



**Université Sidi Mohammed Ben Abdellah**  
Faculté des Sciences et Techniques-Fès  
Département des sciences de la vie



## PROJET DE FIN D'ETUDES

**L'apport de la biologie moléculaire (PCR et séquençage) dans la détection de la mutation V600E du gène BRAF dans le mélanome**

**Licence Sciences et Techniques (LST)  
Biologie et Santé**

**Présenté par :**

Boussalal Fouzia

**Encadré par :**

Pr. Mohammed IRAQUI HOUSAINI

Pr. Karim OULDIM

**Membres de jury :**

Pr. Mohammed IRAQUI HOUSAINI

Pr. Karim OULDIM

Pr. Sanae GUISSI

**Année Universitaire :2013-2014**

# Résumé

Le cancer de la peau se caractérise comme tout cancer par une croissance anormale des cellules, dans ce cas celles de la peau. Ce cancer se divise principalement en deux types: le cancer de type non-mélanome ou carcinome (carcinome basocellulaire, carcinome épidermoïde) et le type mélanome.

Le mélanome est une tumeur maligne des cellules de la peau qui fabriquent la [mélanine](#), un pigment qui colore la peau et la protège des méfaits des rayons ultraviolets.

Les patients ont des chances de guérison à la seule condition que le mélanome soit découvert et enlevé à un stade très précoce. Le dépistage précoce **est donc essentiel dans toute stratégie de prévention.**

Le travail présent a permis l'étude concrète d'une série de 15 patients souffrant de mélanome grâce aux moyens de biologie moléculaire.

Ces patients se sont présentés à l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès munis de résultats des nombreux examens et analyses médicales qui détectent leur cancer, mais qui ne permettent pas de préciser le diagnostic définitif et de répondre aux interrogations de ces patients et de leur famille.

L'étude est commencée tout d'abord par l'extraction d'ADN, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique, les échantillons sont analysés par la suite par PCR (pour amplification du gène recherché responsable de mélanome), et enfin le séquençage du fragment permet l'identification de la mutation recherchée.

Le résultat d'amplification d'exon 15 du gène BRAF, montre que tous les patients possèdent une bande d'une taille approximative de 145 pb. Les fragments amplifiés des 15 patients ont été séquencés, Pour 14 patients, aucune mutation n'a été détectée, par contre pour le dernier patient, l'alignement montre la présence de mutation V600E qui correspond à une substitution du nucléotide T en A. Cette mutation est caractéristique du mélanome cutané de type SSM. La détection de la mutation permet de donner naissance à un type de traitement appelé la thérapie ciblée.

Ces thérapies ciblées, adaptées à chaque patient selon les caractéristiques génétiques de la tumeur, permettent d'obtenir dans certain cas des survies prolongées.

Le travail effectué a permis de prendre en charge les patients dont le diagnostic a été définitif, et d'éliminer également certaines hypothèses et poser d'autres pour les patients qui nécessitent plus de recherche avant de préciser le diagnostic définitif.

## Objectif de stage

Le stage est une étape indispensable pour l'étudiant, en vue d'apprendre les méthodes de travail, les problèmes du domaine, et surtout de pratiquer ce qui a été acquis durant les études.

Ce stage, d'une durée d'un mois et demi a consisté à mettre en place les techniques de la biologie moléculaire au sein de laboratoire de génétique et d'oncogénétique à CHU de Fès.

Ainsi, ce rapport présente le travail effectué au sein de laboratoire. Mon projet consiste à mettre en œuvre l'apport de la biologie moléculaire (PCR et séquençage) dans la détection de la mutation V600E du gène BRAF dans le mélanome.

Ce stage s'est avéré très intéressant et très enrichissant pour ma propre expérience dans le domaine médical. En effet, ma formation (BS) s'inscrit précisément dans ce cadre, et grâce à ce stage, j'ai eu l'opportunité de mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant ma formation à la FST.

# Dédicaces

Je dédie cet humble travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec lesquelles j'ai tout partagé :

## **A mes très chers parents :**

En témoignage de mon amour, mon affection et ma grande reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation sur le plan culturel et affectif. Je leur présente mon travail si modeste, mais qui sera certes un premier pas pour leur rendre hommage et les remercier pour leurs grands efforts accomplis à mon égard. Sans votre présence dans ma vie, sans votre soutien inestimable, sans votre dévouement incomparable, je n'aurais existé.

## **A mon très cher frère Mohammed :**

Qui m'a fortement soutenu tout au long de mon travail de près et de loin ; qui a contribué avec son encouragement et sa confiance, à embellir chaque étape de décision prise ces deux mois durant, sans relâche. Je lui dédie ce travail en guise de merci qui émane d'un cœur dévoué.

## **A mes chers frères et sœurs :**

**Fatima Zahra, Ghizlane, Saïd, Rajae et Yassine** ; Vous qui êtes à mes cotés, pour partager mes joies et m'épauler en cas de détresse. Que la vie de chacun de vous soit souriante, douce et généreuse. Je vous souhaite une félicité éternelle.

**A mes chers Amis :**

Pour les merveilleux moments qu'on a passé ensemble, notre travail et nos amusements. Vous comptez beaucoup pour moi.

## Remerciements

Au terme de ce travail, il m'est particulièrement agréable d'exprimer ma reconnaissance et mes vifs remerciements à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.

Principalement :

***Pr. IRAQUI HSSAINI MOHAMED***, je suis fière et heureuse d'avoir été l'une de ses étudiantes.

Je le remercie d'avoir accepté d'encadrer ce projet et de me faire part de son expérience. Les résultats de ce travail doivent beaucoup aux exigences de sa rigueur scientifique, à ses orientations, et à son talent pédagogique. C'est pour moi, l'opportunité de lui exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour son esprit ouvert et ses conseils précieux. Je ne s'aurais exprimé ma reconnaissance, certes, car sa bonté est indescriptible.

**Pr. OULDIM KARIM**, responsable de l'Unité de génétiques médicales et d'oncogénétique au Centre hospitalier Hassan II (CHU) de Fès au service de Laboratoire. Je le remercie de m'avoir encouragé et m'avoir accordé toute sa confiance, sa disponibilité, l'aide et les conseils concernant les missions évoquées lors des différents suivis tout au long de ces deux mois. Sachant répondre à toutes mes interrogations ; sans oublier sa participation au cheminement de ce rapport.

**Pr. GUISSI SANAE**, qui a bien voulu juger ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma considération et ma reconnaissance les plus distingués.

## Sommaire

Présentation	de
l'établissement.....	1
Introduction.....	.....3
<b>Partie1 : revue</b>	
<b>bibliographique.....</b>	<b>5</b>
1. Bases clinique et histologique du mélanome.....	6

a) Mélanome.....	6
b) Epidémiologie .....	6
c) Facteurs de risque.....	7
d) Diagnostic clinique.....	8
e) Histogenèse du mélanome.....	8
2. Biologie moléculaire des mélanomes.....	9
a) Généralités.....	9
❖ Cancer.....	10
❖ Mutations.....	11
b) Définition médicale du gène BRAF .....	10
c) L'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic.....	11

## Partie 2 : Matériel et

<b>méthodes.....</b>	<b>14</b>
A. Matériel utilisé.....	15
1. Echantillonnage.....	15
a) Patients.....	15
2. Stratégies de travail.....	15
B. Méthode.....	15
I. Extraction d'ADN.....	15
a) Principe.....	15
b) Protocole expérimental.....	15
II. Dosage des acides nucléiques.....	17
a) Principe.....	17
b) Protocole expérimental.....	17

III.	Amplification de l'ADN extrait par PCR.....	17
a)	Principe.....	17
b)	Les acteurs de la PCR.....	18
c)	La réaction de la PCR.....	18
d)	Protocole expérimental.....	18
IV.	Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose...20	
a)	Principe.....	20
b)	Réactifs nécessaires.....	21
c)	Protocole expérimental.....	21
V.	Séquençage des produits du gène BRAF.....	21
a)	Principe.....	21
1.	Purification de produit PCR.....	22
a)	Principe.....	22
b)	Réactifs nécessaires.....	22
c)	Protocole expérimental.....	22
2.	Réaction de séquence.....	22
a)	Principe.....	22
b)	Réactifs nécessaires.....	23
c)	Protocole expérimental.....	23
3.	Purification du produit de la réaction de séquence.....	24



a) Principe.....	24
b) Réactifs nécessaires.....	24
c) Protocol expérimental.....	24
4. Chargement de l'appareil .....	24
5. Les outils de la bio informatique.....	25
<b>Partie 3 : Résultats et discussions.....</b>	<b>26</b>
A. Paramètres épidémiologiques.....	27
1. Sexe.....	27
2. L'âge .....	27
3. Phototype.....	27
B. Paramètres cliniques.....	28
1. Type anatomo- pathologie.....	28
C. Etude moléculaire.....	29
1. Dosage et qualité d'ADN extrait.....	29
2. Amplification de l'exon 15 du gène BRAF.....	29
3. Résultats de séquençage.....	30
Conclusion et perspectives.....	32
Référence Bibliographique.....	34

## Liste des abréviations

<b>A</b>	Adénine
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>ALM</b>	Mélanome Acrolentigineux
<b>BET</b>	Bromure d’Ethidium
<b>C</b>	Cytosine
<b>dATP</b>	Désoxy Adénine tri-phosphate
<b>dCTP</b>	Désoxy cytosine tri-phosphate
<b>dGTP</b>	Désoxy Guanine tri-phosphate
<b>dNTP</b>	Désoxy Nucléotide tri-phosphate
<b>E</b>	Acide glutamique
<b>F</b>	Forward
<b>G</b>	Guanine
<b>h</b>	Heure
<b>Kb</b>	Kilo base
<b>M</b>	Mole
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium
<b>ml</b>	Millilitre
<b>min</b>	Minute
<b>ng</b>	Nanogramme
<b>nM</b>	Nanomolaire
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>R</b>	Rivers
<b>Sec</b>	Seconde
<b>SSM</b>	Mélanome superficiel extensif
<b>Th</b>	Thymine

<b>T</b>	Témoin
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>UGMO</b>	Unité de génétique médicale et d'oncogénétique
<b>V</b>	Valine
<b>Vol</b>	Volume

## Présentation de l'établissement

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;
- Biochimie et pharmacotoxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

Il se compose de :

- Salle de réception;
- Salle de prélèvements;
- Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
- Laboratoire d'hématologie;
- Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
- Laboratoire de parasitologie;
- Laboratoire de génétique;
- Laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines qui assurent des activités variées:

### Génétique clinique (activité clinique)

- Consultation de génétique (au centre du diagnostic) ;
- Conseil génétique (au centre du diagnostic) ;
- Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic) ;
- Avis du médecin généticien dans les services cliniques ;

- Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques).
- ✚ Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)
  - Cytogénétique classique (caryotype) ;
  - Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence).
- ✚ Génétique moléculaire (analyse des gènes)
  - Amplification de gène par PCR ;
  - Séquençage.

