

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université BLIDA I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biosignalisation cellulaire et moléculaire: Génétique du cancer

Thème

*MÉLANOME MÉTASTATIQUE : Etude
Anatomopathologique Immunohistochimique et Biologie
Moléculaire*

Présenté par

ARAAR Chaimaa Sara

CHIKR Warda

Soutenu le 4 juil 2016 devant le jury composé de

M ^{me} AISSANI. R	Maitre assistante A	à l'université de Blida	Présidente
M ^{me} KANANE.A	Maitre assistante A	à l'université de Blida	Examinatrice
P ^r HANNACHI.L	Maitre de conférences A	à Faculté de Médecine Université Alger	Promotrice
M ^{me} NADJI. S	Enseignante	à l'Université de Blida	Co-Promotrice
M ^{me} BEN AZOUZE.F	Enseignante	à l'Université de Blida	Invité



REMERCIEMENTS

Merci à Dieu tout puissant de nous avoir guidé dans notre vie et donné la santé et la volonté, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail particulier au

P^r Hannachi.L notre chère promotrice, pour son aide efficace, ses conseils judicieux qui ont amélioré la réalisation de ce mémoire ainsi que toute l'équipe du service d'anatomie pathologique du CHU Mustapha Alger.

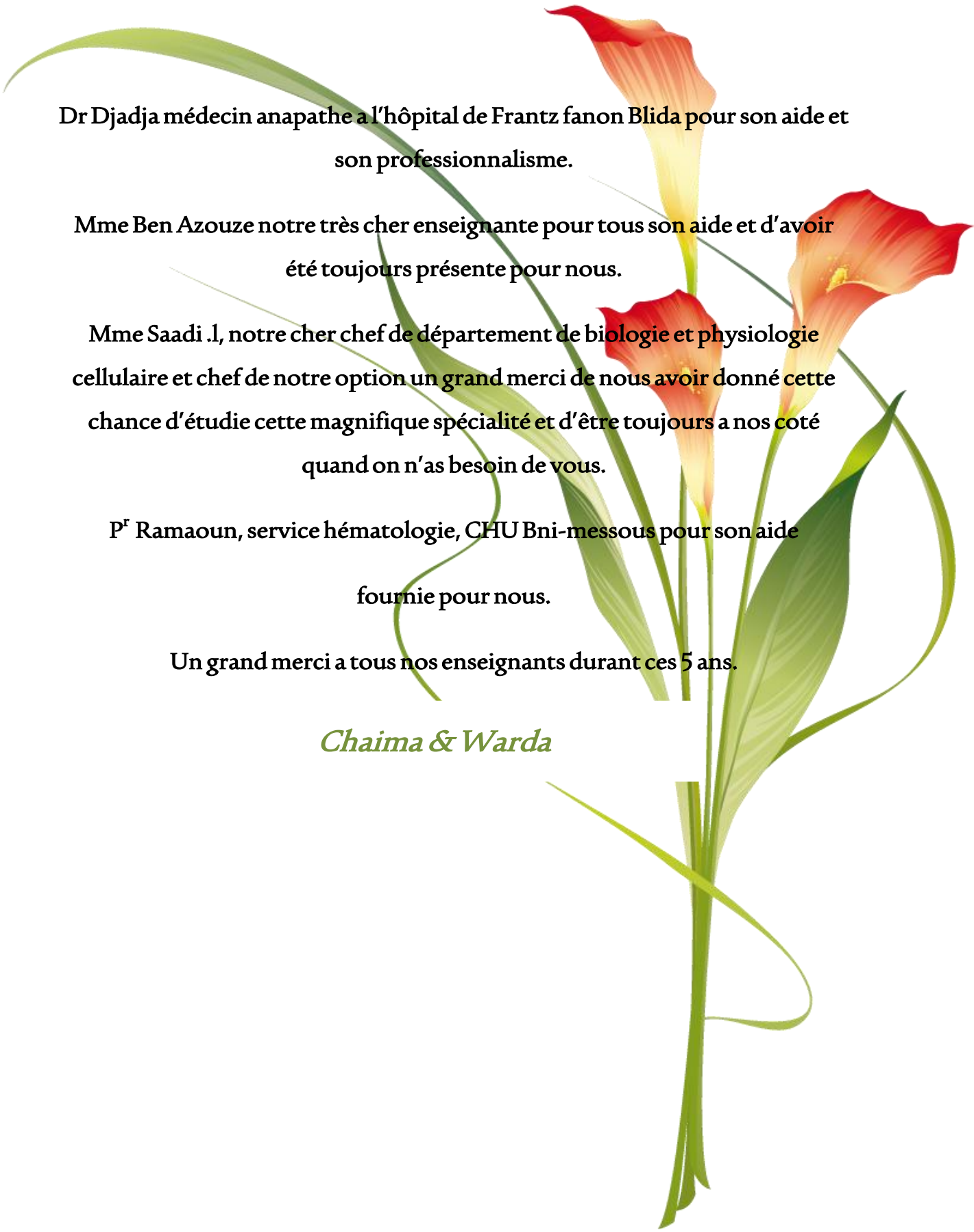
Mme Aissani maitre assistante au département de Biologie a l'université de Blida1, d'avoir accepté de présider ce jury.

Mme Kanane maitre assistante au département de biologie a l'université de Blida1, d'avoir accepté de faire partie du jury, et examiner ce travail.

Mme Nadji.S notre cher co-promotrice pour tous ces efforts fournis pour pouvoir mener à bien notre mémoire tout au long de cette année.

Dr Lounicie.Y pour sa touche scientifique et tous ces conseils, remarques et encouragement apporté dans ce travail.

P^r Ouhioune.W chef de service d'Anapath a l'hôpital Frantz fanon Blida pour son précieux aide et son esprit scientifique, et à toute son équipe.



Dr Djadja médecin anapathe a l'hôpital de Frantz fanon Blida pour son aide et son professionnalisme.

Mme Ben Azouze notre très cher enseignante pour tous son aide et d'avoir été toujours présente pour nous.

Mme Saadi .I., notre cher chef de département de biologie et physiologie cellulaire et chef de notre option un grand merci de nous avoir donné cette chance d'étudier cette magnifique spécialité et d'être toujours a nos coté quand on n'as besoin de vous.

P^r Ramaoun, service hématologie, CHU Bni-messous pour son aide fournie pour nous.

Un grand merci a tous nos enseignants durant ces 5 ans.

Chaima & Warda



Dédicaces

Du profond de mon cœur Je dédie ce précieux travail à tous ceux qui me son chers

A MA CHÈRE MÈRE NASSIMA

Nassima l'amour de ma vie, l'exemple de la bonté et cœur d'or, les mots ne suffisent ni sauront témoigner l'amour, le respect éternelle que je te porte, j'espère que ce travail de rendras le peu de l'ensemble de toute tes effort et sacrifice tous en long de ma vie pour mon éducation mon instruction et mon bien être

A MA grand MÈRE GHANIA

Mani ma confidente mon bout de sucre tu as été une Mère et tu le seras toute ma vie, tu es la source d'affection et d'amour qui suffisent a englobé tous univers je te dédie ce travail qui est l'exaucement de toute tes prière.

Je vous remercie vous deux, les deux Mère que le bon dieu me les a offerts pour toute l'affection, l'amour et le soutient que vous m'avait porté depuis mon enfance et j'espère que vos bénédictions et vous douaa m'accompagneront tout le long de ma vie, que se modeste travail soit l'exaucement de tout vous vœux et douaa tant formulé, et le fruit de innombrable sacrifice, puisse dieu tous puisant vous récompense et vous accorde santé, bonheur et longue vie.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE Obeid –allah

Ce travail t'est dédie mon très cher Papa, la vie a été très dure avec nous elle t'a prise trop tôt, j'espère là ou tu es tu seras fière de moi ton unique fille qui a toujours priée pour le salut de ton âme je t'aime.

Puisse dieu le tous puisant l'avoir en sa sainte miséricorde et le recomposeras par son paradis et nous uniras tous un jour.

A MON GRAND PÈRE TAIBE

Mon très cher Baba , je te dédier ce travail en reconnaissance de toute tes effort et ta tendresse que tu ma apporte tu es le seul père que j'ai eu sur cette terre, que dieu te récompenseras et t'apporteras santé et long vie in-cha-allah.





A MES TANTES ET ONCLES

*A ma cher tante SARAH, tu est une copine et sœur pour moi et son marie OTHMANE
je vous remercie pour votre gentillesse et affection et leurs enfants Omar, Anes (lelou), et
le dernier de la famille Radouane.*

*A mes cher oncles LOTFI un grand merci pour ton affection et ta tendresse je te dédie se travail,
et a ton épouse Wahiba et ses enfants Obeid-allah, Aymen(amouna), et Meryouma.
A KAMEL et son épouse Amina et ses enfants Haythem, Maria, Yasmina.*

*A mes tante DALILA, HASINA, LEILA, FOUZIA, CHERIFA, HADJAR ET
SOUAD et leurs marie et enfants.*

A mes oncles qui son fel ghorba YASINE et BILA et leurs enfants.

A MES MEILLEURS AMIES

*A ma copine MARWA tu es ma sœur d'âme merci d'être toujours a mes coté et de
partagé avec moi le bon et le mauvais je t'aime.*

A FARES mon meilleurs ami, merci d'être toujours la quand j'ai besoin de toi.

*A mon binôme Warda merci pour tout ton effort fourni pour ce travail qui nous ai unis-
j'espère qu'on le restera.*

*A toutes mes copines de la promo je vous remercie pour tous les bons moments qu'ont n'as
partagé Ensemble grâce a vous j'ai un paquet de bon souvenir je vous souhaite toute
bonheurs, santé et argents (lol).*

*A tous mes enseignants de tous mon parcoure d'étude je vous remercie et je vous dédie ce
travail.*

*Et a tous les personnes que j'aime et qui m'aime et a tous se qui on participé a la
réalisation de ce mémoire.*

*Et a l'homme qui vas partagé ma vie(j' attend ta divine apparition
mon très chère !)......*

ARAAR CHAIMA SARA





*Au Bon dieu Tout puissant qui m'a inspiré
Qui ma guidé dans le bon chemin Je vous dois ce que je suis devenu
Louanges et remerciements Pour votre clémence et miséricorde*

*A mon très cher père CHIKR RACHID
Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le
dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.
Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon
éducation et mon bien être.
Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consenti pour mon
éducation et ma formation.
Puisse dieu, le tout puissant, te procurer santé, bonheur et longue
vie.*

*A ma très chère mère BELABES BAKHTA
Tes qualités humaines exceptionnelles font de toi une mère
exemplaire et un module de vertu.
Affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de
la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du
dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.
Tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour
mener à bien mes études.
Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que
tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner
depuis ma naissance , durant mon enfance et même a l'âge adulte .
Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour.
Puisse dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue
vie et bonheur.*





*A mes très chers frères MOHAMED et sa femme OMHANI,
SIDALI et sa femme IBTISSEM, ABDELMALEK et sa femme
CHAHRAZED*

*Je vous remercie pour votre soutien et tous vos efforts qui ont contribué
à mon épanouissement.*

*J'espère avoir été à la hauteur de votre estime.
Que ce travail soit un témoignage de mes sentiments de fraternité et
d'amour.*

*A mes très chères sœurs FATMA et son mari NACER, AMINA et
son mari AMINE, IKRAM et son mari YUCEF, et surtout ma
chère jumelle FAIROUZ*

*Merci pour votre soutien et vos prières ! Aucun mot n'exprime l'amour et
le respect que j'ai toujours eu pour vous.*

*Je dédie ce travail en témoignage de mon profond amour SAID. Puisse
Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et
bonheur.*

*A ma copine et compagnon de carrière universitaire CHAIMA je
vous remercie infiniment pour tes aides, tes conseils et ton amour.*

*A mes nièces et mes neveux
A mes copines LILA, HAYETTE et MARWA
A tous mes amis et à ceux qui m'aiment de près ou de loin.
A mes grands parents maternels BELABES MOHAMED et KLITIN HALIMA
A la mémoire de mes Grands-parents
Le destin ne nous a pas laissé le temps pour jouir ce bonheur ensemble et de vous
exprimer tout mon respect. Puisse Dieu tout puissant vous accorder sa clémence, sa
miséricorde et vous accueillir dans son paradis...*

CHIKR WARDA



Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AC : Adenylyl Cyclase

Ac laire : anti-corp primaire

AC llaire : anti-corp srcondaire

AMPc : AMP cyclique

Braf : v-raf murine sarcoma viral oncogene
homologue B1

C-Kit : récepteur du facteur des cellules souches

CDK : Cyclin Dependant Kinase

CDK4 : cyclin-dependent kinase 4

CD : Cluster of Differentiation

Ct : Tubes de prélèvement

CREB : Camp Responsive Element Binding Protein

CDKN2A : inhibiteur cyclin-dépendant 2A de kinase

EGFR : récepteur épidermique de facteur de croissance ;

ERK : Extracellular Signal regulated Kinases

Ft : Tubes de filtration

FC : facteur de croissance

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

HE : Hématoxyline Eosine

IHC : immunohistochimie

LMM : lentigo maligne melanoma

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase, désigne la voie canonique Ras/Raf/MEK/ERK

MEK : Mitogen activated ERK Kinase

Mdm2: mouse double minute 2 p53

MM : Mélanome métastatique

MGG : Métastase Ganglionnaire

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

MSH : Mélanocyte Stimulating Hormone

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NRAS : Neuroblastoma RAS oncogene homolog

SSM : mélanome à extension superficiel

OMS : organisation mondiale de la santé

PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase

PCR : Polymerase Chain Reaction

PI3K : Phosphatidyl Inositol-3-Kinase

PBS : Phosphate buffered saline

PK: Protein Kinase

Ps100 : protéine 100

PKA : Protéine kinase A

pTEN : Phosphatase and TENsin homolog located on chromosome 10

RAS : Rat Sarcoma

RB : Rétinoblastome

RGP : Phase de croissance radiale

RT PCR : real time polymerase chain reaction

RTK : récepteur tyrosine kinase

SCF : Stem Cell Factor

TNM: Tumor Nodes Metastasis

UV : rayons Ultra-Violets

Liste Des Figures

Figure	Titre	Page
01	L'évolution du MM	9
02	Les trois voies de signalisations impliquées dans le MM	12
03	La voie de signalisation du C-kit	15
04	Réactifs de PCR	27
05	Principe de la procédure	29
06	Sélection du matériels	32
07	Sélection de la zone tumorale	33
08	Microdissection	33
09	Principe de tube a filtre	33
10	Disposition de la plaque a échantillon	35
11	Principe de fonctionnement des sondes fluorescentes	37
12	Sondes a marquage fluorescent	38
13	Détection automatisé au temps réel	40
14	Répartition des malades selon le sexe	42
15	Répartition des patients selon l'âge	43
16	Répartition du MM selon le siège de métastases	44
17	Coupes histologique d'un MM ganglionnaire après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	45
18	Coupes histologique d'un MM cutané après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	46
19	Coupes histologique des différents types du MM après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	48
20	Coupes histologique d'un MM hépatique avec la tumeur primitif au niveau choroïdien après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	50
21	Coupes histologique d'un MM amygdalienne après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	52
22	L'expression du C-kit selon les types histologiques	54
23	Coupes histologiques d'un MM après immunomarquage membranaire du C-kit observé au microscope optique	55
24	Comparaison d'expression du C-kit et le BRAF	58

Liste Des Tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Matériel non biologique	20
02	Répartition cas de MM selon le sexe	42
03	Répartition cas de MM selon l'âge	43
04	Expression du C-kit	53
05	Expression du C-kit selon le type histologique	54
06	Résultats de test de mutation BRAF V600E	56
07	Expression du BRAF chez MM cutané	56
08	Expression du BRAF chez MM cutané et les différents types du MM	57
09	Comparaison d'expression du BRAF et C-kit	58
10	Comparaison entre les MM présentant une mutation BRAF V600E et une expression du marqueur immunohistochimique C-kit	59

Résumé

Le mélanome est un cancer de la peau des plus dangereux avec une incidence qui ne cesse de croître ces dernières années

Le mélanome métastatique (MM) est une phase terminale et progressive du mélanome c'est l'une des formes des cancers les plus agressives. En effet, 75 % des individus décèdent en l'espace d'une année.

L'objectif de notre travail est d'étudier les aspects anatomopathologiques et moléculaires des mélanomes métastatiques (MM), à travers une étude rétrospective (01/2010 – 01/2016) et prospective (01/2016- 06/ 2016). Cette étude a été menée sur des prélèvements colligés au laboratoire d'anatomo-pathologie du Centre Hospitalo-Universitaire, Mustapha Bacha (Alger).

La prédominance masculine est notée (58%) avec un ratio de 1.45. Les âges extrêmes sont de 28 et 89 ans, et l'âge moyen de 57 ans.

Nous avons recherché la relation de l'expression du récepteur à l'EGF (C- Kit) et la présence ou l'absence de la mutation BRAF (V600E) et leurs influences dans l'apparition du MM, et ce en vue d'une thérapie ciblée.

Dans notre série, 27 MM ont été colligés. Leur répartition selon le site métastatique se fait comme suit : ganglionnaire retrouvé chez 12 patients (44%), cutané chez 06 patients (22%), hépatique chez 03 patients (11%), cérébral chez 02 patients (7 %), et un patient (4%) pour chacun des sites suivants ; osseux, glandulaire, parotidien, amygdalien.

Cette étude montre une surexpression du C-KIT, dans 18 cas (67%) et une mutation BRAF V600E détectée chez 04 patients (27%).

La variabilité génotypique associée au MM rend le ciblage thérapeutique complexe. Nous disposons actuellement de nouvelles thérapies ciblées ayant montré un allongement de la survie globale des patients atteints de MM et par la suite pouvoir faire une thérapie adéquate.

Mots clés : Mélanome métastatique, BRAF, C-Kit, thérapie ciblée.

Abstract

Melanoma is a cancer of the most dangerous skin with an impact that continues to grow in recent years

The metastatic melanoma (MM) is a terminal and progressive phase melanoma is one of the most aggressive forms of cancer. Indeed, 75% of people die in the space of a year.

The aim of our study was to investigate the c, pathological, molecular metastatic melanoma through a retrospective and prospective study of 2010, respectively in 2015 and 2016. This study was conducted on samples collected in the laboratory of pathology of the university Hospital Mustapha Bacha (Algiers). Patient age ranged from 28 to 89 years, an average of 57.

We investigated the relationship of the expression of EGF receptor (C-Kit) and the presence or absence of the mutation BRAF (V600E) and their influence in the appearance of MM, and in order to targeted therapy.

Our results show that on the pathological level, 27 cases distributed several types of metastasis : lymph node type of metastatic melanoma was found in 12 patients (44%), 06 patients present a cutaneous metastasis (22%) , 03 patients representing a liver metastasis (11%) , 02 patients with brain metastasis (7%) , and one patient (4%) for each subsequent metastasis ; bone , gland , parotid , amygdala .

This study shows clinically and histologically , in the majority of cases that benefited from the research overexpression of C -KIT , revealed a labeling in 18 cases or 67% .In the end , the BRAF V600E mutation was detected in 04 patients sue 15 (27%) of metastatic melanoma.

Genotypic variability associated with metastatic melanoma makes the complex therapeutic targeting. We now have new treatments for targeted therapy has shown an increase in the overall survival of patients with metastatic melanoma and thereafter to make a proper therapy.

Keywords: Metastatic melanoma , BRAF , C -Kit , targeted therapy.

ملخص

سرطان الجلد هو سرطان الجلد الأكثر خطورة مع الأثر الذي يستمر في النمو في السنوات الأخيرة سرطان الجلد المنتشر (MM) هو محطة والتقدمية مرحلة سرطان الجلد هو واحد من أكثر أشكال عدوانية من سرطان. في الواقع، فإن 75٪ من الناس يموتون في غضون عام واحد.

ان الهدف من عملنا هذا المتابعة السريرية لمرضى سرطان الجلد المنتشر الجزيئي من خلال الدراسة المتوقعة على التوالي لعام 2010 حتى عام 2015 بالإضافة الى عام 2016. وقد أجريت هذه الدراسة على عينات تم جمعها في مختبر علم الأمراض من مستشفى الجامعي مصطفى باشا (الجزائر العاصمة) و مختبر علم الأمراض من مستشفى الجامعي بالبلدية. تراوحت أعمار المرضى 28-89 عاما، أي بمعدل 57.29 سنة

هدفنا هو التحقيق في العلاقة بين التعبير عن EGF مستقبلات (C-Kit) وجود أو عدم وجود طفرة BRAF (V600E) وتأثيرها في ظهور MM، ول العلاج الموجه.

وتشير النتائج التي توصلنا إليها على المستوى المرضي،

27 حالة تشمل عدة أنواع من الورم خبيث:

- 12 حالة في العقد الليمفاوية (44 ٪)

- 06 حالات في المناطق الجلدية (22 ٪)

- 03 حالات الكبد (11 ٪)

- حالتين في الدماغ (7 ٪) ،

- و حالة في كل من ; العظام، والغددالنكفية، بصري، اللوزتين.

وتبين هذه الدراسة سريريا و تشريحيًا ، في معظم الحالات التي استفادت من اختبار البحوث C- KIT ، كشف العلامات في 18 حالة (67 ٪) .

وفي النهاية، تم اكتشاف تحور BRAF V600E في 4 المرضى من 15 (27 ٪) من سرطان الجلد المنتشر. التباين الوراثي المرتبط بسرطان الجلد المنتشر يجعل استهداف العلاج معقد. نملك الآن افاق جديدة في الشفاء و هو العلاج المستهدف الذي أظهر زيادة في البقاء على قيد الحياة لمرضى سرطان الجلد المنتشر وبعد ذلك لتقديم العلاج المناسب.

كلمات البحث : سرطان الجلد النقيلي، BRAF ، ckit ، العلاج الموجه.

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : DONNEES BIBIOLOGGRAPHIQUES.

I-1 Mélanome métastatique.....	3
I-2 facteurs de risque et étiologie.....	4
a-Causes environnementales.....	4
b-Causes génétiques.....	4
I-3 Épidémiologie.....	5
I-4 Développement du mélanome vers le mélanome métastatique.....	6
a- Exemple de mélanome cutané.....	6
b- Phase pré-métastatique	7
c- Processus métastatique	8
I-5 Mécanismes de sélections cellulaires	10
A- Mécanismes génétiques	10
B- Gène supprimeur des métastases	10
C- Mécanismes immunologiques.....	10
D- La transition épithélio-mésenchymateuse.....	11
E- chimiotactisme	11
I-6 Principales Voies de signalisation du mélanome métastatique.....	12
I-6-1 voie des mitogen-activated protein kinases (MAPK).....	12
I-6-2 voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)	13
I-6-3 voie de l'AMPc et MITF.....	13
I-7 Gènes impliqués dans le mélanome métastatique	14
I-7-1 C-kit	14
A- mutation du C-kit.....	14
I-7-2 B-raf.....	15
A- Mutation B-raf.....	15

I-8 thérapie ciblée	16
I-8-1 Prise en charge thérapeutique.....	16
I-8-2 Mutation B-raf et la thérapie ciblée.....	16
I-8-2 C-kit et la thérapie ciblée.....	18

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II -1 Matériel.....	19
II-1-1 population d'étude	19
II-1-2 Matériel non biologique.....	20
II -2 Méthodes.....	21
II- 2-1 Étude anatomopathologique.....	21
II-2-2 Étude immunohistochimique du marqueur de C-KIT.....	23
II-2-3 Étude moléculaire : PCR en temps réel.....	27
II-2-4 Phase post -analytique et Interprétation des résultats.....	40

CHAPITRE III : RESULTATS

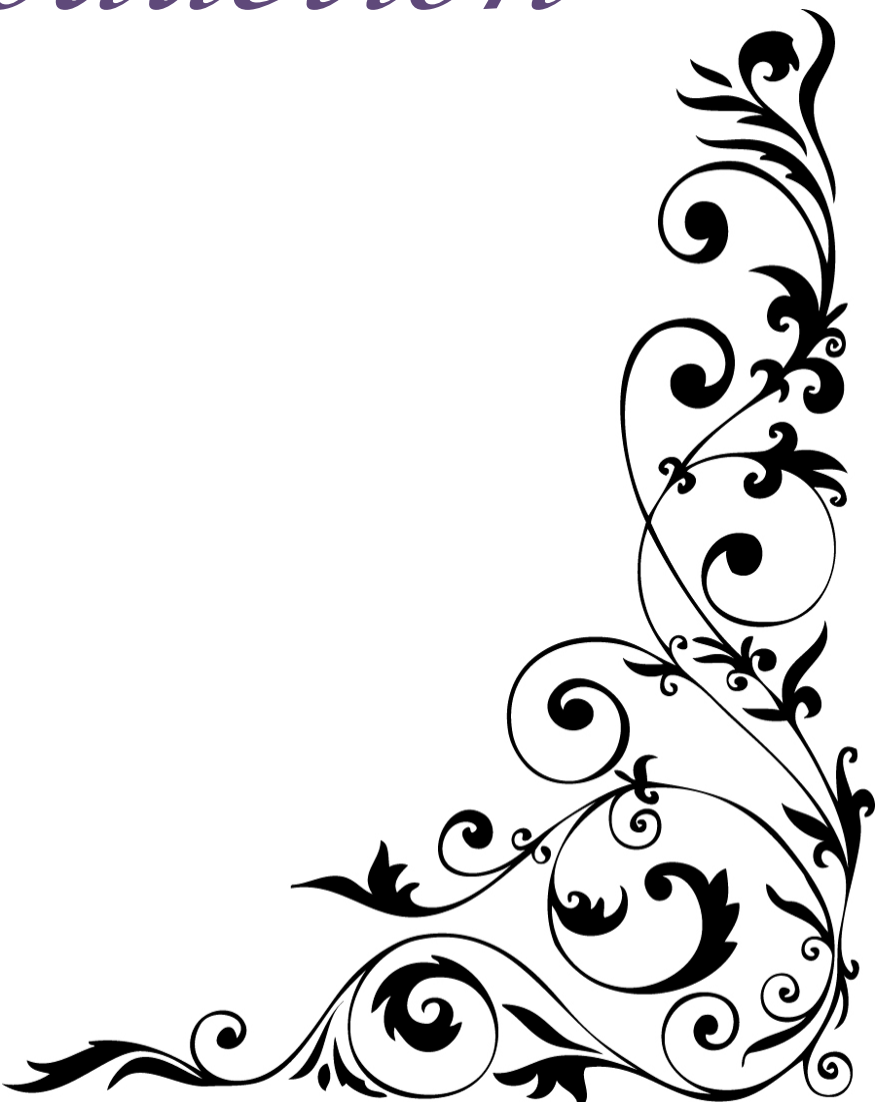
III-1 Paramètres Épidémiologiques.....	42
III-1-1 Répartition du mélanome métastatique selon le sexe.....	42
III-1-2 Répartition du mélanome métastatique selon l'âge	43
III-2 Répartition du mélanome métastatique selon la localisation.....	44
III-3 Résultat immunohistochimique du marquage de C-kit.....	53
III-4 Résultat de PCR : Teste de mutation B-raf V600E.....	56

CHAPITRE IV : Discussion.....60

Conclusion64

Annexe.....

Références bibliographiques.....



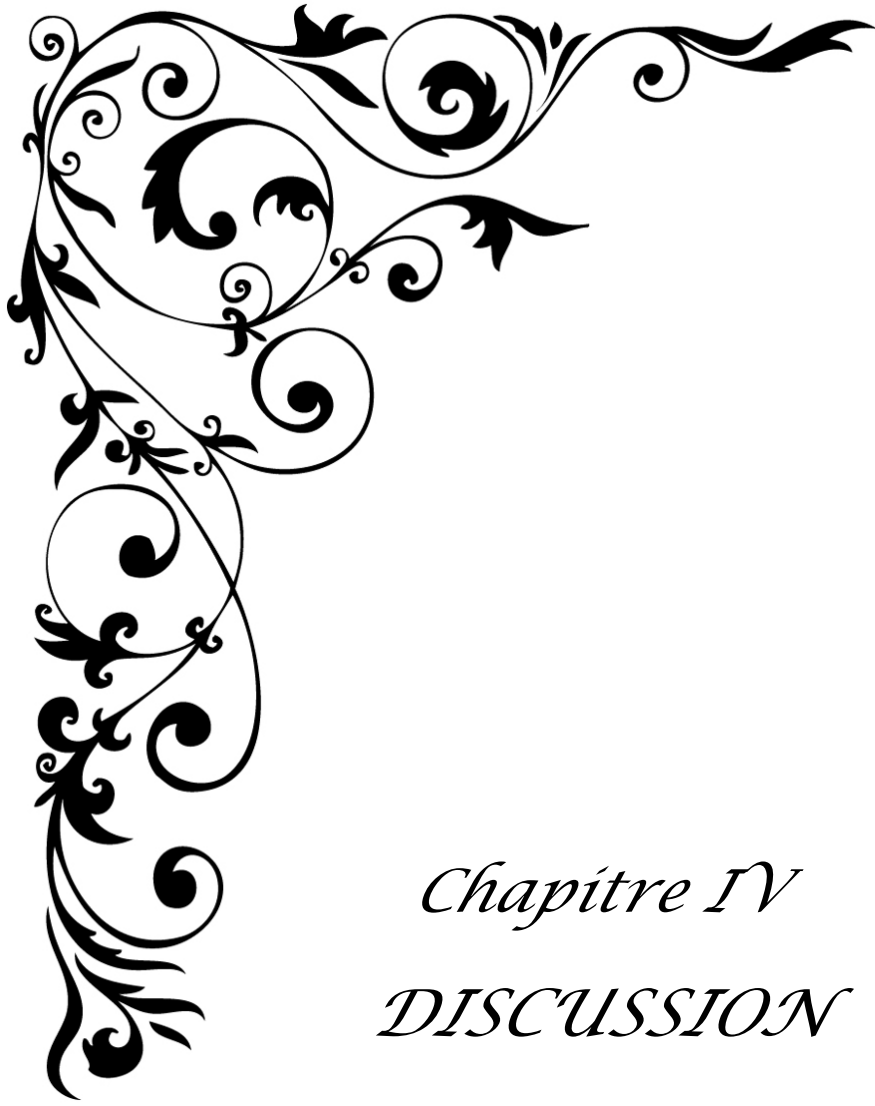
Introduction



Chapitre II
MATÉRIEL et
Méthodes



Chapitre III
RESULTATS



Chapitre IV
DISCUSSION

ANNEXES



Chapitre I
DONNEES
bibliographique

Introduction

Le cancer est l'une des causes de mortalité la plus fréquente dans le monde. Ceci s'explique par notre alimentation, notre mode de vie, mais aussi les antécédents familiaux et les facteurs génétiques.

