

UNIVERSITÉ TOULOUSE III – PAUL SABATIER
FACULTÉS DE MÉDECINE

ANNÉE 2018

2018 TOU3 1552

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

Sébastien MARCHASSON

le 25 juin 2018

**ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE D'UNE SERIE
DE 28 AMELOBLASTOMES.**

Directeur de thèse : Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET

JURY

| | |
|---|----------------|
| Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE | Présidente |
| Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET | Assesseur |
| Madame le Professeur Monique COURTADE-SAIDI | Assesseur |
| Monsieur le Professeur Frédéric LAUWERS | Assesseur |
| Madame le Docteur Béatrice HERBAULT-BARRES | Suppléante |
| Madame le Docteur Ségolène GEORG | Membre invitée |

TABLEAU du PERSONNEL HU

des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier au 1^{er} septembre 2017

Professeurs Honoraires

| | | | |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Doyen Honoraire | M. ROUGE Daniel | Professeur Honoraire | M. VIRENQUE Christian |
| Doyen Honoraire | M. LAZORTES Yves | Professeur Honoraire | M. CARLES Pierre |
| Doyen Honoraire | M. CHAP Hugues | Professeur Honoraire | M. BONAFÉ Jean-Louis |
| Doyen Honoraire | M. GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard | Professeur Honoraire | M. VAYSSE Philippe |
| Doyen Honoraire | M. PUEL Pierre | Professeur Honoraire | M. ESQUERRE J.P. |
| Professeur Honoraire | M. ESCHAPASSE Henri | Professeur Honoraire | M. GUITARD Jacques |
| Professeur Honoraire | M. GEDEON André | Professeur Honoraire | M. LAZORTES Franck |
| Professeur Honoraire | M. PASQUIE M. | Professeur Honoraire | M. ROQUE-LATRILLE Christian |
| Professeur Honoraire | M. RIBAUT Louis | Professeur Honoraire | M. CERENE Alain |
| Professeur Honoraire | M. ARLET Jacques | Professeur Honoraire | M. FOURNIAL Gérard |
| Professeur Honoraire | M. RIBET André | Professeur Honoraire | M. HOFF Jean |
| Professeur Honoraire | M. MONROZIES M. | Professeur Honoraire | M. REME Jean-Michel |
| Professeur Honoraire | M. DALOUS Antoine | Professeur Honoraire | M. FAUVEL Jean-Marie |
| Professeur Honoraire | M. DUPRE M. | Professeur Honoraire | M. FREXINOS Jacques |
| Professeur Honoraire | M. FABRE Jean | Professeur Honoraire | M. CARRIERE Jean-Paul |
| Professeur Honoraire | M. DUCOS Jean | Professeur Honoraire | M. MANSAT Michel |
| Professeur Honoraire | M. LACOMME Yves | Professeur Honoraire | M. BARRET André |
| Professeur Honoraire | M. COTONAT Jean | Professeur Honoraire | M. ROLLAND |
| Professeur Honoraire | M. DAVID Jean-Frédéric | Professeur Honoraire | M. THOUVENOT Jean-Paul |
| Professeur Honoraire | Mme DIDIER Jacqueline | Professeur Honoraire | M. CAHUZAC Jean-Philippe |
| Professeur Honoraire | Mme LARENG Marie-Blanche | Professeur Honoraire | M. DELSOL Georges |
| Professeur Honoraire | M. BERNADET | Professeur Honoraire | M. ABBAL Michel |
| Professeur Honoraire | M. REGNIER Claude | Professeur Honoraire | M. DURAND Dominique |
| Professeur Honoraire | M. COMBELLES | Professeur Honoraire | M. DALY-SCHVEITZER Nicolas |
| Professeur Honoraire | M. REGIS Henri | Professeur Honoraire | M. RAILHAC |
| Professeur Honoraire | M. ARBUS Louis | Professeur Honoraire | M. POURRAT Jacques |
| Professeur Honoraire | M. PUJOL Michel | Professeur Honoraire | M. QUERLEU Denis |
| Professeur Honoraire | M. ROCHICCIOLI Pierre | Professeur Honoraire | M. ARNE Jean-Louis |
| Professeur Honoraire | M. RUMEAU Jean-Louis | Professeur Honoraire | M. ESCOURROU Jean |
| Professeur Honoraire | M. BESOMBES Jean-Paul | Professeur Honoraire | M. FOURTANIER Gilles |
| Professeur Honoraire | M. SUC Jean-Michel | Professeur Honoraire | M. LAGARRIGUE Jacques |
| Professeur Honoraire | M. VALDIGUIE Pierre | Professeur Honoraire | M. PESSEY Jean-Jacques |
| Professeur Honoraire | M. BOUNHOURE Jean-Paul | Professeur Honoraire | M. CHAVOIN Jean-Pierre |
| Professeur Honoraire | M. CARTON Michel | Professeur Honoraire | M. GERAUD Gilles |
| Professeur Honoraire | Mme PUEL Jacqueline | Professeur Honoraire | M. PLANTE Pierre |
| Professeur Honoraire | M. GOUZI Jean-Louis | Professeur Honoraire | M. MAGNAVAL Jean-François |
| Professeur Honoraire associé | M. DUTAU Guy | Professeur Honoraire | M. MONROZIES Xavier |
| Professeur Honoraire | M. PASCAL J.P. | Professeur Honoraire | M. MOSCOVICI Jacques |
| Professeur Honoraire | M. SALVADOR Michel | Professeur Honoraire | Mme GENESTAL Michèle |
| Professeur Honoraire | M. BAYARD Francis | Professeur Honoraire | M. CHAMONTIN Bernard |
| Professeur Honoraire | M. LEOPHONTE Paul | Professeur Honoraire | M. SALVAYRE Robert |
| Professeur Honoraire | M. FABIÉ Michel | Professeur Honoraire | M. FRAYSSE Bernard |
| Professeur Honoraire | M. BARTHE Philippe | Professeur Honoraire | M. BUGAT Roland |
| Professeur Honoraire | M. CABARROT Etienne | Professeur Honoraire | M. PRADERE Bernard |
| Professeur Honoraire | M. DUFFAUT Michel | Professeur Honoraire | M. CHAP Hugues |
| Professeur Honoraire | M. ESCANDE Michel | Professeur Honoraire | M. LAURENT Guy |
| Professeur Honoraire | M. PRIS Jacques | Professeur Honoraire | M. ARLET Philippe |
| Professeur Honoraire | M. CATHALA Bernard | Professeur Honoraire | Mme MARTY Nicole |
| Professeur Honoraire | M. BAZEX Jacques | Professeur Honoraire | M. MASSIP Patrice |
| | | Professeur Honoraire | M. CLANET Michel |

Professeurs Émérites

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Professeur ALBAREDE Jean-Louis | Professeur MAZIERES Bernard |
| Professeur CONTÉ Jean | Professeur ARLET-SUAU Elisabeth |
| Professeur MURAT | Professeur SIMON Jacques |
| Professeur MANELFE Claude | Professeur FRAYSSE Bernard |
| Professeur LOUVET P. | Professeur ARBUS Louis |
| Professeur SARRAMON Jean-Pierre | Professeur CHAMONTIN Bernard |
| Professeur CARATERO Claude | Professeur SALVAYRE Robert |
| Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL Bernard | Professeur MAGNAVAL Jean-François |
| Professeur COSTAGLIOLA Michel | Professeur ROQUES-LATRILLE Christian |
| Professeur ADER Jean-Louis | Professeur MOSCOVICI Jacques |
| Professeur LAZORTES Yves | Professeur LAGARRIGUE Jacques |
| Professeur LARENG Louis | Professeur CHAP Hugues |
| Professeur JOFFRE Francis | Professeur LAURENT Guy |
| Professeur BONEU Bernard | Professeur MASSIP Patrice |
| Professeur DABERNAT Henri | |
| Professeur BOCCALON Henri | |

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

| | |
|--------------------------------|--|
| M. ADOUE Daniel (C.E) | Médecine Interne, Gériatrie |
| M. AMAR Jacques | Thérapeutique |
| M. ATTAL Michel (C.E) | Hématologie |
| M. AVET-LOISEAU Hervé | Hématologie, transfusion |
| Mme BEYNE-RAUZY Odile | Médecine Interne |
| M. BIRMES Philippe | Psychiatrie |
| M. BLANCHER Antoine | Immunologie (option Biologique) |
| M. BONNEVIALLE Paul | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie. |
| M. BOSSAVY Jean-Pierre | Chirurgie Vasculaire |
| M. BRASSAT David | Neurologie |
| M. BROUCHET Laurent | Chirurgie thoracique et cardio-vascul |
| M. BROUSSET Pierre (C.E) | Anatomie pathologique |
| M. CARRIE Didier (C.E) | Cardiologie |
| M. CHAUVEAU Dominique | Néphrologie |
| M. CHOLLET François (C.E) | Neurologie |
| M. DAHAN Marcel (C.E) | Chirurgie Thoracique et Cardiaque |
| M. DE BOISSEZON Xavier | Médecine Physique et Réadapt Fonct. |
| M. DEGUINE Olivier | Oto-rhino-laryngologie |
| M. DUCOMMUN Bernard | Cancérologie |
| M. FERRIERES Jean | Epidémiologie, Santé Publique |
| M. FOURCADE Olivier | Anesthésiologie |
| M. GEERAERTS Thomas | Anesthésiologie et réanimation |
| M. IZOPET Jacques (C.E) | Bactériologie-Virologie |
| Mme LAMANT Laurence | Anatomie Pathologique |
| M. LANG Thierry (C.E) | Biostatistiques et Informatique Médicale |
| M. LANGIN Dominique | Nutrition |
| M. LAUQUE Dominique (C.E) | Médecine Interne |
| M. LAUWERS Frédéric | Anatomie |
| M. LIBLAU Roland (C.E) | Immunologie |
| M. MALAUAUD Bernard | Urologie |
| M. MANSAT Pierre | Chirurgie Orthopédique |
| M. MARCHOU Bruno (C.E) | Maladies Infectieuses |
| M. MAZIERES Julien | Pneumologie |
| M. MOLINIER Laurent | Epidémiologie, Santé Publique |
| M. MONTASTRUC Jean-Louis (C.E) | Pharmacologie |
| Mme MOYAL Elisabeth | Cancérologie |
| Mme NOURHASHEMI Fatemeh (C.E) | Gériatrie |
| M. OLIVES Jean-Pierre (C.E) | Pédiatrie |
| M. OSWALD Eric | Bactériologie-Virologie |
| M. PARIENTE Jérémie | Neurologie |
| M. PARINAUD Jean (C.E) | Biol. Du Dévelop. et de la Reprod. |
| M. PAUL Carle | Dermatologie |
| M. PAYOUX Pierre | Biophysique |
| M. PERRET Bertrand (C.E) | Biochimie |
| M. RASCOL Olivier (C.E) | Pharmacologie |
| M. RECHER Christian | Hématologie |
| M. RISCHMANN Pascal | Urologie |
| M. RIVIERE Daniel (C.E) | Physiologie |
| M. SALES DE GAUZY Jérôme | Chirurgie Infantile |
| M. SALLES Jean-Pierre | Pédiatrie |
| M. SANS Nicolas | Radiologie |
| Mme SELVES Janick | Anatomie et cytologie pathologiques |
| M. SERRE Guy (C.E) | Biologie Cellulaire |
| M. TELMON Norbert | Médecine Légale |
| M. VINEL Jean-Pierre (C.E) | Hépatogastro-entérologie |

P.U. Médecine générale

M. OUSTRIC Stéphane Médecine Générale

P.U. - P.H.

2ème classe

| | |
|--------------------------|---|
| Mme BONGARD Vanina | Epidémiologie |
| M. BONNEVIALLE Nicolas | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| M. BUREAU Christophe | Hépatogastro-entéro |
| M. CALVAS Patrick | Génétique |
| M. CARRERE Nicolas | Chirurgie Générale |
| Mme CASPER Charlotte | Pédiatrie |
| M. CHAIX Yves | Pédiatrie |
| Mme CHARPENTIER Sandrine | Thérapeutique, méd. d'urgence, addict |
| M. COGNARD Christophe | Neuroradiologie |
| M. FOURNIE Bernard | Rhumatologie |
| M. FOURNIÉ Pierre | Ophthalmologie |
| M. GAME Xavier | Urologie |
| M. LAROCHE Michel | Rhumatologie |
| M. LEOBON Bertrand | Chirurgie Thoracique et Cardiaque |
| M. LOPEZ Raphael | Anatomie |
| M. MARX Mathieu | Oto-rhino-laryngologie |
| M. MAS Emmanuel | Pédiatrie |
| M. OLIVOT Jean-Marc | Neurologie |
| M. PARANT Olivier | Gynécologie Obstétrique |
| M. PAYRASTRE Bernard | Hématologie |
| M. PERON Jean-Marie | Hépatogastro-entérologie |
| M. PORTIER Guillaume | Chirurgie Digestive |
| M. RONCALLI Jérôme | Cardiologie |
| Mme SAVAGNER Frédérique | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. SOL Jean-Christophe | Neurochirurgie |

P.U. Médecine générale

M. MESTHÉ Pierre Médecine Générale

P.A Médecine générale

POUTRAIN Jean-Christophe Médecine Générale

FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

Doyen : E. SERRANO

P.U. - P.H.

Classe Exceptionnelle et 1ère classe

| | |
|------------------------------------|---|
| M. ACAR Philippe | Pédiatrie |
| M. ALRIC Laurent | Médecine Interne |
| Mme ANDRIEU Sandrine | Epidémiologie |
| M. ARNAL Jean-François | Physiologie |
| Mme BERRY Isabelle (C.E) | Biophysique |
| M. BOUTAULT Franck (C.E) | Chirurgie Maxillo-Faciale et Stomatologie |
| M. BUJAN Louis (C. E) | Urologie-Andrologie |
| Mme BURA-RIVIERE Alessandra | Médecine Vasculaire |
| M. BUSCAIL Louis (C.E) | Hépto-Gastro-Entérologie |
| M. CANTAGREL Alain (C.E) | Rhumatologie |
| M. CARON Philippe (C.E) | Endocrinologie |
| M. CHIRON Philippe (C.E) | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie |
| M. CONSTANTIN Arnaud | Rhumatologie |
| M. COURBON Frédéric | Biophysique |
| Mme COURTADE SAIDI Monique | Histologie Embryologie |
| M. DAMBRIN Camille | Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire |
| M. DELABESSE Eric | Hématologie |
| Mme DELISLE Marie-Bernadette (C.E) | Anatomie Pathologique |
| M. DELORD Jean-Pierre | Cancérologie |
| M. DIDIER Alain (C.E) | Pneumologie |
| Mme DULY-BOUHANICK Béatrice | Thérapeutique |
| M. ELBAZ Meyer | Cardiologie |
| M. GALINIER Michel | Cardiologie |
| M. GALINIER Philippe | Chirurgie Infantile |
| M. GLOCK Yves (C.E) | Chirurgie Cardio-Vasculaire |
| M. GOURDY Pierre | Endocrinologie |
| M. GRAND Alain (C.E) | Epidémiologie, Eco. de la Santé et Prévention |
| M. GROLEAU RAOUX Jean-Louis | Chirurgie plastique |
| Mme GUIMBAUD Rosine | Cancérologie |
| Mme HANAIRE Hélène (C.E) | Endocrinologie |
| M. KAMAR Nassim | Néphrologie |
| M. LARRUE Vincent | Neurologie |
| M. LEVADE Thierry (C.E) | Biochimie |
| M. MALECAZE François (C.E) | Ophtalmologie |
| M. MARQUE Philippe | Médecine Physique et Réadaptation |
| Mme MAZEREEUW Juliette | Dermatologie |
| M. MINVILLE Vincent | Anesthésiologie Réanimation |
| M. RAYNAUD Jean-Philippe (C.E) | Psychiatrie Infantile |
| M. RITZ Patrick | Nutrition |
| M. ROCHE Henri (C.E) | Cancérologie |
| M. ROLLAND Yves (C.E) | Gériatrie |
| M. ROUGE Daniel (C.E) | Médecine Légale |
| M. ROUSSEAU Hervé (C.E) | Radiologie |
| M. ROUX Franck-Emmanuel | Neurochirurgie |
| M. SAILLER Laurent | Médecine Interne |
| M. SCHMITT Laurent (C.E) | Psychiatrie |
| M. SENARD Jean-Michel (C.E) | Pharmacologie |
| M. SERRANO Elie (C.E) | Oto-rhino-laryngologie |
| M. SOULAT Jean-Marc | Médecine du Travail |
| M. SOULIE Michel (C.E) | Urologie |
| M. SUC Bertrand | Chirurgie Digestive |
| Mme TAUBER Marie-Thérèse (C.E) | Pédiatrie |
| Mme URO-COSTE Emmanuelle | Anatomie Pathologique |
| M. VAYSSIERE Christophe | Gynécologie Obstétrique |
| M. VELLAS Bruno (C.E) | Gériatrie |

Professeur Associé de Médecine Générale
Pr STILLMUNKES André

P.U. - P.H.

2ème classe

| | |
|--------------------------------|--|
| M. ACCADBLE Franck | Chirurgie Infantile |
| M. ARBUS Christophe | Psychiatrie |
| M. BERRY Antoine | Parasitologie |
| M. BONNEVILLE Fabrice | Radiologie |
| M. BOUNES Vincent | Médecine d'urgence |
| Mme BOURNET Barbara | Gastro-entérologie |
| M. CHAUFOUR Xavier | Chirurgie Vasculaire |
| M. CHAYNES Patrick | Anatomie |
| Mme DALENC Florence | Cancérologie |
| M. DECRAMER Stéphane | Pédiatrie |
| M. DELOBEL Pierre | Maladies Infectieuses |
| M. FRANCHITTO Nicolas | Addictologie |
| M. GARRIDO-STÓWHAS Ignacio | Chirurgie Plastique |
| Mme GOMEZ-BROUCHET Anne-Muriel | Anatomie Pathologique |
| M. HUYGHE Eric | Urologie |
| Mme LAPRIE Anne | Radiothérapie |
| M. MARCHEIX Bertrand | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| M. MAURY Jean-Philippe | Cardiologie |
| M. MEYER Nicolas | Dermatologie |
| M. MUSCARI Fabrice | Chirurgie Digestive |
| M. OTAL Philippe | Radiologie |
| M. SOLER Vincent | Ophtalmologie |
| Mme SOTO-MARTIN Maria-Eugénia | Gériatrie et biologie du vieillissement |
| M. TACK Ivan | Physiologie |
| M. VERGEZ Sébastien | Oto-rhino-laryngologie |
| M. YSEBAERT Loïc | Hématologie |

P.U. Médecine générale

Mme ROUGE-BUGAT Marie-Eve Médecine Générale

Professeur Associé en O.R.L.
Pr WOISARD Virginie

M.C.U. - P.H.

| | |
|-----------------------------|---|
| M. ABBO Olivier | Chirurgie infantile |
| M. APOIL Pol Andre | Immunologie |
| Mme ARNAUD Catherine | Epidémiologie |
| M. BIETH Eric | Génétique |
| Mme CASPAR BAUGUIL Sylvie | Nutrition |
| Mme CASSAING Sophie | Parasitologie |
| M. CAVAIGNAC Etienne | Chirurgie orthopédique et traumatologie |
| M. CONGY Nicolas | Immunologie |
| Mme COURBON Christine | Pharmacologie |
| Mme DAMASE Christine | Pharmacologie |
| Mme de GLISEZENSKY Isabelle | Physiologie |
| Mme DE MAS Véronique | Hématologie |
| Mme DELMAS Catherine | Bactériologie Virologie Hygiène |
| M. DUBOIS Damien | Bactériologie Virologie Hygiène |
| M. DUPUI Philippe | Physiologie |
| M. FAGUER Stanislas | Néphrologie |
| Mme FILLAUX Judith | Parasitologie |
| M. GANTET Pierre | Biophysique |
| Mme GENNERO Isabelle | Biochimie |
| Mme GENOUX Annelise | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. HAMDI Safouane | Biochimie |
| Mme HITZEL Anne | Biophysique |
| M. IRIART Xavier | Parasitologie et mycologie |
| Mme JONCA Nathalie | Biologie cellulaire |
| M. KIRZIN Sylvain | Chirurgie générale |
| Mme LAPEYRE-MESTRE Maryse | Pharmacologie |
| M. LAURENT Camille | Anatomie Pathologique |
| M. LHERMUSIER Thibault | Cardiologie |
| M. LHOMME Sébastien | Bactériologie-virologie |
| Mme MONTASTIER Emilie | Nutrition |
| Mme MOREAU Marion | Physiologie |
| Mme NOGUEIRA M.L. | Biologie Cellulaire |
| M. PILLARD Fabien | Physiologie |
| Mme PUISSANT Bénédicte | Immunologie |
| Mme RAYMOND Stéphanie | Bactériologie Virologie Hygiène |
| Mme SABOURDY Frédérique | Biochimie |
| Mme SAUNE Karine | Bactériologie Virologie |
| M. SILVA SIFONTES Stein | Réanimation |
| M. TAFANI Jean-André | Biophysique |
| M. TREINER Emmanuel | Immunologie |
| Mme TREMOLLIERES Florence | Biologie du développement |
| Mme VAYSSE Charlotte | Cancérologie |
| M. VIDAL Fabien | Gynécologie obstétrique |

M.C.U. Médecine générale

M. BRILLAC Thierry
Mme DUPOUY Julie

M.C.U. - P.H.

| | |
|-----------------------------|--|
| Mme ABRAVANEL Florence | Bactériologie Virologie Hygiène |
| Mme BASSET Céline | Cytologie et histologie |
| Mme CAMARE Caroline | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. CAMBUS Jean-Pierre | Hématologie |
| Mme CANTERO Anne-Valérie | Biochimie |
| Mme CARFAGNA Luana | Pédiatrie |
| Mme CASSOL Emmanuelle | Biophysique |
| Mme CAUSSE Elizabeth | Biochimie |
| M. CHAPUT Benoit | Chirurgie plastique et des brûlés |
| M. CHASSAING Nicolas | Génétique |
| M. CLAVEL Cyril | Biologie Cellulaire |
| Mme COLLIN Laetitia | Cytologie |
| Mme COLOMBAT Magali | Anatomie et cytologie pathologiques |
| M. CORRE Jill | Hématologie |
| M. DE BONNECAZE Guillaume | Anatomie |
| M. DEDOUIT Fabrice | Médecine Légale |
| M. DELPLA Pierre-André | Médecine Légale |
| M. DESPAS Fabien | Pharmacologie |
| M. EDOUARD Thomas | Pédiatrie |
| Mme ESQUIROL Yolande | Médecine du travail |
| Mme EVRARD Solène | Histologie, embryologie et cytologie |
| Mme GALINIER Anne | Nutrition |
| Mme GARDETTE Virginie | Epidémiologie |
| M. GASQ David | Physiologie |
| Mme GRARE Marion | Bactériologie Virologie Hygiène |
| Mme GUILBEAU-FRUGIER Céline | Anatomie Pathologique |
| M. GUILLEMINAULT Laurent | Pneumologie |
| Mme GUYONNET Sophie | Nutrition |
| M. HERIN Fabrice | Médecine et santé au travail |
| Mme INGUENEAU Cécile | Biochimie |
| M. LAIREZ Olivier | Biophysique et médecine nucléaire |
| M. LEANDRI Roger | Biologie du dével. et de la reproduction |
| M. LEPAGE Benoit | Biostatistiques et Informatique médicale |
| Mme MAUPAS Françoise | Biochimie |
| M. MIEUSSET Roger | Biologie du dével. et de la reproduction |
| Mme NASR Nathalie | Neurologie |
| Mme PRADDAUDE Françoise | Physiologie |
| M. RIMAILHO Jacques | Anatomie et Chirurgie Générale |
| M. RONGIERES Michel | Anatomie - Chirurgie orthopédique |
| Mme SOMMET Agnès | Pharmacologie |
| Mme VALLET Marion | Physiologie |
| M. VERGEZ François | Hématologie |
| Mme VEZZOSI Delphine | Endocrinologie |

M.C.U. Médecine générale

M. BISMUTH Michel
Mme ESCOURROU Brigitte

Médecine Générale
Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr ABITTEBOUL Yves
Dr CHICOULAA Bruno
Dr IRI-DELAHAYE Motoko
Dr FREYENS Anne

Dr BOYER Pierre
Dr ANE Serge
Dr BIREBENT Jordan
Dr LATROUS Leila

REMERCIEMENTS

A Madame le Professeur Emmanuelle Uro-Coste

Présidente du jury

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Tu nous fais le très grand honneur de présider ce jury de thèse.

