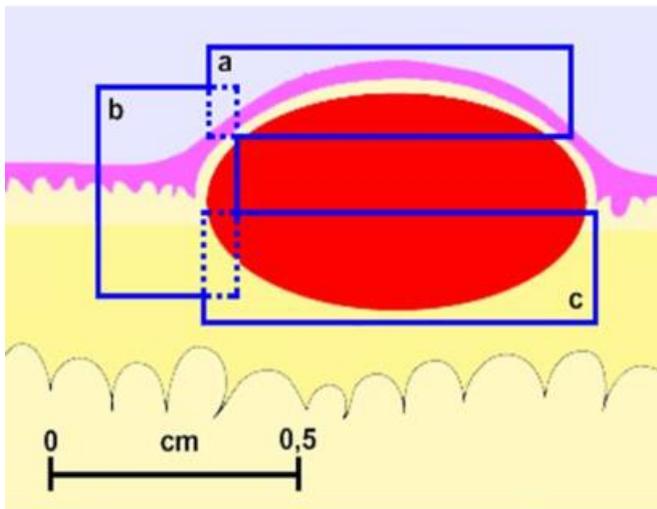
- Niveau 4 : Infiltration du derme réticulaire. Le front d'invasion est irrégulier.
- Niveau 5 : Envahissement de l'hypoderme.



**Figure 5** : Niveaux de Clark

- **Ulcération** : Elle est définie par une interruption de l'épiderme (non traumatique, ni artéfactuelle) avec présence de dépôts fibrino-leucocytaires.
- **Autres critères (non pris en compte pour la classification TNM)**
  - **L'activité mitotique** : Elle correspond au taux moyen de mitoses par mm<sup>2</sup>. On compte les mitoses dermiques en commençant par les zones les plus mitotiques (« hot spots »). Une forte activité mitotique est de moins bon pronostic qu'une activité mitotique faible.
  - **La régression** : C'est un phénomène fréquent dans le mélanome, il s'agit d'une disparition des mélanocytes tumoraux secondaire à la réponse immunologique de l'hôte. Il existe plusieurs stades évolutifs. Initialement, on peut observer une inflammation riche en lymphocytes au sein de la prolifération tumorale. Le diagnostic entre une vraie régression ou seulement une inflammation accompagnant une invasion dermique peut être difficile. Plus tardivement, un aspect de régression complète est possible avec la présence de mélanophages, dans ce cas la régression ne fait pas de doute. Enfin, la régression peut être

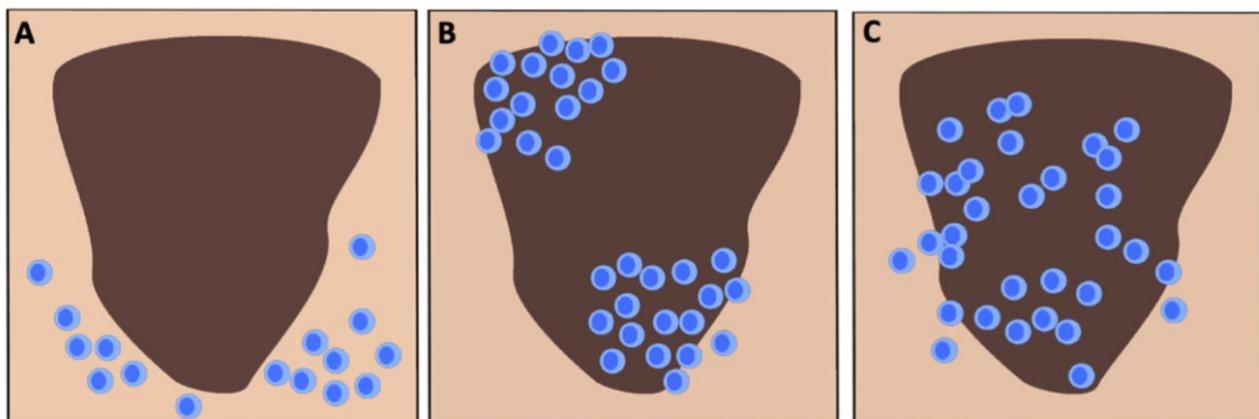
d'aspect pseudo cicatriciel, avec disparition totale des mélanocytes, de l'infiltrat inflammatoire et des mélanophages, remplacés par un tissu fibreux cicatriciel résiduel. La régression totale peut être affirmée seulement si une métastase de mélanome est connue. L'aspect régressif est toujours un facteur pronostic défavorable. Il peut faire sous-estimer l'épaisseur réelle du mélanome et ainsi son agressivité. Il est donc impératif de préciser la présence de régression et son étendue (% de surface occupée par la régression).



**Figure 6 :** Schéma représentatif des différents types de régressions. A-Si régression épidermique, diagnostic différentiel avec une métastase dermique B-Si régression latérale, mauvaise classification en mélanome nodulaire C-Si régression sous le mélanome, diminution de l'épaisseur du Breslow

- **Emboles vasculaires ou lymphatiques :** La présence d'emboles est un facteur de mauvais pronostic.
- **TILs (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*):** La quantité, la localisation et le phénotype des lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL) sont des marqueurs prédictifs de la réponse à l'immunothérapie mais aussi des modulateurs clefs de la progression de la maladie. L'infiltrat immunitaire est de localisation intra tumorale, stromale ou péri-tumorale. Actuellement, le score de Clark (1989) est largement utilisé pour sa bonne reproductibilité et sa facilité d'application. Il définit 3 niveaux :
  - 1) *absent* : il n'y pas d'infiltrat lymphocytaire visible ou présence de lymphocytes n'infiltrant pas la tumeur ;
  - 2) *non-brisk* : infiltration focale ou multifocale éparse lymphocytaire ;
  - 3) *brisk* : infiltration diffuse par les lymphocytes sur toute la phase

de croissance verticale de la lésion ou tout au long de la base de la tumeur. Un profil dit « brisk » est un marqueur de meilleur pronostic. Les cellules immunitaires présentent des fonctions et des phénotypes hétérogènes pouvant être mis en évidence par immunomarquage : les cellules B (CD20), les cellules T (CD3, CD4, CD8) et les cellules T régulatrices (FOXP3). Il a été observé un meilleur pronostic pour les phénotypes T CD3+, CD8+, CD4+ et B CD20+ alors qu'un pronostic plus péjoratif est associé au lymphocytes T reg (FOXP3+) (10).



**Figure 7** : Schéma représentatif du score de Clark ; A : profil « absent » ; B : profil « non-brisk » ; C : profil « brisk »

Au total, les critères majeurs rentrent seuls en compte pour la classification pTNM, avec les stades de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC 8<sup>ème</sup> édition) et de l'American Joint Committee on Cancer (AJCC) (*voir annexe 1*) (11).

La classification peut être simplifiée ainsi :

- Stades I et II : mélanomes localisés
- Stade III : mélanomes avec métastases locorégionales cutanées ou ganglionnaires
- Stade IV : mélanomes avec métastases à distance.

## 7. Classification morpho-moléculaire

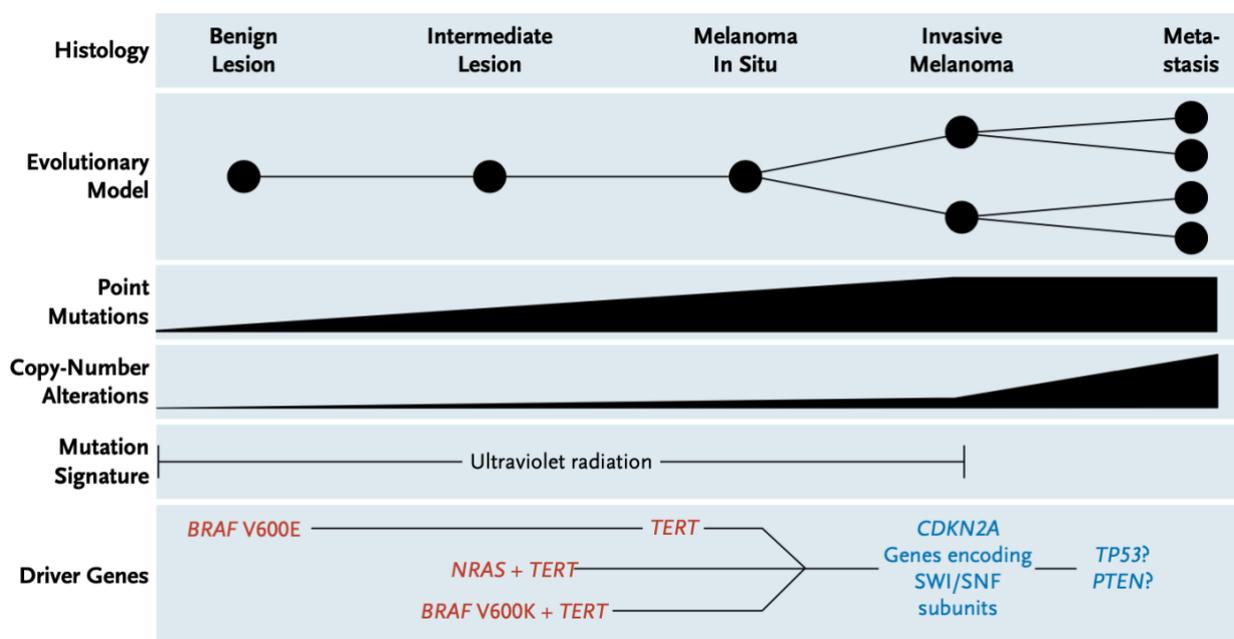
La nouvelle classification de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) 2018 (4<sup>ème</sup> édition) propose une classification morpho-moléculaire des mélanomes grâce à la meilleure connaissance de l'évolution génétique des tumeurs mélanocytaires (12). Elle est basée sur la voie de pathogénèse du mélanome et son association à l'exposition solaire.

Shain et al (13) ont décrit la succession des altérations génétiques au cours de la progression du mélanome.

Dans un premier temps, les lésions précurseurs sont initiées par des mutations activant la voie des MAP kinases. On observe que les lésions bénignes (nævus) présentent exclusivement des mutations BRAF V600E.

Ensuite, les auteurs décrivent des lésions dites « intermédiaires » caractérisées par des aspects histologiques particuliers et surtout par des anomalies génétiques additionnelles comme des mutations NRAS. De plus, des mutations du promoteur TERT sont retrouvées fréquemment dans les lésions intermédiaires et les mélanome in situ. En revanche, l'inactivation bi-allélique de CDKN2A apparaît exclusivement dans les mélanomes invasifs, comme les mutations PTEN et TP53 qui sont retrouvées seulement dans les mélanomes à un stade avancé.

Enfin, cette étude démontre aussi l'impact majeur des rayons ultraviolets dans l'activation des mutations et donc dans l'initiation et la progression vers le mélanome.



**Figure 8 :** Modèle de progression des mélanomes proposé par Shain et al.

Une classification en fonction du « degré de dommage solaire cumulatif » (CSD), c'est-à-dire selon l'exposition solaire accumulée au cours du temps, a été établie. Elle différencie trois groupes :

- Les mélanomes survenant sur peau peu exposée au soleil, à faible CSD : SSM et certains NM.

- Les mélanomes survenant sur peau exposée de manière chronique au soleil, à CSD élevé : LMM, mélanome desmoplastique, certains NM.
- Les mélanomes survenant sur peau non-exposée au soleil : mélanome de Spitz, mélanome acral, mélanome des muqueuses, mélanome sur nævus bleu ou nævus congénital.

Des signatures moléculaires distinctes sont identifiées selon la localisation et l'exposition solaire des lésions mélanocytaires. Les mélanomes à CSD faible sont majoritairement localisés au niveau du tronc et des extrémités et sont porteurs le plus souvent de mutation BRAF (en particulier BRAF p.V600E). Les mélanomes à CSD élevé, se situent préférentiellement au niveau de la tête et du cou et présentent plutôt des mutations NRAS, NF1, KIT et autres mutations BRAF. Les mélanomes survenant sur peau non exposée présentent une charge mutationnelle plus faible avec parfois des mutations plus fréquentes de BAP1, c-KIT, HRAS, GNA11 et des fusions de kinases. La mise en évidence de ces anomalies moléculaires présente un réel impact théranostique et thérapeutique.

Type of UVR exposure/CSD	Subtype of melanoma	Affected genes
Low-CSD melanoma	SSM	BRAF V600 E/K or NRAS CDKN2A TP53 SWI/SNF TERT
High-CSD melanoma	LMM Desmoplastic melanoma	NF1, NRAS, BRAF, KIT CDKN2A TP53 SWI/SNF TERT
Low to no UVR exposure (or variable/incidental)	Spitz melanoma	HRAS, ROS1, NTRK1, NTRK3, ALK, RET, MET, BRAF, CDKN2A, TERT
	Acral melanoma	NRAS, KIT, NF1,
	Mucosal melanoma (genital, oral, sinonasal)	SPRED1, BRAF, CCND1, ALK, ROS1, RET, NTRK1, CDKN2A, CDK4, TP53, SWI/SNF, TERT
	Uveal melanoma	GNAQ, GNA11, CYSLTR2, PLCB4, BAP1, SF3B1, EIF1AX
	Melanoma arising in congenital naevus	NRAS
	Melanoma arising in blue naevus	GNAQ, GNA11, CYSLTR2, BAP1, SF3B1, EIF1AX

CSD = Cumulative sun damage.

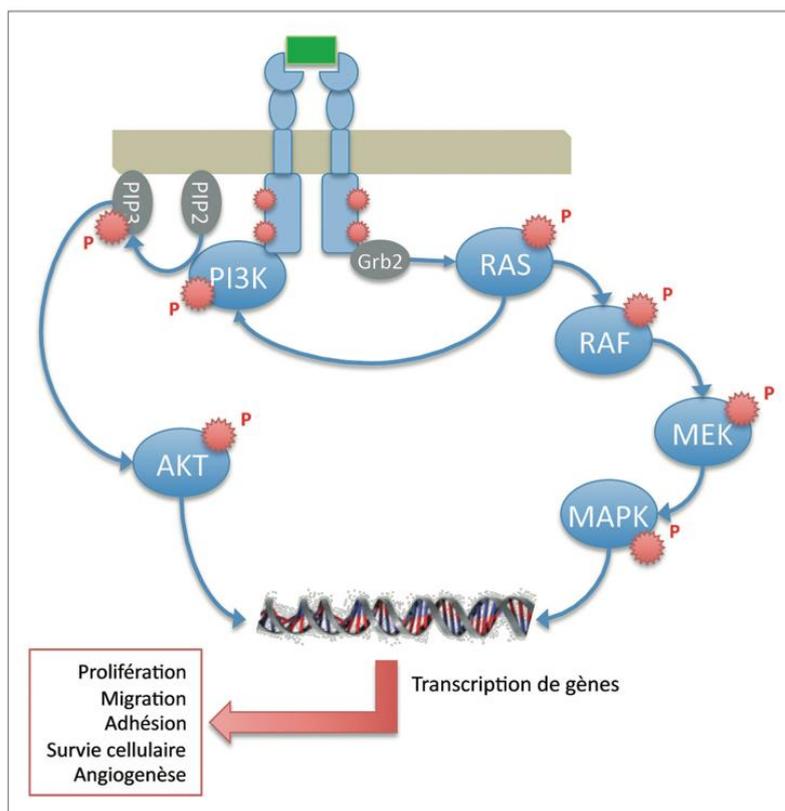
**Tableau 3** : Classification des mélanomes selon leurs caractéristiques génomiques, leur type histologique et l'exposition solaire (CSD)

## II. Oncogénétique du mélanome

### 1. Mutation de BRAF et voie des MAP kinases

La mutation du gène BRAF est retrouvée dans de nombreux cancers comme le carcinome papillaire de la thyroïde, les cancers colorectaux, les gliomes (14) et plus fréquemment dans les mélanomes. Elle concerne 40% à 50% des mélanomes (15).

La protéine BRAF est une protéine kinase qui appartient à la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK mise en jeu lors de l'activation de l'EGFR (protéine transmembranaire de la classe des récepteurs à activité tyrosine-kinase). La fixation d'un ligand (comme l'EGF, TGF $\alpha$ , amphiréguline, épිරéguline...) entraîne l'activation du récepteur EGFR par dimérisation et phosphorylation de celui-ci. Cette phosphorylation déclenche l'activation de deux voies de signalisation intracellulaire d'aval : la voie RAS/RAF/MEK/MAPK et la voie PI3K/AKT/m-Tor. Il s'ensuit alors une cascade de phosphorylation. La protéine BRAF est activée par RAS, puis elle va activer à son tour MEK, elle-même activant ERK qui induit après translocation, l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et l'apoptose cellulaire (16).