## *Introduction*

Les gens atteints d'un mélanome, une forme grave de [cancer de la peau](#), ont maintenant plus d'espoir pour la survie et le choix d'un traitement plus ciblé. Les médecins continuent à trouver de nouveaux traitements contre le mélanome et les moyens d'aider les gens atteints à mener une vie meilleure. [1]

Il existe trois types de cancer de la peau [2] :

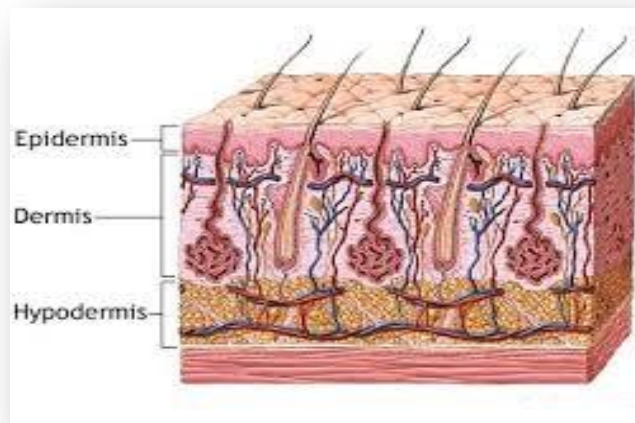
1. Mélanome ;
2. Carcinome basocellulaire ;

### 3. Carcinome à cellules squameuses.

Le cancer de la peau le plus grave est le mélanome. Le mélanome est une forme beaucoup moins fréquente de cancer de la peau que le carcinome basocellulaire ou le carcinome épidermoïde [2], il affecte les cellules de la peau, appelées mélanocytes et qui donne à la peau sa couleur.

La peau est l'organe du corps, qui nous protège de la chaleur, la lumière du soleil, les blessures et les infections. Il stocke également l'eau et la graisse, et produit de la vitamine D. La peau comporte trois couches illustrées dans la figure 1 :

1. la couche extérieure, l'épiderme;
2. la couche médiane : le derme ;
3. la couche interne ou l'hypoderme.



1 : les constituants  
peau

**Figure**  
de la

Les mutations du gène BRAF sont fréquemment observées dans les tumeurs. Dans les mélanomes, environ 40% des tumeurs présentent une mutation de ce gène. Les mutations du codon 600 représentent à elles-seules 90% des mutations observées [3].

La biologie moléculaire a pris une place importante en cancérologie, actuellement, le développement de cette discipline a permis d'aborder les mécanismes moléculaires de la progression tumorale et de mettre en lumière des gènes impliqués dans l'évolution de cette pathologie.

Le génie génétique permet de réaliser le diagnostic, et faciliter également la mise en évidence de nouveaux traitements.

La détection des mutations dans le gène BRAF permet de donner naissance à un type de traitement appelé la thérapie ciblée. Contrairement aux chimiothérapies qui agissent contre la multiplication des cellules, les thérapeutiques dites ciblées sont des médicaments dirigés contre des cibles moléculaires. Ces cibles peuvent être des récepteurs, des gènes ou des protéines qui jouent un rôle dans la transformation des cellules normales en cellules

cancéreuses. Le médicament cible peut être un anticorps contre un gène exprimé à la surface ou dans la cellule cancéreuse, une molécule capable de bloquer la transmission d'un signal de division cellulaire, ou encore un anticorps dirigé contre les nouveaux vaisseaux fabriqués par la tumeur qui permettent de l'alimenter.

Ces thérapies ciblées, adaptées à chaque patient selon les caractéristiques génétiques de la tumeur, permettent d'obtenir dans certain cas des survies prolongées.

Le traitement du mélanome malin métastatique a connu récemment un développement considérable par l'introduction de deux médicaments: le vemurafenib (zelboraf), utile chez les patients porteurs d'une mutation BRAF V600E, et l'ipilimumab (yervoy), un stimulant du système immunitaire.

Dans l'étude BRIM publiée dans le NEJM en février 2012, sur 132 patients BRAF V600E mutés des réponses cliniques ont été observées dans plus de 50% de patients traités avec vemurafenib. La survie moyenne a été prolongée à 16 mois.

Le vemurafenib est un inhibiteur de la forme activée de l'enzyme sérine-thréonine-kinase BRAF. En tant qu'inhibiteur puissant et sélectif de la protéine mutée BRAF V600, le vemurafenib inhibe la voie des MAP kinases.

# Revue bibliographique

## **1. Bases cliniques et histologiques des mélanomes :**

### a) Le mélanome :

Qu'est-ce que le  
mélanome?



**Le mélanome** est une tumeur maligne qui se développe à partir de cellules de la peau appelées mélanocytes, Il représente une minorité des cancers de la peau, mais c'est le plus grave d'entre eux. Lorsqu'il est détecté tôt, au tout début de son développement, il peut être guéri. [4]

Dans 80 % des cas, le mélanome se manifeste par l'apparition d'une tache pigmentée sur la peau saine qui ressemble à un grain de beauté et dans 20 % des cas, par la modification de la couleur et de la forme d'un grain de beauté préexistant.



On distingue quatre principaux types de mélanome de la peau :

- Le mélanome superficiel extensif (SSM) : Il correspond à la prolifération tumorale de cellules à cytoplasme clair et abondant. Le noyau est rond ou ovale et le pigment mélanique prend une disposition en poussière. Les cellules se disposent très rapidement en nid, envahissant l'épiderme. Après cette phase de croissance horizontale, vient la phase de croissance verticale qui se caractérise par l'envahissement du derme. [5]
- Le mélanome nodulaire : Ce type mélanocytaires tumorales qui prolifèrent à la jonction dermoépidermique et envahissent le derme en profondeur, sans phase d'extension horizontale. L'ulcération est fréquente et très rapide. [5]
- Le mélanome de Dubreuilh : Ce type de mélanome se caractérise par une phase intra-épidermique très prolongée, et correspond à une prolifération mélanocytaire intraépidermique atypique. Les cellules sont localisées le long de la membrane basale, et migrant peu vers les couches superficielles de l'épiderme. [5]
- Le mélanome acrolentigineux (ALM) : multiplication des mélanocytes dans l'épiderme, sous forme de cellules isolées le long de la basale, elle évolue en deux phases d'abord horizontale lentigineuse, puis verticale dermique. [5]

Chaque mélanome est unique et se caractérise en fonction de son épaisseur, de la présence ou non d'une ulcération (plaie) et d'un mode d'extension.

## b) Epidémiologie :

L'incidence du mélanome double environ tous les 10 ans dans les pays à population essentiellement blanche. En France, et dans la plupart des pays d'Europe, on estime l'incidence, 5 à 10 nouveaux cas/ 100.000 habitants et par an. [6]

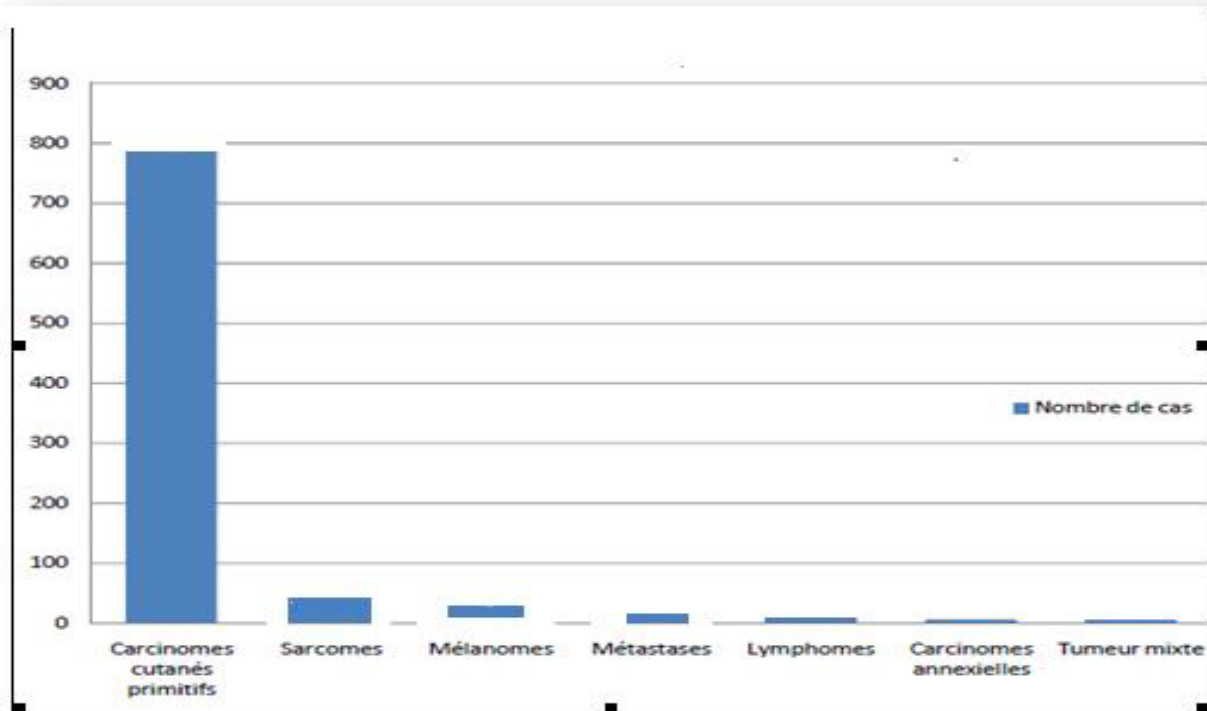
De grandes différences s'observent en fonction de la latitude (soleil) et des caractéristiques ethniques des populations. Cette incidence atteint des sommets (40 nouveaux cas/ 100.000 habitants et par an) chez les blancs en Australie, alors qu'elle est très faible dans les pays où les sujets sont noirs ou jaunes. [6]

Le mélanome cutané représente la 14<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> cause de décès chez la femme et chez l'homme avec, respectivement, 720 et 900 décès estimés pour l'année 2011. [6]

Le Maroc qui partage les mêmes facteurs de risque et habitudes que les autres pays de Maghreb, connaît un taux d'incidence bas : ceci est fort probablement dû au phototype foncé de leurs populations. En fait, les statistiques officielles sont rares. Néanmoins, on rapporte que 287 cas de mélanome ont été répertoriés entre l'année 1973 et 1994 aux centres hospitaliers universitaires (CHU) de Casablanca et de Rabat, donnant un taux d'incidence de 0,048 cas/100.000 habitants/an. Selon une étude publiée en 2007, faite au CHU Ibn Rochd de Casablanca, le mélanome cutané représente 3,5 % des cancers cutanés diagnostiqués sur une période s'étalant entre 1984 et 2007. [7]

A Fès, cette fréquence est estimée à 4,3% de l'ensemble des cancers cutanés selon le registre des cancers cutanés du service d'anatomopathologie du CHU Hassan II.