Je te remercie pour ton enseignement ludique et passionné tout au long de mon internat.

J'admire l'étendue de tes connaissances et l'ensemble de tes qualités professionnelles.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Monique Courtade-Saïdi

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Tu nous fais le très grand honneur de juger ce travail.

Je te remercie pour ton enseignement de la cytologie tout au long de mon internat. C'est par notre spécialité qui est extrêmement intéressante. J'admire ta gentillesse et l'étendue de tes connaissances.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Frédéric Lauwers,

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Chef du service de Chirurgie Maxillo-Faciale et Plastique de la face

Vous nous faites l'honneur de siéger à ce jury de thèse.

Je n'ai pas eu le plaisir de travailler à vos côtés, mais je vous remercie d'apporter votre expertise et vos connaissances afin de juger ce travail.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Docteur Béatrice Herbault-Barrès

Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ma thèse. Merci pour votre collaboration et votre expertise dans ce travail. Merci pour la lecture des cas d'améloblastome et vos conseils.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect

A Madame le Docteur Ségolène Georg

Praticien Hospitalier

Chirurgie Orale, service de Chirurgie Maxillo-Faciale et Plastique de la face

Je suis très heureux de te compter parmi les membres du jury et honoré que tu juges ce travail. Je te remercie de m'avoir fait confiance pour porter la suite de ton travail ! J'admire ta dévotion dans le travail! Très heureux que tu te sois intéressée à l'anatomie-pathologie.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le Professeur Anne GOMEZ-BROUCHET

Directrice de thèse

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie et Cytologie Pathologiques

Je te remercie de m'avoir confié ce travail et de m'avoir soutenu tout au long de sa réalisation. J'admire tes compétences diagnostiques et scientifiques, ta capacité à entreprendre et à gérer de multiples projets. J'apprécie ton accessibilité, ta gentillesse, ta capacité de synthèse et ton dynamisme.

Je te suis reconnaissant de m'avoir fait confiance et suis heureux d'avoir pu travailler avec toi à plusieurs reprises.

Reçois l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Chef du service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Je vous remercie de m'avoir fait profiter de votre enseignement et de votre expérience tout au long de mon internat. J'admire votre volonté de toujours faire de l'anatomopathologie une spécialité d'excellence.

Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Serment d'Hippocrate

*Sur ma conscience, en présence de mes maîtres et de mes condisciples,
je jure d'exercer la médecine suivant les lois de la morale,
de l'honneur et de la probité.
Je pratiquerai scrupuleusement tous mes devoirs envers les malades,
mes confrères et la société.*

**ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET
MOLECULAIRE D'UNE SERIE DE 28
AMELOBLASTOMES.**

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| REMERCIEMENTS | 6 |
| SOMMAIRE | 12 |
| ABREVIATIONS | 15 |
| FIGURES ET TABLEAUX..... | 18 |
| 1. INTRODUCTION..... | 21 |
| 1.1 Classification anatomo-pathologique des tumeurs odontogéniques et osseuses maxillo-faciales..... | 22 |
| 1.2 Améloblastome conventionnel | 23 |
| 1.2.1 Epidémiologie | 23 |
| 1.2.2 Embryogénèse | 23 |
| 1.2.3 Clinique..... | 24 |
| 1.2.4 Anatomo-pathologie..... | 25 |
| 1.3 Améloblastome de type unikystique | 29 |
| 1.3.1 Généralités..... | 29 |
| 1.3.2 Anatomo-pathologie..... | 30 |
| 1.4 Améloblastome de type extra-osseux/périphérique..... | 31 |
| 1.5 Améloblastomes malins | 32 |
| 1.5.1 Améloblastome métastatique | 32 |
| 1.5.2 Carcinome améloblastique | 33 |
| 1.5.2.1 Généralités..... | 33 |
| 1.5.2.2 Anatomo-pathologie..... | 34 |
| 1.6 Imagerie des améloblastomes..... | 37 |
| 1.6.1 Radiologie conventionnelle..... | 37 |
| 1.6.2 Imageries complémentaires..... | 38 |
| 1.7 La voie RAS/MAPK | 38 |
| 1.7.1 La voie de signalisation RAS/MAPK- Généralités..... | 38 |
| 1.7.2 Exemple du récepteur de l'EGFR | 39 |
| 1.7.3 Les protéines RAS et RAF | 40 |
| 1.7.4 Les kinases intracellulaires effectrices de la voie MAPK..... | 41 |
| 1.7.5 Activation anormale dans les cancers | 42 |
| 1.7.6 Mutations du gène BRAF et tumorigénèse | 43 |
| 1.7.6.1 Gène et protéine BRAF | 43 |
| 1.7.6.2 Mutations BRAF dans les tumeurs..... | 44 |
| 1.7.6.3 Mutation BRAFV600 et améloblastome..... | 45 |
| 1.7.6.4 Traitements inhibiteurs de BRAF | 45 |
| 1.7.6.5 Effets indésirables des traitements inhibiteurs de BRAF..... | 46 |
| 1.7.6.6 Inhibiteurs de MEK..... | 46 |
| 1.8 La voie EZH2 | 47 |
| 1.8.1 Voie EZH2- Généralités..... | 47 |
| 1.8.2 Gène et protéine EZH2..... | 47 |
| 1.8.3 Rôle d'EZH2 dans la régulation de la transcription..... | 48 |
| 1.8.4 EZH2 et tumorigénèse..... | 50 |
| 1.8.5 Mutations EZH2 et cancers | 51 |

| | |
|---|----|
| 1.8.6 EZH2 en thérapie ciblée | 51 |
| 1.8.6.1 Généralités..... | 51 |
| 1.8.6.2 Inhibiteurs d'EZH2 | 52 |
| 1.9 Diagnostics différentiels des améloblastomes..... | 52 |
| 1.9.1 Tumeur odontogène adénomatoïde | 52 |
| 1.9.2 Tumeur épithéliale odontogénique calcifiée | 53 |
| 1.9.3 Fibrome améloblastique | 53 |
| 1.9.4 Tumeurs kystiques odontogènes | 54 |
| 1.10 Traitement des améloblastomes | 54 |
| 1.10.1 Traitement chirurgical | 55 |
| 1.10.2 Radiothérapie | 55 |
| 1.10.3 Chimiothérapie | 56 |
| 1.10.4 Thérapies ciblées | 56 |
| 1.10.4.1 Inhibiteurs BRAF et améloblastomes | 56 |
| 1.10.4.2 Agents ciblant la voie SHH..... | 56 |
| 1.11 Objectifs de l'étude | 57 |
| 2. MATERIELS ET METHODES | 58 |
| 2.1 Recueil des données cliniques | 58 |
| 2.2 Etude de la mutation BRAF | 59 |
| 2.2.1 Extraction de l'ADN | 59 |
| 2.2.1.1 Digestion-Déparaffinage | 59 |
| 2.2.1.2 Extraction | 59 |
| 2.2.2 Amplification par PCR en temps réel et technologie TaqMan | 60 |
| 2.2.2.1 Principe de la PCR classique..... | 60 |
| 2.2.2.2 La Technologie TaqMan | 61 |
| 2.2.3 Amplification par PCR en temps réel et HRM | 62 |
| 2.2.3.1 Etape de la PCR en temps réel | 62 |
| 2.2.3.2 HRM..... | 64 |
| 2.2.4 Pyroséquençage | 64 |
| 2.2.4.1 Réaction d'immobilisation et préparation du MIX | 64 |
| 2.2.4.2 Pyroséquençage | 65 |
| 2.3 Etude des mutations EZH2..... | 67 |
| 2.3.1 Séquençage des ARN tumoraux..... | 68 |
| 2.3.2 Amplification par PCR en temps réel et HRM | 68 |
| 2.3.3 Séquençage Sanger..... | 69 |
| 2.4 Etude immunohistochimique des améloblastomes..... | 70 |
| 2.5 Analyses statistiques..... | 74 |
| 3. RESULTATS | 75 |
| 3.1 Données épidémiologiques de l'ensemble de la cohorte..... | 75 |
| 3.2 Analyse de la mutation BRAF | 76 |
| 3.2.1 Immunohistochimie BRAF | 76 |
| 3.2.2 Biologie moléculaire de BRAF | 77 |

| | |
|--|----|
| 3.3 Immunohistochimies complémentaires | 81 |
| 3.4 Analyse des mutations EZH2 | 85 |
| 4. DISCUSSION | 87 |
| 5. CONCLUSION | 94 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 95 |

ABBREVIATIONS

A adénine
Ala : Alanine
ADN = DNA Acide Désoxyribonucléique
AdoHcy S-adenosylhomocysteine
AKT Protein kinase B
AMM Autorisation de mise sur le marché
APC Adenomatous polyposis coli
ARAF A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
ARN Acide ribonucléique
BCL2 B-cell lymphoma 2
BRAF B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CCND1 Cyclin D1
CD Cluster of Differentiation
Cdk Cyclin dependent kinases
CDKN2A Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
c-FOS Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
CHU Centre Hospitalier Universitaire
c-JUN Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
CK Cytokératine
c-MYC MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor
COSMIC Catalogue of Somatic Mutations In Cancer
CR régions conservées
CRAF C-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
Ct Cycle threshold
CTNNB1 Catenin beta 1
DAB 3,3'-Diaminobenzidine
dATP désoxy-adénine triphosphate
dCTP désoxy-cytosine triphosphate
ddNTP didésoxyribonucléotides triphosphates
dGTP désoxy-guanine triphosphate
DLX2 Distal-less homeobox 2
DNMT ADN méthyltransférases
dNTP désoxyribonucléotides triphosphates
DNZep 3-Deazaneplanocin
DPI Dossier Patient Informatisé
dTTP désoxy-thymine triphosphate

E acide glutamique
EGFR Epidermal growth factor receptor
ERK Extracellular signal-Regulated Kinase
ESHG European Society of Human Genetic
EZH2 Enhancer of Zeste Homolog 2
FGFR Fibroblast growth factor receptors
FIGO International Federation of Gynecology and Obstetrics
GDP Guanosine DiPhosphate
GFPO Groupe français des patholgoistes osseux
Gli Glioma-associated oncogene family zinc finger 1
Glu acide glutamique
Grb2 Growth factor receptor bound protein 2
GTP Guanosine TriPhosphate
HER1 = EGFR Epidermal growth factor receptor
HRAS HRas proto-oncogene, GTPase, Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRM High Resolution Melting
IRM Imagerie par résonance magnétique
ISL1 ISL LIM homeobox 1
KRAS KRAS proto-oncogene, GTPase, Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L lysine
MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MEK MAPK-ERK-Kinase
MgCl2 Chlorure de Magnésium
MSX2 msh homeobox 2
NCAM Neural cell adhesion molecule
NGS Next Generation Sequencing
NRAS NRAS proto-oncogene, GTPase, Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NK Natural killer
OFD Ostéofibrodysplasie
OGT tumeur odontogène
OMS Organisation mondiale de la santé
p. protéine
PcG Polycomb group
PCR Polymérase Chain Réaction = Réaction de polymérase en chaine
PIK3CA Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PITX2 Paired like homeodomain 2
pRB protéine du Rétinoblastome
PRC Polycomb Repressive Complex
Ptch Patched

PTEN Phosphatase and tensin homolog
q bras long chromosomique
qPCR PCR quantitative
RAF Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RBD RAS binding domain
RNAseq RNA sequencing
RTK Récepteur à activité tyrosine kinase
RUNX1 Runt related transcription factor 1
S sérine
SAM S-adénosyl-L-méthionine
SET Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste and Trithorax
SHH Sonic Hedgehog
SMARCB1 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SMO Smoothened
SOS Son of sevenless homolog
T thymine
Taq Thermus aquaticus
TDM tomodensitométrie
TGFa Transformating Growth Factor a
T hyb Température d'hybridation
Tm Température de fusion
SH2 Src homology-2
SOX2 SRY-box 2
USA United States of America
V valine
Val valine
WHO World Health Organization
Wnt réunion de Wg (anglais : wingless, français « sans aile ») et Int (anglais : integration site, français « site d'intégration »)

FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures :

| | |
|---|----|
| Figure 1. Vue endobuccale d'un améloblastome mandibulaire, Pr Lauwers, Dr Georg..... | 25 |
| Figure 2. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x2,5..... | 26 |
| Figure 3. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x10..... | 26 |
| Figure 4. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x40..... | 27 |
| Figure 5. Améloblastome de sous-type plexiforme. Grossissement x2,5..... | 28 |
| Figure 6. Améloblastome de sous-type plexiforme. Grossissement x10..... | 28 |
| Figure 7. Améloblastome desmoplasique. Grossissement x10..... | 29 |
| Figure 8. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x2,5..... | 30 |
| Figure 9. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x10..... | 31 |
| Figure 10. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x20..... | 31 |
| Figure 11. Améloblastome métastatique. Grossissement x10..... | 33 |
| Figure 12. Carcinome améloblastique. Grossissement x4..... | 34 |
| Figure 13. Carcinome améloblastique. Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique. Grossissement x20..... | 35 |
| Figure 14. Carcinome améloblastique. Engainement nerveux. Grossissement x20..... | 35 |
| Figure 15. Carcinome améloblastique. Mitoses et mitoses anormales. Grossissement x40... .. | 36 |
| Figure 16. Carcinome améloblastique. Nécrose. Grossissement x10..... | 36 |
| Figure 17. Orthopantomogramme..... | 38 |
| Figure 18. Les différents récepteurs aux signaux extracellulaires..... | 39 |
| Figure 19. Mécanisme d'activation de RAS par Grb2/SOS..... | 41 |
| Figure 20. Voie de signalisation RAS/MAPK..... | 42 |
| Figure 21. Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF..... | 44 |
| Figure 22. Répartition des mutations du gène EZH2 selon COSMIC..... | 48 |
| Figure 23. Inhibition épigénétique de la transcription par les PcG..... | 49 |
| Figure 24. Modèle de régulation de la protéine EZH2 durant le cycle cellulaire..... | 50 |
| Figure 25. Tumeur odontogène adénomatoïde, WHO Head and Necks Tumors, 4ème édition..... | 53 |
| Figure 26. Fibrome améloblastique, WHO Head and Necks Tumors, 4ème édition..... | 54 |
| Figure 27. Quantité d'ADN en fonction du cycle PCR, Pr Espinos..... | 60 |
| Figure 28. Sonde TaqMan, Pr Espinos..... | 61 |
| Figure 29. Fonctionnement de la sonde TaqMan, Pr Espinos..... | 62 |
| Figure 30. Principe du pyroséquençage..... | 66 |
| Figure 31. Témoin positif en pyroséquençage, Grand D..... | 66 |

| | |
|---|----|
| Figure 32. Témoin négatif en pyroséquençage, Grand D. | 67 |
| Figure 33. Les composants de la PCR de séquence, Pr Espinos. | 70 |
| Figure 34. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-BRAF. | 77 |
| Figure 35. Courbe d'amplification dans le cadre de l'HRM. | 78 |
| Figure 36. Courbe de fusion HRM. | 79 |
| Figure 37. Nuages de points résultant de la technologie TaqMan. | 80 |
| Figure 38. Cas BRAFV600E muté en pyroséquençage. | 80 |
| Figure 39. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK5/6. | 81 |
| Figure 40. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK14. | 81 |
| Figure 41. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK8/18. | 82 |
| Figure 42. Cas avec marquage intense positif de l'anticorps anti-CD56. | 83 |
| Figure 43. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-cycline D1. | 83 |
| Figure 44. Cas avec marquage nucléaire négatif de l'anticorps β -caténine. | 84 |
| Figure 45. Cas avec marquage membranaire et cytoplasmique positif de l'anticorps anti-E-cadhérine, corrélé au marquage de l'anticorps β -caténine. | 84 |
| Figure 46. Courbe d'amplification dans le cadre de l'HRM. | 85 |
| Figure 47. Courbe de fusion HRM. | 86 |
| Figure 48. Electrophérogramme. | 86 |
| Figure 49. Notion de profondeur et de couverture, Pr E. Uro-Coste, D. Grand. | 92 |

Liste des tableaux :

| | |
|--|----|
| Tableau 1. Caractéristiques des anticorps et méthodes utilisés..... | 72 |
| Tableau 2. Caractéristiques clinico-histopathologiques de l'ensemble des patients..... | 76 |
| Tableau 3. Validité intrinsèque de l'immunohistochimie BRAF..... | 77 |

1. INTRODUCTION

L'améloblastome est une tumeur épithéliale odontogène bénigne, principalement intra-ossuse, de localisation mandibulaire et maxillaire et à croissance lente. L'améloblastome est caractérisé par une agressivité locale et une tendance à la récurrence, si son exérèse n'est pas complète lors de la chirurgie première. La chirurgie est le traitement de référence. Il existe des formes rares d'améloblastomes malins primitifs.

La biologie moléculaire permet la recherche de mutations dans les tumeurs et a pour but de comprendre la physiopathologie de ces dernières. Elle sert aussi d'outil diagnostique, pronostique et thérapeutique.

Récemment, des mutations du gène BRAF ont été décrites dans les améloblastomes, permettant un début de compréhension des mécanismes étiopathogéniques de cette pathologie. Cela pourrait être, une alternative thérapeutique à la chirurgie, lorsque celle-ci n'est pas indiquée. En effet, les inhibiteurs de BRAF sont utilisés en thérapeutique anti-cancéreuse. Notre premier objectif était donc d'évaluer l'incidence des mutations BRAF dans notre cohorte toulousaine d'améloblastomes par une double approche ; immunohistochimique et moléculaire.

Enfin, le séquençage par RNAseq de deux améloblastomes, lors d'une autre étude dans le service, a permis de découvrir deux mutations inconnues du gène EZH2. Ce dernier est un gène permettant la méthylation des histones. Il joue un rôle épigénétique dans la transcription et est impliqué dans le cycle cellulaire. Aucune mutation du gène EZH2 n'est actuellement décrite dans les améloblastomes ou les tumeurs odontogènes. La confirmation de ces mutations pourrait constituer une autre alternative aux traitements des améloblastomes. En effet, les inhibiteurs d'EZH2 sont étudiés en thérapeutique anti-cancéreuse. Le deuxième objectif était donc de vérifier les résultats que nous avons obtenus sur deux cas améloblastomes.

1.1 Classification anatomo-pathologique des tumeurs odontogéniques et osseuses maxillo-faciales

| | | | |
|--|---------|---|--------|
| Odontogenic carcinomas | | Malignant maxillofacial bone and cartilage tumours | |
| Ameloblastic carcinoma | 9270/3 | Chondrosarcoma | 9220/3 |
| Primary intraosseous carcinoma, NOS | 9270/3 | Chondrosarcoma, grade 1 | 9222/1 |
| Sclerosing odontogenic carcinoma | 9270/3 | Chondrosarcoma, grade 2/3 | 9220/3 |
| Clear cell odontogenic carcinoma | 9341/3* | Mesenchymal chondrosarcoma | 9240/3 |
| Ghost cell odontogenic carcinoma | 9302/3* | Osteosarcoma, NOS | 9180/3 |
| | | Low-grade central osteosarcoma | 9187/3 |
| Odontogenic carcinosarcoma | 8980/3 | Chondroblastic osteosarcoma | 9181/3 |
| | | Parosteal osteosarcoma | 9192/3 |
| Odontogenic sarcomas | 9330/3 | Periosteal osteosarcoma | 9193/3 |
| | | | |
| Benign epithelial odontogenic tumours | | Benign maxillofacial bone and cartilage tumours | |
| Ameloblastoma | 9310/0 | Chondroma | 9220/0 |
| Ameloblastoma, unicystic type | 9310/0 | Osteoma | 9180/0 |
| Ameloblastoma, extraosseous/peripheral type | 9310/0 | Melanotic neuroectodermal tumour of infancy | 9363/0 |
| Metastasizing ameloblastoma | 9310/3 | Chondroblastoma | 9230/1 |
| Squamous odontogenic tumour | 9312/0 | Chondromyxoid fibroma | 9241/0 |
| Calcifying epithelial odontogenic tumour | 9340/0 | Osteoid osteoma | 9191/0 |
| Adenomatoid odontogenic tumour | 9300/0 | Osteoblastoma | 9200/0 |
| | | Desmoplastic fibroma | 8823/1 |
| | | | |
| Benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumours | | Fibro-osseous and osteochondromatous lesions | |
| Ameloblastic fibroma | 9330/0 | Ossifying fibroma | 9262/0 |
| Primordial odontogenic tumour | | Familial gigantiform cementoma | |
| Odontoma | 9280/0 | Fibrous dysplasia | |
| Odontoma, compound type | 9281/0 | Cemento-osseous dysplasia | |
| Odontoma, complex type | 9282/0 | Osteochondroma | 9210/0 |
| Dentinogenic ghost cell tumour | 9302/0 | | |
| | | Giant cell lesions and bone cysts | |
| Benign mesenchymal odontogenic tumours | | Central giant cell granuloma | |
| Odontogenic fibroma | 9321/0 | Peripheral giant cell granuloma | |
| Odontogenic myxoma/myxofibroma | 9320/0 | Cherubism | |
| Cementoblastoma | 9273/0 | Aneurysmal bone cyst | 9060/0 |
| Cemento-ossifying fibroma | 9274/0 | Simple bone cyst | |
| | | | |
| Odontogenic cysts of inflammatory origin | | Haematolymphoid tumours | |
| Radicular cyst | | Solitary plasmacytoma of bone | 9731/1 |
| Inflammatory collateral cysts | | | |
| | | | |
| Odontogenic and non-odontogenic developmental cysts | | | |
| Dentigerous cyst | | | |
| Odontogenic keratocyst | | | |
| Lateral periodontal cyst and botryoid odontogenic cyst | | | |
| Gingival cyst | | | |
| Glandular odontogenic cyst | | | |
| Calcifying odontogenic cyst | 9301/0 | | |
| Orthokeratinized odontogenic cyst | | | |
| Nasopalatine duct cyst | | | |

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (776A). Behaviour is coded 10 for benign tumours, 11 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour, 02 for carcinoma-in-situ, and grade of intraepithelial neoplasia, and 03 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.
*These new codes were approved by the IARC/WHO Committee in 2014.