Parmi les cancers les plus agressifs, il y'a le MM avec un taux de mortalité de près de 75%. a l'heure actuelle, près de 132 000 mélanomes sont enregistrés chaque année dans le monde.

L'incidence du MM ne cesse d'augmenter annuellement cela revient en grande majorité aux mutations génétiques.

Mélanome est le cancer cutané le moins fréquent (1% des cancers cutanés) mais le plus grave. Il est diagnostiqué le plus souvent au stade de tumeur primitive. Il est alors traité avec un bon taux de réussite. Par contre, le mélanome métastatique (MM) est de mauvais pronostic. Même si des thérapies ciblées comme l'ipilimumab et le vémurafénib ont récemment obtenu une AMM la prise en charge du MM reste malheureusement palliative. Ceci est d'autant plus préoccupant que l'incidence du mélanome a triplé en trente ans et qu'il apparaît de plus en plus précocement chez les jeunes enfants et les adolescents. (Piérard.C, 2012).

Parmi une panoplie de protéines, le marqueur de signalisation C-kit qui représente un récepteur transmembranaire impliqué dans la prolifération et développement de plusieurs lignée cellulaires, l'activation du récepteur C-kit et l'autophosphorylation des résidus tyrosine spécifiques dans la partie intracellulaire du récepteur. Ces acides aminés phosphorylés sont des sites d'accueil pour différentes protéines, qui à leur tour contrôlent plusieurs voies de signalisation intra cellulaires, dont les voies MAPK et PI3K.

Le MM est généralement du a une surexpression de C-kit, et des mutations activatrices de C-kit dans moins de 3 % des mélanomes. Bien que globalement rares, les mutations de c-KIT sont plus fréquentes dans les mélanomes. (N. Dumaz and al novembre 2011).

les mélanomes porteurs d'une mutation de C-kit pourraient être traités par une thérapie ciblée.

Le B-raf c'est une protéine kinase de la famille Raf et facteurs de signalisation qui régule les protéines MAPK et ERK et joue un rôle dans les processus de division et de différenciation cellulaire. Il permet la détection par dosage plasmatique quantitatif de l'ADN circulant la mutation BRAF et pourrait donner un suivi étroit de l'évolution du mélanome. (Boussemart .L, 2012).

Introduction

Notre travail repose sur la problématique suivante : le C-kit et le B-raf varient ils en fonction de l'invasion métastatique du mélanome ?

Afin de répondre à cette question, nous avons mené une double étude (rétrospective et prospective) à partir de prélèvements collectés au service d'Anatomie pathologique du Centre Hospitalier Mustapha Bacha (Alger).

L'objectif principal de ce travail est de rechercher à partir d'une analyse moléculaire du MM la relation de l'expression du récepteur à l'EGF (C- Kit) et la présence ou l'absence de la mutation BRAF (V600E), et ce en vue d'une thérapie ciblée.

I-1 Mélanome métastatique

Le mélanome est une tumeur rare mais son incidence semble augmenter de façon alarmante ces dernières années. Il se développe à partir des mélanocytes présents à la jonction du derme et de l'épiderme, C'est une néoplasie secondaire à la transformation maligne des mélanocytes, il peut apparaître sur une peau saine (dans 70 à 80 % des cas) ou résulter de la transformation maligne d'un nævus, prolifération bénigne des mélanocytes. Il représente environ 2,7 % de l'ensemble des cancers incidents. (P.Bahadoran et al 2014)

Le mélanome prend habituellement naissance sur la peau. Mais il peut aussi apparaître dans d'autres parties du corps, mais ces formes de mélanomes sont rares. (Annexe 1)

De ce fait, il existe plusieurs types de mélanome : les mélanomes cutanés, les mélanomes des muqueuses, les mélanomes oculaires et les mélanomes d'origine primaire inconnue, Mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin, superficiel extensif SSM, nodulaire. Le mélanome cutané est de loin le plus fréquent (91,2 %) ; les autres types sont beaucoup plus rares (oculaire 5,3 %; origine primaire inconnue 2,2 %; muqueuse 1,3 %). (AMIR -TIDADINI.ZC, 2013)

Le mélanome métastatique (MM) est le nom donné aux tumeurs mélaniques malignes issues des mélanocytes, qui sont à un stade avancé et qui ont développé des métastases dans différents sièges essentiellement dans la peau, les poumons le foie, le cerveau, l'os et métastase gastro-intestinale) (annexe 2) .

Historiquement, le terme métastase, du grec *metastasis* « je change de place », est apparu au XVI^{ème} siècle pour désigner les tumeurs secondaires à une tumeur primitive.

Ce phénomène est individualisé en tant qu'objet de recherche à partir de 1889, date de la publication dans le Lancet par J. Paget de l'hypothèse (*seed and soil*). Actuellement , le processus métastatique est défini comme "une dissémination de cellules néoplasiques dans un site secondaire (ou de *plus grand ordre*) non contigu et distant, au sein duquel ces cellules prolifèrent pour former une masse extravasculaire de cellules incomplètement différenciées, (ILIE .M, 2012).

I-2-Facteurs de risque et Étiologie

La cellule cancéreuse mélanomateuse a une croissance exponentielle et une importante activité de migration donnant ainsi rapidement des métastases, en rapport avec une cascade de modifications du génome de la cellule (une cascade de réactions génétiques), dues à des facteurs multiples :

❖ Facteurs extrinsèques :

Les rayons ultra violets, les rayons B, Rayons X sont les facteurs les plus incriminés.

Les produits chimiques tels que : arsenic, goudron...

Les Virus : papillomavirus 'HPV'

❖ Facteurs Intrinsèques : ils peuvent être de type :

-Immunitaires avec une carence immunitaire innée

-Génétiques : troubles de la mélanine, troubles de la réparation de l'ADN.

a-Causes environnementales

- L'exposition brutale des peaux claires au Soleil qui est le facteur de risque majeur
- L'exposition aux lampes à ultra-violets Domestiques ou de salon multiplie le risque de mélanome par trois en cas de phototypes clairs qui est l'un des facteurs de risque majeur
- la présence de très nombreux grains de beauté.
- Le rôle du phototype est connu. Les individus à phototype clair sont les plus menacés. Les yeux clairs ou bleus, les cheveux blonds ou roux, le teint clair, la présence de taches de rousseur(d'éphélides), la tendance aux coups de soleil, l'impossibilité de bronzer chez les personnes à peau blanche est un facteur de risque notable de mélanome (multiplié par 2 ou 3).

b-Causes génétiques

- Le mélanome héréditaire dans environ 10% des cas, est dû à une mutation au niveau de deux gènes :
- Le gène CDKN2A (suppresseur de tumeur) situé au niveau du chromosome 9 p21,
Gène CDK4 (proto- oncogène) situé en 12q13.
- Maladies héréditaires Le xerodermapigmentosum(maladie autosomique récessive, rare, touchant une personne sur 250 000) est caractérisé par une

très grande sensibilité au soleil et une prédisposition dramatique aux cancers de la peau.

- Mutation au niveau du gène B-raf
- Mutation du gène C-kit

I-3-Épidémiologie

L'incidence du mélanome et des autres cancers cutanés a augmenté au cours des dernières décennies. A l'heure actuelle, entre 2 et 3 millions de cancers cutanés non mélanocytaires et 132 000 mélanomes malins sont enregistrés chaque année dans le monde. Un cancer diagnostiqué sur trois est un cancer de la peau et d'après les Skin Cancer Foundation Statistics, un américain sur cinq présentera un cancer cutané au cours de sa vie.

Au fur et à mesure de la destruction de la couche d'ozone, l'atmosphère perd de plus en plus sa fonction de filtre protecteur et davantage d'UV solaires atteignent la surface de la terre. On estime qu'une diminution de 10 % de la concentration d'ozone entraînera l'apparition de 300 000 cancers cutanés non mélanocytaires et 4 500 mélanomes de plus. L'incidence mondiale du mélanome continue à progresser - toutefois, les principaux facteurs de prédisposition à ce cancer semblent être liés à une exposition au soleil dans le cadre des loisirs et à des antécédents de coups de soleil. Il s'agit là de facteurs qui sont de la responsabilité de chaque individu.

En Afrique du Sud, la fréquence varie entre 0,5 et 1,8 cas par an et pour 100 000 habitants chez les Noirs contre 4,4 à 6,2 pour 100 000 habitants par an chez les Blancs.

Au Maroc, comme dans l'ensemble des pays du Maghreb et d'Afrique, la fréquence du mélanome reste relativement faible. Son incidence est estimée à 0,048 par 100 000 habitants et par ans (Bachti.B,2015).

73,870 cas de mélanomes cutanés seront diagnostiqués aux États-Unis en 2015

En Australie, a la plus forte incidence du mélanome dans le monde, environ 57 cas pour 100.000 personnes par an.

Selon l'Agence internationale pour la Recherche sur le Cancer (CIRC) (2002) démontrent que le taux les plus élevés d'incidence nationaux rapportés pour le mélanome a lieu dans les populations de l'Australie (39: 100.000 par an) et la

Nouvelle-Zélande (34: 100 000 par an). Les taux suivants les plus élevés de mélanomes nationaux ont été observés aux Etats-Unis (17: 100 000 par an), suivi par le pays scandinaves avec des taux autour de 12-15: 100.000 par an. Autre les populations européennes (par exemple, le Royaume-Uni, Allemagne, Pays-Bas, Autriche, France) ont signalé des taux de mélanome dans la gamme 4-10: 100.000 par an. La majorité non blanche populations de l'Afrique, l'Asie et le Pacifique et le mélange populations d'Amérique centrale et du Sud cohérente les taux de mélanome ont rapporté moins de 3: 100.000 par an

En Algérie

Chaque année 5 à 10 nouveaux cas de mélanomes sont enregistré au CHU Mustapha-Pacha 30 nouveaux cas sont enregistré chaque ans dans la moitié évolue en mélanome métastatique c'est à dire 15cas chaque année (OUAHIOUNE.W 2013)

I-4 Développement du mélanome vers le mélanome métastatique

a- Exemple de mélanome cutané

Le mélanome progresse généralement en 3 stades décrits par le modèle de Clark.

Au premier stade, les cellules tumorales prolifèrent de manière anarchique.

Elles envahissent l'épiderme mais ne franchissent pas la couche basale qui sépare le derme de l'épiderme. Le mélanome reste dans l'épiderme : il est non invasif in-situ.

Il est appelé mélanome à extension radiale ou RGP pour Radial Growth Phase. Il peut s'étendre que de manière latérale au sein de l'épiderme : c'est la phase horizontale. Elle peut durer de 1 à 15 ans. L'exérèse du mélanome à ce stade assure la guérison complète et évite ainsi tout risque de métastase.

Si le mélanome n'est pas pris en charge au stade précédent, les cellules du mélanome devenues plus agressives vont envahir les tissus sous-jacents. Elles sont capables de passer de l'épiderme au derme et le coloniser(Elenitsas.R,et al,2016)

C'est la croissance verticale du mélanome à haut risque métastatique. La tumeur devenue plus agressive acquiert alors le pouvoir de se disséminer et ainsi de former des métastases. Pour évaluer le pronostic à ce stade du développement tumoral la détection de ganglions sentinelles est possible. (annexe 3)

Au stade de mélanome métastatique, les cellules tumorales induisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui irriguent la tumeur pour lui apporter l'oxygène et les nutriments indispensables à sa croissance. Puis par voie hématogène et/ou

lymphatique la tumeur s'implante et envahit les tissus sains environnants à distance de la tumeur initiale pour donner les métastases.

Dans un premier temps, le patient présente des métastases loco-régionales cutanées puis des métastases à distance cutanées ou viscérales. Ainsi les organes touchés par ordre de fréquence décroissant sont : les poumons, le foie, le cerveau, les os. Ces métastases viscérales ne sont pas nécessairement précédées de métastases loco régionales (Schreiber.RD, et al,2011).

Développement du mélanome est accés rapide Une fois le mélanome déclenché la dissémination métastatique se feras en très peut temps dans certain qu'cas moins d'un an.

Stade I & stade II $\Rightarrow$ stade III $\Rightarrow$ stade IV

Le stade métastatique est le dernier stade de l'oncogénèse. Le cancer métastatique est le plus agressif et le plus menaçant pour la vie de l'individu.(annexe 4)

b- Phases du développement métastatique

Les trois phases du développement de la maladie cancéreuse sont :

Pré-métastase, micrométastase, métastase.

Phase pré-métastatique

Les tumeurs primitives malignes sont exceptionnellement métastatiques d'emblée : la fonction métastatique apparait après une première phase de développement local, de durée très variable. L'émergence de métastases peut être liée à des modifications génétiques, amplification, mutation, transposition, délétions, ou à des modificationsépigénétiques.

La présentation des cellules métastatiques dans une tumeur maligne peut être mise en évidence expérimentalement ,par greffe de cellules tumorales, dans des travaux de recherche l'ablation chirurgicale des tumeurs en phase pré-métastatique permet de stoppé l'évolution de la tumeur, et donc la guérison totale ,sauf dans des cas au il sont traitait par des signaux extérieure admission de facteurs de croissance par exemple cela provoque la transformation de micrométastase et les transformé en métastase car les micrométastase reste dormantes si aucun signal extérieur ne vient induire leur prolifération .

Cette phase pré-métastatique présente une grande diversité de comportement et peut être très prolongée. (Annexe 4)

Micrométastases : elles correspondent à des foyers de cellules tumorales susceptibles d'envahir les vaisseaux qu'elles côtoient. Surtout recherchées dans la moelle osseuse et dans les ganglions.

c- Processus métastatique

Le processus métastatique associe une succession d'étapes que seul un petit nombre de clones de la tumeur primitive peuvent franchir. Dans un premier temps, la cellule métastatique se détache de la tumeur primitive (délamination) et envahit la matrice extracellulaire. Elle passe ensuite dans la circulation sanguine ou lymphatique (intravasation). Enfin, la cellule cancéreuse quitte la circulation (extravasation) et acquiert la capacité à survivre et à proliférer dans son nouvel environnement. (Annexe 5)

Ces différentes étapes sont:

- Le détachement cellulaire et l'invasion de la matrice extracellulaire
- l'intravasation : passage dans la circulation
- Survie dans la circulation
- Extravasation sortie des cellules de la circulation
- Survie et prolifération dans un site étranger.

c-1 L'échappement

Les cellules métastatiques ne forment pas de connexions avec les cellules voisines elles dégradent l'environnement péri cellulaire, franchissent les membranes basales endothéliales pour pénétrer dans la circulation sanguine et/ou lymphatique. Le MM est lymphophile donc l'échappement se fait plus dans la circulation lymphatique où elles sont passivement transportées. Les cellules métastatiques envahissent et migrent activement dans le tissu adjacent (invasion).

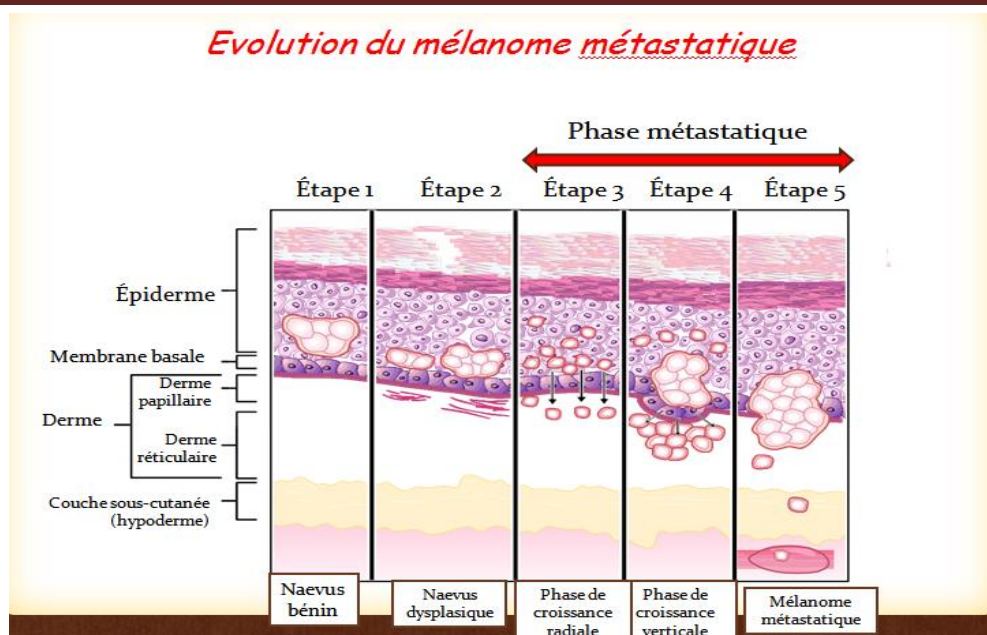


Figure 01 : Evolution du mélanome métastatique (Andrieu,B 2012)

c-2 l'étape sanguine

Les cellules tumorales entrent au contact des éléments du sang circulant ou de la lymphe qui comportent des lymphocytes T et d'autres leucocytes. La formation de microembolies facilite l'arrêt dans la circulation capillaire. Enfin, les plaquettes transportent des facteurs de croissance tels que le PDGF (platelet-derived growth factor) ou le TGF qui peuvent être utilisés par les cellules humorales pour initier leur prolifération au moment de l'implantation.

c-3 l'implantation

Les capillaires sanguins ou lymphatiques sont les lieux d'implantation habituels des métastases. Les capacités d'attachement des cellules migratrices vont permettre l'arrêt et l'adhésion cellulaire. Des phénomènes mécaniques interviennent également dans les micro-vaisseaux entraînant la destruction de très nombreuses cellules.

c-4 la prolifération

L'interaction entre les cellules tumorales et les différents éléments de l'organe receveur des métastases détermine la phase ultime de cette cascade d'événements. Le contact des cellules avec un substrat nouveau agit comme un signal et détermine l'arrêt ou l'accélération de leur prolifération, les cellules tumorales parvenues dans un site donné sont capables soit d'utiliser les facteurs de croissance circulants ou tissulaire, soit d'être

insensibles aux facteurs inhibiteurs de croissance dont le foie par exemple semble être riche, soit enfin d'être autocrine.

Cette dernière étape est particulièrement importante, tant du point de vue biologique que clinique et thérapeutique. Après le déroulement des deux premières phases du processus métastatique : échappement, migration et attachement, les cellules tumorales s'implantent dans l'organe cible où elles peuvent se maintenir sans proliférer pendant un temps variable. Ce temps peut être soit très court, déterminent l'apparition de métastase tardives apparaissant des mois, voire des années après le traitement locorégional.

I-5 Mécanismes de sélections cellulaires

La fréquence des métastases varie selon les individus et le type de prolifération les métastases des carcinomes cutanés sont exceptionnelles. A l'inverse, les mélanomes , certains carcinomes bronchiques sont fréquemment l'objet d'une dissémination métastatique. Leur délai d'apparition est également très variable.

Différents mécanismes sont discutés pour expliquer ces différences.

A. Mécanismes génétiques

Le pouvoir métastasant est un caractère secondairement acquis par mutation et/ou réarrangement chromosomique dans des cellules génétiquement instables. Pour l'instant on connaît encore peu de gènes intervenant dans l'acquisition d'un phénotype métastasant.

B. Gène suppresseur des métastases :

- nm23: Le taux de RNAm pour le gène nm23 est réduit d'un facteur 10 dans les lignées de mélanome induisant des métastases dans une étude chez la souris par rapport aux mêmes lignées qui n'entraînent pas de métastases.

C. Mécanismes immunologiques

Les défenses cellulaires anti tumorales sont assurées essentiellement par:

- Les lymphocytes T cytotoxiques :
- Les lymphocytes "Natural Killer" (NK) responsables d'une cytotoxicité directe non restreinte par le CMH.
- Diminution de l'expression des molécules HLA de classe I: la perte d'expression sélective d'un allèle HLA de classe I va entraîner une résistance à la lyse par les LT CD8 cytotoxiques.

- Sécrétion de cytokines immunosuppressives par la tumeur elle-même:
- Absence de molécules de co-stimulation: Dans la réponse immune,
- Absence d'expression des molécules HLA de classe II : Défaut de stimulation des LT CD4

D. La transition épithélio-mésenchymateuse

Mais alors, comment les cellules tumorales acquièrent-elles si tôt cette capacité à disséminer ? Une explication possible est que le phénotype motile ne serait pas acquis *de novo*, mais résulterait de la réactivation d'un programme génétique utilisé lors de l'embryogenèse, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM).

Il suffirait donc, théoriquement, à une cellule cancéreuse d'activer ce(s) facteur(s) de transcription pour acquérir un phénotype mésenchymateux compatible avec un processus de dissémination.

Le MM se développe à distance de la tumeur primitive. On parle alors de métastases.

Les organes les plus souvent touchés sont :

- 1) la peau 24-57%
- 2) les ganglions 50%-60%
- 3) le poumon 18-36%
- 4) le foie 14-20%
- 5) le cerveau. 12-20%
- 6) l'os 11-17%

Le mélanome au stade métastasant va envahir de nombreux sites : cérébrale, osseux, car il est très agressif et peut envahir n'importe quel site. (annexe 4)

E. chimiotactisme :

Le chimiotropisme appelé également *profond tropisme* se caractérise par une simple orientation non accompagnée de mouvements, c'est-à-dire de déplacement dans l'une ou l'autre direction des cellules saines à la cancéreuse.

Dans le cas de cellules cancéreuses, le chimiotactisme facilite et favorise la dissémination et l'invasion métastatique de nouveau site métastatique.

Il s'agit de mouvement ou *sain* de la cellule, le cytoplasme est attiré (on parle de chimiotactisme positif) ou repoussé (on parle de chimiotactisme négatif) par certaines substances chimiques, et particulièrement les toxines des microbes.

Pour résumer, la chimiotaxie est la tendance des cellules, et plus particulièrement des leucocytes ou des organismes mobiles, à se déplacer dans une direction

déterminée sous l'influence de divers stimuli. Ces stimuli sont émis par des substances chimiques. (Annexe 6)(ILIE .M, 2012)

I-6 Les principales Voies de signalisation impliquée dans le mélanome métastatique

Au moins 3 voies de transduction du signal sont impliquées dans la mélanogenèse : la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), celle de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et celle de l'AMPc (AMP cyclique).

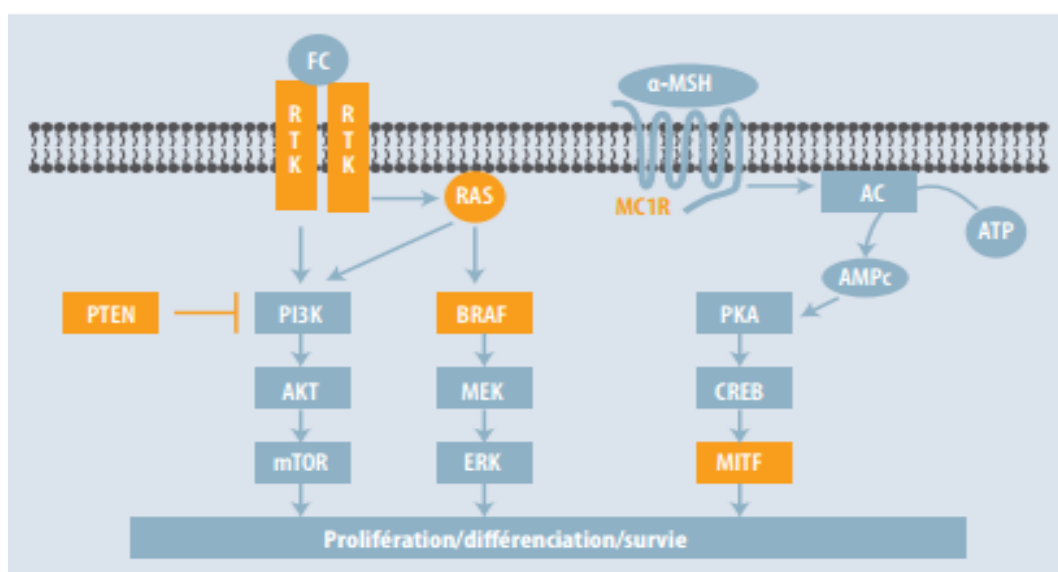


Figure 02 : les trois voies de signalisations majeures impliquées dans le développement des mélanomes. La voie PI3K (gauche) et la voie de l'AMPc (droite). Les protéines indiquées en orange sont codées par des gènes fréquemment mutés ou impliqués dans les mélanomes cutanés (Dumaz.N, ET al 2011).

I-6-1 La voie des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) : favorise la prolifération

La voie MAPK La voie MAPK est activée en aval de la plupart des récepteurs des facteurs de croissance (FC). C'est une cascade essentielle de signaux de transduction qui contrôle la survie, la croissance et la différenciation cellulaire, mais aussi la transformation tumorale.

La voie des MAPK est activée à la surface de la membrane cellulaire soit par la fixation d'un ligand à un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK) soit par adhésion des intégrines à la matrice extra-cellulaire (MEC). Cette liaison entraîne l'activité de

la GTP-ase RAS qui active ses effecteurs dont les plus connus sont RAF et la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K).

La famille RAF est une famille de sérine-thréonine kinase comportant trois protéines : A-RAF, B-RAF et C-RAF, transcrites à partir d'un seul gène. RAF activée phosphoryle et active la MAPK/ERK kinase (MEK $\frac{1}{2}$) qui conduit à la phosphorylation et à l'activation de l'*extra-cellulaire signal-regulated kinase* (ERK $\frac{1}{2}$). ERK transmet des signaux de prolifération et de survie par phosphorylation de différents substrats cytoplasmique et nucléaires. (Annexe 7)

I-6-2 La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) : favorise la progression du mélanome métastatique

La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique p100. L'activation de PI3K par un RTK entraîne la phosphorylation de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3, 4,5-trisphosphate (PIP3). PIP3 peut alors activer AKT. AKT favorise la prolifération, la survie et l'invasion cellulaire. L'un des régulateurs de cette voie est la phosphatase *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) qui régule négativement la voie de PI3K en déphosphorylant PIP3.

Comme pour la voie des MAPK, NRAS peut activer la voie PI3K et de la même façon, favoriser la prolifération, l'apoptose, le réarrangement du cytosquelette et la chimiorésistance des cellules tumorales (Delphine.S,2012). (Annexe 8)

II-3 La voie de l'AMPc et MITF

La voie de l'AMPc est stimulée par des hormones mélanotropes produites par les kératinocytes comme l' α -MSH (alpha-Melanocyte Stimulating Hormone), qui se lie au récepteur MC1R (Melanocortin 1 Receptor) et stimule la production d'AMPc. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein), qui à son tour, stimule l'expression de la protéine MITF. La protéine MITF est un facteur de transcription situé au centre de multiples voies de signalisation contrôlant la différenciation, la morphologie, la prolifération et la survie des différentes cellules de la lignée mélanocytaire : les mélanoblastes, les mélanocytes et les mélanomes. Il a récemment été montré que le gène MITF était amplifié dans environ 20 % des

mélanomes, mais pas dans les nævus. L'amplification de MITF est corrélée à une diminution de la survie globale des patients. L'expression ectopique de MITF coopère avec la protéine mutante BRAFV600E pour transformer des mélanocytes humains, démontrant que MITF peut agir comme un oncogène dans le mélanome.

L'inhibition de l'expression de MITF induit l'apoptose des lignées de mélanomes dans lesquelles le gène MITF est amplifié, mais aussi des lignées dans lesquelles il ne l'est pas. La protéine MITF est donc une cible potentielle dans le mélanome, mais moduler son activité in vivo semble encore difficile. (Annexe 9)

I-7 Les gènes impliqués dans le mélanome métastatique

I-7-1 C-kit

Les diverses formes d'aberrations de KIT se produisent dans le mélanome y compris des mutations et des amplifications. Les mutations sont plus répandues que les duplications, se produisant dans approximativement 10% de mélanomes acral et muqueux. (Annexe 10)

L'activation du récepteur KIT provoque la signalisation en aval qui conduit à la prolifération cellulaire et la survie.

A- Mutation du C-kit

Lorsque le gène c-kit est muté, le récepteur KIT n'est pas monté à la perfection. Des mutations dans c-kit se traduisent par une modification de la forme et de la fonction du récepteur KIT. Des mutations dans le gène c-kit provoquent le récepteur KIT à être activée en permanence ! Ceci est un concept très important. Cela signifie que même sans le signal normal de diviser (facteur de cellules souches), les récepteurs sont en offrant un stimulus constant pour les cellules tumorales de se diviser survivre.