**Figure 9** : Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/MAPK et PI3K/AKT

Dans 90% des cas, les mutations du gène BRAF affectent le codon 600 de l'exon 15 (17), avec un remplacement de la Valine (V) par :

- Un acide glutamique (V600E), mutation la plus fréquente (79% des cas)
- Une lysine (V600K), deuxième mutation la plus fréquemment retrouvée (12%)
- Une arginine (V600R) dans 5% des cas
- Une méthionine (V600M) dans 4% des cas (18)

Ces mutations sont toutes activatrices de la fonction kinase de la protéine BRAF. Dans 10% des cas, des mutations plus rares sont mises en évidence (BRAF K601DEL, L597S, L597Q...) (19).

## **2. Autres altérations moléculaires du mélanome.**

La mutation du gène NRAS est présente dans 15 à 20% des mélanomes (18) (20) et sont mutuellement exclusives avec la mutation BRAF (sauf très rares exceptions) (17). L'identification de la mutation NRAS sur un échantillon permet de renforcer le résultat négatif de la recherche de mutation BRAF. La protéine NRAS fait partie de la famille des GTPases et joue un rôle dans la transmission de signaux extracellulaires provenant de récepteurs membranaires (EGFR). Une fois activée, la protéine RAS stimule les deux principales voies de signalisation cellulaires de l'EGFR : la voie des MAP-Kinase et la voie PI3K/AKT (*cf. figure 8*). La mutation de NRAS aboutit à un blocage de la protéine en forme active, avec pour conséquence la dérégulation du cycle cellulaire, la survie et la prolifération cellulaire. Le gène NRAS comporte 7 exons, et les codons les plus souvent concernés sont les codons 12, 13 et 61.

Le gène C-KIT est muté dans 1 à 3 % des mélanomes métastatiques, plus fréquemment dans les mélanomes muqueux et acrolentigineux et ceux survenant sur peau chroniquement exposée au soleil (high CSD melanoma). C-KIT est le récepteur du SCF (Stem Cell factor) qui joue un rôle central dans le développement de multiples lignées cellulaires dont les mélanocytes. Le gène comporte 21 exons, les plus fréquemment concernés sont les exons 9, 11, 13 et 17 (21).

### III. Prise en charge thérapeutique

#### 1. Principes généraux

Le traitement initial repose sur l'exérèse chirurgicale complète devant la suspicion ou le diagnostic clinique de mélanome. Il est ensuite préconisé la reprise chirurgicale des marges de la cicatrice selon l'indice de Breslow (*cf. tableau 2*).

La technique du ganglion sentinelle consiste à effectuer l'exérèse du ou des premiers ganglions situés dans la zone de drainage du mélanome (en général un à trois) et ainsi déterminer histologiquement la présence de micro métastase. Il permet d'éviter une morbidité excessive dû à des curages ganglionnaires inutiles. Il faut d'abord s'assurer de l'absence de métastase régionale ou à distance par l'examen clinique et l'imagerie. L'analyse de l'envahissement ou non du ganglion est déterminante pour la suite de la prise en charge thérapeutique. Si un ganglion sentinelle est métastatique un traitement adjuvant sera proposé pouvant comprendre un curage axillaire, un traitement médicamenteux ou de la radiothérapie.

Cette technique est indiquée pour les mélanomes ayant une épaisseur de 1 mm et plus, les mélanomes avec ulcération quelle que soit la taille et pour les mélanomes entre 0,8 et 1 mm l'indication est à discuter en RCP (Réunion de Concertation Pluridisciplinaire) (22).

#### 2. Thérapies ciblées

Le mélanome avec des métastases à distance présente un pronostic sombre chez les patients non traités avec une médiane de survie de 6 à 9 mois. Les métastases les plus fréquentes sont pulmonaires, hépatiques, cérébrales et osseuses. (23)

Les patients atteints de mélanomes de stade III ou IV (après résection de leur métastase si celle-ci est possible) sont éligibles à un traitement adjuvant. Ces dernières années, le développement des thérapies ciblées et de l'immunothérapie (anti-PDL1 ou anti-CTLA4) a permis une augmentation considérable de la survie des patients et à changer les recommandations thérapeutiques.

Actuellement trois thérapies ciblées possèdent l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) : le Vémurafénib, le Dabrafénib et l'Encorafénib. Ce sont des inhibiteurs de la voie des MAP kinases qui ciblent spécifiquement la protéine mutée BRAF V600.

En 2012, *Chapman* et al. (24) ont réalisé une étude comparative entre le Vémurafénib et le Dacarbazine (chimiothérapie). Pour le Vémurafénib, ils ont rapporté une augmentation

significative du taux de survie globale à 6 mois de 84 % (vs 64 % pour le Dacarbazine) et de la médiane de survie sans progression de 5,3 mois (vs 1,6 mois pour le Dacarbazine) chez les patients ayant un mélanome métastatique non traité auparavant et muté BRAF V600E. Le Vémurafénib a donc été la première thérapie ciblée indiquée chez les patients avec un mélanome métastatique de stade IIIc et stade IV porteur de la mutation BRAFV600.

Par la suite, de nombreux mécanismes de résistance avec récurrences ont été observés au bout de 6 à 8 mois de traitement. Pour cette raison, après la mise en évidence d'un meilleur taux de survie (25), ils sont maintenant toujours administrés en association avec un inhibiteur de MEK (Cobimetinib, Trametinib ou Bimétinib) (26). La protéine MEK est une protéine kinase jouant aussi un rôle dans la régulation de la voie des MAP kinase.

Pour les patients présentant un mélanome métastatique avec mutation de C-KIT, l'Imatinib Mésylate a montré une certaine efficacité avec un taux de réponse de 23,3 %. (27) Il est utilisé dans certains centres, hors AMM.

Pour les mélanomes avec mutations de NRAS, il n'y a pas de molécule inhibant efficacement NRAS, des essais cliniques sont en cours.

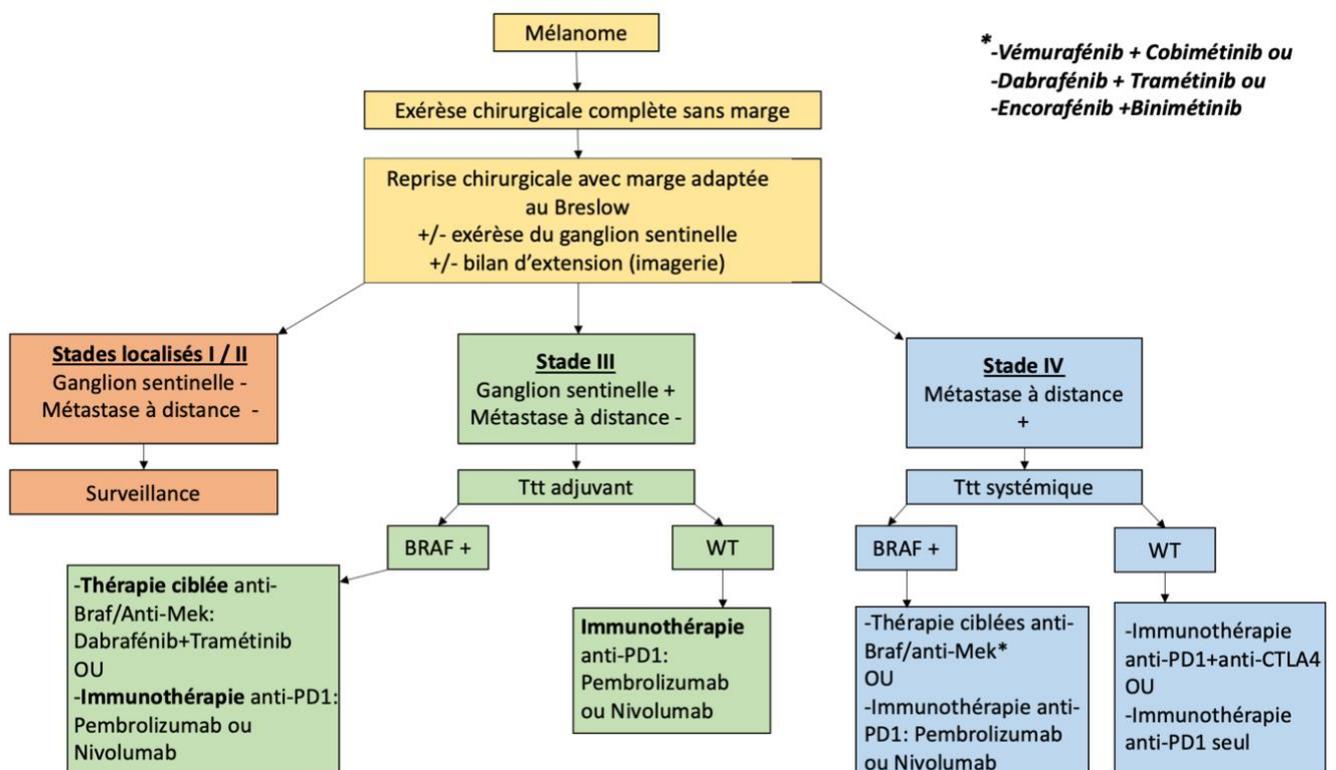
Les recommandations actuelles pour le traitement adjuvant du mélanome métastatique dépendent du statut BRAF, on évalue à environ 40% le nombre de patient « BRAF muté » et à 60% les patients « wild-type » (WT). Elles peuvent être ainsi résumées (28):

- Si présence de mutation V600 de BRAF : les patients sont éligibles à un traitement par thérapie ciblée anti-BRAF+anti-MEK (seulement l'association Dabrafénib+Trametinib présente l'AMM dans cette indication) ou à une immunothérapie. En l'absence d'étude comparative entre la thérapie ciblée et l'immunothérapie, il n'y a pas de donnée permettant de recommander un traitement plutôt que l'autre (avis en RCP). Si une résistance apparaît au traitement par thérapie ciblée on proposera l'immunothérapie en deuxième ligne. Il existe une nette différence concernant les effets secondaires entre les inhibiteurs de PDL-1 et de BRAF/MEK. Bien qu'il existe moins d'effets secondaires de grade III et IV pour le Nivolumab ou le Pembrolizumab, ces deux médicaments peuvent avoir des effets secondaires immunitaires sur le long terme potentiellement mortels (ex : diabète, insuffisance hypophysaire, myocardite). En revanche, davantage de patients arrêtent le traitement par thérapies ciblées en raison d'effets secondaires plus aigus (détachement rétinien, toxidermies...) mais qui disparaissent à l'arrêt. Un autre point

non négligeable est que l'immunothérapie est prescrite pour une durée de 12 mois, alors que les thérapies ciblées n'ont pas de limite temporelle d'arrêt.

- Si statut BRAF WT : les patients sont éligibles à un traitement par immunothérapie.

De nouvelles études sont en cours pour évaluer l'efficacité d'un traitement par immunothérapie ou thérapie ciblée en néo-adjuvant du mélanome, même à un stade plus localisé. Cette thérapie en néo-adjuvant pourrait rendre l'exérèse chirurgicale plus facile et moins délabrante, réduire les indications de radiothérapie et limiter l'extension locorégionale de la maladie (29) (30).



**Figure 10 :** Prise en charge thérapeutique du mélanome

#### IV. Recherche de la mutation BRAF

La détection de la mutation BRAF est un préalable à toute prise en charge thérapeutique du mélanome métastatique. La technique de référence est le génotypage par biologie moléculaire (BM) d'échantillon tumoral au sein d'une des 28 plateformes mises en place par l'InCA (Institut National du Cancer) (31). Il est préférable d'effectuer la recherche mutationnelle sur une métastase en premier lieu, et à défaut sur le mélanome primitif. De rares discordances de statut mutationnel ont été rapportées entre le site primaire et la localisation métastatique, surtout lorsqu'il est question de métastase cutanée ou cérébrale (15).

Ces analyses peuvent être réalisées selon différentes techniques de BM : PCR (Polymerase Chain Reaction) en temps réel (qPCR), pyroséquençage, séquençage Sanger, courbe de fusion à haute résolution (HRM, High resolution Melt) ou séquençage de nouvelle génération (NGS, Next Generation Sequencing).

Il est aussi possible de rechercher spécifiquement la mutation BRAF V600E par immunohistochimie (IHC) qui présente de nombreux avantages. Plusieurs études ont démontré la sensibilité et la spécificité de ce test, *Capper and al.* ont été les premiers en 2011 (*cf. tableau résumé en annexe 2*). L'IHC permet la mise en place plus rapide d'une thérapie ciblée, en revanche elle ne permet pas de détecter les mutations plus rares de BRAF.

Au CHU de Caen, la technique de biologie moléculaire utilisée est la qPCR avec sonde Taqman.

Son principe repose sur celui de la PCR classique, elle permet l'amplification d'un fragment d'ADN (Acide désoxyribonucléique) spécifique délimité par des « amorces » (oligonucléotides) complémentaires. Techniquement, il faut placer les tubes contenant le mélange réactionnel (couple d'amorces, Taq polymérase, tampon, magnésium, désoxyribonucléotides : dATP, dCTP, dGTP et dTTP) dans un thermocycleur. Puis la PCR se déroule en plusieurs cycles composés de trois étapes :

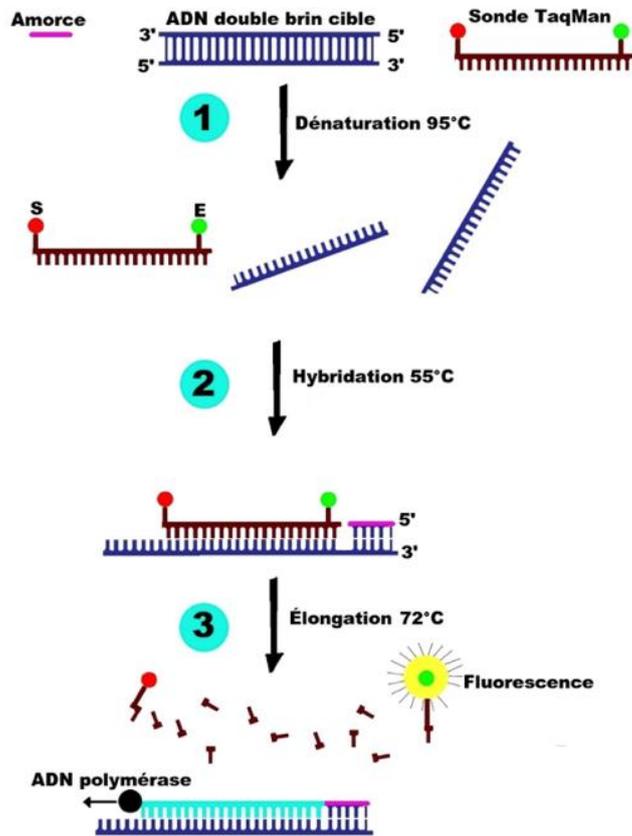
- 1) Dénaturation (à 95°C) des doubles brins d'ADN pour donner des simples brins.
- 2) Hybridation (à 55°C) du couple d'amorces qui délimitent la région d'ADN à amplifier.
- 3) Élongation par la Taq polymérase thermorésistante (à 72°C) à partir des extrémités 3'OH des amorces et formation de brins complémentaires.

Les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est exponentielle.

La PCR en temps réel avec sonde Taqman permet le suivi de la réaction en temps réel et non en final comme la PCR classique. Ce sont des sondes marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur E (« reporter ») et à leur extrémité 3' par un suppresseur S (« quencher »). Le suppresseur S inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, quand la sonde s'hybride à sa cible (l'amplicon), elle est alors hydrolysée par la Taq polymérase pendant l'élongation (étape 3). Dans ce cas, le fluorochrome émetteur se sépare du suppresseur. L'automate émet donc un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées (*cf fig 9*). Ainsi, la spécificité de la réaction est liée à la fois à celle des amorces et à celle de la sonde (32).

Cette technique de qPCR présente de nombreux avantages pour la recherche de la mutation BRAF : elle est peu coûteuse, facile, relativement rapide (délai d'une semaine en moyenne), très sensible et spécifique. Elle est possible sur des prélèvements congelés, frais, inclus en paraffine et faibles en ADN. De plus le multiplexage est possible si la mutation recherchée est connue.

En revanche, elle présente aussi quelques inconvénients : elle est exclusive de la requête (la mutation recherchée doit être connue) et même si elle est possible sur de faibles quantités d'ADN, elle nécessite plus de 10 % de cellules tumorales (33).



**Figure 11** : PCR en temps réel avec sonde Taqman

Dans notre centre, la recherche de la mutation BRAF V600E par immunohistochimie doit être systématiquement réalisée pour les mélanomes métastatiques. En parallèle, les mutations de BRAF V600E, V600K, V600R sont recherchées par technique de biologie moléculaire (PCR en temps réel). Si le gène BRAF est non muté, l'analyse des gènes NRAS et KIT est effectuée par Séquençage Sanger. Pour certains cas, si l'IHC est douteuse ou s'il existe une forte suspicion clinique de mutation BRAF, mais sans mutations BRAF V600E, K ou R retrouvées en qPCR, un séquençage Sanger peut être réalisé.