Le mélanome occupe le troisième rang, après les carcinomes primitifs et les sarcomes. (Figure 2)



**Figure 2 :** Répartition du cancer de la peau selon le type histologique [8]

### c) Facteurs de risque :

Le principal facteur de risque des mélanomes est l'exposition au soleil, et notamment les coups de soleil répétés pendant l'enfance, mais aussi à tous les âges [9]. Cependant, ce risque se combine avec des facteurs de susceptibilité personnelle: les individus à peau claire et/ou avec de nombreux grains de beauté sont les plus à risque. Un système immunitaire affaibli, comme chez les personnes traitées par immunosuppresseurs après une greffe d'organes, ou bien des antécédents familiaux de mélanome chez des proches parents, constituent également des facteurs de risque importants.[10]

### d) Diagnostic Clinique

Le diagnostic du mélanome repose sur l'analyse morphologique d'une lésion cutanée, habituellement pigmentée et sur l'histoire de cette lésion rapportée par le malade. La figure suivante montre les différentes caractéristiques histologiques des tumeurs de mélanome en comparaison avec les naevus bénins.



A

B

C

D

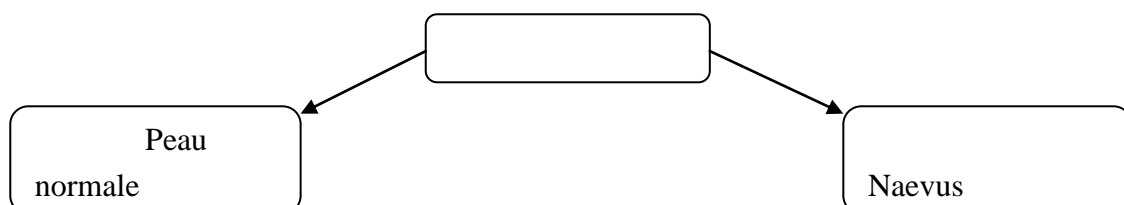
**Figure 3 :**  
Différentes  
caractéristiques des  
tumeurs de

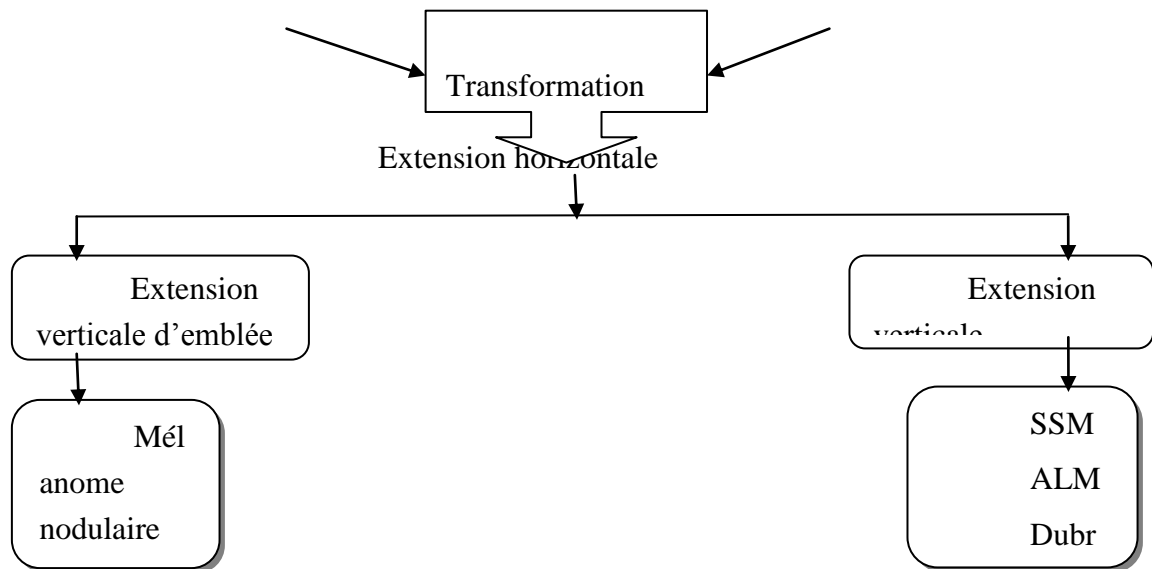
mélanomes en comparaison avec les naevus bénins : La règle ABCD : A :  
Asymétrique, B : Bords irréguliers, C : Coloration non homogène, D : Diamètre important (>  
6 mm).

### e) Histogenèse des mélanomes :

Les mécanismes d'apparition des mélanomes ne sont pas complètement élucidés. Les études épidémiologiques ont montré une corrélation entre une exposition solaire brutale et intense (brûlure solaire) et l'apparition d'un mélanome. Ce dernier peut cependant survenir sur des zones cutanées non exposées au soleil.

Le développement de mélanome commence par une lésion bénigne dans les mélanocytes au niveau de la couche basale. Cette lésion se propage superficiellement suite à une série de division cellulaire incontrôlée. Il donne naissance à des cellules de forme irrégulière avec un noyau volumineux et un cytoplasme peut abondant. La propagation se poursuit radialement puis verticalement (Figure 4), pour arriver finalement au stade le plus dangereux qui est le mélanome métastatique, où les cellules cancéreuses se propagent par la circulation sanguine et lymphatique dans tout le corps vers les poumons, le foie et le cerveau. [11]





**Figure 4 : histogénèse du mélanome**

L'analyse histologique des mélanomes permet de déterminer :

- L'épaisseur ;
- Le caractère ulcéré ou non ;
- Le degré d'invasion de la peau en profondeur.

## **2. Biologie moléculaire des mélanomes :**

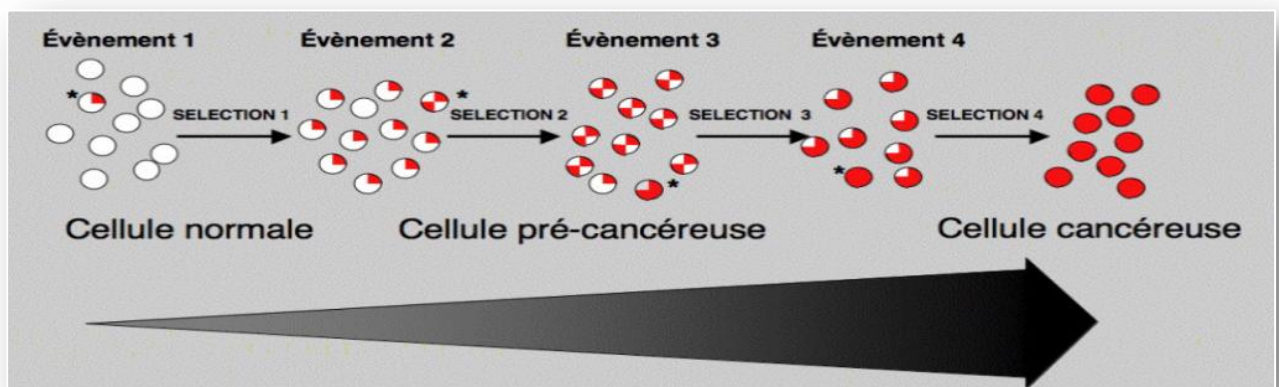
### a) Généralités :

#### ❖ Cancer :

Il s'agit d'une tumeur maligne formée à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme grâce à une accumulation d'événements moléculaires (Ex mutations des gènes). (Figure 5)

La transformation cellulaire tumorale peut se traduire par:

- Perte de contrôle du cycle cellulaire (prolifération tumorale) ;
- Insensibilité à l'apoptose ;
- Anomalies de la réparation de l'ADN ;
- Migration, invasion et métastase.



## Figure 5 : Transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse

### ❖ Mutations :

Une mutation est une variation du matériel génétique (ADN) par rapport à la séquence de référence.

Deux types de mutations:

- Germinales (affectent les gamètes, transmissibles).
- Somatiques (ne touchent pas les cellules destinées à la reproduction, elles ne seront donc jamais héréditaires ; une cause importante de cancers).

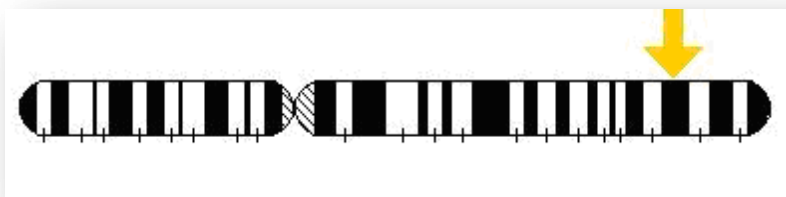
### b) Définition médicale du gène BRAF :

Le gène produit la protéine BRAF, qui est impliquée dans l'envoi de signaux dans les cellules pour leur croissance. Ce gène peut être muté dans de nombreux cancers et conduit à une modification de la protéine BRAF. Cela peut augmenter la croissance et la propagation des cellules cancéreuses [12].

Normalement, la protéine BRAF est activée et désactivée en réponse à des signaux qui contrôlent la croissance cellulaire et le développement. Les mutations somatiques entraînent la formation d'une protéine BRAF active en permanence. La protéine hyperactive peut contribuer à la croissance des cancers en permettant aux cellules anormales de croître et de se diviser de façon incontrôlable.

Le gène BRAF se localise au niveau du bras long q du chromosome 7. Sa taille recouvre approximativement 199.622 bases et code pour la protéine BRAF de 766 acides aminés. (Figure 6)

#### Localisation du gène BRAF



**Figure 6 :**  
**localisation du gène BRAF sur le bras long q du chromosome 7**

Ce gène contient 18 exons séparés entre eux par des introns de tailles différentes. La mutation la plus courante du gène BRAF, remplace la valine par l'acide aminé glutamique à la position 600 (Val600Glu ou V600E). Cette mutation a été fréquemment trouvée dans la forme agressive du cancer de la peau, ainsi que dans des excroissances de la peau non cancéreuses appelées naevus. Elle a également été identifiée dans les cancers du côlon, du rectum, de l'ovaire et de la glande thyroïde. La plupart des mutations retrouvées dans ce gène

sont localisées au niveau de l'exon 15. Le mutant BRAF V600E, forme la plus habituelle, a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale. [13]

### c) l'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostique :

Les techniques de la biologie moléculaire ont permis, en moins de 30 ans d'établir la carte de tous les gènes humains. L'automatisation des techniques, en particulier pour l'amplification de l'ADN et le séquençage, permet une accélération constante du rythme des recherches.