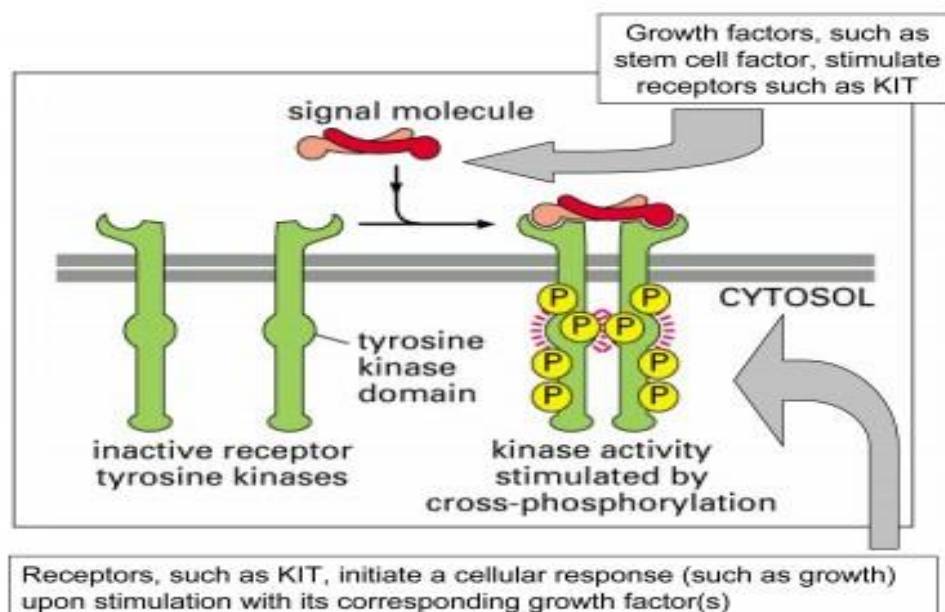


Figure 03 : La voie de signalisation du C-kit (Andrieu,B 2012)

I-7-2 Le gène BRAF

La protéine B-Raf est une protéine kinase de 766 aa 84,4 KDa, de la famille Raf qui régule les protéines MAPK et ERK et joue un rôle dans les processus de division et de différenciation cellulaire. Elle est notamment située en aval des voies de signalisation du récepteur à l'EGF et des protéines Ras. (annexe 11)

Une forte association entre des mutations du gène *BRAF* et le mélanome a été rapportée en 2002 par Davies et ses collaborateurs (Annexe 11). Il existe chez l'homme 3 gènes *RAF* (*A-RAF*, *BRAF* et *C-RAF*) et 3 gènes *RAS* (*H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS*). Le gène *BRAF* code pour une sérine/thréonine kinase intervenant dans la voie de signalisation des MAP (*mitogen-activated protein-kinases*). L'activation de cette voie conduit à des événements cytoplasmiques et transcriptionnels communs au développement de multiples cancers. Les gènes *N-RAS* et *BRAF*, impliqués dans la voie de signalisation des MAP-kinases, sont fréquemment mutés aux cours des stades locaux et métastatiques du mélanome. Les mutations du gène *BRAF* semblent constituer un élément précoce dans l'évolution du mélanome, la progression métastatique de la maladie et la prolifération vasculaire associée au développement tumoral (Annexe 12)

A- Mutations BRAF

Dans 90% des cas, la base thymine est substituée par une adénine au nucléotide 1799. Cette substitution conduit à la formation d'une protéine dont la valine est remplacée par un glutamate au codon 600. Cette mutation est appelée V600E.

(EL HAOUARI .A 2012)

Les 10% restant expliquent un choix variable des mutations faux-sens et tous résident dans les glycines de la G-boucle dans l'exon 11 ou dans le segment d'activation dans l'exon 15 près du V600. La mutation V600E confère activité transformant aux cellules parce qu'elle imite la phosphorylation de T599 et/ou S602 dans le segment d'activation et ainsi BRAF repose constitutivement l'active d'une façon d'indépendant de RAS. Les mutations dedans ou les NRAS ne sont pas pour la mutation V600E de BRAF. (Domingo. E, et al 2004) (annexe 13)

I-8 Thérapie ciblée

L'expression « thérapie ciblée » désigne les thérapeutiques dirigées contre des cibles moléculaires identifiées comme nécessaires à la transformation néoplasique de la cellule et à sa survie. En ce sens, elle découle de la meilleure connaissance des mécanismes fondamentaux des processus d'oncogenèse permettant d'identifier les altérations clés inhérentes au phénotype tumoral. La classification moléculaire a permis de développer des médicaments capables de bloquer plus ou moins spécifiquement, la fonction de ces protéines activatrices. (Annexe 14)

I-8-1 Prise en charge thérapeutique

La stratégie thérapeutique est définie en lien avec le médecin traitant, et en accord avec le patient, sur la base de l'avis rendu en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) (annexe 15). Cet avis est présenté au patient au cours d'une consultation d'annonce et fait l'objet d'un accord. L'ensemble de ces éléments est consigné dans le programme personnalisé de soins (PPS) remis au patient et adressé au médecin traitant.

I-8-2 Mutation B-raf et la thérapie ciblée

- **vémurafénib** (Zelboraf, Plexxikon) cible spécifiquement cette kinase et inhibe sa fonction enzymatique avec d'autant plus d'efficacité qu'elle contient la mutation V600E. Ce médicament induit une régression tumorale précoce et importante.. Elle repose sur l'activation non spécifique du système immunitaire par un anticorps monoclonal,
- **L'ipilimumab**, qui bloque le récepteur CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4). Cette molécule agit en tant que frein physiologique de la réponse immunitaire en interrompant le signal de co-stimulation positive lors de la présentation des antigènes aux lymphocytes. mélanome métastatique par rapport au traitement standard par la **dacarbazine** (Piérard-franchimant.C,2011). (annexe 16)

Nous disposons donc aujourd'hui de deux nouveaux traitements ayant montré un allongement de la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique : l'ipilimumab que l'on peut utiliser chez tous les patients indépendamment de la mutation du statut mutationnel de BRAF avec des réponses souvent prolongées mais uniquement chez 15 à 20 % des patients, et une thérapie ciblée anti-BRAF que l'on ne peut proposer que chez les patients dont le mélanome est porteur d'une mutation de ce gène mais qui entraîne des réponses thérapeutiques majeures, précoces et qui surviennent chez plus de la moitié des patients traités (Rober.C,2011).

Actuellement, les agents biologiques adjuvants tels que l'interféron - α (IFN- α) ont externalisé des thérapies à distance tels que la radiothérapie et immuno- modulateur des agents dans le traitement du mélanome à un stade avancé.

Cette utilisation transition du traitement adjuvant a procuré des avantages de survie significatifs pour les patients de mélanome. Cependant, les toxicités liées et le coût de la thérapie empêchent leur utilisation dans de nombreux pays. L'utilisation d'agents chimio-thérapeutiques a donné des avantages optimaux dans le mélanome métastatique. Inhibition ciblée de la MAP / ERK cascade a acquis une grande popularité dans le domaine. Malgré la performance bénéfique des agents chimio-thérapeutiques contre le mélanome, leurs limites ont eu un impact d'un grand groupe de la population. L'utilisation d'inhibiteurs de BRAF est associé à un profil d'effets secondaires diverses, le plus souvent des nausées, fatigue, éruptions cutanées, arthralgie et alopecie. Il a également été signalé pour provoquer une réaction de

photosensibilité qui peut être évitée par des mesures de protection suivantes à l'exposition au soleil. (Annexe 17)

Une autre toxicité majeure qui est une préoccupation cruciale avec l'administration de médicaments comme vemurafenib est le développement de keratocanthomas et / ou un carcinome épidermoïde. Les auteurs ont rapporté une incidence de cancers cutanés 18-20 % qui ont été traités par résection chirurgicale simple. Un autre obstacle à l'utilisation de vemurafenib est sa résistance secondaire acquise, qui a été bien établie dans divers essais cliniques. Il y a eu plusieurs mécanismes proposés de résistance aux inhibiteurs de BRAF.

Le concept général d'un " Gatekeeper " mutation qui empêche la liaison du médicament à l'oncogène ciblé ne confère pas de résistance à BRAF agents ciblés. Bien que cette question reste sans réponse, diverses études ont révélé des mécanismes distincts qui jouent un rôle critique dans la progression tumorale.

Après des années de recherche continue, Bien que le traitement adjuvant avec l'IFN- α a fourni bénéfice de survie dans les cas à risque élevé, son profil d'effets secondaires indésirables est très préoccupante. Agents chimiothérapeutiques BRAF ciblés ont relégué au second plan la gestion des mélanomes cutanés; Cependant, ceux-ci offrent un avantage palliatif aux patients dans la maladie avancée. La résistance à ces agents perturbe les stratégies de gestion. Parce que le rôle de BRAF n'a pas été définitivement corrélé avec la progression de la maladie, il est devenu essentiel de clarifier les mécanismes qui sont responsables de la progression, la rechute et de récurrence. La sécheresse de preuves substantielles pour le rôle pronostique de BRAF dans le mélanome métastatique ouvre des zones d'essais cliniques sur les marqueurs pronostiques les plus récents. (Delphine.S,2012). (Annexe 14, 15)

En outre, il a été suggéré que les essais utilisant des thérapies combinatoires tels que les inhibiteurs de BRAF combinés avec des agents biologiques tels que l'IL-2, les agents anti-angiogéniques tels que **le bévacizumab**, et l'immunothérapie, pourrait se révéler bénéfique pour stopper la progression du mélanome métastatique.

I-8-3 C-KIT et la thérapie ciblée :

Le traitement se fait par des inhibiteurs de KIT comme l'**imatinib** et le **sunitinib** qui ont été montré comme étant bénéfique (Megan.L .2013). (annexe 18)

II -1 Matériel

II-1-1 Population d'étude

Notre travail a été réalisé durant notre stage effectué au Service d'Anatomie Pathologique du CHU Mustapha sur une période de 06 mois allant de Janvier à juin 2016. Ce travail consiste en une étude rétrospective et prospective s'étendant sur 7 années (2010 – 2016), sur une série de patients Algériens venus de différentes régions du pays. nous avons procédé à une réévaluation à partir des blocs de paraffine des prélèvements biopsiques, de biopsies exérèses, plus rarement de pièces chirurgicales de patients atteints de MM. Ces prélèvements sont fixés au formol avant d'être inclus en paraffine (FFPE)

Au total 27 cas sélectionnés (en fonction des formes anatomo-cliniques, de l'état du bloc de paraffine et de la quantité du tissu tumoral nécessaire pour les techniques ultérieures) ont été retenus, et subdivisés ainsi en groupes relativement homogènes en nombre :

- 12 patients présentant un Mélanome Métastatique ganglionnaire
- 06 patients présentant un Mélanome Métastatique cutané
- 03 patients présentant un Mélanome Métastatique hépatique
- 02 patients présentant un Mélanome Métastatique cérébrales
- 01 patient présentant un Mélanome Métastatique glandulaire
- 01 patient présentant un Mélanome Métastatique amygdalien
- 01 patient présentant un Mélanome Métastatique osseux
- 01 patient présentant un Mélanome Métastatique parotidien

Seuls sur 15 patients ont bénéficié d'une recherche de la mutation BRAF, sur leurs prélèvements, par la technique de PCR en temps réel selon la disponibilité du produit.

Les données cliniques (L'âge, le sexe, la localisation) des patients ont été recueillis à partir des fiches de renseignements cliniques.

II-1-2 Matériel non biologique

Appareillage	Matériel et verreries	Réactif	réactifs d'immunohistochimie
– Bain-marie – Microtome – Agitateur (AGIMATIC-S) – Etuve – Appareille d'inclusion	– Lame d'étalement – Lames silanisées – Panier de lames – Micropipettes	– Formol a 10% – Ethanol a 80% , 90% , 100 % – Eau d'distillée et Eau de robinet – Paraffine – Hématoxyline – Eosine – Nitrate d'argent – Rouge nucléaire – Xylène	– Solution de PH (9 ,6) – Eau oxygénée – Solution d'anticorps I aire (spécifique) : –AC anti CD117, – Solution PBS (phosphate buffered saline): chlorure de sodium, du phosphate disodique, du phosphate monopotassique et un peu de chlorure de potassium. – Solution d'anti corps C secondaire – Solution DAB chromogène – Hémalin – Ammoniaque

Tableau 01 : matériels non biologique

II- 2-1 Étude anatomopathologique

- Méthode :
 - **Phase pré-analytique**

Étapes indispensables qui conditionnent la fiabilité de toutes les techniques ultérieures (annexe 19).

- Prélèvement
- Fixation cruciale (dilution, quantité, durée ...)
- Etude macroscopique
- Déshydratation
- inclusion/ imprégnation

A. Prélèvement

Biopsie, pièces opératoires ou exérèse.

B. La fixation

Consiste à immerger le tissu dès qu'il est prélevé dans une solution de formol à 10% 10 fois plus important que le volume de tissu à fixer :

- 4 à 6 h pour les biopsies
- 24 à 48 h pour les pièces opératoires

Le but de la fixation est d'immobiliser les structures tissulaires et les composants dans un état semblable à l'état vivant.

En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une autodigestion du tissu. De plus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus.

C. Macroscopie

- Les échantillons font l'objet d'une description macroscopique minutieuse, des prélèvements bien orientés sont réalisés.
- Les tissus doivent être découpés proprement sans les écraser pour maintenir l'architecture tissulaire

D. La déshydratation

- Étape préalable à l'inclusion
- permet de chasser l'eau des tissus et de préparer ainsi le remplacement par des produit hydrophobes
- se fait par passages successifs dans des bains d'alcool à concentration croissante (10 heures)
- la clarification consiste en l'immersion dans un bain de toluène, solvant de l'alcool absolu et de la paraffine (3 heures)

E. Imprégnation / inclusion ou enrobage

- Permet d'obtenir des pièces rigides autorisant une coupe fine de 3 à 5 μm pour la microscopie optique
- le produit d'inclusion (la paraffine) va remplacer l'eau des tissus imprégner ex: la paraffine liquide à 56 °C imprègne les tissus.

L'étape finale après l'inclusion consiste en l'enrobage du tissu par de la paraffine grâce à la console thermo-réfrigérante et nous permet de réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine

F. Coupes

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames

G. Etalement du tissu sur les lames

Les coupes réalisées sont étalées et fixées sur des lames de verre porte objet. Il faut éviter toute cassure, tout pli. (Annexe 20)

- **Phase analytique**

Coloration histochimique à l'Hématoxyline-éosine

- Déparaffinage et réhydratation : Il faut éliminer la paraffine (hydrophobe) pour rendre les tissus perméables aux colorants (solutions aqueuses ou alcooliques)

- technique: des bains successifs de xylène puis d'alcools de degré décroissant jusqu'à l'eau courante
- Après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, le tissu est coloré. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hématéine, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine)
- le montage : Recouvrement de la préparation par une lamelle protectrice en utilisant une «colle» le baume ou résine de montage pour une conservation longue on utilise le baume du Canada ou l'Eukitt. (annexe 19)

II-2-2 Étude immuno-histochimique de marquage de C-KIT (CD117)

L'immunohistochimie consiste à mettre en évidence divers antigènes (Ag) cellulaires, ou extracellulaires, grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux, sur des coupes de tissus fixés, et inclus en paraffine. Les Ag recherchés peuvent être des Ag membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires, ou des protéines de la matrice extracellulaire.

- **Matériel et réactifs nécessaires**

Les réactifs et le matériel suivants peuvent être requis pour la coloration mais ne sont pas fournis avec l'anticorps primaire: (annexe 31)

1. Tissu de contrôle positif et négatif
2. Lames de microscope, chargées positivement
3. Étuve capable de maintenir une température de 58 à 60° C $\pm$ 5° C
4. Cuves ou bains de coloration
5. Minuteur
6. Xylène ou substitut du xylène
7. Éthanol ou alcool
8. Eau déionisée ou distillée ;
9. Autocuiseur électrique pour l'étape de prétraitement des tissus ;
10. ImPath DAB Detection Kit (cat. no: 44995);
11. ImPath DAB Super Sensitive Detection Kit (cat. no: 44994);
12. ImPath AP-Red Detection Kit (cat. no.: 44993);
13. ImPath AP-Red Super Sensitive Detection Kit (cat. no: 44992);
14. Solutions de lavage 15. Hématoxyline ou un autre contre-colorant ;
16. Diluants pour anticorps ;

- 17. Réactif de contrôle négatif ;
- 18. Milieu de montage ;
- 19. Lamelles de montage ;
- 20. Microscope optique (40 à 400x) ;

- **Protocole :**

- a. Incubation 1 : les lames sont incubées à 55°C pendant 12 heures dans une étuve.

- b. Déparaﬃnage : 4 bains de xylène 5 min pour chacune

- c. Réhydratation : 4 bains d'Alcool 5 min pour chacune

- Eau plusieurs bains quelques minutes

- d. Démasquage des sites antigéniques (pré traitement) : Placer les lames dans des étuis* qui contient une solution de PH préalablement préparée (PH 6.PH9).

- e. Incubation 2 :

- mettre les lames enrobées dans la solution de PH dans un bain marie à 95°C pendant 40 minutes.

- plonger les lames dans l'eau distillée pendant 5 minutes

- Arranger les lames dans un plateau humidifié, et contourner le tissu à l'aide d'un dako pen.

- Ajouter quelque gouttes d'eau oxygénée à la zone sélectionnée ; son rôle consiste à empêcher l'éclatement des cellules, et laisser agir 5 minute.

- f. Introduction d'AC I :

- Ajouter 100 µl de solution contenant l'AC (CD 117) couvrir le plateau et laisser agir pendant une nuit.

- passage des lames dans 3 bacs contenant du PBS, et laisser 5minutes dans les deux derniers bacs.

- g. Introduction d'AC II :

- Ajouter l'AC II (CD 117) commun pour toutes les lames et laisser agir jusqu'à 10 minutes.
- Lavage dans du PBS.

h. Révélation :

- Se fait par le chromogène-substrat DAB et rincer avec l'eau distillé

i. Contre coloration :

- Immerger les lames 2 à 3 minutes dans l'hématoxyline de Mayer
- rincer a l'eau courant (5 minutes)
- plonger les lames dans un bain d'eau ammoniacuée pour donner une coloration bleu au tissu,
- puis déshydrater et éclaircir dans l'alcool et l'eau courante.

j. Montage :

Les lamelles sont déposées sur les lames à l'aide d'Eukitt. (Annexe 31)

II-2-3 Étude moléculaire : PCR en temps réel

3.1.1. Le test de PCR en temps réel (cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test) :

A. Matériel (Annexe 21/ 31)

- Réactifs :

- 1) Cobas® DNA Sample Preparation Kit (annex
- 2) Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test
- 3) Autre Réactifs nécessaire



Figure 04: Réactifs de la PCR

- Appareillage Matériels et instruments : (annexe 22)

METHODES

1 PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

- Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 se base sur deux grands procédés
- préparation manuelle des échantillons pour obtenir de l'ADN génomique à partir de tissu FFPE (fixés à la formaline, enrobés de paraffine)
 - amplification par PCR de l'ADN cible à l'aide d'une paire d'amorces complémentaires et de deux sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores différents.
- Une sonde est conçue afin de détecter la séquence BRAF V600 de type sauvage et l'autre est conçue afin de détecter la séquence de mutation V600E.
 - Deux témoins externes de cycle d'analyse sont fournis et l'allèle de type sauvage sert de témoin interne complet du processus.

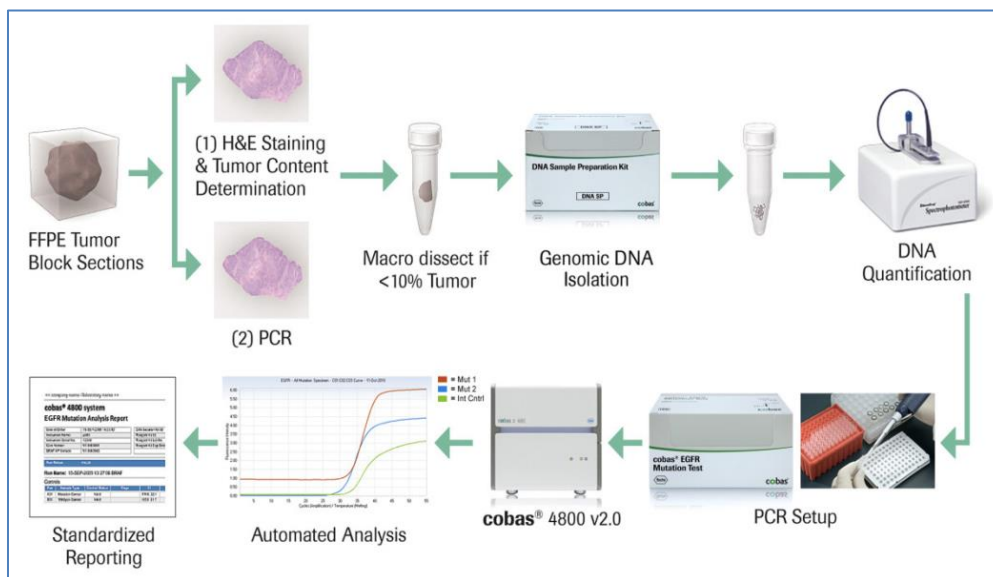


Figure 5 : Principes De La Procédure

A. Mode opératoire

I-Préparation Manuelle

A. Préparation des coupes

Les sections de 5 µm tissu tumoral (mélanome) montées sur lames blanche peuvent être conservées à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 60 jours.

Les échantillons de mélanome peuvent être transportés dans une T° comprise entre 15-30 °C.

Rq : seules des sections de tissus FFPE de mélanome de 5 µm d'épaisseur contenant un pourcentage précis de cellules tumorales peuvent être utilisées dans le test de mutation cobas® BRAF.

À L'aide d'un microscope Optique sélectionné la zone contenant au moins 10% de cellules tumorale sur lame colorée à l'HE

B. Préparation des réactifs

1. Reconstituer la Protéinase K (**PK**) en ajoutant 4,5 mL d'eau stérile (de qualité PCR) au flacon à l'aide d'une pipette sérologique jetable et stérile de 5 mL. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Aliquoter 450 µL de **PK** reconstituée dans des tubes Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL et conserver à -20 °C.

2. Préparer le Tampon de lavage I de l'ADN (**WB I**) actif en ajoutant 15 mL d'éthanol absolu au flacon de **WB I**. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon **WB I** actif à une température comprise entre 15 et 30 °C.

3. Préparer le Tampon de lavage II de l'ADN (**WB II**) actif en ajoutant 50 mL d'éthanol absolu au flacon de **WB II**. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon **WB II** actif à une température comprise entre 15 et 30 °C. (annexe 23)

C. Déparaffination des sections de tissus FFPE montées sur lames

- Ajouter une lame sur laquelle est montée une section de tissus FFPE de 5 µm dans un récipient contenant une quantité suffisante de xylène pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.

- Transférer la lame vers le récipient avec une quantité d'éthanol absolu suffisante pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.
- Retirer la lame de l'éthanol et laisser la section sécher complètement à l'air (de 5 à 10 minutes).
- Effectuer une macro-dissection si l'échantillon contient moins de 25 % de cellules tumorales.
- Étiqueter un tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL pour chaque échantillon, avec l'information d'identification de l'échantillon.
- Ajouter 180 µL de **DNA TLB** dans le tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL étiqueté.
- Ajouter 70 µL de **PK** reconstituée au tube Safe-Lock de microcentrifugeuse de 1,5 mL contenant du **DNA TLB**. (annexe 24)
- Racler le tissu pour le retirer de la lame et immerger dans le mélange **DNA TLB** et **PK**.
- Continuer à l'étape A de la procédure **Isolation de l'ADN**.

D. Isolation de l'ADN

Lyse des cellules et élimination des protéines

- Passer au vortex le tube contenant le mélange échantillon/**DNA TLB/PK** pendant 30 secondes.
- Placer le tube dans le bloc chauffant à sec à 56 °C et incuber pendant 60 minutes.
- Passer le tube au vortex pendant 10 secondes.
- Placer le tube dans le bloc chauffant à sec à 90 °C et incuber pendant 60 minutes.
- Laisser le tube refroidir à une température comprise entre 15 et 30 °C. Après refroidissement, centrifuger par à-coups pour recueillir tout éventuel liquide en excès provenant du bouchon. (annexe 25)

Précipitation de l'ADN

- Ajouter 200 µL de **DNA PBB** et mélanger en pipettant et en rejetant 3 fois.
- Incuber le tube à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 10 minutes.
- Ajouter 100 µL d'isopropanol à chaque tube et mélanger le lysat en pipettant et en rejetant 3 fois.
- Transférer tout le lysat dans l'unité **FT/CT** correctement étiquetée.
- Centrifuger les unités **FT/CT** à 8000 x g pendant 1 minute. (annexe 26)

▪ **Les lavages (se débarrasser des déchets cellulaires)**

- Placer chaque **FT** sur un nouveau **CT**. Jeter la fraction contenue dans l'ancien **CT** avec les déchets chimiques et mettre au rebut l'ancien **CT** de façon appropriée.
- Ajouter 500 µL de **WB I** actif au **FT**.
- Centrifuger les unités **FT/CT** à 8000 x g pendant 1 minute.
- Jeter la fraction contenue dans chaque **CT** avec les déchets chimiques. Remplacer le **FT** sur le même **CT**.
- Ajouter 500 µL de **WB II** actif au **FT**.
- Centrifuger les unités **FT/CT** à 8000 x g pendant 1 minute.
- Placer un **FT** sur un nouveau **CT**. Jeter la fraction contenue dans l'ancien **CT** avec les déchets chimiques et mettre au rebut le **CT** utilisé de façon appropriée.

Délution : (neutralisation du milieu et récupération de l'ADN pur par le principe de la chromatographie échangeuse d'ions) (annexe 27)

- Centrifuger les unités **FT/CT** entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 1 minute afin de sécher la membrane du filtre.
- Placer le tube **FT** dans un tube d'élution (tube de centrifugeuse d'1,5 ml) pré-étiqueté avec l'identification de l'échantillon. Jeter la fraction contenue dans l'ancien **CT** avec les déchets chimiques et mettre au rebut le **CT** utilisé de façon appropriée.
- Ajouter 100 µL de **DNA EB** au centre de la membrane du **FT** sans toucher la membrane du **FT**.
- Incuber le **FT** avec le tube d'élution à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 5 minutes.

- Centrifuger le **FT** avec le tube d'élution à 8000 x g pendant 1 minute pour recueillir l'éluat dans le tube d'élution (tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL pré-étiqueté). Mettre au rebut le **FT** utilisé de façon appropriée. L'éluat est constitué du stock d'ADN.
- Du prélèvement à l'ADN génomique tumorale



Figure 6 : Sélection du matériel - Nécessité du contrôle morphologique
Nature de la lésion - Estimation du % de cellules tumorales présentes
Délimitation de la zone tumorale (macrodissection)



Figure 7 : sélectionné la zone tumorale sur la lame blanche

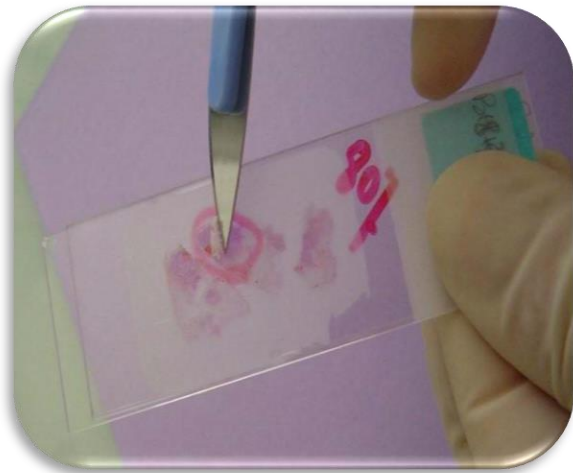


figure 8 : Microdissection

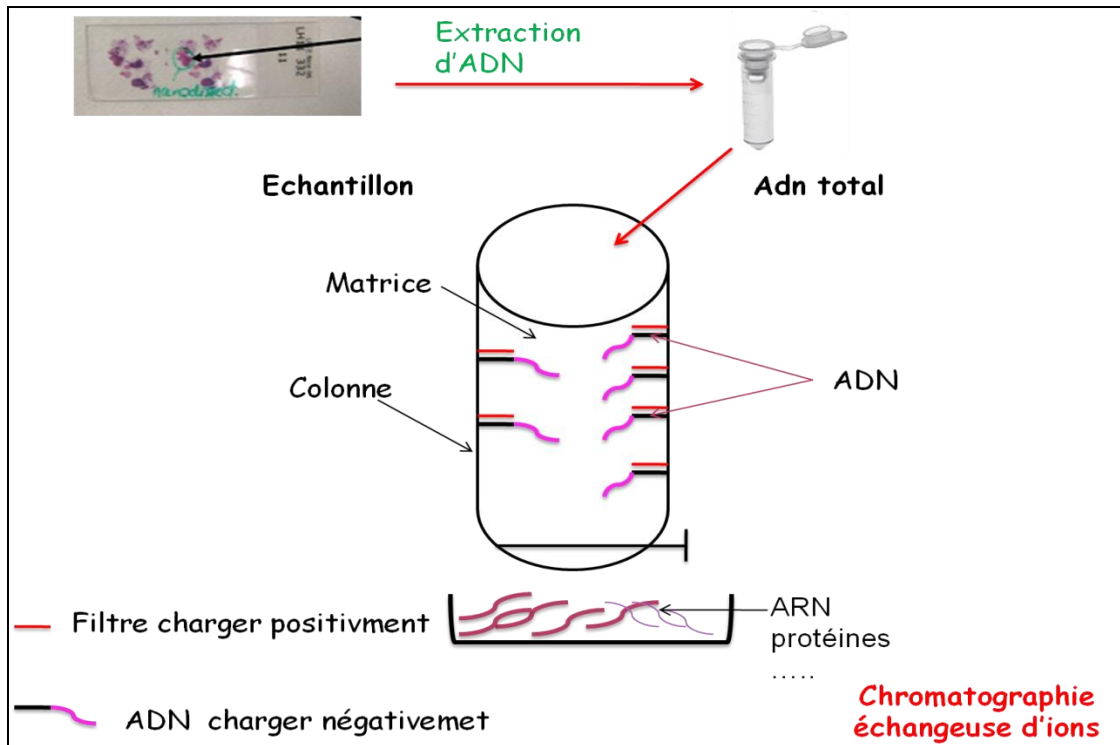


Figure 9: Principe de tube a filtre

E. Quantification de l'ADN

- Mélanger chaque stock d'ADN en le passant au vortex pendant 5 secondes avant la quantification.
- Quantifier l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis Nanodrop (ND-1000 ou ND-2000) conformément au protocole indiqué par le fabricant. Utiliser **DNA EB** comme blanc pour l'instrument. Il est en moyenne nécessaire d'effectuer 2 lectures.
- Les deux mesures ne doivent pas différer de plus de $\pm 10 \%$ l'une par rapport à l'autre lorsque les lectures de concentration d'ADN sont $\geq 20,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$. Pour des lectures de concentration d'ADN $< 20,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$, les deux mesures ne doivent pas différer de plus de $\pm 2,0 \text{ ng}/\mu\text{L}$.
- La concentration du stock d'ADN doit être $\geq 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ pour effectuer le test de mutation **cobas® 4800 BRAF V600**. Une seule amplification/détection est effectuée par échantillon, en utilisant $25 \mu\text{L}$ d'une dilution à $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ du stock d'ADN (au total 125 ng).
- Préparation de l'instrument

F. Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon**• Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon à des concentrations comprises entre 5 ng/μL et 35 ng/μL**

- Pour chaque échantillon, déterminer la quantité de stock d'ADN nécessaire à l'aide de la formule suivante :
 - Volume de stock d'ADN nécessaire = $(35 \mu\text{L} \times 5 \text{ ng}/\mu\text{L}) / \text{concentration du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}$
- Pour chaque échantillon, déterminer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (**DNA SD**) nécessaire à l'aide de la formule suivante :
- Volume de DNA SD nécessaire en μL = $(35 \mu\text{L} - \text{Volume de stock d'ADN nécessaire en } \mu\text{L})$

• Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon à des concentrations > 35 ng/μL

- Si la concentration du stock d'ADN est > 35 ng/μL, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (**DNA SD**) nécessaire pour préparer au moins 35 μL de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μL de stock d'ADN.
- Vol. de DNA SD nécessaire en μL = $((5 \mu\text{L de stock d'ADN} \times \text{conc. du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}) / (5 \text{ ng}/\mu\text{L})) - 5 \mu\text{L}$
Utiliser le volume calculé de **DNA SD** pour diluer 5 μL de stock d'ADN.

g. Dilution de l'échantillon

- Préparer le nombre approprié de tubes Safe-Lock de microcentrifugation de 1,5 mL pour les dilutions des stocks d'ADN en les étiquetant avec l'identification d'échantillon appropriée dans la zone d'ajout des échantillons.
- À l'aide d'un pipetteur doté d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols, pipeter le volume calculé de diluant d'échantillon d'ADN (**DNA SD**) dans chaque tube d'échantillon étiqueté.
- Passer au vortex chaque échantillon de stock d'ADN pendant 10 secondes.
- À l'aide d'un pipetteur doté d'embouts avec filtre de protection contre les aérosols, pipeter délicatement le volume calculé de chaque stock d'ADN

d'échantillon dans le tube étiqueté de façon appropriée contenant le **DNA SD**. Utiliser un embout de pipette neuf pour chaque échantillon.