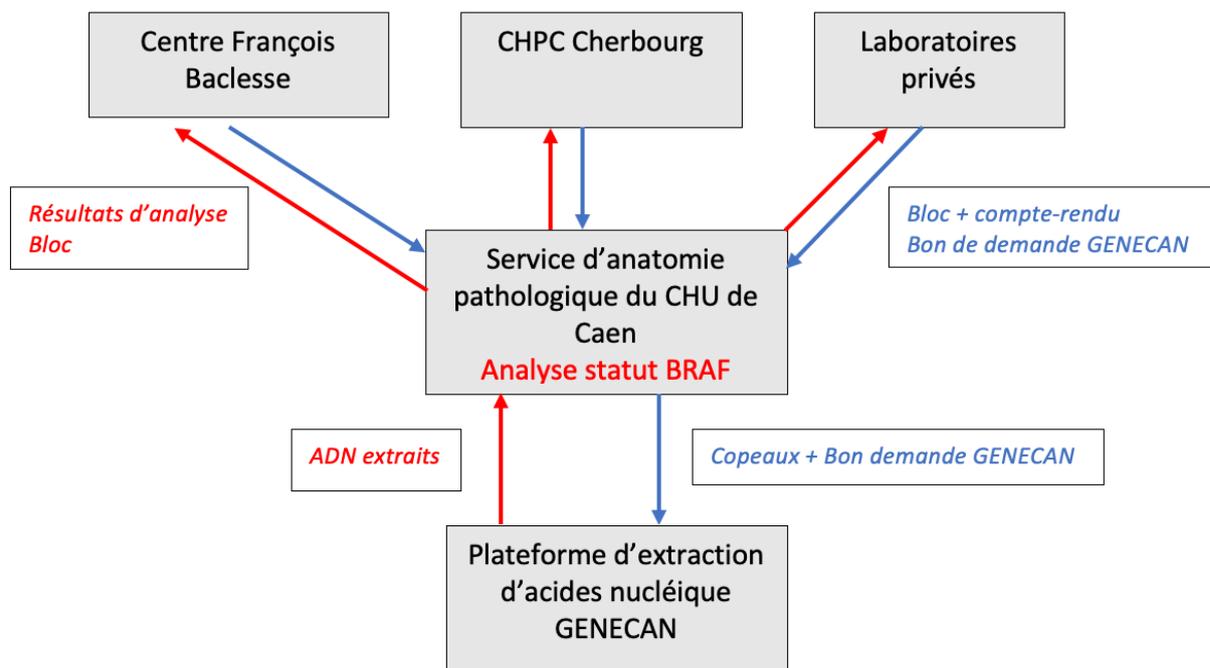
La place de l'IHC pour la recherche de la mutation BRAFV600 reste encore mal définie pour la prise en charge des mélanomes stades III et IV.

L'objectif de cette étude est de comparer les performances de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire pour la détermination du statut mutationnel BRAF dans les mélanomes métastatiques.

## Matériel et méthode

### I. Patients

Tous les patients ayant fait l'objet d'une recherche de mutation BRAF sur un prélèvement de lésion primitive ou secondaire de mélanome entre le 07/01/2015 et le 29/05/2020 au sein de la plateforme d'analyse cellulaire et moléculaire du CHU de Caen ont été inclus de manière rétrospective et consécutive. A noter que tous les cas de mélanomes nécessitant la recherche biomoléculaire de BRAF de la région Basse-Normandie (du centre François-Baclesse, de l'hôpital périphérique de Cherbourg et des laboratoires libéraux d'Alençon, Avranches, Caen) sont adressés au CHU de Caen.



**Figure 12** : Organigramme des demandes de détermination du statut BRAF

## II. Immunohistochimie

L'étude immunohistochimique est faite sur le même bloc de paraffine que l'analyse en biologie moléculaire. Chaque prélèvement est d'abord fixé immédiatement et pendant 24 à 72h dans une solution de formol à 4% puis inclus en paraffine. Ensuite, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont réalisées puis colorées en HES.

L'IHC est faite à l'aide d'un anticorps spécifique de la mutation *BRAF* V600E (anticorps monoclonal de souris VE1, laboratoire Eurobio, E19292) sur un automate Ventana Benchmark ULTRA (Kit de révélation Optiview), dilution 1/50. Un témoin positif externe est associé à chaque test, il est effectué à partir d'un échantillon de tumeur mutée *BRAF* V600E (>80% de cellules mutées) et ainsi qu'un témoin négatif par incubation de l'anticorps secondaire sans anticorps primaire. Concernant l'interprétation, un résultat est considéré comme positif si un marquage cytoplasmique d'intensité modérée à forte des cellules tumorales est observé. Un marquage de moindre intensité ou un marquage nucléaire est interprété comme négatif.

## III. PCR en temps réel

### 1. **Extraction de l'ADN**

L'extraction de l'ADN tumorale est effectuée à partir du bloc de paraffine contenant l'échantillon tumoral. Tout d'abord, le pathologiste entoure sur la lame HES la zone d'intérêt puis évalue le pourcentage de cellules tumorales et de nécrose. Des coupes de 10 µm sont réalisées à l'aide du microtome à partir du bloc de paraffine. Les copeaux de paraffine sont isolés par microdissection manuelle. Il s'ensuit un déparaffinage par xylène, éthanol et centrifugation. L'extraction de l'ADN est réalisée à l'aide du kit Qiagen® comportant de multiples étapes : lyse cellulaire, extraction de l'ADN par précipitation à l'éthanol, fixation sur une membrane de silice, lavages et élution pour récupérer l'ADN purifié. Les concentrations d'ADN et les ratios de densité optique (DO230/260, DO260/280) sont mesurées à l'aide du Nanodrop® afin de s'assurer de l'absence de contamination.

## 2. ARMS PCR : Recherche des mutations de l'exon 15, codon 600 du gène BRAF

L'ARMS (Amplification Refractory Mutation System) est une PCR spécifique d'allèle. Dans un premier temps, les mutations BRAF V600E-K sont recherchées sans être différenciées. En l'absence de ces deux mutations, la mutation BRAF V600R est à son tour recherchée séparément. Le mélange réactionnel utilisé contient : 12,5 µL de Quantifast® produit prêt à l'emploi (comportant une Taq polymérase, un tampon de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et K<sup>+</sup>, un additif Q-BOND® permettant d'accélérer la PCR, des dNTP), 9 µL d'eau RNase free, 1 µL d'amorce sens à 10 ng/µL, 1 µL d'amorce anti-sens à la concentration 10 ng/µL, sonde Taqman et 1 µL d'ADN à 50 ng. Un témoin négatif (dans lequel l'ADN est remplacé par de l'eau RNase free) et un témoin positif correspondant à la mutation ou à la forme sauvage à rechercher sont systématiquement ajoutés. Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau suivant (*cf. tableau 4*).

NOM	SEQUENCE (5'-3')
BRAF WILD V600V	TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATA
BRAF V600K-E	TAGGTGATTTTGGTCTAGCTACATG
BRAF V600R	AGGTGATTTTGGTCTAGCTACAG
BRAF V600 REVERSE	ACCATCCACAAAATGGATCCA
BRAF 600 TAQMAN	6FAM-TCGATGGAGTGGGTCC-BHQ1

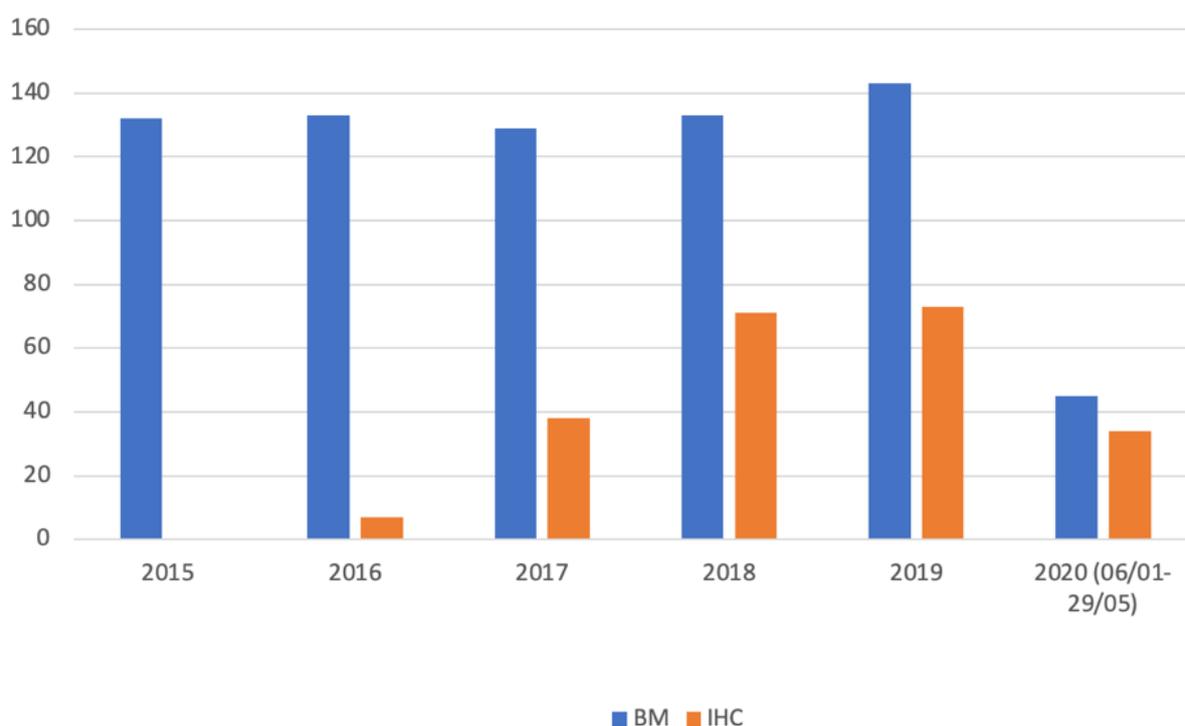
**Tableau 4** : Amorces et sondes utilisées pour l'ARMS PCR

L'appareil de PCR en temps réel utilisé est l'Eppendorf Realplex®. Les résultats sont analysés par le logiciel Realplex®.

Pour les cas discordants en IHC/BM, un séquençage Sanger à l'aide du séquenceur ABI 3500 d'Applied Biosystem peut être réalisé.

## Résultats

Initialement, une recherche sur le logiciel Diamic a permis d'identifier 715 échantillons tumoraux de lésions primitives ou secondaires qui ont bénéficié d'une recherche de statut mutationnel BRAF au CHU de Caen du 07/01/2015 (date de mise en place de la BM) au 29/07/2020. Après exclusion des cas n'ayant pas eu de double analyse (BM et IHC), notre effectif final retenu est de 223 échantillons. On remarque que les demandes d'IHC en première intention ont nettement augmentées au fil des années (en 2016, aucune demande d'IHC pour 132 cas de recherche mutationnelle en BM et en 2019, 73 demandes d'IHC sur 143 demandes de BM).



**Figure 13 :** Évolution des demandes IHC/BM par année (N=715)

Les 223 échantillons de notre effectif final proviennent de 202 patients. 183 patients ont fait l'objet d'une recherche BRAF sur un site lésionnel, 17 patients sur deux sites et 2 patients sur trois sites. Pour ces 19 derniers patients, les résultats sont tous identiques selon le site lésionnel. Les principaux critères clinico-histologiques sont présentés dans le tableau ci-dessous (*cf. tableau 5*).

	<b>N (%)</b>
<b>GENRE</b>	
Femme	122 (55%)
Homme	101 (45%)
<b>AGE</b>	
< ou = 60 ans	64 (29%)
> 60 ans	159 (71%)
<b>NATURE DE L'ECHANTILLON (*)</b>	
Biopsie	29 (29%)
Exérèse	70 (71%)
<b>ORIGINE DE L'ECHANTILLON (*)</b>	
Primitif	23 (21%)
Secondaire	85 (79%)
<b>% DE CELLULES TUMORALES (*)</b>	
< ou = 20%	2 (3%)
> 20% et < ou = 50%	17 (22%)
> 50%	57 (75%)

**Tableau 5 :** Caractéristiques clinico-histologiques des prélèvements inclus dans l'étude (\*données manquantes)

Dans un premier temps (*analyse 1*), l'analyse comparative des résultats de BM et d'IHC a mis en évidence 10 cas discordants (4,5%). 5 cas (cas n°1 à n°5) présentent un résultat positif en BM et un résultat négatif en IHC (BM+/IHC -) et 5 cas (cas n°6 à n°10) ont un résultat négatif en BM et un résultat positif en IHC (BM-/IHC+). Avec ces données, l'IHC a une sensibilité de 92,6%, une spécificité de 98,5%, une valeur prédictive positive de 92,6% et une valeur prédictive négative de 96,8%.

Cas #	IHC	BM
Cas 1	-	+ (V600R)
Cas 2	-	+ (V600K)
Cas 3	-	+
Cas 4	-	+ (V600K)
Cas 5	-	+ (V600E+K601)
Cas 6	+	-
Cas 7	+	-
Cas 8	+	-
Cas 9	+	-
Cas 10	+	-

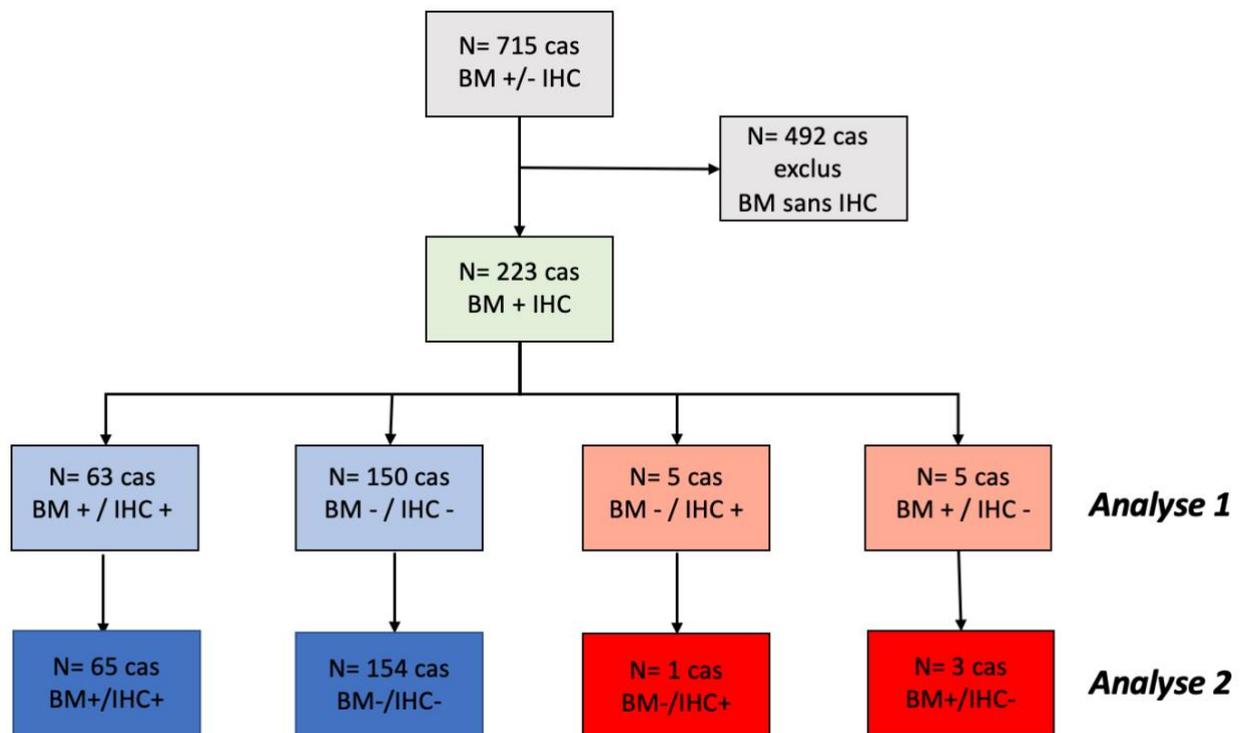
**Tableau 6** : Cas discordants

Dans un second temps (*analyse 2*), nous avons analysé les 10 résultats discordants entre la BM et l'IHC.

Pour les 5 cas discordants BM+/IHC-, 3 cas (*cas n°1, n°2 et n°4*) présentent une mutation V600K ou V600R (ne pouvant pas être reconnues par l'anticorps utilisé en IHC), 1 cas (*cas n°3*) résulte d'une fausse amplification en qPCR (mutation non retrouvée en séquençage Sanger ni en NGS). Au total, un seul cas (*cas n°5*) s'avère être un vrai faux-négatif en IHC (présence d'une double mutation V600E+K601 en séquençage Sanger).

Concernant les 5 autres cas discordants BM-/IHC+, pour 2 cas (*cas n°9 et n°10*), l'analyse complémentaire par séquençage Sanger a retrouvé la mutation V600E (la qPCR a été faussement négative). Au final, 3 cas (*cas n°6, n°7 et n°8*) sont de vrais faux positifs en IHC (dû à une mauvaise interprétation de l'IHC).