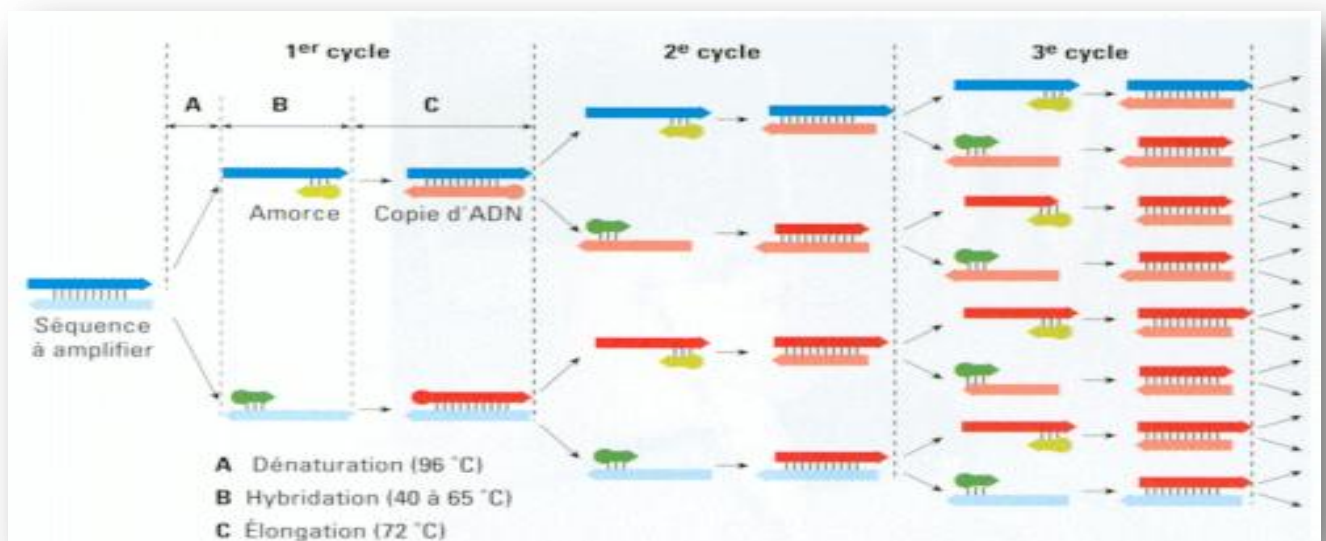
La réaction de polymérisation en chaîne est une technique extrêmement puissante pour l'amplification d'ADN. La PCR a de nombreuses variantes comme la (RT-PCR) et la plus récemment la PCR en temps réel qui permet des mesures quantitatives de molécules d'ADN [14]. Dans le cas du gène BRAF, la PCR suivie par le séquençage sont utilisées pour la recherche d'une ou plusieurs mutations au niveau de ce gène.

La méthode PCR (Polymérase Chain Réaction) est utilisée dans le but d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Les réactions de PCR sont constituées de plusieurs 'cycles PCR' permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin. Ainsi, les produits PCR obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

La PCR se déroule en trois étapes :

- 1. Dénaturation :** Séparations des « matrices doubles brins en simples brins » ;
- 2. Hybridation:** pour cibler l'amplification sur la région ADN souhaitée à l'aide d'amorces spécifiques ;
- 3. Amplification PCR :** étape de polymérisation du brin complémentaire.

A la fin de chaque cycle, l'ADN double brin est synthétisé. (Figure 7)





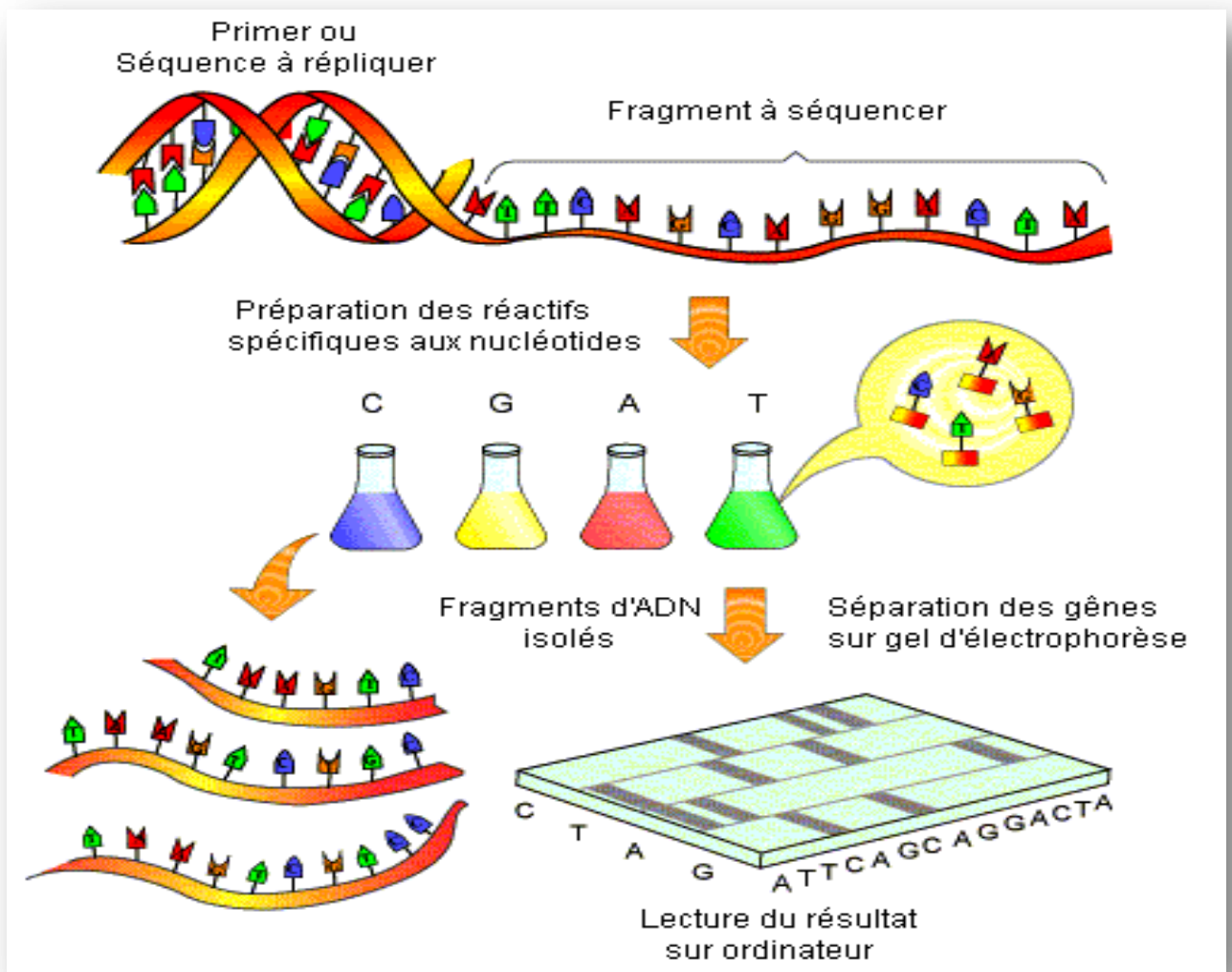
### **Figure 7: les étapes d'amplification d'ADN**

Il faut entre 30 et 40 cycles pour qu'il y ait une réelle amplification de l'ADN. Chaque cycle double la quantité d'ADN synthétisée au cours du cycle précédent. Un seul cycle dure environ 5 min.

Après la PCR, il faut analyser la séquence nucléotidique du gène amplifié pour vérifier la présence ou non de mutation. Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné. Il a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970.

Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de Walter Gilbert aux États-Unis, et l'autre par celle de Frederick Sanger au Royaume-Uni. Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce). L'élongation de l'amorce est réalisée par l'ADN polymérase dans le sens 5' 3'.

Les quatre désoxynucléosides triP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration des quatre ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxy nucléosides une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, inhibent l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés sur un gel d'électrophorèse. (Figure 8)



**Figure 8 :** les étapes de séquençage de l'ADN (méthode de Sanger)



# *Matériels & Méthodes*

## **A. Matériel utilisé :**

### 1) Echantillonnage :

#### a) Patients :

Il s'agit d'une étude rétrospective portée sur une série de 15 patients ayant le mélanome. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncologie et biologie moléculaire de CHU de Fès, afin d'évaluer l'implication du gène BRAF comme facteur prédictif et pronostic dans le diagnostic et le traitement de ces cancers.

- Dans notre cas (gène BRAF), l'extraction est réalisée à partir des tissus tumoraux. Le Kit utilisé : Recover All \*TM Total Nucleic Acid Isolation Kit.

### 2) Stratégie de travail :

Une extraction de l'ADN est d'abord réalisée à partir des tissus tumoraux, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique, par la suite les échantillons sont analysés par

PCR (pour amplification de gène recherché responsable de mélanome, le séquençage du fragment amplifié permet l'identification de la mutation recherchée.

## **B. Méthode :**

### **I. Extraction d'ADN:**

L'extraction de l'ADN (acide désoxyribonucléique) est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en quantité suffisante pour permettre son analyse. Au niveau du laboratoire de Génétique médicale et d'oncogénétique, l'extraction se fait selon deux méthodes : soit par SEL ou par KIT commercialisé.

#### **a) Principe :**

Les tumeurs identifiées incluses en paraffine sont incubées dans le xylène ou toluène à température élevée (afin d'enlever la paraffine des tissus), et ensuite lavées dans des solutions d'alcool pour enlever les traces de xylène. Les échantillons ainsi déparaffinés sont sujets à une étape de digestion des protéines liées à l'ADN et l'ARN par l'action d'une protéase. Enfin les acides nucléiques sont purifiés par capture sur un filtre puis lavage et élution.

#### **b) Protocole expérimental :**

### **1. Préparation des solutions de lavage :**

Deux solutions de lavage sont utilisées (wash 1 et wash 2/3).

- 42 ml d'éthanol 100% sont ajoutés à la bouteille de concentré de lavage Wash 1.
- 48 ml d'éthanol 100% sont également ajoutés à la 2ème solution de lavage Wash 2/3.

### **2. Déparaffinage :**

Dans un tube de 1,5 ml contenant 8 coupes de 10 µm, 1 ml de xylène est ajouté. Le traitement au xylène est nécessaire pour éliminer le complément de paraffine.