Une 4^{ème} édition de l’OMS a été publiée sur les tumeurs odontogènes en 2017, avec une simplification volontaire de la dénomination des entités par rapport à la précédente édition. Les tumeurs odontogènes (OGT) représentent moins de 1% des tumeurs de la cavité buccale. Il s’agit essentiellement de tumeurs bénignes avec pour certaines une agressivité locale et un risque élevé de récurrence locale. Les tumeurs bénignes et malignes sont subdivisées en tumeurs épithéliales, tumeurs mixtes (épithéliales et mésenchymateuses) et tumeurs mésenchymateuses. Les tumeurs odontogènes dérivent des cellules de l’appareil odontogène et de leurs restes (germes de Malassez).

L'améloblastome fait partie des tumeurs épithéliales bénignes pures avec trois autres entités: la tumeur odontogénique squameuse, la tumeur odontogénique épithéliale calcifiée et la tumeur odontogénique adénomatoïde.

L'améloblastome conventionnel comporte trois sous types: l'améloblastome folliculaire, l'améloblastome plexiforme et l'améloblastome desmoplastique. Trois autres variants d'améloblastome sont rapportés: l'améloblastome de type unikystique, l'améloblastome de type extra-osseux/périphérique et l'améloblastome métastatique.

Enfin, il existe le carcinome améloblastique, à distinguer de l'améloblastome métastatique¹. Tous deux appartiennent au groupe des améloblastomes malins.

1.2 Améloblastome conventionnel

1.2.1 Epidémiologie

Bien que rare, avec une incidence annuelle estimée à environ 0,5 cas par million d'habitants, l'améloblastome est la tumeur odontogénique la plus fréquente en dehors des odontomes^{2 3}. Il représente 1% de toutes les tumeurs orales⁴, et 9 à 11% des tumeurs odontogènes^{5 6}. Le pic d'incidence diagnostique est situé aux 4^{ème} et 5^{ème} décades et il est décrit chez des patients de 8 à 92 ans^{2 7 8}. Le sexe ratio homme/femme est de 1/1⁹. L'améloblastome est la tumeur odontogénique la plus fréquente en Asie et en Afrique, avec un âge moyen de découverte de 39,1 ans¹⁰.

Chez les patients ayant la mutation BRAFV600E, l'âge moyen au diagnostic est de 34 ans, versus 54 ans pour les BRAF wild-type¹¹. L'atteinte mandibulaire est plus fréquente chez les patients mutés BRAF^{12 13}.

La localisation intra-osseuse la plus fréquente est la mandibule (80%), le plus souvent dans la région postérieure, suivie de la région mandibulaire antérieure¹⁴. La deuxième localisation en fréquence est le maxillaire dans sa partie postérieure, suivie de la région maxillaire antérieure^{2 7 8 15 16}. L'améloblastome desmoplastique a la particularité d'avoir une prédilection pour le maxillaire¹⁷.

1.2.2 Embryogénèse

L'améloblastome est issu de la lame dentaire comme le montre l'expression de marqueurs précoces de l'épithélium dentaire comme PITX2, MSX2, DLX2, RUNX1 et ISL1^{18 19}.

La dent est un organe composé de tissus d'origine épithéliale et conjonctive.

A la 6ème semaine du développement, l'ectoderme qui recouvre la cavité buccale s'épaissit et s'invagine dans le mésenchyme sous-jacent. Le versant externe de cet épaississement recouvre en dehors le sillon gingivo-labial et la face externe de la lèvre. Le versant interne constitue la lame dentaire, qui présente rapidement des zones de condensation et de prolifération cellulaire, qui s'enfoncent dans le mésenchyme. Elles sont à l'origine des bourgeons de la première dentition. Chaque bourgeon dentaire comporte l'organe de l'émail (expansion globuleuse en cloche), la pulpe dentaire et le follicule dentaire, futur ligament alvéolodentaire. Dans l'organe de l'émail, les cellules de la concavité, contiennent les améloblastes qui vont produire l'émail. Dans le mésenchyme de la concavité, en regard des améloblastes, les odontoblastes vont produire la dentine.

1.2.3 Clinique

La démarche diagnostique est identique à toutes les lésions maxillo-mandibulaires. L'anamnèse médicale est souvent pauvre et n'inclut aucune comorbidité. Le plus souvent, l'améloblastome est de découverte fortuite lors d'un examen d'imagerie ou devant l'apparition de manifestations cliniques non spécifiques. En effet, les signes cliniques sont tardifs et d'apparition lente. Parfois, lors de l'augmentation de taille, des complications apparaissent, à type de perte et malocclusion dentaire, paresthésies et hypoesthésies dans le territoire du nerf maxillaire V.2 ou mandibulaire V.3, douleurs, invasion des tissus mous avec déformations ou asymétrie faciale, trismus, difficultés de mastication et obstruction des voies aériennes¹.

L'examen clinique s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, est effectué un examen exobuccal puis dans un second temps, un examen endobuccal (figure 1) ²⁰.



Figure 1. Vue endobuccale d'un améloblastome mandibulaire, Pr Lauwers, Dr Georg.

1.2.4 Anato-pathologie

Macroscopiquement, l'améloblastome peut se présenter sous forme solide et/ou kystique.

Microscopiquement, il en existe trois sous-types. Le sous type le plus fréquent est l'améloblastome folliculaire. Celui-ci ressemble à l'épithélium de l'émail, et se compose de massifs épithéliaux qui siègent dans un stroma fibreux. Les cellules en périphérie des massifs sont prismatiques/cylindriques ou cubiques, avec des noyaux hyperchromatiques et palissadiques à polarité inversée²¹. Au centre des massifs, l'organisation cellulaire est plus lâche, rappelant le réticulum étoilé de l'émail. Il existe parfois des aspects microkystiques (figures 2, 3 et 4).

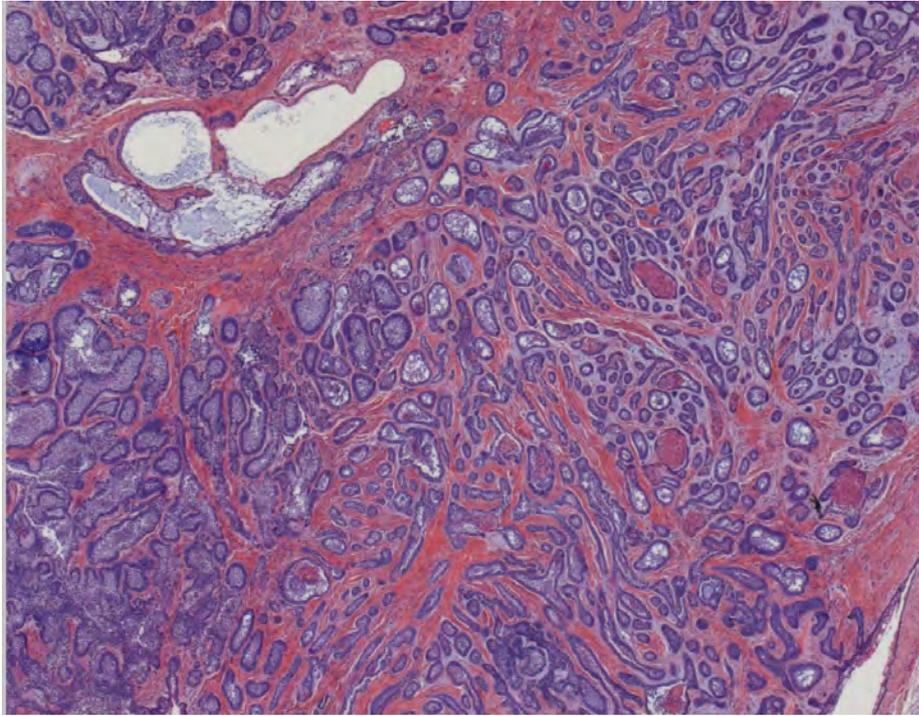


Figure 2. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x2,5.

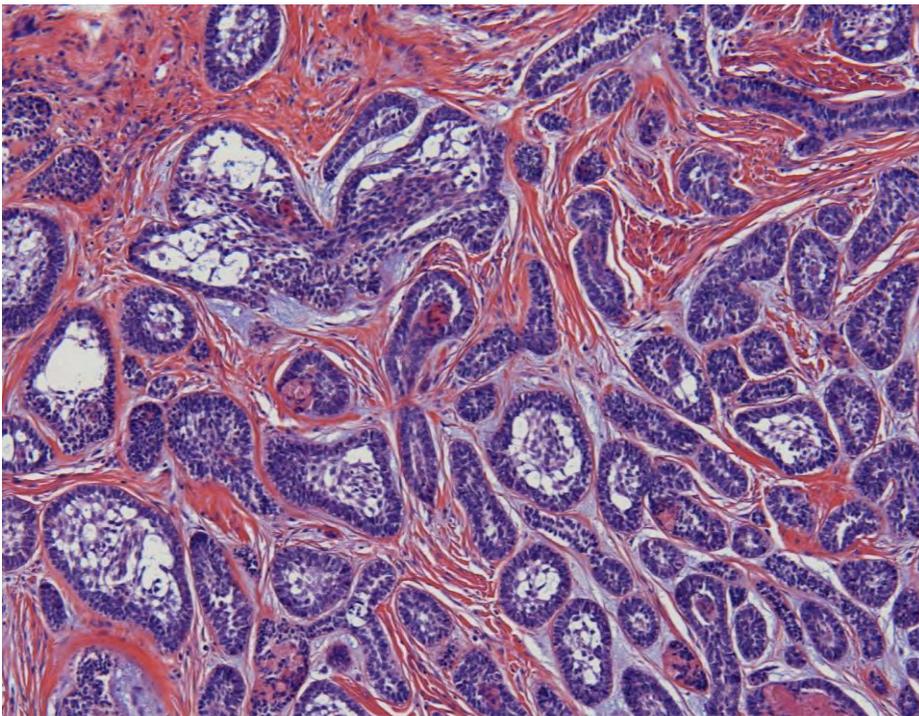


Figure 3. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x10.

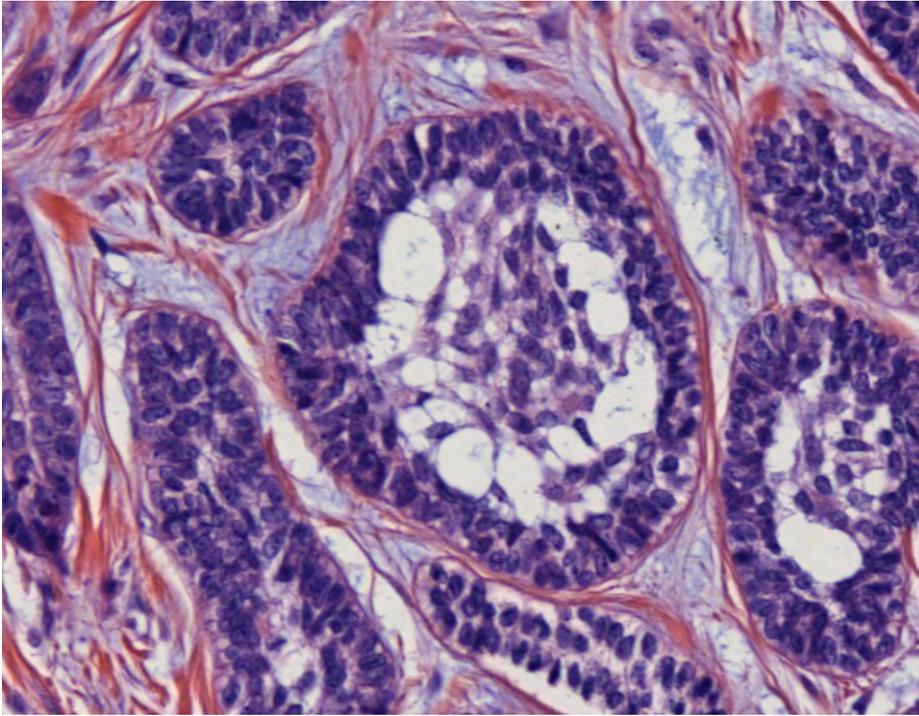


Figure 4. Améloblastome de sous-type folliculaire. Grossissement x40.

Le deuxième sous type le plus fréquent est l'améloblastome de type plexiforme. Il est composé de travées anastomotiques avec des cellules périphériques cubiques et un contingent réticulé stellaire peu abondant (figures 5 et 6).

Les sous types folliculaire et plexiforme peuvent coexister¹.

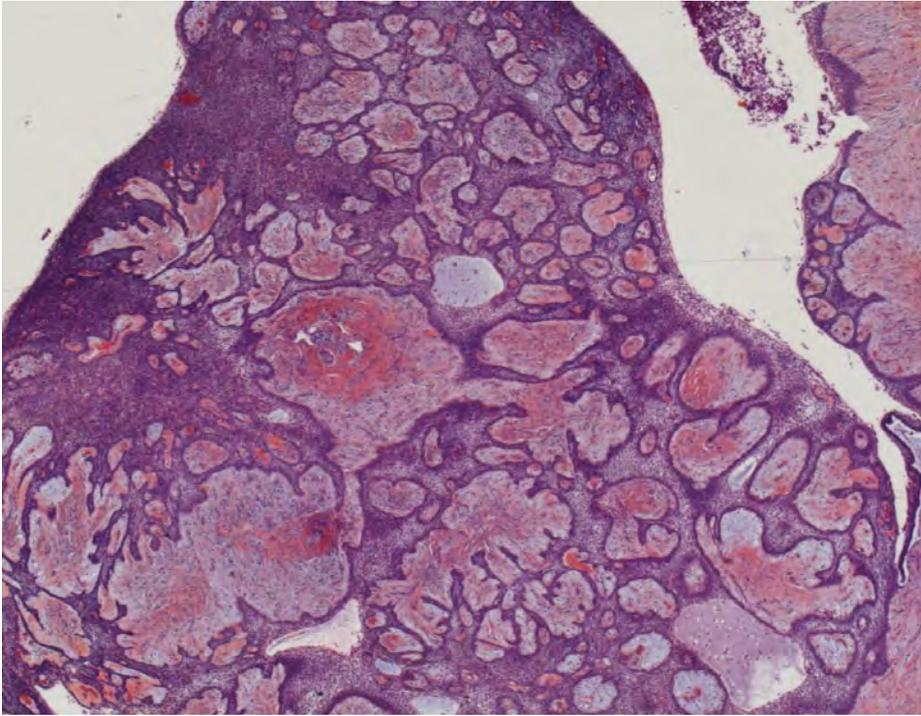


Figure 5. Améloblastome de sous-type plexiforme. Grossissement x2,5.

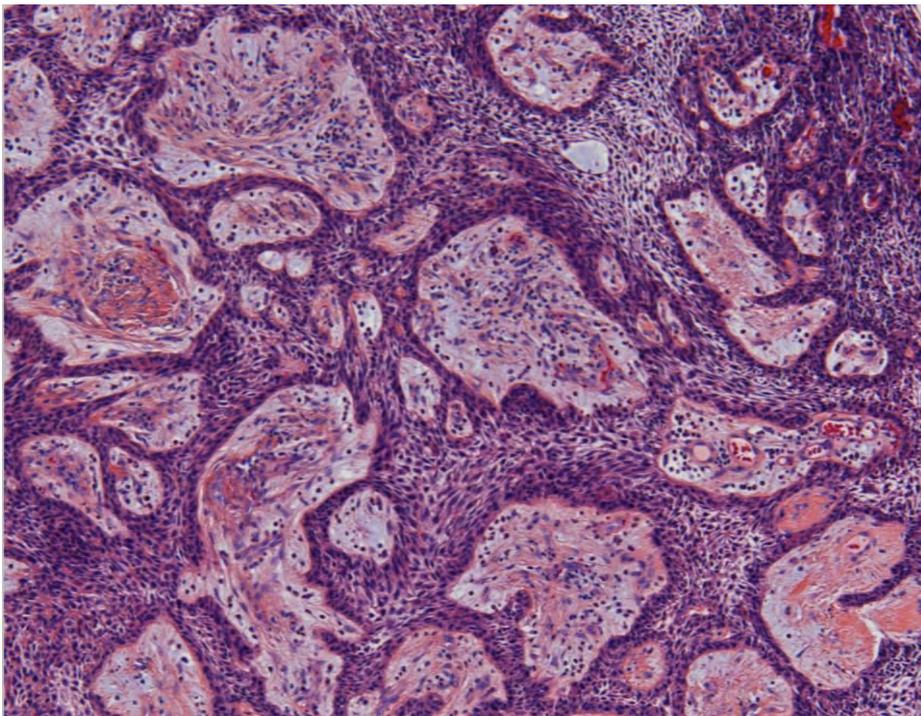


Figure 6. Améloblastome de sous-type plexiforme. Grossissement x10.

Le sous type desmoplasique est composé de cellules cubiques périphériques et de cellules fusiformes centrales. Le stroma collagénique est dense et comprime les massifs épithéiaux. Parfois il existe des foyers de métaplasie osseuse (figure 7).

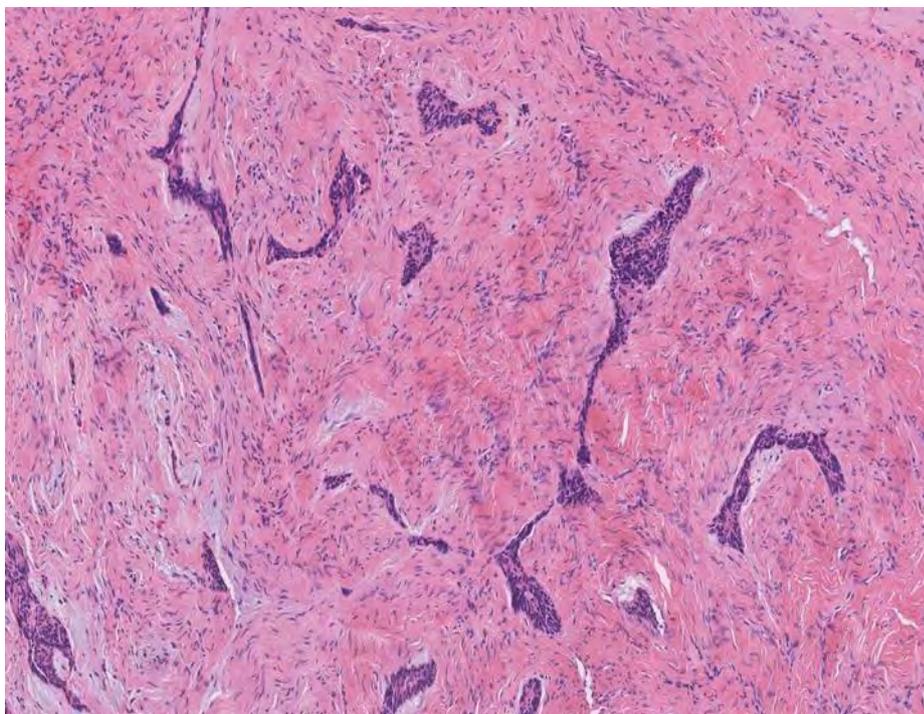


Figure 7. Améloblastome desmoplasique. Grossissement x10.

1.3 Améloblastome de type unikystique

1.3.1 Généralités

L'améloblastome de type unikystique est un variant de l'améloblastome intra-osseux.

Il survient dans une cavité kystique unique avec ou sans prolifération dans la lumière du kyste. Il représente 5 à 22 % des améloblastomes²².

Environ 50% des cas sont diagnostiqués dans la deuxième décennie et ils sont décrits entre 1 et 79 ans^{23 24 15}. L'âge moyen de découverte est de 16 ans s'il existe une dent incluse, et 35 ans en l'absence de dent incluse^{25 26}. Il a une légère prédominance masculine mais l'améloblastome unikystique sans dent incluse présente une légère prédominance féminine^{23 24 15 26}. Il se localise dans la région mandibulaire à proximité de la troisième molaire et de la branche ascendante suivie par la symphyse. La plupart des atteintes maxillaires ont lieu dans la région postérieure^{23 24 15 26}.

Cliniquement, il est le plus souvent asymptomatique mais parfois douloureux.

Au niveau de l'imagerie, il est caractérisé par une image radio-transparente unique, le plus souvent dans la région de la troisième molaire. L'atteinte de la racine dentaire est fréquente et une atteinte corticale est présente dans 1/3 des cas²⁷.

1.3.2 Anato-pathologie

Le diagnostic d'améloblastome unikystique se fait après examen de l'ensemble de la lésion.

Le type luminal montre un simple kyste avec un épithélium de type améloblastome (figures 8, 9 et 10). Le type intraluminal est caractérisé par des extensions épithéliales intraluminales, le plus souvent de type plexiforme.

Entre 50% et 75% des diagnostics initiaux d'améloblastome kystique ont un contingent mural²². Celui-ci est plus agressif, avec un comportement évolutif semblable à améloblastome conventionnel^{1 28}.

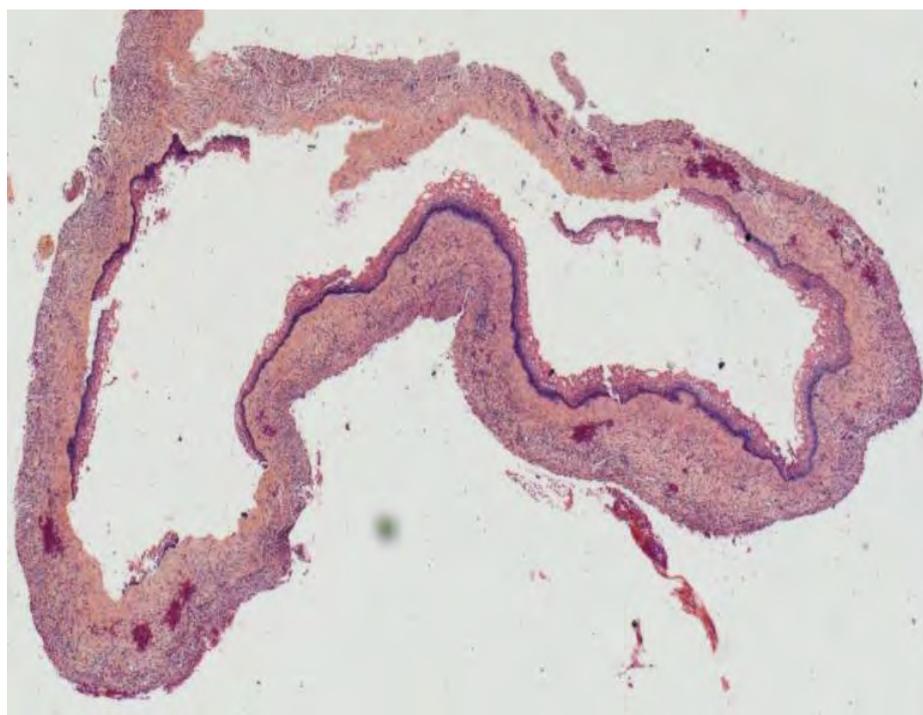


Figure 8. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x2,5.

