

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

**Aspects morphologiques, immunohistochimiques et
moléculaires du mélanome**

Présenté par :
NADJI Sihem

Soutenu le 26/06/2014 devant le jury composé de :

M ^{me} AISSANI. R	Maitre assistante A	à l'université de Blida	Présidente
M ^{me} OUAHIOUNE .W	Maitre de conférences A	à l'université de Blida	Examinatrice
M ^r BENYAHIA. N	Maitre assistant A	à l'université de Blida	Examineur
M ^{me} AMIR ZC.	Professeur	Faculté de Médecine Université Alger 1	Promotrice
M ^{me} BENAZOUZ .F	Maitre assistante A	à l'Université de Blida	Co-Promotrice
M ^r BOUZID K.	Professeur	faculté de Médecine Université Alger 1	Invité
M ^{me} HANNACHIL	Maitre de conférences A	Faculté de Médecine Université Alger 1	Invitée

Promotion **2013-2014**

Remerciements

Merci à notre bon dieu qui nous a donné la force et le courage nécessaire pour réussir ce travail.

A **Pr BOUZID KAMEL** je vous remercie vivement pour tous vos efforts, pour votre acharnement, votre disponibilité et surtout votre dévouement afin de mener à terme ce travail dont je vous en remercie.

A **Pr ASSLAH. F**, je vous remercie pour votre confiance et vos encouragements afin de poursuivre ce travail et de le mener à terme.

A ma promotrice **Pr AMIR Z-C** je ne peux vous remercier assez pour toute votre amabilité. Vous avez été toujours présente pour le moindre petit détail. Grâce à vous ce mémoire a pu voir le jour.

A ma co-promotrice **M^{em} BENAOUZ** pour sa disponibilité, ses conseils, ces orientations.

J'exprime ma sincère reconnaissance à l'ensemble des membres de ce jury pour avoir accepté de juger ce travail et pour avoir donné de leur temps précieux.

A **Pr HANNACHI.L** Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail, et pour avoir accepté de faire partie du jury.

A **M^{EM} IDRI HASSINA** pour son aide et ses explications sur l'étude moléculaire

Je tiens à remercier **M^{em}. BERKAN K, M^r.BELARBI A ; M^{em}. AIT YOUNES.S ; M^r SALAH LAOUER**; pour leurs soutiens et encouragements.

Je voudrais également exprimer mes remerciements à l'ensemble de l'équipe de service d'anatomo-pathologie et à toutes les personnes qui la composent.

DEDICACES

A la mémoire de mon Père NADJI BACHIR

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 consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma très chère mère SAIGHI HASNIA

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.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

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 ma très chère sœur SALIHA, ET son mari

Ma chère sœur qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.

A Mon ange gardien et mon fidèle compagnon dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse ma sœur NADIA.

A mes chères frères SALEH, SALEEM, HICHAM, et leurs femmes, a mon frère FOUZI

A mes chères sœurs AMINA et son mari SIDAHMED

A NESRIN et son mari SALIM

A CHAHRAZED et son mari DJAMEL

A mes nièces et mes neveux

A mes copines Amina, Djaouida et Amina

A tous mes amis et qui m'aime de près ou de loin.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier les aspects cliniques, anatomopathologiques, moléculaires des mélanomes, à travers une étude rétrospective et prospective respectivement entre 2008 et 2012 et 2013 et 2014. Cette étude à été menée sur des prélèvements colligés au laboratoire d'anatomo-pathologie du Centre hospitalo-universitaire, Mustapha Bacha (Alger). L'âge des patients varie entre 35 et 80 ans, en moyenne de 57.29 avec une prédominance féminine. De variable marqueurs des anomalies moléculaires et génomiques ont été utilisé afin de réaliser des marquages immuno-histochimiques à savoir : le melan A, le pS100, HMB 45, Ki67, le C-kit, la B-caténine, la p53 et la recherche de la mutation BRAF V600E par PCR en temps réel

Nos résultats montrent que sur le plan anatomo-pathologique, le mélanome cutané de type nodulaire est retrouvé dans 66,66% (6/9) des cas, L'indice de Breslow est de 3,27 mm en moyenne et le niveau de Clark était à V chez 7 patients (90%) et III chez 1 patient (10%). 08 cas de mélanome muqueux sont retrouvés. Ce dernier se répartie d'une façon homogène dans les différents types de muqueuse entre 1 et 2 cas/8. Les mélanomes à cellules mixtes sont les plus fréquentes (70%) dans la série des mélanomes de la choroïde. De plus, Les métastases ganglionnaires sont retrouvées dans 7/13 patients avec une fréquence de 54%.

Cette étude, montre cliniquement et histologiquement, une fréquence élevée de facteurs de mauvais pronostic à savoir le Ki67. Dans les quarantaines de cas qui ont bénéficié de la recherche de la surexpression du C-KIT, ont révélé un marquage dans 15 cas soit 37%. L'expression de la β -caténine est retrouvée dans la moitié des cas étudiés (20 cas) soit 50%. L'expression de la p53 a été notée dans 45% soit 18 cas dans la majorité a été <9%. En fin, la mutation BRAF V600E a été détectée dans 4 patients /8 des mélanomes cutané.

La variabilité génotypique associée au mélanome rend le ciblage thérapeutique complexe, et constitue actuellement un défi majeur en termes de traitement.

Mots clés : Mélanome, mélanocytes, BRAF, Ki67, p53, β -caténin, C-Kit, thérapie ciblée, métastase.

Abstract

The aim of our work was to study the molecular, clinical, pathological features of melanoma, through a retrospective and prospective study performed between 2008 and 2012, and 2013 and 2014 respectively. The samples collected were performed in the laboratory of anatomic-Pathology of university-hospital, Mustapha Bacha (Algiers). Patient's age varies between 35 and 80 years, averaging 57.29 with a female predominance. Variable molecular markers for genomic abnormalities have been used for immunolabelling, namely: melan A, PS100, HMB 45, Ki67, C-kit, the B-catenin, p53 and Research BRAF V600E mutation by real-time PCR.

Our results showed that, at the pathological level, cutaneous nodular melanoma, was found in 66.66% (6/9) of cases, the index of Breslow of 3.27 mm and the average level of Clark was V in 7 patients (90%) and III in 1 patient (10%). 08 mucosal melanoma cases were found. This last is homogeneously distributed in the different types of mucosa between 1 to 2 cases /8. Mixed cells melanomas are the most frequent (70%) in the series of choroidal ones. In addition, the ganglionic metastases are found in 7/13 patients with a frequency of 54%.

Genotypic variability associated with melanoma makes the complex therapeutic targeting, and is currently a major challenge in terms of treatment.

This study shows clinically and histologically, a high incidence of bad prognostic factors namely Ki67. In a number of 40 cases that have been subject of C-kit overexpression immunolabelling, 15 cases (37%) are immune-positive. The expression of β -catenin was found at 50% (20 cases). The expression of p53 was observed in 45% or 18 in most cases was <9%. Finally the BRAF V600E mutation was detected in 4 patients/ 8 cutaneous melanoma.

Genotypic variability associated with melanoma makes the complex therapeutic targeting, and is currently a major challenge in terms of treatment.

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier les aspects cliniques, anatomopathologiques, moléculaires des mélanomes, à travers une étude rétrospective et prospective respectivement entre 2008 et 2012 et 2013 et 2014. Cette étude à été menée sur des prélèvements colligés au laboratoire d'anatomo-pathologie du Centre hospitalo-universitaire, Mustapha Bacha (Alger). L'âge des patients varie entre 35 et 80 ans, en moyenne de 57.29 avec une prédominance féminine.

De variable marqueurs des anomalies moléculaires et génomiques ont été utilisé afin de réaliser des marquages immuno-histochimiques à savoir : le melan A, le pS100, HMB 45, Ki67, le C-kit, la B-caténine, la p53 et la recherche de la mutation BRAF V600E par PCR en temps réel

وقد استخدمت واسمات جزيئية متغيرة وتشوهات الجيني لتحقيق علامات هيسٲوكيميائية مناعة وهي: الميلانين A، PS100، HMB 45، Ki67، C-عدة، وB-catenin، البروتين p53 والبحث عن طفرة BRAF V600E بواسطة PCR في وقت حقيقي

Nos résultats montrent que sur le plan anatomo-pathologique, le mélanome cutané de type nodulaire est retrouvé dans 66,66% (6/9) des cas, L'indice de Breslow est de 3,27 mm en moyenne et le niveau de Clark était à V chez 7 patients (90%) et III chez 1 patient (10%). 08 cas de mélanome muqueux sont retrouvés. Ce dernier se répartie d'une façon homogène dans les différents types de muqueuse entre 1 et 2 cas/8. Les mélanomes à cellules mixtes sont les plus fréquentes (70%) dans la série des mélanomes de la choroïde. De plus, Les métastases ganglionnaires sont retrouvées dans 7/13 patients avec une fréquence de 54%.

نتائج مستوى المرضية تظهر أن سرطان الجلد العقدي الجلدي قد وجد في 66.66% (6/9) من الحالات، مستوى بريسٲو يقدر ب 3.27 مم كمتوسط و مستمى كلارك الخامس من 7 مرضى (90%) والثالث عند مريض واحد (10%). تم العثور على 08 حالات سرطان الجلد المخاطي موزعين بشكل متجانس في أنواع مختلفة من الغشاء المخاطي بين الحالات 1 و 8/2. الخلايا الميلانينية المختلطة هي الأكثر شيوعا (70%) في سلسلة من الميلانينية المشيمية. بالإضافة إلى ذلك، تم العثور على الانبثات العقدية في 7/13 حالة يعانون من تردد قدره 54%.

Cette étude, montre cliniquement et histologiquement, une fréquence élevée de facteurs de mauvais pronostic à savoir le Ki67. Dans les quarantaines de cas qui ont bénéficié de la recherche de la surexpression du C-KIT, ont révélé un marquage dans 15 cas soit 37%. L'expression de la β -caténine est retrouvée dans la moitié des cas étudiés (20 cas) soit 50%. L'expression de la p53 a été notée dans 45% soit 18 cas dans la majorité a été <9%. En fin, la mutation BRAF V600E a été détectée dans 4 patients /8 des mélanomes cutané.

La variabilité génotypique associée au mélanome rend le ciblage thérapeutique complexe, et constitue actuellement un défi majeur en termes de traitement.

ملخص

الهدف من عملنا هو دراسة الجوانب المرضية السريرية، الميلانينية الجزيئية، من خلال دراسة بأثر رجعي والمحتملين بين أعوام 2008 , 2012 , 2013 2014 على التوالي. أجريت هذه الدراسة على عينات جمعت في مختبر علم الأمراض في مستشفى مصطفى باشا الجامعي(الجزائر العاصمة). عمر المريض يتراوح بين 35 و 80 عاما، حيث بلغ متوسطها 57.29 مع أغلبية للإناث.

وقد استخدمت واسمات جزيئية متغيرة وتشوهات الجيني لتحقيق علامات هيستوكيميائية مناعية وهي: الميلانين A ، PS100 ، HMB 45 ، Ki67 ، C-عددة، و B-catenin ، البروتين p53 والبحث عن طفرة BRAF V600E بواسطة PCR في وقت حقيقي. نتائج مستوى المرضية تظهر أن سرطان الجلد العقدي الجلدي قد وجد في 66.66% (9/6) من الحالات، مستوى بريسلو يقدر ب 3.27 مم كمتوسط و مستمى كلارك الخامس من 7 مرضى (90%) والثالث عند مريض واحد (10%). تم العثور على 08 حالات سرطان الجلد المخاطي موزعين بشكل متجانس في أنواع مختلفة من الغشاء المخاطي بين الحالات 1 و 8/2. الخلايا الميلانينية المختلطة هي الأكثر شيوعا (70%) في سلسلة من الميلانينية المشيمية. بالإضافة إلى ذلك، تم العثور على الانبثاث العقدية في 13/7 حالة يعانون من تردد قدره 54%. وتبين هذه الدراسة السريرية والتشريحية وجود نسبة عالية من العوامل الغير متوقعة مثل Ki67. من بين الأربعين حالة التي استفادت من أبحاث overexpression من C-KIT، أظهرت 15 حالة أو 37% وجود واسمات.

تم العثور على التعبير عن β -catenin في نصف الحالات التي تمت دراستها (20 حالة) أو 50%. ولوحظ التعبير عن البروتين p53 في 45% أو 18 في معظم الحالات كان اقل من 9%. في النهاية، تم اكتشاف طفرة BRAF V600E في 4 مرضى من 8 القتامي الجلدي. التباين الوراثي المرتبط بسرطان الجلد يجعل استهداف العلاج المعقد، ويمثل حاليا تحديا كبيرا من حيث العلاج.

Abstract

The aim of our work was to study the molecular, clinical, pathological features of melanoma, through a retrospective and prospective study performed between 2008 and 2012, and 2013 and 2014 respectively. The samples collected were performed in the laboratory of anatomic-Pathology of university-hospital, Mustapha Bacha (Algiers). Patient's age varies between 35 and 80 years, averaging 57.29 with a female predominance. Variable molecular markers for genomic abnormalities have been used for immunolabelling, namely: melan A, PS100, HMB 45, Ki67, C-kit, the B-catenin, p53 and Research BRAF V600E mutation by real-time PCR.

Our results showed that, at the pathological level, cutaneous nodular melanoma, was found in 66.66% (6/9) of cases, the index of Breslow of 3.27 mm and the average level of Clark was V in 7 patients (90%) and III in 1 patient (10%). 08 mucosal melanoma cases were found. This last is homogeneously distributed in the different types of mucosa between 1 to 2 cases /8. Mixed cells melanomas are the most frequent (70%) in the series of choroidal ones. In addition, the ganglionic metastases are found in 7/13 patients with a frequency of 54%.

Genotypic variability associated with melanoma makes the complex therapeutic targeting, and is currently a major challenge in terms of treatment.

This study shows clinically and histologically, a high incidence of bad prognostic factors namely Ki67. In a number of 40 cases that have been subject of C-kit overexpression immunolabelling, 15 cases (37%) are immune-positive. The expression of β -catenin was found at 50% (20 cases). The expression of p53 was observed in 45% or 18 in most cases was <9%. Finally the BRAF V600E mutation was detected in 4 patients/ 8 cutaneous melanoma.

Genotypic variability associated with melanoma makes the complex therapeutic targeting, and is currently a major challenge in terms of treatment.

INTRODUCTION

Le mélanome est une tumeur rare mais son incidence semble augmenter de façon alarmante ces dernières années. C'est une néoplasie produite par la transformation maligne des mélanocytes ; ces cellules responsables de la production de la mélanine, donne sa pigmentation à la peau, aux cheveux et aux yeux. Les mélanocytes sont retrouvés sur la peau, les méninges, les muqueuses et les yeux. Pour cette raison, il existe plusieurs types de mélanome : les mélanomes cutanés, les mélanomes des muqueuses, les mélanomes oculaires et les mélanomes d'origine primaire inconnue. Le mélanome cutané est de loin le plus fréquent (91,2 %) tandis que les autres types sont beaucoup plus rares (oculaire 5,3 %; origine primaire inconnue 2,2 %; muqueuse 1,3 %). La présentation et la prise en charge varient en fonction du type de mélanome, d'où l'importance de les distinguer.

Les Mélanomes cutanés ont été classés en quatre principaux sous-types histologiques : diffusion superficielle, lentigo malin (Dubreuilh), acral lentigineux et nodulaire. Bien que ces sous-types de mélanomes particuliers soient distincts sur le plan clinique et histopathologique, une telle classification est sans valeur pronostique.

Il est actuellement admis que la plupart des mélanomes naissent « *de novo* ».

Le soleil est le principal facteur d'environnement impliqué dans l'épidémiologie du mélanome. Le rôle cancérogène des ultraviolets B (UVB) a été démontré. Du fait du changement du mode de vie, des campagnes de sensibilisation aux méfaits de l'exposition abusive au soleil sont en vigueur en Occident.

Le diagnostic du mélanome est anatomoclinique. Il repose sur l'anamnèse, l'aspect clinique étudié sur la base de l'« ABCDaire » et histologique.

La cancérogenèse est due au dérèglement de l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, la survie ou la mort cellulaire, une dérégulation secondaire à la survenue de mutations de ces gènes.

Afin de mieux comprendre la transformation cellulaire et pouvoir améliorer la prévention, le diagnostic précoce, le pronostic et la thérapie des mélanomes, il est crucial de connaître les mécanismes cellulaires et moléculaires qui ont lieu lors du développement des mélanomes

Le mélanome est un cancer à pouvoir hautement métastatique. Les cellules tumorales s'échappent de la peau pour aller former des métastases dans l'organisme. De ce fait, le mélanome représente la forme la plus redoutable de tous les cancers de la peau. Le pronostic est très sombre lorsque la maladie est disséminée. Jusqu'à tout récemment, peu d'options thérapeutiques étaient envisageables pour ces patients. La mise en évidence d'anomalies moléculaires telles que la mutation BRAF a ouvert de nouvelles options thérapeutiques.

La protéine BRAF est une composante clé de la voie RAS-RAF, qui intervient dans la croissance et la survie normales des cellules. Des mutations dans le gène BRAF induisent

une hyperactivité de cette voie, ce qui peut conduire à une croissance excessive des cellules et entraîner un cancer

Le gène BRAF peu connu avant 2002, est impliqué dans de nombreux types de cancers et surtout dans le mélanome cutané où il est activé par mutation ponctuelle chez plus de 50% des patients. Cependant sa fréquence n'est pas répartie de façon homogène dans les différents sous types de mélanomes. Elle serait plus fréquente dans les mélanomes de type SSM (superficial spreading melanoma) que dans les mélanomes muqueux ou acrolentigineux.

Des mutations du récepteur KIT, ligand du STF (Stem Cell Factor) sont retrouvées dans 5 à 10% des mélanomes muqueux ou acrolentigineux. Ce génotypage moléculaire des mélanomes avec des particularités selon les sous type cliniques et histologiques nous permet de comprendre que nous sommes devant des maladies différentes les unes des autres et qui devraient bénéficier de prise en charge thérapeutique particulières.

Les aspects cliniques, histologiques et biologiques de progression du mélanome sont actuellement mieux connus ; les développements technologiques récents ont, quant à eux, permis d'aborder les mécanismes moléculaires de la progression tumorale et de mettre en lumière des gènes impliqués dans cette évolution. Toutefois, des difficultés importantes persistent : il existe une grande variabilité dans l'expression de ces gènes, non seulement d'un patient à l'autre, mais aussi selon les stades de la maladie, locaux ou métastatiques ; par ailleurs, certaines des mutations retrouvées au cours du mélanome peuvent également être présentes dans des lésions bénignes (nævus). La variabilité génotypique associée au mélanome rend le ciblage thérapeutique complexe, et constitue actuellement un défi majeur en termes de traitement.

L'objectif de notre travail est d'étudier les aspects cliniques, anatomopathologiques, moléculaires des mélanomes, à travers une étude rétrospective et prospective respectivement entre 2008 - 2012 et 2013 - 2014. Cette étude à été menée sur des prélèvements colligés au Service d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalo-Universitaire, Mustapha (Alger).

Chapitre I : Généralités

1. Définition :

Le mélanome est une tumeur rare mais son incidence semble augmenter de façon alarmante ces dernières années. C'est un néoplasie secondaire à la transformation maligne des mélanocytes, cellules responsables de la production de la mélanine qui donne sa pigmentation à la peau, aux cheveux et aux yeux. Les mélanocytes sont retrouvés sur la peau, les méninges, les muqueuses et la choroïde. 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. 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 .ZC -TIDADINI, 2013)

2. Etiologie :

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 :

2.1. Facteurs extrinsèques :

- Le rayon ultra violet, les rayons B, Rayons X sont les facteurs les plus incriminés.
- Les produits chimiques tels que : arsenic, goudron...
- Les Virus : papillomavirus 'HPV'

2.2. Facteurs Intrinsèques : Qui peuvent être de type

- Immunitaires avec une carence immunitaire innée
- Génétiques : troubles de la mélanine Troubles de la réparation de l'ADN.

3. Epidémiologie :

Le taux d'incidence standardisée à la population mondiale est estimé chez l'homme à 9,7 et chez la femme à 10,1 pour 100 000 habitants en 2011. Trois quarts des cas environs, sont diagnostiqués au-delà de 49 ans. En 2005, l'âge moyen au diagnostic est estimé à 60 ans chez l'homme et 58 ans chez la femme. (Arnaud .P, Jérôme .V .2011.)

La fréquence des mélanomes en Algérie semble, en effet, en augmentation 53 nouveaux cas ont été colligés en l'espace de 02 ans dans le service de pathologie de l'EHS de Douéra (Ouahioune.W, 2007)

Dans le registre du Service d'Anatomie Pathologique de Douéra ; Actuellement, nous dépassons les 30 nouveaux cas par an, dont, malheureusement, près de la moitié sont diagnostiqués au stade de métastase. (Ouahioune .W, 2013).

4. Aspects Cliniques Du Mélanomes :

La suspicion de mélanome est clinique, mais le diagnostic est histologique.

L'histologie permet de poser voire d'affirmer le diagnostic, grâce à des critères morphologiques. (ILIE .M, 2012)

Environ un tiers de tous les mélanomes se développe à partir d'une tache pigmentée. La règle dite A-B-C-D permet de distinguer une tache pigmentée bénigne d'une tache pigmentée suspecte (annexe 1). (Broccard .N, 2009)

Règle ABCDE (annexe 1) : Un mélanome est habituellement :

- une lésion asymétrique (**A**) ;
- une lésion à bords (**B**) irréguliers, souvent encochés ou polycycliques ;
- une lésion à couleur (**C**) inhomogène (brun, noir, marron ou bleu, zones dépigmentées, halo inflammatoire) ;
- une lésion avec un diamètre (**D**) supérieur à 6mm (critère non spécifique) ;
- une lésion d'évolution (**E**) récente documentée (extension en taille, en forme, en couleur, en relief). (BASSET .N, et al, 2003)

5. Aspects histologiques

L'histogénèse des mélanomes se déroule sur un mode biphasique (annexe 2). Dans une première phase, l'extension est « horizontale » intra-épidermique, au-dessus de la membrane basale. Dans une seconde phase, l'extension est « verticale » avec envahissement du derme superficiel (phase micro-invasive), puis du derme profond et de l'hypoderme (phase invasive). Le mélanome a donc en règle :

Une composante intra épidermique faite de mélanocytes qui constituent une nappe ou des thèques disposées irrégulièrement le long de la basale, associée à un envahissement des couches superficielles de l'épiderme par des cellules tumorales migrant de façon isolée et anarchique ;

Une composante dermique invasive parfois associée à une réaction inflammatoire (annexe 2) (Basset .N, et al, 2003)

L'examen anatomopathologique précise s'il s'agit bien d'un mélanome, son type histologique, son épaisseur (indice de Breslow, voir annexe 3), la présence d'une ulcération, et mesure l'indice mitotique (nombre de mitoses/mm²) pour les mélanomes fins. Enfin, il indique le caractère complet ou non de l'exérèse. Même si l'exérèse est complète, en fonction du Breslow, une reprise chirurgicale sera réalisée. (CHAGNON .S.et al 2012)

a. Ce que permet l'analyse histologique des mélanomes

- ~ Confirmer le diagnostic en se basant sur des critères cytologiques et architecturaux
- ~ Déterminer l'épaisseur par l'indice de Breslow (facteur pronostic ++), à l'aide d'un micromètre oculaire
- ~ Déterminer le caractère ulcéré ou non (facteur pronostic)
- ~ Evaluer la présence de mitoses
- ~ Déterminer le degré d'invasion de la peau par l'indice de Clark, c'est à dire quelle structure est envahie en profondeur, indépendamment de l'épaisseur de la lésion, dépendant uniquement des zones anatomiques ; permet de définir le traitement complémentaire

b. Les critères architecturaux sont appréciés faible grandissement

- ~ Asymétrie de la lésion
- ~ Mauvaise délimitation latérale
- ~ Thèques mélanocytaires épidermiques confluentes, variables en taille et forme, disposées de façon désordonnée (« pontage »)
- ~ Prédominance de mélanocytes isolés intra-épidermiques, d'extension pagétoïde, disposés de façon désordonnée
- ~ Composante dermique invasive sans gradient de maturation

c. Les critères cytologiques sont définis au fort grandissement

- ~ Pléomorphisme nucléaire (variabilité dans la taille)
- ~ Nucléole proéminent
- ~ Mitoses atypiques
- ~ Pigment mélanique poussiéreux, verdâtre (*ILIE . M 2012*)

5.1. Formes anatomo-cliniques

Six sous-types histologiques du mélanome ont été décrits (*Porras and Cockerell, 1997; Scolyer et al. 2011*) (annexe 4)

a- Le mélanome à extension superficielle (SSM : Superficial Spreading Melanoma des anglo-saxons)

Le mélanome à extension superficielle est la forme la plus fréquente de mélanome ; il représente 70% des cas environ. Il se caractérise par une phase de croissance horizontale intra-épidermique (mélanome *in situ*) qui précède de plusieurs mois à plusieurs années une phase de croissance verticale, les cellules malignes franchissent dès lors la jonction dermo-épidermique.