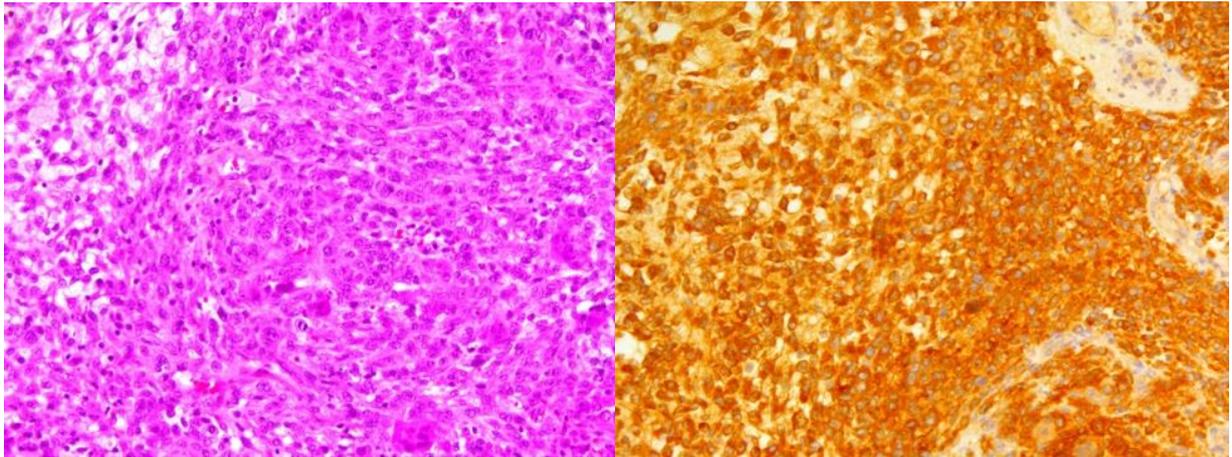
D'après ces nouveaux résultats, la sensibilité de l'IHC est de 98,5%, la spécificité de 98,1%, la valeur prédictive positive de 95,6% et la valeur prédictive négative de 99,4%. Au total, on a mis en évidence une mutation V600 E/K pour 67 des 223 cas (30 %), une autre mutation non V600E/K pour 2 cas (0,9 %) et aucune mutation BRAF pour 154 échantillons (69,1 %).



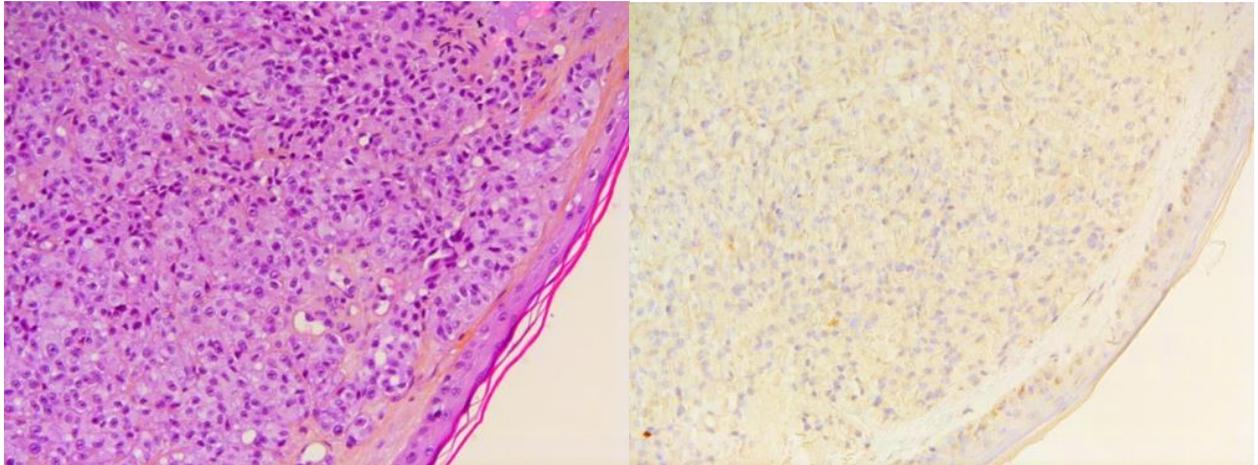
**Figure 14 :** Flowchart montrant les échantillons analysés avec les cas concordants ou discordants

On a ensuite comparé les délais d'obtention des résultats de l'IHC et de la BM. Pour calculer ces durées, on a pris en compte la date de prescription des examens (IHC et BM) puis la date de validation du compte-rendu final par le pathologiste responsable du cas. Douze cas ont été exclus car les dates exactes de prescription d'examen ne sont pas connues (N=211). Au final, l'étude en immunohistochimie dure en moyenne 3,7 jours [1-21 jours] et l'étude moléculaire dure en moyenne 9,1 jours [2-29 jours].

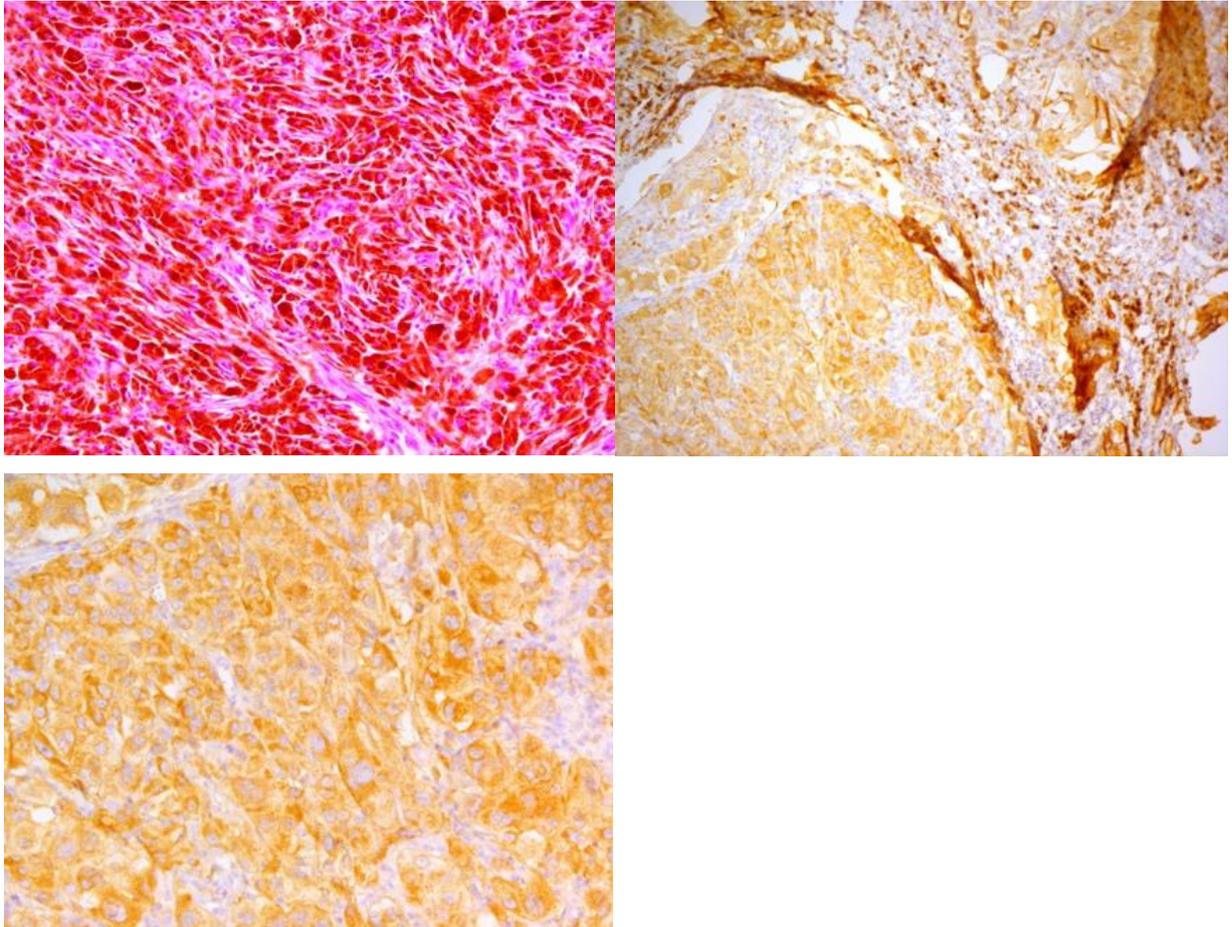
Pour 6 cas appartenant à notre effectif initial de 715 prélèvements, la technique de biologie moléculaire n'a pu être réalisée de façon optimale, soit car son interprétation n'a pas été possible soit car l'échantillon n'a pu être amplifié pour diverses raisons (présence de trop de pigments mélaniques, trop peu de cellules tumorales...). L'IHC a été réalisée afin de voir si elle pouvait pallier à ces limites de la BM, mais aucune mutation BRAF V600E n'a été mise en évidence.



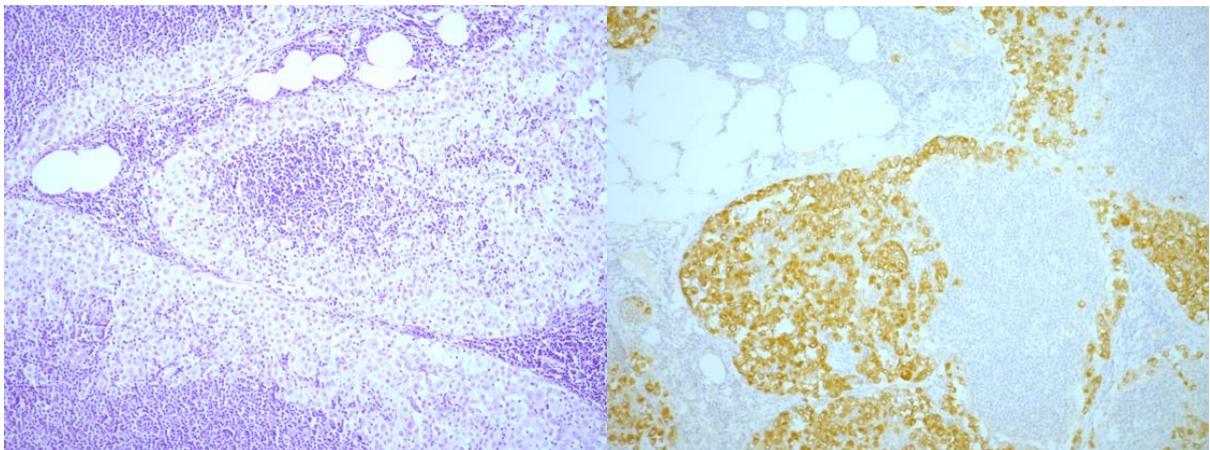
**Figure 15 :** (Grossissement x20) Métastase dermique de mélanome avec un marquage positif intense et diffus cytoplasmique par IHC (BRAFV600E+).



**Figure 16 :** (Grossissement x30) Métastase dermique de mélanome sans marquage en IHC (BRAFV600E-).

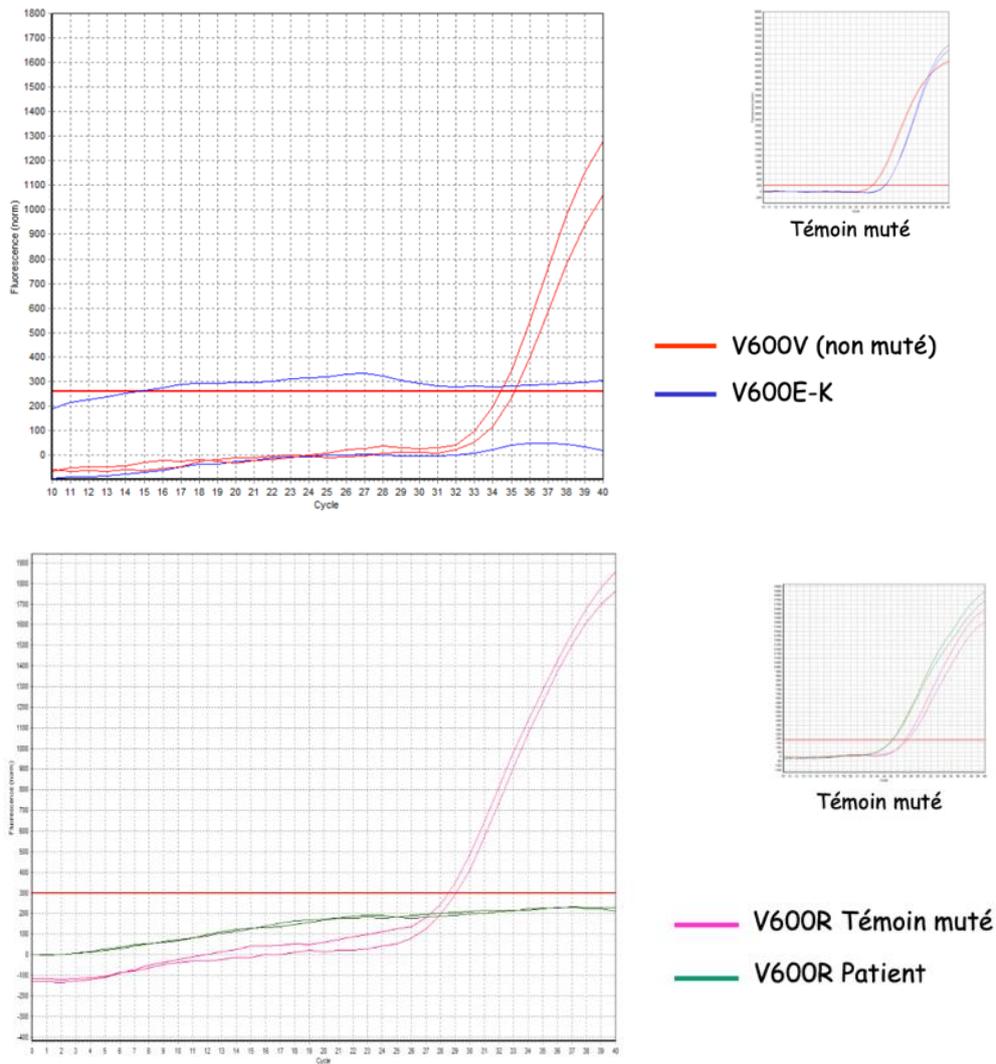


**Figure 17 :** (Grossissements x20 et x30) Cas discordant n°10, IHC+/BM- : Mélanome cutané primitif avec pigmentation intense, marquage positif en IHC (BRAFV600E+). Faux négatif en BM.



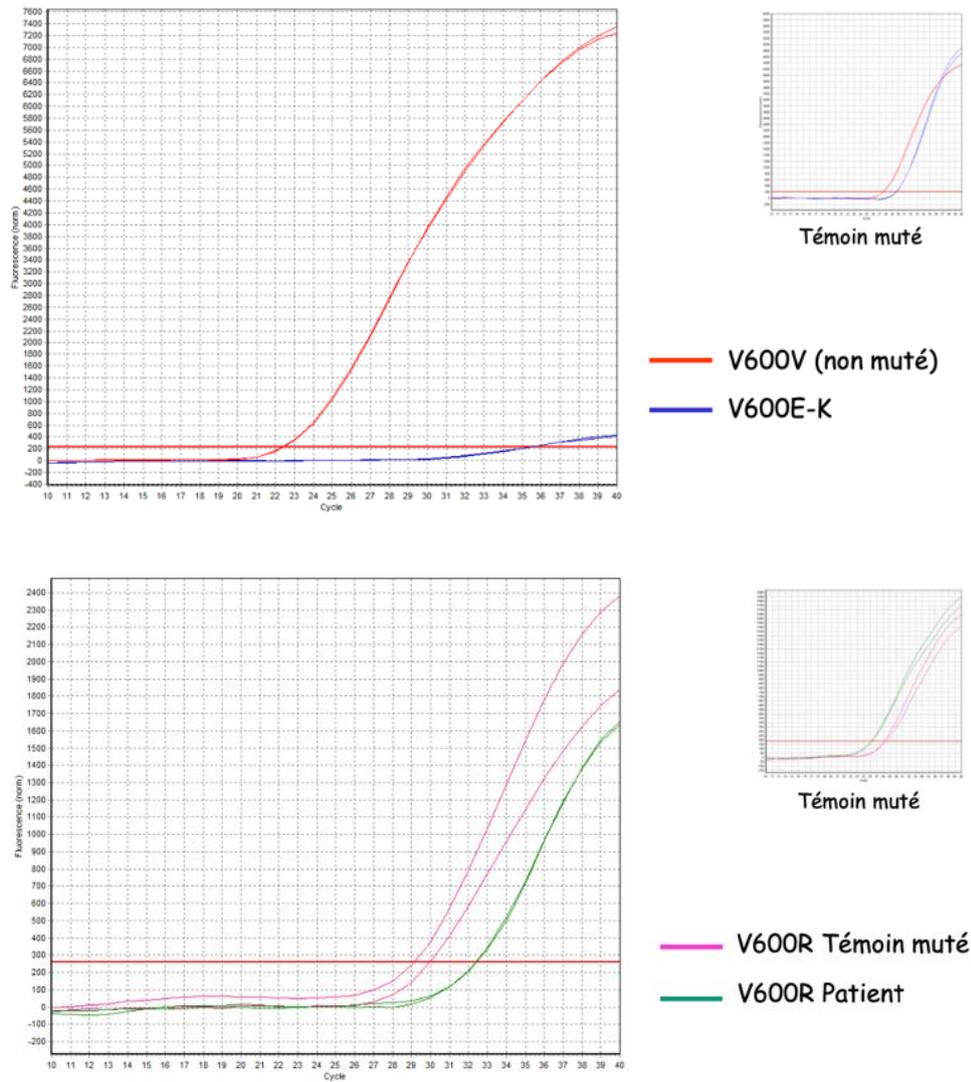
**Figure 18 :** (Grossissement x10) Cas discordant n°9, IHC+/BM- : Localisation métastatique ganglionnaire de mélanome, marquage positif en IHC (BRAFV600E+). Faux négatif en BM.