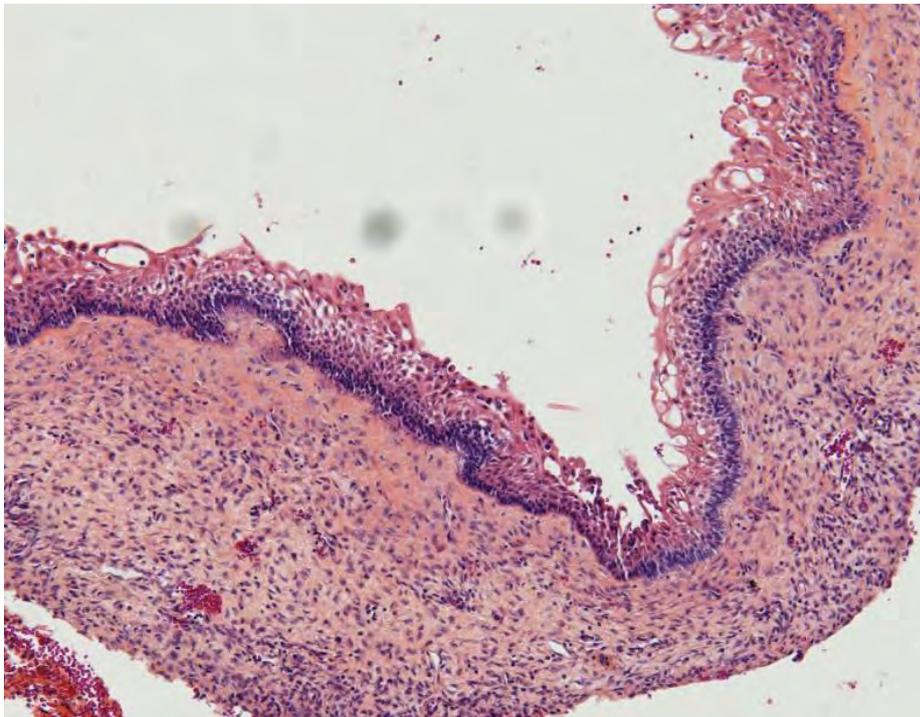


Figure 9. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x10.

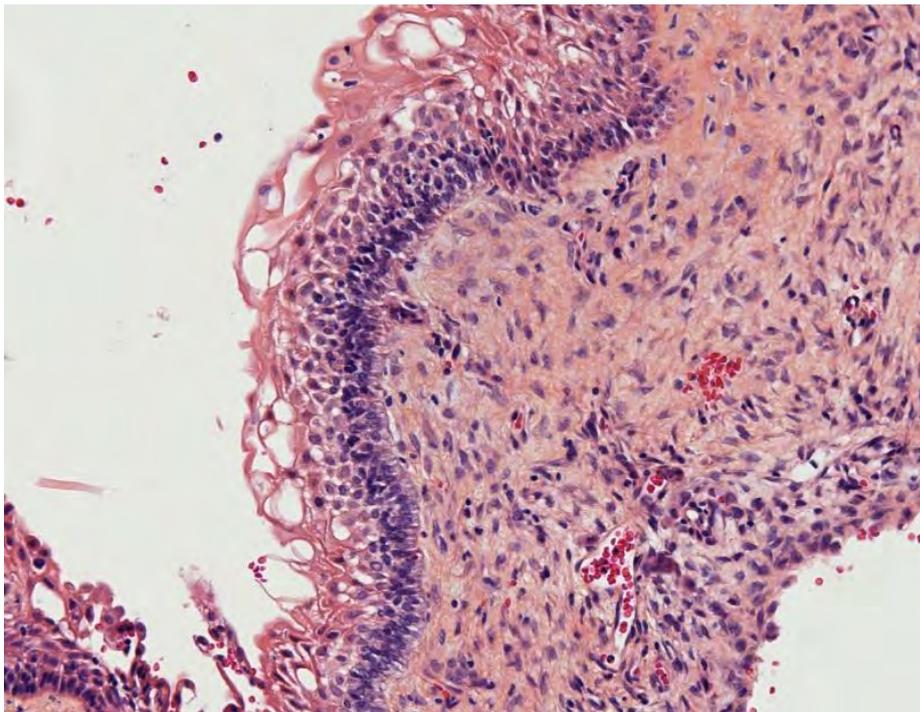


Figure 10. Améloblastome de type unikystique. Grossissement x20.

1.4 Améloblastome de type extra-osseux/périphérique

C'est un améloblastome développé dans les tissus mous de la gencive et des régions édentées avec les mêmes caractéristiques microscopiques que l'améloblastome conventionnel.

Il représente 1 à 10 % des améloblastomes^{29 30}. L'âge moyen des patients est de 50-54 ans et il est décrit de 9 à 92 ans. Environ 2/3 des cas surviennent entre la 5^{ème} et la 7^{ème} décennie²⁹. Le sexe ratio homme/femme est de 1,4/1.

La localisation la plus fréquente est la région des tissus mous mandibulaire rétro-molaire suivi de la région des tissus mous de la tubérosité maxillaire, le plus souvent à la partie linguale de la mandibule.

Cliniquement, il s'agit d'une lésion douloureuse, sessile et exophytique. La dent adjacente peut être inclinée.

Macroscopiquement et microscopiquement, il a les caractéristiques de l'améloblastome conventionnel³¹.

1.5 Améloblastomes malins

Cette catégorie inclut à la fois, l'améloblastome métastatique et le carcinome améloblastique. Dans l'OMS 2017, l'améloblastome métastatique est classé comme variant de l'améloblastome conventionnel.

L'incidence de l'améloblastome malin représente 1,6 à 2,2 % de toutes les tumeurs odontogène³². Aux Etats Unis, l'incidence de l'améloblastome malin est de 1,79 cas par million d'habitant, augmentant avec l'âge³³. L'incidence du carcinome améloblastique est supérieure à celle de l'améloblastome métastatique (2 :1)³⁴.

1.5.1 Améloblastome métastatique

C'est un améloblastome ayant métastasé malgré une histologie bénigne. Il s'agit d'un diagnostic rétrospectif.

La tumeur primitive est localisée le plus fréquemment au niveau de la mandibule puis du maxillaire³⁵. Elle est d'architecture solide ou multikystique. Les métastases sont localisées essentiellement au niveau pulmonaire (70%), vient ensuite l'atteinte ganglionnaire (28%), puis l'atteinte osseuse (12%)^{35 36 37 38}.

La clinique varie en fonction de l'organe atteint.

Pour poser le diagnostic, les tumeurs primitives et secondaires doivent avoir les caractéristiques microscopiques d'un améloblastome conventionnel bénin (figure 11)^{39 1}.

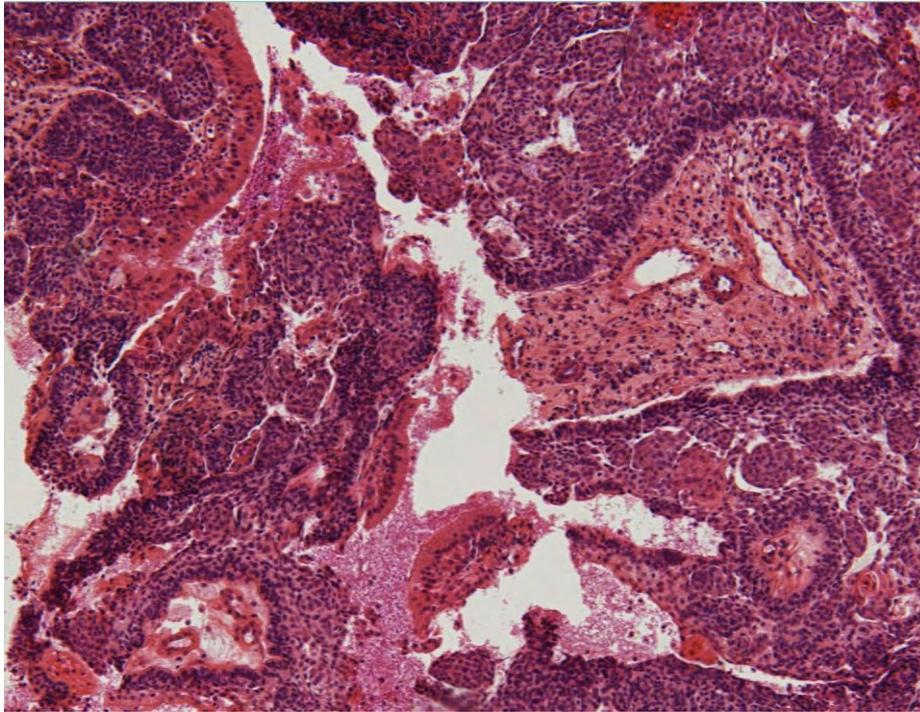


Figure 11. Améloblastome métastatique. Grossissement x10.

1.5.2 Carcinome améloblastique

1.5.2.1 Généralités

Il se définit comme étant une tumeur maligne primitive développée au dépend de l'épithélium odontogène. C'est la contrepartie maligne de l'améloblastome et il est rare.

Les hommes sont légèrement plus à risque que les femmes et la plupart des cas surviennent chez des patients de plus de 45 ans. En Chine, il représente environ 2% de tous les améloblastomes et la majorité des patients sont jeunes⁴⁰.

Le segment postérieur des mâchoires est le site le plus atteint. La moitié à 2/3 des cas touchent la mandibule^{41 42}. La plupart des cas surviennent de novo. Quelques cas sont décrit dans les améloblastomes périphériques²⁹.

Au niveau de l'imagerie, il est radiotransparent, mal limité, envahit la corticale et infiltre les structures adjacentes.

Concernant l'évolution, un tiers des patients auront des métastases pulmonaires, tandis que l'atteinte ganglionnaire est rare. La médiane de survie est 17,6 ans, deux fois plus longue pour les lésions maxillaires que mandibulaires⁴³. La récurrence locale est de 28 % après chirurgie radicale⁴⁴. La radiothérapie semble être bénéfique mais a tendance à n'être utilisée qu'en dernier recours. L'addition de plusieurs traitements agressifs dès le départ est recommandée⁴⁰.

1.5.2.2 Anatomo-pathologie

Au niveau microscopique, il doit comporter des critères cytologiques malins et des aspects morphologiques rappelant l'améloblastome. L'architecture peut être folliculaire ou plexiforme ou peut former des plages et des nids.

La couche cellulaire périphérique est palissadique et une inversion de polarité des noyaux peut être focalement présente (figure 12). Le centre des îlots épithéliaux peut être remplacé par un épithélium basaloïde, malpighien, par des cellules fusiformes ou des kystes.

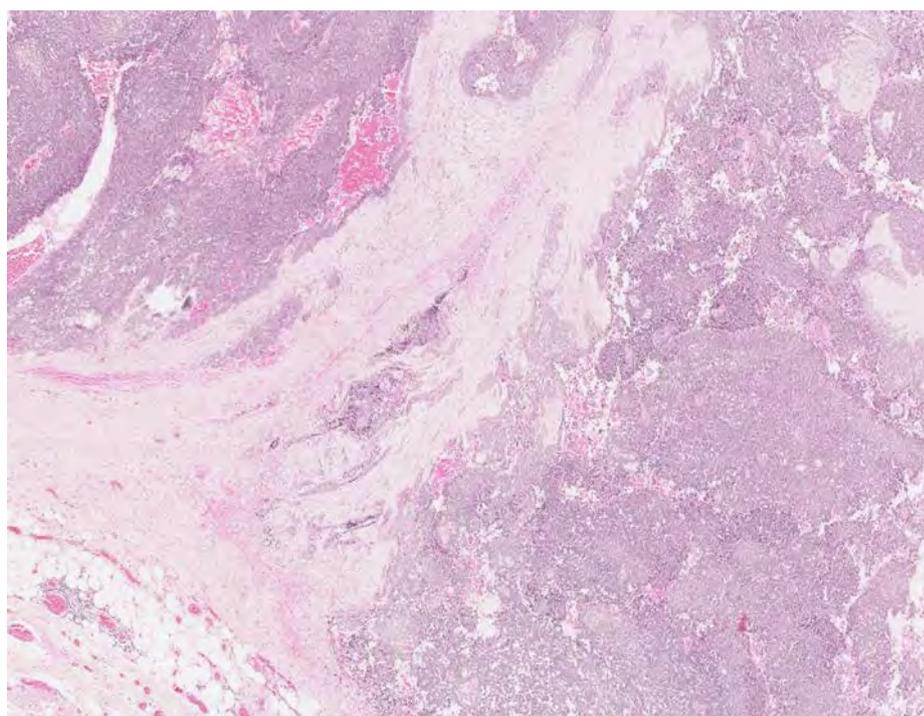


Figure 12. Carcinome améloblastique. Grossissement x4.

Les critères de malignité sont le pléomorphisme, l'augmentation du rapport nucléocytoplasmique, l'hyperchromatisme, l'activité mitotique, les mitoses anormales et l'invasion vasculaire et nerveuse. Tous ces critères doivent être présents pour affirmer le diagnostic de carcinome améloblastique. On peut aussi retrouver de la nécrose. Ce dernier critère n'est pas obligatoire (figures 13 à 16).

L'activité mitotique à elle seule n'est pas un critère de malignité. La cellularité et l'activité mitotique sont plus marquées dans le maxillaire que dans la mandibule. L'infiltration de la médullaire osseuse doit être évaluée avec précaution car l'améloblastome est à développement intra osseux¹.

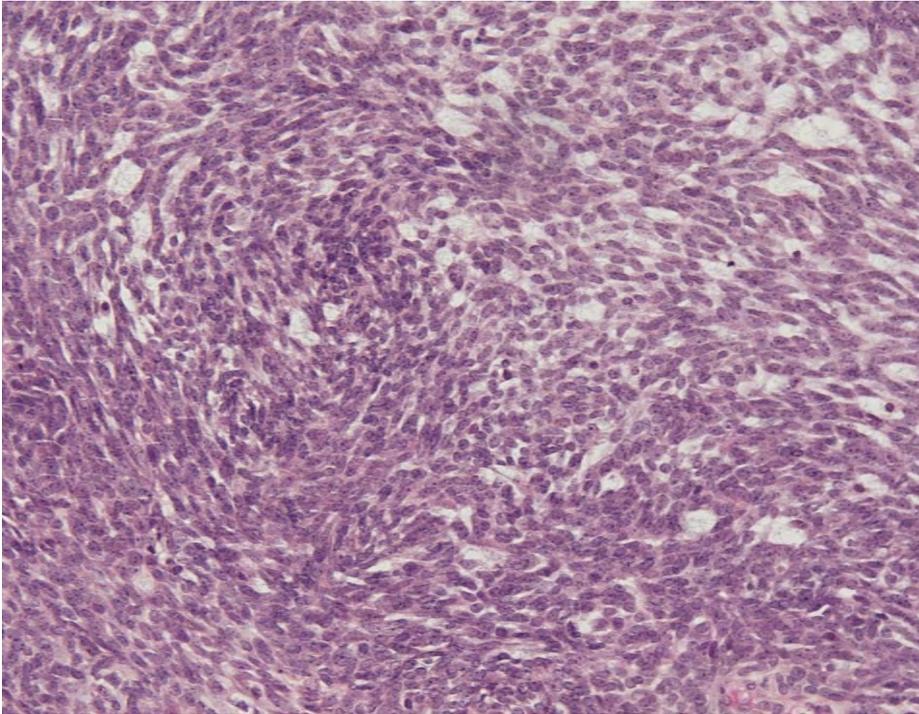


Figure 13. Carcinome améloblastique. Augmentation du rapport nucléo-cytoplasmique. Grossissement x20.

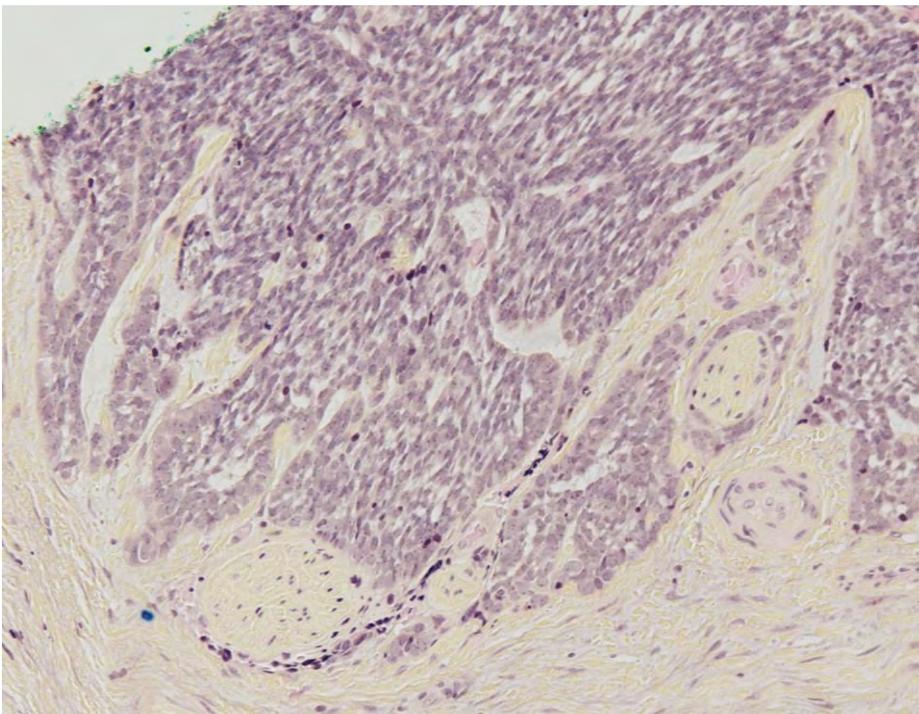


Figure 14. Carcinome améloblastique. Engainement nerveux. Grossissement x20.

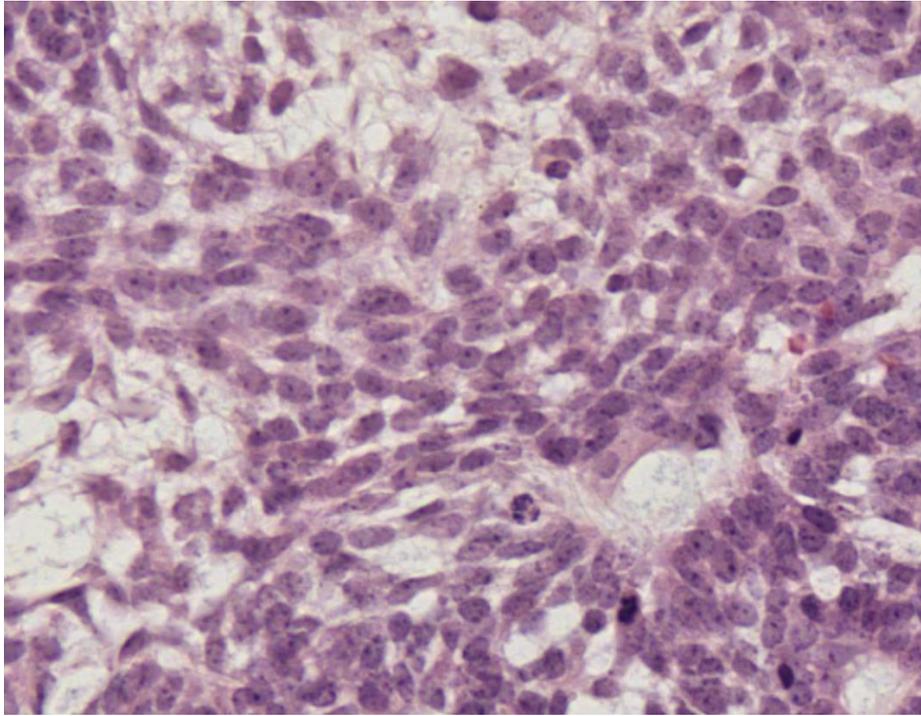


Figure 15. Carcinome améloblastique. Mitoses et mitoses anormales. Grossissement x40.

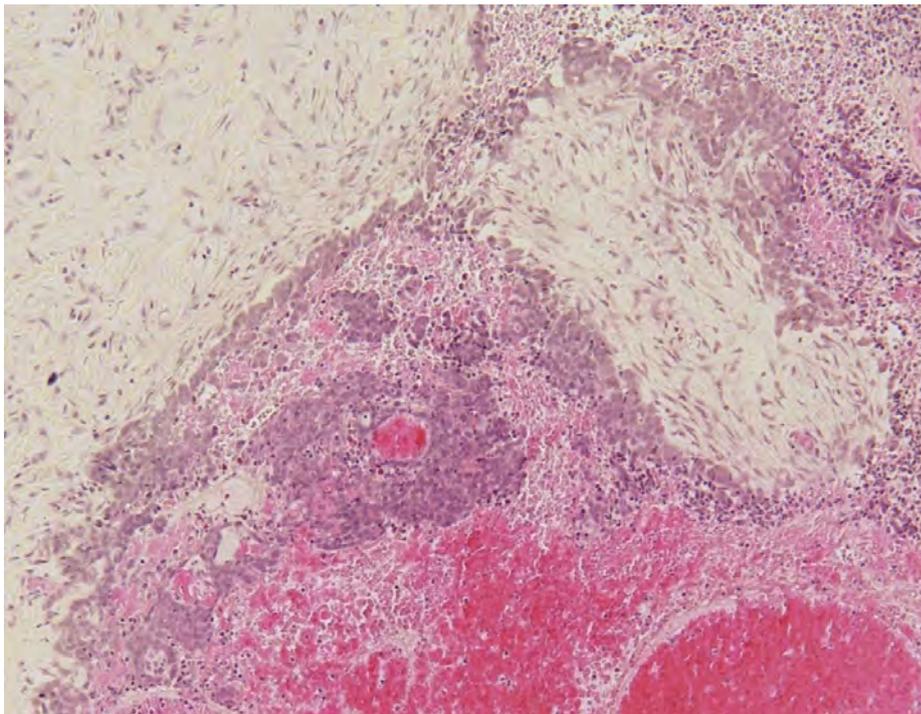


Figure 16. Carcinome améloblastique. Nécrose. Grossissement x10.