Une centrifugation brève est réalisée, et les échantillons sont incubés 3 min à 50°C pour faire fondre la paraffine. Une centrifugation pendant 2 minutes à 14000 rpm permet d'éliminer le xylène. Le culot est lavé avec l'éthanol absolu 2 fois pour enlever l'excès de xylène. Le surnageant est enlevé et le culot est séché dans l'étuve à 45°C pendant 30 min pour éliminer l'éthanol.

### **3. Digestion à la protéase :**

La digestion de la membrane cellulaire se fait par élution de l'échantillon dans un volume précis du tampon de digestion. Le volume utilisé dépend de la taille de l'échantillon. 100 µl du tampon de la digestion avec 4 µl de protéase sont ajoutés au culot séché puis on procède à une incubation de 16 heures à 50°C sous agitation.

### **4. Isolement des acides nucléiques :**

L'isolement de l'ADN, des débris protéiques et cellulaires se fait par le kit (Recover All \*TM Total Nucleic Acid Isolation). Après avoir préparé le mélange (Isolation additif /Ethanol), il sera ajouté à l'échantillon et mélangé. (Tableau 1) :

**Tableau 1 : Volume du mélange Isolation Additif /Ethanol selon le volume du tampon de digestion**

	<b>Volume du tampon de digestion</b>
	100µl
<b>Isolation Additif</b>	120 µl
<b>Ethanol 100%</b>	275
<b>Total</b>	395

Le mélange est passé à travers un filtre cartouche puis lavé avec 700 µl de la solution de lavage Wash 1. Une centrifugation pendant 30 secondes permet d'éliminer les débris restants sur le filtre. Un lavage avec 500 µl de la solution de lavage Wash 2/3 suivi d'une centrifugation 30 secondes à 10000 rpm sont réalisés.

On ajoute 700 µl de la solution Wash 1 au filtre, le tout est incubé pendant 30 secondes à la température ambiante. On centrifuge à 10000 rpm pendant 30 secondes. Les échantillons sont ensuite lavés 2 fois avec 500 µl de Wash 2/3, puis centrifugés pour éliminer le liquide résiduel. Le filtre est transféré dans un nouveau tube de collecte et 60 µl de la solution d'éluion à 95°C sont ajoutés. Une dernière centrifugation pendant 1min à 14000 rpm permet de récupérer l'ADN qui est conservé à -20°C.

## II. Dosage des acides nucléiques :

Après l'extraction de l'ADN à partir d'un tissu tumoral, un test qualité de l'ADN est réalisé.

### a) But :

La concentration de l'ADN extrait est dosée par le nanodrop (Figure 10). Afin d'amplifier le gène recherché par PCR, il est nécessaire que les solutions d'ADN extraits aient la même concentration (10 ng /µl), il faut donc estimer la quantité d'ADN pour diluer à la bonne concentration.



## Figure 9 : Spectrophotomètre nanodrop

### b) Principe :

Pour la quantification de l'ADN, on utilise la longueur d'onde 260 nm qui correspond à la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques dans l'ultraviolet. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport  $R=A(260)/A(280)$  permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Il doit être entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Si le rapport est supérieur à 2, cette valeur indique une probable contamination par des ARN. [15]

## III. Amplification de l'ADN extrait par PCR :

### a) Principe :

La réaction PCR (Polymérase Chain Réaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

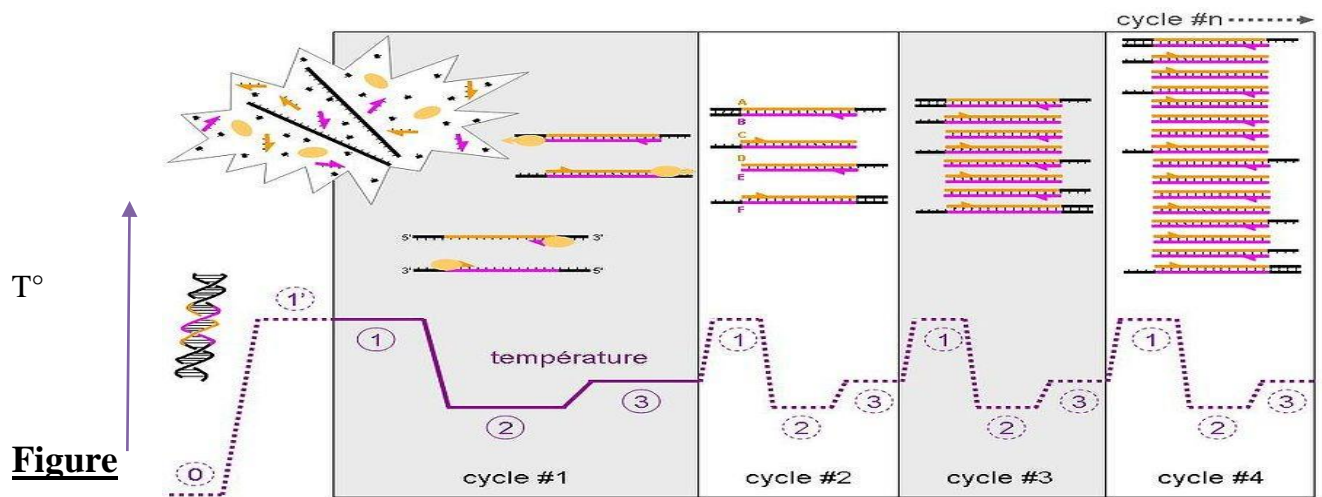
Pour ce faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

### b) Les acteurs de la PCR :

1. L'ADN : généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier.
2. Deux amorces, sens et anti-sens, qui sont des petits brins d'ADN d'environ 20 bases, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.
3. Une enzyme : la taq Polymérase, une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.
4. Les Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, sont les éléments de base utilisés par la taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaire.

### c) La réaction :

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes : 1 : dénaturation, 2 : hybridation, 3 : élongation. (Figure 10)



**Figure 10:**

Schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis à différentes températures. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

d) Protocole expérimental :

La PCR a été effectuée et optimisée sur l'ADN génomique (10 ng/μl), en utilisant des amorces spécifiques pour le gène étudié (exon 15 du gène BRAF).

**Tableau 3:** les amorces utilisées dans la PCR de l'exon 15 du gène BRAF

[16]

Nom	Référence	SEQUENCE 5' - 3'
Amorce sens: BRA1_15F	Eurofins MWG operon	TGC-TTG-CTC-TGA-TAGGAA-AAT-G
Amorce Anti sens: BRA1_15R	Eurofins MWG operon	GTA-ACT-CAG-CAG-CATCTC-AGG-G

Le mélange est préparé selon les indications du tableau 5 :

**Tableau 4:** les réactifs utilisés dans la PCR [16]

Mix PCR initiales	concentrations	Volume pour 1 réaction
Eau stérile		30,6µl
Amorce sens	10µM	2µl
Amorce anti-sens	10µM	2µl
Dntp	10µM	1µl
Mgcl2	25µM	4µl
Tampon PCR	5X	5µl
Taq polyméras	5U/µl	0,4µl
ADN	10ng/µl	5µl

Le mélange préparé est aliquoté à raison de 45µl par tube. En suite, 5µl d'ADN sont ajoutés dans chaque tube pour avoir un volume total de 50µl. les tubes sont placés dans un thermocycleur. (Figure 12)



**Figure 12 : thermocycleur Applied Biosystem**

Le programme de thermocycleur est lancé selon le tableau (5) :

**Tableau 5 : programme de thermocycleur [16]**

Programme PCR			
Etapes	Cycles	Température	Temps
Dénaturation initiale	1	95°C	10

			minutes
Dénaturation	35 à 40	94°C	30 secondes
Hybridation		60°C	1 minute
Elongation		72°C	30 secondes
Elongation finale	1	72°C	10 minutes

L'ADN amplifié est ensuite conservé à 4°C.

#### IV. Visualisation du produit PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

##### a) Principe :

Le contrôle des produits amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est une macromolécule chargée négativement, de ce fait, elle peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration TAE (Tris-Acétate-EDTA).

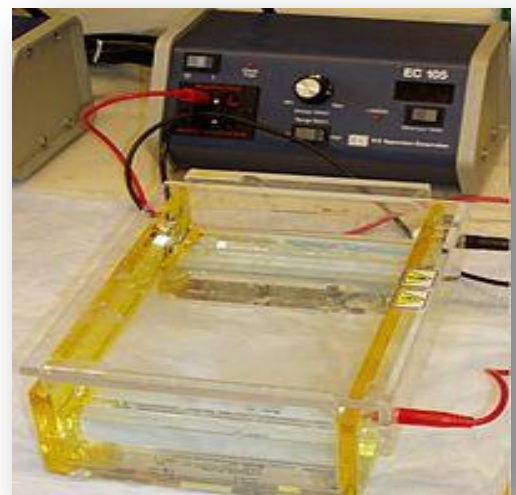
Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration.

Lors de la préparation du gel d'agarose, le BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur du double hélice, est ajouté. Cette molécule est fluorescente sous UV et permet de détecter les fragments d'acides nucléiques.

##### b) Protocol expérimental :

Dans un premier temps, le gel d'agarose 2% est préparé. Pour ceci, dans un récipient, 1g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X est mélangés, on porte à ébullition puis on ajoute 2 µl de BET. On coule le gel dans le moule à électrophorèse, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

Après refroidissement, on installe le moule dans la cuve qui est remplie du tampon de migration (TAE 1X), on dépose dans chaque puits un mélange de 6 µl de produit PCR et de 2 µl de solution de charge qui a pour rôle de stabiliser l'ADN au fond du puits et la migration est lancée à 100 V. (Figure 13)



Finalement, les bandes d'ADN fluorescentes sont visualisées sous UV.

### **Figure13 : Cuve remplie de tampon(TAE)**

## **V. Séquençage des produits PCR du gène BRAF :**

### **a) Principe:**

Le séquençage est un procédé qui permet d'obtenir la séquence nucléotidique exacte d'un fragment d'ADN. Initialement appliquée par Frederick Sanger, cette technique a reconnu depuis, un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, marquage par quatre types de fluorochromes, automatisation du processus..., Avant de procéder au séquençage proprement dit, il est nécessaire de passer par des étapes de préparation du produit à séquençer afin d'obtenir un résultat optimal.

Cette condition nécessite trois étapes :

- 1- Purification par l'exosap ;
- 2- Réaction de séquence par BigDyeR. Terminator ;
- 3- 2ème Purification de produit de PCR.

## **1. Purification de produit PCR :**

### **a) Principe :**

La purification du produit PCR consiste à éliminer les traces des constituants de la réaction de PCR, à savoir, les amorces, les résidus, les dNTP... et ne garder que l'ADN à séquençer pour ne pas gêner les réactions en aval.