- Fermer et mélanger chaque stock d'ADN d'échantillon en le passant au vortex pendant 10 secondes. (annexe 27)

h. Préparation du mélange réactionnel (MMX) actif

Utilisé Le tableau 4 pour déterminer le volume de chaque réactif nécessaire pour la préparation du MMX actif en fonction du nombre d'échantillons inclus dans le cycle d'analyse. (Annexe 28)

Disposition de la plaque d'échantillons											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	BRAF MUT	Échant. 7	Échant. 15	Échant. 23							
B	BRAF WT	Échant. 8	Échant. 16	Échant. 24							
C	Échant. 1	Échant. 9	Échant. 17								
D	Échant. 2	Échant. 10	Échant. 18								
E	Échant. 3	Échant. 11	Échant. 19								
F	Échant. 4	Échant. 12	Échant. 20								
G	Échant. 5	Échant. 13	Échant. 21								
H	Échant. 6	Échant. 14	Échant. 22								

Figure 10 : disposition de la plaque d'échantillon

i. Amplification PCR et détection

1. Sélection des cibles

- Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 est conçu pour détecter le changement de **nucléotide 1799 T>A** dans le gène BRAF qui entraîne une substitution valine à **acide glutamique** au codon 600 (V600E).
- Les sondes TaqMan marquées par fluorophore, spécifiques aux cibles BRAF de type sauvage et V600E se lient Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 est conçu pour détecter le changement de **nucléotide 1799 T>A** dans le gène BRAF qui entraîne une substitution valine à **acide glutamique** au codon 600 (V600E).
- aux séquences sauvages et V600E respectivement.
- La séquence sauvage et la séquence V600E sont détectées par des canaux optiques dédiés à chaque séquence.

2. Amplification des cibles

- L'ADN polymérase *Thermus species* Z05 est utilisé pour l'amplification de la cible.
- Le mélange réactionnel de PCR est d'abord chauffé afin de dénaturer l'ADN génomique et d'exposer les séquences cibles aux amorces.
- À mesure que le mélange refroidit, les amorces en amont et en aval s'hybrident avec les séquences d'ADN cible.
- Le premier cycle de PCR est alors achevé, produisant une copie d'ADN bicaténaire de la région cible de 116 paires de bases du gène BRAF
- L'ADN polymérase Z05, en présence d'ion métallique divalent et de dNTP en excès, allonge chaque amorce hybridée, synthétisant ainsi un deuxième brin d'ADN.
- Le premier cycle de PCR est alors achevé, produisant une copie d'ADN bicaténaire de la région cible de 116 paires de bases du gène BRAF.
- Ce processus est répété pendant un certain nombre de cycles, chaque cycle doublant effectivement la quantité d'ADN d'amplicon.
- L'amplification se produit uniquement dans la région du gène BRAF entre la paire d'amorces appropriée

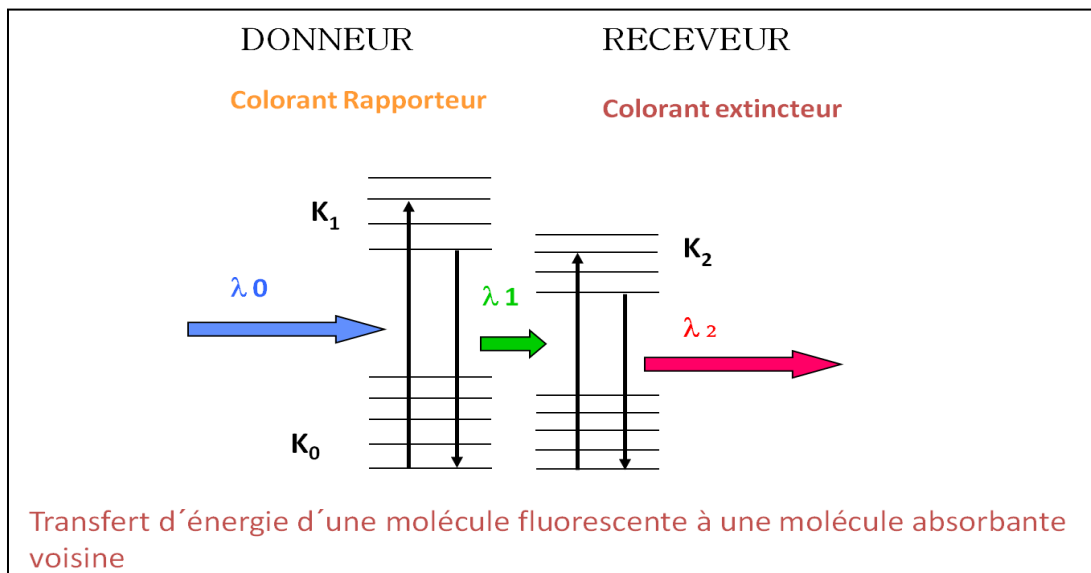


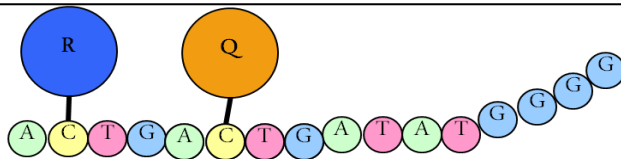
Figure 11 : Principe de fonctionnement des sondes fluorescentes

Le Transfert d'Énergie Fluorescente est une technique qui permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes. La première, (dite le "donneur"), est excitée par une longueur d'onde λ_1 (dans l'UV, par exemple).

Le donneur va libérer des photons de longueur d'onde λ_2 (dans le bleu, par exemple), qu'on peut détecter. Il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation à la seconde molécule fluorescente (le "receveur") qui libérera aussi des photons, mais à une longueur d'onde qui lui est propre, λ_3 (dans le jaune, par exemple).

Puisqu'il y a transfert d'énergie entre le donneur et le receveur (et que rien ne se perd, rien ne se crée), plus le transfert d'énergie est efficace et plus le receveur émet de photons par rapport au donneur.

Certains accepteurs ne fluorescent pas, mais en absorbant l'énergie du donneur ils causent une baisse de sa fluorescence qui peut être quantifiée. (Un tel accepteur non-fluorescent, dit "*quencher*" (ou "éteignoir"), est utilisé dans le système TaqMan de PCR quantitatif).



Sondes oligonucléotidiques à marquage fluorescent doubles
(SondesTaqMan)

La distance entre R (Donneur) et Q (receveur) est tenue minimale pour garantir une absorption efficace

A

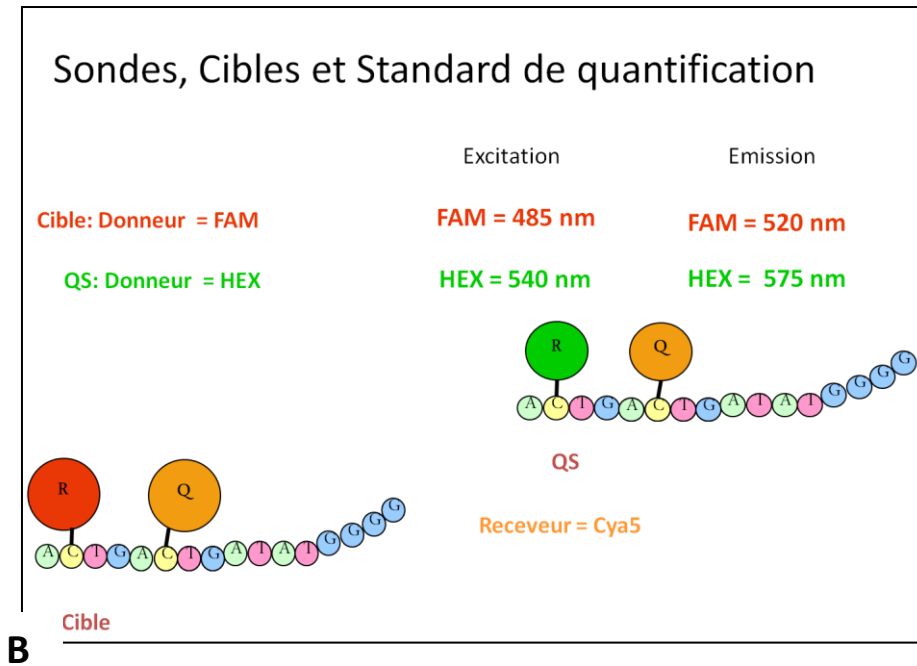


Figure 12 A et B : Sondes à marquage fluorescent

Le transfert d'énergie du donneur au receveur, souligné par la détection de l'émission de lumière λ_3 , indique que le donneur et le receveur ont été très proches l'un de l'autre car l'efficacité du FRET est proportionnelle à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux molécules.

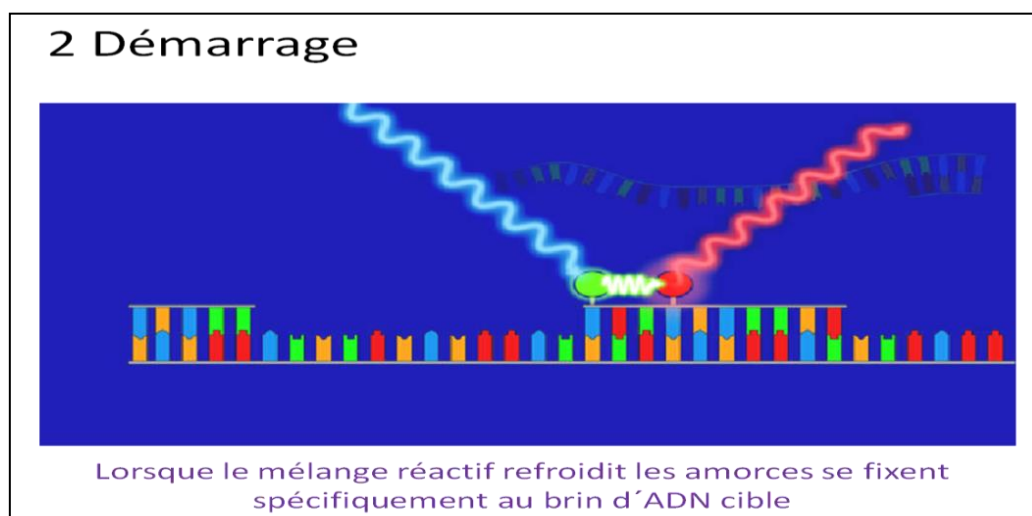
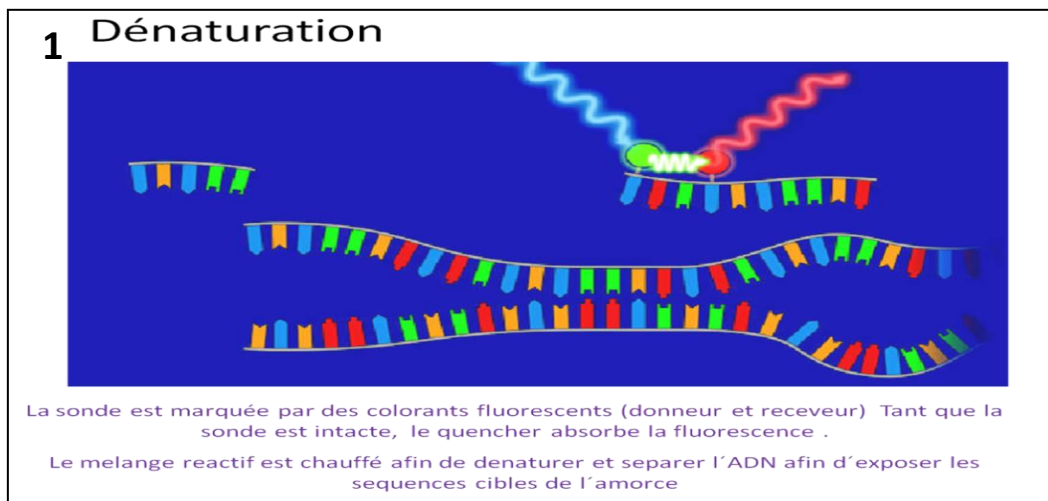
Les deux molécules doivent être séparées par 10-100 Angstroms; le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur; et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être à peu près parallèles.

La distance à laquelle le transfert est efficace à 50% est appelé distance de Förster et varie selon les agents fluorescents utilisés.

3. Détection automatisée en temps réel

- Le test de mutation cobas® 4800 BRAF V600 utilise la technologie d'amplification par PCR en temps réel.
- Dans la réaction, chaque sonde oligonucléotidique spécifique à la cible est marquée par un fluorophore servant de rapporteur et par une molécule quencher qui absorbe les émissions fluorescentes du fluorophore rapporteur quand la sonde est intacte.

- Au cours de chaque cycle d'amplification, une sonde complémentaire de la séquence d'ADN monocaténaire dans l'amplicon se lie et est ensuite clivée par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase Z05.
- Une fois que le fluorophore rapporteur est séparé du quencher par cette activité nucléase, une fluorescence d'une longueur d'onde caractéristique peut être mesurée lorsque le fluorophore rapporteur est excité par un spectre de lumière approprié.
- Deux fluorophores rapporteurs sont utilisés pour marquer la sonde spécifique aux cibles BRAF de type sauvage (WT, V600) et la sonde de mutation BRAF V600E.
- L'amplification des deux séquences BRAF peut être détectée de façon indépendante dans un seul puits réactionnel en mesurant la fluorescence à deux longueurs d'onde caractéristiques. (annexe 29)



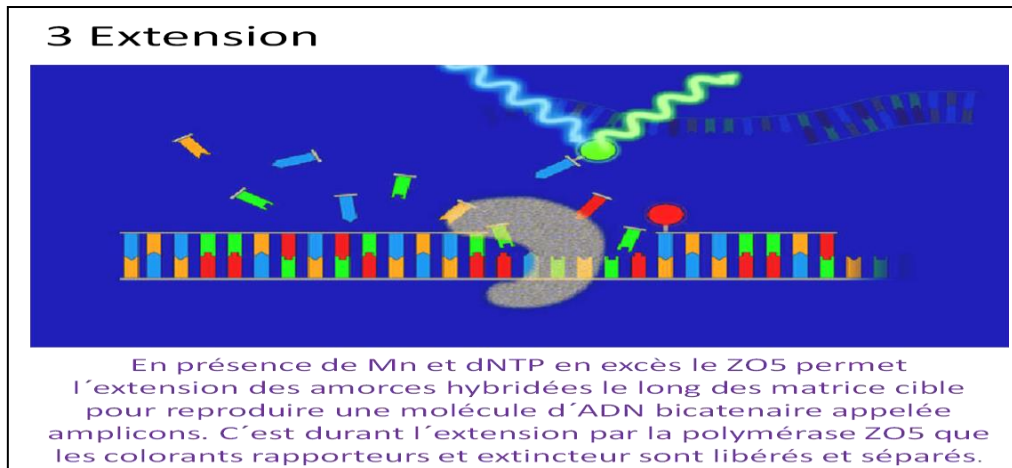


Figure 13 : (1,2 et 3) Détection automatisée en temps réel

II-2-4 Phase post -analytique et Interprétation des résultats

a. Interprétations de lames colorées à l'HE

L'analyse histologique Permet :

- De poser le diagnostic selon les critères cytologiques et architecturaux, d'apprécier les limites d'exérèses
- De préciser les facteurs pronostics du mélanome cutané tels que :

- Ulcération
- Présence de mitoses

b. Interprétation Des Résultats d'immunohistochimie

La procédure d'immunocoloration provoque la précipitation d'un produit de réaction coloré au niveau des sites antigéniques localisés par l'anticorps primaire. Consulter la notice du système de détection approprié pour connaître les réactions colorées attendues. Un pathologiste qualifié, expert en procédures immunohistochimiques, doit évaluer les tissus de contrôle positifs et négatifs avant d'interpréter les résultats.

- **Tissu De Contrôle Positif**

Le contrôle positif coloré doit être examiné en premier pour vérifier que tous les réactifs fonctionnent correctement. La présence d'un produit de réaction coloré de manière appropriée dans les cellules cibles indique une réactivité positive.

- **Tissu De Contrôle Négatif :**

Le tissu de contrôle négatif doit être examiné après le tissu de contrôle positif afin de vérifier le marquage spécifique de l'antigène cible par l'anticorps primaire. L'absence de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif confirme l'absence de réactivité croisée de l'anticorps avec les cellules ou les composants cellulaires. En cas de coloration spécifique dans le tissu de contrôle négatif, les résultats obtenus avec les échantillons de patients sont considérés comme non valides.

c. Interprétation Des Résultats de la PCR

Un résultat « Mutation Not Detected » n'exclut pas la présence d'une mutation dans le site du codon 600 du BRAF, car les résultats dépendent du pourcentage de séquences mutantes, de l'intégrité des échantillons, de l'absence d'inhibiteurs et d'une quantité suffisante d'ADN détectée. (Annexe 29/ 30)

III-1 Paramètres épidémiologiques

Nous constatons les données suivantes.

III-1-1-Répartition des cas en fonction du sexe

Dans notre série on a révélé une prédominance masculine avec 16 hommes et 11 femmes soit un sexe ratio de 1,45.

sexe	F	M	Total
Mélanome métastatique	11	16	27
Pourcentages %	41	59	

Tableau 02 : répartition des cas en fonction du sexe

Les résultats de répartition des cas en fonction du sexe sont regroupés dans la figure ci dessus.

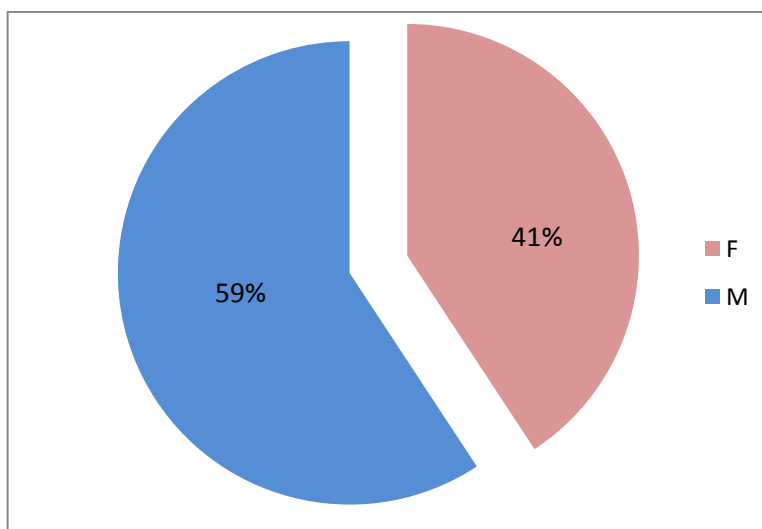


Figure 14: Répartition du M.M en fonction du sexe.

III-1-2-Répartition des cas en fonction de l'âge

Les résultats de répartition des cas en fonction d'âge sont représentés dans la figure.

tranche d'âge	[25-30]	[30-35]	[35-40]	[40-45]	[45-50]	[50-55]	[55-60]	[60-65]	[65-70]	[70-75]	[75-80]	[80-85]	[85-90]
nombre	2	3	0	6	2	4	4	2	1	0	2	0	1

Tableau 03 : Répartition des cas en fonction de l'âge.

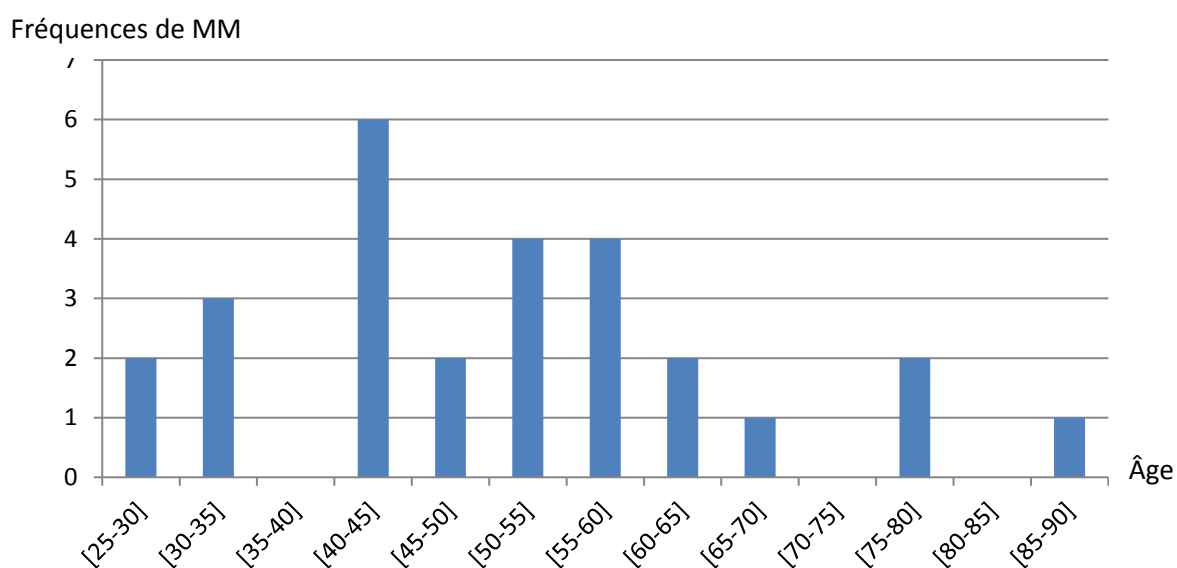


Figure 15 : Répartition des cas de M.M en fonction de l'âge.

L'âge des cas de notre série varie entre 25 à 90 ans. La tranche d'âge comprise entre [40-45] ans est la plus fréquentes.

III-2 Répartition du mélanome métastatique selon la localisation

Les résultats de répartition des cas selon la localisation de métastase de mélanome sont représentés ci dessus.

Le mélanome métastatique ganglionnaire est le plus fréquent dans notre série 12/27 patients représente une métastase ganglionnaire c'est le premier siège métastatique.

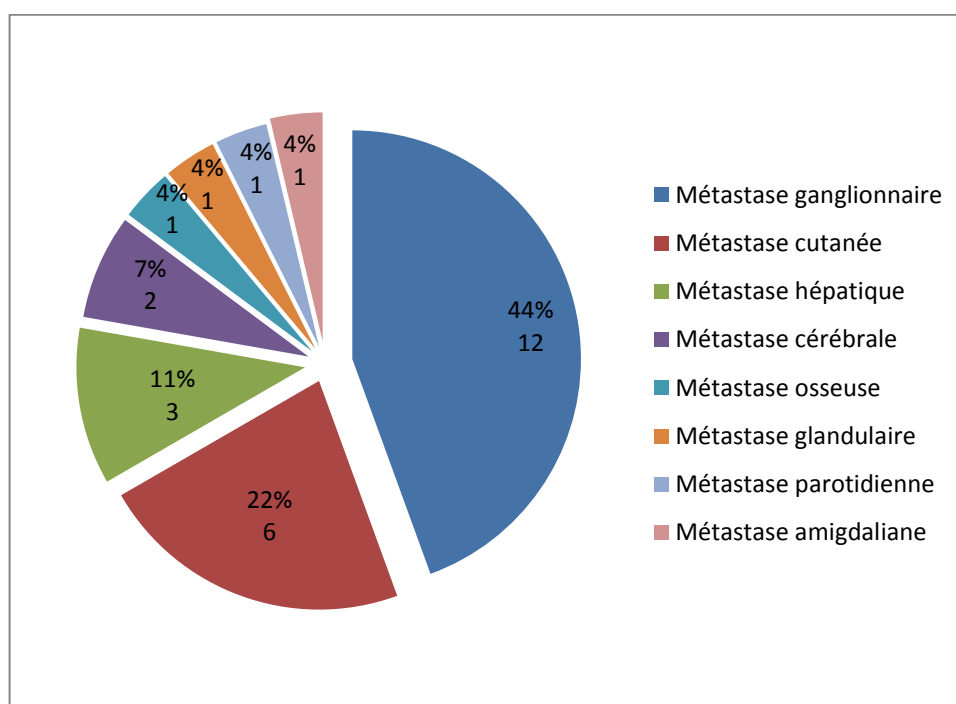
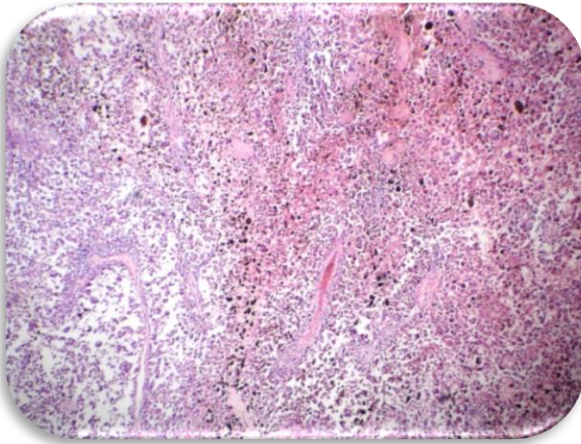
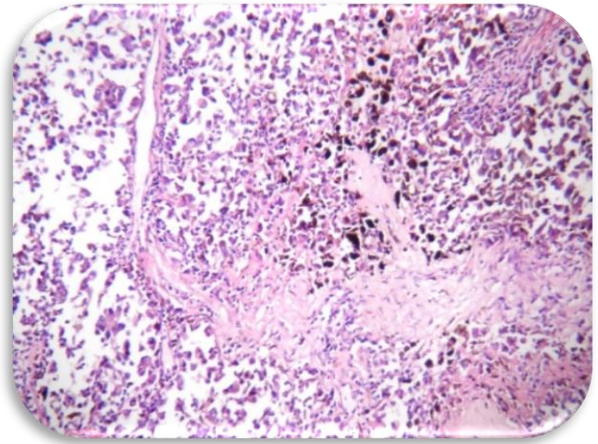


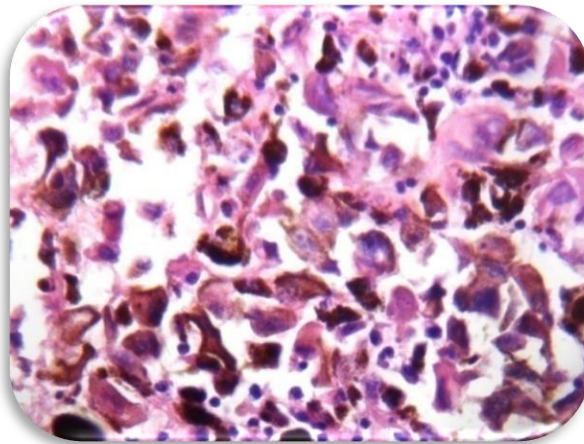
Figure 16 : répartition du mélanome métastatique selon le siège de métastase.



HE : G × 40



HE : G × 100



HE : G × 400

La coloration HE : est la coloration histologique standard qui permet la coloration du cytoplasme en rose clair et les noyaux en violet.

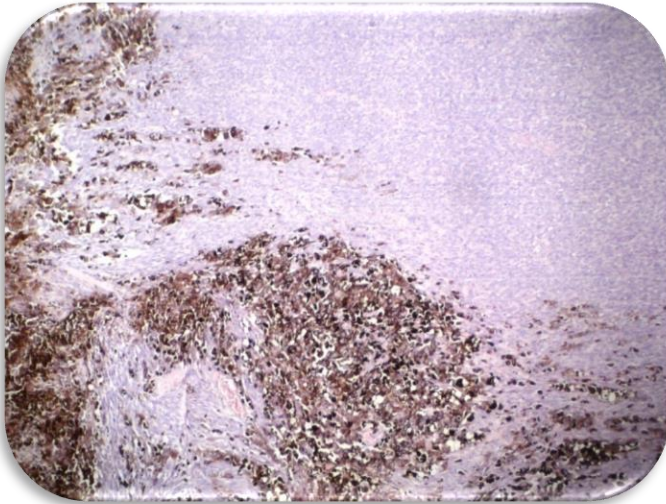
Métastase ganglionnaire d'un mélanome présent un aspect pigmenté noirâtre.

Au G×400 on voit des cellules à cytoplasme abondant comportant par foyers de pigments mélaniques les noyaux sont vascularisés ou à nucléole proéminent et les mitoses sont nombreuses.