Au niveau immunohistochimique, le carcinome améloblastique exprime SOX2 et on observe une augmentation de l'index de prolifération ki67^{45 46}.

Au niveau des anomalies génétiques, on retrouve la mutation BRAF comme dans l'améloblastome.

1.6 Imagerie des améloblastomes

Les examens radiologiques permettent d'objectiver la lésion et d'affiner l'orientation diagnostique. La localisation, l'origine, le volume tumoral et son rapport avec les structures voisines pourront être déterminés.

L'examen de référence est l'orthopantomogramme.

D'autres examens complémentaires sont possibles, comme la tomodensitométrie (TDM) sans et avec injection de produit de contraste pour affiner les données de la radiologie conventionnelle, et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) qui permettra l'examen des tissus mous.

Ces examens radiologiques permettent de guider la décision thérapeutique dont le geste chirurgical. Ils permettent aussi la surveillance des récurrences²⁰.

1.6.1 Radiologie conventionnelle

L'image typique mais non pathognomonique est une lésion radiotransparente multiloculaire « en bulle de savon » ou « en rayon de miel » (figure 17).

Le caractère uniloculaire de la lésion est moins fréquent. Le contour de ces lésions est bien défini, délimité par un liseré osseux réactionnel. La corticale peut être atteinte.

L'améloblastome desmoplasique peut être radio-transparent ou radio-opaque^{17 47}.

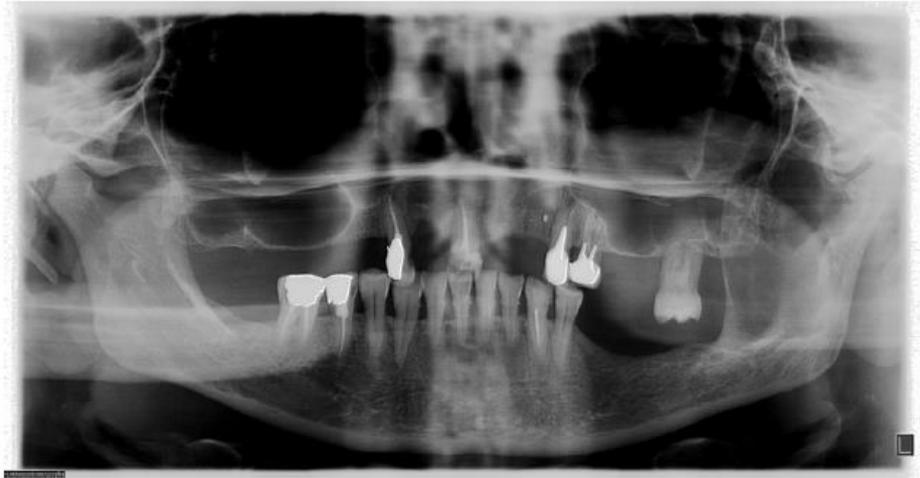


Figure 17. Orthopantomogramme.

Image radio-claire semblant souffler les corticales, CHU Toulouse.

1.6.2 Imageries complémentaires

On peut aussi réaliser un examen tomodensitométrique (TDM) sans et avec injection de produit de contraste. Il permet de déterminer la taille de l'améloblastome, ainsi que son rapport avec les structures environnantes comme le canal mandibulaire et la corticale osseuse.

Enfin, une imagerie par résonance magnétique (IRM), non irradiante, permet une acquisition d'images de haute résolution et d'évaluer l'extension dans les tissus mous.

1.7 La voie RAS/MAPK

La voie RAS/MAPK constitue, avec la voie PI3K/AKT, une des voies de transmission du signal les mieux connues en cancérogénèse. Elle aboutit, après une cascade de phosphorylations successives, à l'activation de la transcription, et ainsi, à la prolifération cellulaire, à l'invasion, à la migration cellulaire, à l'angiogenèse et à la survie cellulaire.

La protéine BRAF est un élément essentiel de la voie RAS/MAPK. Une dérégulation de cette voie peut se faire par l'intermédiaire d'une mutation de BRAF.

1.7.1 La voie de signalisation RAS/MAPK- Généralités

Son activité est modulée par des mécanismes de phosphorylation et de déphosphorylation. Elle implique l'activation de facteurs de croissance, de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, de protéines kinases, ainsi que de proto-oncogènes²⁰.

La voie RAS/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) est, généralement, activée par l'intermédiaire d'un récepteur transmembranaire, qui lui-même est stimulé par un facteur de croissance ou une cytokine. Ces derniers, sans entrer dans la cellule, vont transmettre le signal extracellulaire. Les récepteurs membranaires de ces facteurs de croissance ont la particularité d'avoir une activité tyrosine-kinase qui permet l'activation du récepteur par autophosphorylation. Il s'en suit l'activation d'une cascade de phosphorylations de nombreuses protéines intracytoplasmiques.

La voie RAS/MAPK est activée dans de nombreux cancers. Les mécanismes d'activation de cette voie sont variés. Ils peuvent se faire via les récepteurs membranaires comme l'EGFR, mais aussi via la survenue de mutations somatiques au niveau des proto-oncogènes codant pour la protéine RAS ou la protéine RAF. Elles constituent des cibles thérapeutiques de choix.⁴⁸

1.7.2 Exemple du récepteur de l'EGFR

L'EGFR ou HER1, principal récepteur transmembranaire capable d'activer la voie RAS/MAPK, est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille HER ou ErbB (figure 18). Cette famille appartient à la famille des récepteurs à facteurs de croissance à activité tyrosine kinase.

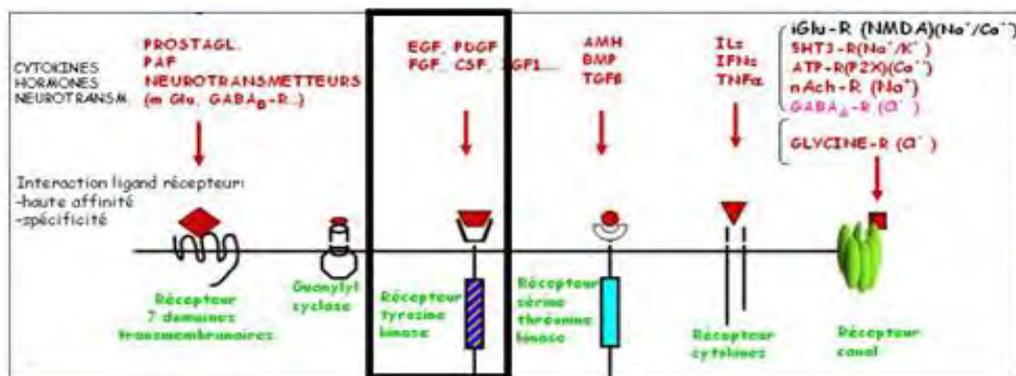


Figure 18. Les différents récepteurs aux signaux extracellulaires.

Extrait de « Notion de transduction du signal » Paraystre B, 2014⁴⁹.

L'EGFR est composé d'un domaine extracellulaire assurant la fixation avec le ligand, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine effecteur tyrosine-kinase intracellulaire.

L'EGFR possède plusieurs ligands. Par exemple, l'EGF et le TGF α (Transforming Growth Factor α). La fixation du ligand sur le récepteur entraîne, après homo et/ou hétérodimérisation de ce récepteur, son activation par phosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire.

Ces résidus phosphorylés servent d'ancrage pour un certain nombre de protéines intracellulaires contenant un domaine Src homology-2 (SH2). Ces domaines sont capables de reconnaître ces protéines phosphorylées.

Ces protéines à domaine SH2 jouent un rôle central dans la transmission de signaux intracellulaires, raison pour laquelle, on les retrouve dans les voies de signalisations RAS/MAPK et PI3K/AKT⁵⁰.

Dans la voie RAS/MAPK, il s'agit du complexe Grb2/SOS, qui active la protéine RAS. Lors de la phosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase, le complexe Grb2/SOS est recruté via le domaine SH2 de Grb2. Ce complexe se lie à RAS et permet l'activer, en remplaçant le GDP par le GTP⁵¹.

1.7.3 Les protéines RAS et RAF

La famille des proto-oncogènes RAS comprend trois gènes, qui sont KRAS, HRAS et NRAS.

Les protéines issues de ces gènes ont un poids moléculaire de 21 000 daltons, d'où leur nom p21. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C terminale.

Les protéines RAS font parties des GTPases et jouent donc un rôle dans la transmission des signaux extracellulaires vers le noyau.

Elles oscillent entre deux états, actif et inactif.

Dans l'état actif, elles sont liées au GTP (Guanosine TriPhosphate), ce qui permet transitoirement l'interaction de RAS avec d'autres molécules intracellulaires effectrices et l'activation de différentes voies de signalisations, notamment RAS/MAPK et PI3K/AKT.

Dans l'état inactif, elles sont liées au GDP. L'activation des protéines RAS survient lors du remplacement du GDP par le GTP (figure 19).

Elles activent les protéines de la famille RAF-1, constituées de sérine-thréonine-kinases. Les protéines de la famille RAF-1 sont ARAF, BRAF et CRAF. Ce sont trois différentes isoformes^{48 52}.

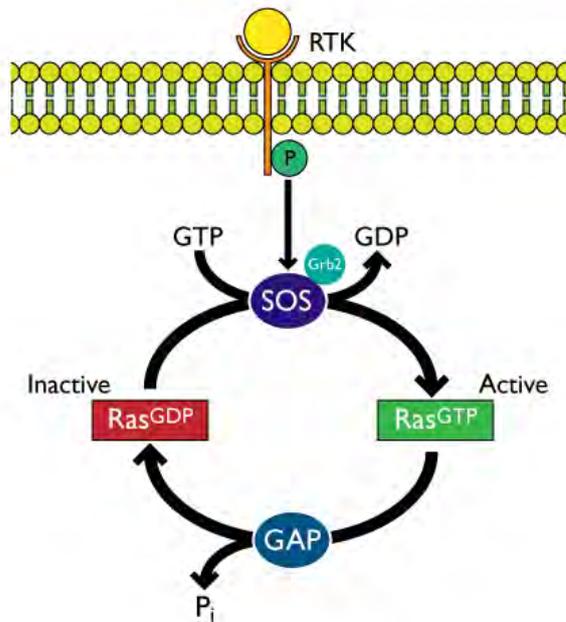


Figure 19. Mécanisme d'activation de RAS par Grb2/SOS⁵¹.

1.7.4 Les kinases intracellulaires effectrices de la voie MAPK

L'activation de la voie MAPK également appelée ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1 (figure 20). Cette protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-Kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase).

A son tour MEK active, de manière hautement spécifique par double phosphorylation, ERK. Cela entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC et c-JUN).

A leur tour, ils stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6. Ces dernières ont un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en phase G.

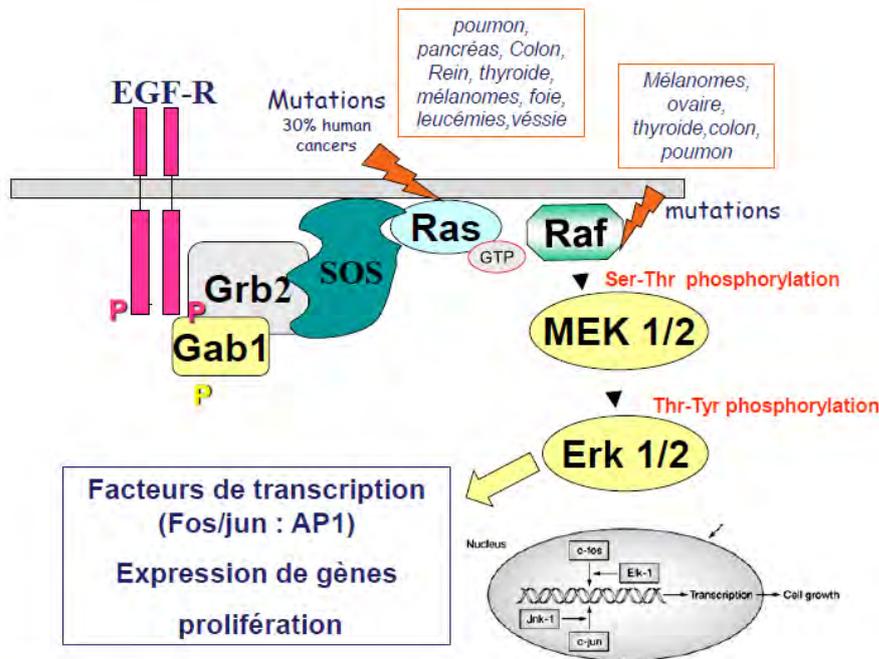


Figure 20. Voie de signalisation RAS/MAPK.

Extrait de « Notion de transduction du signal » Paraystre B, 2014⁴⁹.

1.7.5 Activation anormale dans les cancers

L'activation anormale de la voie RAS/MAPK peut se faire par l'intermédiaire des différents effecteurs de la voie et par divers mécanismes mutationnels.

L'activation d'EGFR joue un rôle dans la genèse de nombreux cancers. Elle peut se faire par plusieurs mécanismes :

- Augmentation de son expression liée à une augmentation du nombre de récepteurs à la surface de la cellule
- Mutations du gène de l'EGFR au niveau de son domaine transmembranaire
- Augmentation de la quantité de ligand d'EGFR
- Amplification du gène de l'EGFR

KRAS est l'un des oncogène le plus fréquemment activé dans les voies de cancérogénèse puisqu'on le retrouve dans 20% des tumeurs.

L'activation de la protéine RAS se fait par une mutation de KRAS, qui lui confère un pouvoir oncogénique, en étant responsable d'une accumulation de la forme active en rapport avec le GTP.

Les gènes NRAS et KRAS sont moins souvent mutés et le type de cancer est différent⁵³.

Concernant les protéines de la famille RAF-1, seul BRAF a été décrit comme muté. Une mutation prédominante sur les autres est retrouvée au niveau de ce gène, qui est la substitution d'une valine en un acide glutamique, au niveau du codon 600 (V600E).

Cette mutation activatrice est responsable d'une augmentation de l'activité kinase de la protéine BRAF, avec un effet oncogénique démontré dans des modèles cellulaires⁵⁴.

1.7.6 Mutations du gène BRAF et tumorigénèse

1.7.6.1 Gène et protéine BRAF

Le gène BRAF est situé sur le bras long du chromosome 7, au niveau du locus 7q34 et comprend 18 exons. Il code pour une protéine de la famille RAF, appelée BRAF, qui est une sérine-thréonine kinase de 766 acides aminés, qui intervient dans la voie de signalisation RAS/MAPK.

Elle est composée de trois régions conservées (CR) : CR1 et CR2 qui sont des domaines régulateurs et CR3 qui contient le domaine catalytique enzymatique kinase de BRAF (figure 21). CR1 auto-inhibe le domaine kinase de CR3 et contient le domaine de liaison à RAS. En se liant à RAS- GTP, CR1 libère CR3 et arrête l'inhibition de la kinase⁵⁵.

Les mutations somatiques touchent principalement le domaine catalytique de la kinase CR3, avec pour mutation prédominante, la substitution d'un acide glutamique par une valine sur l'exon 15 au niveau du codon 600, c.1799T>A, (p.Val600Glu). Cela aboutit à une mutation faux sens. Environ 90% des mutations sur le codon 600 sont dues à cette mutation⁵⁶.

Cette mutation provoque l'activation permanente de la sous-unité catalytique de BRAF, et le recrutement de BRAF à la membrane cytoplasmique⁵⁷. BRAFV600E a une activité catalytique 500 fois supérieure à la protéine normale⁵⁸, en faisant un oncogène puissant.

Approximativement 15% des cancers possèdent une anomalie de BRAF⁵⁹. Elles ont été rapportées dans les mélanomes, les carcinomes papillaires de la thyroïde, les tumeurs séreuses ovariennes, les cancers colorectaux, les carcinomes hépatocellulaires et les leucémies à tricoleucocytes.

Enfin, les mutations de BRAF peuvent être germinales, ce qui donne lieu à un groupe de syndrome génétique appelé « RASopathies ». Elles regroupent l'ensemble des maladies génétiques secondaires à une mutation germinale de gènes codant pour les protéines de la voie RAS/MAPK⁶⁰.

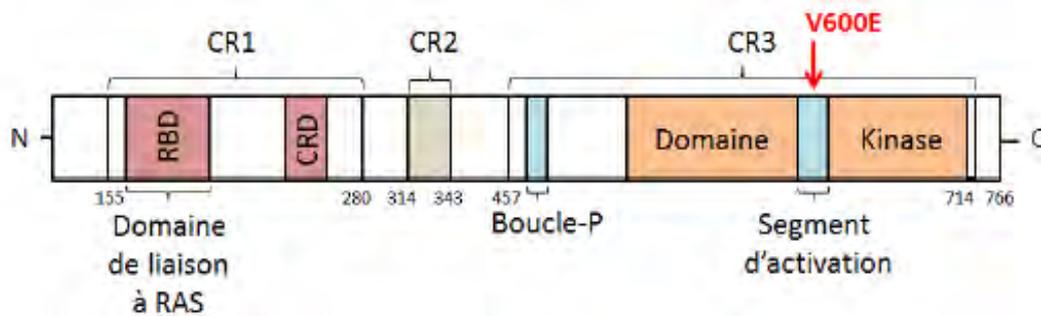


Figure 21. Représentation des 3 domaines structuraux de BRAF.

La position de la mutation oncogène V600E est indiquée par une flèche rouge. CR : Conserved region, RBD : RAS binding domain⁶¹.

1.7.6.2 Mutations BRAF dans les tumeurs

Les tumeurs les plus fréquemment mutées BRAF sont les mélanomes et les tumeurs de la thyroïde (40%), suivies par les cancers colorectaux (5-10%). Ces mutations sont exclusives des mutations du gène KRAS⁴⁸.

La mutation BRAF est la mutation la plus fréquente dans les mélanomes. La moitié des patients ayant un mélanome métastatique sont BRAF mutés⁶². Elle est aussi présente dans 80% des naevi, constituant ainsi un évènement très précoce⁶³ dans l'oncogénèse de ces tumeurs. Les inhibiteurs de BRAF sont donnés en première intention dans les mélanomes métastatiques BRAF mutés.

Les carcinomes papillaires de la thyroïde, mutés BRAF sont plus agressifs⁶⁴ que ceux non mutés.

Dans les ovaires, les tumeurs séreuses de bas grade et les tumeurs séreuses borderline (35%), la mutation du gène BRAFV600E est associée à un bon pronostic⁶⁵.

L'activation BRAF a été reportée dans 60-80% des astrocytomes pilocytiques pédiatriques. Dans cette tumeur, il existe deux types d'activation de BRAF. La première est une anomalie chromosomique qui conduit à la fusion entre deux gènes. La plus fréquente est celle entre KIAA1549 et BRAF. La deuxième est la mutation ponctuelle BRAFV600E^{66 67}.

Dans les cancers du poumon, la mutation BRAF est retrouvée dans 1 à 3% des carcinomes bronchiques non a petite cellules, la plupart dans des adénocarcinomes⁶⁸. En effet, 6% des adénocarcinome sont mutés BRAF mais la mutation V600E ne représente que 24% des mutations BRAF⁶⁹. Les mutations BRAF sont exclusives des mutations fréquentes comme

celles de l'EGFR ou de KRAS⁷⁰. Une prévalence de 4% dans les carcinomes épidermoïdes du poumon a été retrouvée⁷¹.

Les études sur les tumeurs hépatiques et des voies biliaires sont peu nombreuses. Une étude trouve 23% de carcinome hépatocellulaire BRAFV600E muté⁷², une autre rapporte 22% de mutation BRAF dans les cholangiocarcinomes.

Enfin, la mutation BRAFV600E est une mutation constitutive de la leucémie à tricoleucocytes, avec 100% de mutation⁷³.

1.7.6.3 Mutation BRAFV600 et améloblastome

Deux études ont montré que la mutation BRAFV600E était la mutation la plus fréquemment retrouvée dans les améloblastomes, avec une fréquence d'environ 62-63%^{11 12}. Une troisième étude rapporte des mutations de BRAFV600 dans 46%⁷⁴.

De façon intéressante la mutation BRAFV600 n'est pas rapportée dans les autres tumeurs odontogènes, non améloblastiques. D'autres mutations sont rapportées dans les améloblastomes : mutations de KRAS, HRAS, NRAS et FGFR respectivement dans 8%, 6%, 6% et 6% des cas¹¹.

La voie MAPK joue ainsi un rôle prépondérant dans la tumorigénèse des améloblastomes. Les mutations des gènes dans la voie MAPK sont exclusives et sont vraisemblablement de survenue précoce dans l'oncogénèse de ces tumeurs. Cela suggère que ces mutations sont un évènement précoce et sont critiques dans la pathogénie de l'améloblastome.

D'autres mutations dans des gènes de voies non MAPK, comme SMO, PIK3CA, CTNNB1 et SMARCB1 ont été retrouvées à un faible pourcentage¹¹. Elles sont fréquemment associées à des mutations dans les gènes de la voie des MAPK.

1.7.6.4 Traitements inhibiteurs de BRAF

Les inhibiteurs de BRAF bloquent la fonction de la protéine.

Il existe deux types d'inhibiteurs de BRAF : les sélectifs, de type 1, qui se lient et inhibent la conformation active de la kinase BRAF et les non sélectifs, de type 2, qui se lient à la conformation inactive de la kinase⁷⁵.

Les inhibiteurs de type 1 se lient au domaine de liaison de l'ATP de BRAFV600, inhibant son activité kinase et la voie MAPK en aval.

Les inhibiteurs de BRAF sont utilisés majoritairement en thérapeutique contre le mélanome. Les deux premiers à avoir eu l'AMM en 2012 et 2013 sont le vemurafenib et le dabrafenib. En 2011, suite à la publication de Chapman et al, qui ont comparé le vemurafenib à la dacarbazine lors d'un essai de phase III randomisé chez des patients mutés BRAF, le vemurafenib a été approuvé comme traitement de première intention des patients porteurs de mélanome métastatique muté BRAFV600⁷⁶.

Concernant les inhibiteurs de type 2, ils n'ont dans un premier temps pas montré d'efficacité clinique. Cela est probablement dû à l'inhibition non sélective de la kinase, qui a entraîné une toxicité significative à des doses bien inférieures de celles requises pour inhiber la voie des MAPK. Son intérêt est de l'associer à de la chimiothérapie ou des inhibiteurs de type 1, pour augmenter son efficacité⁵⁸.

1.7.6.5 Effets indésirables des traitements inhibiteurs de BRAF

La principale toxicité des inhibiteurs BRAF est cutanée.

La plus documentée est l'apparition de lésions hyperkératosiques. Les carcinomes épidermoïdes touchent 12 à 26% des patients traités par vemurafenib et les kérato-acanthomes 8 à 14 %^{77 76}.