Pendant sa phase de croissance horizontale qui suit le modèle de Clark, le mélanome présente l'aspect d'une lésion pigmentée à contours irréguliers polycycliques, de couleur inhomogène ou polychrome (noir, marron, rouge, achromique), de diamètre supérieur à 5 mm et dont l'aspect change dans le temps (évolutif).

b - le mélanome nodulaire (NM : Nodular Melanoma)

Le mélanome nodulaire représente 15 à 30% des mélanomes (*Ibrahim and Haluska, 2009*), il se présente sous la forme d'un nodule généralement de couleur noire mais parfois achromique, ferme, arrondi, pouvant s'ulcérer, suinter ou saigner. Sa croissance est très rapide (de quelques semaines à quelques mois) et d'emblée verticale. En conséquence, l'épaisseur tumorale (indice de Breslow) est souvent élevée, l'indice de Breslow étant le principal critère pronostic du mélanome.

c - Le mélanome de Dubreuilh (LM vs LMM : Lentigo Maligna Melanoma) (Annexe 4 B)

Le mélanome de Dubreuilh se développe au niveau des zones soumises à une photo-exposition chronique telles que la tête (et en particulier les joues) et le cou. La peau péri-tumorale est le siège d'une élastose solaire et l'épiderme est atrophique. L'âge moyen de diagnostic est beaucoup plus élevé que pour les autres formes de mélanome et se situe aux environs de 65 ans. La phase de croissance horizontale intra-épidermique dure plusieurs années avant que les cellules tumorales franchissent la jonction dermo-épidermique (phase d'envahissement vertical). Le mélanome de Dubreuilh se présente sous la forme d'une lésion pigmentée inhomogène allant du noir au marron foncé. En l'absence de traitement et après plusieurs années, le mélanome de Dubreuilh évolue vers une forme localement invasive. Bien que la phase initiale de développement intra-épidermique soit très lente, dès que le mélanome de Dubreuilh acquiert la capacité de franchir la jonction dermo-épidermique, son pronostic et son potentiel de progression dans l'organisme deviennent alors comparables aux autres mélanomes.

d - Le mélanome acrolentigineux (ALM : Acral Lentiginous Melanoma)

Le mélanome acrolentigineux ne représente que 5% des mélanomes de la population générale mais c'est la forme clinique majoritairement retrouvée chez les populations de phototype foncé (*Ibrahim and Haluska, 2009*).

Dans sa phase initiale il se présente le plus souvent sous la forme d'une tache brune ou noire, aux contours irréguliers au niveau de la plante des mains ou des pieds. Le mélanome acrolentigineux peut également se localiser au niveau de la matrice de l'ongle ou sur la peau péri-unguéale, sur n'importe quel doigt ou orteil ; il a alors le plus souvent l'aspect d'une bande pigmentée longitudinale. Les signes cliniques évocateurs sont : une bande mélanique > 6 mm de large, un élargissement proximal, une irrégularité de la pigmentation, une extension péri-unguéale de la pigmentation (*signe de Hutchinson*).

e - Les mélanomes muqueux (mucosal melanoma)

Les mélanomes muqueux sont des mélanomes rares puisqu'ils représentent moins de 5% de ces derniers. Ils peuvent toucher l'ensemble des muqueuses avec une prédilection pour la vulve, le vagin, le naso-pharynx et les sinus. Ils se présentent le plus souvent sous la forme d'une tache ou d'un nodule brun.

f- Les mélanomes choroïdiens (uveal melanoma)

Ce sont des mélanomes localisés dans l'œil, ils peuvent affecter l'iris, le corps ciliaire ou la choroïde ; cette dernière localisation étant la plus fréquente. Ils sont rares. Cependant il est à noter que cette forme est particulièrement agressive puisque plus de 50% des patients développent des métastases à distance, avec une prédilection particulière pour les localisations secondaires hépatiques (Jovanovic. P *et al.* 2013).

6. Classification et facteurs pronostiques du mélanome cutané

Après l'exérèse chirurgicale du mélanome, la classification utilisée est la classification pTNM avec stades de l'Union internationale contre le cancer (UICC) et de l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC), (**annexe 5, 6 et 7**).

La classification en stades peut être simplifiée ainsi :

- stades I et II : mélanomes localisés ;
- stade III : mélanomes avec métastases locorégionales cutanées ou ganglionnaires ;
- stade IV : mélanomes avec métastases à distance. (*CHAGNON. S et al* 2012)

6.1. Indice de Breslow (annexe 3)

L'indice de Breslow, consiste en la mesure en millimètres de la hauteur totale du mélanome (de la surface vers la profondeur), c'est un facteur pronostique majeur qui dépend donc de l'épaisseur calculée.

6.2. Ulcération

L'ulcération est un facteur pronostique indépendant qui indique un pronostic plus mauvais et un risque plus élevé de tumeur métastatique comparativement à un mélanome non ulcéré de la même épaisseur. L'ulcération des mélanomes est définie comme l'absence d'épiderme intacte recouvrant une partie importante du mélanome primitif sur la base d'un examen microscopique de l'épiderme.

6.3. Degré d'invasion

Le degré d'invasion déterminé par les niveaux de Clark est un facteur pronostique important pour les mélanomes de faible épaisseur seulement (< 1,0 mm). Il est donc inclus dans la classification par stades des lésions T1, l'invasion jusqu'au niveau de Clark IV ou V augmentant le stade de la tumeur d'un sous-groupe (Annexe 6).

6.4. Autres facteurs pronostiques

D'autres facteurs pronostiques comprennent le sexe, le site anatomique, l'âge, le type de croissance, la présence de lymphocytes infiltrant la tumeur et l'indice mitotique.

6.5. Classification des ganglions par stades

Lorsque l'on évalue l'atteinte ganglionnaire, le nombre de ganglions lymphatiques atteints est le facteur pronostique le plus important. Une biopsie du ganglion lymphatique sentinelle est recommandée pour toutes les tumeurs mesurant entre 1,0 et 4,0 mm, y compris les mélanomes de faible épaisseur (< 1,0 mm) dont le degré d'invasion correspond au niveau de Clark IV ou V.

Une telle intervention ne doit pas être effectuée pour les tumeurs > 4,0 mm, car le risque de métastases hématogènes est si élevé que les données pronostiques peuvent ne pas être valides.

6.6. Nombre de ganglions lymphatiques atteints

Le nombre de ganglions lymphatiques métastatiques était le facteur prédictif et pronostic le plus important selon l'analyse de régression de Cox, et n'était pas dépendant du fardeau tumoral réel. L'atteinte ganglionnaire est divisée en 3 sous-groupes :

- N1, patients dont un ganglion est atteint
- N2, patients dont 2 ou 3 ganglions sont atteints
- N3, patients dont 4 ganglions ou plus sont atteints.

6.7. Micrométastases vs macrométastases

Le fardeau tumoral est le deuxième facteur pronostique le plus important chez les patients présentant des métastases ganglionnaires.

Des **micrométastases** sont présentes lorsque des ganglions sans signes cliniques ou radiologiques de mélanome présentent des métastases documentées sur le plan pathologique.

Des **macrométastases** sont présentes chez les patients dont les ganglions lymphatiques présentent des signes cliniques et pathologiques de métastases issues d'un mélanome. Le taux de survie diffère entre ces deux groupes (Annexe 7). (WANG .E, 2003)

7. 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 8). 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.

7.1. Stratégies thérapeutiques

Les options thérapeutiques sont définies en fonction notamment de la localisation, du stade, de l'histologie et de l'état général. (Annexe 8 et 9)

La chirurgie est le traitement de référence du mélanome cutané non métastatique.

Dans les **stades I**, la chirurgie est réalisée seule.

Dans les **stades II**, une **immunothérapie** par interféron alpha peut être proposée en traitement adjuvant si l'indice de Breslow est supérieur à 1,5 mm.

Dans les **stades III**, le curage ganglionnaire, associé à une chirurgie de la lésion, est le traitement standard ; une **immunothérapie** par interféron alpha peut être proposée en traitement adjuvant ;

Une **chimiothérapie** peut être proposée pour le traitement des mélanomes avec atteinte cutanée ou ganglionnaire non résecables. Les bénéfices attendus et les effets indésirables doivent être discutés avec le patient ; Une **radiothérapie** peut être proposée après discussion en RCP.

Dans les **stades IV** :

L'exérèse chirurgicale des métastases doit être systématiquement discutée ;

Une **radiothérapie** peut être proposée après discussion en RCP ;

Une **chimiothérapie** peut être proposée pour le traitement des mélanomes avec atteinte métastatique viscérale. Les bénéfices attendus et les effets indésirables doivent être discutés avec le patient ; de **nouvelles molécules** sont maintenant disponibles.

Peuvent être utilisées notamment dans des situations particulières proposées en RCP :

- la destruction des métastases par radiofréquence ;
- la cryochirurgie des métastases hépatiques ;
- la chimiothérapie par perfusion de membre isolé ;
- la radiothérapie stéréotaxique intra et extra crânienne.

7.2. Chimiothérapie et nouvelles molécules

Chez les patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique, plusieurs molécules de chimiothérapie sont disponibles : Dacarbazine et Fotemustine (en particulier en cas de métastases cérébrales).

Récemment, de nouvelles molécules ont été mises à disposition :

- l'ipilimumab, anticorps monoclonal, indiqué à ce jour dans le traitement du mélanome avancé (non résecable ou métastatique) en deuxième ligne ;

- le vemurafenib, thérapie ciblée en ATU, indiquée dans le traitement des patients atteints de mélanome non résecable ou métastatique, porteurs d'une mutation BRAF V600E et ne pouvant être inclus dans un essai clinique de thérapie ciblée. (CHAGNON .S. et al 2012)

8. Carcinogénèse et biologie moléculaire des mélanomes :

8.1. Le mélanocyte et son environnement

- 1) Le mélanocyte: cellule à l'interface derme/épiderme responsable de la synthèse de mélanine. Réponse au stress Génotoxique UV induit
- 2) le Dialogue entre le mélanocyte et son microenvironnement est essentiel à l'homéostasie tissulaire.
- 3) Rupture du dialogue, signature du début du processus oncogénique

8.2. Voies de régulation de la fonction du mélanocyte.

Les kératinocytes expriment divers facteurs de croissance qui se lient aux récepteurs de mélanocytes qui régulent les voies intracellulaires critiques. L'expression de ces facteurs est augmentée après des dommages à la peau comme après exposition aux rayons UV. Des mutations germinales dans p16INK4A et CDK4 (bleu clair) prédisposent à mélanome familial. KIT, ARN et BRAF (blanc) sont muté somatiquement dans les mélanomes. Variantes MC1R et ASIP (jaunes) confèrent un risque accru de développement de mélanome. De plus les macrophages qui infiltrent la peau après les rayons UV peuvent stimuler les mélanocytes. Activation des voies dépeint le résultat dans la

production de pigments accrue et de la distribution vers les kératinocytes adjacentes et a augmenté la survie, la réparation de l'ADN et la prolifération du mélanocyte. (Annexe 10) (Graeme .W, 2011)

8.3. Du mélanocyte au naevus puis au mélanome

Processus tumorale

Plusieurs étapes chacune marquée par l'émergence d'un nouveau clone possédant des avantages de croissance (Annexe 11)

a- Peau normal: distribution homogène des mélanocytes

b- Naevus bénin mélanocytaire, augmentation du nombre de mélanocytes (jonctionnel, dermique ou composé). Certains sont dysplasiques avec des mélanocytes morphologiquement atypiques.

c- Phase de croissance radiale (horizontale, RGP) du mélanome stade de tumeur primaire.

d- Phase de croissance verticale (VGP) du mélanome.

Première étape ayant un potentiel malin.

- ✓ L'oncogenèse se caractérise initialement par l'affranchissement progressif de la cellule de son environnement tissulaire.
- ✓ L'apparition d'un cancer est un processus qui s'étend sur de nombreuses années.
- ✓ C'est une maladie génétique des cellules somatiques.
- ✓ La tumeur a pour origine une unique cellule qui s'est dérégulée.
- ✓ Acquisition progressive par la cellule des mutations successives lui conférant des propriétés nouvelles (résistance, proliférative ...)
- ✓ La carcinogenèse est un phénomène à plusieurs étapes, par un processus cumulatif d'événements mutationnels interdépendants.
- ✓ Par activation d'oncogènes (gènes intervenant dans les voies d'activation et/ou le contrôle de la prolifération cellulaire) et par inactivation d'anti-oncogènes (gènes suppresseurs de tumeur, contrôlant l'intégrité du génome).
- ✓ Le développement oncogénique reste un événement rare comparé au nombre d'agressions subies par les cellules au cours leur vie. (Gray-Schopfer.V, et al, 2007)

9. PROGRESSION DE MÉLANOME

Le mélanome, le plus meurtrier des cancers de la peau, est causé par la transformation des mélanocytes (cellules productrices de pigment) qui accumulent des altérations génétiques, conduisant à la prolifération anormale et à la dissémination. L'American Cancer Society' estime que l'incidence est en augmentation. La prédisposition à la maladie semble être influencée par le patrimoine génétique de l'individu, le statut de pigmentation de la peau et l'exposition aux rayons ultraviolets (dans le cas de mélanome cutané). Cliniquement, les lésions du mélanome peuvent être classées selon la localisation et la progression, allant des naevi bénins aux mélanomes métastatiques, toutefois le staging TNM (Tumeur-Noeud-Métastases) met l'accent sur l'épaisseur du mélanome, l'ulcération, l'extension ganglionnaire lymphatique et les métastases viscérales ou non viscérales. Le schéma de classification actuelle ne permet pas toujours de prédire la survie ou la réponse au traitement ; l'hétérogénéité génétique et les processus moléculaires impliqués dans cette maladie doivent également être pris en compte. (Annexe 12)

10. INCIDENCE, TYPES, ET GÈNES DE MUTANT ASSOCIÉS

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*). 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 de *N-RAS* sont présentes dans 5 % à 20 % des mélanomes. Quant aux mutations du gène *BRAF*, la plus commune est la mutation substitutive V600E (anciennement V599E), présente dans près de 66 % des cas de mélanome. (Dalle.s et al 2006)

10.1 Instabilité génétique une caractéristique du mélanome :

- Le mélanome est caractérisé par l'abondance et la variété des mutations somatiques.
- Les cibles de ces mutations sont les gènes codant des protéines Kinases, des facteurs des voies de signalisation majeures intracellulaires, des facteurs de transcription ou des suppresseurs de tumeurs.
- Les mutations ponctuelles (plus que les délétions ou duplication) semblent les aberrations les plus décisives pour la progression.
- De nombreuses mutations des mélanomes ont souvent une signature UV et concerne les gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN. (annexe 13)

10.2 Gènes et voies de signalisation impliqués dans la mélanoma-génèse

10.2.1. La voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)

L'activation de la voie des MAPKs suite à l'activation d'oncogènes comme *NRAS*, *BRAF* et *KIT* constitue l'altération la plus fréquemment retrouvée dans les mélanomes. (Figure 1)

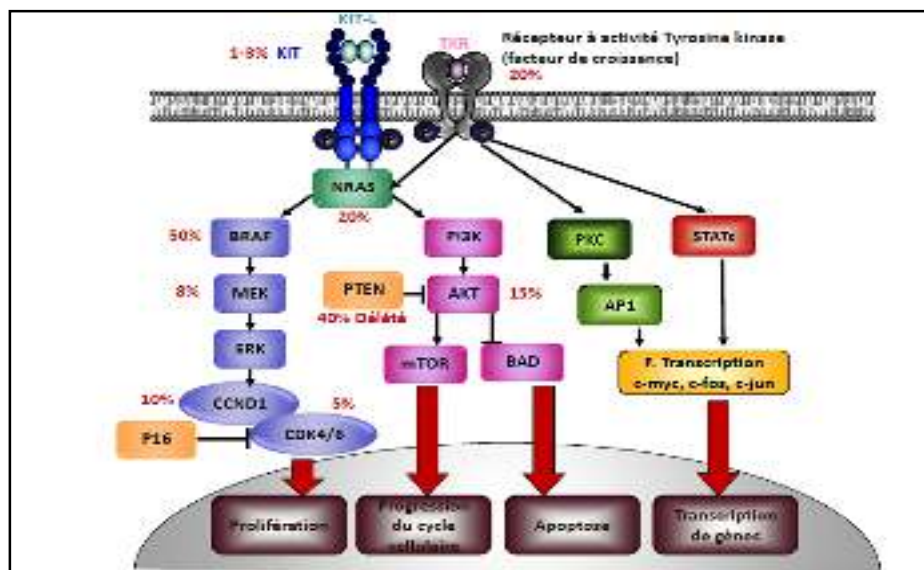


Figure 1 : Les voies de signalisation passant par KIT et les récepteurs de type HER

Les voies de signalisation passant par KIT et les récepteurs de type HER
Dérégulations de la cellule et conséquences (Annexe 14)

- Autonomisation du récepteur
 - Activation constitutive des protéines de signalisation en absence de signal en amont
- Les voies de la signalisation comme cible pour le développement de nouvelles molécules anticancéreuses. (GUBLER .B 2014)

a. Le gène 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 amplifications, se produisant dans approximativement 10% de mélanomes acral et muqueux.

Les mutations ont comme conséquence une expression plus élevée de KIT, et semblent déterminer la réponse à la thérapie ciblée. (Alexander M. et al 2013)

Localisation du gène C-Kit:

Endroit cytogénétique : 4q12

Endroit moléculaire sur le chromosome 4 : La base appaieille 54.657.927 à 54.740.714

Le gène de *KIT* est situé sur Le bras long (q) du chromosome 4 à la position 12.

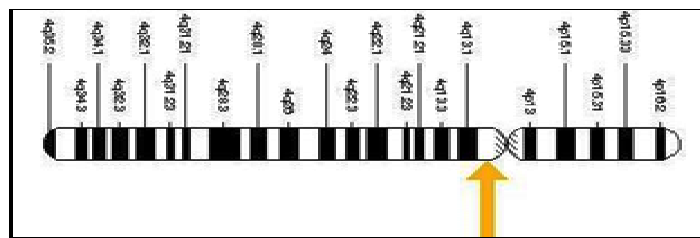


Figure 2 : Localisation du gène C-Kit

C-KIT ET MÉLANOME

C-KIT (CD117) code pour un récepteur tyrosine kinase dont le ligand est le stem cell factor (SCF ou KIT ligand) cascades. Effecteurs en aval de c-KIT incluant MAPKand PI3K, Phospholipase C, Src, MITF. KIT-SCF dont la signalisation est indispensable pour la prolifération, la différenciation, le développement des mélanocytes, la survie, et la migration. EFC est un mitogène à l'origine de l'augmentation de la production de mélanine dans les mélanocytes normaux. Mélanocytes normaux sont tributaires de la signalisation de c-KIT pour la survie, mais cet effet est perdu dans les cellules noeviques. (Annexe15) (Staci D.et al 2007)

b. Le gène BRAF :

Une forte association entre des mutations du gène *BRAF* et le mélanome a été rapportée en 2002 par Davies et ses collaborateurs (Annexe 16). 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 ; elles sont détectables dès la phase de croissance horizontale de ce cancer.

Des mutations du gène *BRAF* sont cependant également présentes au sein de naevus bénin. Les mutations germinales de ce gène semblent rares. (Dalle. S, et al 2006)

Localisation du gène BRAF :

Endroit cytogénétique : 7q34

Endroit moléculaire sur le chromosome 7 : la base appairelle 140.719.333 à 140.924.763 Le gène de *BRAF* est situé sur le long (q) bras du chromosome 7 à la position 34 (Figure 2)

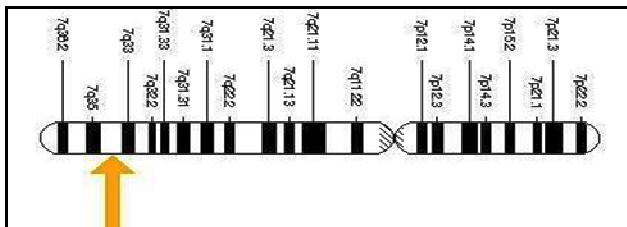


Figure 3 : localisation du gène BRAF

BRAF: facteurs de la voie de signalisation des MAPK

BRAF:

- Protéine 766 aa 84,4 KDa
- Famille des Serine/Threonine Kinases (superfamille RAF)
- proto-oncogene
- BRAF intervient dans la voie RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK responsable de la transduction des signaux mitogéniques (des récepteurs membranaires vers le noyau)

Structure tridimensionnelle de BRAF

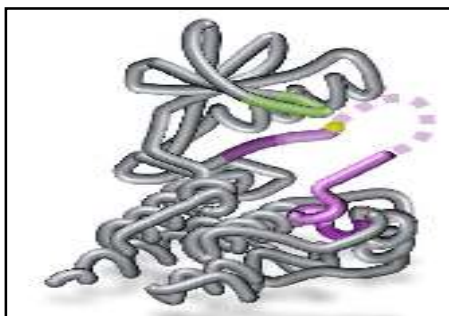


Figure 4 : Structure du domaine Kinase de BRAF.

- Position 600 indiquée en jaune

- Domaine d'activation en rose.

Tirets = absence de résolution (GUBLER. B 2014)

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. (Annexe 17) (EL HAOUARI .A 2012)

Les 10% restant explique 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)

Implication dans L'entité Mélanome:

90% des mutations de *BRAF* dans le mélanome sont le résultat d'une substitution à la position **V600 (exon 15 – nucléotide 1799)**

–Elles confèrent un gain de fonction à la protéine

–Elles conduisent à une stimulation constitutive de la phosphorylation d'ERK (GUBLER. B 2014)

c. Implications des protéines BRAF et C-KIT dans la Prolifération des mélanocytes

La cascade mitogène-activée de signalisation (MAPK) de protéine kinase

Le facteur de croissance liant à l'adhérence de kinases ou (RTKs) d'intégrin de tyrosine de récepteur à la matrice extracellulaire (ECM) active RAS, lançant la cascade de phosphorylation de RAF/MEK/ERK. EGFR, récepteur épidermique de facteur de croissance ; VEGFR, facteur de croissance endothélial vasculaire ; PDGFR, récepteur plaquette-dérivé de facteur de croissance ; FGFR, récepteur de facteur de croissance de fibroblaste ; FLT-3, kinase FMS-connexe 3 de tyrosine ; SHC, src homologue et collagène ; GRB2, facteur de croissance récepteur-bondissent la protéine 2 ; SOS, fils de sevenless ; FAK, kinase focale d'adhérence ; Stat, capteurs de signal et activateurs de transcription ; HIF-1 , alpha factor-1 hypoxie-induisible ; MITF, facteur microphthalmia-associé de transcription ; BIM, médiateur bcl-2 de interaction de la mort de cellules. Vers une classification moléculaire de mélanome (Annexe 18). (Lièvre.A, et al 2010)

10.2.2. Voie CDKN2a/p16 et les gènes impliqués

a. CDKN2A gène

Le gène *CDKN2A* (inhibiteur cyclin-dépendant 2A de kinase) est un régulateur de la division cellulaire. Les mutations dans ce gène sont la cause la plus fréquente de mélanome héréditaire. Le risque de mélanome chez les porteurs de la mutation *CDKN2A* est d'environ 14% à 50 ans, 24% vers l'âge de 70 ans et 28% à 80 ans. (Lin J, et al 2008).