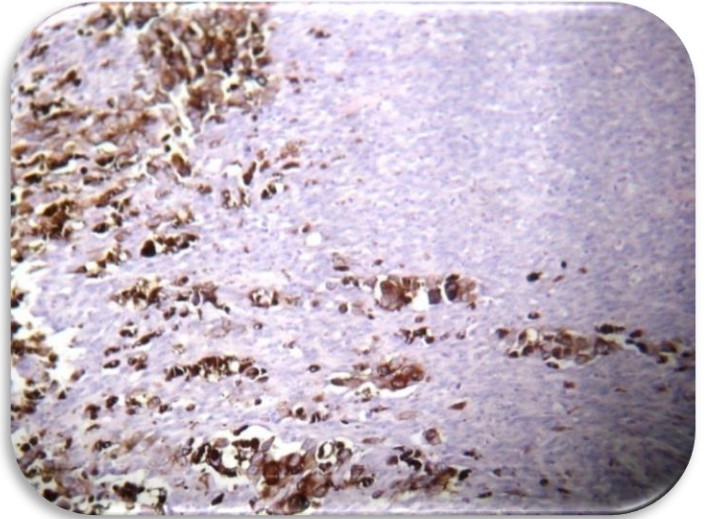
Figure 17 : coupes histologiques d'une métastase ganglionnaire d'un mélanome après coloration HE au microscope optique à différents grossissement.

Mélanome métastatique cutané

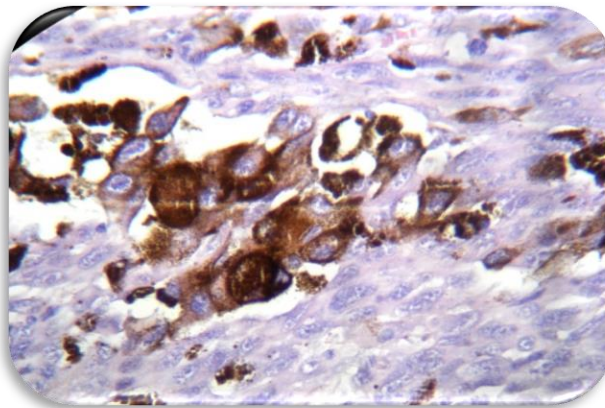
Le mélanome métastatique cutané est le second type le plus fréquent dans notre série représenté par 6/27 des patients.



HE : G × 40



HE : G × 100



HE : G × 400

L'examen microscopique montre un revêtement cutané siège d'une prolifération néoplasique maligne d'origine mélanocytaire

Figure 18 : coupes histologiques d'un mélanome cutané métastatique après coloration HE au microscope optique à différents grossissement.

A : Mélanome métastatique de la glande parotidienne

Parenchyme parotidien (flèche noire) siège d'une prolifération néoplasique nodulaire agencée en nappes de cellules diffuses parsemées de pigment de mélanine (flèche jaune)

Les cellules tumorales sont polymorphes, rondes, ovoïdes fusiformes a noyaux monstrueux, vésiculeux nucléolé (flèche bleue).

Les atypies cytonucléaires et les mitoses anormales sont très marquées.

Le stroma est moyennement abondant fibro inflammatoire par endroits, cette prolifération est délimitée par une fine capsule fibreuse surmontant les petits amas lymphoïdes (flèche rouge).

B : Métastase cérébrale d'un mélanome

Prolifération cellulaire maligne de cellules fusiformes ailleurs globuleuses disposées en faisceaux et nappes parfois à disposition péri vésiculaire.

Ces cellules tumorales sont munies de noyaux vésiculeux nucléolés avec atypies et nombreuses mitoses (flèche rouge).

Le stroma est grêle. Quelques rares pigments brunâtres d'allure mélanique sont notés.

C : Métastase osseuse d'un mélanome

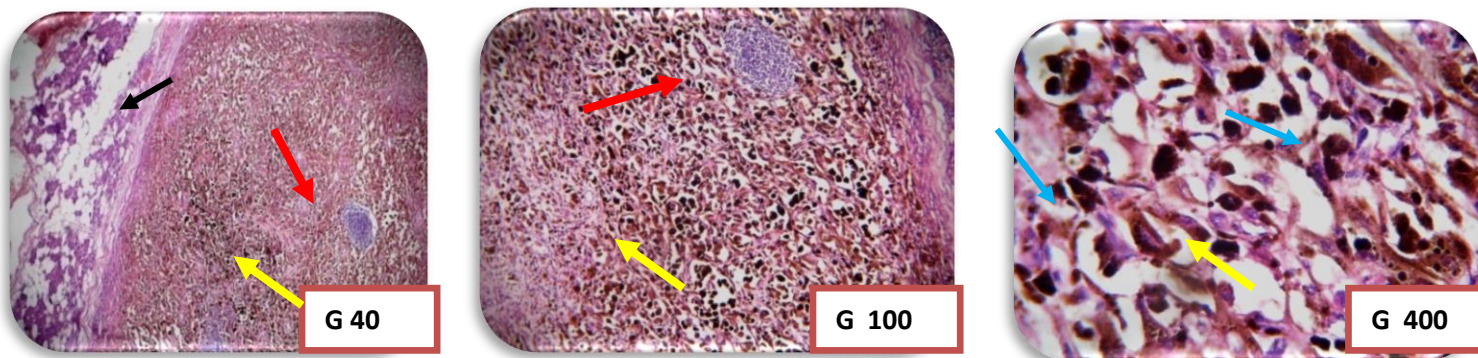
Prolifération néoplasique dense, organisée en nids en thèques et en lobules, alternant avec des zones de nécrose tumorale.

Les cellules sont rondes de taille moyenne, au cytoplasme réduit et à noyau arrondi contenant une chromatine assez fine avec un nucléole bien visible ou au contraire pas du tout. (Flèche rouge).

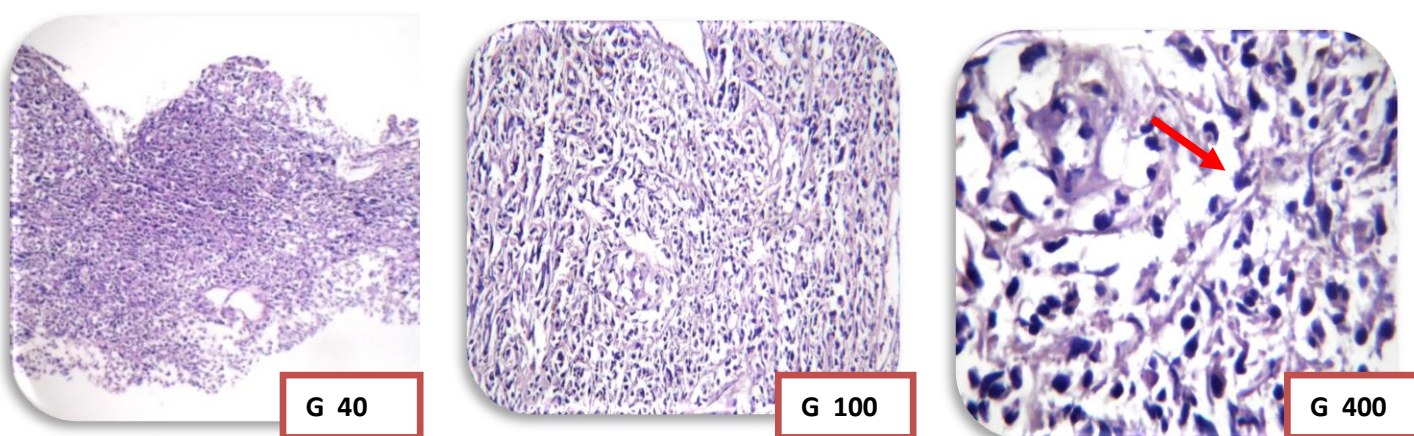
Les atypies sont minimales à focalement modérées et les mitoses très nombreuses. (Flèche jaune).

Le stroma réduit est fibro-vasculaire.

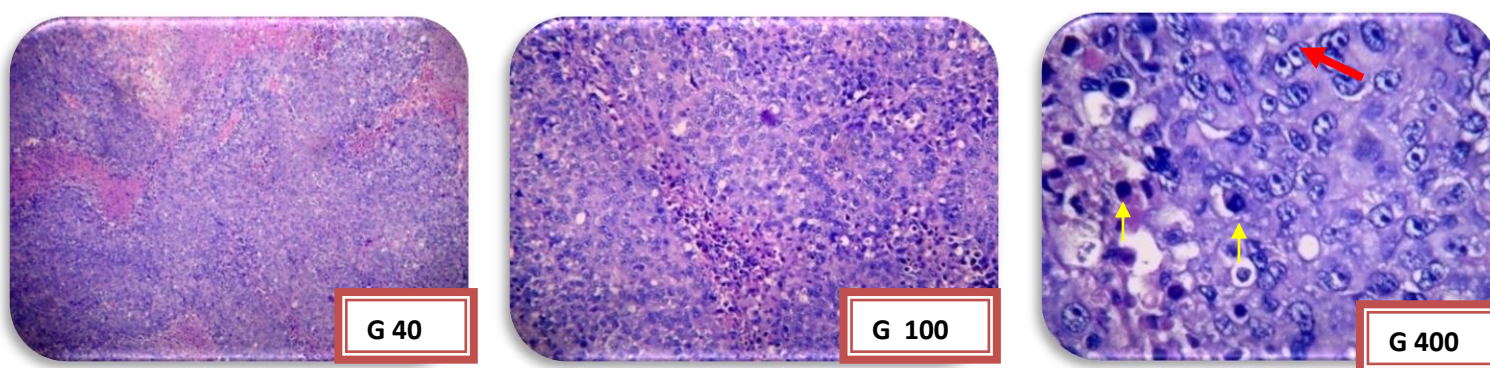
Des pigments brunâtres se voient au sein des lobules sus décrits.



A : Mélanome métastatique de la glande parotidienne



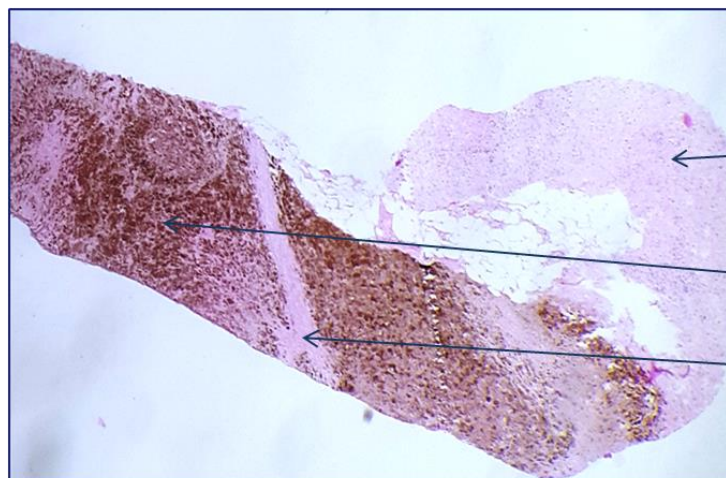
B : Métastase cérébrale d'un mélanome



C : Métastase osseuse d'un mélanome

Figure 19: coupes histologiques des différents types de mélanome métastatique après coloration HE au microscope optique à différents grossissement.

Mélanome métastatique hépatique

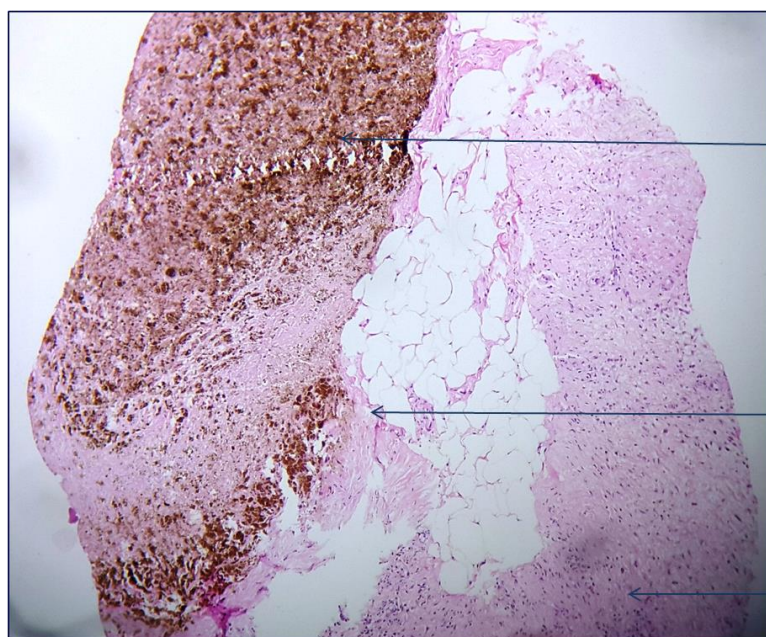


Parenchyme
hépatique
sain

Nappes diffuses de cellules
tumorales mélanocytaires

Fibrose

A Ponction biopsie hépatique: métastase
hépatique d'un mélanome. HE Grx10

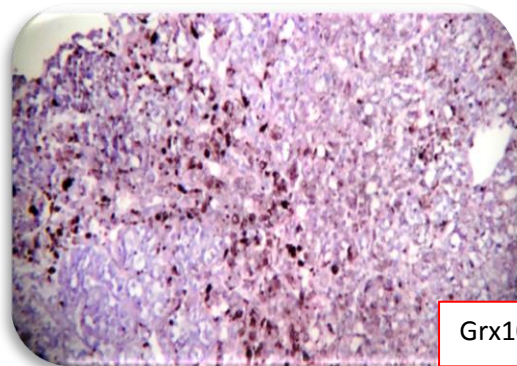


Nappes diffuses de cellules
tumorales mélanocytaires

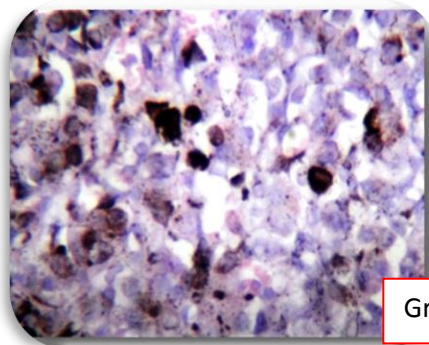
Fibrose

Parenchyme
hépatique
sain

B Ponction biopsie hépatique: métastase
hépatique d'un mélanome. HE Grx20



Grx10

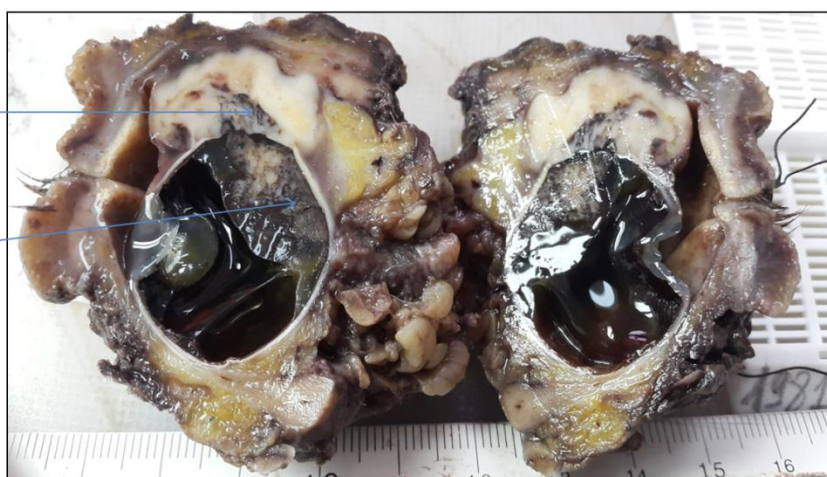


Grx400

C Ponction biopsie hépatique: métastase hépatique d'un mélanome. HE Grx40 / Grx400

Effraction sclérale
avec envahissement
musculo graisseux

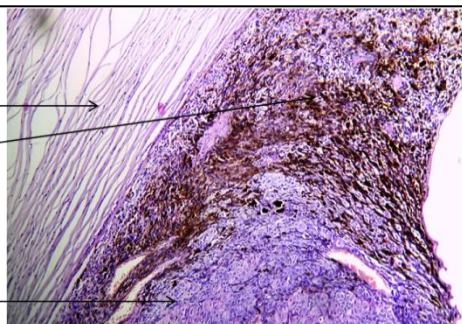
Nodule
tumoral
noirâtre

**D**

Sclère saine

Iris
envahie

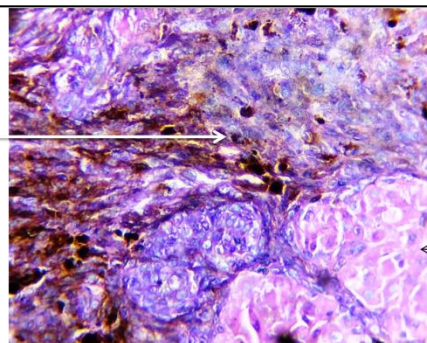
Nodule
tumoral



Mélanome choroïdien : HEX10

E

Cellules
tumoraux
fusiformes
pigmentées



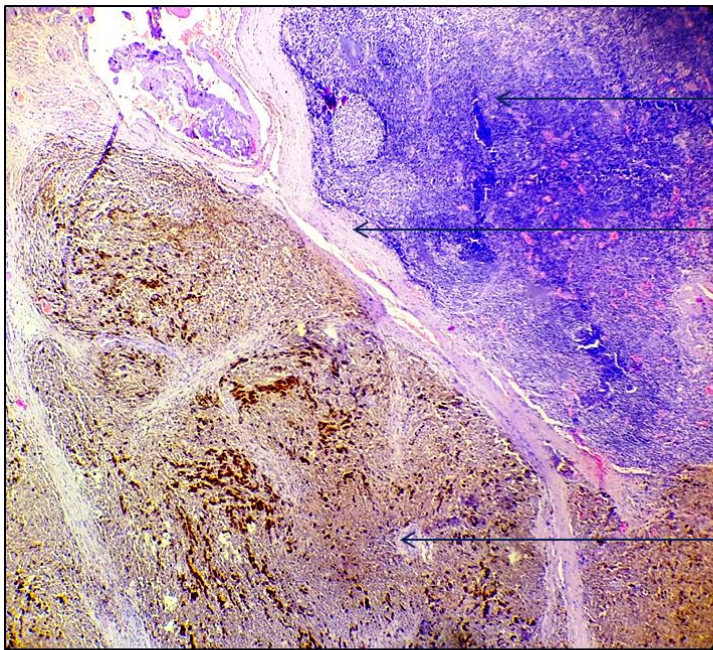
Cellules
tumoraux
épithélioïdes
à gros noyau
nucléolé

Mélanome choroïdien : HEX400

F

Figure 20 : (A B C D E F) coupes histologiques d'une métastase hépatique de mélanome avec la tumeur primitif au niveau choroïdien après coloration HE au microscope optique à différents grossissements.

Mélanome métastatique amygdalien

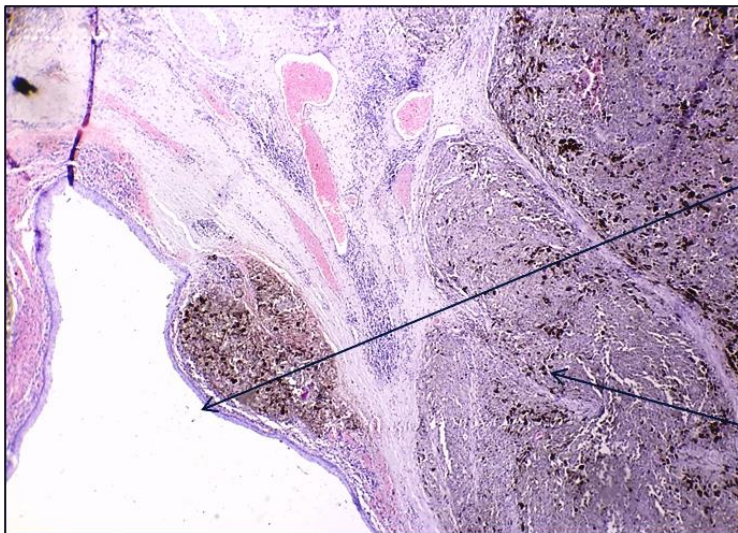


Tissu lymphoïde

épithélium malpighien
surmontant un tissu lymphoïde

Nappes diffuses de cellules
tumorales mélanocytaires
pigmentées

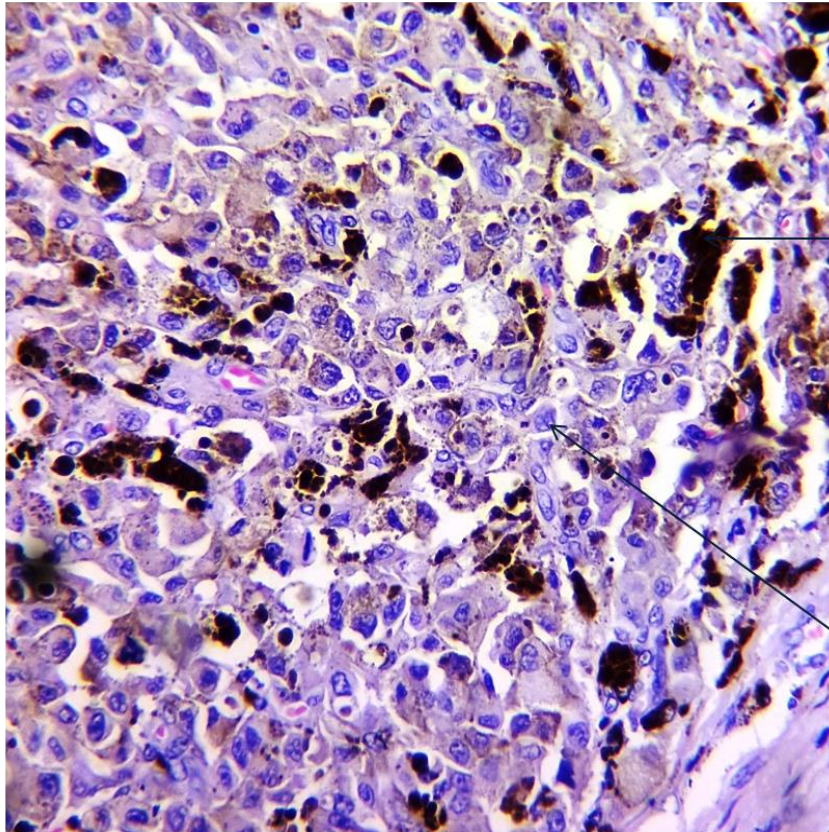
A métastase amygdalien d'un mélanome . (HE Gr x 10)



Muqueuse cavaire: épithélium
malpighien soulevé par la tumeur

Nappes diffuses de cellules
tumorales mélanocytaires
pigmentées

B métastase amygdalien d'un mélanome . (HE Gr x 10)



Pigment mélanique

Cellules tumorales
mélanocytaires: cellules de
grande taille à noyau
vésiculeux nucléolé

C

Mélanome . (HE Gr x 10) : cellules
de grande taille à gros noyau
nucléolé

Figure 21 : (A B C) coupes histologiques d'une métastase amygdalienne de mélanome après coloration HE au microscope optique à différents grossissements.

III-3 Résultat immuno-histochimique du marquage de C-kit

Dans notre série les 27 cas ont bénéficié de la recherche de la surexpression C-KIT ont révélé un marquage positive dans 18 cas soit 67%, 8 cas soit 29% sont négatifs et un cas ininterprétable (ou non contributif).

ckit	positive	négative	Ininterprétables	Total
nombre	18	8	1	27
%	67	29	4	

Tableau 04 : Expression de C-Kit

- Répartition du type histologique selon la positivité de marquage anti C-kit

Nous observons que le mélanome métastatique présente une grande fréquence d'expression du C-KIT avec 8cas/12 pour la métastase ganglionnaire positive , 3 cas négative, 1 cas ininterprétable , 2/6 pour métastase cutané positive avec 4/6 sont négatives ,l'ensemble des cas dans la métastase hépatique 3 cas qui présente c-kit positive, aussi pour métastase cérébrale 2/2 ,de même pour osseux, parotidien, amygdalien les uniques cas sont positives , métastase glandulaire l'unique cas est négative.

Type	c-kit+	c-kit -	ininterprétable	total
ganglionnaire	8	3	1	12
Cutané	2	4	0	6
hépatique	3	0	0	3
Cérébrale	2	0	0	2
Osseuse	1	0	0	1
glandulaire	0	1	0	1
parotidienne	1	0	0	1
amygdalin	1	0	0	1
Total	18	8	1	27

Tableau 05 : expression de C-Kit selon le type histologique.

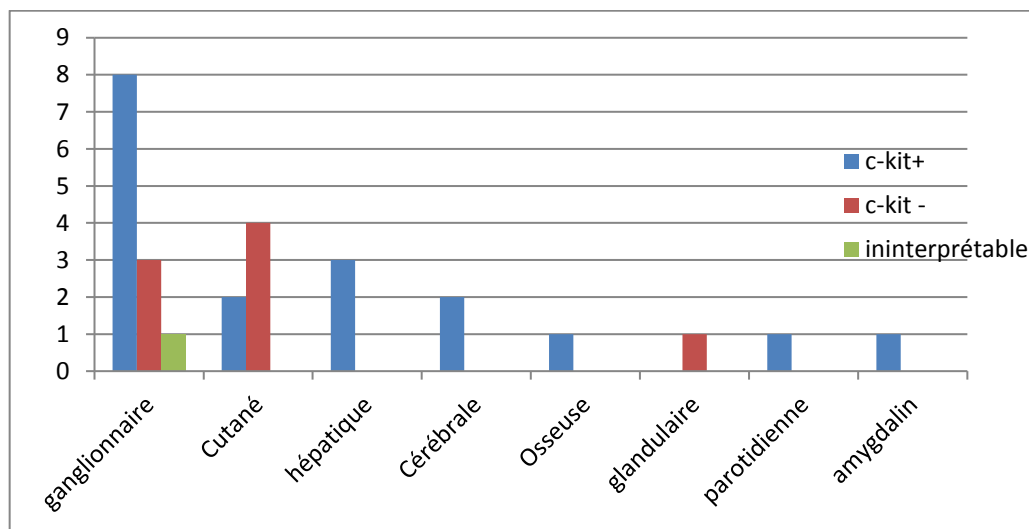
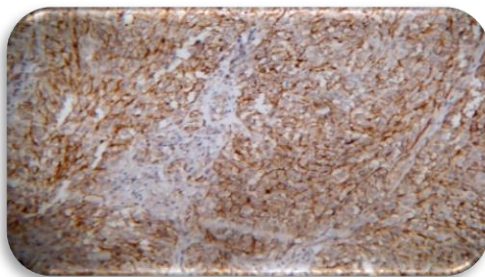
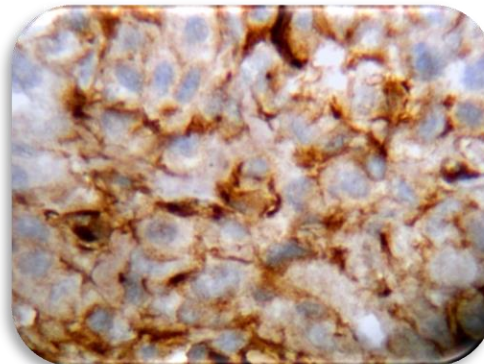
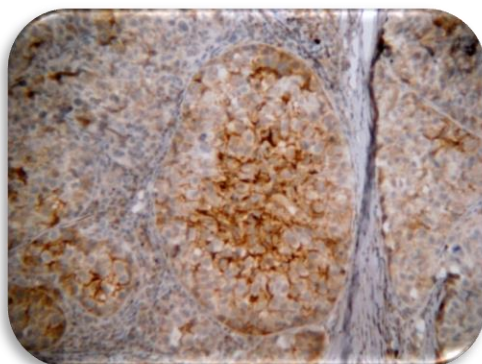


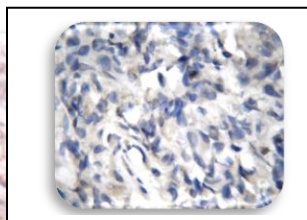
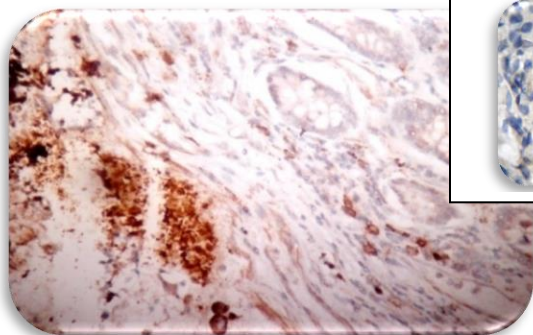
Figure22 :expression de C-kit selon le type histologique.



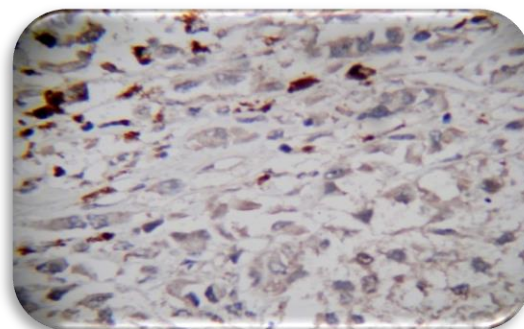
B : Métastase ganglionnaire présente une positivité intense de C-Kit.



C : Métastase osseuse d'un mélanome présente une expression focale de c-kit.



A (G 100) : Témoins externe : positifs les mastocytes observés dans la lamina de la muqueuse intestinale présentent une positivité membranaire et cytoplasmique de C-kit avec un témoin cutané négatif.



D : Mélanome métastatique glandulaire
Négativité d'expression de c-kit G 400.

Figure 23 (A B C D) : coupes histologiques de mélanome métastatique après immunomarquage membranaire du C-Kit observées au microscope optique à différents grossissements.

III-4 Résultat de PCR du Teste de mutation B-raf V600E

Parmi nous cas on n'a réalisé le teste de mutation B-raf V600E pour 15 cas /27 car le kit B-raf est indisponible, la mutation a été détectée pour 4 cas/15 qui représente un mélanome métastatique cutané.

B-raf	Mutation détecté	Mutation non détecté	total
nombre	4	11	15
%	27	73	

Tableau 06: Résultats de test de mutation BRAF V600E

- Expression du B-raf chez le mélanome métastatique cutané**

Le B-raf est muté dans 75% des patient qui présente une métastase cutané ,3/4 cas présente une mutation B-raf V600E.