De plus, il a été rapporté des proliférations épithéliales bénignes à type de papillomes cutanés. A ceci s'ajoute, des lésions de kératose pileaire, de panniculite, de dermatose acantholytique, de syndrome main-pied, des réactions de photo-sensibilité et des naevus éruptifs⁷⁸.

Les effets indésirables des inhibiteurs de BRAF sont diminués par l'association à des inhibiteurs de MEK.

1.7.6.6 Inhibiteurs de MEK

Les traitements inhibiteurs de MEK agissent sur la voie MAPK en aval de BRAF. Le trametinib est l'inhibiteur de MEK le plus connu.

Différentes études ont montré la supériorité de l'association des deux thérapeutiques en termes de survie globale et de survie sans progression, par rapport à l'utilisation d'inhibiteur BRAF seul chez des patients mutés BRAF⁷⁹.

La toxicité des inhibiteurs de MEK se manifeste par des éruptions cutanées, de l'hypertension, des diarrhées, de l'œdème, de l'insuffisance cardiaque, des chorioretinopathies et des élévations des enzymes créatine kinases.

L'association des inhibiteurs de BRAF et des inhibiteurs de MEK a pour but d'améliorer le taux de réponse et de retarder les mécanismes de résistance. De plus, cela permet de diminuer les effets secondaires de chaque médicament lorsqu'il est administré individuellement.

1.8 La voie EZH2

1.8.1 Voie EZH2- Généralités

Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) est une enzyme histone-lysine N-méthyltransférase codée par le gène EZH2. Elle est la sous-unité catalytique enzymatique fonctionnelle du Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), responsable de l'activité de méthylation de PRC2⁸⁰⁸¹. La fonction principale de PRC2 est de catalyser l'addition de groupes méthyles à l'histone H3, au niveau de la lysine 27 par l'intermédiaire d'EZH2⁸². Cette étape a lieu en post-traductionnel.

Les histones sont la cible d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation et la méthylation. Ces modifications sont des mécanismes épigénétiques essentiels, permettant la modification de la structure de la chromatine et donc la régulation de la fonction des gènes.

Contrairement aux anomalies génétiques comme celles de BRAF, qui altèrent de manière irréversible la fonction du gène, les modifications épigénétiques sont réversibles. Ce sont donc des cibles thérapeutiques intéressantes. Ainsi depuis que le lien entre méthylation des histones et progression tumorale a été prouvé, les histones-méthyl-transférases représentent des cibles potentielles anti-cancéreuses de choix⁸³.

1.8.2 Gène et protéine EZH2

Le gène EZH2 est situé sur le bras long du chromosome 7, au niveau du locus 7q36.1. Ce gène comporte 10 transcrits qui codent pour 8 protéines allant de 144 à 751 acides aminés. Selon le Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC), 1155 mutations ont été répertoriées (figure 22).

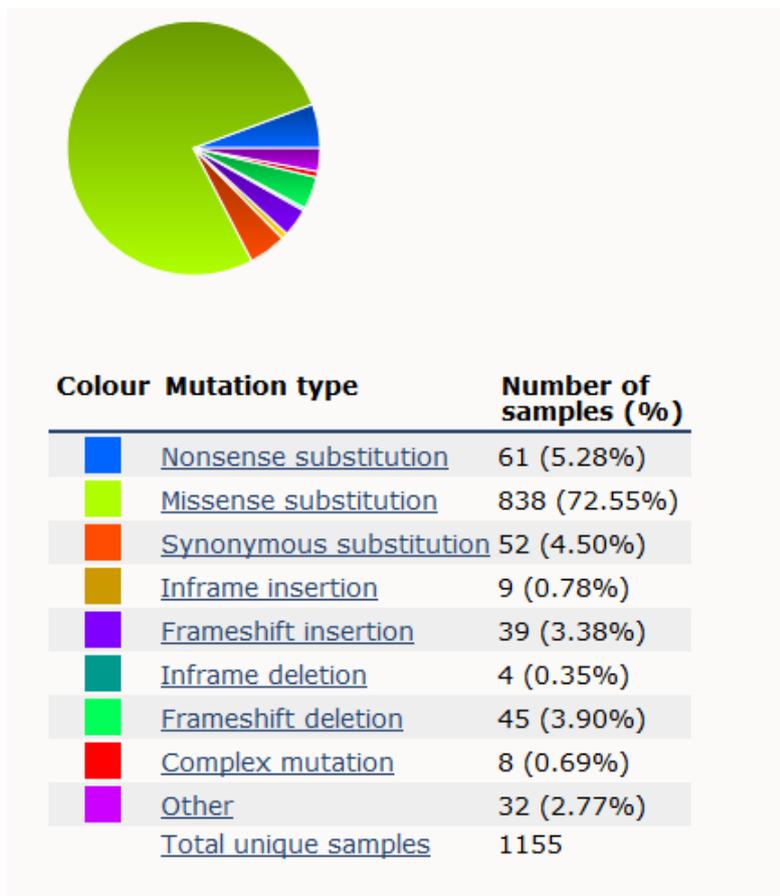


Figure 22. Répartition des mutations du gène EZH2 selon COSMIC.

1.8.3 Rôle d'EZH2 dans la régulation de la transcription

La méthylation, l'acétylation, et l'ubiquitination des protéines d'histone jouent donc un rôle dans la régulation épigénétique de la transcription.

EZH2 est capable de mono-, di- et tri- méthylation de l'histone H3, par l'addition de groupes méthyles par l'intermédiaire de son domaine SET C-terminal. La lysine méthyl-transférase utilise le cofacteur S-adénosyl-L-méthionine (SAM) comme substrat pour le transfert du groupement méthyl sur le résidu aminé⁸².

Les histones sont des protéines structurales qui se lient à l'ADN et qui permettent sa compaction⁸⁴. La fonction d'EZH2 est donc de faciliter la formation d'hétérochromatine, ce qui réduit la fonction du gène et conduit à la répression transcriptionnelle⁸⁵.

La catalyse médiée par EZH2 est associée à une répression de la transcription dû au recrutement ultérieur de PRC1, qui facilite la condensation de la chromatine et la formation d'hétérochromatine^{81 86}. PRC2 et PRC1 agissent en synergie pour réprimer la transcription, PRC2 par méthylation et PRC1 par ubiquitination (figure 23).

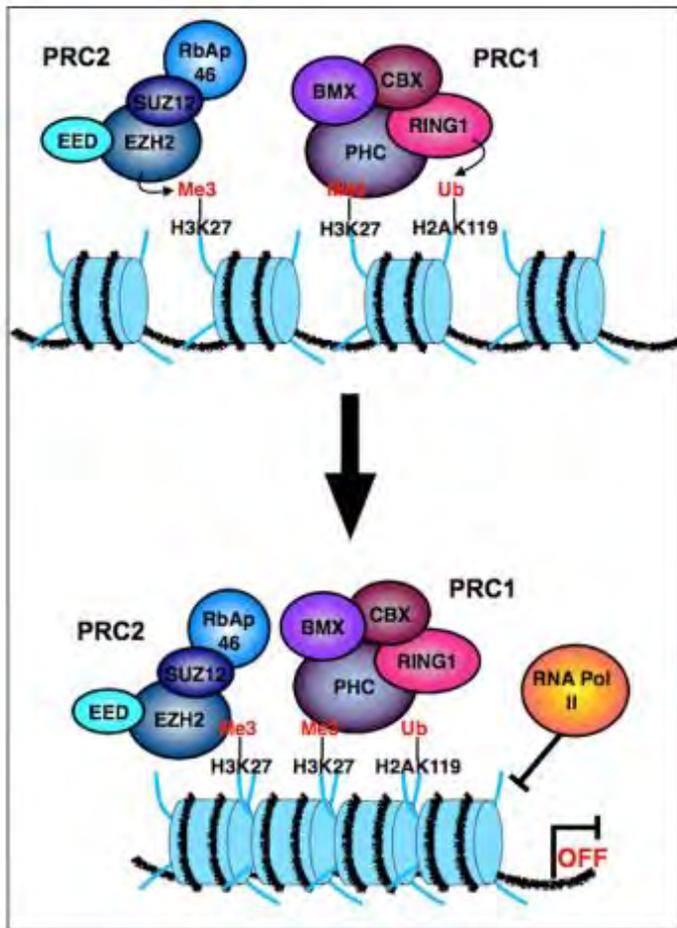


Figure 23. Inhibition épigénétique de la transcription par les PcG.

La triméthylation de H3K27 permet le recrutement de PRC1, induisant une compaction de la chromatine et une inhibition de la transcription⁸⁷.

Pendant la division cellulaire, la formation d'hétérochromatine est nécessaire permettant la séparation des chromosomes. EZH2 est une cible des protéines de la famille E2F comme pRB lors du cycle cellulaire. Enfin, des cyclines impliquées dans le cycle cellulaire telles que cdk1 et cdk2 potentialisent le rôle d'EZH2 (figure 24)⁸⁷.

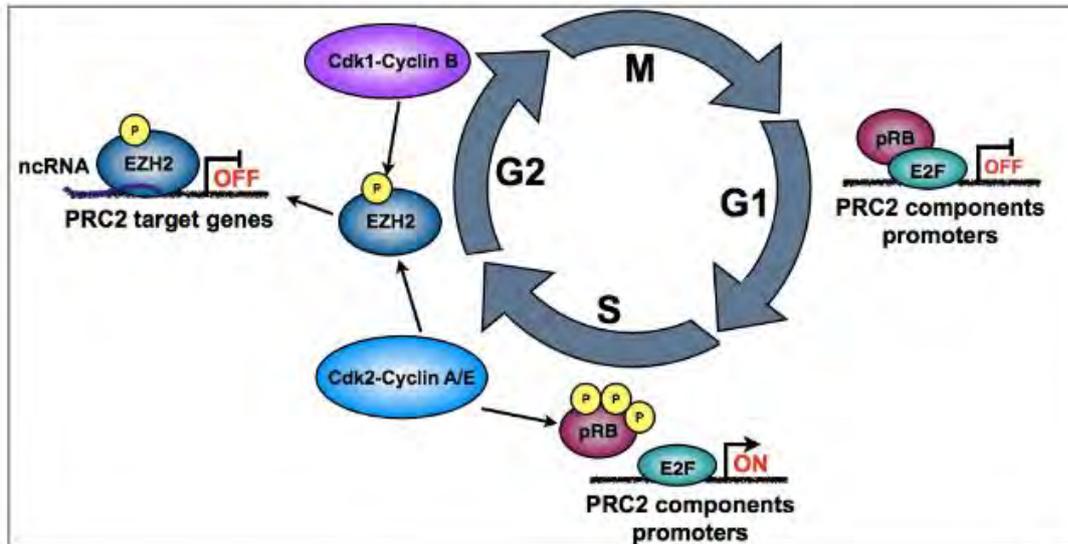


Figure 24. Modèle de régulation de la protéine EZH2 durant le cycle cellulaire⁸⁷.

Le complexe PRC2/EZH2 peut également être impliqué dans le recrutement d'ADN méthyltransférases (DNMT), ce qui entraîne une augmentation de la méthylation de l'ADN, un autre mécanisme épigénétique de répression de la transcription⁸⁸.

L'activité de EZH2 est régulée par la phosphorylation post-traductionnelle des résidus thréonines et sérines sur EZH2⁸⁹.

1.8.4 EZH2 et tumorigénèse

Différentes mutations dans l'axe PRC2-EZH2 ont été décrites comme des mutations gains et pertes de fonction d'EZH2, des surexpressions d'EZH2 ou des mutations d'autres protéines intervenant dans cet axe⁹⁰.

Des études récentes suggèrent qu'EZH2 se comporte comme un gène suppresseur de tumeur alors qu'il était auparavant considéré comme un proto-oncogène^{91 92 93}.

De manière générale, EZH2 n'est pas exprimé dans les cellules non tumorales. Dans les cellules tumorales, il a été démontré que des gènes suppresseurs de tumeurs étaient méthylés et par conséquent réprimés, tandis qu'une déméthylation générale de l'ADN était observée⁹⁴. Il a été mis en exergue qu'une surexpression d'EZH2 était corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire⁹⁵. Le lien entre surexpression d'EZH2 et mauvais pronostic a été établi pour la première fois dans le cancer de la prostate métastatique⁹⁶.

1.8.5 Mutations EZH2 et cancers

Des mutations du gène EZH2 ont été rapportées dans différentes hémopathies malignes.

Une mutation hétérozygote de la tyrosine 641, située dans le domaine SET de la protéine EZH2, a été observée dans 22% des lymphomes B diffus à grandes cellules à centres germinatifs et dans 7 à 12% des lymphomes folliculaires^{97 98}.

Différentes mutations du gène EZH2 ont été rapportées dans les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs avec une fréquence de 10-13%^{92 99}.

Des mutations du gène EZH2 ont aussi été décrites dans les cancers solides.

Dans les mélanomes, les mutations d'EZH2 ont une prévalence de 3%¹⁰⁰. Une surexpression de ce gène est associée à une épaisseur plus importante, à un Clark plus élevé et à une invasion vasculaire¹⁰¹.

Dans les cancers prostatiques métastatiques, et dans les cancers du sein¹⁰², une surexpression d'EZH2 est associée à un pronostic moins bon et à une faible différenciation^{85 101}.

Dans le cancer de l'endomètre, une surexpression d'EZH2 est associée aux sous types papillaires séreux et à cellules claires, à un plus haut grade nucléaire et à un stade FIGO plus élevé¹⁰¹.

Dans les carcinomes urothéliaux, une surexpression d'EZH2 est associée aux carcinomes invasifs et non aux carcinomes non invasifs^{103 104}.

Dans les cancers gastriques, une surexpression d'EZH2 est corrélée au pronostic, à la taille tumorale, à la profondeur d'invasion, à l'invasion des vaisseaux, aux métastases ganglionnaires et au stade clinique¹⁰⁵.

Une surexpression d'EZH2 a été décrite dans d'autres cancers tels que les carcinomes hépatocellulaires et les cancers du poumon non à petites cellules^{106 107}.

Enfin, aucune mutations ou surexpression du gène EZH2 n'a été décrite dans les améloblastomes ou les tumeurs odontogènes.

1.8.6 EZH2 en thérapie ciblée

1.8.6.1 Généralités

EZH2 est une cible en thérapie anticancéreuse de choix puisqu'on la retrouve dans de nombreux cancers. Un anti-cancéreux est optimal lorsqu'il cible les cellules tumorales et qu'il

épargne les cellules non tumorales. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des cibles thérapeutiques qui soient quasi-exclusivement exprimées dans les cellules tumorales, ce qui est le cas d'EZH2¹⁰⁸. De plus, les altérations épigénétiques sont réversibles, ce qui permet de rétablir un cycle cellulaire normal. Le ciblage d'EZH2 permettrait de remédier aux problèmes de résistance, rencontrés avec les inhibiteurs de la voie MAPKinase.

1.8.6.2 Inhibiteurs d'EZH2

Les inhibiteurs de l'EZH2 ciblent le site actif du domaine SET de la protéine. Plusieurs inhibiteurs d'EZH2 ont été développés. L'inhibiteur d'EZH2 le plus évalué en cancérologie est le DNZep.

Le 3-Deazaneplanocin (le DZNep) inhibe l'activité de la S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) hydrolase, qui est un dérivé méthylé de la S-adénosyl-L-méthionine (SAM), conduisant à son accumulation. Cette accumulation inhibe l'histone-lysine N-méthyltransférase EZH2¹⁰⁹. DZNep conduit à la dégradation des protéines PRC2 cellulaires incluant EZH2¹¹⁰. Ainsi, DZNep induit l'apoptose, inhibe l'invasion cellulaire et augmente la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie^{111 112}.

1.9 Diagnostics différentiels des améloblastomes

Les principaux diagnostics différentiels sont discutés collégalement lors de réunions multidisciplinaires associant radiologues, chirurgiens-dentistes et stomatologues, et anatomopathologistes. Les principaux diagnostics différentiels en dehors des tumeurs des glandes salivaires ou de nature épithéliales non odontogènes, sont les tumeurs bénignes épithéliales pures ou mixtes de nature odontogène.

1.9.1 Tumeur odontogène adénomatoïde

C'est une tumeur épithéliale bénigne.

Elle représente moins de 5% des tumeurs odontogènes et est plus fréquente chez la femme durant les trois premières décades^{113 114}. Elle touche le plus souvent le maxillaire.

Radiologiquement, la tumeur est symétrique et bien limitée.

Au niveau microscopique, elle a un aspect caractéristique et est composée de nodules constitués de massifs épithéliaux ressemblant à des canaux. Parfois, on retrouve un matériel hyalin éosinophile (figure 25)¹.

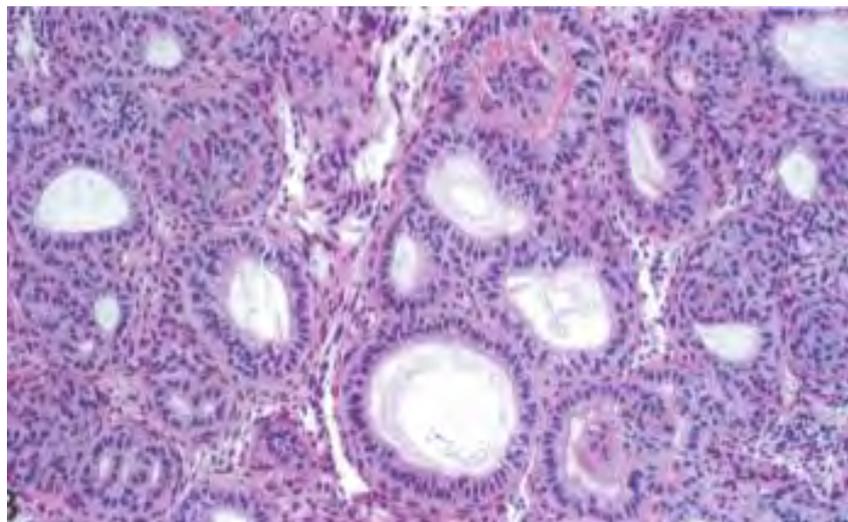


Figure 25. Tumeur odontogène adénomatoïde, WHO Head and Neck Tumors, 4ème édition.

1.9.2 Tumeur épithéliale odontogénique calcifiée

C'est une tumeur épithéliale bénigne anciennement nommée, tumeur de Pindborg.

Elle représente moins de 1% des tumeurs odontogènes. Elle survient à tout âge avec une prédominance entre la 4^{ème} et la 6^{ème} décade avec une prédilection pour la mandibule.

Les patients sont le plus souvent asymptomatiques. La tumeur peut être radio-opaque et/ou radio-claire avec parfois un aspect de « neige fraîche » caractéristique.

Au niveau microscopique, cette tumeur est d'architecture très variable composée de cellules polyédriques avec un abondant cytoplasme aux limites nettes. Parfois les cellules sont claires. Les noyaux sont souvent pléomorphes mais l'index mitotique est très faible. Enfin, il existe une sécrétion amyloïde avec calcification secondaire. Contrairement à l'améloblastome il n'existe pas de palissade en périphérie des massifs épithéliaux¹.

1.9.3 Fibrome améloblastique

C'est une tumeur bénigne épithéliale et mésenchymateuse odontogène.

Elle représente 1,5 à 6,5% des tumeurs odontogènes et 80% survient avant 22 ans^{115 116 117}.

Elle touche le plus souvent la mandibule et est radio-transparente.

Au point de vue microscopique, la composante épithéliale est de type améloblastique. La composante mésenchymateuse qui fait le diagnostic est myxoïde et riche en cellules¹. Ces dernières ne présentent pas de critères histologiques de malignité (figure 26).

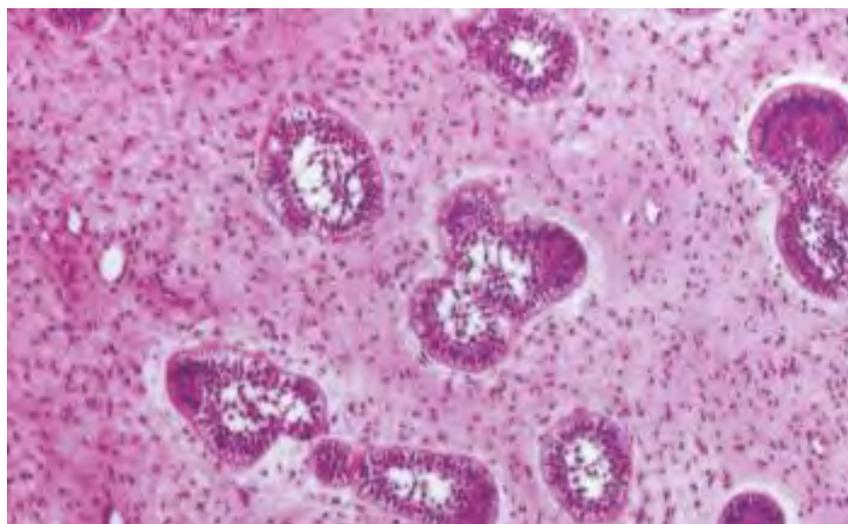


Figure 26. Fibrome améloblastique, WHO Head and Necks Tumors, 4ème édition.

1.9.4 Tumeurs kystiques odontogènes

La fréquence des tumeurs kystiques odontogènes sur la totalité des tumeurs odontogènes n'est pas connue.

La tumeur kystique la plus fréquente est le kyste radiculaire. En effet, il représente 55% de toutes les tumeurs odontogènes kystiques. Les deux autres tumeurs kystiques les plus fréquentes sont le kyste dentigère et le kératokyste odontogénique, avec une fréquence de 20% chacune^{118 119}.

Au niveau microscopique, ces tumeurs ne présentent pas de difficultés particulières dans le diagnostic différentiel avec les améloblastomes d'aspect macroscopiquement kystiques.

1.10 Traitement des améloblastomes

Le traitement habituel consiste en une exérèse chirurgicale de la lésion. La caractéristique des améloblastomes est la tendance à la récurrence²⁰. Les récurrences locales sont de 60 à 80% si le traitement est conservateur et s'observe dans plus de 50% des cas dans les 5 premières années après le traitement initial.

1.10.1 Traitement chirurgical

Aucun gold standard chirurgical n'est établi. Il existe deux types de traitements chirurgicaux. Le traitement conservateur, à type d'énucléation, et le traitement radical, qui peut être interrupteur ou non interrupteur.

Le traitement conservateur permet de séparer la lésion de l'os environnant, en respectant la continuité osseuse. Il est peu délabrant.

Le traitement radical permet d'enlever la lésion en monobloc et assure des marges d'exérèse.

Lorsque le traitement est non interrupteur, la continuité basale est respectée mais le risque de fracture peropératoire est non négligeable.

Lorsque le traitement est interrupteur, une reconstruction de la perte de substance est nécessaire²⁰.

La littérature actuelle tend à orienter d'emblée vers un traitement plus radical²⁰. Carlson, et al, optent pour un traitement agressif, radical avec des marges de 1 à 1,5 cm¹²⁰. Jeblaoui, et al, relatent un taux de récurrence après chirurgie conservatrice de 100%. Ils préconisent donc de pratiquer des résections radicales^{121 122}.