## Absence de mutation



**Figure 19 :** Profil moléculaire du cas discordant n°6 IHC+/BM- : Absence de mutation en BM (qPCR). Faux positif en IHC.

## Présence de la mutation V600R



**Figure 20 :** Profil moléculaire du cas discordant n°1, IHC-/BM+ : Présence de la mutation BRAFV600R en BM.

## Discussion

Notre étude confirme que l'IHC est une méthode très spécifique et sensible pour la détermination du statut mutationnel BRAF. Nos résultats sont pour la plupart concordants avec ceux de la BM (qPCR et séquençage Sanger).

Nous avons sélectionné via le moteur de recherche PubMed, 40 articles scientifiques rétrospectifs et prospectifs (*cf. annexe 2*) publiés entre 2011 et 2020, dont le sujet est la comparaison de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire pour la recherche de la mutation BRAF dans les mélanomes. Cette revue de la littérature nous a permis de comparer nos résultats avec ceux des différents auteurs.

Les effectifs des études varient de 25 à 726 cas : 12 études ont un effectif inférieur ou égal à 50 cas, 13 études ont entre 51 et 100 cas, 7 études ont entre 101 et 150 cas, 4 études ont entre 151 et 200 cas et enfin 4 études ont un effectif de plus de 200 cas. Notre effectif de 223 échantillons est donc conséquent par rapport aux autres articles étudiés.

Notre étude est rétrospective, les données de notre centre n'a jamais été exploitée pour ce sujet. Par conséquent, nous avons voulu réaliser un bilan de nos pratiques au niveau local. Les autres études sont aussi pour la plupart rétrospectives et monocentriques (38/40).

Dans notre analyse, nous avons observé un pourcentage de 30,9% de mutations de BRAF, avec une nette majorité de mutation V600E et V600K, qui sont les plus fréquentes (18). Au sein des autres études, ce pourcentage de mutations BRAF varie de 28,8% à 68%. Notre résultat est un peu inférieur aux chiffres habituels retrouvés dans la littérature (15). *O'Brien* et al. (34) ont aussi retrouvé un taux moins élevé de mutations BRAF dans leur population irlandaise avec un pourcentage de 28,8%. Ils expliquent ce faible taux par les différences démographiques concernant la mutation BRAF. Effectivement, *Van Den Hurk* et al. (35) ont comparé le taux de mutation BRAF au sein de deux populations différentes : irlandaise et belge. Ils ont constaté un taux significativement plus faible de mutation BRAF au sein de la population irlandaise. Concernant la population française, il n'y a pas de donnée claire à ce sujet.

Initialement, nous mettons en évidence 10 cas discordants (4,5%). Après une analyse plus approfondie, le nombre final de cas discordants est de 4 (1,8%). Dans les autres études, le taux de discordance entre la BM et l'IHC varie de 0 à 32%. Ces variations s'expliquent d'une part par la taille des effectifs. Les études réalisées sur un faible nombre de prélèvements présentent des variations importantes des taux de discordance. Ainsi les études de *Busam* et al.(36) et de *Capper* et al.(37) dont les effectifs sont de 44 et 47 ont

un taux de discordance nul (0%) et à l'inverse l'étude de *Ehsani* et al. (38) réalisée sur 25 prélèvements montre un taux de discordance très élevé avec 8 cas (32%). En revanche, les études réalisées sur un effectif plus important présentent des taux de discordance comparable à notre étude et avec moins de variations inter-études. *Eriksson* et al.(39) ont mis en évidence 12 cas discordants pour un effectif de 200 cas (6%) et *Kakavand* et al.(40) ont présenté 17 cas discordants pour un effectif de 726 (2,3%). D'autre part, la taille des effectifs n'est pas la seule raison des variations observées : les différentes techniques de BM utilisées, les méthodes d'analyse et d'interprétation de l'IHC participent aussi à ces différents taux de discordances rencontrées.

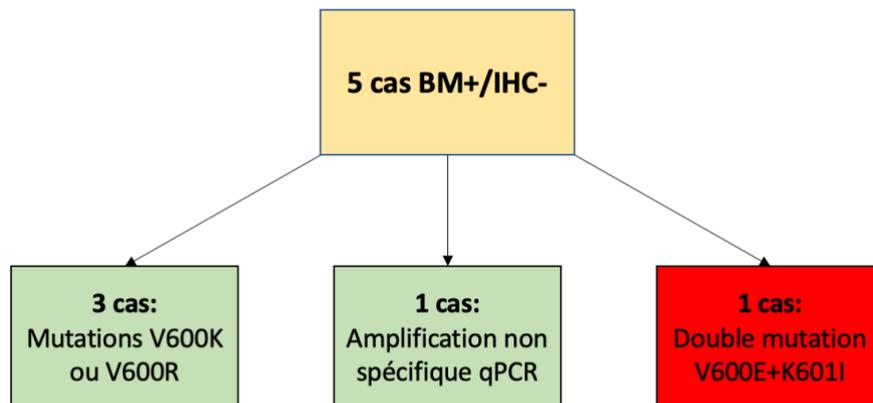
Nos résultats sont en accord avec la littérature, dans un premier temps (analyse 1) on obtient une sensibilité de 92,6% et une spécificité de 96,8% puis dans un second temps (analyse 2) la sensibilité est de 98,5% et la spécificité de 98,1%. Les sensibilités et les spécificités observées au sein de cette revue de la littérature varient respectivement de 72,2% à 100% et de 47% à 100%. Il en est de même pour les valeurs prédictives négatives et positives décrites au sein des 40 articles, qui sont comprises entre 81,6% et 100% (VPN) et 56% et 100% (VPP). Dans notre étude, la VPP et la VPN sont calculées en première analyse à 92,6% et 96,8% respectivement puis en seconde analyse à 95,6% et 99,4% respectivement.

Après une première analyse des données de notre étude, 10 cas discordants ont été mis en évidence.

Il s'agit de 5 cas IHC-/BM+ (*cf. figure 21*), dont 3 cas avec des mutations V600K ou V600R. Il n'y a eu aucun résultat d'IHC positive pour une autre mutation (non V600E). Cependant, certains auteurs ont présenté des IHC positives alors que la mutation n'était pas de type V600E. Comme *Huang* et al. (41), l'unique cas de mutation V600K de leur étude s'est avéré être positif en IHC. L'explication possible est la réaction croisée des anticorps. Les anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes constitués de séquence peptidiques similaires peuvent entraîner une réactivité croisée.

Un autre cas IHC-/BM+ est en réalité un faux positif en qPCR, dû à une amplification non spécifique. Nous n'avons pas retrouvé de mutation de BRAF après analyse de l'échantillon par séquençage Sanger puis par NGS. L'explication de cette amplification non spécifique ne peut être établie précisément. Plusieurs hypothèses sont possibles comme une erreur de manipulation avec l'introduction d'un autre ADN ou alors un ADN trop fragmenté pouvant engendrer de plus petits fragments et alors donner lieu à des amplifications non spécifiques.

Enfin pour le dernier cas IHC-/BM+, il s'agit bien d'un faux négatif en IHC. Après réalisation du séquençage Sanger, on a mis en évidence une double mutation V600E+K601I de BRAF. *Skorokhod et al. (42)* et *Ihle et al. (43)* ont aussi présenté le même cas de figure, avec une double mutation comprenant la mutation V600E, mais non reconnue en IHC. L'explication de ces cas reste complexe, la présence d'une double mutation pourrait entraîner un changement conformationnel protéique et ainsi empêcher l'anticorps de reconnaître l'épitope.



**Figure 21** : Schéma représentatif des 5 cas discordants BM+/IHC-

Les 5 autres cas discordants sont IHC+/BM- (*cf. figure 22*), dont 3 cas résultent d'une mauvaise interprétation de l'immunomarquage. Deux échantillons parmi ces 3 cas faux positifs intéressent des lésions très pigmentées en HES, le pigment mélanique a alors été interprété comme un marquage positif en immunohistochimie. Le troisième cas quant à lui ne comporte qu'un minime fragment de lésion tumorale nécrosée (après épuisement du bloc suite à la réalisation d'autres techniques immunohistochimiques) interprété comme positif en IHC, mais le marquage n'est pas assez spécifique.

*Fisher et al.(44)* ont prouvé l'intérêt d'utiliser des critères d'interprétation d'IHC précis (c'est-à-dire que seulement un marquage cytoplasmique intense et fort de plus de 10% des cellules tumorales est considéré comme positif) avec un score d'intensité du marquage allant de 0 à 3+ (absence de marquage à un marquage très intense). L'utilisation de ces critères a amélioré les performances de l'IHC avec un nombre inférieur de cas discordants et des meilleures spécificité et valeur prédictive positive. Dans leur étude, les cas discordants sont majoritairement des échantillons métastatiques et des lésions fortement pigmentées, il faut donc les analyser avec attention.

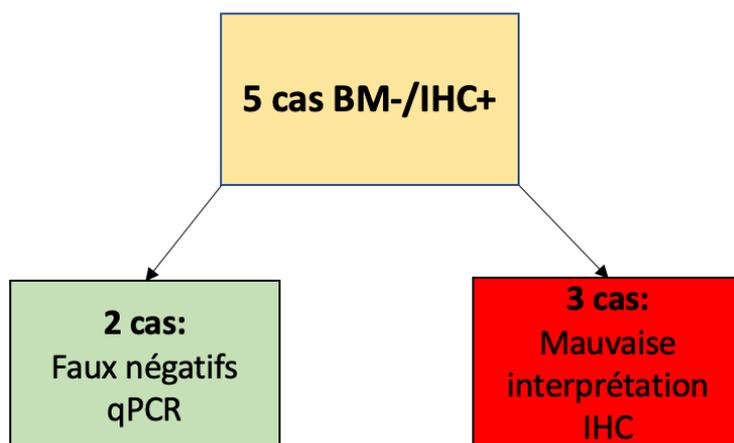
D'autres méthodes complémentaires peuvent aussi être mises en place pour palier à la quantité excessive de mélanine. *Chen et al.(45)* ont utilisé un prétraitement basé sur du

peroxyde d'hydrogène peu concentré et un chauffage pour éliminer la mélanine endogène des échantillons très pigmentés mais sans interférer avec l'antigénicité et l'intégrité du tissu. Il est aussi possible d'utiliser un chromogène de couleur rouge plutôt que marron pour mieux distinguer les pigments mélaniques de l'immunomarquage, comme *Thiel* et al. l'ont décrit (46).

Pour les deux autres cas discordants IHC+/BM-, il s'agit de faux négatifs en qPCR, la mutation BRAF V600E a été retrouvée en séquençage Sanger.

Pour le premier faux négatif en BM, l'échantillon comporte peu de cellules tumorales au sein d'un ganglion lymphatique, ce qui a limité l'analyse moléculaire. Dans l'étude de *Long* et al. (47), un cas similaire est décrit pour lequel ils n'ont pu confirmer le résultat positif de l'IHC en BM. Le prélèvement a intéressé aussi un ganglion lymphatique comportant quelques cellules tumorales, ce qui a entraîné un rapport « noyaux tumoraux/ noyaux non tumoraux » trop faible pour l'étude moléculaire.

Enfin pour le deuxième cas faux négatif en BM, le prélèvement est fortement pigmenté ce qui est aussi une limite connue de la PCR. Comme évoqué dans l'article de *Feller* et al. (48), la mélanine interagit avec l'ADN polymérase et compromet la réalisation de la technique. Ainsi, l'IHC présente un réel avantage dans ces situations où les échantillons sont riches en pigments mélaniques ou ne comportent pas assez de cellules tumorales. Elle permet de ne pas méconnaître une mutation BRAF.



**Figure 22 :** Schéma représentatif des 5 cas discordants BM-/IHC+

Au sein de notre étude, 19 patients ont eu plusieurs prélèvements (sur lésion primaire et métastatique) et les résultats ont toujours été concordants, mais ce n'est pas toujours le cas.

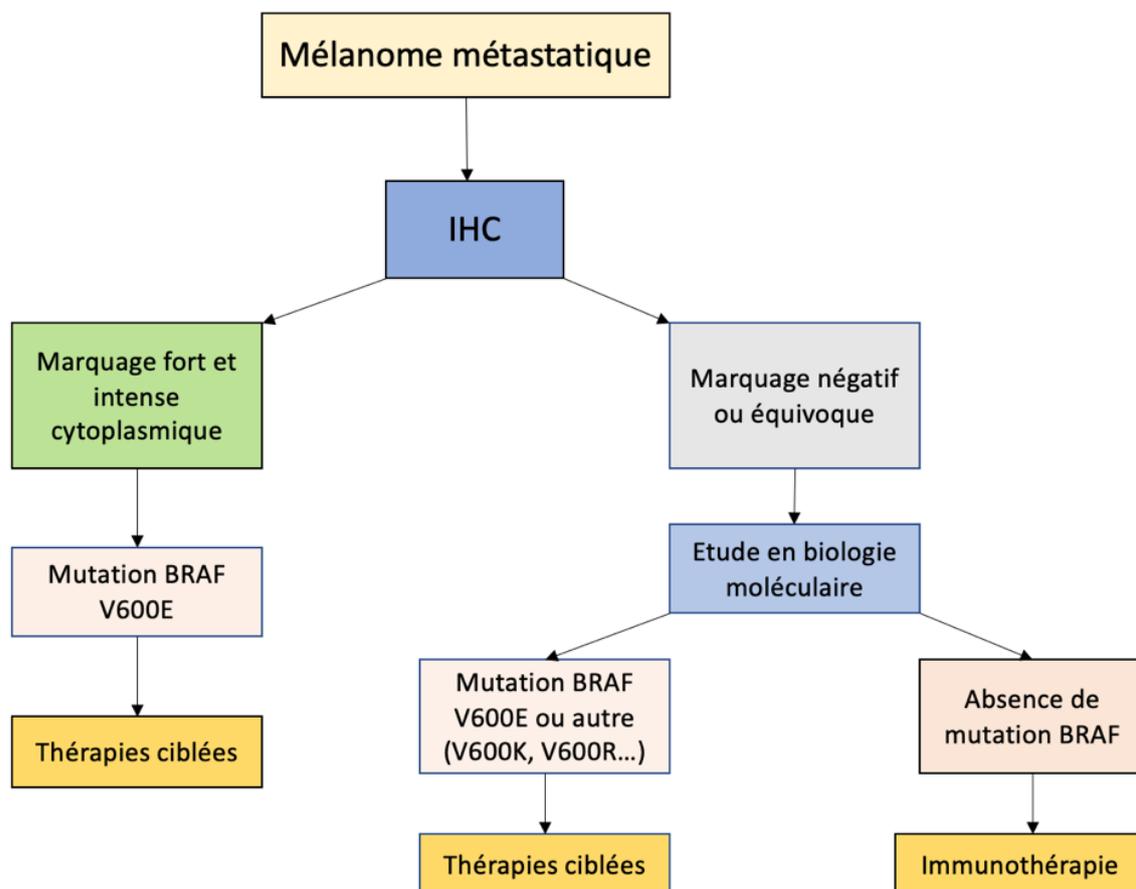
Actuellement, il est recommandé de réaliser le statut BRAF en priorité sur les lésions métastatiques à distance ou régionales, et à défaut sur la lésion primaire (23). La méta-analyse de *Valachis* et al. (49) a mis en évidence un taux de divergence significatif du statut BRAF lors de la comparaison des résultats entre lésion primaire et lésion métastatique ou entre deux lésions métastatiques de localisation différente. Le taux de divergence combiné est de 13,4 % entre lésion primaire et lésion métastatique et de 7,3% entre deux lésions métastatiques (sans différence significative selon le statut, muté ou non). Ces écarts peuvent avoir plusieurs explications : des problèmes techniques dans l'analyse moléculaire (mauvais échantillonnage, un nombre insuffisant de cellules tumorales...), la présence de plusieurs mélanomes primitifs ou occultes avec des altérations génétiques différentes, des modifications génétiques au cours du temps, une véritable hétérogénéité intra tumorale. Par conséquent, ces discordances peuvent avoir un impact clinique majeur pour les patients. Il est risqué de traiter inutilement par thérapie ciblée un patient (si finalement on observe une perte de la mutation BRAF au sein des métastases). En revanche, il y a une perte de chance si on ne traite pas les patients BRAF mutés (si une lésion primaire ne présente pas de mutation BRAF initialement mais qu'au cours du temps on met en évidence une mutation BRAF sur une métastase).