B-raf	mutation détecté	mutation non détecté	fréquence de positivité
cutané	3	1	75
pourcentages%	75	25	

Tableau 07 : Expression du B-raf chez mélanome métastatique cutané

comparaison de l'expression du B-raf chez le mélanome métastatique cutané et les autres types de mélanome métastatique

Tableau 08 : expression du B-raf chez le mélanome métastatique cutané et

Différents type de mélanome métastatique.

	B-raf	muté	non muté	Pourcentages d'expression %
	Cutané	3	1	75
Autre type de Mélanome métastatique	glandulaire	0	1	25
	ganglionnaire	1	5	0
	parotidienne	0	1	0
	cérébrale	0	1	0
	Hépatique	0	1	0
	osseuse	0	1	0

- Comparaison entre d'expression du B-raf et du marqueur immunohistochimiques C-kit

marqueurs	positive	négative	ininterprété	total
C-kit	18	8	1	27
B-raf	4	11	0	15

Tableau 09 : comparaison d'expression du B-raf et C-kit.

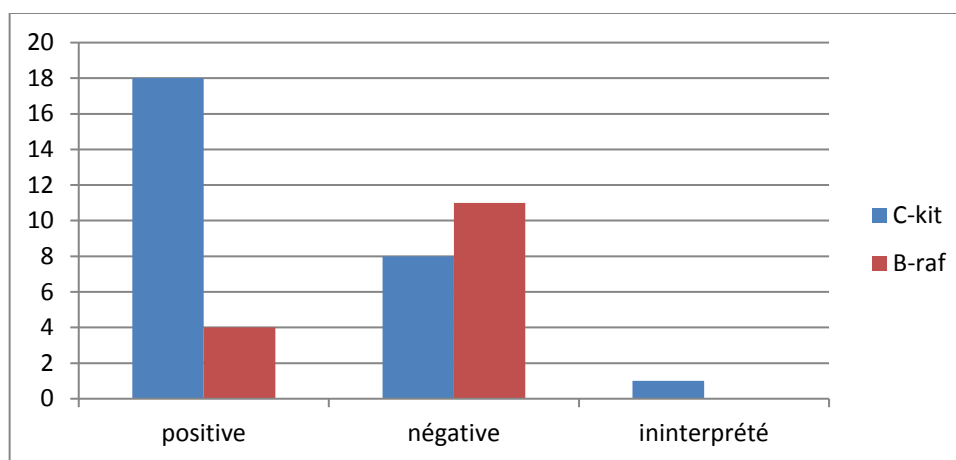


Figure 24: comparaison d'expression du B-raf et C-kit.

Donc a partir ses résultat quand le ckit présente un marquage positive le B-raf seras négative.

Quand le B-raf est muté le C-kit est négative.

- **Comparaison entre les mélanomes métastatique présentant une mutation BRAF V600E détectée et l'expression du marqueur immunohistochimiques C-KIT**

Tableau 10 : Comparaison entre des mélanomes métastatique présentant une mutation BRAF V600E détectée et l'expression du marqueur immunohistochimiques C-kit.

Type	c-kit+	c-kit -	ininterprétable	B-raf muté	B-raf non muté	sexe
ganglionnaire	8	3	1	1	5	6F/12
cutané	2	4	0	3	1	3H/4
hépatique	3	0	0	0	1	H
cérébrale	2	0	0	0	1	F
osseuse	1	0	0	0	1	H
glandulaire	0	1	0	0	1	F
parotidienne	1	0	0	0	1	H
amigdalienne	1	0	0	0	/	H
Total	18	8	1	4	11	/

La mutation BRAF a été détectée chez des patients de sexe masculin 3H/4 âgés de 27, 35 ,46 et 62 ans.

L'expression de C-KIT dans ces 4 cas n'a pas été retrouvée.

La positivité d'expression de C-kit a été détectée chez les patients de sexe féminin 6F/12 par contre

L'expression de mutation B-raf n'a pas été détecté chez ces dernier.

Discussion

Notre Étude consiste en une collecte de 27 cas de mélanomes métastatiques colligés dans le service de Pathologie du CHU Mustapha sur une période de 6 ans allant de 2010 à 2016, sur une période de 2 ans et demi (01/2011- 06/ 2016).

Le mélanome est l'un des cancers les plus rares de la peau. Il représente 2,7 % de l'ensemble des cancers incidents selon Bahadoran.P et al 2014, la moitié des cas de mélanome se développent en mélanome métastatique en Algérie selon Ouahioune.W 2013.

Dans notre série il existe une prédominance masculine (16 M et 11F) avec un sexe ratio de 1,45.

Dans une série marocaine (BACHTI.B ; 2015), sur les 33 cas étudiés, il y avait 18 femmes et 15 hommes, Le sex-ratio M/F était donc 0,83 M/F cela rejoint notre étude pour un sex-ratio de 1,45 la femme est prédominante que l'homme, cependant les hommes ont des taux plus élevés à partir de l'âge de 64 ans dans cette étude ceci rejoint nos résultats puisque l'âge moyen de notre série est supérieur à 50 ans.

Dans notre série les âges extrêmes de [25-90] ans avec une augmentation de fréquence entre [40-45]. Ceci concorde avec les données de la littérature (OMS, 2004).

Notre série regroupe différents types de MM, 12 cas de MM ganglionnaires (44%), 6 de siège cutané (22%), 3 hépatiques (11%), 2 cas de MM cérébral (7%), 1 métastase osseuse (3%), 1 glandulaire (4%), et un autre cas de métastase parotidienne (4%), et un cas de métastase amygdalienne (4%).

Parmi les 27 cas de MM de notre série, la localisation ganglionnaire est la plus fréquente (41%), selon la littérature OMS 2004, El Haouari,A 2012, BACHTI,B 2015.

L'étude immunohistochimique utilisant Le proto-oncogène C-kit a permis de retrouver sur les 27 cas de MM ,18 cas avec un marquage positif(67%),8 cas négatifs(29%) et 1 cas ininterprétable (ou non contributif)

Sa rejoint la littérature selon ElHaouari,A 2012 le C-Kit est positif dans 60% .

Par contre ca se concorde pas avec Willmore-Payne.C et al.2005 ou la plupart des mélanomes perdent l'expression de c-kit pendant la progression tumorale.

L'expression du C-kit était retrouvée dans les mélanomes localisés ainsi que les mélanomes métastatiques et près de 70% des cas de la lignée mélanocytaire perdent l'expression du C-kit selon BACHTI.B 2015.

La recherche de la mutation B-raf V600E a été réalisé pour 15 cas /27 car le kit B-raf est indisponible ,la mutation est détectée pour 4 cas/15 qui représente potentiellement une mutation chez les MM cutané, 75% des cas mutés cutané et 25% des cas non mutés. Donc dans le MM cutané la mutation B-raf V600E est plus fréquente que dans les autres types de MM. Portent en considération que nous résultat on été fait sur des types de MM hétérogène .

Cela rejoint les données de la littérature ou le B-raf sont fréquents dans mélanome cutané, et apparaissant dans 40% à 60%.

Environ 70% à 90% de ces mutations provoquent une mutation (V600E), et 10% à 30% provoquent une mutation (V600K) selon Kevin B et al 2013, qui veut dire qu'il existe déférente mutation protéique.

Mutation BRAF est présente dans 40 à 50 % des mélanomes, la mutation V600E représentant 80 à 90 % des mutations selon A.Bay et al 2014.

Dans notre série de mélanomes métastatique cutanés, la mutation B-raf a été détectée chez de jeunes patients, de sexe masculin, âgés respectivement de 27,35ans.

Cela rejoint nos données qui montrent que le taux de mutation est de 16%, (4 cas/15) soit il s'agissait exclusivement de MM cutanés (4 cas/ 8 mélanomes cutanés ont une mutation BRAF soit 50%).

La mutation B-raf est de 45% dans le mélanome selon Megan.L et al 2013.

L'identification dans plus de la moitié des MM, de l'existence d'une mutation du gène BRAF. Dans plus de 80 % des cas, il s'agit de la mutation V600E, qui active l'activité enzymatique de la protéine du même nom. Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase située en aval de RAS et en amont de MEK sur la voie des MAPkinases. Selon C.ROBERT 2011.

La mutation B-raf V600E, est présente dans près de 66 % des cas de mélanome selon Stéphane.D et al 2006

Fait intéressant, il a été démontré que la présence de la mutation BRAF serait associée à une évolution souvent plus agressive du mélanome.

Dans notre série le C-KIT n'était pas exprimé dans les 4 cas avec mutation BRAF détectée, (Willmore-Payne. C et al. 2005) ont également évalué 100 cas de mélanome malin avec étude de l'expression du C-kit par IHC. Contrairement au BRAF, des mutations activatrices de c-kit n'ont pas été signalées dans le mélanome. La protéine c-kit est normalement exprimée dans les cellules interstitielles de Cajal, les cellules germinales, les mastocytes, et les mélanocytes. Dans le mélanome, il apparaît que c-kit est fortement exprimé dans la composante in situ et dans la composante jonctionnelle des lésions invasives, mais l'expression est perdue une fois que le mélanome est invasif et métastatique, la perte de l'expression de c-kit permet aux cellules mélanomateuses de s'échapper du ligand kit (facteur de cellule souche).

La mutation BRAFV600E, de loin la plus fréquente, affecte de façon importante son activité sérine/thréonine kinase. BRAFV600E a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale, et joue un rôle dans les processus de division et de différenciation cellulaire, Elle est notamment située en aval des voies de signalisation du récepteur à l'EGF et des protéines Ras. Pour cela dans Notre étude on n'a trouvé que lorsque la mutation B-raf est détectée l'expression

de récepteur a l'EGF (C-kit) ou CD117 par immunomarquage est totalement négatif ça explique que le B-raf muté dans la voie MAP Kinase est activé sans signal en amont.

Mutation V600E dans certain cas de patient jeune comme seul lui de notre série âgé de 27ans on peut clairement suspecter une prédisposition génétique avec une grande probabilité de mutation génétique comme aussi le xéroderma-pigmentosum

Par contre si la mutation B-raf est non détectée le C-Kit sera dans certains cas exprimé et dans d'autres non exprimé, ceci explique qu'il ya d'autres anomalies moléculaires qui rentrent dans la mélanogénèse et simulent les voies de la progression tumorale qui conduit à la métastase.

Le cancer est un des grands enjeux de santé publique du XXI^{ème} siècle, amplifié par l'allongement de l'espérance de vie mais aussi les modifications de notre environnement. Bien qu'étant l'une des maladies les plus étudiées à l'heure actuelle, de nombreux mécanismes impliqués dans l'apparition et le développement du cancer restent à éclaircir.

Le mélanome est la plus grave tumeur cutanée chez l'homme qui, à un stade avancé, est résistante aux thérapies diverses. L'incidence du MM est en augmentation constante dans le monde. Il devient de ce fait une vraie préoccupation de santé publique. La gravité de cette tumeur maligne est liée à sa forte capacité à métastaser mettant en jeu le pronostic vital du patient si la lésion n'est pas détectée précocement,

Les nouvelles thérapies du MM ciblent les voies de transduction du signal qui sont impliquées dans la progression des tumeurs. Les inhibiteurs de la protéine BRAF et le c-kit récemment développés (l'ipilimumab et les inhibiteurs de B-raf : Vémurafenib et Dabrafenib) donnent des résultats spectaculaires mais transitoires car des résistances se développent rapidement. Par ailleurs, ces thérapies ciblées sur BRAF favorisent l'apparition de carcinomes cutanés.

La prévention du mélanome est un vrai problème de santé publique qui nécessite une éducation de la population générale sur la nécessité de protection solaire et la sensibilisation au mélanome et l'incitation au diagnostic précoce avec la formation des professionnels de santé.

L'espérance de vie d'un patient présentant un MM n'est habituellement que de quelques mois, l'ère étant actuellement à la biologie moléculaire et à la thérapie ciblée, cette dernière reste le seul espoir des patients atteints de Mélanome métastatique.

Ce travail n'est qu'une ébauche et il mériterait d'être élargi et bien développé.

- ❖ Ameur- Ameur. A, 2015, régulation de l'expression de gènes.
- ❖ Amir-Tidadini ZC. 2013, xième journées nationales de pathologie 1er EPU sur les tumeurs mélaniques.
- ❖ Andrieu, J-M et al, 2012, livre de biologie des cancers.
- ❖ Bachtli. B, 2015. Les mélanomes malins cutanés, aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques.
- ❖ Bahadoran. P et al, 2014, recommandations pour le diagnostic de prédisposition génétique au mélanome cutané et pour la prise en charge des personnes à risque.
- ❖ Belaabidia. B et al, 2009, Le profil épidémiologique de mélanome cutané dans la région d'Agadir.
- ❖ Benatiya Andaloussi. I et al, 2011, mélanome de la conjonction et xeroderma pigmentosum, une rare association.
- ❖ Bristol .Myers Squib, 2015, Sensibilisation à la maladie / Environnement du mélanome.
- ❖ Boussemart. L, 2012, Inhibiteurs de BRAF dans le traitement du cancer : Contribution à l'étude des mécanismes de résistance et des effets secondaires paradoxaux.
- ❖ Costes. V et al, 2014, histoire naturelle de la métastase.
- ❖ Dalle. St J, Luc thomas ,2014. Service de dermatologie. Le mélanome métastatique. Conseil scientifique en dermatologie avenue de malakoff - 75116 Paris.
- ❖ Delphine. S, 2012, importance de classification moléculaire dans la prise en charge de patients atteints de mélanome métastatique.
- ❖ Dumaz N 2015, (signalisation et thérapie dans les mélanomes).
- ❖ Dumaz .N, Mourah. S, 2011, Les voies de signalisation activées dans le mélanome et les principes actuels du génotypage.
- ❖ Elenitsas. R et al, 2016, incidence of sentinel node metastasis patients with thin primary melanoma.
- ❖ El Haouari. A, 2012 les mélanomes cutanés et muqueux 172/12..

- ❖ Gavrilovic et al, 2015, Brain metastases: epidemiology and pathophysiology p 5.
- ❖ Jouganous. J, 2015, Modélisation et simulation de la croissance de métastases pulmonaires.
- ❖ Kevin B. Kim, Richard k et al 2013 Phase II Study of the Inhibitor trametinib in patients with metastatic braf-mutant cutaneous melanoma 482,483.usa, journal of clinical oncology.
- ❖ Lyle, Megan et al, 2013, diagnosis and treatment of kit-mutant metastatic melanoma.
- ❖ Mathieu. B, 2007, NM23 et les genes supresseurs des métastases.
- ❖ Mariam T et al, 2014, Mélanome cutané épais: facteurs de mortalité et de survenue de métastases.
- ❖ Megan. L et al, 2013, diagnosis and traitement of Kit- mutant metastatic melanoma.
- ❖ Nihad .A, 2014, mélanome cutané intérêt des thérapies actuelles et des marqueurs biologiques dans la prise en charge du mélanome métastatique.
- ❖ Organisation mondiale de la santé OMS, 2004, Les chiffres et incidences.
- ❖ Ouahioune. W, 2013, revue scientifique morphologique du mélanome.
- ❖ Patrick .B et al, 2014, prédisposition génétique au cancer p200.
- ❖ Pierard-Franchiment.C, 2012, Le mélanome métastatique un vent d'espoir porté.
- ❖ Quatresooz. P et al, 2015, une métastase cutanée. Qui es-tu, d'où viens-tu?
- ❖ Robert.C, 2015, Prise en charge thérapeutique du mélanome métastatique : nouveaux traitements et perspectives.
- ❖ Routier. E et al, 2014, L'immunothérapie dans le mélanome par l'ipilimumab et le vémurafénib.
- ❖ Sandra .H, 2014, Les étapes précoces du processus métastatique 376-380.

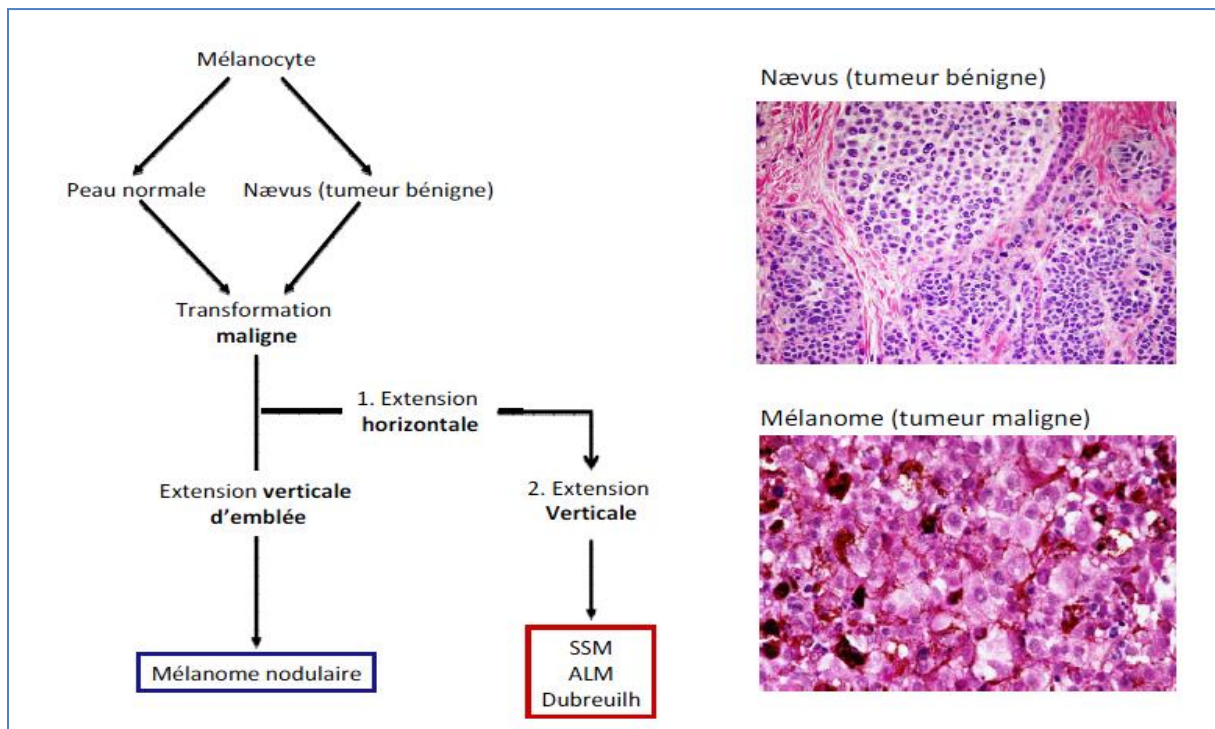
- ❖ Schreiber. RD et al, 2011, cancer immunoediting : integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.
- ❖ Sehed D, 2012, importance de la classification moléculaire dans la prise en charge de patients atteints de mélanome métastatique.
- ❖ Taillibert .S, 2015, et al Épidémiologie des lésions métastatiques cérébrales.
- ❖ Véronique. H et al, 2010, role du laboratoire d'anatomie pathologique dans l'approche pré-analytique des examens en biologie tumoral.
- ❖ Willmore-Payne .C, Joseph et al, 2005, Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution applicant melting analysis, Human Pathology 36, 486– 49.
- ❖ Whiteman. D et al, 2011, epidemiology of malignant melanoma.

Site internet

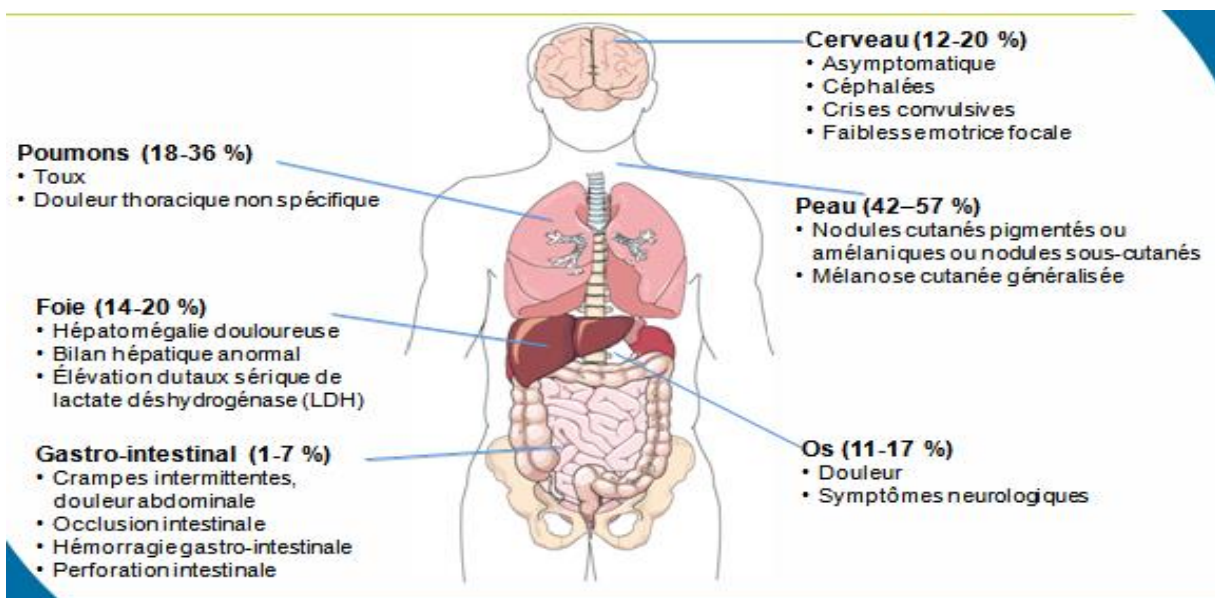
- ❖ <http://www.physiotherapiepour tous.com/maladies-de-la-peau/melanome-de-la-peau>.
- ❖ <http://www.aimatmelanoma.net/fr/aim-for-answers/les-traitements-du-melanome/drogues-en-cours-d-etude/les-therapies-ciblees.html>.
- ❖ <http://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Les-therapies-ciblees/Les-tests-moleculaires/Les-tests-ou-marqueurs-determinant-l-acces-a-des-therapies-ciblees/Mutations-du-gene-BRAF-dans-les-melanomes>.
- ❖ <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1002011>.
- ❖ <http://www.webmd.com/melanoma-skin-cancer/melanomaguide/metastatic-melanoma>.
- ❖ <http://www.fondation-arc.org/A-la-Une/melanome-de-la-peau-les-therapies-ciblees-avancent.html>.
- ❖ <http://www.e-sante.fr/benefices-combinaison-therapies-ciblees-dans-melanome-metastatique/breve/373>.

- ❖ <http://www.onmeda.fr/dossiers-sante/nouveaux-medicaments-melanome-un-medicament-en-fonction-du-gene-braf-555-6.html>.
- ❖ <http://www.lapvso.com/parcours-dune-analyse-histologique-2>.
- ❖ <http://www.erasme.ulb.ac.be/page.asp?id=14611&langue=FR>.
- ❖ <http://www.aimatmelanoma.net/facteurs-de-risque/histoire-personnelle-familiale/la-genetique-du-melanome>.
- ❖ <http://www.L'encyclopediedesmaladies.medipedia.be/melanome/comprendre/la-peau-les-melanocytes-et-les-grains-de-beaute>.
- ❖ <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/skin-melanoma/melanoma>.

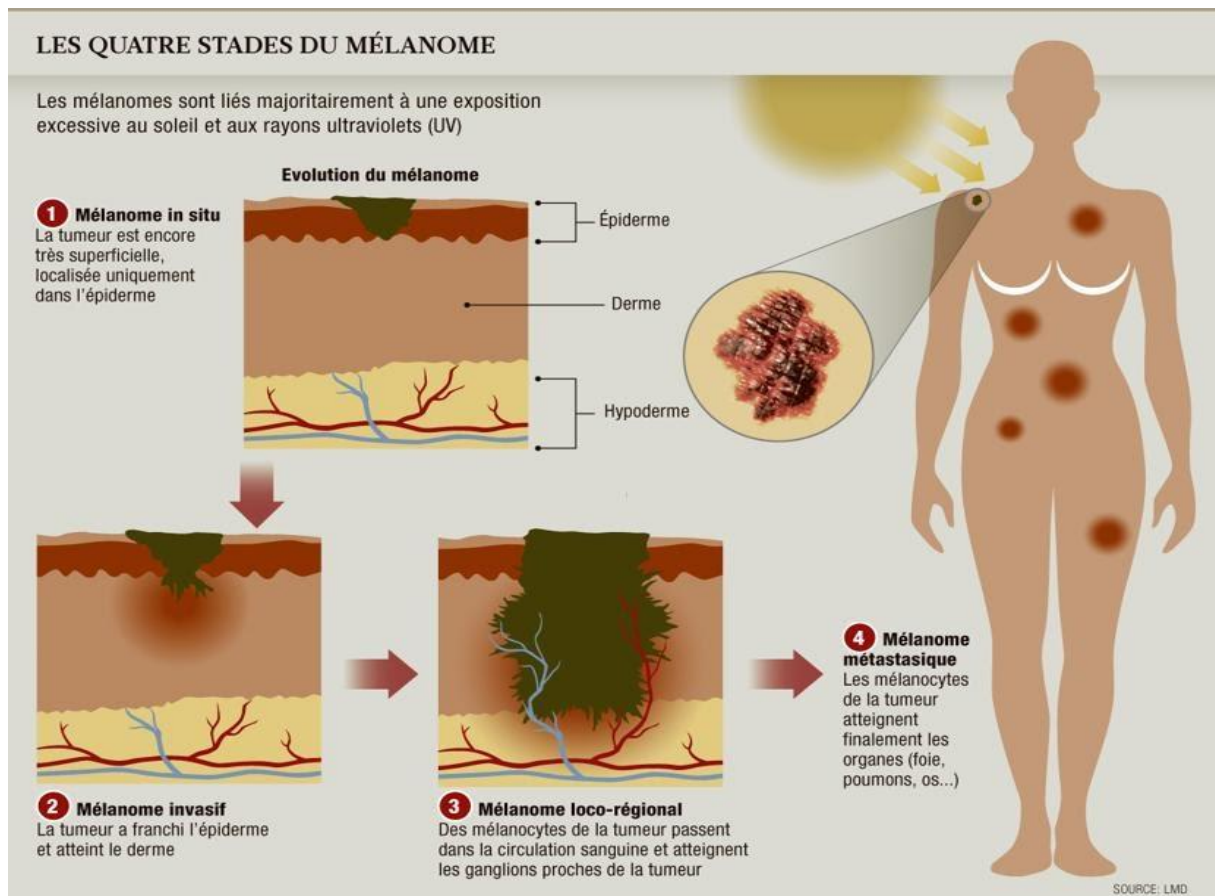
Annexe 1 : Histogenèse des mélanomes



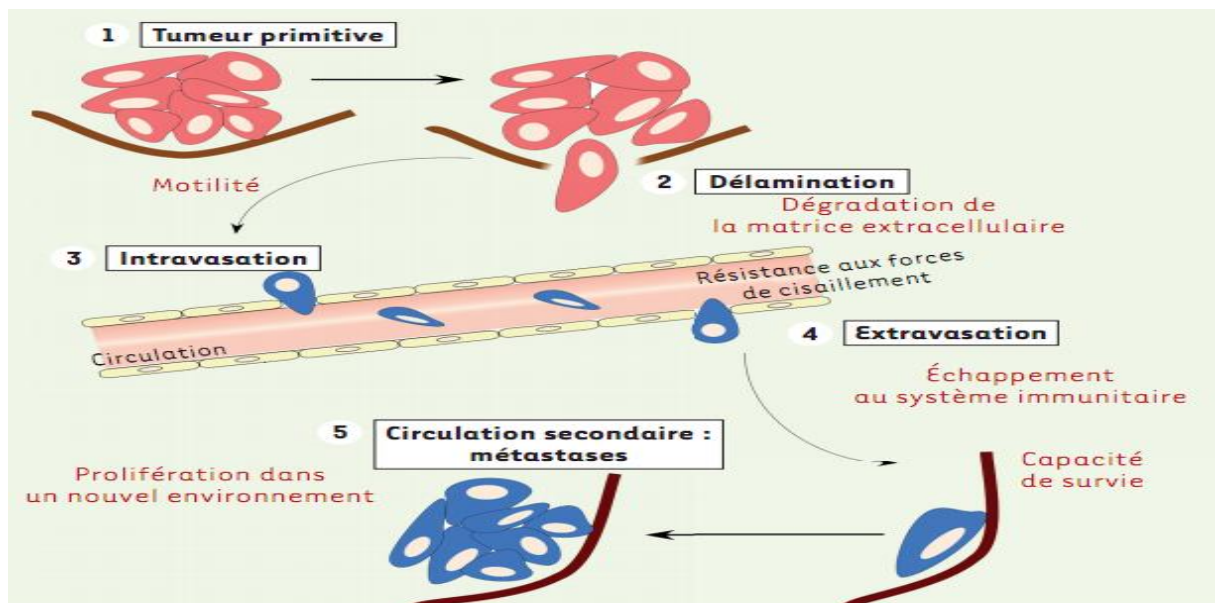
Annexe 2 : Les différents sièges de mélanome métastatique



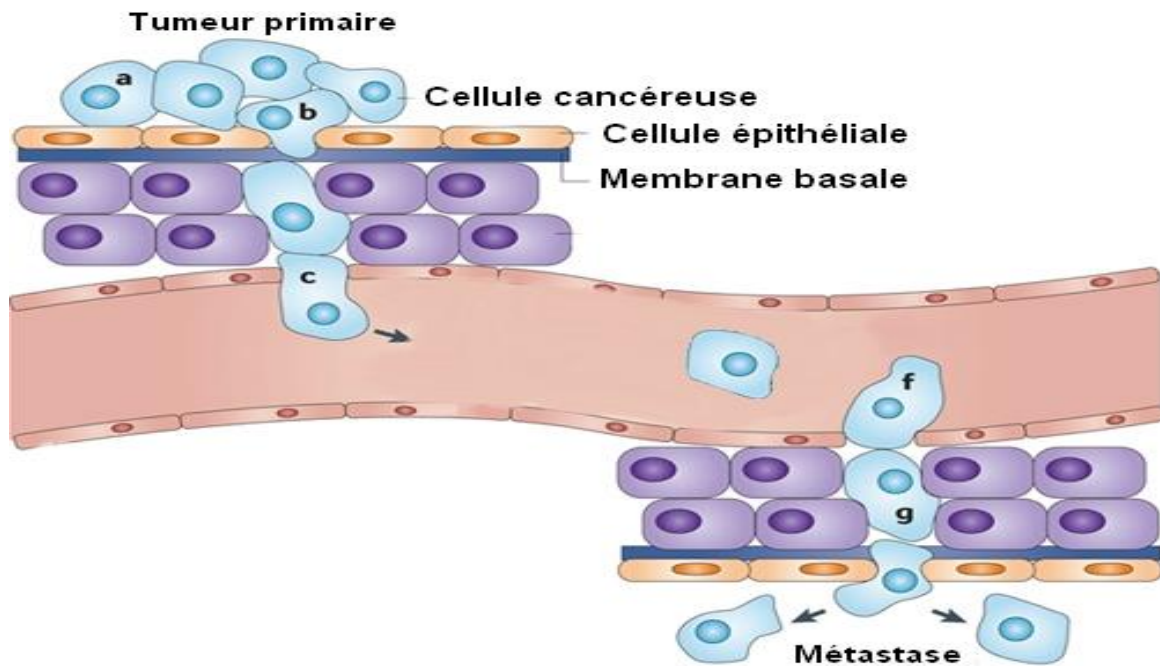
Annexe 3 : La progression du mélanome.