L'OMS de 2005 conclut que les types périphérique et unikystique présentent un meilleur pronostic que les types multikystique et desmoplasique. Ils pourraient donc bénéficier d'une prise en charge conservatrice, consistant en une énucléation simple.

L'OMS en 2017 insiste sur la nécessité d'une résection en marges saines, hormis les formes unikystiques lumineuses.

1.10.2 Radiothérapie

La radiothérapie semble être une alternative aux traitements chirurgicaux selon quelques cas rapportés dans la littérature.

Elle serait indiquée pour les tumeurs localement évoluées et permettrait de réduire la taille tumorale¹²³. De plus, elle constitue une alternative à la chirurgie lorsque celle-ci est impossible^{124 125 126}.

1.10.3 Chimiothérapie

Peu d'études portent sur la chimiothérapie mais les améloblastomes seraient chimio-résistants ou peu chimio-sensibles¹²⁷.

Seulement quelques cas ont été rapportés, associant radiothérapie et chimiothérapie^{32 128}.

1.10.4 Thérapies ciblées

1.10.4.1 Inhibiteurs BRAF et améloblastomes

Un case report a montré, chez un patient ayant un améloblastome mandibulaire premièrement énucléé et ayant récidivé, une réduction de plus de 90% de la masse tumorale en traitement néo-adjuvant avant la reprise chirurgicale, sans récurrence après un an de suivi¹²⁹.

Un autre cas, évoquant un améloblastome ayant une récurrence locale et des métastases pulmonaires, montre la disparition des métastases après 8 semaines de traitement par inhibiteur BRAF et anti-MEK associés¹³⁰.

1.10.4.2 Agents ciblant la voie SHH

Différentes études ont montré l'implication de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (shh) dans les améloblastomes^{131 12}. En effet, cette voie, activée dans l'embryogénèse et le développement, est réactivée dans les cancers dont les améloblastomes.

Le récepteur membranaire de Shh est Patched (Ptch). Lorsque Shh se fixe à son récepteur Ptch, il y a levée de l'inhibition de la protéine Smoothed (SMO), qui va alors migrer à la membrane. Il y a alors activation de la voie et des facteurs de transcriptions Gli. Ces derniers, transloqués dans le noyau, vont activer les gènes CCND1 et BCL2, qui jouent un rôle dans la survie cellulaire¹³².

Dans les améloblastomes, les différentes protéines de la voie sont exprimées à nouveau. Une étude a montré les effets neutralisants in vitro des anticorps anti-SHH sur des modèles cellulaires, avec induction de l'apoptose¹³³.

1.11 Objectifs de l'étude

Nous avons deux objectifs principaux dans cette étude.

Le premier objectif était d'évaluer l'incidence des mutations BRAF dans notre cohorte toulousaine d'améloblastomes par une double approche : immunohistochimique et de biologie moléculaire.

Le deuxième objectif était de vérifier les résultats que nous avons obtenus par des techniques de séquençage de dernière génération (RNAseq) sur deux cas améloblastomes. Nous avons retrouvé deux mutations inconnues du gène EZH2. Compte tenu de l'intérêt potentiel du ciblage d'EZH2 en thérapeutique, et de l'absence de description de telles mutations dans les améloblastomes, nous avons voulu vérifier l'exactitude des données NGS par d'autres approches de biologie moléculaire.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Recueil des données cliniques

Nous avons analysé rétrospectivement 28 échantillons d'améloblastome, provenant de 28 patients, recensés entre le 01/01/2010 et 01/01/2018. Au final, le statut BRAF a pu être déterminé pour 21 échantillons.

Il s'agissait de cas avec un diagnostic confirmé ou établi à Toulouse.

Le versant clinique de cette étude a été possible grâce au service de chirurgie maxillo-faciale et plastique de la face de l'hôpital Pierre-Paul Riquet, plus particulièrement grâce à Monsieur le Professeur Lauwers et à Monsieur le Professeur Lopez. A ceci s'ajoute l'investissement et le suivi clinique de Madame le Docteur Georg.

Les données cliniques ont été recueillies à l'aide des logiciels informatiques de traitement du dossier médical Orbis et DPI (Dossier Patient Informatisé). Les données anatomopathologiques ont été recueillies à l'aide du logiciel Diamic.

Pour chaque patient, les données suivantes ont été recueillies :

- Sexe
- Date de naissance
- Age au diagnostic
- Année du diagnostic
- Localisation : mandibulaire ou maxillaire
- Type de chirurgie : conservatrice ou radicale, interruptrice ou non
- Type histologique : conventionnel, unikystique, périphérique, métastatique ou carcinome améloblastique
- Immunohistochimies réalisées
- Statut BRAFV600
- Traitements complémentaires : radiothérapie, curiethérapie, radiofréquence, chimiothérapie

2.2 Etude de la mutation BRAF

Nous avons recherché la mutation BRAFV600 par trois techniques différentes : HRM, technologie TaqMan et pyroséquençage. Pour chaque patient muté, au minimum, deux techniques différentes ont été réalisées pour confirmer les résultats positifs. Un pyroséquençage a été réalisé lorsque les résultats HRM et TaqMan étaient douteux.

2.2.1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir de copeaux de tissus tumoraux fixés et inclus en paraffine (28 échantillons) à l'aide du robot extracteur Promega, après la réalisation des étapes de digestion et de préparation à l'extraction.

Il a été utilisé un kit de purification « Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit » selon les recommandations du fournisseur.

Les prélèvements paraffinés avaient fait l'objet avant leur inclusion, d'une décalcification à l'acide nitrique (10%) ou à partir d'une solution DC3® d'acide chlorhydrique.

2.2.1.1 Digestion-Déparaffinage

Pour chaque échantillon, 5 à 10 coupes de tissus de 10µm d'épaisseur ont été placées dans un tube Eppendorf, dans lequel a été ajouté 20µL de protéinase K 30 µM /mg et 180 µL de tampon d'incubation.

L'ensemble a ensuite été placé à 70°C toute une nuit ou durant 4 heures, en agitant toutes les 30 minutes.

2.2.1.2 Extraction

A la fin de la digestion, a été ajouté à chaque échantillon 400 µL de tampon de lyse. Les tubes ont été vortexés et placés à 70°C afin de faire fondre la paraffine, puis laissés à température ambiante afin de figer cette dernière au-dessus de l'échantillon.

L'ADN a ensuite été extrait de manière automatisée pour un volume d'élution finale de 60 µL.

Les ADN extraits ont été stockés dans des réfrigérateurs à une température de 4°C après le dosage de leur concentration par spectrofluorométrie (Qubit invitrogen).

2.2.2 Amplification par PCR en temps réel et technologie TaqMan

2.2.2.1 Principe de la PCR classique

C'est une technique d'amplification enzymatique, qui permet à partir d'un fragment d'ADN donné, d'obtenir un grand nombre de copies identiques de ce même fragment.

Pour cela, il faut une paire d'amorces encadrant le fragment à séquencer. Elles vont permettre à la Taq polymérase de recopier le brin matrice de 5' en 3', grâce à l'incorporation de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP : dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

La première étape est la dénaturation de l'ADN à 95°C, permettant la séparation de l'ADN double brin.

La deuxième étape est l'hybridation des amorces à une température, qui correspond à $T_{\text{hyb}} = T_m - 5^\circ\text{C}$ (T_m : moyenne des T_m des 2 amorces).

Enfin, la troisième étape est l'élongation. Elle correspond à la synthèse du brin complémentaire à partir des amorces, grâce à l'ADN polymérase et aux nucléotides présents dans le milieu réactionnel.

La multiplication du nombre de cycles permet une réaction en théorie exponentielle, même si cela n'est pas réellement le cas en pratique (figure 27).

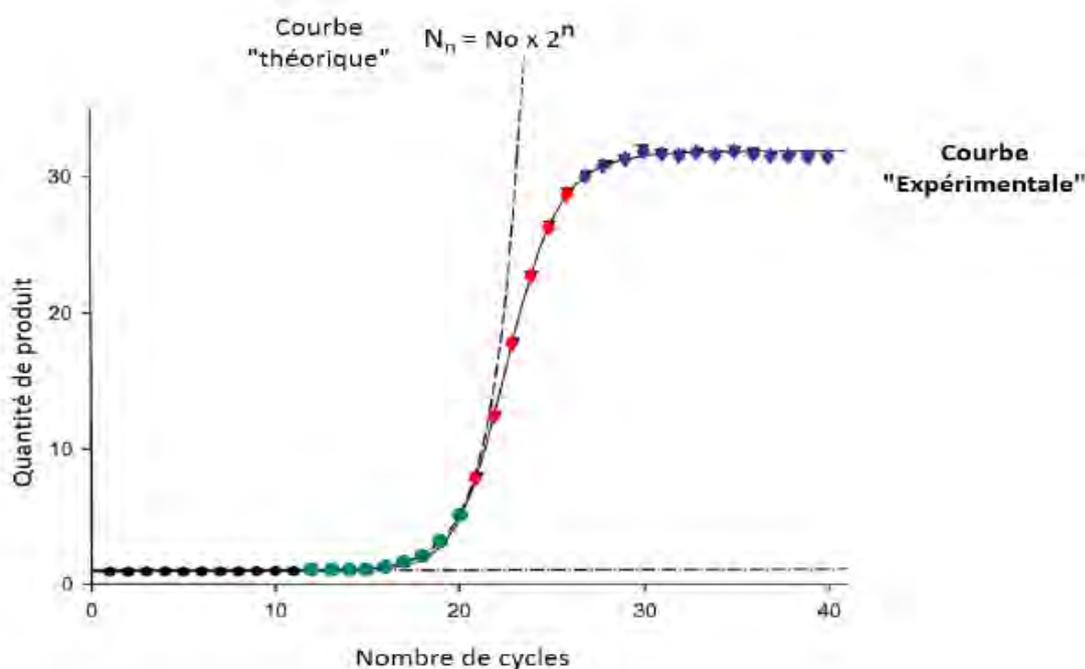


Figure 27. Quantité d'ADN en fonction du cycle PCR, Pr Espinos.

2.2.2.2 La Technologie TaqMan

Seule la mutation c.1799T>A, p.V600E du gène *BRAF* a été recherchée.

Il s'agit d'une technique de PCR quantitative par détection en temps réel de la fluorescence.

La chimie TaqMan utilise une sonde oligonucléotidique spécifique de la mutation recherchée. Cela signifie qu'un type de sonde ne permet de rechercher qu'une seule mutation. La mutation recherchée est connue et décrite dans la tumeur étudiée. Ainsi, s'il existe une autre mutation que celle détectée par la sonde, celle-ci ne sera pas retrouvée.

Le terme « TaqMan » est dérivé des deux mots : Taq polymérase et de PacMan (figure 28).

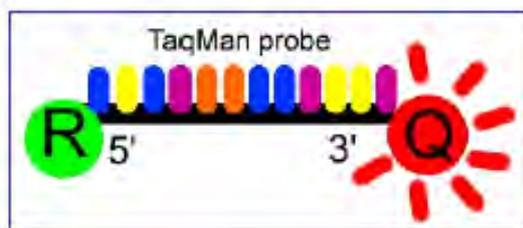


Figure 28. Sonde TaqMan, Pr Espinos.

Lors de la PCR classique décrite précédemment, on ajoute à la réaction, la sonde d'hydrolyse appelée sonde TaqMan. La PCR devient une PCR quantitative, puisque grâce à elle on peut détecter la quantité d'ADN muté produite pendant la PCR.

La Taq polymérase possède une activité exonucléase 5' vers 3'. Celle-ci débute à partir des amorces permettant de dégrader tout oligonucléotide se trouvant sur son passage.

La sonde TaqMan ou sonde d'hydrolyse est marquée par deux fluorophores, le Reporter et le Quencher. Le spectre d'émission du Reporter chevauche le spectre d'excitation du Quencher, il n'y a donc pas de fluorescence. Si lors de l'avancée de la Taq polymérase, le Reporter est libéré par l'activité exonucléase de la Taq polymérase, cela signifie que la mutation est présente. Après la libération du Reporter, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et la fluorescence du Reporter est augmentée, l'augmentation du signal correspondant à la composante du fluorophore Reporter (figure 29). Le fluorophore est proportionnel au nombre de copies mutées qui sont détectées à chaque cycle de la PCR. Ainsi, la fluorescence détectée est directement proportionnelle au relargage de fluorophore et donc à la quantité d'ADN mutée présent dans le produit de PCR.

Notre recherche de mutation a été réalisée à l'aide du kit BRAF TaqMan MGB Probes.

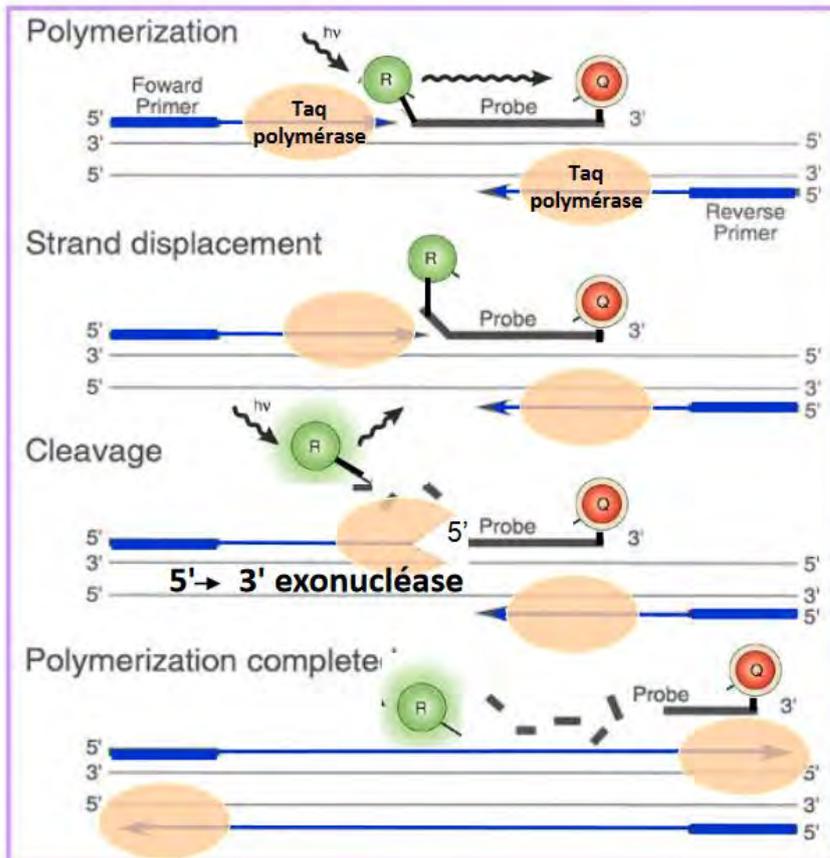


Figure 29. Fonctionnement de la sonde TaqMan, Pr Espinos.

Pour ce faire, un mélange réactionnel de 10 μL comprenant (par réaction) 5 μL d'un MasterMIX, 0,25 μL du kit BRAF selon recommandation fournisseur et 2,75 μL d'H₂O a été réalisé. A ces 10 μL ont été rajoutés 2 μL d'ADN.

Les conditions de la PCR étaient: 1 cycle de dénaturation à 95°C, 50 cycles d'amplification/quantification de 15 sec à 95°C – 15 sec à 65°C – 25 sec à 72°C, 1 cycle de fusion de 1 min à 95°C – 1 min à 40°C – 5 sec à 70°C - avec une augmentation lente de la température jusqu'à atteindre 95°C, 1 cycle de refroidissement 30 sec à 40°C.

2.2.3 Amplification par PCR en temps réel et HRM

2.2.3.1 Etape de la PCR en temps réel

Seul le codon 600 du gène *BRAF* a été amplifié.

Cette amplification a été réalisée grâce à une réaction en chaîne par polymérase (PCR) en temps réel ou qPCR (PCR quantitative). Cette technologie est basée sur la détection et la

quantification d'un reporter fluorescent, dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

Par rapport à la technologie TaqMan, cette technologie permet de retrouver toutes les mutations présentes dans la région d'intérêt mais ne permet pas de dire qu'elle est la mutation détectée.

Notre qPCR a été réalisée avec le kit ROCHE (Lightcycler® 480, High Resolution Melting Master), qui utilise un intercalant saturant.

Lors des cycles de PCR, les intercalants présents dans le MIX, ne se fixaient qu'à l'ADN double brin, ce qui permettait de majorer leur fluorescence.

La qPCR est caractérisée par l'existence de deux phases : une phase exponentielle durant laquelle la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle, suivie d'une phase de plateau durant laquelle il existe une diminution progressive des réactifs d'amplification.

Pour ce faire, un mélange réactionnel de 10 µL comprenant (par réaction) 6 µL d'un MasterMIX, 0,3 µL d'amorce sens BRAF, 0,3 µL d'amorce anti-sens BRAF, 1,44 µL de MgCl₂ et 1,96 µL d'H₂O a été réalisé. A ces 10 µL ont été rajoutés 2 µL d'ADN.

Les conditions de la PCR étaient: 1 cycle de dénaturation à 95°C, 50 cycles d'amplification/quantification de 15 sec à 95°C – 15 sec à 65°C – 25 sec à 72°C, 1 cycle de fusion de 1 min à 95°C – 1 min à 40°C – 5 sec à 70°C - avec une augmentation lente de la température jusqu'à atteindre 95°C, 1 cycle de refroidissement 30 sec à 40°C.

Les données de fluorescences sont collectées à la fin de chaque cycle de la PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. Plus la quantité d'ADN initiale est importante, moins il faut de cycles pour atteindre un point, pour lequel, le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (Cycle threshold) et apparait en début de phase exponentielle.

Les échantillons présentant un Ct supérieur à 35 ont été considérés comme non analysables.

Tous les échantillons ont été analysés en duplicat et chaque réaction comportait des témoins positifs mutés et négatifs sauvages.

2.2.3.2 HRM

A la fin de la PCR en temps réel, a été réalisée une courbe de fusion haute résolution ou High Resolution Melting (HRM). Cette étape permet la détection d'une mutation si celle-ci est présente. Lors de cette étape les amplicons ont progressivement été dénaturés, entraînant une perte de fluorescence.

La dénaturation de l'ADN a initialement été obtenue par une augmentation brutale de la température à 95°C suivie d'une renaturation à 40°C favorisant la formation d'hétéroduplex (hybridation brin muté-brin sauvage). A la phase de dénaturation suivante, ces hétéroduplex, du fait de leurs mésappariements, présentaient une dénaturation précoce avec un T_m (température de fusion) moins élevé que pour un homoduplex wild-type, signant la présence d'une mutation (le T_m étant la température à laquelle 50% de l'ADN est dénaturé).

Cette mutation a été ainsi repérée par une modification de la cinétique de la fluorescence par rapport à un témoin non muté. L'enregistrement de l'intensité de la fluorescence en fonction de la température est appelé courbe de fusion.

Les courbes de fusion ont été analysées avec le logiciel Lightcycler® 480. Parmi nos échantillons seuls les profils HRM mutés ou douteux ont été séquencés afin de caractériser les mutations. Les échantillons aux profils non mutés ont été considérés comme sauvages.

2.2.4 Pyroséquençage

Cette technologie permet la recherche toutes les différentes mutations présentes dans la région ciblée. Le temps nécessaire pour réaliser cette technique est plus important que pour la PCR en temps réel avec HRM et la technologie Taqman.

Il s'agit d'un séquençage direct d'une courte séquence d'ADN biotinylé, dont le principe correspond à l'incorporation de nucléotides dans un ordre déterminé. Ce séquençage permet d'étudier 24 échantillons en une courte durée (15-20 min).

Notre pyroséquençage a été réalisé à l'aide du kit BRAF theascreen Pro kit.

2.2.4.1 Réaction d'immobilisation et préparation du MIX

Il était nécessaire de réaliser en premier lieu une réaction d'immobilisation de l'ADN à la streptavidine. Cette réaction comprenait pour un tube, 28 μ L d'eau purifiée, 40 μ L de Pyromark binding buffer, 2 μ L de billes de streptavidine (Sepharose High performance), 10

μL de PCR. Les prélèvements ont ensuite été placés sur un agitateur durant 30 min à 1400 rpm.

Parallèlement, 25 μL d'un MIX comprenant pour un échantillon 24,2 μL de Pyromark annealing et 0,8 μL du kit BRAF selon recommandations fournisseur ont été déposés dans chaque puit de la plaque du run (1 plaque comprenant 24 puits).

Par l'intermédiaire d'une « station de travail », l'ADN biotinylé capturé et fixé sur les billes lors de la réaction d'immobilisation, a été dénaturé à la soude (passage d'un ADN double brin à un ADN simple brin et élimination du brin non biotinylé), lavé et élué dans le tampon d'annealing contenant l'amorce de séquençage. La plaque a ensuite été chauffée 2 min à 80°C puis laissée à température ambiante durant 15 min afin de permettre une hybridation spécifique des amorces. Les échantillons de la plaque ont ensuite été séquencés.

2.2.4.2 Pyroséquençage

Seul le codon 600 du gène *BRAF* a été exploré.

Principe du pyroséquençage :

Lors du séquençage, si un nucléotide est incorporé dans le brin en cours de synthèse, un pyrophosphate est libéré.

Ce pyrophosphate est alors transformé en ATP par une ATP sulfurylase. Cet ATP est utilisé par une luciférase pour produire un signal lumineux.

Le pyroséquenceur capte ce signal et le transforme en pic sur un pyrogramme, dont la taille correspond au nombre d'un même nucléotide incorporé.

Les nucléotides non incorporés ou en excès sont dégradés par une apyrase (figure 30).

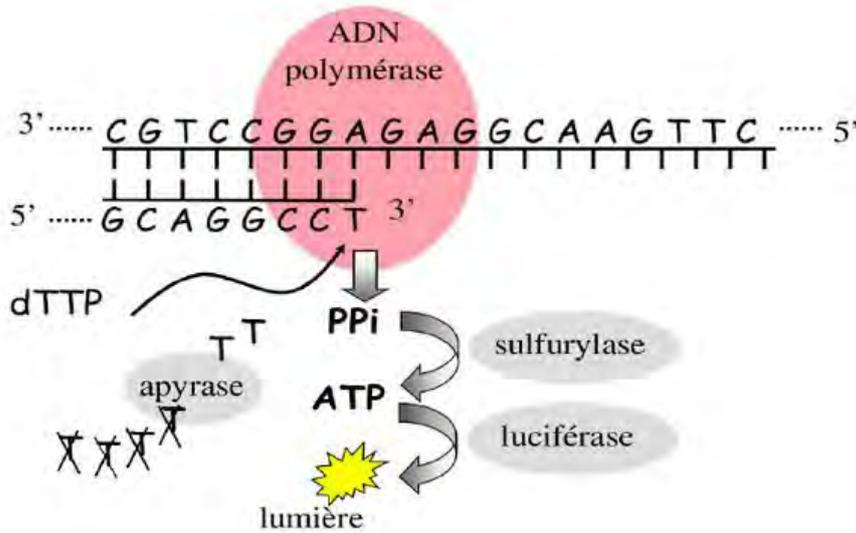
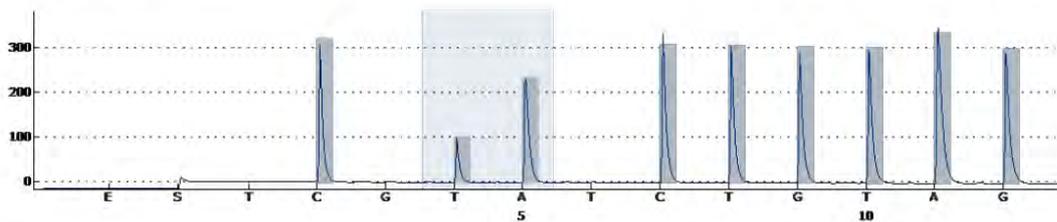


Figure 30. Principe du pyroséquençage¹³⁴.