Localisation du gène cdkn2a:

Endroit cytogénétique: 9p21

Endroit moléculaire sur le chromosome 9: Dela paires de base 21.967.751 à 21.994.490

Le gène de *CDKN2A* est situé sur (p) le bras court du chromosome 9 à la position 21. Figure 4

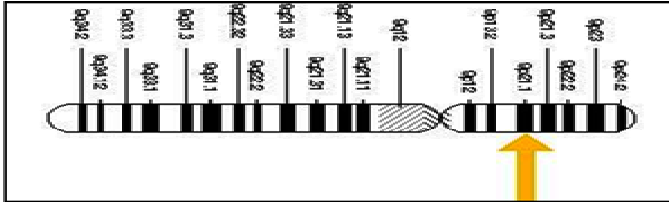


Figure 5 : Localisation du gène *cdkn2a*

Comme de nombreuses personnes ayant des mutations dans le gène *CDKN2A* vont développer un mélanome au cours de leur vie, *CDKN2A* code pour deux protéines distinctes:

INK4A (inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 4; également connu sous le nom p16INK4a)

ARF (suppléant du cadre de lecture ouvert; aussi connu comme p14ARF chez l'homme). (Annexe 19)

b. *MDM2* gène

Mdm2 est un régulateur négatif important de la p53 protéine suppresseur de tumeur. IL est le nom d'un gène, ainsi que la protéine codée par ce gène.

Cette mutation semble être un facteur de risque de mélanome encore plus puissant que les autres facteurs de risque tels que les coups de soleil, la peau claire, les taches de rousseur etc...(Firoz EF, et al. 2009.)

Localisation du gène *mdm2*:

Endroit cytogénétique : 12q14.3-q15

Endroit moléculaire sur le chromosome 12: De la paires de base 68.808.171 à 68.845.543 le gène *MDM2* est situé sur le long (q) bras du Chromosome 12 entre les positions 14.3 et 15. Figure 5

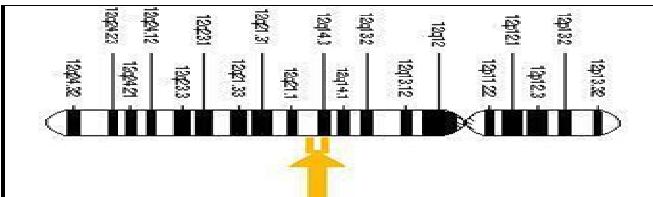


Figure 6 : Localisation du gène *mdm2*

c. *RB1* gène

Des mutations germinales dans le gène du rétinoblastome (*RB1*) lui-même, dans la voie d'INK4A CDK4/6-RB, pourraient conduire à une multiplication par 4 à 20 fois le risque accru de mélanome. Ces résultats indiquent que de multiples mécanismes qui fonctionnent pour contourner le Rb-dépendante G_1 arrêt du cycle cellulaire sont impliqués dans le développement d'un mélanome malin. (Ranaweera. A 2011)

Localisation du gène *rb* :

Endroit cytogénétique: 13q14.2

Endroit moléculaire sur le chromosome 13: De la paires de base 48.303.746 à 48.481.889 Le gène *RB1* est situé sur le long (q) bras du chromosome 13 à la position 14.2.

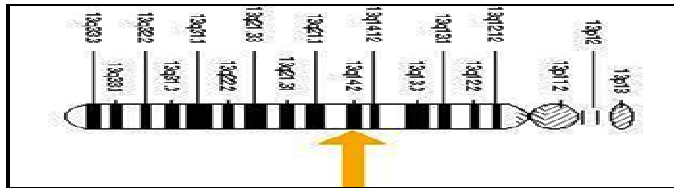


Figure 7: Localisation du gène Rb

d. Implications des des protéines codées par le locus *CDKN2A* dans l'arrêt du cycle cellulaire

✓ Inactivation des voies p16^{INK4A}/CDK4/CD1/Rb et/ou p14^{ARF}/p53

La protéine p16INK4A est un suppresseur de tumeur. Elle est en particulier impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence.

En conditions physiologiques, p16INK4A n'est pas exprimée dans les tissus à l'âge adulte. En revanche, en réponse à l'activation d'oncogènes, au raccourcissement des télomères, au stress oxydant ou aux dommages à l'ADN, il existe une activation transcriptionnelle de p16INK4A encore mal caractérisée. L'activation d'oncogènes tel que Ras et *BRAF*, induirait l'expression de p16INK4A via les facteurs de transcription Ets-1 et Ets-2. Dans le cas de stress oxydant, ce serait p38 qui jouerait un rôle. (Annexe 19) (Ben-Porath and Weinberg, 2005).

✓ La voie p14ARF/HDM2/p53

Comme p16 INK4A, p14^{ARF} est un senseur de l'activation oncogénique, sa transcription est activée notamment en réponse à l'activation de Ras et *MYC*, à la perte de *RB1* et en réponse aux dommages à l'ADN. Lorsque p14ARF est présente, elle se lie à HDM2 prévenant l'ubiquitination par ce dernier de p53 et donc sa dégradation. L'accumulation de p53 induit alors un arrêt du cycle cellulaire en G2/M, suite à cet arrêt du cycle, la cellule pourra ré-entrer dans le cycle cellulaire après réparation des dommages, entrer en apoptose ou en sénescence. En l'absence de p14ARF, p53 ne peut donc pas correctement jouer son rôle de suppresseur de tumeurs (Annexe 19 b) (Tsao et al. 2012).

✓ Règlement de cycle de cellules par cycline dépendant kinase (CDKs) :

Les cyclines vont promouvoir la progression et la médiation de l'arrêt des inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante. La protéine du rétinoblastome (Rb) contrôle le point de restriction G1/S.. Cdk 2/4/6 vont phosphoryler Rb, dissocier E2F et permettre la progression du cycle. p53 agit sur le cycle cellulaire par l'intermédiaire de l'expression différentielle des gènes selon le stress cellulaires. épissage alternatif de 9p21 produit p14ARF ou p16INK4a. P14ARF inhibe MDM2 et empêche la dégradation de protéasome p53. P16INK4a inhibe la cycline D-CDK4/6, maintient Rb-E2F et cause l'écart 1 (G1) ; l'arrêt ARF, trame de lecture alternative ; G2, Gap 2 ; S, synthèse ; M, mitose. (Annexe 20) (Leslie A. 2006).

10.2.3. Voie β -caténine/MITF :

β -caténine est également un régulateur de Mitf, facteur de transcription qui induit l'expression des enzymes clés de la mélanogénèse ; β -caténine est impliquée dans le développement pathologique des mélanocytes. Il a été montré que β -caténine est surexprimée dans environ 27% des lignées de mélanomes et mutée dans 30% de ces lignées au niveau des sites de phosphorylation par

GSK-3. Au niveau cytoplasmique, elle est impliquée dans la voie de signalisation Wnt. Au niveau nucléaire, β -caténine régule positivement ou négativement l'expression des gènes cible.

En absence de ligand Wnt, β -caténine est recrutée au sein d'un complexe de destruction contenant les protéines APC et Axin qui facilitent la phosphorylation de β -caténine par CK1a et GSK-3. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination et la dégradation de β -caténine par le protéasome.

De plus, dans 28% des mélanomes *in situ*, β -caténine est localisée dans le noyau. A ce jour, il existe donc une importante corrélation entre la présence de β -caténine mutée et la formation de mélanomes. (Annexe 21) (BELLOIR. E 2006).

10.3. Conclusions et réflexions sur la carcinogenèse du mélanome

Des altérations de plusieurs oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs et leur voie de signalisation respectives ont déjà été identifiés dans le mélanome

- Les voies de signalisation clés importantes dans le mélanome sont de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles (GUBLER. B 2014)

11. Modèles de mélanome pour des études biologiques et thérapeutiques

Mélanomes BRAF Mutés : Réponse thérapeutique et résistance

Thérapies ciblées anti- BRAF ont montré une efficacité en clinique et seraient bien tolérées. Ils ont montré des taux de réponse globale d'environ 50 % et la médiane de survie sans progression de 5 à 7 mois dans les essais cliniques. Malgré ces résultats encourageants, la résistance à ce traitement a été retrouvée chez la plupart des patients. Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de BRAF incluent la réactivation de la voie MAPK par CRAF, ARAF, la variante d'épissure p61BRAF(V600E), la mutation activatrice de NRAS ou MEK, la perte de la NF1 suppresseur de tumeur et l'activation de voies compensatoires telles que le réseau de PI3K via la signalisation des récepteurs tyrosine kinase (en particulier via le PDGFRb, IGF1-R, FGFR, HGFR et EGFR). Des données apparaissent également en ce qui concerne l'importance du métabolisme dans la modulation des réponses aux médicaments. Des stratégies thérapeutiques impliquant la combinaison des inhibiteurs de BRAF avec d'autres agents ciblés sont actuellement en cours pour améliorer les résultats pour les patients... (Annexe 22) (Adina .V, et al 2013)

Chapitre II : Matériel Et Méthodes

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 neuf (09) mois allant de novembre 2013 à juin 2014. Ce travail consiste en une étude rétrospective s'étendant sur 5 années (2008 – 2012) et prospective sur 2 années (2013-2014) 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 (intestinale...) de patients atteints de Mélanome. Ces prélèvements sont fixés au formol avant d'être inclus en paraffine (FFPE)

Cette étude rassemble des prélèvements parvenus dans le service d'Anatomie Pathologique du CHU de Mustapha (Alger). Au totale 40 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 4 groupes relativement homogènes en nombre :

- 10 patients présentant un Mélanome choroïdien
- 9 patients présentant un Mélanome cutané
- 8 patients présentant un Mélanome des muqueuses
- 13 patients présentant un Mélanome métastatique

Seuls 25 patients ont bénéficié d'une recherche de la mutation BRAF, sur leurs prélèvements, par la technique de PCR en temps réel, car nous n'avons pu obtenir qu'un seul Kit d'extraction et d'amplification BRAF au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du Service d'oncologie (CPMC). Nous avons favorisé les patients pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée (selon l'indication de cette thérapie par les oncologues) et compléter avec nos cas pour terminer le KIT. Ces prélèvements ont bénéficié au préalable d'une étude histologique et immunohistochimique.

Les données cliniques (L'âge, le sexe, la localisation) des patients ont été recueillis à partir des fiches de renseignements cliniques. Tous les cas ont bénéficié d'une réévaluation histologique après coupes sériées.

2. Matériel non biologique

Appareillage	Matériel et verreries	Réactif	Kit d'immunohistochimie
<ul style="list-style-type: none"> - Bain-marie - Microtome - Agitateur (AGIMATIC-S) - Etuve - Appareille d'inclusion 	<ul style="list-style-type: none"> - Lame d'étalement - Lames silanisées - Panier de lames - Micropipettes 	<ul style="list-style-type: none"> - Formol a 10% - Ethanol a 80% , 90% , 100 % - Eau d' distillée et Eau de robinet - Paraffine - Hématoxyline - Eosine - Nitrate d'argent - Rouge nucléaire - Xylène 	<ul style="list-style-type: none"> - Solution de PH (9 ,6) - Eau oxygéné - Solution d'anticorps I aire (spécifique) : - AC anti melan A, AC anti CD117, AC anti P53, AC anti HMB45, AC anti β-caténine, AC anti ki67. AC Anti pS100 - 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 1 : **Materiel non biologique**

3. Méthode :

3.1. Phase pré-analytique :

Etapas indispensables qui conditionnent la fiabilité de toutes les techniques ultérieures (Annexe 23)

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



figure 6 : Bloc de paraffine

A. Prélèvement : (annexe 24)

- Biopsie
- Pièces opératoires
- Exérèse

B. la fixation

Stabilisation des tissus le fixateur provoque la formation d'un réseau intermoléculaire stabilisé par des liaisons covalentes

Maintien des caractéristiques physico-chimiques et d'organisation pas blocage des groupements chimiques particuliers qui pourraient faire l'objet d'une coloration histochemique

Le formol (formaldéhyde=méthanal en solution aqueuse): ponts méthyléniques inter et intra-protéines, blocage de la cytolysse tue les éventuelles bactéries qui pourraient dégrader le tissu. Bon pouvoir de pénétration. Manipulation précautionneuse (risques pour l'utilisateur: irritation des muqueuses, carcinogène...).

Durée de fixation :

- 1mm d'épaisseur de tissu / heure
- Minimum 6h pour biopsie (6 à 12 h)
- 24 à 48h pour les pièces opératoires
- Eviter les sur-fixations au-delà de 72h

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 3 à 5 μm pour la microscopie optique
- le produit d'inclusion (la paraffine) va remplacer l'eau des tissus imprégner donc le tissu
ex: paraffine 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.

3.2. Phase analytique

3.2.1. Coloration histochimique à l'HE

- 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, érythroline)
- 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

3.2.2. Coloration histochimique spéciale de Fontana

Cette méthode d'imprégnation caractérise l'argentaffinité de pigments mélanique

Technique :

Déparaffinage des lames :

3 bains de xylène 3X5min

2bains d'alcool absolu 2X5min

Laisser les lames dans l'eau distillé propre

Coloration :

Plonger les lames dans le Nitrate d'argent ammoniacal

Laisser a l'obscurité, en récipient fermé 12 à18h

Rincer en eau distillée 2 bains

Contre colorer au rouge nucléaire 2 à 5 min

Rincer a l'eau courant

Montage des lames

3.2.3. L'Immunohistochimie

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.

Intérêt

- Localisation précise de certaines protéines
- Etude de leur lieu de synthèse et leur compartimentation
- Observation de leur cheminement cellulaire ou tissulaire, transport membranaire...

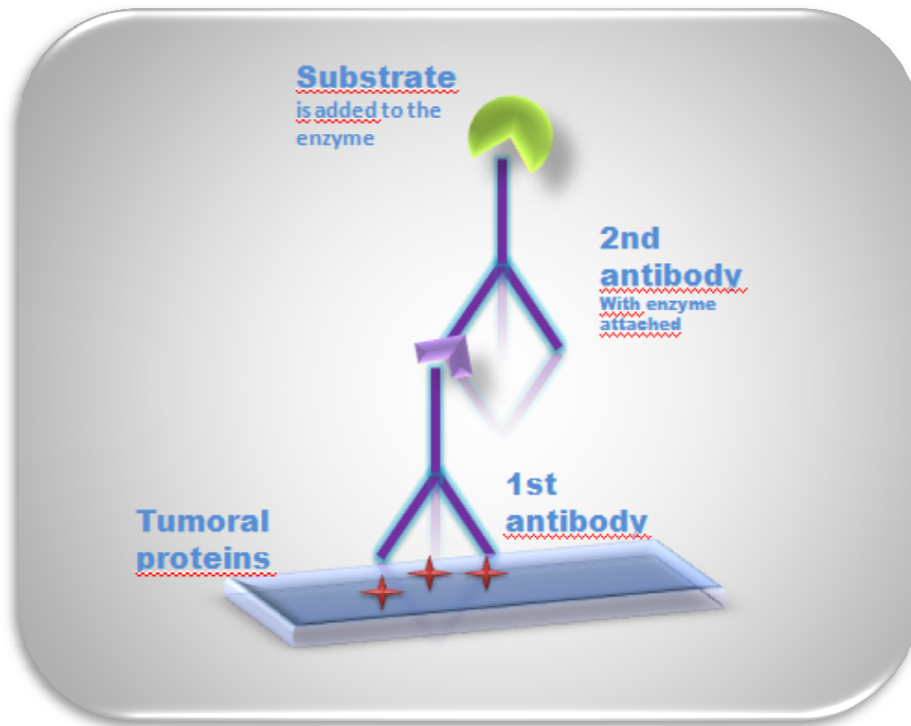


Figure 8 : Schéma présentant le principe de la technique d'immunohistochimie

Protocole :

- a. **Incubation 1** : les lames sont incubées à 55°C pendant 24 heures dans une étuve
- b. **Déparaffinage** : 4 bains de xylène 5 min
- c. **Réhydratation** : alcool 100° 2X 5 min
Alcool 95° 5 min
Alcool 70° 5 min
Eau plusieurs bains quelques minutes
- d. **Démasquage des sites antigéniques (pré traitement)** : Placer les lames dans une solution de PH préalablement préparée (PH 6.PH9) selon le type d'anti corps spécifique utilisée .
- 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 distillé pendant 5 minutes
 - Arranger les lames dans un plateau humidifié, et contourner le tissu a l'aide d'un dako pen.
 - Ajouter quelque gouttes d'eau oxygénée a la zone sélectionné 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 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.

Type d'Ac anti-	PH	Dilution
Anti-Melan A	9	1/50
Anti-HMB45	9	1/25
Anti-Ps 100	6	1/400
Anti-ki67	6	1/50
Anti-P53	9	1/50
Anti-c-kit (CD117)	9	1/400
Anti-β – caténine	9	1/200

Tableau 2 : représentant les AC I utilisés dans l'étude IH C de mélanome

g. Introduction d'AC II :

- Ajouter l'AC II commun pour toutes les lames et laisser agir 120 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 ammoniaquée pour donner une coloration bleu au tissu,
- puis déshydrater et éclaircir

j. Montage :

Les lamelles sont déposées sur les lames à l'aide d'huile d'immersion.

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

A. Matériel

✓ **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)



figure 9 : teste de mutation BRAF V600E

3) Autre Réactifs nécessaire

- Xylène
- éthanol absolu
- Isopropanol
- Eau stérile (eau de qualité PCR, ou eau de qualité biologique moléculaire)

✓ **Appareillage Matériel et verreries :**

- 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



Figure 10 : **Microcentrifugeuse**



figure 11 : **Tubes de Safe-Lock**



Figure 12 : Nano drop



figure 13 : unité FT (Tubes de filtration avec bouchons)/CT (Tubes de prélèvement)

- 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



Figure 14 : Instruments et logiciel

B. METHODES :

A. 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.

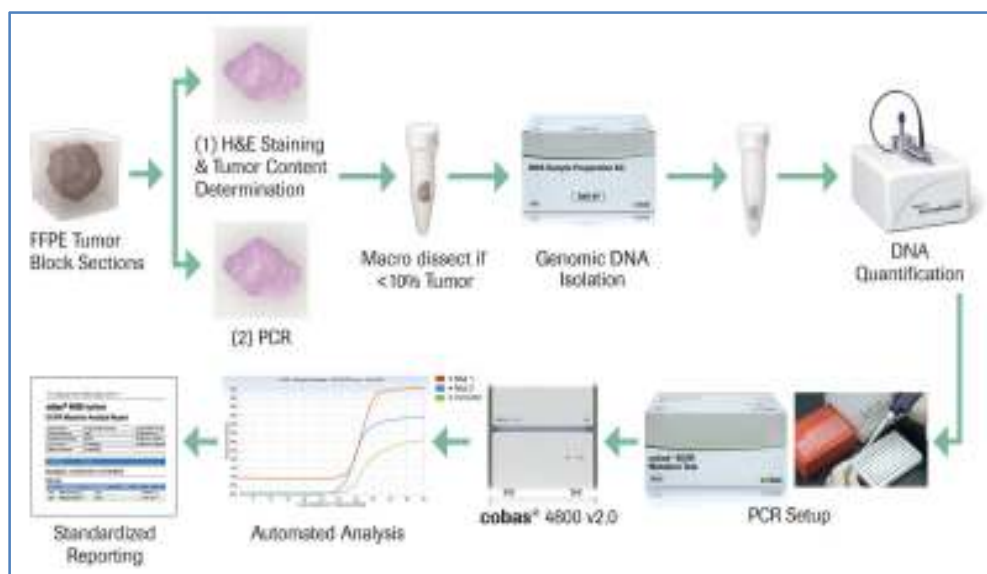


Figure 15 : PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

B. Mode opératoire :

I-Préparation Manuelle

A. Préparation des coupes :

Les sections de 5 µm tissu tumoral (mélanome) montées sur lames blanches 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 sélectionnez la zone contenant au moins 10% de cellules tumorales 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.

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**.
- 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 incubé pendant 60 minutes.
- Passer le tube au vortex pendant 10 secondes.
- Placer le tube dans le bloc chauffant à sec à 90 °C et incubé 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.

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.

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. Replacer 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.

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

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

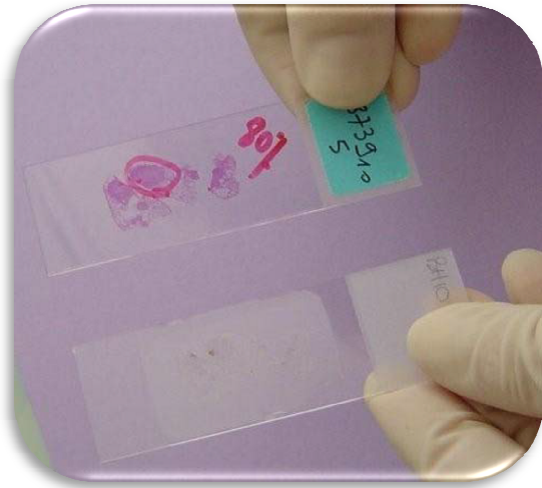


Figure 17 : sélectionné la zone tumorale sur la lame blanche

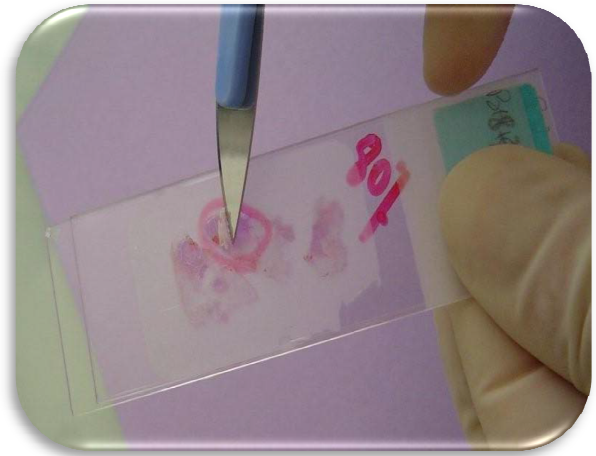


figure 18 : Microdissection

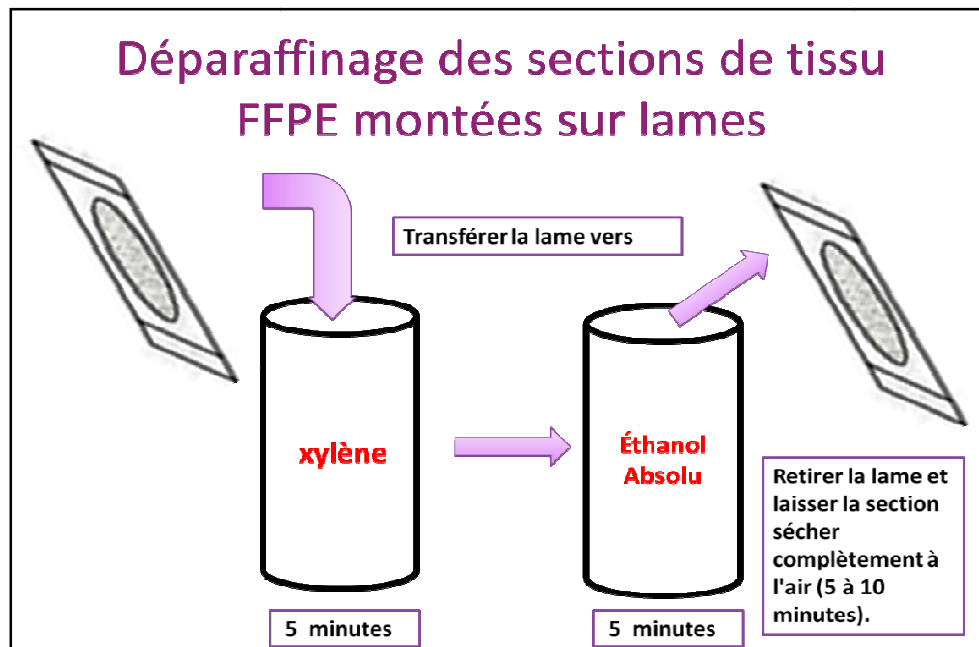


Figure 19 : Déparaffinage

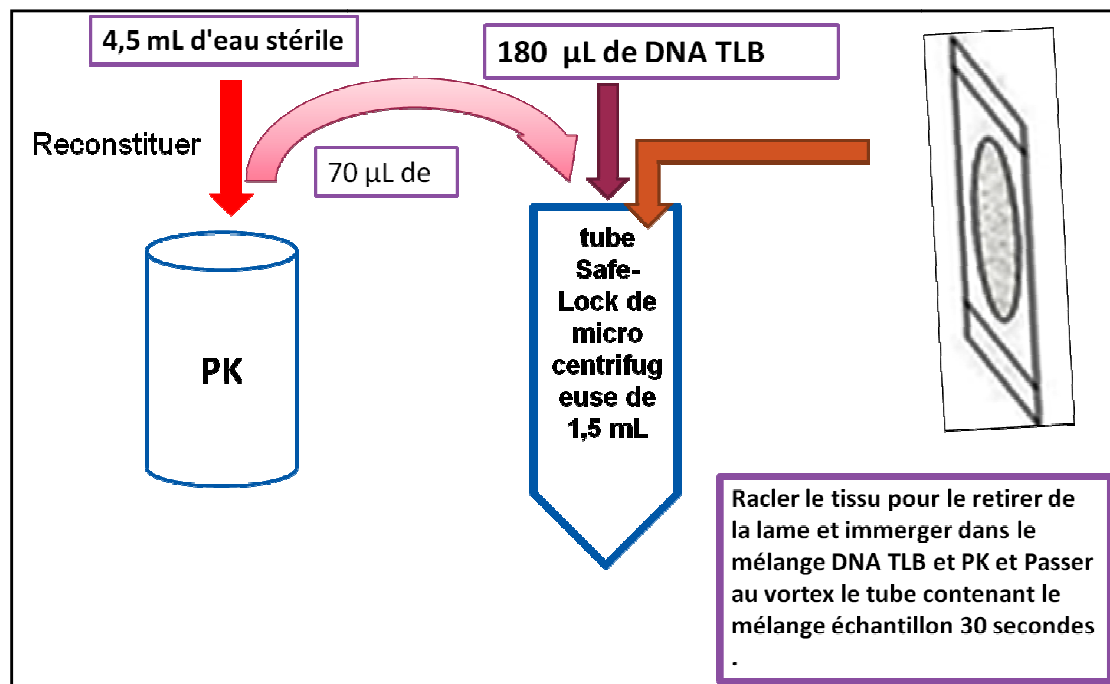


Figure 20 : Préparation des réactifs

Digestion de la zone tumorale (protéinase K)