### **b) Réactifs nécessaires :**

- Produit PCR ;
- L'ExoSap-IT® qui est constitué principalement de deux enzymes:
  - L'exonucléase S1 qui dégrade tous les brins monocaténares et donc toutes les amorces.
  - La phosphatase alcaline qui va déphosphoryler tous les dNTP qui n'étaient pas incorporés dans la réaction précédente.
  -

### **c) Protocole expérimental :**

Dans un tube eppendorff de 0.2 ml, on met 2 µl de la solution ExoSap en présence de 5 µl du produit PCR. On met le mélange réactionnel dans le ThermoCycleur et on lance le programme spécifique de l'ExoSap :



**Tableau 6: Programme de l'ExoSap [16]**

<b>Stade</b>	<b>Température</b>	<b>Temps</b>	<b>cycle</b>
1	37°	15min	1
2	90°	15min	1
3	10°	∞	1

## **2. Réaction de séquence :**

### **a) Principe :**

Cette technique comme la PCR, est basée sur la copie d'un fragment d'ADN que l'on désire séquencer par une Taq polymérase. Sauf que dans cette réaction on ajoute en plus des 4 dNTP une faible quantité des 4 ddNTP (didésoxyribonucléotides) dont le groupement OH du carbone 3' du désoxyribose est remplacé par un atome d'hydrogène de façon à bloquer la réaction d'élongation chaque fois incorporé. Chaque type de ddNTP est marqué par un fluorochrome différent qui servira à la détection des bases au niveau du séquenceur.

### **b) Réactifs nécessaires :**

- Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator, Kit qui contient principalement:
  - Taq polymérase ;
  - dNTP ;
  - ddNTP marqués ;
  - tampon ;
  - MgCL2.
- Produit PCR purifié
- Amorces spécifiques
- Eau stérile.

### **c) Protocole expérimental :**

On prépare dans des tubes eppendorff de 0.2 ml, le mélange illustré dans le tableau 7, soit 2 tubes pour chaque patient.

## **Tableau 7 : Volumes des réactifs du mélange de la réaction de séquence**

Tubes réaction	BigDye (µl)	Amorce 6mM µM (µl)	Pr.PC purifié (µl)	Eau stérile (µl)	Volume finale (µl)
Tube 1 F (contenant les amorces F)	2	1	4	3	10
Tube 1 (contenant les amorces R)	2	1	4	3	10

Les tubes sont incubés dans le Thermocycleur et le programme suivant est lancé:

**Tableau 9: Programme de Thermocycleur pour la réaction de séquence**

[16]

Stade	Température	Temps	cycles
1	96°C	1 min	1
2	96°C	10 s	25
	50°C	5s	
	60°C	4 min	
3	10°C	∞	1

### **3. Purification du produit de la réaction de séquence :**

#### a) Principe :

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence. Cette purification consiste à éliminer l'excès des réactifs pour ne pas gêner le séquençage.

#### b) Réactifs nécessaires :

- Kit "BigDye® XTerminator™ purification Kit" contenant:
  - SAM™Solution (tampon) ;
  - BigDye®XTerminator™Solution (résines).

#### c) Protocole expérimental :

45µl du produit SAM™Solution et 10 µl du produit BigDye®XTerminator™Solution préalablement vortexés pour suspendre les résines et 10 µl

du produit de la réaction de séquençage sont déposés dans les puits de la plaque. La plaque est mise ensuite sous agitation légère pendant 30 min, puis une centrifugation à 1000 tr/min pendant 2 minutes est réalisée. Le surnageant contenant les fragments à séquencer est transféré dans les puits de la plaque du séquenceur.

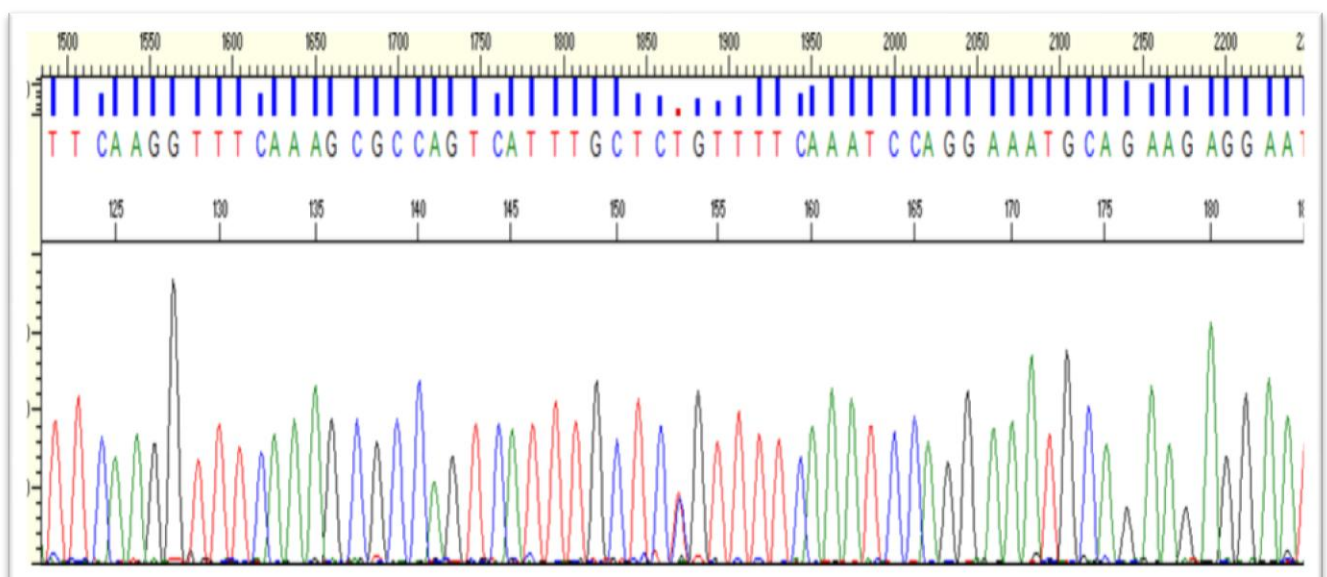
#### **4. Chargement de l'appareil :**

La plaque est placée dans le séquenceur (Figure 14), qui est un automate d'électrophorèse capillaire. Ce dernier lance un flux électrique d'ions à travers un capillaire, ce qui entraîne la migration des fragments d'ADN. Une fois arrivés au site de détection, les quatre fluorochromes des ddNTP terminaux seront excités. Suite à cette excitation, chaque fluorochrome émettra une lumière à une longueur d'onde différente qui sera détectée puis convertie en séquence par le logiciel d'analyse des séquences.



**Figure 14 : Analyseur génétique 3500Dx**

Ci-dessous un exemple d'enregistrement obtenu à partir du séquenceur automatique :



**Figure 15** : Image d'un résultat de séquençage. Pic en bleu : C, pic en rouge : T, pic en vert : A, pic en noir : G

## **5. Les outils de bioinformatique :**

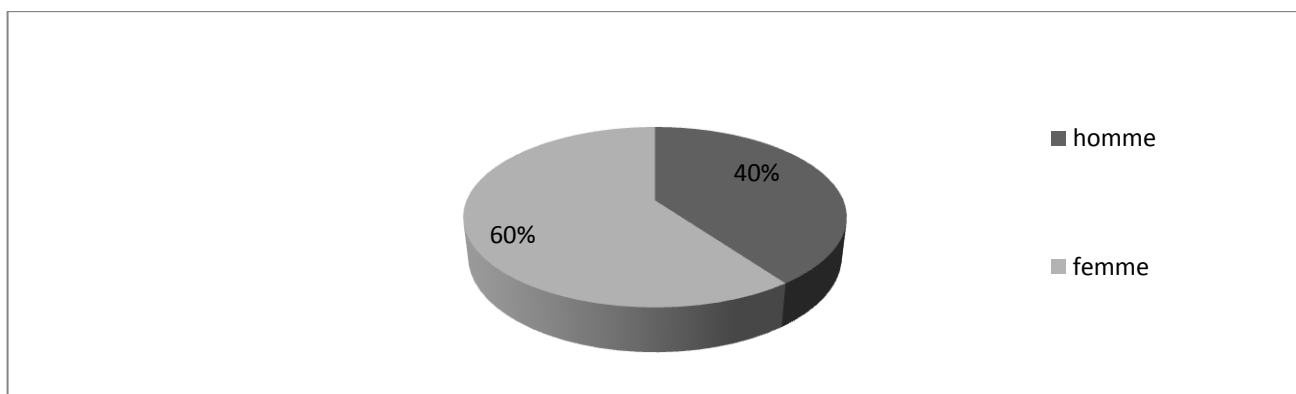
Le logiciel blast permet de comparer une séquence nucléique dite requête à une banque de séquences nucléiques sur les 2 brins, c'est-à-dire la séquence étudiée (brin +) et son complémentaire inversé (brin -).

# Résultats & Discussion

## **A. Paramètres épidémiologiques :**

### **1. Sexe :**

Parmi les 15 cas explorés, il y avait 6 hommes et 9 femmes, le sexe ratio H/F était donc 0.67 H/1F.



No  
mbre des  
patients

### **Figure 16 : Répartition des malades selon le sexe**

Les études réalisées sur le mélanome montrent que ce type de cancer occupe le troisième rang parmi l'ensemble des cancers cutanés. Ce dernier est prédominant chez les femmes que chez les hommes.