On a aussi étudié les délais d'obtention des résultats pour chaque technique, IHC et BM. Pour l'IHC, les durées sont plus rapides avec un délai moyen de 3,7 jours (vs 9,1 jours pour la BM). Ces écarts s'expliquent en partie par le fait que la qPCR nécessite plusieurs intermédiaires : tout d'abord le pathologiste responsable du cas va prescrire la technique et sélectionner la zone d'intérêt, puis la technicienne de BM va alors procéder à la microdissection du bloc et alors la qPCR pourra être réalisée (le lendemain le plus souvent), enfin les résultats doivent être interprétés par le médecin responsable de la biologie moléculaire et le compte-rendu est finalement validé par le médecin pathologiste responsable du cas. Alors que pour l'IHC, le pathologiste peut directement prescrire la technique lors de l'interprétation histologique du prélèvement et obtenir la technique dès le lendemain et ainsi valider le résultat directement. Cela représente un avantage non négligeable. Les thérapies ciblées peuvent être indiquées et très efficaces pour les patients dit « explosifs » c'est-à-dire ayant une masse tumorale importante et progressant rapidement. Leur mise en place rapide est alors nécessaire.

L'IHC présente de nombreux avantages avec comme précisé précédemment un délai d'obtention des résultats rapide. Elle permet aussi une analyse morphologique des lésions permettant ainsi d'améliorer l'interprétation de l'immunomarquage. Son autre principal intérêt est de pouvoir mettre en évidence une mutation BRAFV600E dans des échantillons de très petite taille, comportant moins de 10% de cellules tumorales. Elle présente cependant plusieurs inconvénients. La phase pré-analytique des prélèvements doit être bien contrôlée : il faut une période d'ischémie froide (temps pendant lequel l'organe non approvisionné en sang est refroidi) la plus courte possible avant la mise en fixateur, limiter une hyper/hypofixation en formol et éviter les traitements décalcifiants pour les prélèvements osseux. De plus, l'interprétation du marquage en immunohistochimie doit être réalisée par un observateur entraîné afin de limiter les erreurs, surtout pour les échantillons nécrosés et riches en pigments mélaniques. Enfin, l'IHC ne peut reconnaître seulement l'épitope V600E, les autres mutations ne peuvent donc pas être mises en évidence par cette technique.

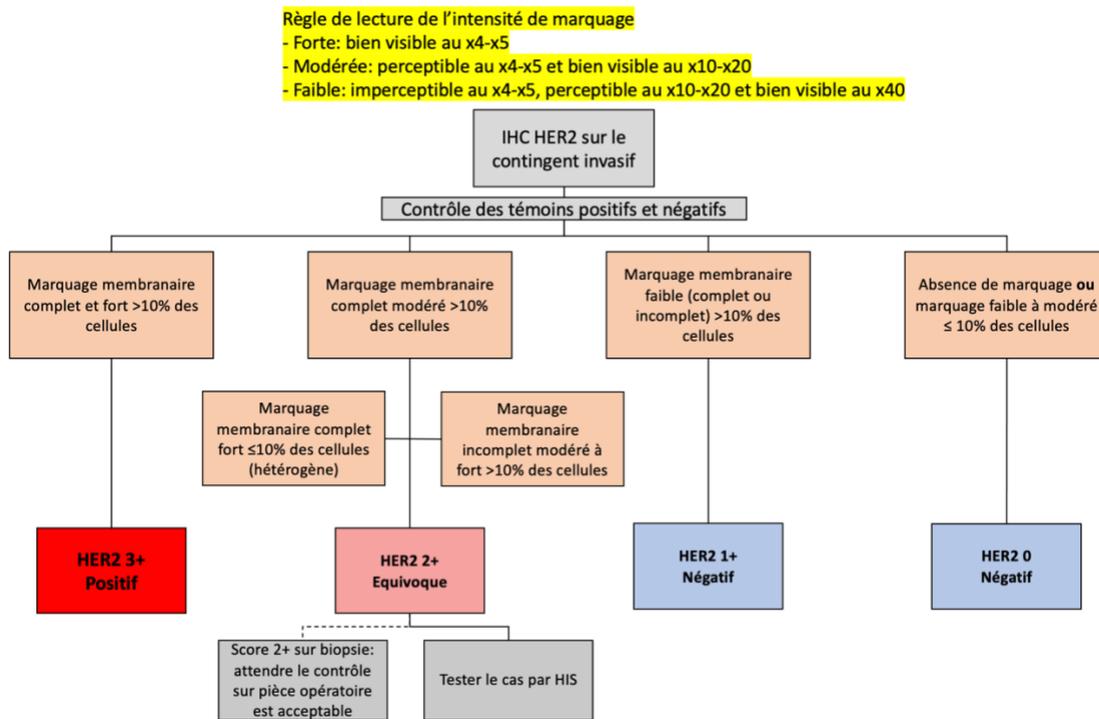
La qPCR présente aussi ses limites. Elle nécessite des échantillons avec au moins 10% de cellules tumorales, sans trop de pigments mélaniques pour éviter une interférence avec la Taq-polymérase, une exigence dans la qualité de l'extraction de l'ADN et elle est plus coûteuse (34). En revanche, c'est une technique fiable et elle permet la recherche de plusieurs autres mutations.

Les techniques d'immunohistochimie et de biologie moléculaires sont complémentaires. On pourrait donc proposer un circuit-court, intégrant l'IHC en première intention avec l'algorithme suivant : 1/ Utilisation de l'IHC en première intention pour les échantillons de mélanomes métastatiques 2/ Si marquage fort et intense cytoplasmique de > 10% des cellules tumorales, alors la mutation BRAF V600E est présente et un traitement inhibiteur de BRAF peut-être mis en place 3/ Si marquage négatif ou équivoque, il faut alors effectuer l'analyse en biologie moléculaire à la recherche d'une mutation BRAF V600E ou d'une autre mutation V600K, V600R... (cf. figure 23).



**Figure 23 :** Algorithme de la place de l'IHC dans la prise en charge des mélanomes

Cette prise en charge en routine avec un premier screening par IHC existe déjà pour d'autres biomarqueurs, comme pour HER2 dans le cancer du sein. La surexpression/amplification de HER2 est un facteur prédictif de réponse au Trastuzumab (anticorps monoclonal, indiqué en adjuvant ou néo-adjuvant dans les cancers du sein en situation métastatique). La détermination du statut HER2 est réalisée systématiquement pour chaque prélèvement de cancer mammaire invasif ou pour les rechutes. Actuellement, les techniques recommandées sont l'IHC et HIS (Hybridation In Situ, analyse moléculaire), réalisées sur coupes fixées et incluses en paraffine. En première intention, l'étude de HER2 est effectuée par IHC avec des règles de lecture précises prenant en compte l'intensité du marquage et le nombre de cellules marquées (*cf. figure 24*). Le résultat rendu est soit positif, négatif ou équivoque. Pour les cas « équivoque » ou « hétérogène » en IHC, une étude en biologie moléculaire est réalisée par hybridation in situ. Il existe une bonne concordance de ces deux techniques (50) (51).



**Figure 24 :** Algorithme de la place de l'IHC pour HER2 dans le cancer du sein

Le développement de l'IHC pour la recherche de la mutation BRAF est aussi utile et intéressante dans d'autres pathologies néoplasiques (comme le cancer du côlon) ou non néoplasiques (comme les histiocytoses langerhansiennes).

Les mutations du gène BRAF sont retrouvées dans 5 à 10% des cancers colorectaux (CCR). Dans plus de 95% des cas, il s'agit de la mutation BRAFV600E. Par ailleurs, elle est plus fréquente dans les CCR de type sporadique présentant une instabilité micro-satellitaire (IMS) avec une incidence de 50 à 80%, que dans les CCR IMS liés à un syndrome de Lynch avec une incidence de 1,4 %. Cette caractéristique peut être utilisée comme aide diagnostique du syndrome de Lynch (16). Effectivement, dans les instabilités micro-satellitaires (qui correspondent à une inactivation bi-allélique des gènes du système Mismatch Repair (MMR) : MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) la perte d'expression de MLH1 est la plus fréquemment retrouvée. Ce profil est compatible avec un syndrome de Lynch mais aussi avec un CCR sporadique de statut IMS (par hyperméthylation somatique du promoteur MLH1). L'identification d'une mutation BRAF V600E oriente vers le diagnostic de CCR sporadique et permet de surseoir à l'enquête oncogénétique approfondie et à la recherche de mutation constitutionnelle (sauf si la présentation clinique et/ou familiale est évocatrice de syndrome de Lynch). En l'absence de mutation BRAF V600E, la question du syndrome de Lynch reste posée. Dans ce dernier cas, la recherche d'hyper-méthylation tumorale du promoteur de MLH1 peut apporter une aide en orientant vers une origine

sporadique ; dans les autres cas, une recherche de mutation constitutionnelle du gène MLH1 doit être menée (16). La recherche de la mutation BRAF peut donc être effectuée par IHC et/ou par BM. Comme dans le mélanome, de nombreuses études ont prouvé la bonne spécificité et sensibilité de l'IHC, ainsi que sa concordance avec la BM (52) (53) et pourrait s'intégrer dans une prise en charge en routine des CCR.

L'histiocytose langerhansienne (HL) est une affection rare d'étiologie inconnue caractérisée par une infiltration d'un ou plusieurs organes par des cellules dendritiques de type Langerhans, le plus souvent organisées en granulomes. Les présentations cliniques sont très variées allant d'une atteinte mono-tissulaire unique à une atteinte systémique. Les organes les plus touchés sont la peau, l'os, les poumons et le système endocrinien. Le diagnostic repose principalement sur l'anatomopathologie et le pronostic varie selon les atteintes. La cause reste encore inconnue à ce jour et la nature de cette affection reste débattue (maladie néoplasique ou réactionnelle ?). La découverte récente de la forte prévalence de la mutation de l'oncogène BRAF et de l'implication constante de la voie RAS-RAF-MEK-ERK est une avancée importante dans la compréhension de cette maladie. En effet, la mutation BRAFV600E a été mise en évidence dans 38 à 60% des HL (54), cela ouvre des perspectives thérapeutiques nouvelles. Le Vémurafenib s'est avéré efficace dans quelques cas d'histiocytose langerhansienne de l'adulte mais avec des toxicités non négligeables (carcinomes épidermoïdes, toxidermie, allongement du QT...) qui pourraient limiter son indication. En revanche du fait de l'activation constante de la voie MEK-ERK, les inhibiteurs de MEK tel que le Tramétinib constituent une approche thérapeutique intéressante (55).

A travers ces deux exemples, on constate que la mutation BRAF est impliquée dans de nombreuses pathologies, le développement de l'IHC présente alors un réel intérêt.

## Conclusion

En conclusion, d'après les données mises en évidence dans notre étude, l'immunohistochimie est une méthode spécifique, sensible et rapide pour la recherche de la mutation BRAF V600E. Les résultats sont concordants avec ceux de la biologie moléculaire, en particulier la PCR en temps réel. Ces deux techniques sont surtout complémentaires. Actuellement, la biologie moléculaire reste nécessaire pour la recherche des autres mutations de BRAF non V600E. De plus la recherche de la mutation de BRAF s'élargie à d'autres pathologies, cancéreuses ou non.

Ces résultats en accord avec les données de la littérature sont encourageants pour inscrire l'immunohistochimie en première intention dans la prise en charge en routine des mélanomes, afin de pouvoir traiter les patients rapidement par thérapies ciblées. Pour cela, une bonne gestion des phases pré-analytiques et analytiques est indispensable, ainsi qu'une sensibilisation des préleveurs et des cliniciens.

## Bibliographie

1. Epidémiologie des cancers cutanés - Détection précoce des cancers de la peau [Internet]. [cité 13 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancers-de-la-peau/Epidemiologie#toc-l-essentiel-sur-les-m-lanomes>
2. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides. :372.
3. ald\_30\_guide\_melanome\_web.pdf [Internet]. [cité 13 sept 2020]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-03/ald\\_30\\_guide\\_melanome\\_web.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-03/ald_30_guide_melanome_web.pdf)
4. Facteurs de risque - Mélanome de la peau [Internet]. [cité 13 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Melanome-de-la-peau/Facteurs-de-risque>
5. Item 299 – UE 9 Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques. Annales de Dermatologie et de Vénérologie. mars 2018;145:S165-85.
6. Fiche dermoscopie N<sub>T</sub>3.pdf.
7. Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, et al. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy (“two-step method of digital follow-up”) in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. juill 2012;67(1):e17-27.
8. Wolter J Mooi, Thomas Krausz. Pathology of melanocytic disorders.
9. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ. PRAME Expression in Melanocytic Tumors. *American Journal of Surgical Pathology*. nov 2018;42(11):1456-65.
10. Maibach F, Sadozai H, Seyed Jafari SM, Hunger RE, Schenk M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol*. 10 sept 2020;11:2105.
11. TNM 8edition.pdf.
12. Classification of Skin Tumours (2018, World Health Organization).pdf.
13. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 12 nov 2015;373(20):1926-36.
14. Dujardin F, Pagès J-C, Collin C, de Calan L, Lecomte P, Guyétant S. Mutation BRAF V600E et carcinomes papillaires de la thyroïde : prévalence et faisabilité de la détection sur produits de cytoponction. *Annales de Pathologie*. 1 août 2010;30(4):252-62.
15. Colombino M, Capone M, Lissia A, Cossu A, Rubino C, De Giorgi V, et al. *BRAF/NRAS* Mutation Frequencies Among Primary Tumors and Metastases in Patients With Melanoma. *JCO*. 10 juill 2012;30(20):2522-9.
16. Laurenty A-P, Selves J, Guimbaud R. Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique. :9.
17. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. juin 2002;417(6892):949-54.
18. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, et al. Routine Multiplex Mutational Profiling of Melanomas Enables Enrollment in Genotype-Driven Therapeutic Trials. Smalley K, éditeur. *PLoS ONE*. 20 avr 2012;7(4):e35309.
19. Heinzerling L, Kühnapfel S, Meckbach D, Baiter M, Kaempgen E, Keikavoussi P, et al. Rare BRAF mutations in melanoma patients: implications for molecular testing in clinical practice. *Br J Cancer*. mai 2013;108(10):2164-71.
20. Johnson DB, Lovly CM, Flavin M, Panageas KS, Ayers GD, Zhao Z, et al. Impact of NRAS Mutations for Patients with Advanced Melanoma Treated with Immune Therapies. *Cancer Immunology Research*. 1 mars 2015;3(3):288-95.
21. Meng D, Carvajal RD. KIT as an Oncogenic Driver in Melanoma: An Update on

- Clinical Development. *Am J Clin Dermatol.* juin 2019;20(3):315-23.
22. Wong SL, Faries MB, Kennedy EB, Agarwala SS, Akhurst TJ, Ariyan C, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy and Management of Regional Lymph Nodes in Melanoma: American Society of Clinical Oncology and Society of Surgical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY.* :17.
  23. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics – Update 2019. *European Journal of Cancer.* févr 2020;126:141-58.
  24. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 30 juin 2011;364(26):2507-16.
  25. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in *BRAF*-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 13 nov 2014;371(20):1867-76.
  26. Long GV, Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandalà M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III *BRAF*-Mutated Melanoma. *N Engl J Med.* 9 nov 2017;377(19):1813-23.
  27. Guo J, Si L, Kong Y, Flaherty KT, Xu X, Zhu Y, et al. Phase II, Open-Label, Single-Arm Trial of Imatinib Mesylate in Patients With Metastatic Melanoma Harboring *c-Kit* Mutation or Amplification. *JCO.* 20 juill 2011;29(21):2904-9.
  28. Bernard G, Alain D, Marc P, Géraldine J, Elif H, Thomas J, et al. ACTUALISATION DES DONNEES CONCERNANT LE MELANOME STADE III : NOUVELLES RECOMMANDATIONS DU GROUPE DE CANCEROLOGIE CUTANEE. :27.
  29. Amaria RN, Prieto PA, Tetzlaff MT, Reuben A, Andrews MC, Ross MI, et al. 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.* févr 2018;19(2):181-93.
  30. Ascierto PA, Eggermont AMM. Neoadjuvant therapy in melanoma: the next step? *The Lancet Oncology.* févr 2018;19(2):151-3.
  31. [Traitements\\_du\\_melanome\\_avance\\_mel\\_20180928.pdf](#).
  32. La PCR en temps réel: principes et applications. :11.
  33. Chapman PB, Hauschild A, Sondak VK. Frontline Approach to Metastatic *BRAF*-Mutant Melanoma Diagnosis, Molecular Evaluation, and Treatment Choice. *American Society of Clinical Oncology Educational Book.* mai 2014;(34):e412-21.
  34. O'Brien O, Lyons T, Murphy S, Feeley L, Power D, Heffron CCB. BRAF V600 mutation detection in melanoma: a comparison of two laboratory testing methods. *J Clin Pathol.* nov 2017;70(11):935-40.
  35. Van den Hurk K, Balint B, Toomey S, O'Leary PC, Unwin L, Sheahan K, et al. High-throughput oncogene mutation profiling shows demographic differences in BRAF mutation rates among melanoma patients. *Melanoma Research.* juin 2015;25(3):189-99.
  36. Busam KJ, Hedvat C, Pulitzer M, von Deimling A, Jungbluth AA. Immunohistochemical Analysis of BRAFV600E Expression of Primary and Metastatic Melanoma and Comparison With Mutation Status and Melanocyte Differentiation Antigens of Metastatic Lesions. *American Journal of Surgical Pathology.* mars 2013;37(3):413-20.
  37. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol.* juill 2011;122(1):11-9.
  38. Ehsani L, Cohen C, Fisher KE, Siddiqui MT. BRAF Mutations in Metastatic Malignant Melanoma: Comparison of Molecular Analysis and Immunohistochemical Expression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2014;22(9):4.
  39. Eriksson H, Zebary A, Vassilaki I, Omholt K, Ghaderi M, Hansson J. BRAF<sup>V600E</sup>