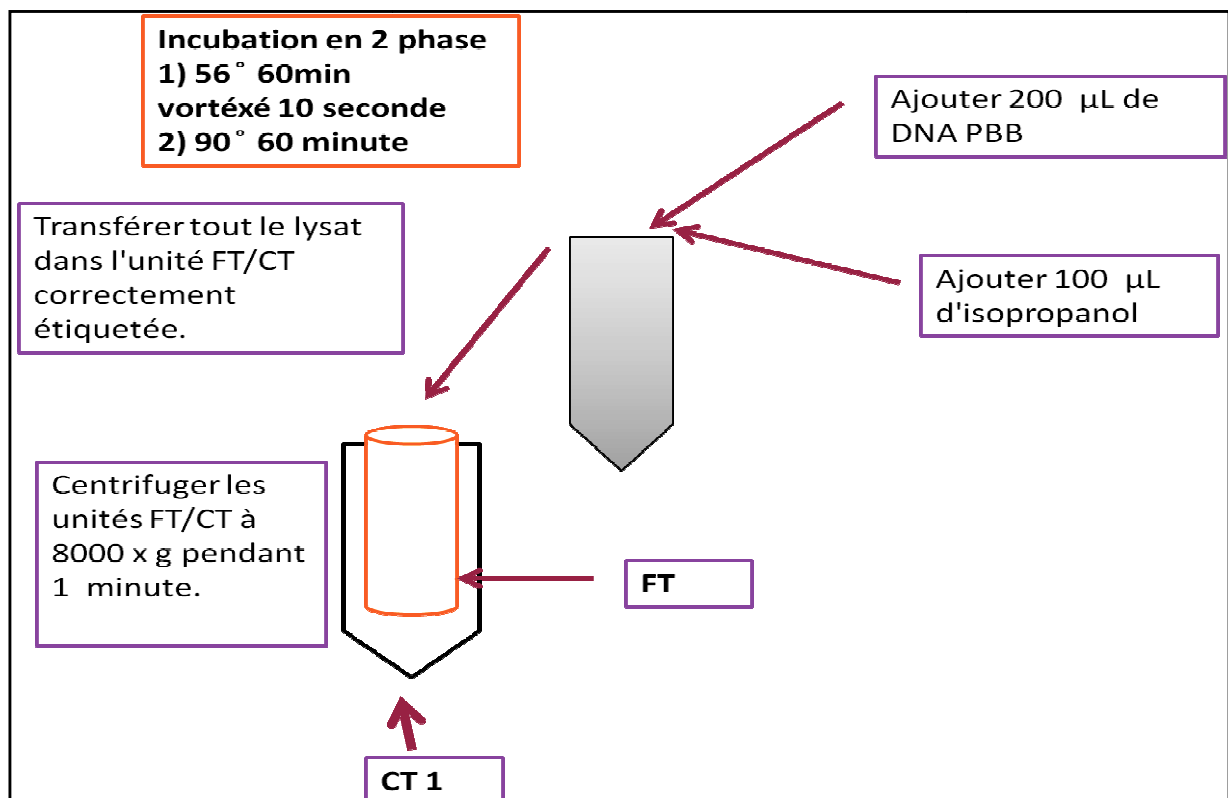


Figure 21 : Isolation de l'ADN génomique sur filtre en fibre de verre

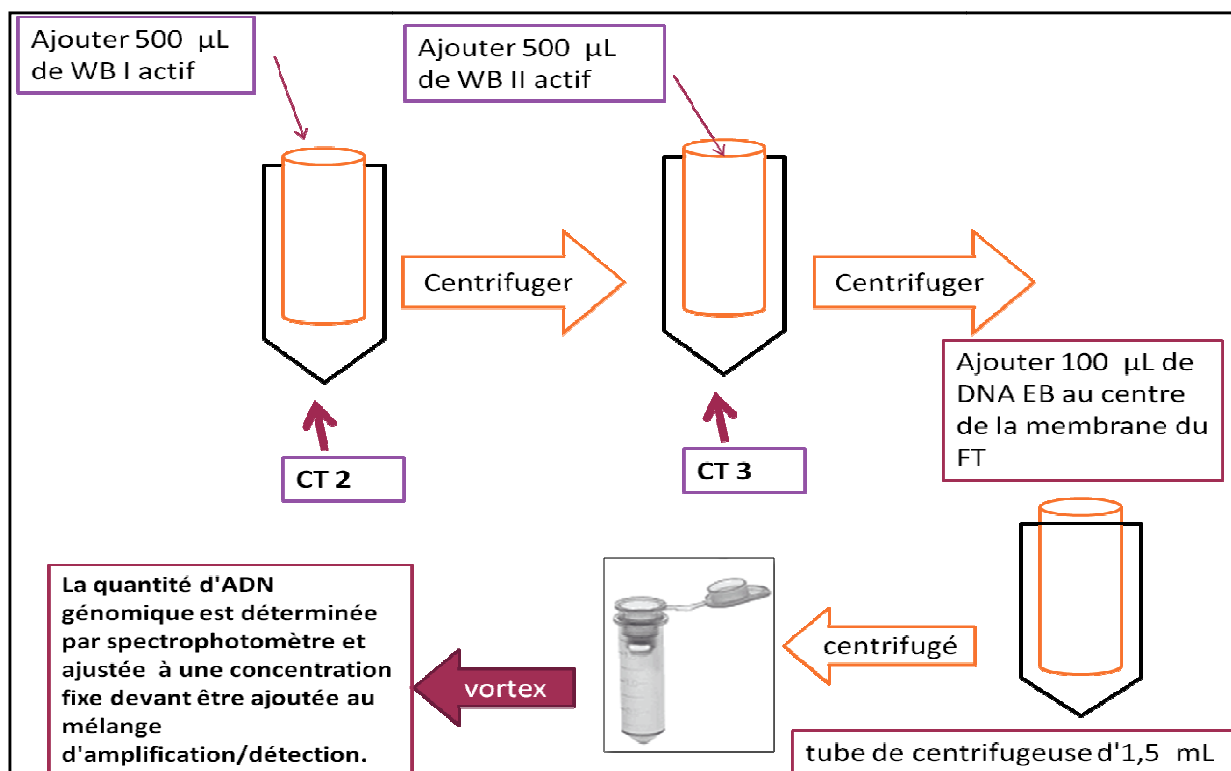


Figure 22 : Purification d'ADN

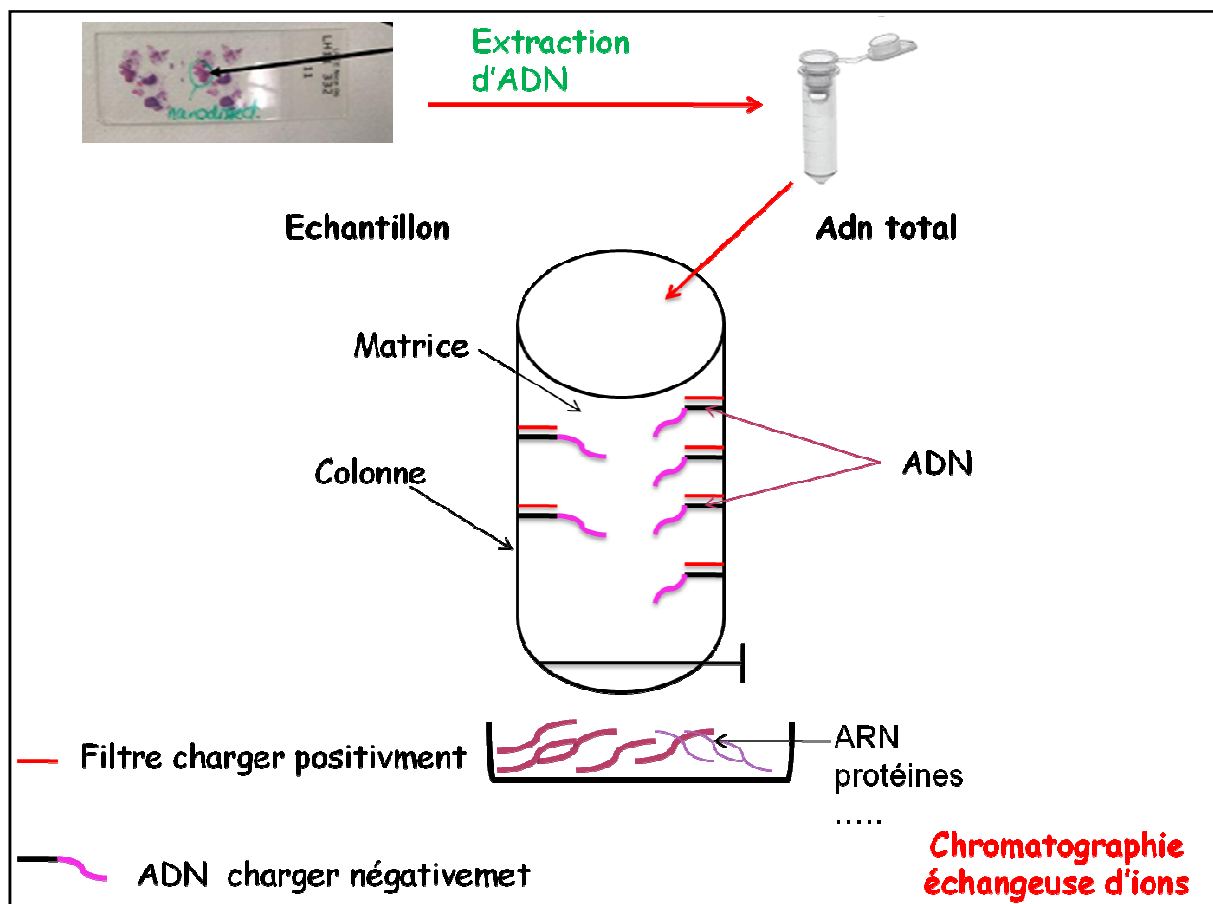


Figure 23 : Principe de tube a filtre

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 $\geq 20,0$ ng/ μ L. Pour des lectures de concentration d'ADN $< 20,0$ ng/ μ L, les deux mesures ne doivent pas différer de plus de $\pm 2,0$ ng/ μ L.
- La concentration du stock d'ADN doit être ≥ 5 ng/ μ L pour effectuer le test de mutation **cobas**[®] 4800 BRAF V600. Une seule amplification/détection est effectuée par échantillon, en utilisant 25 μ L d'une dilution à 5 ng/ μ 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/ μ L et 35 ng/MI**
 - 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 μ L = $(35 \mu\text{L} - \text{Volume de stock d'ADN nécessaire en } \mu\text{L})$
 - ✓ **Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon à des concentrations > 35 ng/ μ L**
 - Si la concentration du stock d'ADN est > 35 ng/ μ L, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (**DNA SD**) nécessaire pour préparer au moins 35 μ L de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μ L de stock d'ADN.
 - Vol. de DNA SD nécessaire en μ L = $((5 \mu\text{L de stock d'ADN} \times \text{conc. du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}) / (5 \text{ ng}/\mu\text{L})) - 5 \mu\text{L}$
- Utiliser le volume calculé de **DNA SD** pour diluer 5 μ L 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.

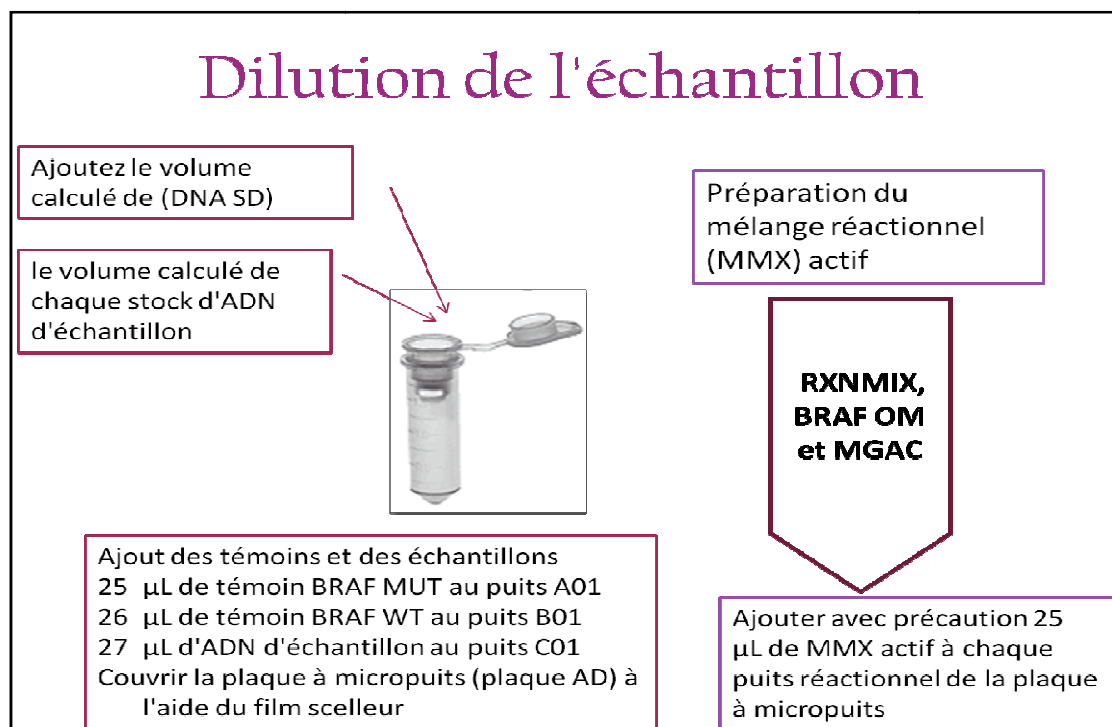


Figure 24 : dilution de l'échantillon et préparation de MMX

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.

		Volumés de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif									
		Nmbre 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

Tableau 3 : volume de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif

Ajouter avec précaution 25 μ L 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.

Ajout des témoins et des échantillons :

Utilisé La figure pour déterminer la Disposition d'échantillons dans la plaque

Démarrage de la PCR

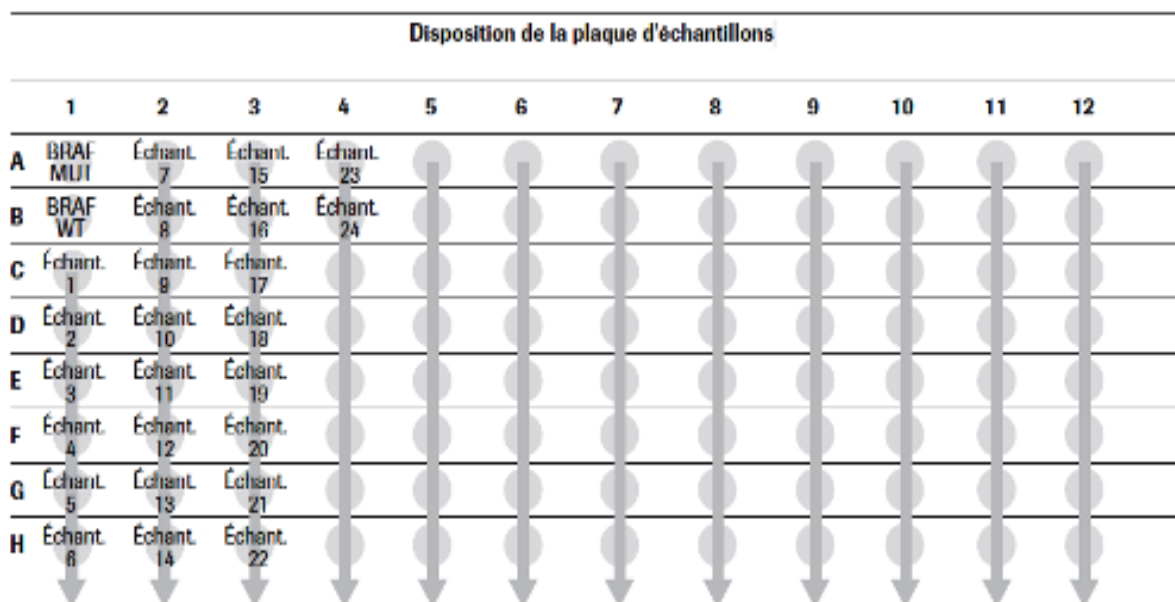


Figure 25 : disposition de la plaque d'échantillon

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

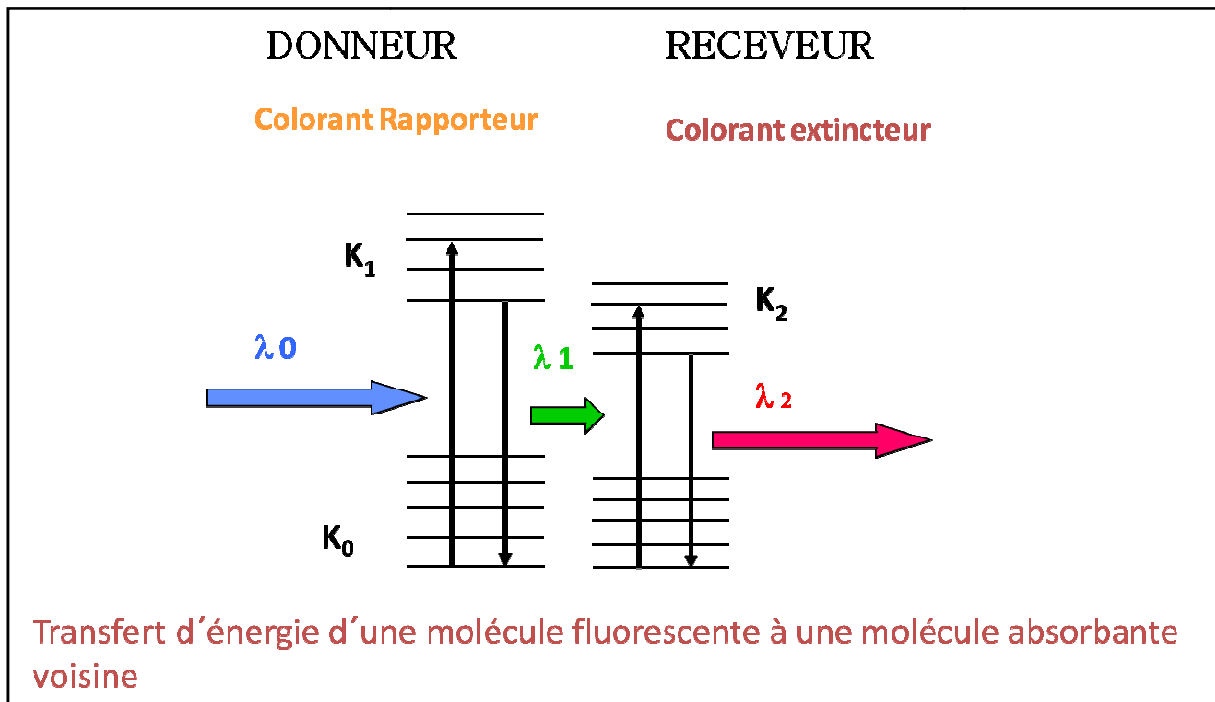


Figure 26 : Principe de fonctionnement des sondes fluorescentes

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).

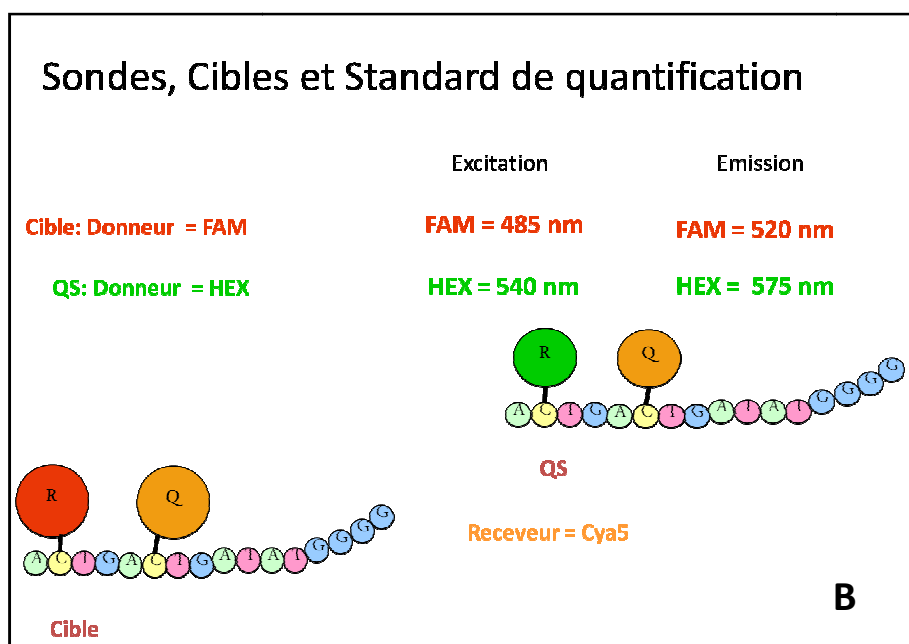
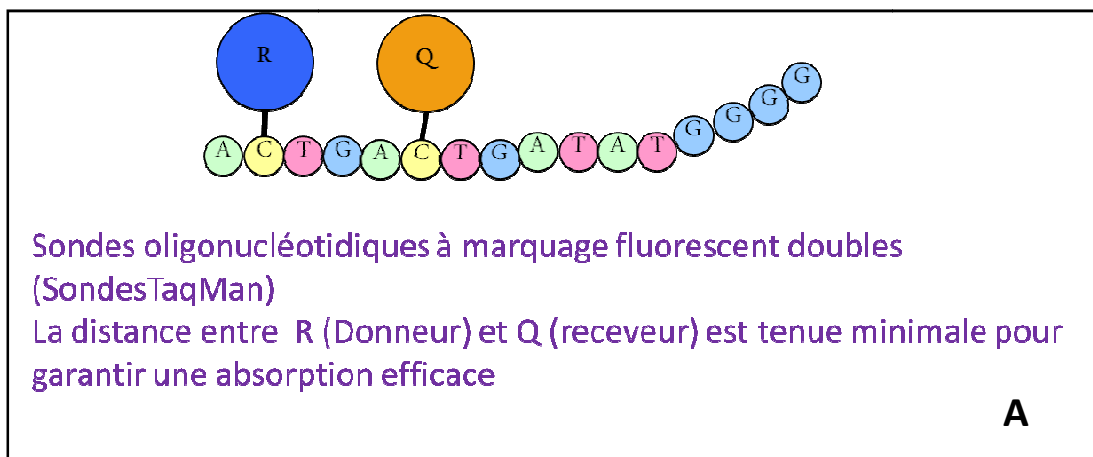


Figure 27 A et B : Sonden à marquage fluorescent

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.