En France, en 2000, le nombre estimé de nouveaux cas de mélanomes cutanés était de 7231, avec 58% de femmes et 42% d'hommes. La même situation a été signalée dans le Queensland et l'Australie. [17]

#### **2. L'âge :**

L'âge des patients de notre série varie entre 18 et 85 ans, avec un âge moyen de 54.56 ans. Ce résultat n'est pas compatible avec celui retrouvé dans certain pays comme les Etats unis où l'âge moyen varie de 52 ans à 63 ans selon les races. [18]

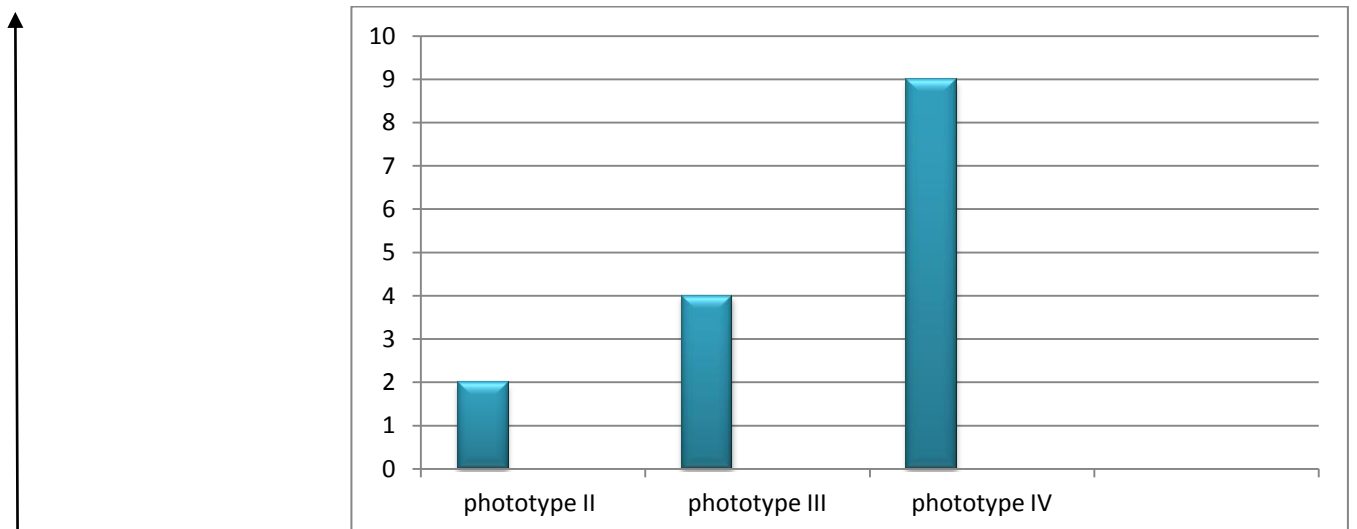
- Une taille faible de l'échantillon.

#### **3. Phototype :**

Le type de la peau ou phototype, caractérise la sensibilité de la peau aux rayonnements UV. Il existe six phototypes correspondant à six types de peaux et couleurs de cheveux.

Plus la peau, les cheveux et les yeux d'une personne sont clairs, plus le risque de mélanome est important.

Dans notre série, il y avait 9 patients (60%) avec un phototype du groupe IV, 4 avec un phototype du groupe III (26,67%), et 2 avec un phototype II (13,33%).



**Figure 17 : Répartition des patients selon le phototype**

Le phototype est lié à la production de mélanine par les mélanocytes. Il existe deux principaux types de mélanine : la mélanine noire et la mélanine rouge. La couleur de la peau varie en fonction de la présence plus ou moins importante de mélanine..  
Seule la mélanine noire (plus importante chez les personnes à phototype élevé) est protectrice vis-à-vis des UV car elle renvoie la lumière. Les personnes à la peau foncée sont donc mieux protégées du soleil que les personnes à la peau claire (phototype faible) chez qui la mélanine rouge est prédominante.

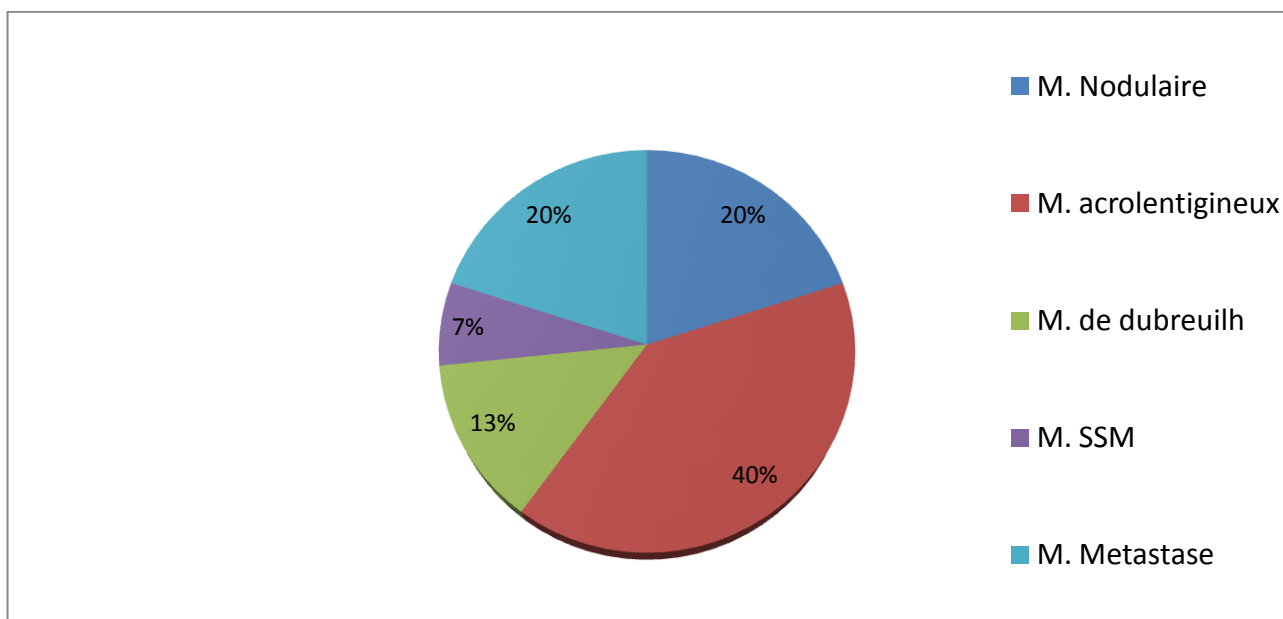
En synthèse, les personnes de phototype I et II ont un risque plus élevé de mélanome. Ce résultat est conforme à la totalité des statistiques réalisées dans le monde et peut être expliqué par la sensibilité élevée des peaux blanches aux rayons ultraviolets.

Néanmoins, les personnes de phototypes V et VI peuvent aussi développer d'autres types de mélanome, non directement liés aux UV : mélanome des muqueuses ou mélanome acro-lentigineux qui siège sur la paume des mains, la plante des pieds ou sous les ongles. [19]

## **B. Paramètres cliniques :**

### **1. Type anatomo-clinique :**

Dans notre série, 3 patients ont présenté un mélanome de type nodulaire, 6 patients ont présenté un mélanome acro-lentigineux, un seul cas de mélanome type SSM et deux cas de mélanome de Dubreuilh et 3 patients ont présenté un mélanome à stade métaphasique.



**Figure 19 : Répartition des patients selon le type histologique**

## **C. Etude moléculaire :**

Il s'agit d'une étude rétrospective, réalisée sur une série de 15 patients et qui consiste à une amplification et séquençage du gène BRAF.

## 1. Dosage et qualité de l'ADN extrait :

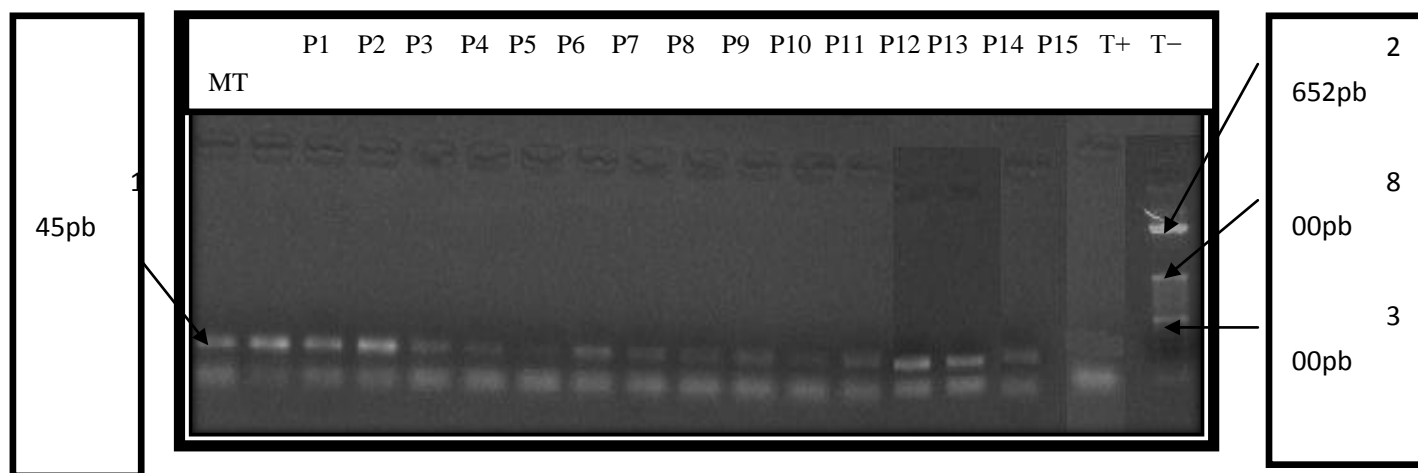
La qualité de l'ADN obtenu après extraction requiert une importance majeure, car elle influence directement sur la qualité des résultats de la PCR et du Séquençage. L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode classique à partir des tissus tumoraux des patients étudiés.

Le rapport de l'absorbance  $DO_{260}/DO_{280}$  est compris pour la majorité des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui permet de conclure que ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines et peuvent être qualifiés de purs.

## 2. Amplification de l'exon 15 du gène BRAF :

Dans le but de rechercher la mutation ponctuelle du gène BRAF dans l'exon 15, l'ADN de 15 patients a été amplifié.

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification des différents patients sont présentés dans la figure 19 :



**Figure 19 : Electrophorèse en gel d'agarose 2% des produits d'amplification par PCR avec les amorces à partir de l'ADN génomique de l'exon 15 chez 15 patients**

M.T : Marqueur de taille 2652 pb

P1...P15 : patients.

T+ : Témoin positif.

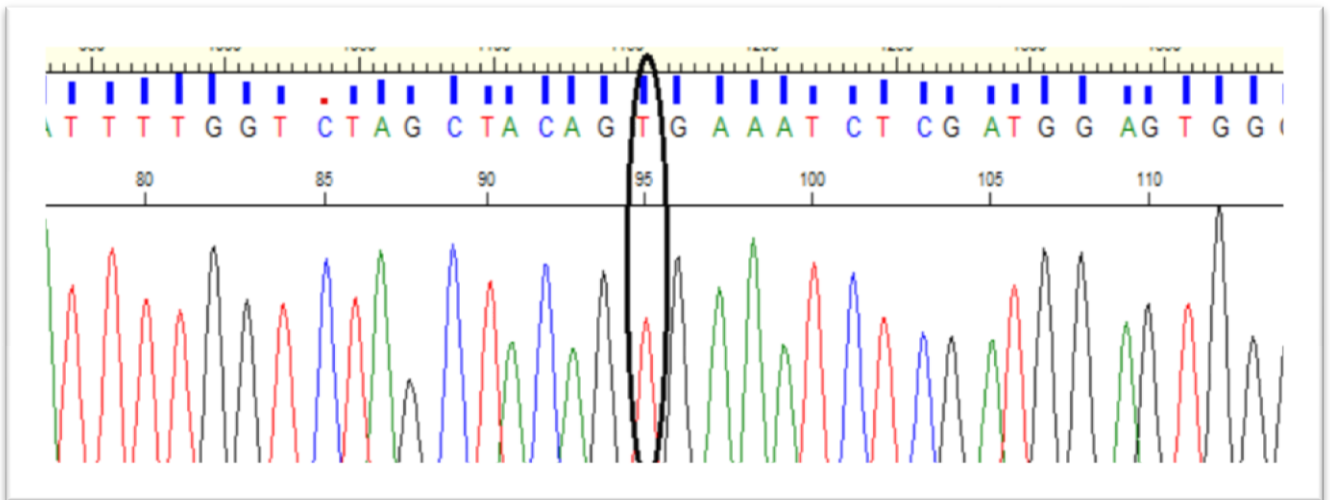
T- : Témoin négatif.