Annexe 4 : Les phases de métastases

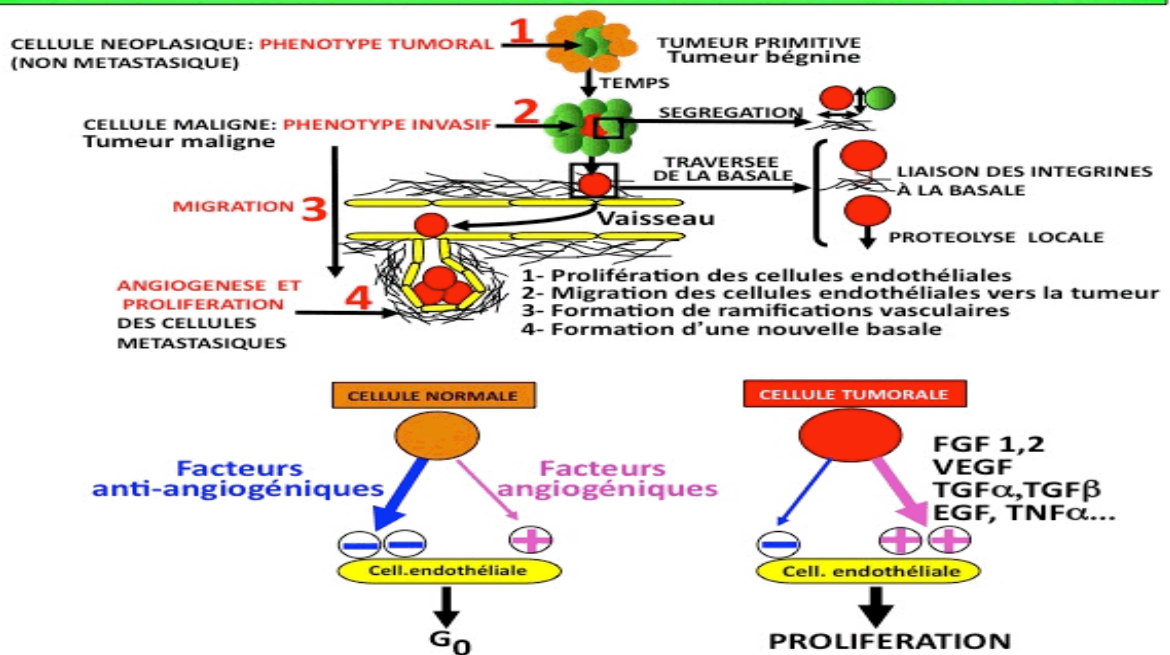


Annexe 5 : Processus métastatique

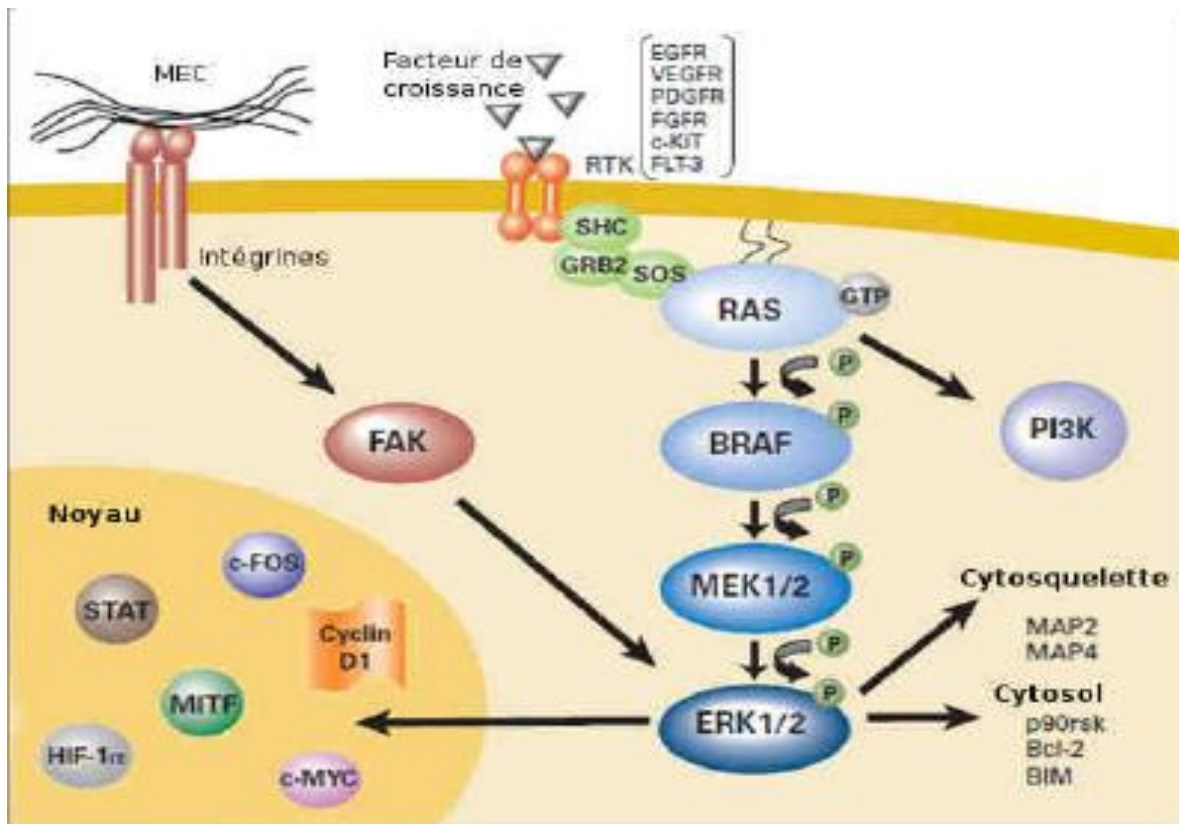


Annexe 6: Chimiotactisme

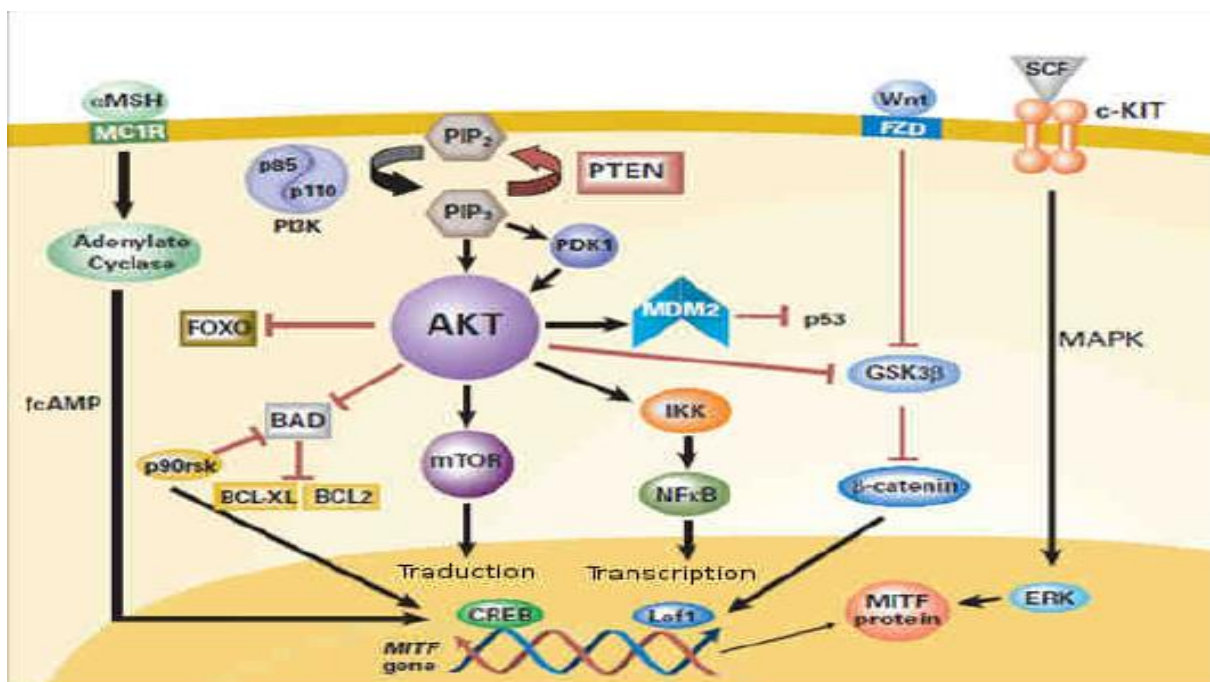
MECANISMES MOLECULAIRES DE LA FORMATION DES METASTASES



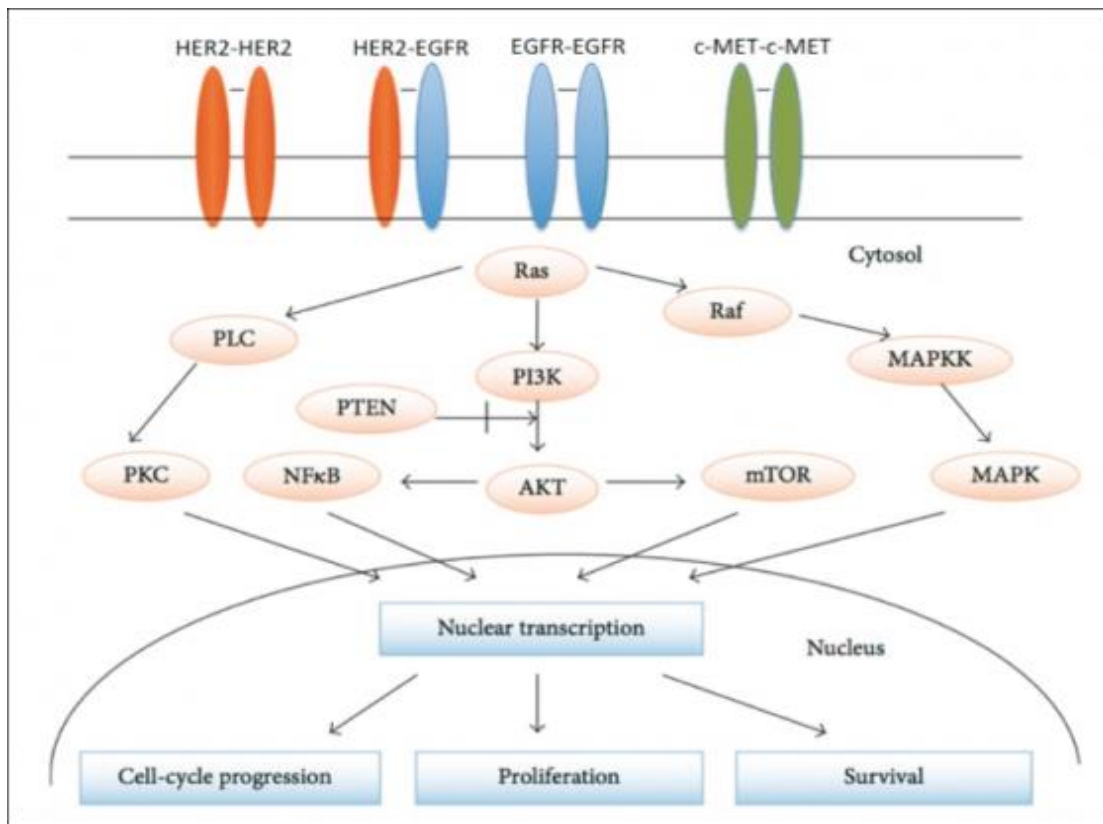
Annexe 7 : La voie des MAPK



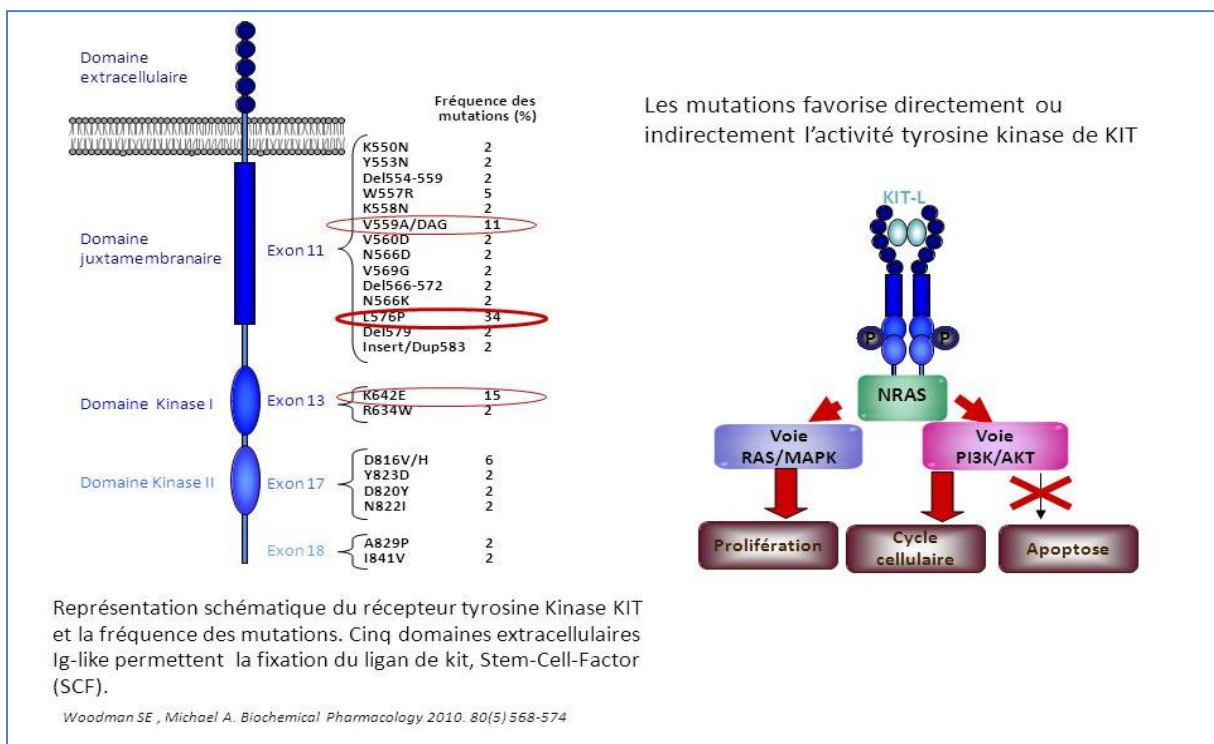
Annexe 8 : La phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)



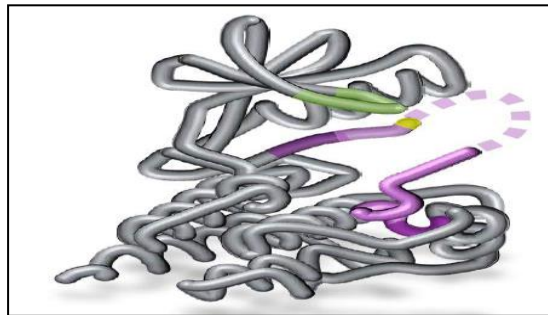
Annexe 9 : La voie de l'AMPc



Annexe 10 : structure et mutation du c-Kit



Annexe 11 : Structure tridimensionnelle de BRAF



Structure du domaine Kinase de BRAF.

- Position 600 indiquée en jaune
- Domaine d'activation en rose.

Tirets = absence de résolution (*GUBLER. B 2014*)

Annexe 12 : Localisation du gène BRAF

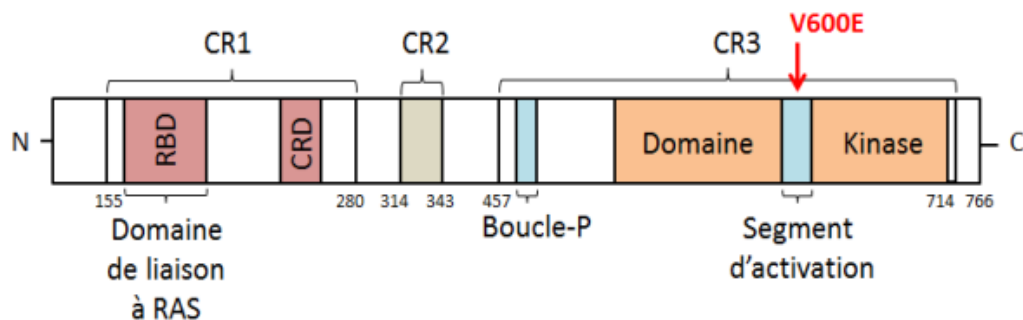
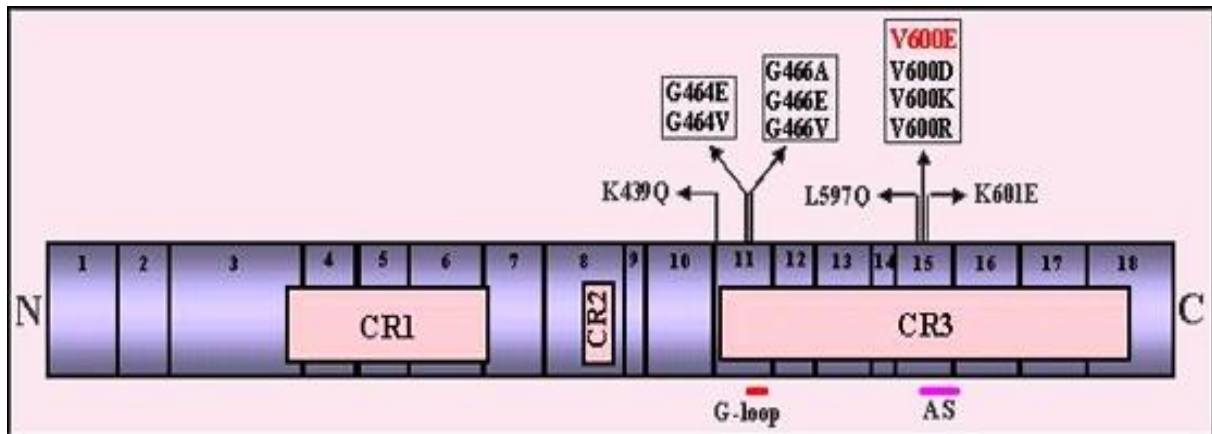


Figure 1: Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF. La position de la mutation oncogène V600E est indiquée par une flèche rouge. CR : Conserved region, RBD : RAS binding domain, CRD : Cystein rich domain (D'après Huang T et al., J Hematol Oncol, 2013)

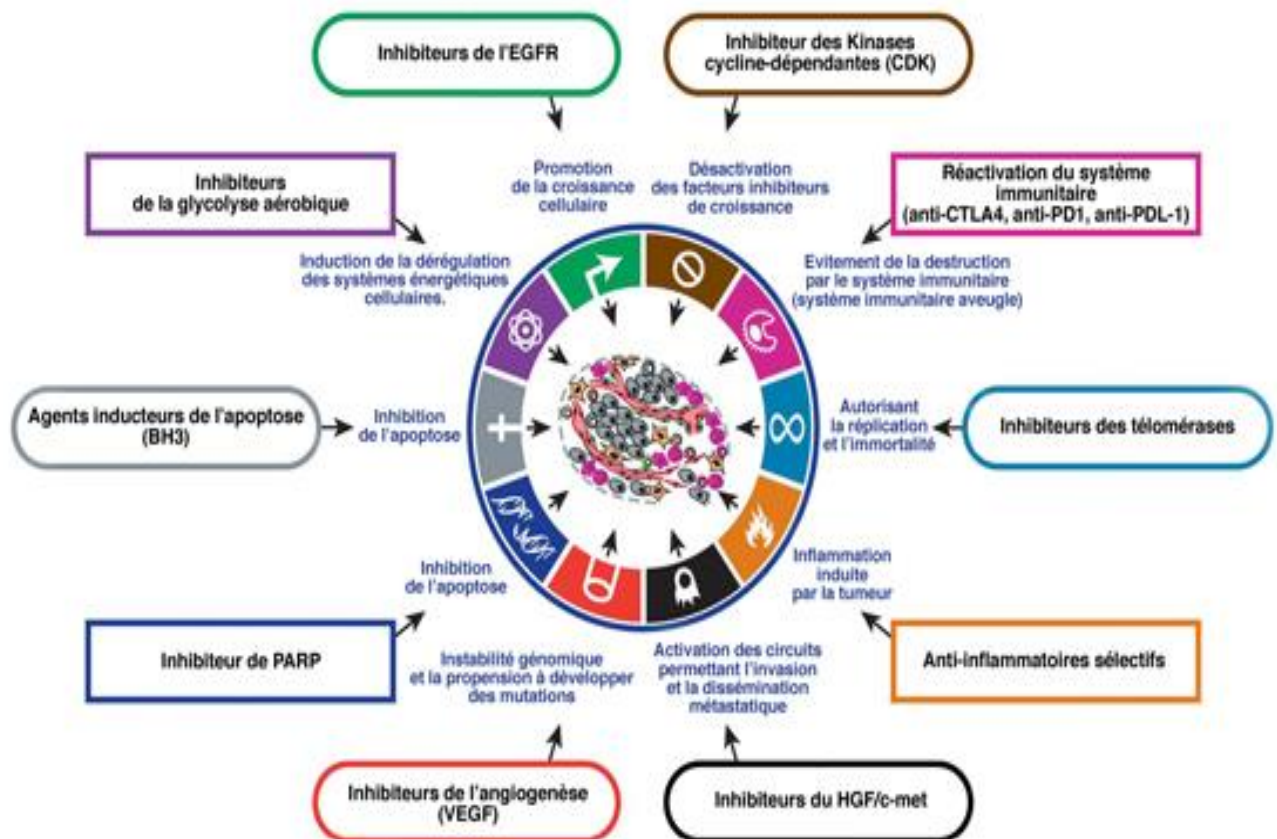
Annexe 13: Diagramme avec des mutations de BRAF trouvées dans le mélanome.



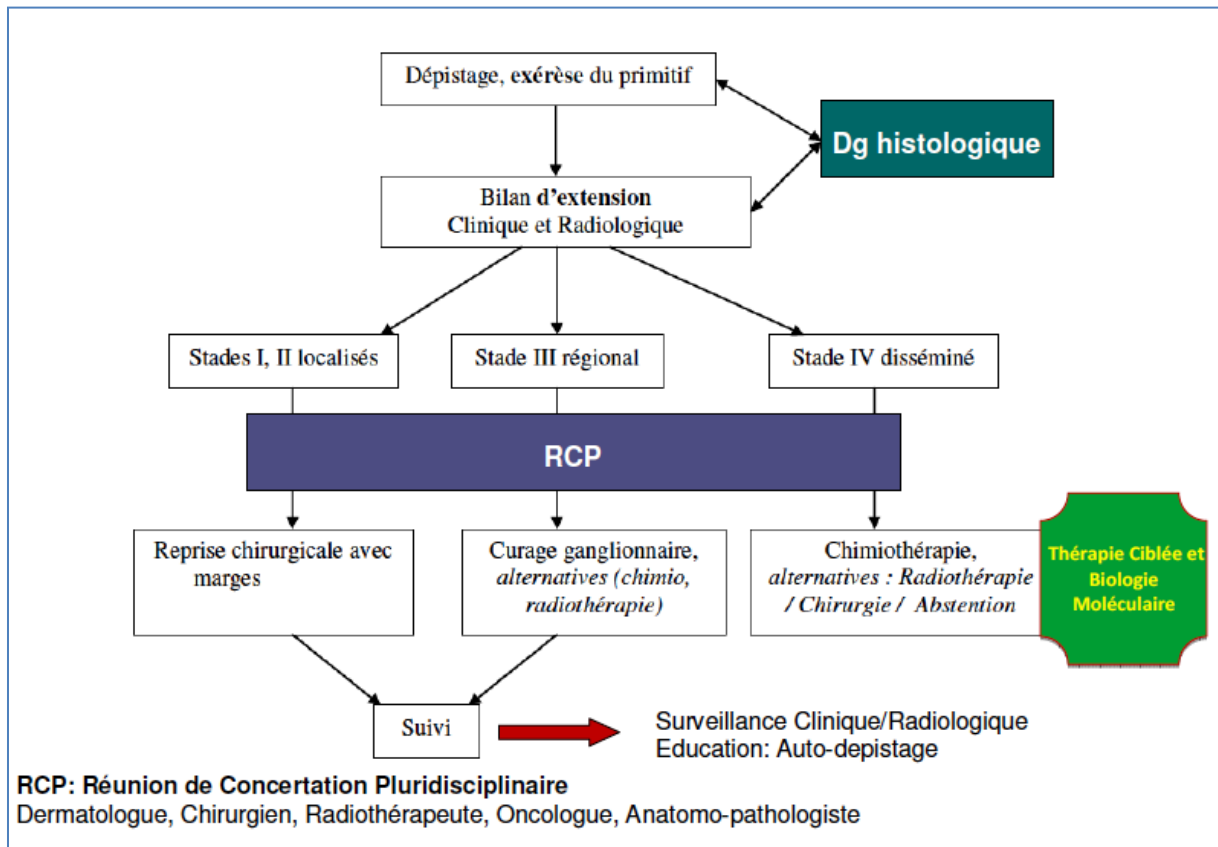
Les flèches noires indiquent les mutations. Les mutations à l'intérieur d'une boîte sont dans le même acide aminé. La mutation V600E de point névralgique est en rouge. Les nombres à l'intérieur des boîtes bleues indiquent l'exon dont est traduite chaque partie de la protéine. L'intérieur de trois boîtes représentent les régions conservées de la protéine avec les gènes ARAF et RAF-1 (CR1, CR2 et CR3). Un motif conservé de glycine (G-boucle) dans l'exon 11 est indiqué avec une barre rouge et le segment d'activation (AS) dans l'exon 15 avec une barre rose. C: Carboxyl-terminal; N: Amino-terminal. (Enric Domingo, et al 2004)

Annexe 14: La thérapie ciblée

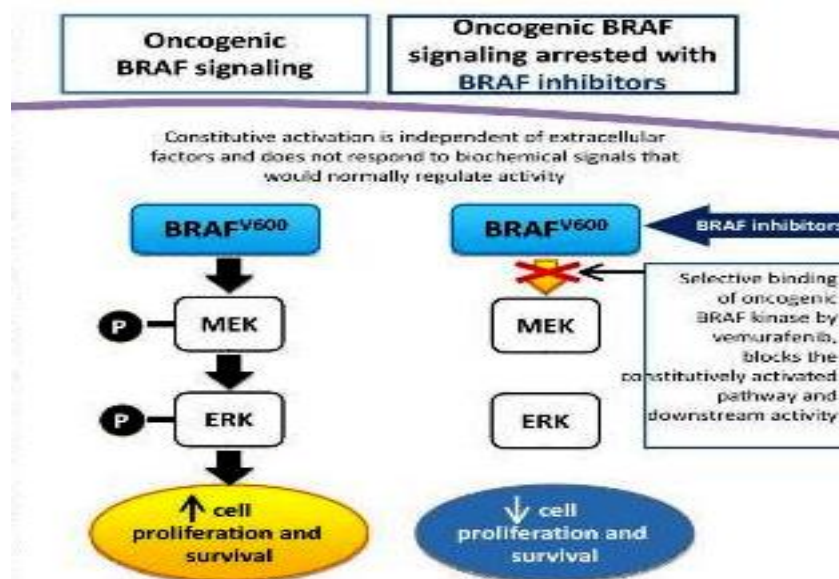
cibles thérapeutiques des biothérapies



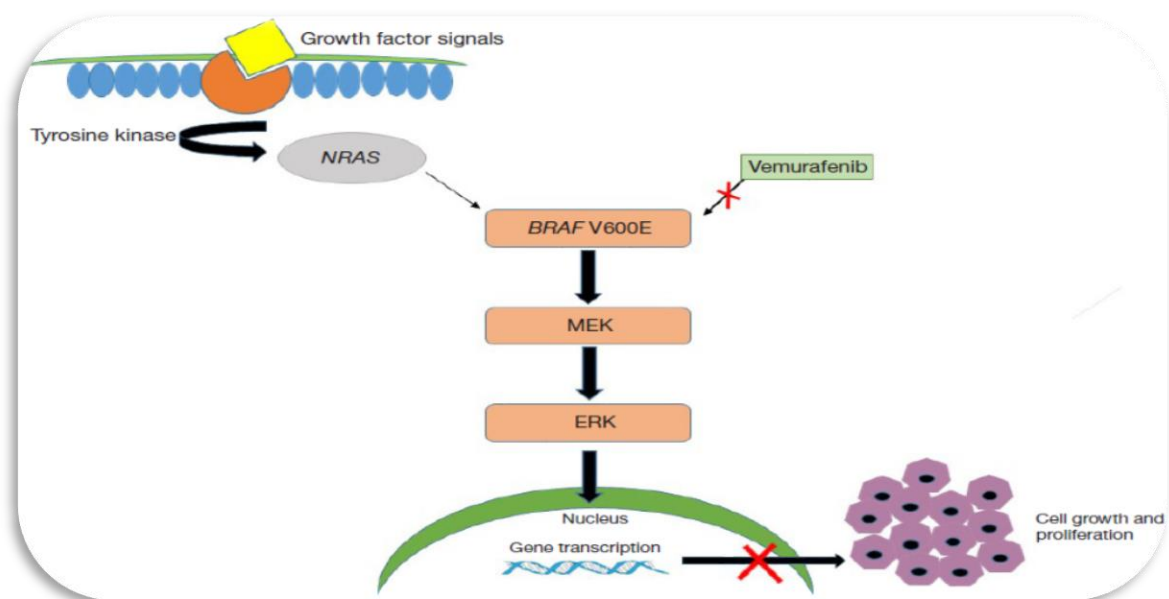
Annexe 15 : schéma de prise en charge d'un patient présentant un mélanome