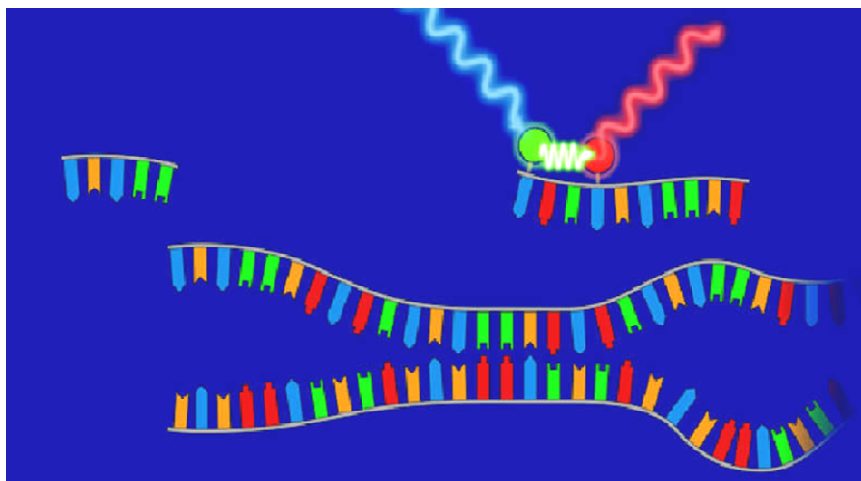
Les deux molécules doivent être séparées par 10-100 Angstroms; le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur; et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être à peu près parallèles.

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.

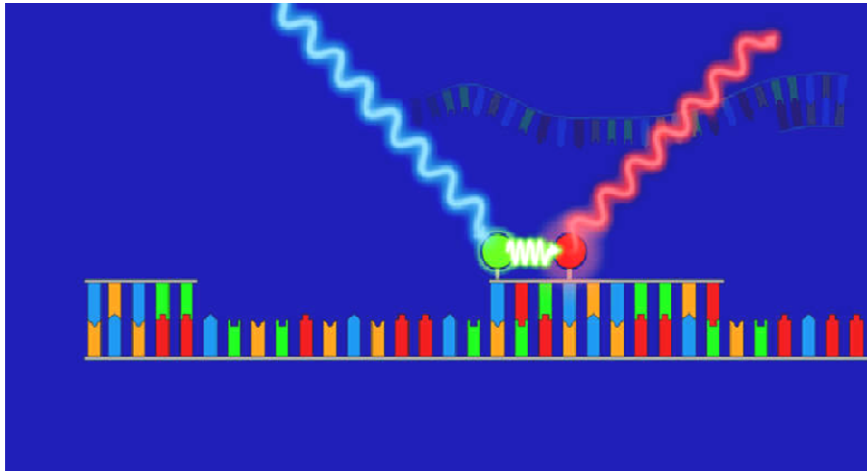
1 Dénaturation



La sonde est marquée par des colorants fluorescents (donneur et receveur) Tant que la sonde est intacte, le quencher absorbe la fluorescence .

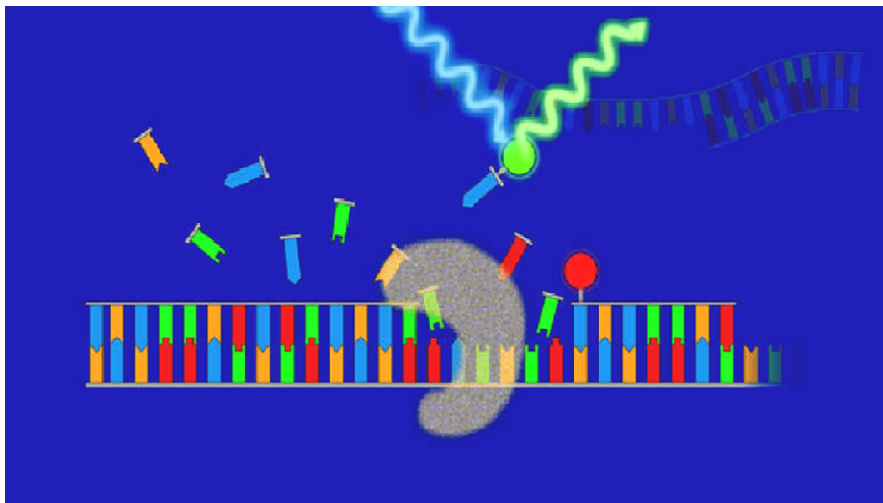
Le mélange reactif est chauffé afin de dénaturer et separer l'ADN afin d'exposer les sequences cibles de l'amorce

2 Démarrage



Lorsque le mélange réactif refroidit les amorces se fixent spécifiquement au brin d'ADN cible

3 Extension



En présence de Mn et dNTP en excès le Z05 permet l'extension des amorces hybridées le long des matrices cible pour reproduire une molécule d'ADN bicatenaire appelée amplicons. C'est durant l'extension par la polymérase Z05 que les colorants rapporteurs et extincteur sont libérés et séparés.

Figure 28 : (1,2 et 3) **Détection automatisée en temps réel**

3.3. Phase post -analytique et Interprétation des résultats

3.3.1. 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 :
 - Epaisseur (**Indice de Breslow**)
 - Niveau d'invasion de CLARK et MHIM
 - Ulcération
 - Présence de mitoses

3.3.2. Interprétation des lames colorées au FONTANA

Certains pigments, comme la mélanine, fixent et réduisent un sel d'argent ammoniacal sous forme de précipités d'argent métallique noir.

Cette méthode d'imprégnation caractérise l'argentaffinité de ces pigments ; elle met donc en évidence le pigment mélanique quand l'HE ne permet pas de le déceler (mélanome peu pigmentés)

3.3.3. Interprétation des lames d'immunohistochimie

L'IHC utilisant les Ac anti melan, HMB45 ou PS100, permet de confirmer le diagnostic de mélanome, l'expression est cytoplasmique brunâtre pour la melan et l'HMB45 et nucléaire et cytoplasmique pour la pS100.

Ki67 et la p53 : leur expression est nucléaire, nous avons réalisé un compte des cellules tumorales marquées sur 300 cellules tumorales examinées au fort grandissement, dans les zones les plus marquées. Ensuite, ce rapport a été exprimé en pourcentage. Par la suite, nos résultats ont été classés en 5 groupes différents pour permettre une étude comparative : entre 1 et 9%, entre 10 et 19%, entre 20 et 29%, entre 30 et 39% et plus de 40%.

Le C-Kit présente un marquage cytoplasmique avec parfois un rehaussement membranaire.

La β -caténine montre une expression soit membranaire, soit cytoplasmique ou nucléaire

3.3.4. 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.)

Tableau 4 : Interprétation des résultats

*** 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.**

Chapitre III : Résultats

Sommaire

Introduction

Chapitre 1 : Généralités	1
1. Définition	1
2. Etiologie	1
3. Épidémiologie	1
4. Aspects Cliniques Du Mélanomes	1
5. Aspects Histologique	2
5.1. Formes Anato-mo-Cliniques.....	3
6. Classification Anatomoclinique	4
6.1. Ulcération	4
6.2. Degré D'invasion	4
6.3. Autres Facteurs Pronostiques	4
6.4. Classification Des Ganglions Par Stades	5
6.5. Nombre De Ganglions Lymphatiques Atteints	5
6.6. Micrométastases Vs Macrométastases	5
7. Prise En Charge Thérapeutique	5
7.1. Stratégies Thérapeutiques	5
7.2. Chimiothérapie Et Nouvelles Molécules.....	6
8. Carcinogénèse Et Biologie Moléculaire Des Mélanomes.....	6
8.1. Le Mélanocyte Et Son Environnement.....	6
8.2. Voies De Régulation De La Fonction Du Mélanocyte.....	6
8.3. Du Mélanocyte Au Naevus Puis Au Mélanome	7
9. Progression De Mélanome	7
10. Incidence, Types, Et Gènes De Mutant Associés.....	8
10.1. Instabilité Génétique Une Caractéristique Du Mélanome	8
10.2. Gènes Et Voies De Signalisation Impliqués Dans La Mélanoma-Genèse.....	8
10.2.1. La Voie Mapk (Mitogen-Activated Protein Kinase)	8
10.2.2. Voie Cdkn2a/P16 Et Les Gènes Impliqués	11
10.2.3. Voie B-Caténine/Mitf	13
10.3. Conclusions Et Réflexions Sur La Carcinogénèse Du Mélanome.....	13
11. Modèles De Mélanome Pour Des Etudes Biologiques Et Thérapeutiques.....	14
Chapitre II : Matériel et Méthodes	15
1. Population d'étude	15
2. Matériel non biologique	16
3. Méthodes	16
3.1. Phase pré-analytique	16

3.2. Phase analytique	17
3.2.1. Coloration histochimique à l'HE	17
3.2.2. Coloration histochimique spéciale de Fontana	18
3.2.3. L'Immunohistochimie	18
3.2.4. Le test de PCR en temps réel	20
3.3. Phase post -analytique et Interprétation des résultats	36
3.3.1. Interprétations de lames colorées à l'HE	36
3.3.2. Interprétation des lames colorées au FONTANA	36
3.3.3. Interprétation des lames d'immunohistochimie	36
3.3.4. Interprétation des résultats du test de mutation	36
Chapitre III : Résultats	38
1. Paramètres épidémiologiques.....	38
A. Age	38
B. Sexe	38
2. Paramètres cliniques.....	39
2.1. Topographie	39
a. Répartition du mélanome selon la localisation	39
b. Répartition selon la localisation et le sexe	40
c. Répartition selon le siège du mélanome et l'âge des patients	41
2.2. Taille de la tumeur	42
2.3. Type anatomo-clinique	42
A. Mélanome cutané	42
B. Mélanome muqueux	46
C. Mélanomes choroidiens	46
D. Mélanome métastatique	54
3. Etude Histochimique	57
4. Etude immuno-histochimique	59
A. Les marqueurs de différenciation : HMB45 – pS100 – Melan A	59
B. Les marqueurs de progression et de prolifération Ki67	60
C. Les marqueurs de signalisation c-kit	63
D. marqueur de transcription et d'adhésion β -caténine	66
E. Facteurs pronostic p53	70
5. Etude moléculaire : Test de mutation BRAF V600E	72
6. Comparaison entre les mélanomes présentant une mutation BRAF V600E détectée et l'expression des différents marqueurs immunohistochimiques étudiés	74
Chapitre IV : Discussions	75
Conclusion	79
Références bibliographiques	80
Annexe	82

Liste Des Figures :

Figure	Titre	Page
1	Les voies de signalisation passant par KIT et les récepteurs de type HER	8
2	Localisation du gène C-Kit	9
3	Localisation du gène BRAF	10
4	Structure du domaine Kinase de BRAF	10
5	Localisation du gène cdkn2a	12
6	Localisation du gène mdm2	12
7	Localisation du gène rb	13
8	Schéma présentant le principe de la technique d'immunohistochimie	19
9	teste de mutation BRAF V600E	21
10	Microcentrifugeuse	21
11	Tubes de Safe-Lock	21
12	Nano drop	22
13	Unité FT (Tubes de filtration avec bouchons)/CT (Tubes de prélèvement)	22
14	Instruments et logiciel	22
15	PRINCIPES DE LA PROCÉDURE	23
16	Sélection du matériel	25
17	Sélectionné la zone tumorale sur la lame blanche	26
18	Microdissection	26
19	Déparaffinage	26
20	Préparation des réactifs	27
21	Isolation de l'adn génomique sur filtre en fibre de verre	27
22	Purification d'ADN	28
23	Principe de tube a filtre	28
24	Dillution de l'échantillon et préparation de mmx	30
25	Disposition de la plaque d'échantillon	30
26	Principe de fonctionnement des sondes fluorescentes	31
27	Sondes à marquage fluorescent	32
28	Détection automatisée en temps réel	35
29	Répartition des malades selon le sexe	38
30	Répartition des patients selon l'âge	39
31	Localisation du mélanome	40
32	Répartition des types histologiques selon le sexe	41
33	Répartition des mélanomes selon la localisation et l'âge	42
34	Types de mélanome cutané	43
35	Coupes histologiques d'un mélanome nodulaire après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	44
36	Coupes histologiques d'un mélanome acral après coloration HE au microscope optique	45

37	Types de mélanome muqueux	46
38	Coupes histologiques d'un mélanome de la muqueuse intestinal après coloration HE au microscope optique à différents grossissement	47
39	Coupes histologiques d'un mélanome de la muqueuse vaginal après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	48
40	Types de mélanomes choroïdiens	49
41	Coupes histologiques d'un mélanome choroïdien à cellules épithélioïdes après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	51
42	Coupes histologiques d'un mélanome choroïdien à cellules fusiformes après coloration HE au microscope optique à différents grandissements	52
43	Coupes histologiques d'un mélanome choroïdien à cellules mixtes	53
44	Type de siège de mélanome métastatique	54
45	Coupes histologiques des différents types de mélanome métastatique après coloration HE au microscope optique à différents grandissement	56
46	Coupes histologiques de mélanome achromique à la coloration histochimique FONTANA au microscope optique à différents grandissements	58
47	Coupes histologiques de mélanome après un immunomarquage des marqueurs de différenciation	59
48	Expression de ki67	60
49	Résultats concernant Ki67, index de prolifération	61
50	Coupes histologique d'un mélanome après immunomarquage nucléaire du Ki67 observées au microscope optique à différents grandissements	62
51	Expression de C-Kit	63
52	Expression de C-Kit selon la localisation	64
53	Coupes histologiques d'un mélanome après immunomarquage membranaire du C-Kit observées au microscope optique à différents grandissements	65
54	Expression de β -caténine	66
55	Expression de β -caténine selon la localisation	66
56	Répartition de la positivité de marquage anti b-caténine selon le site d'expression	67
57	Répartition du type histologique selon cite d'expression de marquage anti b-caténine	68
58	Coupes histologique d'un mélanome après immunomarquage membranaire, cytoplasmique et nucléaire de la B-caténine observées au microscope optique à différents grandissements	69
59	Expression de p53	70
60	Répartition de la positivité de marquage anti P53 selon la localisation	71
61	Immunomarquage nucléaire du p53	72
62	Résultat de test de mutation BRAF V600E	73
63	Répartition des type histologique selon le teste de mutation BRAF V600E	74

Liste Des Tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Matériel non biologique	16
2	Représentant les AC I utilisés dans l'étude IH C de mélanome	20
3	Volume de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif	30
4	Interprétation des résultats	36
5	Répartition selon l'âge	37
6	Répartition selon les différentes localisations	38
7	Répartition selon localisation et le sexe	40
8	Répartition selon le siège du mélanome et l'âge des patients	41
9	Types de mélanome cutané	42
10	Indice de Breslow et niveau de Clark	43
11	Types de mélanome muqueux	46
12	Types de mélanomes choroidiens	49
13	Type de siège de mélanome métastatique	54
14	Résultats de la coloration histochimique de Fontana	57
15	Expression des marqueurs de différenciations	59
16	Expression de ki67	60
17	Résultats concernant Ki67, index de prolifération	62
18	Expression de C-Kit	62
19	Expression de C-Kit selon le type histologique	65
20	Expression de β -caténine dans les 40 cas de notre série	65
21	Expression de B-caténine selon le type histologique	66
22	Répartition de la positivité de marquage anti b-caténine selon le cite d'expression	67
23	Répartition du type histologique selon cite d'expression de marquage anti b-caténine	69
24	Expression de p53	69
25	Répartition de la positivité de marquage anti P53 selon la localisation	72
26	Résultat de test de mutation BRAF V600E	72
27	Répartition des type histologique selon le teste de mutation BRAF V600E	73

28

Corrélation entre les mélanomes présentant une mutation BRAF V600E détectée et l'expression des différents marqueurs immunohistochimiques étudiés

74

Chapitre IV : Discussions

Notre étude consiste en une réévaluation de 40 cas de mélanomes colligés dans le service de Pathologie du CHU Mustapha sur une période de 7 ans allant de 2008 à 2014. Les patients sont de sexe masculin dans 19 cas (48%) et féminin dans 21 cas (52%) ; il y a presque autant de femmes que d'hommes, le sex ratio est de 0,9. Dans la littérature ces données varient en fonction des séries : aux Etats-Unis, selon Renee A. (2003), l'incidence du mélanome est plus élevée chez l'homme que chez la femme. Contrairement à l'Italie où une nette prédominance féminine est observée (M. Vincetei, M.1999).

L'âge moyen de nos patients dépassait 50 ans. Ce résultat rejoint les données de la littérature (OMS, 2004).

Notre série regroupe 13 cas (33%) de mélanome métastatique, 10 cas (25%) choroïdiens, 9 cas (22%) cutanés, et 8 cas (20%) muqueux.

Parmi les 9 cas de mélanome cutané, nous avons noté une prédominance du sous type nodulaire (67%) suivi du mélanome acral (22%) puis du mélanome de Dubreuilh (11%) comme cela a été rapporté dans la série de W.Ouahioune, (2007) le type nodulaire (33,70%), Acrolentigineux (28,10%), le mélanome de Dubreuilh (16,85%). Dans notre série nous n'avons pas retrouvé de cas de mélanome à extension superficielle, dans la série de W Ouahioune ils représentent 12,36% alors que Bernard Guillot et *al.* (2012), dans une étude française, Le mélanome superficiel extensif est le plus fréquent (60 à 70 % des cas), le mélanome nodulaire plus rare (10 à 20 % des cas). Dans l'étude marocaine de El Haouari Aziza (2012) le mélanome acro-lentigineux semble plus fréquent, il est retrouvé dans 35% (1/3) des cas.

Parmi les 13 cas (33%) de mélanomes métastatiques de notre série, la localisation ganglionnaire est la plus fréquente (46%), comme cela a été classiquement rapporté (OMS 2004, l'étude marocaine d'El Haouari Aziza, 2012)

Pour les mélanomes muqueux nous avons noté une répartition homogène dans les différents types de muqueuse.

Les mélanomes choroïdiens de notre série sont essentiellement de type à cellules mixtes (67%), selon l'étude de J. Poitevin et al (2006) le sous type à cellule fusiforme est plus fréquent (48%), le type mixte ne représente que 24%.

L'étude immunohistochimique utilisant les marqueurs de différenciation montre que le Melan A était exprimé dans les 7cas sélectionnés, la pS100 dans 4 cas sur 5 et l'HMB 45 dans les 2 cas sur 3. Selon l'étude d'El Haouari Aziza (2012). L'anti-Melan A est un anticorps monoclonal qui marque 80 à 90 % des mélanomes. Le marquage est cytoplasmique et souvent plus homogène que celui de l'HMB45, Par ailleurs, l'anticorps HMB45 est plus sensible et sa réaction est fréquemment négative dans les mélanomes à cellules fusiformes de type desmoplastique à stroma fibreux. Le marquage est cytoplasmique. La protéine S100 est le marqueur le plus sensible mais non spécifique des tumeurs mélanocytaires.

Le ki67 est un antigène nucléaire (KI67/mib 1) dont l'expression est associée à la prolifération cellulaire et persiste tout au long des différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2, M). Il est absent en phase G0. Nous pouvons le mettre en évidence par immunohistochimie sur coupes en paraffine. Dans les 40 cas de notre série le marquage immunohistochimique du Ki67 a été positif dans 26 cas (65%). Nous avons réalisé un compte des cellules tumorales marquées sur 300 cellules tumorales examinées au fort grossissement, dans les zones les plus marquées. Ensuite, ce rapport a été exprimé en pourcentage. Il s'agit de l'indice de prolifération. Par la suite, nos résultats ont été classés en 5 groupes différents : entre 1 et 9%, entre 10 et 19%, entre 20 et 29%, entre 30 et 39% et plus de 40%.

Dans notre étude 90% des mélanomes avaient un indice de prolifération supérieur ou égale à 10% en effet, 02 mélanomes (8%) présentent moins de 10% de cellules immunomarquées, 10 (39% des cas) expriment le Ki 67 entre 10 et 19%, 5 cas (19%) entre 20 et 29%, 5 autres cas (19%) présentent entre 30 et 39% de leurs cellules marquées et 4 cas (15%) présentent plus que 40% ; alors que dans l'étude de Christine CASTILLO (2008) 1/3 des cas de sa très petite série avaient un indice de prolifération faible inférieur à 10% en effet, 2 cas de mélanomes (33%) présentaient moins de 10% de cellules immunomarquées, 1 cas dont le Ki67 était entre 10 et 19%, 1 autre cas entre 20 et 29%, et enfin les 2 derniers présentaient entre 30 et 39% de leurs cellules marquées (33%).

Le proto-oncogène C-kit a permis d'identifier un couple récepteur c-kit/ ligand SCF impliqué dans la régulation de l'hématopoïèse et dans la survie et la prolifération des mastocytes, des gamètes et des mélanocytes. Le marquage immunohistochimique de facteur de signalisation C-kit (CD117) a été positif chez 37% des cas et négatif chez (33%), ceci se rapproche des données des séries publiées dans la littérature comme l'étude d'El Haouari Aziza (2012) où le CKit a été positif dans 30% cas et pour C. Willmore-Payne et al. (2005) la plupart des mélanomes perdent l'expression de c-kit pendant la progression tumorale, sur les 100 cas de mélanome qu'il a étudié, seulement 29 cas (29%) ont exprimé le C-kit.

La Bêta-caténine est une protéine dont le gène est *CTNNB1*. Elle a un rôle dans l'adhésion cellulaire, la signalisation cellulaire et la transcription des protéines et donc l'activation des oncogène. La β -caténine a été positive dans la moitié des cas (50%). Parmi les quels 80% montraient une expression membranaire, 10% cytoplasmique et 10% nucléaire ; les 2 cas avec expression nucléaire sont des mélanomes métastatique (métastase ganglionnaire) et cutané de type nodulaire à un stade avancé. Dans l'étude d'Elodie BELLOIR (2006) : il a été observé des cellules melanocytiques bénignes et les cellules primaires de mélanome qui expriment des niveaux élevés de β -caténine, principalement localisées à la membrane des cellules. La localisation cytoplasmique et nucléaire libres de β -caténine augmente avec la progression du mélanome. La β -caténine est impliquée dans le développement pathologique des mélanocytes. Il a été démontré que la β -caténine était surexprimée dans environ 27% des lignées de

mélanomes et mutée dans 30% de ces lignées au niveau des sites de phosphorylation par GSK-3. Au niveau cytoplasmique, elle est impliquée dans la voie de signalisation Wnt et au niveau nucléaire, la β -caténine régule positivement ou négativement l'expression des gènes cibles.

En absence de ligand Wnt, la b-caténine est recrutée au sein d'un complexe de destruction contenant les protéines APC et axine qui facilitent la phosphorylation de b-caténine par CK1a et GSK-3. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination et la dégradation de b-caténine par le protéasome. De plus, dans 28% des mélanomes *in situ*, b-caténine est localisée dans le noyau.