- Protein Expression in Primary Cutaneous Malignant Melanomas and Paired Metastases. *JAMA Dermatol.* 1 avr 2015;151(4):410.
40. Kakavand H, Walker E, Lum T, Wilmott JS, Selinger CI, Smith E, et al. *BRAF*<sup>V600E</sup> and *NRAS*<sup>Q61L/Q61R</sup> mutation analysis in metastatic melanoma using immunohistochemistry: a study of 754 cases highlighting potential pitfalls and guidelines for interpretation and reporting. *Histopathology.* oct 2016;69(4):680-6.
  41. Huang W-K, Kuo T-T, Wu C-E, Cheng H-Y, Hsieh C-H, Hsieh J-J, et al. 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-Pac J Clin Oncol.* déc 2016;12(4):403-8.
  42. Skorokhod A, Capper D, von Deimling A, Enk A, Helmbold P. Detection of BRAF V600E mutations in skin metastases of malignant melanoma by monoclonal antibody VE1. *Journal of the American Academy of Dermatology.* sept 2012;67(3):488-91.
  43. Ihle MA, Fassunke J, König K, Grünwald I, Schlaak M, Kreuzberg N, et al. Comparison of high resolution melting analysis, pyrosequencing, next generation sequencing and immunohistochemistry to conventional Sanger sequencing for the detection of p.V600E and non-p.V600E BRAF mutations. *BMC Cancer.* déc 2014;14(1):13.
  44. Fisher KE, Cohen C, Siddiqui MT, Palma JF, Lipford EH, Longshore JW. Accurate detection of BRAF p.V600E mutations in challenging melanoma specimens requires stringent immunohistochemistry scoring criteria or sensitive molecular assays. *Human Pathology.* nov 2014;45(11):2281-93.
  45. Chen Q, Xia C, Deng Y, Wang M, Luo P, Wu C, et al. Immunohistochemistry as a quick screening method for clinical detection of BRAF(V600E) mutation in melanoma patients. *Tumor Biol.* juin 2014;35(6):5727-33.
  46. Thiel A, Moza M, Kytölä S, Orpana A, Jahkola T, Hernberg M, et al. Prospective immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in melanoma. *Human Pathology.* févr 2015;46(2):169-75.
  47. Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry Is Highly Sensitive and Specific for the Detection of V600E BRAF Mutation in Melanoma: The American Journal of Surgical Pathology. *janv* 2013;37(1):61-5.
  48. Feller JK, Yang S, Mahalingam M. Immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody as a screening tool for the BRAFV600E mutational status in primary cutaneous malignant melanoma. *Mod Pathol.* mars 2013;26(3):414-20.
  49. Valachis A, Ullenhag GJ. Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. *European Journal of Cancer.* août 2017;81:106-15.
  50. Cottu P. ATTITUDES DIAGNOSTIQUES ET THERAPEUTIQUES, PROTOCOLES DE TRAITEMENT 2019-2020. :131.
  51. Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *JCO.* 10 juill 2018;36(20):2105-22.
  52. Schafroth C, Galván JA, Centeno I, Koelzer VH, Dawson HE, Sokol L, et al. VE1 immunohistochemistry predicts *BRAF* V600E mutation status and clinical outcome in colorectal cancer. *Oncotarget.* 8 déc 2015;6(39):41453-63.
  53. Dvorak K, Higgins A, Palting J, Cohen M, Brunhoeber P. Immunohistochemistry with Anti-BRAF V600E (VE1) Mouse Monoclonal Antibody is a Sensitive Method for Detection of the BRAF V600E Mutation in Colon Cancer: Evaluation of 120 Cases with and without KRAS Mutation and Literature Review. *Pathol Oncol Res.* janv 2019;25(1):349-59.
  54. Néel A, Artifoni M, Donadieu J, Lorillon G, Hamidou M, Tazi A. Histiocytose

- langerhansienne de l'adulte. *La Revue de Médecine Interne*. oct 2015;36(10):658-67.
55. de Menthon M, Meignin V, Mahr A, Tazi A. Histiocytose à cellules de Langerhans de l'adulte. *La Presse Médicale*. janv 2017;46(1):55-69.
  56. Bisschop C, ter Elst A, Bosman LJ, Platteel I, Jalving M, van den Berg A, et al. Rapid BRAF mutation tests in patients with advanced melanoma: comparison of immunohistochemistry, Droplet Digital PCR, and the Idylla Mutation Platform. *Melanoma Research*. avr 2018;28(2):96-104.
  57. Boursault L, Haddad V, Vergier B, Cappellen D, Verdon S, Bellocq J-P, et al. Tumor Homogeneity between Primary and Metastatic Sites for BRAF Status in Metastatic Melanoma Determined by Immunohistochemical and Molecular Testing. Chammas R, éditeur. *PLoS ONE*. 20 août 2013;8(8):e70826.
  58. Capper D, Berghoff AS, Magerle M, Ilhan A, Wöhrer A, Hackl M, et al. Immunohistochemical testing of BRAF V600E status in 1,120 tumor tissue samples of patients with brain metastases. *Acta Neuropathol*. févr 2012;123(2):223-33.
  59. Colomba E, Hélias-Rodzewicz Z, Von Deimling A, Marin C, Terrones N, Pechaud D, et al. Detection of BRAF p.V600E Mutations in Melanomas. *The Journal of Molecular Diagnostics*. janv 2013;15(1):94-100.
  60. Etienne M, Oca F, Prunier-Mirebeau D, Croué A, Martin L. 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*. mars 2018;145(3):159-65.
  61. Fatnassi-Mersni G, Arfaoui AT, Cherni M, Jones M, Zeglaoui F, Ouzari HI, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of *BRAF* gene in primary cutaneous melanoma: Discovery of novel mutations. *J Cutan Pathol*. sept 2020;47(9):794-9.
  62. Franczak C, Salleron J, Dubois C, Filhine-Trésarrieu P, Leroux A, Merlin J-L, et al. Comparison of Five Different Assays for the Detection of BRAF Mutations in Formalin-Fixed Paraffin Embedded Tissues of Patients with Metastatic Melanoma. *Mol Diagn Ther*. avr 2017;21(2):209-16.
  63. Harlé A, Salleron J, Franczak C, Dubois C, Filhine-Tressarrieu P, Leroux A, et al. 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. Castresana JS, éditeur. *PLoS ONE*. 25 avr 2016;11(4):e0153576.
  64. Jabbar KJ, Luthra R, Patel KP, Singh RR, Goswami R, Aldape KD, et al. Comparison of Next-generation Sequencing Mutation Profiling With BRAF and IDH1 Mutation-specific Immunohistochemistry. *American Journal of Surgical Pathology*. avr 2015;39(4):454-61.
  65. Knol A-C, Pandolfino M-C, Vallée A, Nguyen F, Lella V, Khammari A, et al. Comparative analysis of *BRAF*, *NRAS* and *c-KIT* mutation status between tumor tissues and autologous tumor cell-lines of stage III/IV melanoma. *Exp Dermatol*. janv 2015;24(1):70-3.
  66. Lade-Keller J, Kristensen LS, Riber-Hansen R, Guldborg P, Hansen LL, Steiniche T, et al. A role for immunohistochemical detection of BRAF V600E prior to BRAF-inhibitor treatment of malignant melanoma? *J Clin Pathol*. août 2013;66(8):723-5.
  67. Liu H, Li Z, Wang Y, Feng Q, Si L, Cui C, et al. Immunohistochemical detection of the BRAF V600E mutation in melanoma patients with monoclonal antibody VE1: BRAF V600E mutation in melanoma. *Pathol Int*. nov 2014;n/a-n/a.
  68. Lo MCI, Paterson A, Maraka J, Clark R, Goodwill J, Nobes J, et al. A UK feasibility and validation study of the VE1 monoclonal antibody immunohistochemistry stain for BRAF-V600E mutations in metastatic melanoma. *Br J Cancer*. juill 2016;115(2):223-7.
  69. Løes IM, Immervoll H, Angelsen J-H, Horn A, Geisler J, Busch C, et al. Performance comparison of three BRAF V600E detection methods in malignant melanoma and colorectal cancer specimens. *Tumor Biol*. févr 2015;36(2):1003-13.

70. Long E, Ilie M, Lassalle S, Butori C, Poissonnet G, Washetine K, et al. Why and how immunohistochemistry should now be used to screen for the BRAFV600E status in metastatic melanoma? The experience of a single institution (LCEP, Nice, France). *J Eur Acad Dermatol Venereol*. déc 2015;29(12):2436-43.
71. Manfredi L, Meyer N, Tournier E, Grand D, Uro-Coste E, Rochaix P, et al. Highly Concordant Results Between Immunohistochemistry and Molecular Testing of Mutated V600E BRAF in Primary and Metastatic Melanoma. *Acta Derm Venerol*. 2016;96(5):630-4.
72. Orchard G, Wojcik K, Rickaby W, Martin B, Semkova K, Shams F, et al. Immunohistochemical detection of V600E BRAF mutation is a useful primary screening tool for malignant melanoma. *British Journal of Biomedical Science*. 3 avr 2019;76(2):77-82.
73. Pearlstein MV, Zedek DC, Ollila DW, Treece A, Gulley ML, Groben PA, et al. Validation of the VE1 immunostain for the *BRAF* V600E mutation in melanoma: VE1 immunostain for *BRAF* V600E mutant melanoma. *J Cutan Pathol*. sept 2014;41(9):724-32.
74. Qiu T, Lu H, Guo L, Huang W, Ling Y, Shan L, et al. Detection of BRAF mutation in Chinese tumor patients using a highly sensitive antibody immunohistochemistry assay. *Sci Rep*. août 2015;5(1):9211.
75. Routhier CA, Mochel MC, Lynch K, Dias-Santagata D, Louis DN, Hoang MP. 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*. nov 2013;44(11):2563-70.
76. Schirosi L, Strippoli S, Gaudio F, Graziano G, Popescu O, Guida M, et al. Is immunohistochemistry of BRAF V600E useful as a screening tool and during progression disease of melanoma patients? *BMC Cancer*. déc 2016;16(1):905.
77. Tetzlaff MT, Pattanaprichakul P, Wargo J, Fox PS, Patel KP, Estrella JS, et al. Utility of BRAF V600E Immunohistochemistry Expression Pattern as a Surrogate of BRAF Mutation Status in 154 Patients with Advanced Melanoma. *Human Pathology*. août 2015;46(8):1101-10.
78. Uguen A, Guéguen P, Legoupil D, Bouvier S, Costa S, Duigou S, et al. Dual NRASQ61R and BRAFV600E mutation-specific immunohistochemistry completes molecular screening in melanoma samples in a routine practice. *Human Pathology*. nov 2015;46(11):1582-91.
79. Vallée A, Denis-Musquer M, Herbreteau G, Théoleyre S, Bossard C, Denis MG. 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. *Toland AE, éditeur. PLoS ONE*. 15 août 2019;14(8):e0221123.
80. Yaman B, Kandilog G. BRAF-V600 Mutation Heterogeneity in Primary and Metastatic Melanoma: A Study With Pyrosequencing and Immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(2):8.

## Annexes

### Annexe 1 : 8<sup>ème</sup> édition de la classification AJCC

#### pTNM Pathological Classification

##### pT – Primary Tumour

pTX Primary tumour cannot be assessed\*

pT0 No evidence of primary tumour

pTis Melanoma in situ (Clark level I) (atypical melanocytic hyperplasia, severe melanocytic dysplasia, not an invasive malignant lesion)

##### Note

\* pTX includes shave biopsies and regressed melanomas.

pT1 Tumour 1 mm or less in thickness

pT1a 0.8 mm or less in thickness without ulceration

pT1b 0.8 mm in thickness with ulceration or more than 0.8 mm but no more than 1mm in thickness, with or without ulceration

pT2 Tumour more than 1 mm but not more than 2 mm in thickness

pT2a without ulceration

pT2b with ulceration

pT3 Tumour more than 2 mm but not more than 4 mm in thickness

pT3a without ulceration

pT3b with ulceration

pT4 Tumour more than 4 mm in thickness

pT4a without ulceration

pT4b with ulceration

##### N – Regional Lymph Nodes

NX Regional lymph nodes cannot be assessed

No No regional lymph node metastasis

N1 Metastasis in one regional lymph node or intralymphatic regional metastasis *without* nodal metastases

N1a Only microscopic metastasis (clinically occult)

N1b Macroscopic metastasis (clinically apparent)

N1c Satellite or in.transit metastasis *without* regional nodal metastasis

N2 Metastasis in two or three regional lymph nodes or intralymphatic regional metastasis *with* lymph node metastases

N2a Only microscopic nodal metastasis

N2b Macroscopic nodal metastasis

N2c Satellite or in.transit metastasis *with* only one regional nodal metastasis

N3 Metastasis in four or more regional lymph nodes, or matted metastatic regional lymph nodes, or satellite(s) or in.transit metastasis *with* metastasis in two or more regional lymph node(s)

N3a Only microscopic nodal metastasis

N3b Macroscopic nodal metastasis

N3c Satellite(s) or in.transit metastasis with two or more regional nodal metastasis

##### Note

Satellites are tumour nests or nodules (macro. or microscopic) within 2 cm of the primary tumour. In.transit metastasis involves skin or subcutaneous tissue more than 2 cm from the primary tumour but not beyond the regional lymph nodes.

## **M – Distant Metastasis**

M0 No distant metastasis

M1 Distant metastasis\*

M1a Skin, subcutaneous tissue or lymph node(s) beyond the regional lymph nodes

M1b Lung

M1c Other non.central nervous system sites

M1d Central nervous system

\* Suffixes for M category:

(0) lactic dehydrogenase (LDH) – not elevated

(1) LDH – elevated

so that M1a(1) is metastasis in skin, subcutaneous tissue, or lymph node(s) beyond the regional lymph nodes with elevated LDH.

No suffix is used if LDH is not recorded or unspecified.