Le résultat d'amplification de l'exon 15 du gène BRAF, montre que tous les patients possèdent une bande d'une taille approximative de 145 pb.

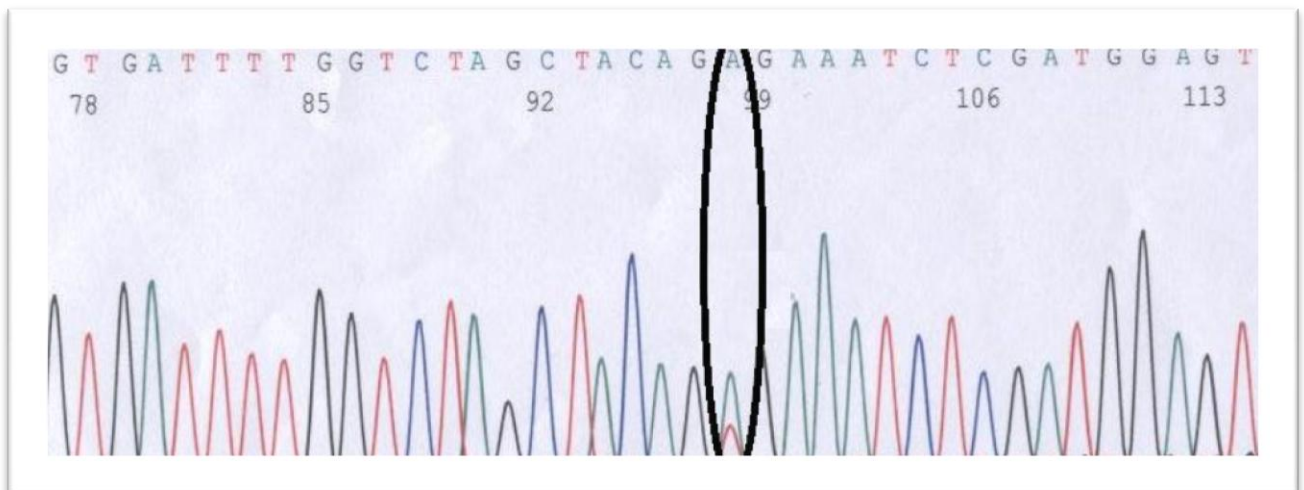


### 3. Résultats de séquençage :

Les fragments amplifiés des 15 patients ont été séquencés, puis les séquences obtenues ont été alignées avec les séquences de la base des données « BLAST ». Pour 14 patients, aucune mutation n'a été détectée, par contre pour le dernier patient, l'alignement montre la présence de mutation V600E qui correspond à une substitution du nucléotide T en A. Cette mutation est caractéristique du mélanome cutané de type SSM.

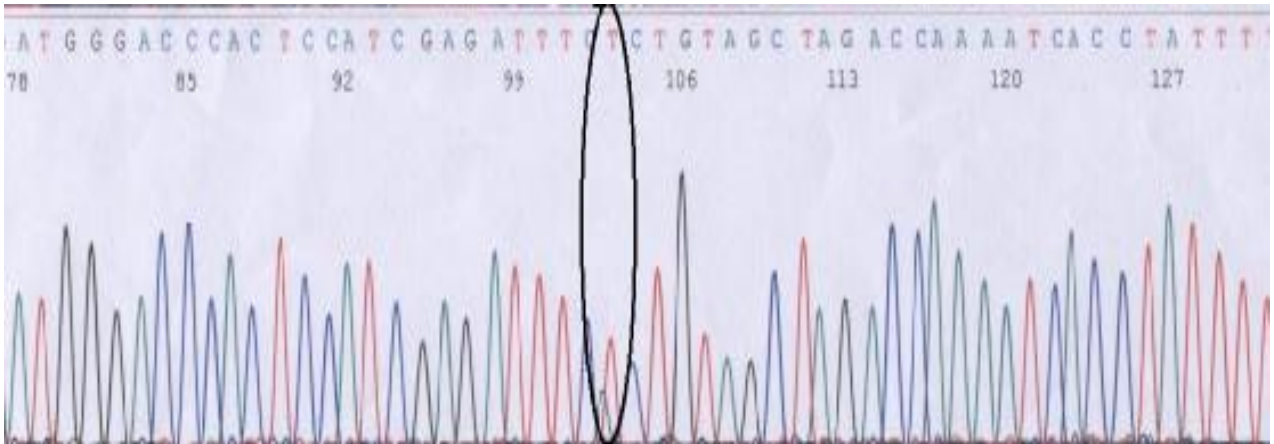


**Figure 20:** profil d'une séquence de l'exon 15 du BRAF d'un échantillon du mélanome qui ne présente pas de mutation T en A.



**Figure 21 :** profil d'une séquence F de l'exon 15 du gène BRAF d'un échantillon du mélanome qui présente une mutation V600E.

mélanome qui présente la mutation T en A.



**Figure 22** : profil d'une séquence R de l'exon 15 du gène BRAF d'un échantillon du mélanome qui présente la mutation T en A.

## *Conclusion et perspectives*

Le mélanome est une tumeur maligne développée aux dépens des mélanocytes. Son incidence est en augmentation constante dans le monde.

L'objectif de notre travail, est d'étudier les aspects moléculaires, thérapeutiques et pronostiques des mélanomes à travers une étude rétrospective, portant sur des prélèvements colligés au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Fès.

L'utilisation de la biologie moléculaire et la génétique est devenue désormais un outil clé dans le diagnostic des différents types de cancers. Elles permettent à la fois la détermination des facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées par la recherche des mutations du gène BRAF, et par conséquent la sélection des patients présentant cette mutation.

Vu l'importance de ce sujet certes très vaste, et qui demande un travail laborieux, toutes les études et techniques permettant la détection d'autres types de mutations comme la duplication de la région contenant le gène BRAF n'ont pas pu être cernées. Pour cela, il sera très important d'appliquer toutes les techniques permettant la révélation de ces altérations pour améliorer le dépistage et cibler le traitement le plus efficace.

L'âge moyen de nos patients est de 54.56 ans avec une prédominance féminine. Sur le plan moléculaire, on a trouvé une seule mutation du gène BRAF correspondant à un cas de mélanome de type SSM.

Les perspectives de ce travail :

L'élargissement de la taille de l'échantillon, ce qui permettra d'évaluer la fréquence de la mutation observée dans la population marocaine.

La mise en évidence des mutations appartenant à d'autres exons du même gène, ce qui permettra d'étudier l'effet de ces mutations sur l'apparition du phénotype cancéreux.

La mise en évidence des mutations appartenant à d'autres gènes.

## Références

## bibliographiques

- [1] : Masson., 2009. Collège français des enseignants de dermatologie.  
<http://www.fascicules.fr/polycopie-accueil-0.html>.
- [2] : <http://www.abinelec.com/cancer> de la peau.htm.
- [3] : Helen Davies., Graham R. Bignell., Charles Cos., Philip Stephens., Sarah Edkins., Sheila Clegg., Jon Teague., Hayley Woffendin., Mathew J.

Garnett., et al. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. NATURE., 417,949-954.

[4] : Zettersten E., Shaikh L., Ramirez R ., et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. Surg Clin N Am 2003; 83: 61-75.

[5] : F.Grange ., 2005. Epidémiologie du mélanome cutané : données descriptives en France et en Europe, Annales de Dermatologie et de Vénérologie ; 132,975-982.

[6] : Schneider S., Krämer H. Who uses sunbeds? A systematic literature review of risk groups in developed countries. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2010;24(6):639-48.

[7] : Balch CM., Soong SJ., Atkins MB., Buzaid AC., Cascinelli N., Coit DG et al. An evidence based staging system for cutaneous melanoma 2004 . CA Cancer J Clin ; 54:131-149.

[8] : Registre des cancers cutanés du service d'anatomopathologie du CHU Hassan II.

[9] : Khat M., Vail A., Parkin M., Green A., 1992. Mortality from melanoma in migrants to Australia : variation by age at arrival and duration of stay. Am J Epidemiol, 135, 1103-1113.

[10] : Miller A., Mihem M., 2006. Gene CDKN2A et CDK4 in Melanoma. N Engl J Med., 355,51-65.

[11] : Flaherty KT., Puzanov I., Kim KB., 2010. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. N Engl J Med., 363,809-819.

[12] : Helen Davies., Graham R. Bignell., Charles Cox., Philip Stephens., Sarah Edkins., Sheila Clegg., Jon Teague., Hayley Woffendin., Mathew J.Garnett., et al. 27JUNE2002. Mutations of BRAF gene in human cancer.NATURE., 417,949-954.

[13] : Namba H., Nakashima M., Hayashi T., Hayashida N., Maeda S., Rogounovitch TI., Ohtsuru A., Saenko VA., Kanematsu T., Yamashita S., (September 2004). "Clinical implication of hot spot BRAF mutation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism., 89, 94264-4266.

[14] : Bauer J., Bastian B.C. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool *Dermatol Ther* 2006 ; 19 : 40-49 [cross-ref].

[15] : Romli. Le mélanome: etude à propos de dix cas et revue de la littérature

[Thèse]. Rabat : Université Mohammed V, 2005. A Case Series and Review of the Literature. *Dermatol Surg* 2007;33:1-10.

[16] : Protocol du laboratoire de l'oncogénétique du CHU de Fès.

[17] : F. Grange., 2005. Epidémiologie de mélanome cutané : données descriptives en France et en Europe, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* ; 139,975-982.

[18] : Wu XC., Eide MJ., Saraiya M., Huange Y ., Wiggens C., Barnohtz-Sloan JS., Martin N., Cokkides V., Miller J., Patel P., Ekwueme DU., Kim., 2009. Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in the United States, 1999-2006, *J Am Acad Dermatol* ; 65,26-37.

[19] : U. Leiter and C. Garbe., 2008. Epidemiology of Melanoma and Non Melanome

*Skin Cancer. The Role of Sunlight, Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 624,89-103.