Annexe 16: Mutation B-raf et la thérapie ciblée

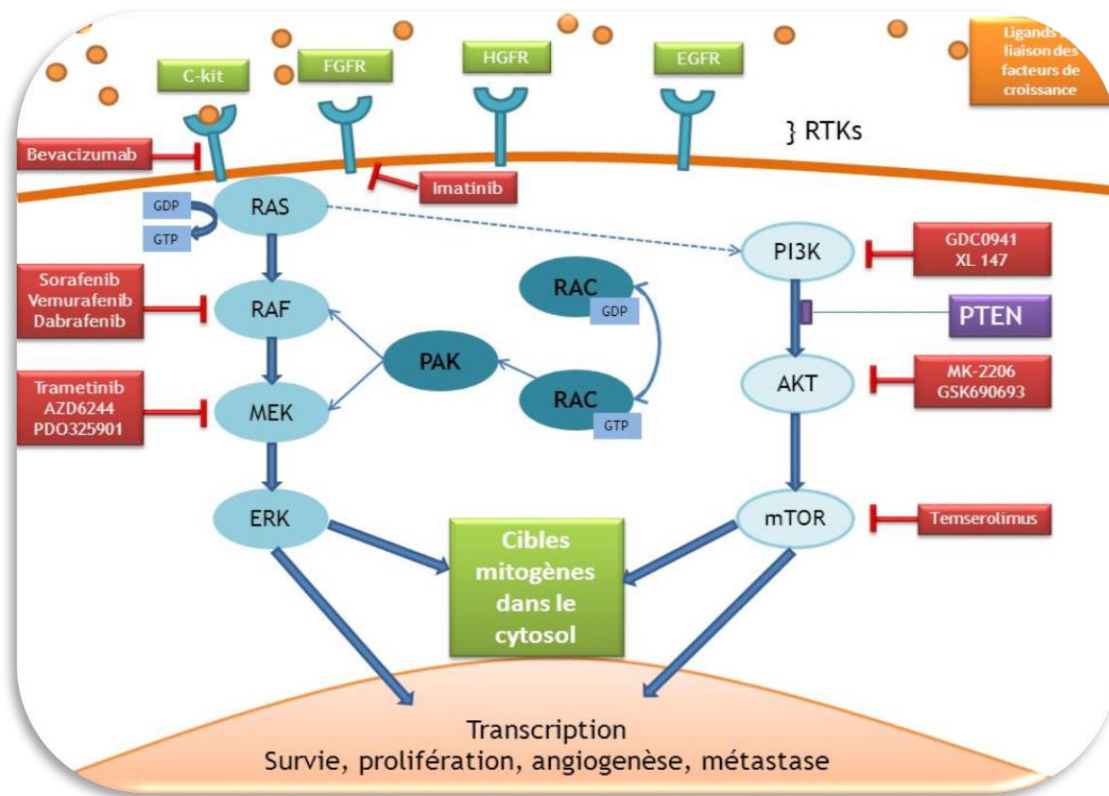


Annexe 17 : l'inhibition du Braf

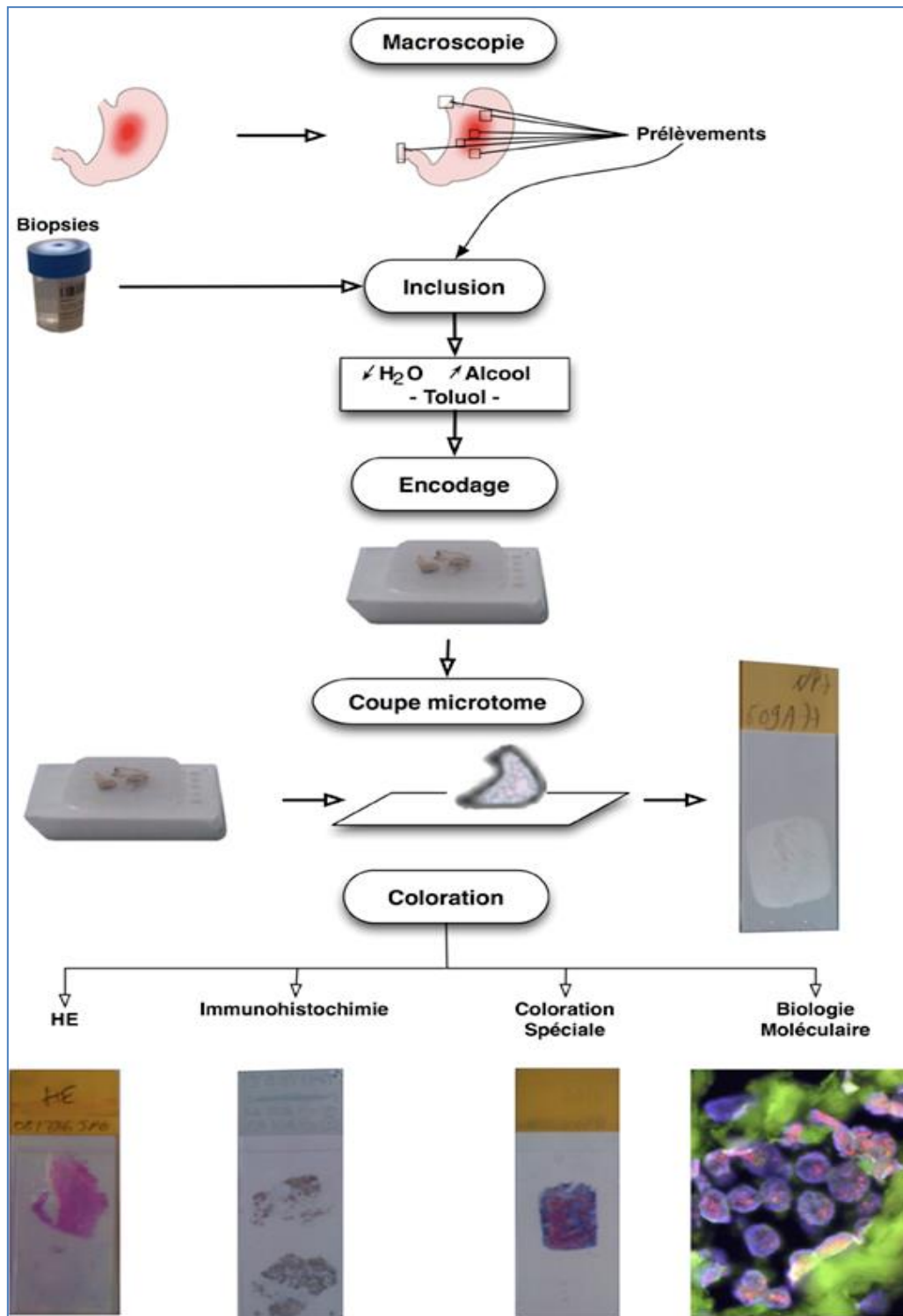


L'image affichée de multiples hypothèses pour acquérir la résistance à l'inhibition de BRAF aux agents chimio-thérapeutiques (inhibiteurs de BRAF) et des mécanismes provoquant MAPK réactivation. Ce processus conduit encore à une rechute tumorale suggérant ainsi des essais de thérapie combinatoire (inhibiteurs de BRAF, inhibiteurs de MEK et / ou Immunothérapie) à différents niveaux de la voie pour prévenir la progression de la tumeur. MAPK MAP kinases.

Annexe 18 : Le C-KIT et la thérapie ciblée



Annexe 19: les différentes étapes de la phase pré analytique



Annexe 20 : les grandes étapes d'anapath



Annexe 21 : matériel de teste de PCR

Réactifs :

1) Cobas® DNA Sample Preparation Kit

- DNA TLB (Tampon de lyse de tissu d'ADN)
- PK (Protéinase K)
- DNA PBB (Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine)
- WB I (Tampon de lavage I de l'ADN)
- WB II (Tampon de lavage II de l'ADN)
- DNA EB (Tampon d'élution de l'ADN)
- FT (Tubes de filtration avec bouchons)
- CT (Tubes de prélèvement)
-

2) Cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test

- RXNMIX (mélange réactionnel)
- MGAC (Acétate de magnésium)
- BRAF OM (Mélange oligo BRAF)
- BRAF MUT (Témoin mutant BRAF)
- BRAF WT (Témoin BRAF de type sauvage)
- DNA SD (Diluant d'échantillon d'ADN)

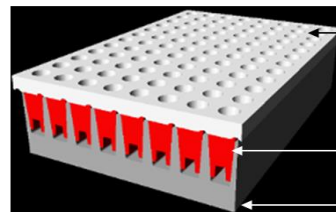
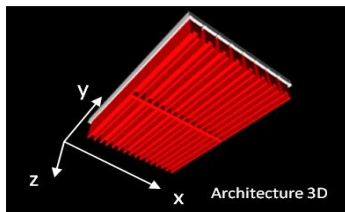
3) Autre Réactifs nécessaire

- Xylène
- éthanol absolu
- Isopropanol
- Eau stérile (eau de qualité PCR, ou eau de qualité biologique moléculaire)
- ✓ Appareillage Matériel et verreries : (annexe 25)
 - Pipettes sérologiques jetables et stériles : 5 et 25 mL
 - Plaque à micropuits (plaque AD) et film scelleur du système cobas® 4800
 - Pipetteurs multi-canaux (capacité 10 µL, 20 µL, 200 µL et 1000 µL) avec embouts de protection contre les aérosols ou à déplacement positif, exempts de DNase
 - Dispositif d'aide au pipetage
 - Microcentrifugeuse de table standard avec capacité de 20 000 x g
 - Deux (2) blocs à chaleur sèche avec capacité de chauffage de tubes de microcentrifugeuse à 56 °C et 90 °C
 - Tubes de microcentrifugeuse Safe-Lock de 1,5 mL, stériles, sans RNase/DNase, de qualité PCR
 - Spectrophotomètre UV-Vis Nano drop
 - Mélangeur vortex
 - Portoirs pour tubes de microcentrifugeuse
 - Gants jetables, non poudrés
 - Thermomètre étalonné pour bloc à chaleur sèche
 - Bain-marie pouvant maintenir une température de 37 °C
 - Lame d'étalement
 - Lame à tranchant unique ou similaire
- Instruments et logiciel
 - Analyseur cobas z 480
 - Unité de contrôle du système cobas® 4800 avec image Windows XP
 - Logiciel du système cobas® 4800 SR2, version 2.0
 - Logiciel d'analyse BRAF, version 1.0
 - Lecteur de codes-barres
 - Imprimante HP

Annexe 22 : Appareillage Matériels et instruments

Concept unique de Microplaque

- Technologie **Thermaxis®** :
 - Structure en bi-couche
 - Architecture en “V” des puits
- Miniaturisation Volume réactionnel : 0.5 – 2 μ l



Partie supérieure
non conductive

Couche conductrice des puits

Thermo-bloc



Microcentrifugeuse



Tubes de Safe-Lock



Nano drop

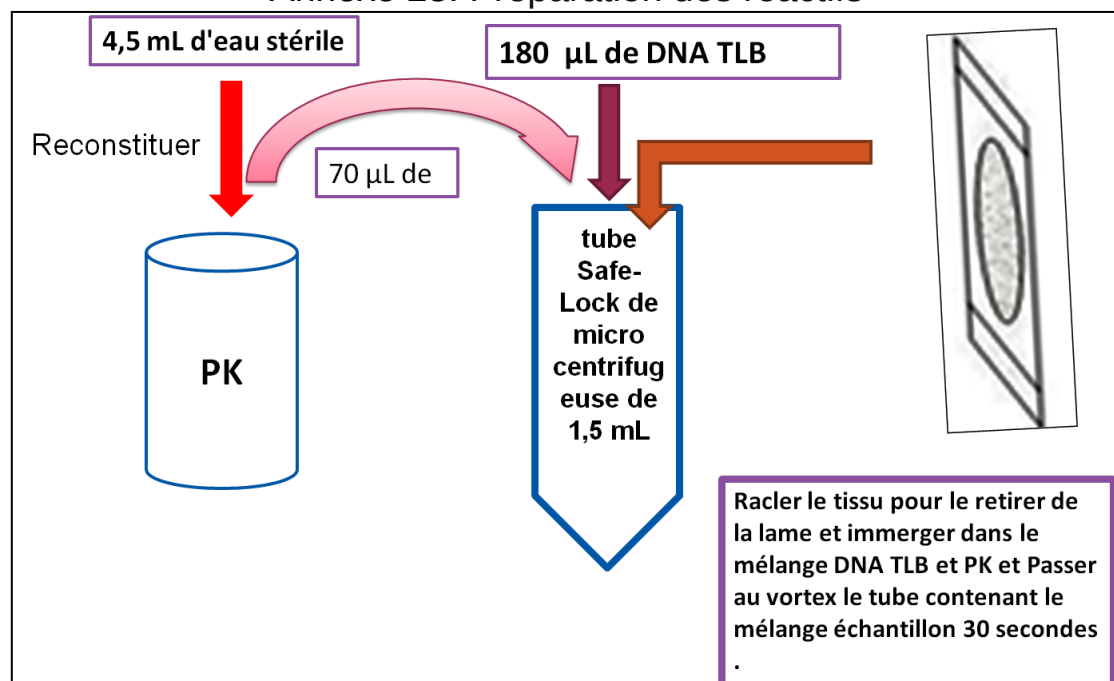


unité FT



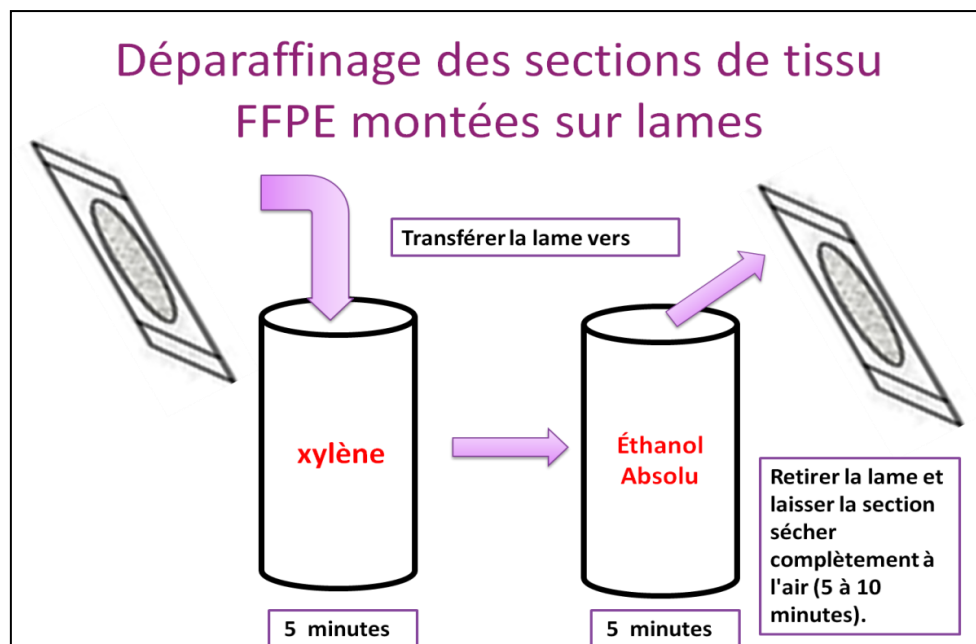
Instruments et logiciel

Annexe 23: Préparation des réactifs

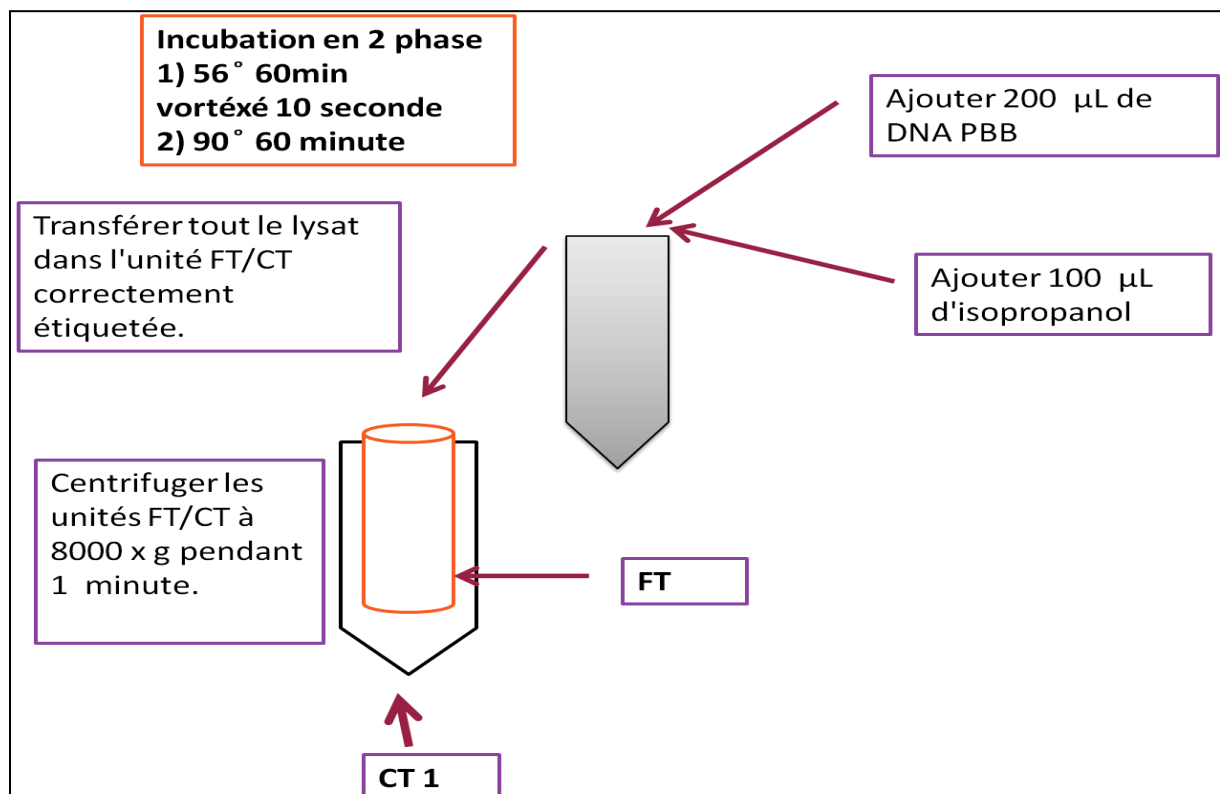


Digestion de la zone tumorale (protéinase K)

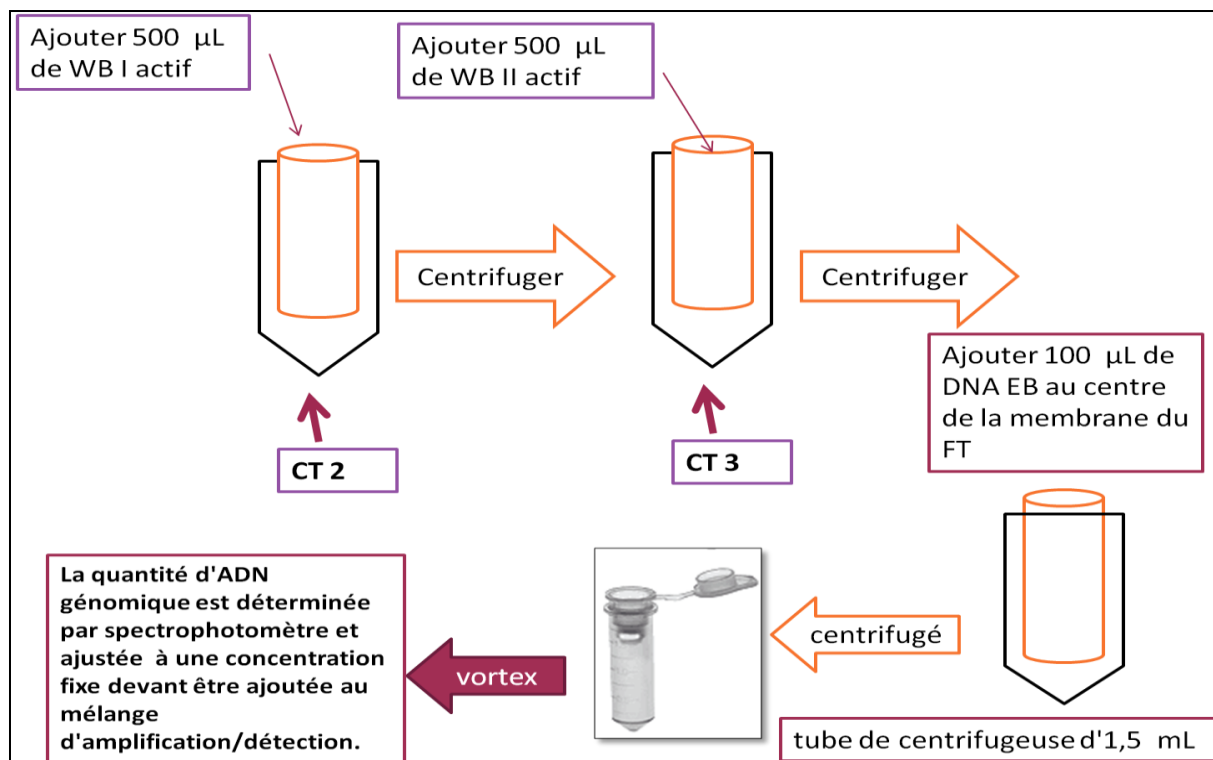
Annexe 24: Déparaffinage



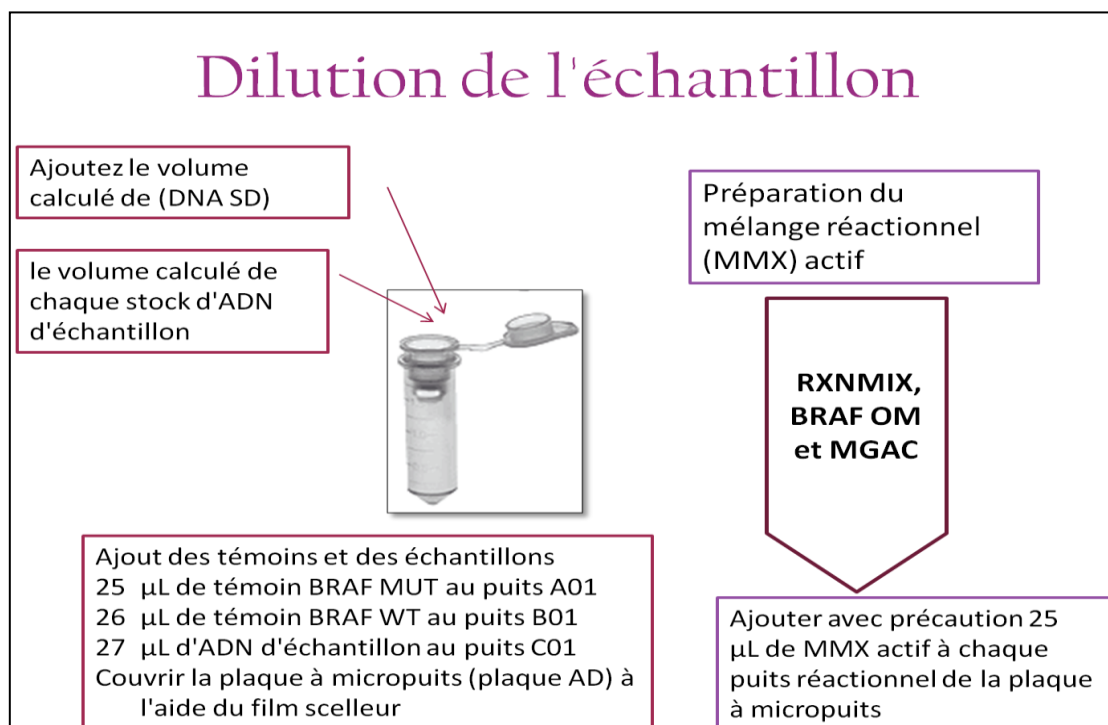
Annexe 25 : Isolation de l'ADN génomique sur filtre en fibre de verre



Annexe 26 : Purification d'ADN



Annexe 27 : Dilution de l'échantillon et préparation de MMX



Annexe 28 : Préparation du mélange réactionnel (MMX) actif

Volumes de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif											
Nbre d'échantillons*											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
RXN MIX	10 µL	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BRAF OM	8 µL	32	40	48	56	64	72	80	88	96	104
MGAC	7 µL	28	35	42	49	56	63	70	77	84	91
Volume total (µL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

* Nombre d'échantillons + 2 témoins + 1

Volume de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif

Ajouter avec précaution 25 µL de MMX actif à chaque puits réactionnel de la plaque à micropuits (Annexe 24) nécessaire pour le cycle d'analyse. Ne pas toucher la plaque à l'extérieur du puits avec l'embout de la pipette.

Annexe 29 : résultats de BRAF V600E mutation teste

cobas® 4800				Roche	
BRAF V600 Mutation Analysis Report					
Start of Run:	31-Mar-2014 14:09:56		DNA Isolation Kit ID #1:	AD1S131058E00D2	
Instrument Name:	Z480 CPMC 51433		Reagent Kit ID #1:	9A1S108221F0069	
Instrument Serial No:	51433_32294		Reagent Lot / Exp Date:	S10822 / Feb-2015	
Core Version:	2.0.1.1129		Operator:	Labmanager	
BRAF AP Version:	1.0.0.1028				
RUN STATUS VALID					
RUN NAME: 31-MAR-2014 14:09 BRAF					
Controls					
Position	Control Type	Kit#	Control Status	Flags	Accepted By
A01	Mutant Control	1	Valid		
B01	Wildtype Control	1	Valid		
Specimens					
Position	Sample ID	Kit#	Test Result	Flags	Accepted By
C01	12181/13	1	Mutation Not Detected		
D01	6427/13	1	Mutation Not Detected		
E01	14004/13	1	Mutation Not Detected		
F01	13337/13	1	Mutation Not Detected		
G01	5549/13	1	Mutation Not Detected		

Annexe 30 : Interprétation des résultats du test de mutation cobas®
4800 BRAF V600

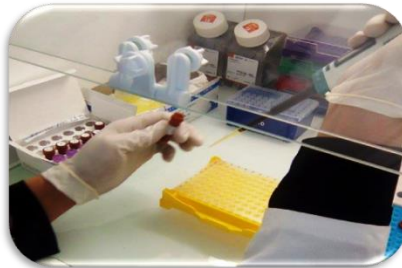
<i>Résultats du test de mutation cobas® 4800 BRAF V600</i>	<i>Interprétation</i>
Mutation Detected	Mutation détectée dans le site du codon 600 BRAF de l'exon 15
Mutation Not Detected*	Mutation non détectée dans le site du codon 600 BRAF de l'exon 15
Invalid	Le résultat est invalide. Répéter l'analyse des échantillons présentant des résultats invalides en suivant les instructions mentionnées à la section Réanalyse des échantillons présentant des résultats invalides ci-dessous.
Failed	Échec du cycle d'analyse en raison d'un problème matériel ou logiciel (Contacter votre distributeur local Roche pour obtenir une assistance technique.)

* Un résultat « Mutation Not Detected » n'exclut pas la présence d'une mutation dans le site du codon 600 du BRAF, car les résultats dépendent du pourcentage de séquences mutantes, de l'intégrité des échantillons, de l'absence d'inhibiteurs et d'une quantité suffisante d'ADN détectée.

Annexe 31 : Figure représente différents matériels ou méthodes utilisés lors de notre étude



Une des étapes de l'IHC
(bacs d'alcool et de xylène)



Une des étapes de la PCR



Solution DAB



Les lames d'HE durant le montage
par l'eukitt



Anticorps
CD117



Lames salinisé d'IH



La hôte



Microtome



Bain-marie

Annexe 32 : Les types du mélanome métastatique/ sexe/ l'âge/ la mutation c-kit et Braf ; des patients étudié dans notre travail

num	année	sexe	Age	Siège	C-Kit	BRAF
1	2010	F	28	Métastase ganglionnaire	+	
2	2010	H	45	Métastase ganglionnaire	+	
3	2010	F	89	métastase cutané	+	
4	2010	F	55	Métastase ganglionnaire	+	
5	2011	H	49	Métastase ganglionnaire	-	
6	2011	F	55	Métastase glandulaire	-	non muté
7	2011	H	79	métastase ganglionnaire	+	non muté
8	2012	H	35	métastase cutané	-	mutée
9	2012	F	46	métastase cutané	-	mutée
10	2012	H	52	métastase parotidienne	+	non muté
11	2012	F	60	métastase ganglionnaire	+	non muté
12	2013	H	41	métastase cutané	+	non muté
13	2013	H	62	métastase cutané	-	mutée
14	2013	H	64	Métastase ganglionnaire	intraitable	non muté
15	2013	H	44	métastase ganglionnaire	+	non muté
16	2013	F	79	métastase cérébrale	+	non muté
17	2014	H	27	Métastase ganglionnaire	-	muté
18	2014	F	60	Métastase ganglionnaire	-	non muté
19	2014	H	70	métastase hépatique	+	Non muté
20	2014	H	43	métastase osseuse	+	non muté
21	2015	F	34	métastase cérébrale	+	
22	2015	H	55	métastase cutané	-	
23	2015	F	58	métastase ganglionnaire	+	
24	2015	H	30	métastase hépatique	+	
25	2015	H	45	Métastase amygdalien	+	
26	2016	F	57	métastase ganglionnaire	+	
27	2016	H	45	métastase hépatique	+	