## Annexe 2 : Tableau résumé des articles comparant l'IHC et la BM.

#	Article	Technique BM	Nb de cas	% mutations	Se, Sp, Vpp, Vpn	Nb disc.	Commentaires
1	Bisschop et al.(56) (2017)	HRM/Sanger	39	BRAF += 100%	Se= 94% Sp=95%	2	-1 cas IHC+/BM- = FN BM, mutation V600E en NGS -1 cas IHC-/BM+= FN IHC, hétérogénéité tumorale
2	Boursault et al.(57) (2013)	HRM/Sanger	230	V600E+=45,2% V600K+=3% K601+= 1,3%	Se= 97,3% Sp=100% Vpp=100% Vpn=97,2%	3	-3 cas décrits comme « ambigus » en IHC : 1 cas V600E BM, 1 cas V600K BM, 1 cas WT BM
3	Busam et al.(36) (2013)	MassArray	44	#	Se= 100% Sp=100% Vpp=100% Vpn=100%	0	#
4	Capper et al. (37) (2011)	Direct Sequencing (Western blot)	47	V600E+=37%	Se= 100% Sp=100% Vpp=100% Vpn=100%	0	#
5	Capper et al.(58) (2011)	Direct Sequencing (Western Blot)	76	V600E+=55,3%	#	2	-2 cas IHC +/BM- = CT trop faible pour séquençage
6	Chen et al.(45) (2014)	DNA pyrosequencing/ ARMS-PCR	38	#	Se=100% Sp=93%	3	-2 cas IHC+/BM+= ? -1 cas IHC-/BM+= mutation V600K en BM
7	Colomba et al.(59) (2013)	Sanger/RT-PCR/ pyrosequencing	111	BRAF+=56% V600E+=45% V600K+=6,7% V600R+=1,1% K601E+=2,2%	Se=100% Sp=100% Vpp=100% Vpn=100%	0	-3 FN Sanger : pas assez de CT -6 cas FP RT-PCR= pour certains, détection de mutations V600K
8	Ehsani et al.(38) (2014)	RT-PCR (Cobas)	25	#	Se=100% Sp=47% Vpp=56% Vpn= 100%	8	-8 cas IHC+/BM-= FP IHC. Plusieurs hypothèses : présence d'autres mutations BRAF ponctuelles, réactivité croisée, faible quantité de CT. -Comparaison de 2 Ac différents : pas de différence constatée.
9	Eriksson et al.(39) (2015)	Pyrosequencing	200	V600E+=47%	Se= 96,6% Sp=94,5% Vpp=93,6% Vpn=97,2%	12	-3 cas : pas assez de matériel pour refaire séquençage -3 cas : IHC-/BM+= FN IHC, ? -6 cas IHC+/BM-=FP IHC. Plusieurs hypothèses : différences phase pré-analytique entres labos, réactivité croisée (lésions primaires++)
10	Etienne et al. (60)(2017)	RT-PCR/Sanger	207	Braf+=56,6% V600E+=35,7% Autre += 7,7%	Se= 100% Sp=99,25% Vpp=98,67% Vpn=100%	1	-1 cas IHC+/BM- : présence de 2 pop. tumorales ; une avec la mutation V600E, l'autre sans mutation.
11	Fatnassi-Mersni et al. (61)(2020)	Sanger	28	Braf+=68% V600E+=37%	Se=100% Sp=100% Vpp=100% Vpn=100%	0	#
12	Feller et al. (48)(2013)	Allele specific PCR/ Sanger	35	V600E+=17%	Se=100% Sp=97% Vpp=86% Vpn=100%	1	-1 cas IHC+/BM-= FN BM ? existence d'une interférence avec la mélanine qui rend la BM moins sensible.
13	Fisher et al. (44)(2014)	RT-PCR (Cobas test) / NGS sequencing	118	#	(1) Se=76,9% Sp=87,9% Vpp=83,3% Vpn= 82,9% / (2) Se=73,6% Sp=95,4% Vpp=92,9% Vpn=81,6% / (3) Se=88,6% Sp=98,3% Vpp=97,5% Vpn=92,1%	(1) 20 (2) 17 (3) 6	-Plusieurs analyses (1) = initiale (2) =avec critères IHC plus strictes/ (3) = après élimination résultats NGS- et CT<5% -(2) 14 cas IHC-/BM+= 8 cas mutation V600K, 4 cas FN IHC, 1 cas FP Cobas, 1 cas double mutation V600E+V600M/ 3 cas IHC+/BM-= 2 cas FN BM car CT faible, 1 cas FP IHC avec mutation K601
14	Franczak et al.(62) (2017)	NGS sequencing	59	Braf+=52,5% V600E+=81,2% V600K+=9,4%	Se=87,1% Sp=100%	4	-4 cas IHC+/BM-= dont 2 cas présentent des mutations rares et complexes.
15	Harlé et al.(63) (2016)	NGS sequencing	59	Braf+=45,8% V600E+=81,2% V600K+=9,4%	Se= 81,7% Sp=100% Vpp=100%	6	-4 cas IHC-/BM+= 1 cas mutation V600K, 1 cas prélèvement avec

					Vpn= 87,5%		nécrose ++, 2 cas mutations rares ou complexes. -2 cas IHC+ = mais mutation V600K en BM, possible réactivité croisée.
16	Huang et al. (41)(2016)	Sanger	73	BRAFV600+= 24,6%	Se=100% Sp=98%	2	-1 cas IHC+/BM-= mauvaise interprétation IHC. Pas de coloration homogène et cytoplasmique. Mise en cause de l'hétérogénéité tumorale. -1 cas IHC+= alors que mutation V600K en BM. Réactivité croisée des anticorps.
17	Ihle et al. (43) (2014)	Sanger	49	V600E+= 44,9%	Se= 100% Sp=98%	3	-1 cas IHC-/BM+=double mutation V600E et V601E non reconnues en IHC -1 cas IHC+/BM-= FN BM, Sanger – mais NGS + (nécessite moins de CT) -1 cas IHC += mais mutation V600R en BM. Réactivité croisée.
18	Jabbar et al. (64)(2015)	NGS sequencing	115	#	Se= 97% Sp=99% Vpp=97% Vpn=99%	2	-13 cas avec « marquage équivoque » exclus -2 cas IHC+/BM-= 1 cas FN en BM car pas assez de CT (pré-analytique) ; 1 cas FP IHC car mauvaise interprétation avec beaucoup de pigments
19	Kakavand et al. (40) (2016)	MassArray	726	#	Se= 100% Sp=99,1 %	17	-6 cas IHC+/BM-= FN BM car CT<10% -7 cas IHC+/BM-= FP IHC car mauvaise interprétation immunomarquage -4 cas IHC+/BM- = ???
20	Knol et al. (65) (2014)	Allele specific PCR	63	Braf +=54% V600E+= 49%	Se= 96% Sp=100% Vpp= 100% Vpn=97 %	1	-1 cas IHC-/BM+= FN IHC. Après répétition de l'IHC marquage positif (phase pré-analytique en cause, pb de fixation ?)
21	Lade-Keller et al. (66) (2013)	RT-PCR (Cobas test)	28	Braf+=46%	Se=93% Sp=100% Vpp=100% Vpn=93%	6	-4 cas IHC+/BM-=FN BM, pas assez de CT pour Cobas test mais détections pas d'autres méthodes moléculaires -2 cas IHC-/BM+= 1 cas mutation V600K, 1 cas peu de mutation de la protéine Braf présente au sein de la lésion
22	Liu et al. (67) (2014)	Sanger	80	V600E+=22,5%	Se=72,2% Sp=100% Vpp=93,6% Vpn=97,2%	5	-5 cas IHC-/BM+= FN en IHC. Coagulation des tissus ou nécrose précoce des tissus qui entraîne une altération de l'antigène et ainsi une perte de la coloration dans les tissus.
23	Lo et al.(68) (2016)	RT-PCR (Cobas test)	219	Braf+=41,1%	Se=94,4% Sp=95,4%	11	-5 cas IHC-/BM+=autres mutations non V600E -6 cas IHC+/BM-= 5 cas surement FN en BM car peu de CT pour le séquençage, 1 cas FP en IHC car tumeur nécrotique ++
24	Loes et al. (69) (2014)	Sanger/ Pyrosequencing/ HRM	64	V600E+=57,8% V600K+=6,3%	Se=88,6% Sp=100% Vpp=100% Vpn=80%	7	-2 cas Sanger- mais +IHC/HRM -3 cas IHC- mais Sanger/HRM + -2 cas IHC/Sanger- mais HRM+ => Explications pas très claires. Sanger plus spécifique (limite de détection inférieure). HRM plus sensible, détecte plus de mutations.
25	Long et al.(70) (2015)	Pyrosequencing	188	V600E+=48%	Se=100% Sp=100%	0	-9 cas dont l'ADN non amplifiable. Sur ces 9 cas, 3 cas ont présentés une IHC+ (3+) et ont bénéficiés d'un ttt par thérapie ciblée. Pour les autres cas, pas de raisons claires, possible ischémie chaude pendant le geste ?
26	Long et al. (2016)(47)	HRM	100	Braf+=48,5% V600E+=79% V600K+=13%	Se=97% Sp=98% Vpp=97%	5	-2 cas IHC-/BM+= 1 cas mutation K601Q, 1 cas fixation différente.

				Autre=8%	Vpn=98%		-3 cas IHC+/BM-= 2 cas FN BM car mutation V600E en PCR, 1 cas WT après autres test BM mais qq CT isolées sur fond riche en lymphocytes il existe alors un faible rapport nx tumoraux/nx non tumoraux
27	Manfredi et al.(71) (2016)	HRM	161	Braf+=46,5%	Se=98,6% Sp=97,7%	2	-1 cas IHC+/BM-=FN BM possible car peu de CT -1 cas IHC-/BM+= ?
28	O'Brien et al.(34) (2017)	RT-PCR (Cobas test)	122	Braf+=28,8%	Se=86,1% Sp=96,9% Vpp=96,9% Vpn=94,4%	5	-moins de mutation Braf= biais de sélection et taux plus faible en Irlande -5 cas IHC-/BM+= 1 cas mutation V600K. Concernant les 4 autres cas, possible hétérogénéité tumorale.
29	Orchard et al. (72) (2019)	Sanger	71	Braf+=35,2%	Se=84% Sp=95,7%	6	-4 cas IHC-/BM+= ? -2 cas IHC+/BM-= ?
30	Pearlstein et al.(73) (2014)	Pyrosequencing	76	Braf+=47,3% V600E+=35,5% Autre=11,8%	Se=85% Sp=100% Vpp=100% Vpn=93%	5	-5 cas IHC-/BM+= 1 cas mutation V600K ; 2 cas avec erreurs d'échantillonnage et nécrose tumorale ; 2 cas hétérogénéité tumorale, risque FN en IHC ou de FP en BM.
31	Qiu et al. (74)(2015)	RT-PCR/ Sanger	41	V600E+=41,2%	Se=100% Sp=100%	0	#
32	Routhier et al. (75)(2013)	SnapShot genotyping assay	31	#	(VE1) Se=90% Sp=95% Vpp=90% Vpn=95%	2	-Deux Ac testés dans cette étude, avec l'autre Ac (anti-Braf) : Se=90%, Sp=81% et 5 cas discordants -Pas d'explication précise pour les 2 discordances -Un cas IHC+ alors que mutation V600K
33	Schiroli et al.(76) (2016)	Sanger	64	#	Se=89,2% Sp=96,2% Vpp=97,1% Vpn=86,2%	5	-1 cas IHC+/BM-=probable FN BM car peu de CT et beaucoup de lymphocytes, Sanger peu sensible. Mais pas assez de matériel pour autre méthode BM. -4 cas IHC-/BM+=pas d'explications, autres mutations associées ?
34	Skorokhod et al. (42) (2012)	Pyrosequencing/ Sanger	29	Braf+=65,5% V600E+=73,6%	Se=86% Sp=100% Vpp=100% Vpn=87%	4	-2 cas IHC-/BM+=1 cas FN IHC car beaucoup de pigments et de mélanophages ; autre cas ? -2 cas IHC+/BM-=FN Sanger mais mutation retrouvée au pyrosequencing
35	Tetzlaff et al. (77) (2015)	NGS	154	Braf+=51,2% V600E+=67%	Se=98% Sp=96% Vpp=93% Vpn=99%	5	-5 cas IHC+/BM-=1 cas FN BM car faible CT et microdissection laser refaite ; 4 cas FP IHC car pb pré-analytique, marquage hétérogène ou autres mutation V600K et D549N
36	Thiel et al. (46)(2015)	Cyclic mini sequencing analysis	102	V600E+=40,2%	Se=100% Sp=96,8% Vpp=95% Vpn=100%	2	-étude prospective -2 cas IHC+/BM-=FP IHC mauvaise interprétation de l'immunomarquage (nécrose et pigments ++)
37	Uguen et al. (78) (2015)	Pyrosequencing/NGS	111	#	Se=100% Sp=92,3%	7	-2 cas IHC+/BM-=FN BM car mutation V600E retrouvée en NGS -5 cas IHC « douteuse » avec 4 cas WT en BM et un cas V600K BM
38	Uguen et al. (78) (2015)	Pyrosequencing/ NGS	142	Braf+=32,9% V600E+=22,8% V600K+=6,3%	Se=100% Sp=95,1%	5	-5 cas IHC+/BM-= 2 cas avec beaucoup de pigments, mauvaise interprétation
39	Vallée et al. (79) (2019)	RT-PCR/Sanger	65	Braf+=35%	# Vpp=100% Vpn=93%	6	-étude prospective -3 cas IHC-/BM+= ? -3 cas IHC+/BM-=3 FP, mauvaise interprétation immunomarquage

40	Yaman et al. (80)(2016)	Pyrosequencing	96	V600E+=62,5%	Se=93,3% Sp=97,2%	5	-1 cas IHC+/BM-= ? -4 cas IHC-/BM+= ?
----	----------------------------	----------------	----	--------------	----------------------	---	--

*\*Disc= discordants; HRM=High resolution melting; NGS=Next generation sequencing; ?=pas d'explication ; FN=faux négatif ; FP=faux positif ; CT=cellularité tumorale*

« Par délibération de son Conseil en date du 10 Novembre 1972, l'Université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ou mémoires. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs ».

VU, le Président de Thèse

VU, le Doyen de la Faculté

VU et permis d'imprimer  
en référence à la délibération  
du Conseil d'Université  
en date du 14 Décembre 1973

Pour le Président  
de l'Université de CAEN et P.O

Le Doyen

ANNEE DE SOUTENANCE : 2020/2021

NOM ET PRENOM DE L'AUTEUR : COLIN AUDREY

TITRE DE LA THESE : Détermination du statut BRAF dans les mélanomes : comparaison des techniques immunohistochimiques et moléculaires sur une série de 223 cas issus du CHU de Caen.

RESUME DE LA THESE EN FRANÇAIS :

Introduction : La recherche de la mutation BRAF est nécessaire pour l'indication des thérapies ciblées dans le mélanome. La technique de référence est la biologie moléculaire (BM) mais l'immunohistochimie (IHC) est une méthode intéressante. Notre objectif est de comparer ces 2 techniques pour la détermination du statut BRAF.

Matériel et méthode : 223 échantillons de mélanomes bénéficiant de la double analyse BRAF (BM/IHC) du 07/01/2015 au 29/07/2020 au CHU de Caen ont été retenus. La BM était faite par qPCR et l'IHC par l'anticorps monoclonal de souris VE1, spécifique de BRAFV600E.

Résultats : Une première analyse a objectivé 10 cas discordants dont 5 cas avec un résultat positif en BM et un résultat négatif en IHC (BM+/IHC-) et 5 cas BM-/IHC+. L'IHC présente alors une sensibilité (Se) de 92,6% et une spécificité (Sp) de 98,5%. Puis les 10 résultats discordants ont été analysés secondairement. Pour les 5 cas discordants BM+/IHC-, 3 cas comportent une mutation V600K ou V600R et 1 cas présente une fausse amplification en PCR. Au total, un seul cas s'avère être un faux-négatif en IHC (présence d'une double mutation). Parmi les 5 cas discordants BM-/IHC+, la mutation BRAFV600E est retrouvée pour 2 cas par séquençage. Au final, seulement 3 cas sont des faux positifs (mauvaise interprétation de l'IHC). Selon ces nouveaux résultats, on retrouve une Se de 98,5% et une Sp de 98,1% pour l'IHC.

Conclusion : Ce travail soutient que l'IHC est un examen sensible et spécifique pour sélectionner en première intention les patients éligibles à un traitement par thérapies ciblées anti-BRAF, surtout à l'heure du développement des circuits courts en cancérologie.

MOTS CLES : Mélanome-Mutation-BRAF-Thérapie ciblée-PCR en temps réel-Biologie moléculaire-Immunohistochimie

TITRE DE LA THESE EN ANGLAIS: Determination of BRAF status in melanoma: comparison of immunohistochemical and molecular techniques on a series of 223 cases from the Caen University Hospital.

RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS :

Introduction: Screening for the BRAF mutation is needed for the indication of targeted therapies in melanoma. The reference technique relies on molecular biology (BM) but immunohistochemistry (IHC) is an interesting tool. Our goal was to compare these 2 techniques for the determination of BRAF status.

Material and method: 223 melanoma samples benefiting from the BRAF double analysis (BM / IHC) from 01/07/2015 to 07/29/2020 at the Caen University Hospital were selected. BM was done by qPCR and IHC by mouse monoclonal antibody VE1, specific for BRAFV600E.

Results: A first analysis showed 10 discordant cases including 5 cases with a positive result in BM and a negative result in IHC (BM + / IHC-) and 5 cases BM- / IHC +. The IHC then has a sensitivity (Se) of 92.6% and a specificity (Sp) of 98.5%. Then the 10 discordant results were analyzed secondarily. For the 5 discordant BM + / IHC- cases, 3 cases contain a V600K or V600R mutation and 1 case presents a false PCR amplification. Finally, only one case proved to be a false negative in IHC (presence of a double mutation). Among the 5 discordant BM- / IHC + cases, the BRAFV600E mutation was found for 2 cases by sequencing. Finally, only 3 cases were false positives (misinterpretation of the IHC). These new results showed a Se of 98.5% and a Sp of 98.1% for the IHC.

Conclusion: This work supports that IHC is a sensitive and specific test to select first-line patients eligible for treatment with targeted anti-BRAF therapies, especially at a time of the development of short circuits in oncology.

KEYWORDS: Melanoma-Mutation-BRAF-Targeted therapy-Real-time PCR-Molecular biology-Immunohistochemistry