La signalisation de b-caténine augmente au cours de la progression du mélanome et favorise la survie des cellules tumorales et la chimiorésistance

Le facteur pronostique p53 après immuno marquage a été positif dans 18 cas (45%), parmi lesquels 10 cas exprimaient faiblement et 5 cas fortement. Pour Stéphane Dalle et al. (2006), le rôle de p53 dans le mélanome n'est que partiellement compris. La protéine p53 est indétectable dans de nombreux tissus, y compris la peau, du fait de sa courte durée de vie. Cependant, l'étude en immuno-histochimie de tumeurs exprimant des variants mutés de p53 montre que cette protéine est stable dans le temps, et détectable. Il ne semble en revanche pas y avoir d'expression de p53 dans les naevi (tumeurs mélaniques bénignes ou grains de beauté). Le niveau d'expression de la protéine p53, qui croît avec l'épaisseur de la lésion, est aussi plus élevé dans les métastases. Lorsque le mélanome survient sur un naevus, seules les cellules malignes expriment la protéine p53. Lors de l'analyse de la tumeur primitive, des pertes d'hétérozygotie de *TP53* ont été retrouvées dans environ 20 % des cas.

Min Lu et al (2013) L'analyse immunohistochimique de 185 échantillons de mélanome a montré que dans la majorité des tumeurs des niveaux élevés de p53 sont exprimées dans une proportion considérable de cellules tumorales. De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression de p53 à partir de tumeurs métastatiques primaires.

La recherche de la mutation BRAF a été réalisée dans 25 cas, elle a été détectée dans 4 cas/25 soit 16%, il s'agissait exclusivement de mélanomes cutanés (4 cas sur 8 mélanomes cutanés ont une mutation BRAF soit 50%) ; parmi lesquels 3 cas sont de type nodulaire et 1 cas de type acral.

Dans notre série de mélanomes cutanés, la mutation BRAF a été détectée chez de jeunes patients, de sexe masculin, âgés respectivement de 34, 35, 46 et 62 ans. D'après D. Cupissol et al. (2014) 3479 patients atteints d'un mélanome ont bénéficié d'un test BRAF en France. Le taux de mutations identifiées (V600E, V600K, etc.) a été de 37,6 %. Selon Marianne Laforest et al (2013), la présence de mutations dans le gène encodant la protéine kinase serine-thréonine B-RAF (BRAF) a été détectée dans plus de 60 % des mélanomes testés. 80 à 90 % de ces mutations consistent en une substitution de l'acide glutamique par la valine pour l'acide amine en position 600 (BRAF V600E).

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, l'indice de prolifération KI67 est élevé (de 20% à 35%) et l'expression de p53 dans tous les cas est inférieure à 0,9%. Par ailleurs, l'expression de la β -caténine est cytoplasmique dans 2 cas, nucléaire dans 1 cas et membranaire dans 1 cas aussi. C. Willmore-Payne 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).

Selon Corine BERTOLOTTO (2008), la transformation maligne Chez l'homme du mélanocyte de la peau, résultant de modifications génétiques, conduit au mélanome. Il a été montré qu'une mutation activatrice de B-Raf entraîne une prolifération modérée des mélanocytes qui s'arrête ensuite rapidement dans une phase dite de sénescence pour former un naevus. Des altérations géniques additionnelles, comme la perte de p16 seraient ensuite nécessaires au développement de la tumeur. Toutefois, dans 75% des cas, le mélanome ne se forme pas à partir d'un naevus préexistant mais de novo. L'activation de la β -caténine pourrait donc bloquer l'induction de p16 consécutive à la mutation de B-Raf, court-circuitant la phase de sénescence et favorisant la transformation des mélanocytes.

L'expression de ki67 dans les cas BRAF mutés et de 20% à 35% selon l'étude de HIROTAKA NAKAYAMA ET AL (2007) le moyen pour Ki-67 LI était faible, mais était significativement plus élevée chez les patients atteints de BRAF-positif que chez les patients BRAF-négatif. Ces résultats suggèrent que la mutation BRAF peut activer la voie de la MAP kinase, entraînant une activation de la prolifération cellulaire tumorale.

Conclusion et Perspectives

L'objectif de notre travail a été atteint d'une part pour la recherche de l'expression des marqueurs de différenciation, de prolifération et de signalisation) qui nous ont permis de maîtriser la technique d'IHC, d'autre part pour la recherche et la caractérisation de la mutation BRAF et la maîtrise de la technique de PCR en temps réel. Ces travaux ont nécessité la mise au point de nombreux protocoles.

Notre étude de 40 cas de mélanomes a montré des résultats assez similaires à la plupart des études rapportées dans la littérature. Dans le mélanome cutané le sous type le plus fréquent est le nodulaire. Les mélanomes métastatiques sont essentiellement ganglionnaires. Dans notre série les mélanomes choroïdiens sont à cellularité mixte.

L'étude immunohistochimique utilisant les marqueurs de différenciation (Melan A, HMB45 et /ou pS100) ont permis de confirmer le diagnostic de mélanome dans tous les cas achromiques ou peu pigmentés. L'étude du marqueur de prolifération Ki67, a montré que 90% des mélanomes avaient un indice de prolifération supérieur ou égale à 10% ; il est beaucoup plus élevé dans les cas métastatiques.

Le marquage immunohistochimique du facteur de signalisation C-kit (CD117) a été observé dans 1/3 des cas. La bêta-caténine a été exprimée dans la moitié des cas de notre série, le plus souvent en membranaire, seul 2 cas en nucléaire.

La mutation BRAF a été détectée chez 04 jeunes patients, de sexe masculin présentant un mélanome cutané, dans ces cas mutés, le C-KIT n'était pas exprimé (en effet les mutations kit et BRAF sont mutuellement exclusives), l'indice de prolifération Ki67 élevé (de 20% à 35%) (En effet les mutations *BRAF* conduisent à une augmentation de l'activité de la tyrosine kinase et de la prolifération cellulaire)

Toutefois dans cette étude nous avons été confrontés à quelques difficultés d'interprétation de l'immuno-marquage de certains cas du fait de l'abondance du pigment mélanique qui masque les noyaux, les cytoplasmes gênant la lecture immunohistochimique.

La compréhension des anomalies génétiques et des mécanismes moléculaires impliqués dans le mélanome aux stades initiaux et disséminés progresse actuellement de manière spectaculaire. Les hypothèses de développements thérapeutiques sont aussi très nombreuses, même si le traitement du mélanome métastatique constitue encore un défi thérapeutique majeur pour les chercheurs et médecins impliqués dans la prise en charge de cette maladie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ Amir .Zc, Tidadini, 2013 : Xième Journées Nationales De Pathologie 1er EPU Sur Les Tumeurs Melaniques ([Http://Www.Aspath-Dz.Com/](http://Www.Aspath-Dz.Com/))
- ❖ Adina .V , Meenhard .H,2013 : Melanoma Research Center, The Wistar Institute, Philadelphia, PA 19104, USA ; Snap shot
- ❖ Alexander .M, Menzies .A,B, Georgina .V, 2013 : Long Recent advances in melanoma systemic therapy. BRAF inhibitors, CTLA4 antibodies and beyond
- ❖ Anoma Ranaweera B.V; 2011 :Genetics of melanoma, DermNet NZ .
- ❖ Arnaud .P, Jérôme .V ; INCA, 2011 : Détection précoce des cancers de la peau. FRDEPTKPEAU11
- ❖ Astrid .L, Laurent-Puig .P, 2010 : La voie de signalisation RAS/MAPK DOI 10.4267/2042/30747
- ❖ Ben-Porath .I, Weinberg .RA, 2005 : The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol;37:961–76.
- ❖ Basset .N, Seguin, Dreno .B, Grob .J-J, 2003 : Tumeurs cutanées épithéliales et mélaniques : mélanomes Ann Dermatol Venereol;130:3S140-3S145
- ❖ Broccard.N, 2009 : Le mélanome.15, LSC / 4.2009 / 3000 F / 2085
- ❖ Belloir .E, 2006 : Fonction d'une forme oncogénique de b-caténine (b-catDEx3) dans le lignage mélanocytaire.
- ❖ Chagnon .S, Dreno .B, Farge .T, Ferrara .AR, Gaspari .R, Guillot .B, Mirabel .X, Nollent .V, Pauly .JM, Revol .M, Robert .C, Ruetsch .M, Salama .A, Tiffet .O, Vergier .B, Vigouroux .MP, 2012 : guide - affection de longue durée Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Mélanome cutané .11,12,17,ALD n°30.
- ❖ Dalle.S, Tanguy .M-D, Luc .T, 2006 : Hypervariabilité génotypique des mélanomes Un défi thérapeutique
- ❖ Domingo.E, Simo Schwartz .Jr, 2004 : Oncologia Molecular i Envelliment, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM) Hospital Universitari Vall d'Hebron Passeig Vall d'Hebron 119-129 Barcelona 08035.
- ❖ El Haouari. . A, 2012 : les mélanomes cutanés et muqueux 172/12.
- ❖ Firoz. EF, Warycha .M, Zakrzewski .J, et al. 2009: Association of MDM2 SNP309, age of onset, and gender in cutaneous melanoma. Clin Cancer Res. 15(7):2573-80.
- ❖ Graeme .W, Hacker .E, 2011 : Ultraviolet Light as a Modulator of Melanoma
- ❖ Gubler .B, 2014 : Mutations et addictions à l'oncogène Laboratoire d'Oncobiologie Moléculaire Laboratoire d'Immunologie EA4666 LyNPpC
- ❖ Gray-Schopfer.V, et al, 2007 : Nature 445, 851-857
- ❖ Ilie .M, 2012 : Bases cliniques, histologiques, et moléculaires des mélanomes, biopathologie , laboratoire de pathologie clinique et expérimentale, hôpital pasteur, chu de nice ircan inserm equipe 3,faculté de médecine de Nice

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ Ibrahim .N, Haluska,.F.G, 2009 : Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Anna. Rev. Pathol.* 4.
- ❖ Jovanovic. P, Mihajlovic .M, Djordjevic-Jocic, .J, Vlajkovic, .S, Cekic, .S, and Stefanovic, V. 2013 : Ocular melanoma: an overview of the current status.*Int J ClinExpPathol*6.
- ❖ Leslie .A, Fecher, Staci .D, La situation du cancer en France en 2011 : Collection Rapport et synthèses, ouvrage collectif édité par l'INCa Cummings, Megan .J, Keefe, Rhoda .M, Alani, 2007 : Toward a Molecular Classification of Melanoma.
- ❖ Lin J, Hocker TL, Singh M, Tsao H, 2008 : "Genetics of Melanoma Predisposition." *Br J Dermatol.* 159(2):286-9
- ❖ Maia et al. *Journal of Translational Medicine* 2012 : Prognostic significance of c-KIT in vulvar cancer: bringing this molecular marker from bench to bedside 10:150
- ❖ Marianne Laforest .I, Pharm .B, M.Sc, 2012 : Le traitement pharmacologique du mélanome cutané métastatique *Pharmactuel* 2013;46(2)
- ❖ Ouahioune.W, 2007 : Les mélanomes cutanés aspect anatomopathologiques et facteurs histopronostiques. Thèse de Doctorat Es Sciences Médicales. p : 196.
- ❖ Ouahioune .W,2013 : Nous dépassons les 30 nouveaux cas de mélanomes, par an. *Santé-MAG* N°22 –
- ❖ Philip .E, Boit, Günter .B, Weedon .D, SARASIN .N, 2006 : Pathologie and genetics skin tumors
- ❖ Porras .B.H, and Cockerell, C.J, 1997 : Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Semin.Cutan. Med. Surg.* 16.
- ❖ Scolyer, R.A., Long, G.V., and Thompson, J.F, 2011 : Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Mol. Oncol.* 5.
- ❖ Staci .D,Leslie. A, Fecher, Cummings, Megan J. Keefe, and Rhoda .M, Alani, 2006 : Toward a Molecular Classification of Melanoma .
- ❖ Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G ,2004 : Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J. Invest. Dermatol.*122, 337–341.
- ❖ Willmore-Payne .C, Joseph .A, Holden, Sheryl Tripp .BS, QIHC .MT, Lester .J, Layfield 2005 : Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis, *Human Pathology* 36, 486– 49
- ❖ Wang .E, Wang.B, M.D, 2003 : FRCPC Le mélanome malin 124-012F

Annexes

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

Ac laire : anti-corp primaire

AC IIaire : anti-corp srcondaire

ALM : Mélanome Acro-Lentigineux

ARF : suppléant du cadre de lecture ouvert; aussi connu comme p14ARF chez l'homme

AJCC : American Joint Committee on Cancer

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

CDKN2A : inhibiteur cyclin-dépendant 2A de kinase

EGFR : , récepteur épidermique de facteur de croissance ;

ERK : Extracellular Signal regulated Kinases

Ft : Tubes de filtration

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3

HMB45 : Human Melanoma Black(anticorps anti mélanocyte)

HE : Hématoxyline Eosine

HDM2 : Humien Double Minute 2

INK4A : inhibiteur de la kinase cycline-dépendante 4; également connu sous le nom
p16INK4a

IHC : immunohistochimie

LMM : lentigo maligne melanoma

MSH : Mélanocyte Stimulating Hormone

MITF : Microphthalmia-associated Transcription Factor

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

Mdm2: mouse double minute 2 p53

NM : mélanome nodulaire

NRAS : Neuroblastoma RAS oncogene homolog **SSM** : mélanome à extension superficiel

PTEN : Phosphatase TENsin homologue

OMS : organisation mondiale pour 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

Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RB : Rétino Blastome

RGP : Phase de croissance radiale

RT PCR : real time polymerase chain reaction

RTK : récepteur tyrosine kinase

SCF : Stem Cell Factor

TNM: Tumor Nodes Metastasis

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

UV : rayons Ultra-Violets

VGP : Phase de croissance verticale

V : valine

Wnt : Wingless Type

Annexe 1 : la règle ABCDE









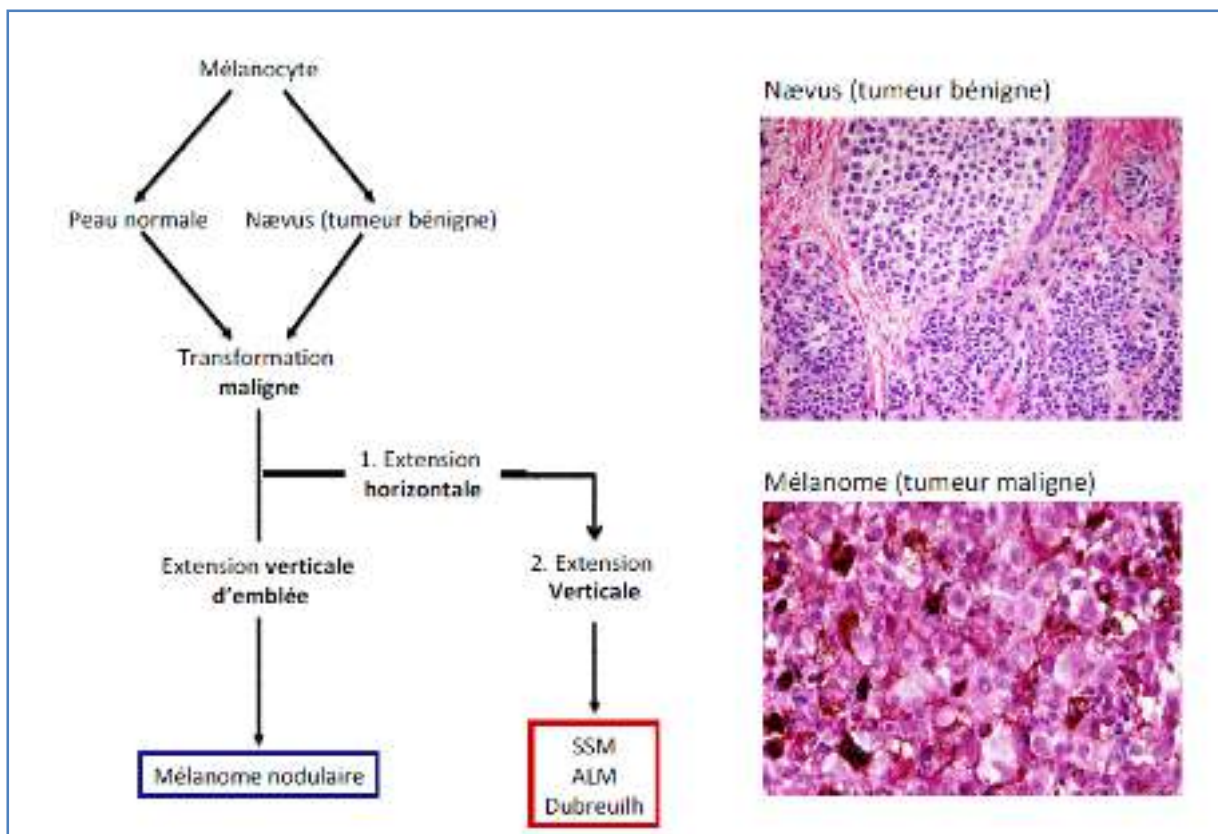
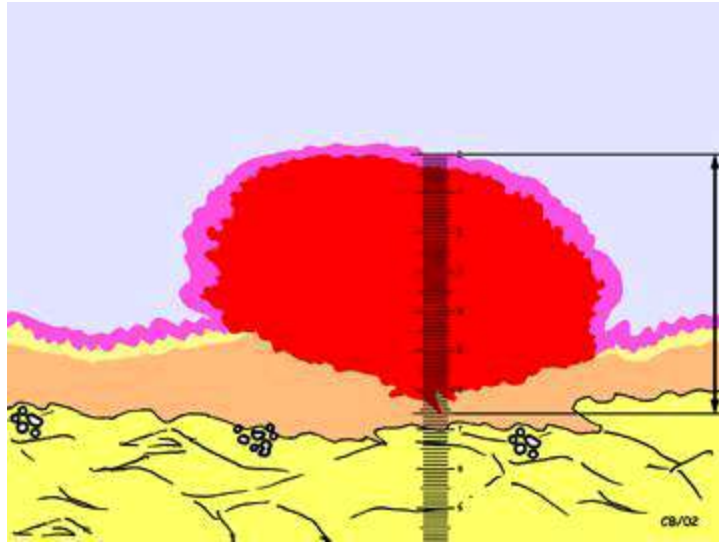
	Règle ABCDE	
	Normal	Suspect
A comme Asymétrie		
B comme Bords irréguliers		
C comme Couleur non homogène		
D comme Diamètre en augmentation		

Tableau réalisé selon le site de l'Institut National du Cancer

Annexe 2 : Histogénèse des mélanomes



Annexe 3 : Mesure de l'épaisseur (indice de Breslow)



L'épaisseur maximale de la tumeur se mesure sur une coupe histologique à l'HE.

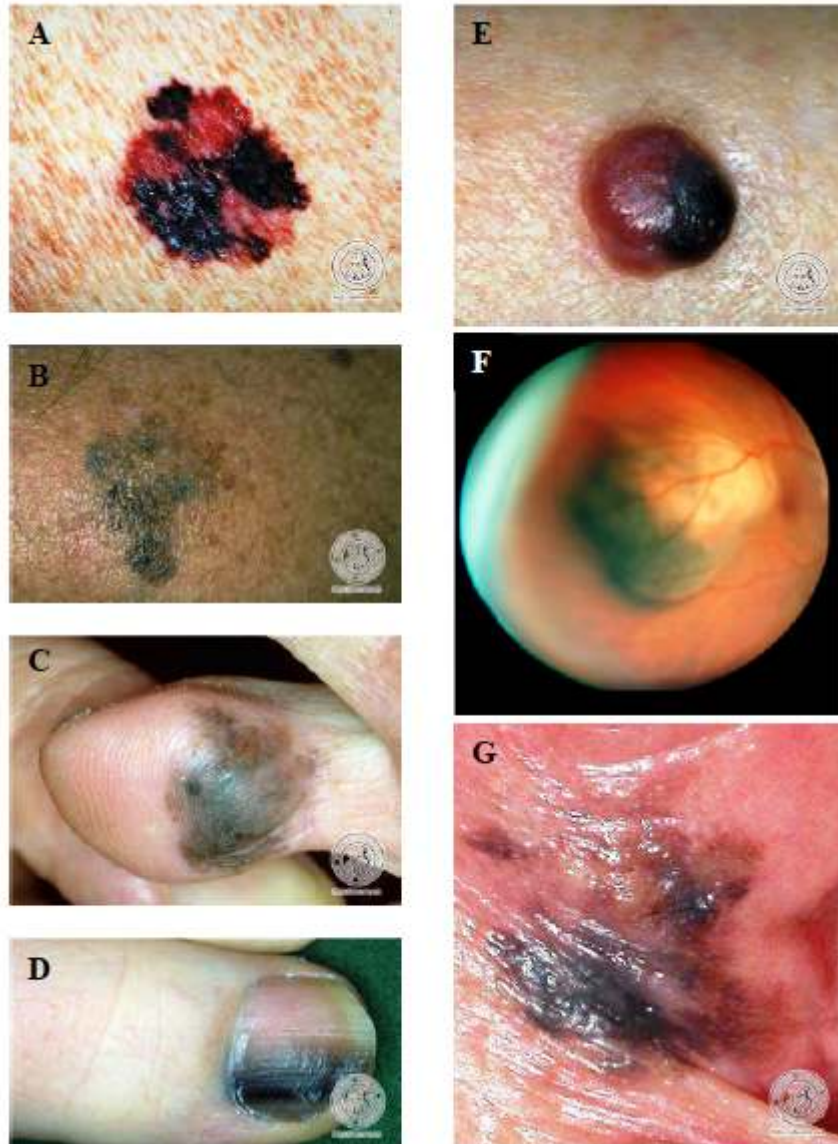
La mesure s'effectue au microscope avec l'aide d'un micromètre oculaire.

On mesure la zone la plus épaisse depuis la couche granuleuse de l'épiderme.

À chaque grossissement correspond un coefficient multiplicateur par lequel il faut multiplier le nombre de divisions de l'échelle du micromètre. **L'épaisseur est donnée en mm.**

On ne mesure l'indice de Breslow que pour les mélanomes envahissant le derme et non pour les mélanomes *in situ*.

Annexe 4 : Les différentes formes anatomo-cliniques des mélanomes cutanés



A : Mélanome à extension superficielle (SSM : Superficial Spreading Melanoma)

B : Mélanome de Dubreuilh (Lentigo Melanoma)

C : Mélanome acrolentigineux affectant la plante des pieds

D : Mélanome acrolentigineux affectant l'ongle

E : Mélanome nodulaire

F : Mélanome uvéal affectant la choroïde

G : Mélanome muqueux

(D'après www.dermis.net et Tsao, 2012)

Annexe 5 : Classification pTNM l'UICC 2009

Tableau 3: Classification TNM du mélanome			
T Classification	Épaisseur (mm)	Ulcération	
T1	≤ 1,0	a : sans ulcération et niveau II/III b : avec ulcération ou niveau IV/V	
T2	1,01-2,0	a : sans ulcération b : avec ulcération	
T3	2,01-4,0	a : sans ulcération b : avec ulcération	
T4	>4,0	a : sans ulcération b : avec ulcération	
N Classification	Nombre de ganglions métastatiques	Masse métastatique ganglionnaire	
N1	1	a : micrométastase b : macrométastase	
N2	2-3	a : micrométastase b : macrométastase c : Métastase(s) en transit/ satellite(s) sans ganglions métastatiques	
N3	4 ganglions métastatiques ou plus, ou ganglions adhérent entre eux, ou métastase(s) en transit/satellite(s) avec ganglion(s) métastatique(s)		
M Classification	Site	Lactate-déshydrogénase sérique	
M1a	Métastases cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires à distance	Normal	
M1b	Métastases pulmonaires	Normal	
M1c	Toutes les autres métastases viscérales	Normal	
	Toute métastase à distance	Élevé	

Annexe 6 : Staging TNM de l'UICC et de l'AJCC 2009

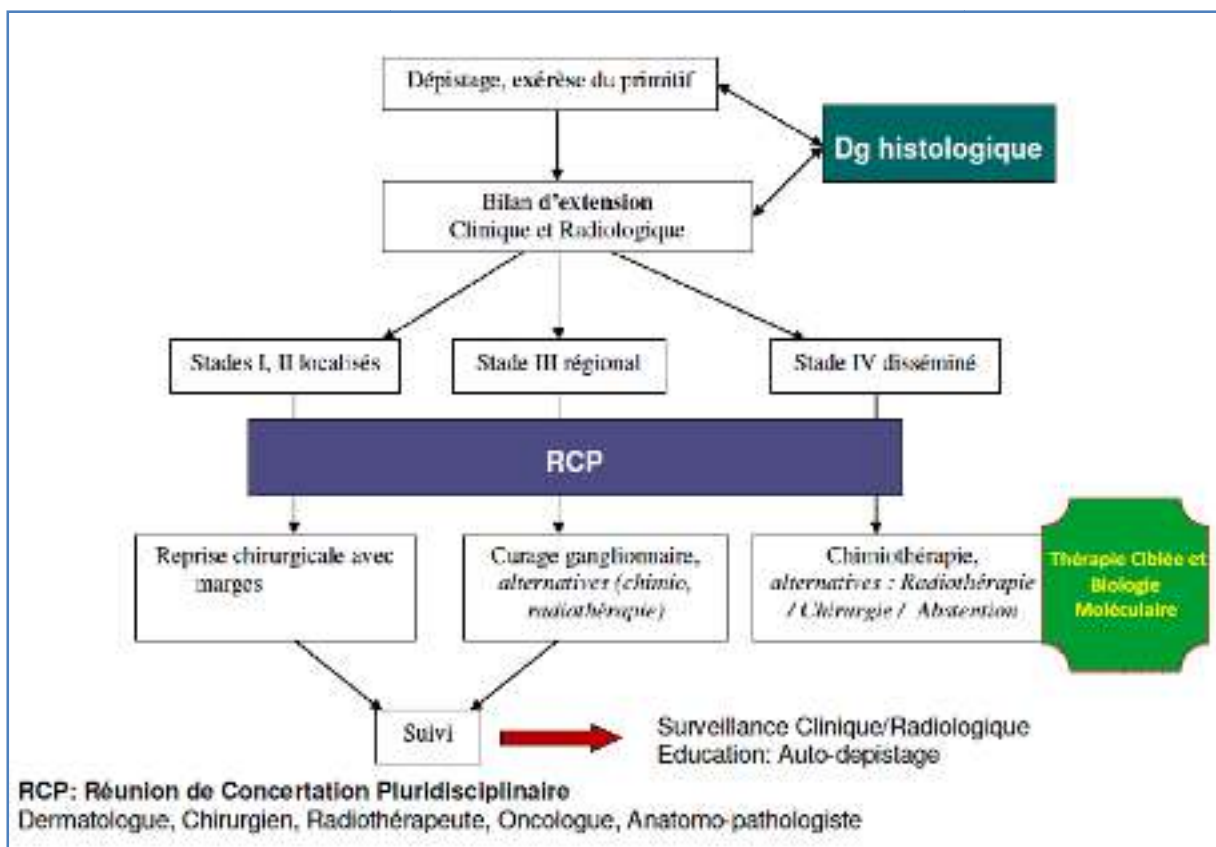
Stades	Critères
Stade 0	Tumeur <i>in situ</i>
Stade IA	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, sans ulcération et mitoses < 1/mm² (pT1a), N0, M0
Stade IB	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, avec ulcération et/ou mitoses ≥ 1/mm² (pT1b), N0, M0 Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a), N0, M0
Stade IIA	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b), N0, M0 Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a), N0, M0
Stade IIB	Tumeur supérieure à 2 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT3b), N0, M0 Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT4a), N0, M0
Stade IIC	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
Stade IIIA	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0
Stade IIIB	Tumeur sans ulcération (pT1a-4a), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0 Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0
Stade IIIC	Tumeur avec ulcération (pT1b-4b), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0 Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3), M0
Stade IV	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

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

Annexe 7 : Taux de survie à 5 ans chez les patients classifiés par stade pathologique

Tableau 4: Taux de survie à 5 ans chez les patients classifiés par stade pathologique								
	IA	IB	IIA	IIB	IIC	IIIA	IIIB	IIIC
Ta : mélanome non ulcéré	T1	T2	T3	T4		N1a, N1b, N2a	N2b, N3	
	95 %	89 %	79 %	67 %		67 %	54 %	28 %
Tb : mélanome ulcéré		T1	T2	T3	T4		N1a, N1b, N2a	N2b, N3
		91 %	77 %	63 %	45 %		52 %	24 %

Annexe 8 : schéma de prise en charge d'un patient présentant un mélanome



Annexe 9 : Stratégies thérapeutiques en fonction du stade du mélanome

Tableau 5 Stratégies thérapeutiques en fonction du stade du mélanome

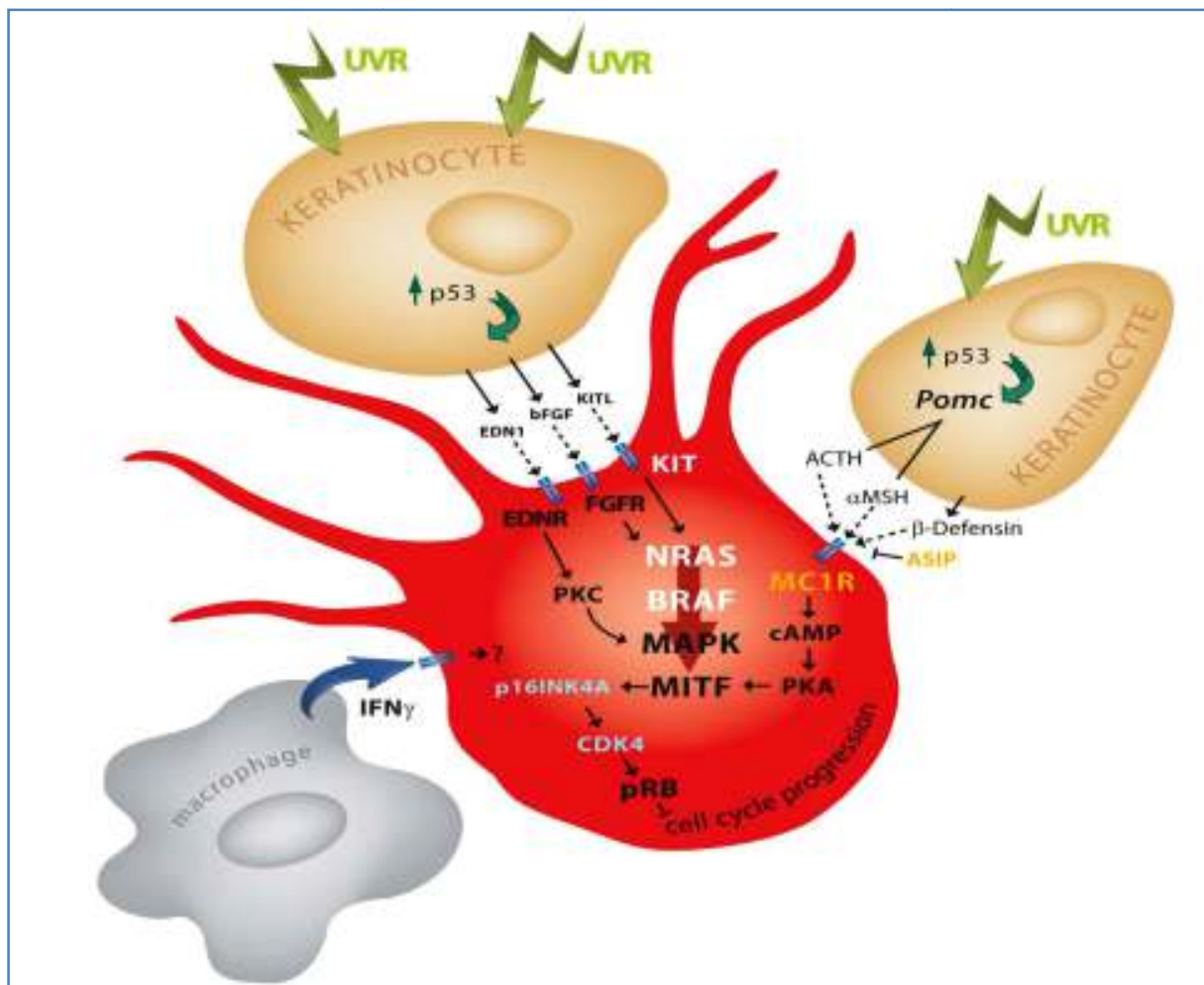
STADE UICC/TNM	CHIRURGIE	CURAGE GANGLIONNAIRE	IMMUNOTHÉRAPIE	CHIMIOTHÉRAPIE	RADIOTHÉRAPIE
Stade I	☒				
Stade II	☒		○		
Stade III*	☒	☒	○		○
Stade IV	○	○	○	○	○

☒ : modalité thérapeutique de référence, systématique (sauf si contre-indication).

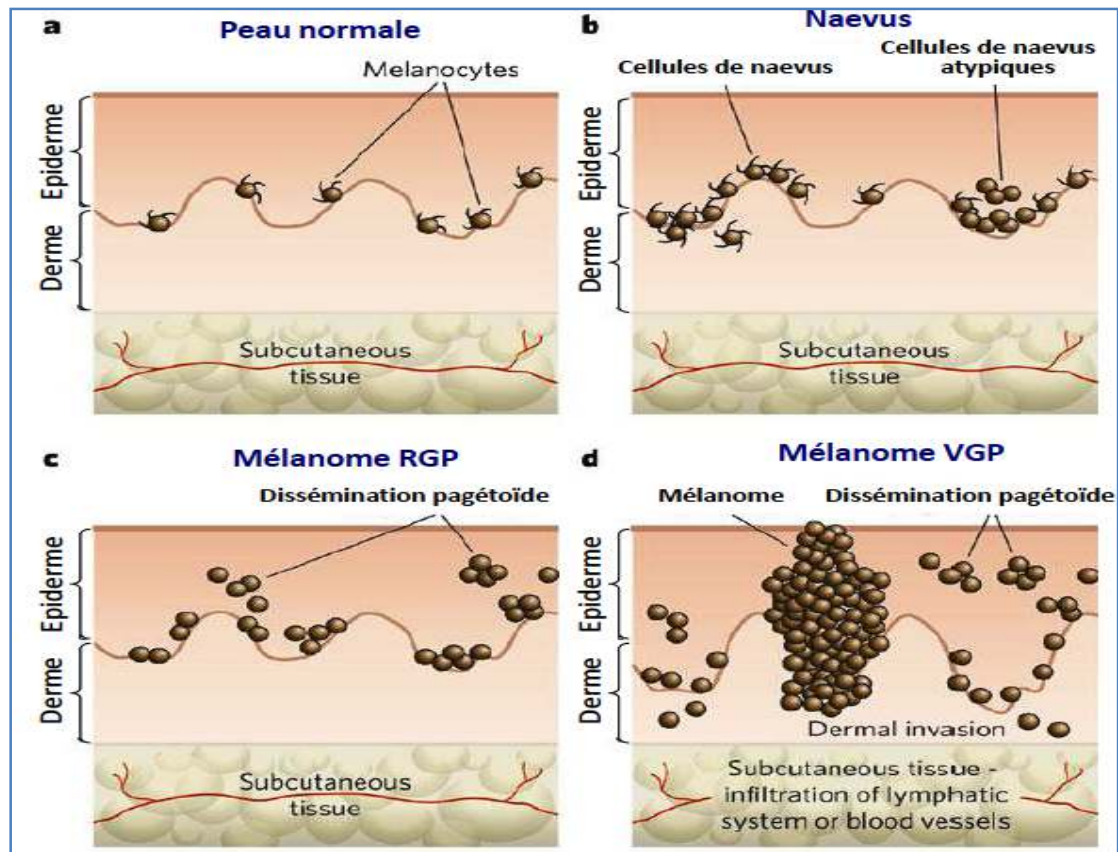
○ : modalité thérapeutique pouvant être discutée selon les situations.

* : le stade III inopérable rejoint le stade IV.

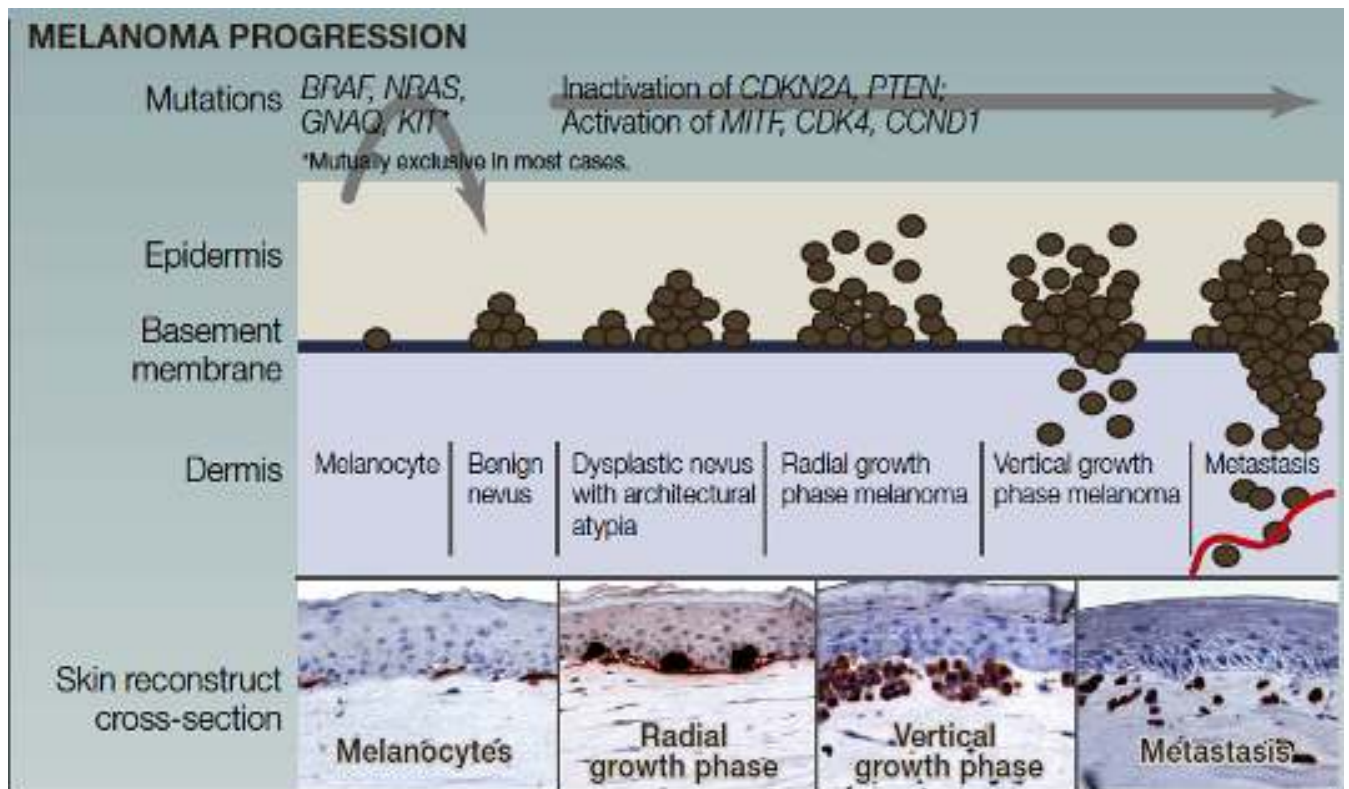
Annexe 10 : Le mélanocyte et son environnement



Annexe 11 : Du mélanocyte au naevus au mélanome



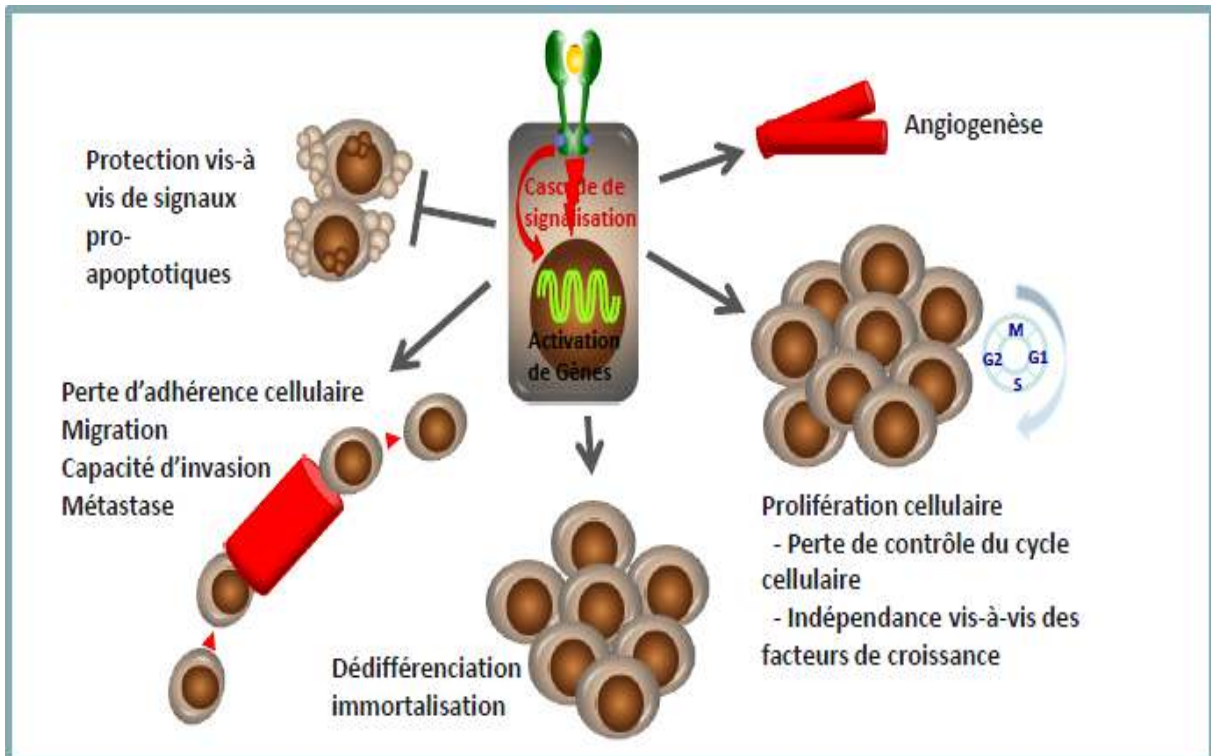
Annexe 12 : PROGRESSION DE MÉLANOME



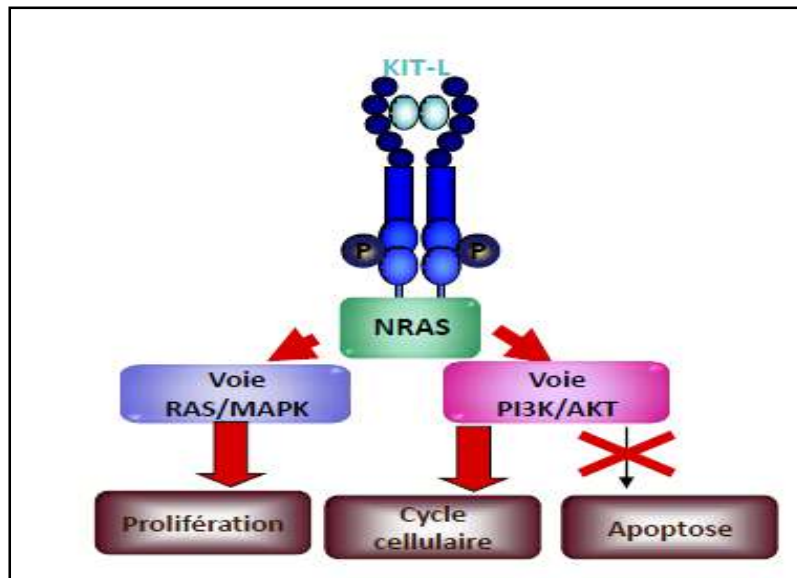
Annexe 13 : les anomalies moléculaires du mélanome

Gènes	Altérations	Fréquence	Sous-type de mélanome concerné	Voies affectées
Kinase ou facteurs des voies de signalisation				
BRAF	Mutation ponctuelle	50%	Tous types et plus particulièrement les mélanomes nodulaires et superficiels extensifs	MAPK
NRAS	Mutation ponctuelle	20%	Tous types et plus particulièrement les mélanomes nodulaires et superficiels extensifs	MAPK, PI3K et RALGDS
KIT	Mutation ponctuelle	1%	Mélanomes acrolentigineux (10%), muqueux (10%), plus rarement lentigo malin	MAPK et PI3K
CDK4	Mutation ponctuelle ou amplification	5%	Tous types	Cycle cellulaire
CCND1	Amplification	10%	Tous types	Cycle cellulaire
ERBB4	Mutation ponctuelle	15-20%	Tous types	PI3K
AKT1, AKT2 et AKT3	Mutation ponctuelle ou amplification	<1% Mutation ponctuelle 25% amplification (AKT3)	Tous types	PI3K
NEDD9	Amplification	50-60%	Tous types	Protéines de structure
GNAQ	Mutation ponctuelle	<1%	Mélanome uvéal (40%)	Voie PKC
GNA11	Mutation ponctuelle	<1%	Mélanome uvéal (40%)	Voie PKC
Facteurs de transcription				
MITF	Amplification	20%	Tous types	Lignage mélanocytaire et cycle cellulaire
MYC	Amplification	20%	Tous types	Cycle cellulaire
ETV1	Amplification	15%	Tous types	Voie MITF
Suppresseur de tumeur				
CDKN2A	Mutation ponctuelle Ou délétion	30%	Tous types	Cycle cellulaire
TP53	Mutation ponctuelle	5%	Tous types	Cycle cellulaire
BAP1	Mutation ponctuelle	<1%	Mélanome uvéal (30%)	BRCA1
PTEN	Mutation ponctuelle ou délétion	50-60% Mutation ponctuelle ou délétion hétérozygote. 10% délétion homozygote	Tous types	PI3K

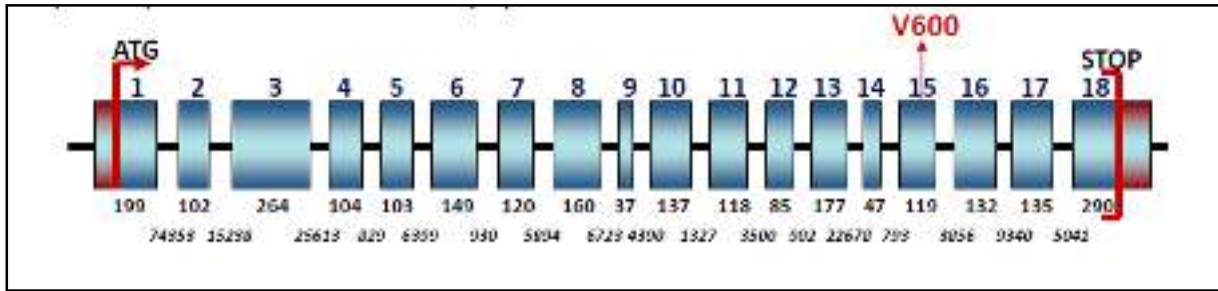
Annexe 14 : Dérégulations de la cellule et conséquences



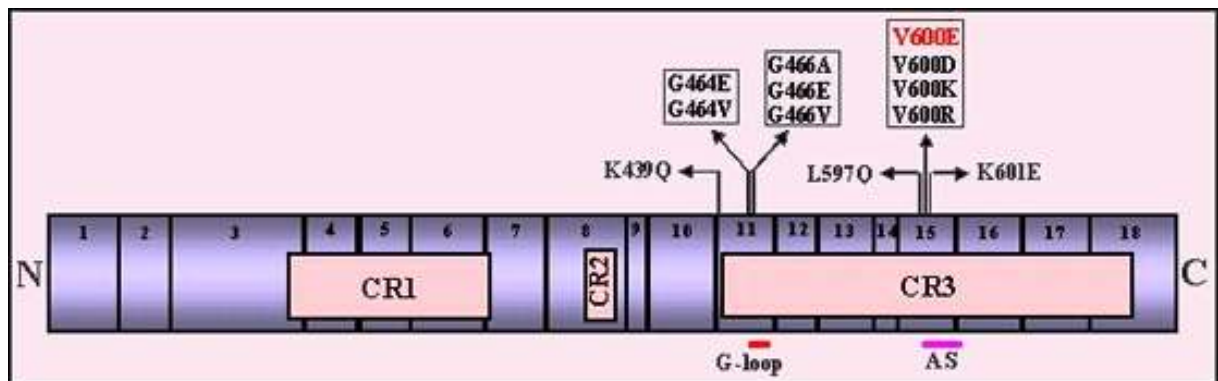
Annexe 15: l'activité tyrosine kinase de KIT



Annexe 16 : Le gène BRAF

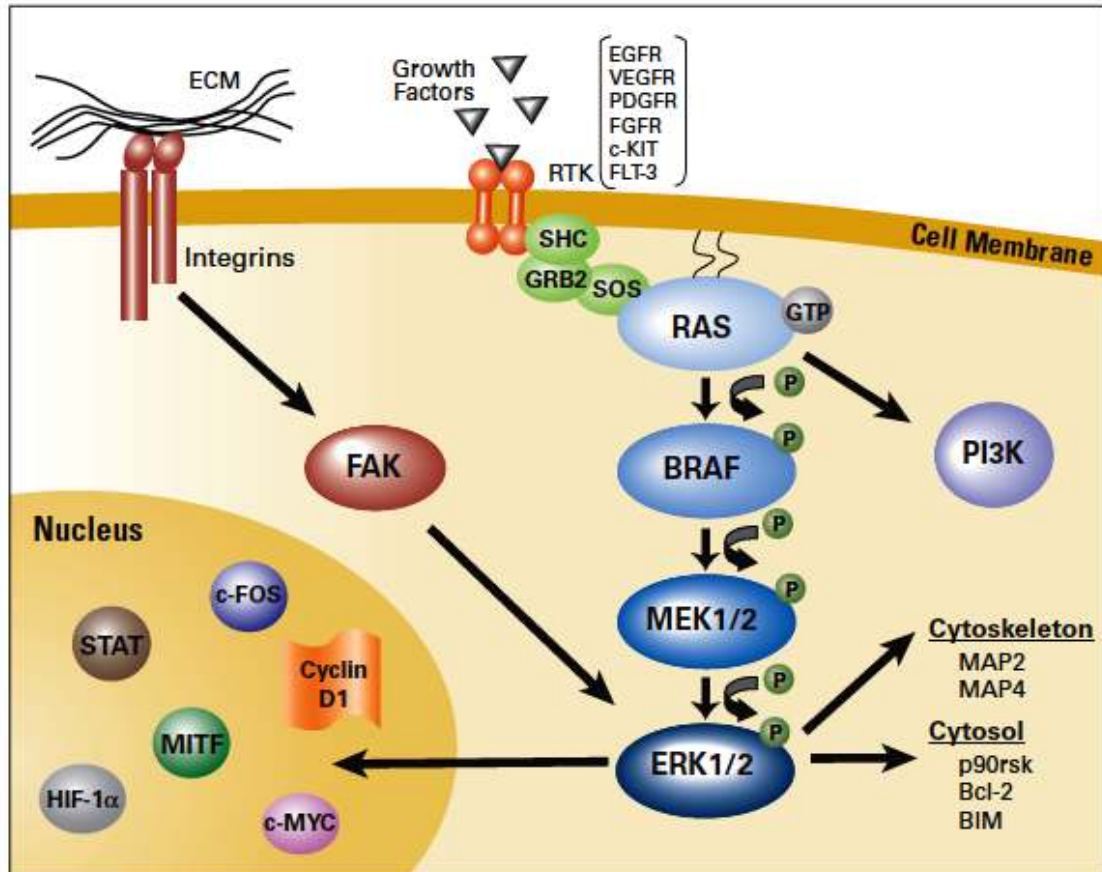


Annexe 17: Diagramme avec des mutations de BRAF trouvées dans le mélanome.

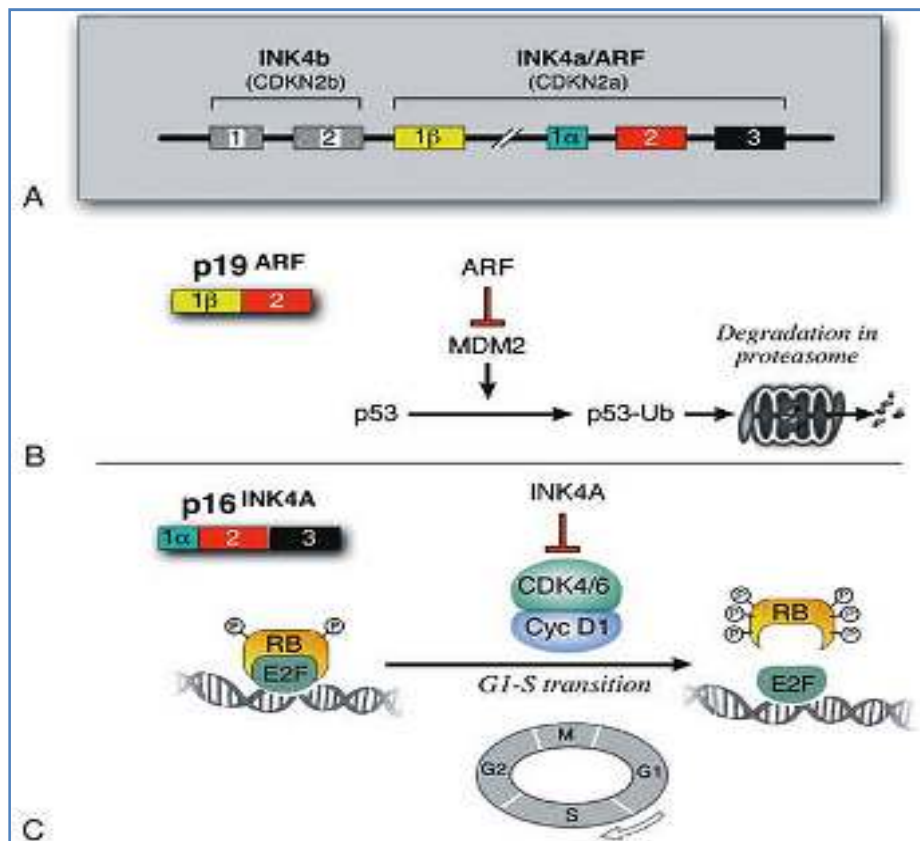


Les flèches noires indiquent les mutations. Les mutations à l'intérieur d'une boîte sont dans le même acide aminé. La mutation V600E de point névralgique est en rouge. Les nombres à l'intérieur des boîtes bleues indiquent l'exon dont est traduite chaque partie de la protéine. L'intérieur de trois boîtes 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)

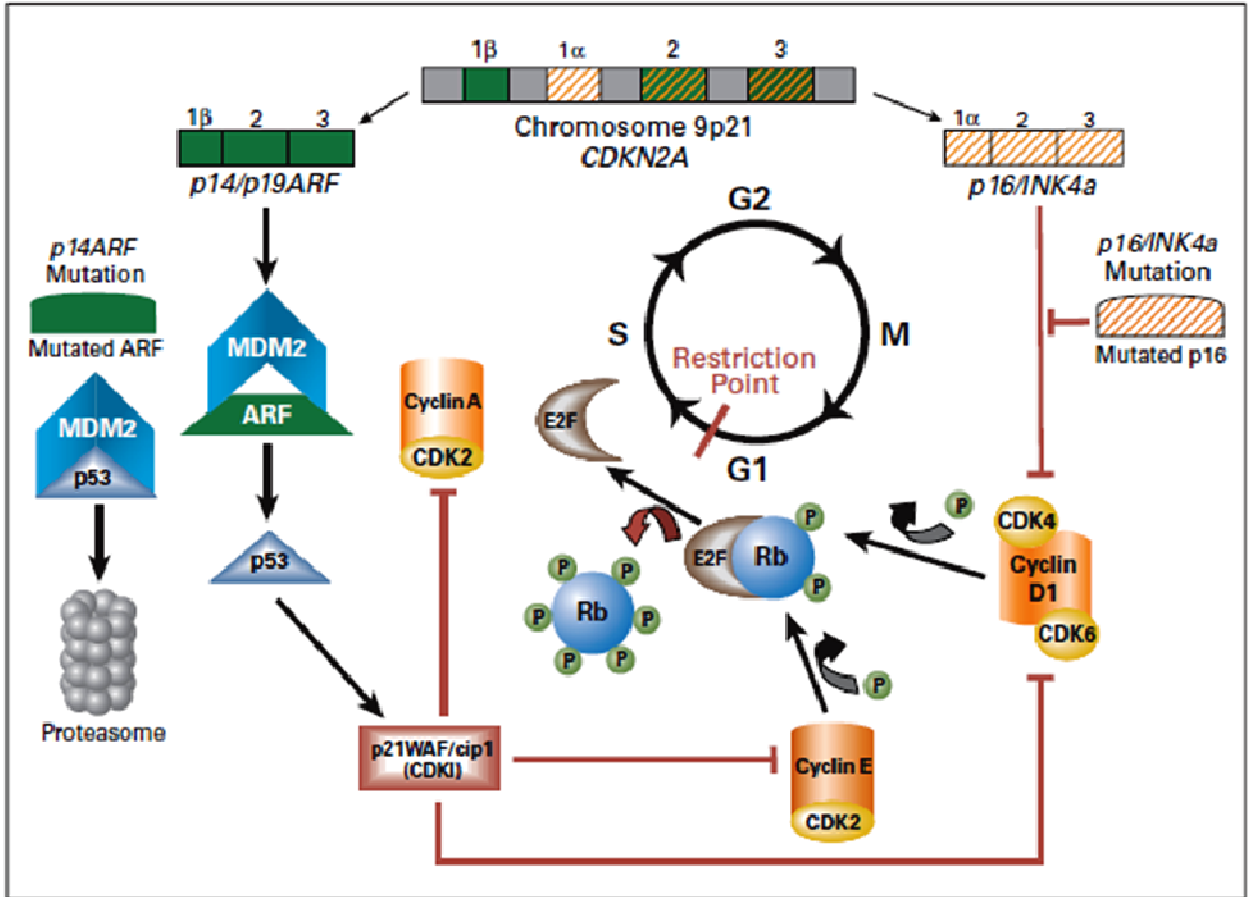
Annexe 18 : La cascade mitogène-activée de signalisation (MAPK) de protéine kinase



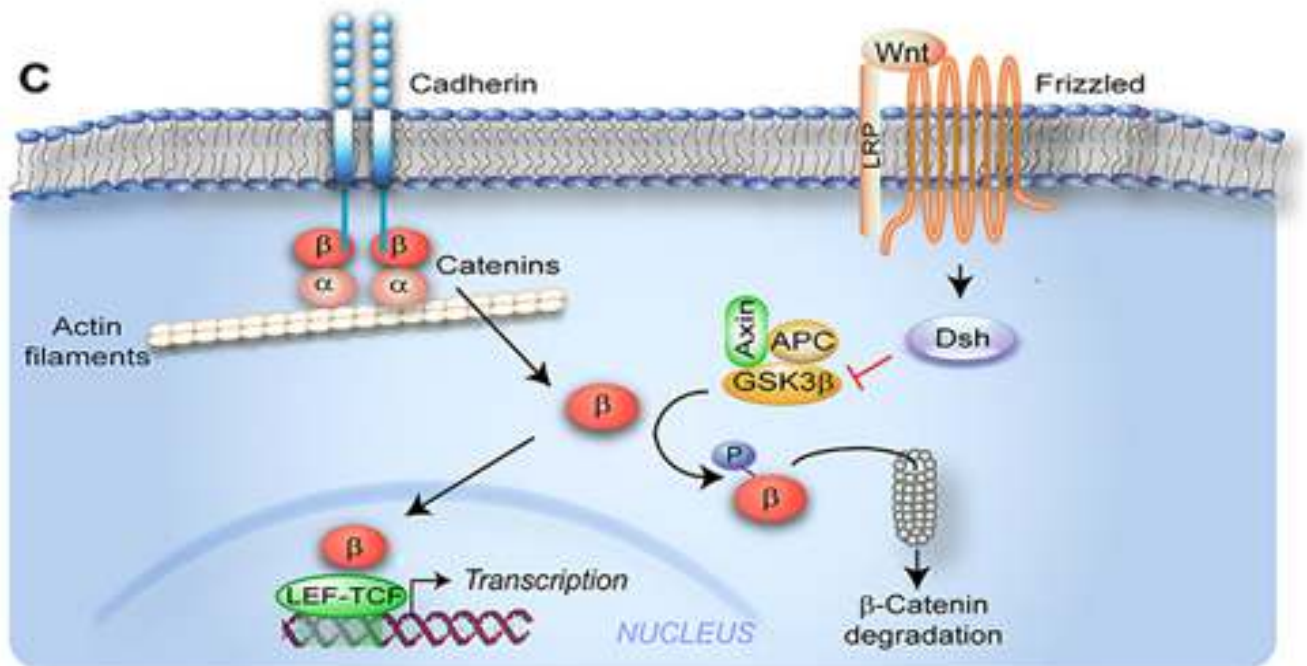
Annexe 19 : La structure génomique inhabituelle et les produits du locus de CDKN2A



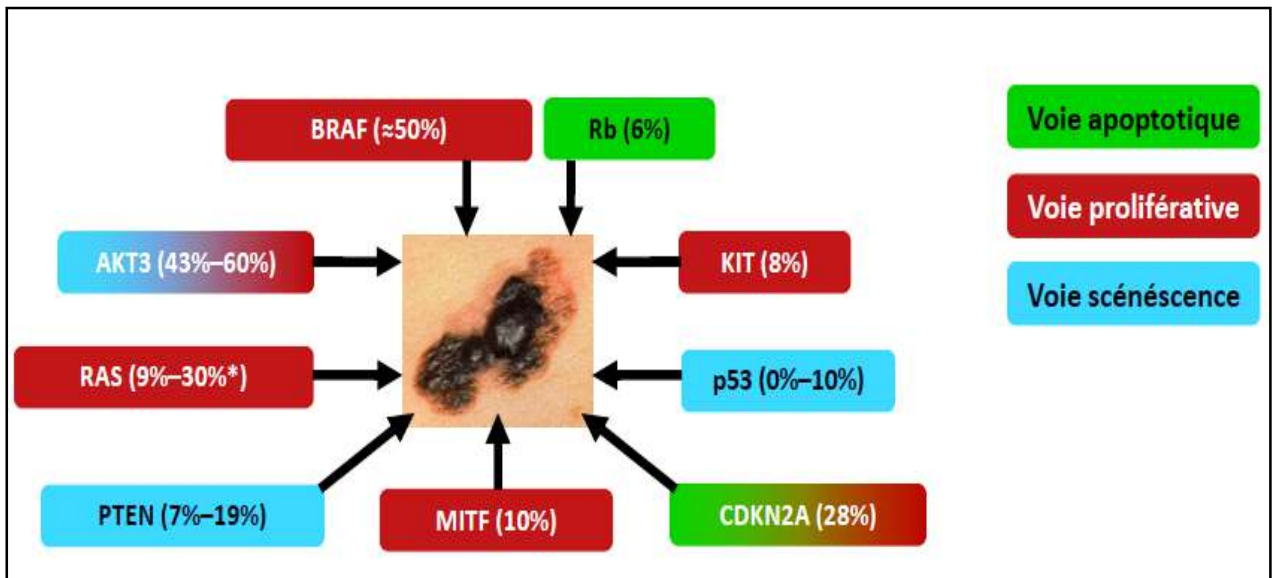
Annexe 20 : Règlements de cycle de cellules par cycline dépendent kinases (CDKs)



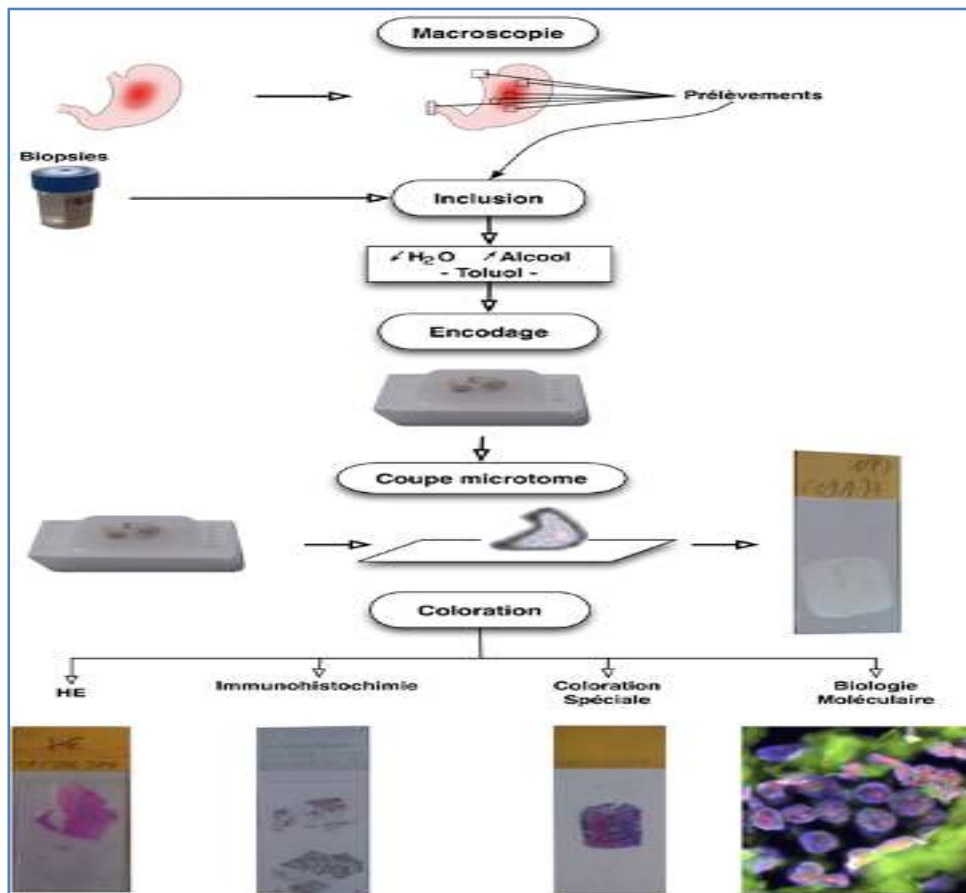
Annexe 21 : la voie de signalisation Wnt / beta-caténine



Annexe 22 : Conclusions et réflexions sur la carcinogénèse du mélanome

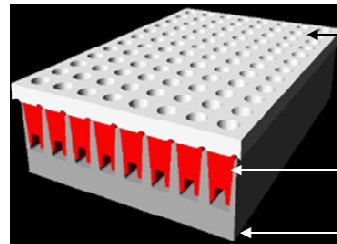
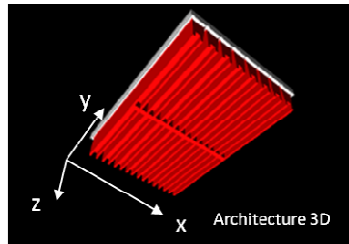
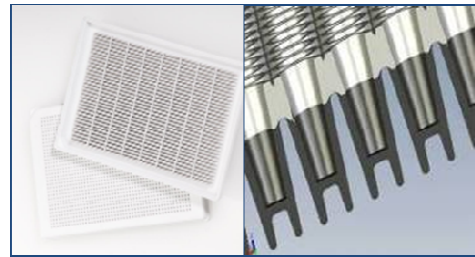


Annexe 23 : les différentes étapes de la phase pré analytique



Annexe 24 : Concept unique de Microplaque

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


















Partie supérieure
non conductive

Couche conductrice des puits

Thermo bloc

Annexe 25 : résultats de BRAF V600E mutation teste

cobas[®] 4800					
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
AD1	Mutant Control	1	Valid		
BD1	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		

				
ACs laires	Solution de dilution	Solution DAB	Eau oxygénée	Une des étapes de la PCR
				
ACs laires dilués	Coupe macroscopique enrobée de paraffine dans une cassette étiquetée.	Pipette	Bac d'Hémathoxyline	Bacs d'alcool et de xylène
				
Réactifs du kit PCR	Spéctromètre Nanodrop	Micro-centrifugeuse	Mélangeur Vortex	Bain-Marie

Annexe 26 : Figure représentant différent matériels ou méthodes utilisés lors de notre étude

N°	sex	age	Sous-type	niveau de clark	indice de breslow	p53	KI67	C-Kit	B-caténine	BRAF
1	H	35	mélanome nodulaire	4	4 mm	+	35%	-	+	mutée
2	H	78	mélanome nodulaire	4	4 mm	+	30%			mutée
3	H	69	mélanome acral	4	>4 mm	-	50%	-	+	non mutée
4	H	53	mélanome nodulaire	4	4 mm	-	70%	+	+	non mutée
5	H	62	mélanome acral	3	0,5 mm	-	20%	-		mutée
6	H	78	mélanome nodulaire	4	4 mm	+	30%	+	+	non mutée
7	F	46	mélanome nodulaire	4	4 mm	+	30%	-	+	mutée
8	F	77	mélanome de Dubreuilh	4	4mm	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	non mutée
9	H	53	mélanome nodulaire	3	5 mm	+	20%	-	+	non mutée

Annexe 27 : résultats globales des mélanomes cutanés

N°	sexe	âge	type de muqueuse	p53	KI67	C-Kit	B-caténine	BRAF
1	f	63	vaginale	-	35%	+	-	non mutée
2	H	70	Rectale	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	non mutée
3	F	73	Rectale	-	-	-	-	
4	F	53	Fausse nasale	-	6%	-	-	
5	F	76	conjonctivale	-	80%	+	-	
6	H	42	intestinale	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	non mutée
7	F	37	Malpigiene	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	Ininterprétable	
8	F	A	Malpigiene	+	20%	+	+	

Annexe 28 : résultats globales des mélanomes muqueux

N°	sex	age	type de mélanome	p53	KI67	C-Kit	B-caténine	BRAF
1	F	67	Mixte	+	30%	-	+	Non mutée
2	H	58	Mixte	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	Non mutée
3	F	A	Mixte	-	ininterprétables	+	+	Non Mutée
4	F	71	Fusiforme	+	35%	-	-	
5	F	36	Mixte	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	
6	F	45	Fusiforme	+	10%	ininterprétables	ininterprétables	
7	H	55	Mixte	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	
8	F	A	Mixte	-	20%	-	-	
9	F	A	Epithélioïde	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	ininterprétables	
10	F	36	Mixte	+	25%	+	+	Non mutée

Annexe 39 : résultats globales des mélanomes de la choroïde

N°	Sexe	Age	Type de mélanome	P53	Ki67	C-kit	B-caténine	Braf
1	H	49	Métastase ganglionnaire	-	6%	-	+	
2	F	60	Métastase cérébrale	+	10%	-	-	
3	H	41	Métastase ganglionnaire	+	10%	+	+	Non muté
4	H	43	Métastase Osseuse	+	+	+	+	
5	H	64	Métastase ganglionnaire	Ininterprétables	10%	Ininterprétables	+	Non muté
6	H	44	Métastase ganglionnaire	+	15%	+	+	Non muté
7	F	79	Métastase ganglionnaire	+	5%	+	+	Non muté
8	H	52	Métastase parotidienne	-	Ininterprétables	Ininterprétables	Ininterprétables	Non muté
9	F	56	Métastase glandulaire	+	20%	-	+	Non muté
10	H	79	Métastase ganglionnaire	+	16%	+	+	Non muté
11	F	59	Métastase ganglionnaire	Ininterprétables	8%	+	+	Non muté
12	H	A	Métastase hépatique	+	19%	+	+	Non muté
13	F	A	Métastase ganglionnaire	-	20%	+	-	Non muté

Annexe 30 : résultats globales des mélanomes métastatiques