Lors des pyroséquençages, chaque patient a été analysé en duplicat et pour chaque plaque, un témoin positif muté, négatif sauvage et un témoin nul (sans ADN) ont également été analysés (figures 31 et 32).

Well: A3
Assay: BRAF codon 600
Sample ID: T+



| | |
|-------------------------|---------------------------------|
| Result | Mutation |
| Frequency | 31,8 % units (LOD: 2,4 % units) |
| Nucleotide Substitution | 1799T>A |
| Amino Acid Substitution | V600E |
| Quality | Passed |

Figure 31. Témoin positif en pyroséquençage, Grand D.

Assay: BRAF codon 600
Sample ID: T-

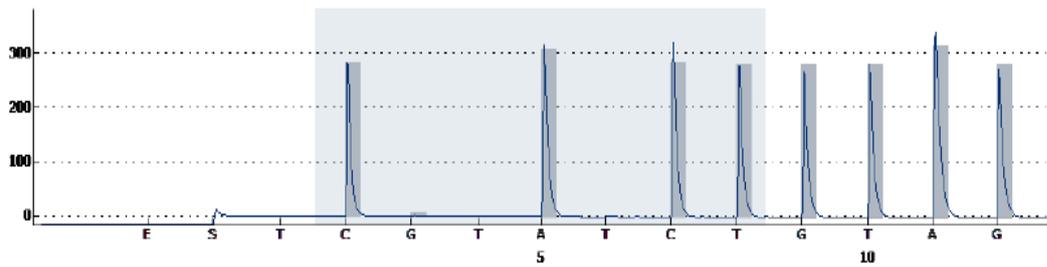


Figure 32. Témoin négatif en pyroséquenceur, Grand D.

Les pyrogrammes ont été analysés à l'aide du logiciel Pyromark Q24 2.0.6. Les mutations recherchées étaient :

- BRAF V600E (GAG) et (GAA)
- BRAF V600D (GAT)
- BRAF V600K (AAG)
- BRAF V600R (AGG)

2.3 Etude des mutations EZH2

Deux mutations EZH2 ont été retrouvées lors de la réalisation d'un RNAseq sur tissus congelés de deux de nos cas d'améloblastomes. Le RNAseq a été réalisé par IntegraGen. Les deux mutations retrouvées sont :

- c. 148513869T>C, qui a pour conséquence le remplacement d'une valine par une alanine, p.V466A
- c. 148524298C>T, qui a pour conséquence le remplacement d'une sérine par une lysine, p.S229L

Ces mutations sont des mutations faux sens.

Notre objectif était de vérifier si ces deux mutations retrouvées chez deux patients étaient réelles. Pour cela, nous avons utilisés deux méthodes de biologie moléculaire différentes, qui sont la PCR en temps réel avec HRM et la méthode Sanger.

2.3.1 Séquençage des ARN tumoraux

L'autre étude faite dans le laboratoire, avait pour but de caractériser et comparer sur un plan moléculaire les améloblastomes et les adamantinomes et d'étudier les profils mutationnels des OFD et adamantinomes. Pour réaliser ce dendrogramme, deux cas d'améloblastomes avaient été sélectionnés.

L'ARNseq (analyse du transcriptome) est une technique NGS qui permet non seulement de réaliser un catalogue de gènes exprimés mais aussi de quantifier l'expression des gènes et de déterminer la structure de chaque transcrit (identification des variants d'épissage et analyse de polymorphismes).

La préparation des bibliothèques, le séquençage et l'analyse des données ont été réalisés par IntegraGen SA (Evry, France).

Les bibliothèques ont été préparées à l'aide du kit de préparation TruSeq Standed Total RNASample en accord avec les recommandations du fabricant : élimination des ARN ribosomaux à partir d'1 µg d'ARN totaux en utilisant le kit Ribo-Zero Gold, fragmentation des ARNs par la chaleur permettant d'obtenir des fragments d'environ 300pb et synthèse des ADNc double brins en utilisant une transcriptase inverse et des amorces aléatoires. Enfin, une ligation d'adaptateurs Illumina et une amplification de la bibliothèque d'ADNc par PCR ont été réalisées avant le séquençage en paired-end 75b sur Illumina HiSeq4000.

Après évaluation de la qualité par FastQC, les séquences obtenues ont été alignées sur le génome de référence hg19. L'expression des gènes a été quantifiée en utilisant HTSeq et la base de données du Gencod v19 comme référence.

2.3.2 Amplification par PCR en temps réel et HRM

Le principe est le même que pour BRAF. Celui-ci a été précédé d'une digestion, d'un déparaffinage et d'une extraction de l'ADN comme pour BRAF. Les deux loci étudiés étaient ceux des deux mutations retrouvées.

Pour ce faire, un mélange réactionnel de 10 µL comprenant (par réaction) 6 µL d'un MasterMIX, 0,36 µL d'amorce sens, 0,36 µL d'amorce anti-sens, 1,2 µL de MgCl₂ et 2,08 µL d'H₂O a été réalisé. A ces 10 µL ont été rajoutés 2 µL d'ADN.

Les conditions de la PCR étaient: 1 cycle de dénaturation à 95°C, 50 cycles d'amplification/quantification de 15 sec à 95°C – 15 sec à 65°C – 25 sec à 72°C, 1 cycle de

fusion de 1 min à 95°C – 1 min à 40°C – 5 sec à 70°C - avec une augmentation lente de la température jusqu'à atteindre 95°C, 1 cycle de refroidissement 30 sec à 40°C.

2.3.3 Séquençage Sanger

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné, afin de pouvoir le comparer à une séquence de référence.

La méthode Sanger était adaptée dans notre situation puisque nous n'avions que 2 patients avec deux régions cibles présentes dans le même gène. Le NGS, qui permet un séquençage massif d'un grand nombre de patient et d'un grand nombre de gène, n'était pas adapté dans notre cas pour vérifier la réalité des mutations trouvées

Tout d'abord, il a été réalisé une PCR classique. Ensuite les produits PCR ont été purifiés.

Cette purification est faite selon la méthode de purification enzymatique Agencourt® AMPure XP®. Elle permet l'élimination en une seule étape des amorces et des dNTP non incorporés restants en fin de PCR. Ces contaminants résiduels interfèrent avec la réaction de séquençage, leur élimination est donc nécessaire.

Puis les produits de PCR purifiés sont mis en contact avec du GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit de Beckman. Il contient de l'ADN polymérase, des dNTP, des ddNTP, du MgCl₂ et tampon (figure 33). Il faut de faible quantité de didéoxyribonucléotides triphosphates terminateurs de chaînes fluorescents qui permettent l'arrêt de l'élongation. En effet, ceux-ci sont incapables de réaliser des liaisons phosphodiester. De manière aléatoire, on obtient des fragments de différentes tailles.

Pour ce faire, un mélange réactionnel de 20 µL pour chaque amorce comprenant (par réaction) 5 µL de produit PCR purifié, 2 µL de l'amorce de séquençage à 1,6 µM, 8 µL Master mix « Quick 200 » un MasterMIX et 5 µL d'H₂O a été réalisé.

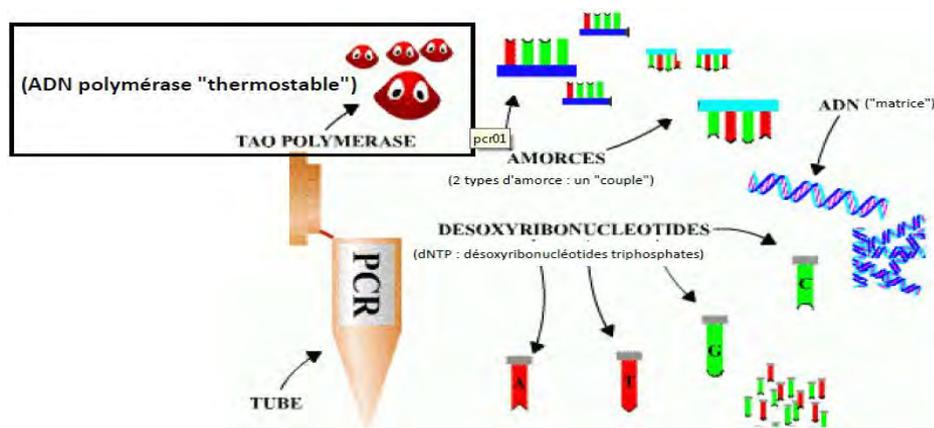


Figure 33. Les composants de la PCR de séquence, Pr Espinos.

Le séquenceur utilisé est un séquenceur Beckman. Les fragments d'ADN obtenus, qui sont de différentes tailles, sont soumis à une électrophorèse capillaire durant laquelle les fragments migrent à différentes vitesses à travers une matrice de gel en fonction de leur taille. Après avoir fait migrer les différents fragments, on a obtenu un électrophérogramme. Chacun des quatre ddNTP modifiés est porteur d'un marqueur fluorescent distinct. Le signal fluorescent émis par chaque fluorophore excité détermine l'identité du nucléotide dans la matrice d'ADN d'origine. Les données de fluorescence sont récupérées au niveau d'une cellule de détection et transmises vers une caméra pour être analysées.

Les données ont été interprétées avec le logiciel Beckman. En alignant les séquences forward et reverse et en comparant à la séquence de référence du génome humain sur COSMIC.

2.4 Etude immunohistochimique des améloblastomes

Une étude immunohistochimique avec les anticorps anti-CK5/6, anti-CK14, anti-CK8/18, anti-CD56, anti-cycline D1, anti- β -caténine, anti-E-Cadhérine et anti-BRAF a été réalisée sur l'ensemble des 28 cas d'améloblastomes.

Pour chacun des blocs sélectionnés, une coupe colorée à l'éosine-hémalum a été réalisée pour l'analyse morphologique.

L'immunohistochimie a ensuite été réalisée sur des coupes de 3 μ m d'épaisseur montées sur lames Superfrost Plus et ayant subi les étapes habituelles de déparaffinage, réhydratation puis un démasquage antigénique adapté à l'anticorps.

Les lames ont ensuite été incubées avec les anticorps suivant anti- : CK5/6, CK14, CK8/18, CD56, Cycline D1, β -caténine, E-Cadhérine et BRAF.

Toutes les lames ont été révélées par le système peroxydase-DAB et contre colorées à l'hématoxyline sur les automates BenchMark ULTRA de Ventana Roche ou Autostainer Link ou OMNIS de Dako.

Les caractéristiques de ces anticorps et les méthodes utilisées sont synthétisées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques des anticorps et méthodes utilisés.

| ANTICORPS | REFERENCE | FOURNISSEUR | CLONE | ESPECE | DILUTION et temps d'incubation | METHODE DE DEMASQUAGE | SYSTEME DE REVELATION |
|------------------|-----------------------------|--------------------|--------------|-------------------|---------------------------------------|---|-------------------------------|
| CK5/6 | GA780 | DAKO | D5/16 B4 | Monoclonal souris | Pré-dilué 12 min | OMNIS EnVision FLEX pH9-97°-30 min | OMNIS EnVision FLEX |
| CK8/18 | Keratin 8/18 Ab-1 MS-743-S1 | THERMO Scientific | 5D3 | Monoclonal souris | 1/100 20 min | PTlink EnVision FLEX pH9-97°-20 min | Autostaineur EnVision FLEX |
| CK14 | NCL-L-LL002 | LEICA Biosystems | LL002 | Monoclonal souris | 1/20 20 min | PTlink EnVision FLEX pH6-97°-20 min | Autostaineur EnVision FLEX |
| CD56 | 760-4596 | CELL MARQUE | MRQ-42 | Monoclonal lapin | Pré-dilué 16 min | BenchMark ULTRA pH9-100°-32 min | OptiView |

Tableau 1 : Caractéristiques des anticorps et méthodes utilisés (suite)

| ANTICORPS | REFERENCE | FOURNISSEUR | CLONE | ESPECE | DILUTION et temps d'incubation | METHODE DE DEMASQUAGE | SYSTEME DE REVELATION |
|--------------------|------------------|----------------------|--------------|----------------------|---------------------------------------|---|----------------------------------|
| Cycline D1 | 790-4508 | VENTANA | SP4-R | Monoclonal lapin | Pré-dilué 24 min | BenchMark ULTRA pH9-100°-64 min | OptiView |
| B-caténine | IR702 | DAKO | β-caténine-1 | Monoclonal souris | Pré-dilué 20 min | PTlink EnVision FLEX pH9-97°-20 min | Autostaineur EnVision FLEX |
| E-Cadhérine | GA059 | DAKO | NCH-38 | Monoclonal souris | Pré-dilué 25 min | OMNIS EnVision FLEX pH9 -97°-30 min | OMNIS EnVision FLEX |
| BRAF | E19294 | SPRING Bioscience | VE1 | Monoclonal souris | 1/100 36°-32 min | Ventana pH8.6-95°-64min | OptiView |

2.5 Analyses statistiques

Le logiciel Excel® 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), version 14.0, a été utilisé pour les analyses descriptives. Les caractéristiques des patients étaient exprimées en médiane, moyenne et pourcentage pour les variables quantitatives.

Les résultats n'ont qu'une valeur indicative du fait du faible nombre de patient.

3. RESULTATS

3.1 Données épidémiologiques de l'ensemble de la cohorte

Notre cohorte incluait 28 échantillons de tumeurs provenant de 28 patients recensés entre le 01/01/2010 et 01/01/2018. *Les caractéristiques sont décrites dans le tableau 2.*

L'âge moyen était de 45,8 ans (12-79 ans). Les patients avec un âge ≤ 18 ans représentaient 17,9% des cas. Notre cohorte était composée de 15 hommes et de 13 femmes, (sex-ratio homme/femme de 1,2).

La localisation préférentielle était mandibulaire avec 82,1% des cas. La localisation maxillaire était de 17,8%.

Concernant le type histologique, nous avons 25 améloblastomes conventionnels, deux améloblastomes métastatiques et un carcinome améloblastique.

Au point de vue chirurgical, le traitement le plus fréquent était le traitement conservateur, représentant 51,9% des cas. Le type de traitement chirurgical n'était pas connu pour une patiente.

Au niveau des traitements complémentaires à la chirurgie, un patient avait bénéficié de radiothérapie et un autre de chimiothérapie. Ce dernier avait aussi eu de la radiofréquence et de la curiethérapie.

| | Caractéristiques | Nombre | Pourcentage |
|---------------------------------------|-----------------------------|---------------|--------------------|
| Sexe | Femme | 13 | 46,4 |
| | Homme | 15 | 53,6 |
| Age | Moyen au diagnostic | 45,8 | |
| Localisation | Mandibulaire | 23 | 82,1 |
| | Maxillaire | 5 | 17,8 |
| Type histologique | Améloblastome conventionnel | 25 | 89,3 |
| | Améloblastome métastatique | 2 | 7,1 |
| | Carcinome améloblastique | 1 | 3,6 |
| Type de traitement chirurgical | Conservateur | 14 | 51,9 |
| | Radical non interrupteur | 3 | 11,2 |
| | Radical interrupteur | 10 | 37,0 |
| Traitement complémentaire | Radiothérapie | 1 | 3,7 |
| | Chimiothérapie | 1 | 3,7 |
| | Autre | 1 | 3,7 |

Tableau 2. Caractéristiques clinico-histopathologiques de l'ensemble des patients.

3.2 Analyse de la mutation BRAF

3.2.1 Immunohistochimie BRAF

Nous avons obtenu une positivité cytoplasmique de 39,3% de nos cas. Cela représentait 11 cas sur 28 (figure 34). Un témoin positif servait de contrôle. La confirmation de cette positivité a été obtenue avec la biologie moléculaire chez 100% des patients positifs en immunohistochimie.

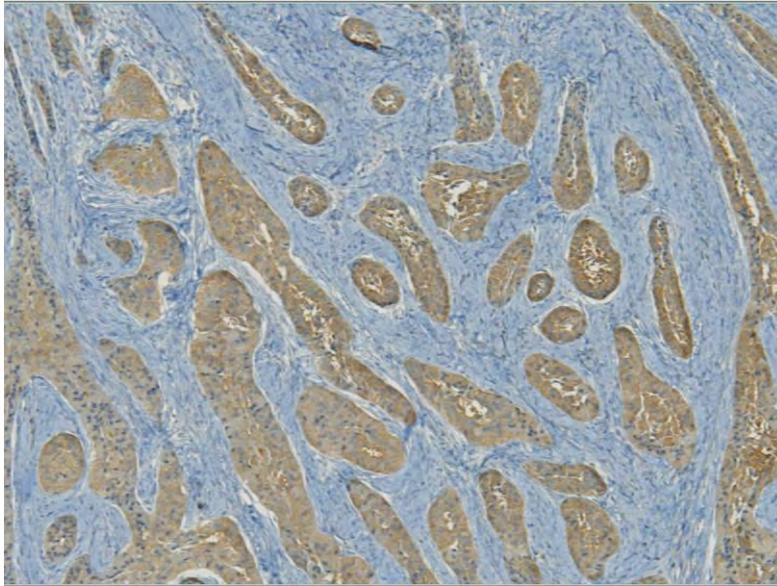


Figure 34. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-BRAF.

Dix-sept cas étaient négatifs en immunohistochimie. Deux de nos cas négatifs étaient positifs en biologie moléculaire. *La validité intrinsèque de l'immunohistochimie BRAF est présentée tableau 3.*

| | Cas mutés | Cas non mutés |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Cas immunohistochimie BRAF + | Vrais positifs = 100% | Faux positifs = 0% |
| Cas immunohistochimie BRAF - | Faux négatifs = 20,0% | Vrais négatifs = 80 % |
| | Sensibilité = 83,3% | Spécificité = 100% |

Tableau 3. Validité intrinsèque de l'immunohistochimie BRAF.

Nous n'avons pas pu prouver l'absence de mutation BRAFV600 sur sept de nos cas négatifs en immunohistochimie du fait de la dégradation du matériel après décalcification par acide chlorhydrique ou nitrique.

3.2.2 Biologie moléculaire de BRAF

Nous avons **61,9%** de cas mutés BRAFV600E dans notre cohorte. Sept cas négatifs n'étaient pas analysables en biologie moléculaire du fait de la décalcification par acide chlorhydrique ou acide nitrique. Nous avons donc 13 cas mutés sur 21 amplifiables.

Nous avons recherché la mutation BRAFV600 par trois techniques différentes : HRM, technologie TaqMan et pyroséquençage.

Tout d'abord, nous avons réalisé pour chaque patient une HRM. Ensuite, pour chaque patient muté, au moins une autre technique a été réalisée pour confirmer le résultat de l'HRM. Pour les patients non mutés en HRM, aucune autre technique n'a été réalisée.

Résultats obtenus par PCR en temps réel et HRM.

C'est la méthode qui permet de détecter si une mutation est présente dans la région d'intérêt.

Dans un premier temps, pour chaque cas, nous avons réalisé une courbe d'amplification (figure 35). La fluorescence était proportionnelle à la quantité d'ADN formée pour les 21 cas amplifiables.

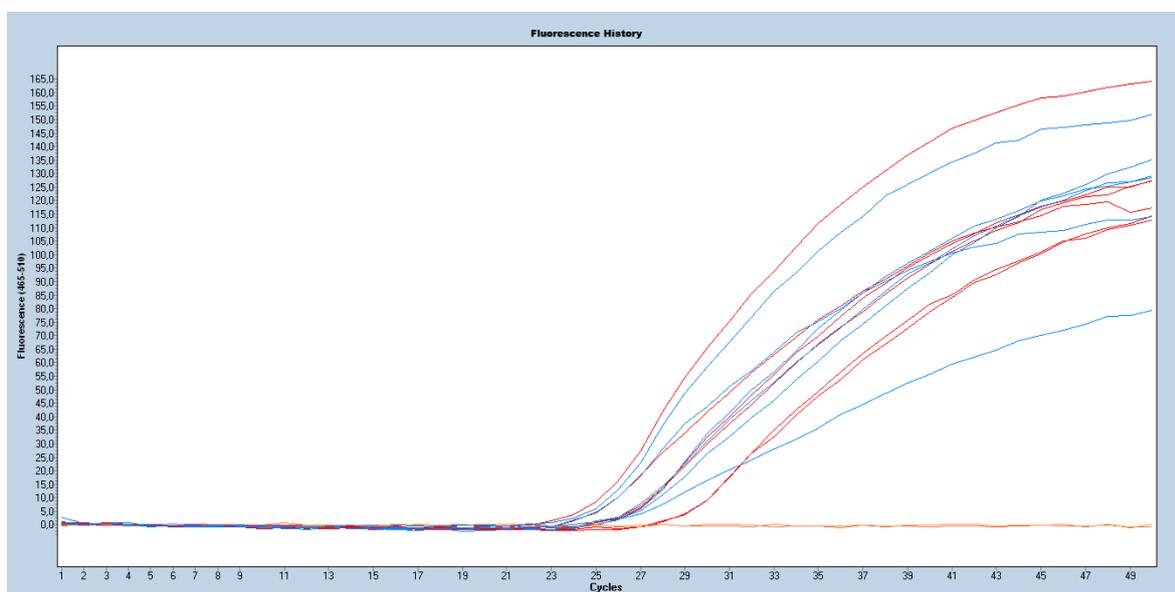


Figure 35. Courbe d'amplification dans le cadre de l'HRM.

Met en évidence la fluorescence en fonction du nombre de cycle, indiquant que la technique a bien fonctionné, Grand D.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une courbe de fusion qui résultait de l'HRM (figure 36). Lorsque la mutation était présente, pour 13 cas, on observait deux courbes différentes. Un des 13 cas a été considéré comme douteux. Pour ce cas, une recherche secondaire en pyroséquençage et non TaqMan a été réalisée. Le pyroséquençage permet de trouver toutes les différentes mutations présentes au niveau du codon 600, pas seulement la

mutation BRAFV600E. De plus, cette technique est effectuée en double, ce qui permet de vérifier les résultats obtenus.

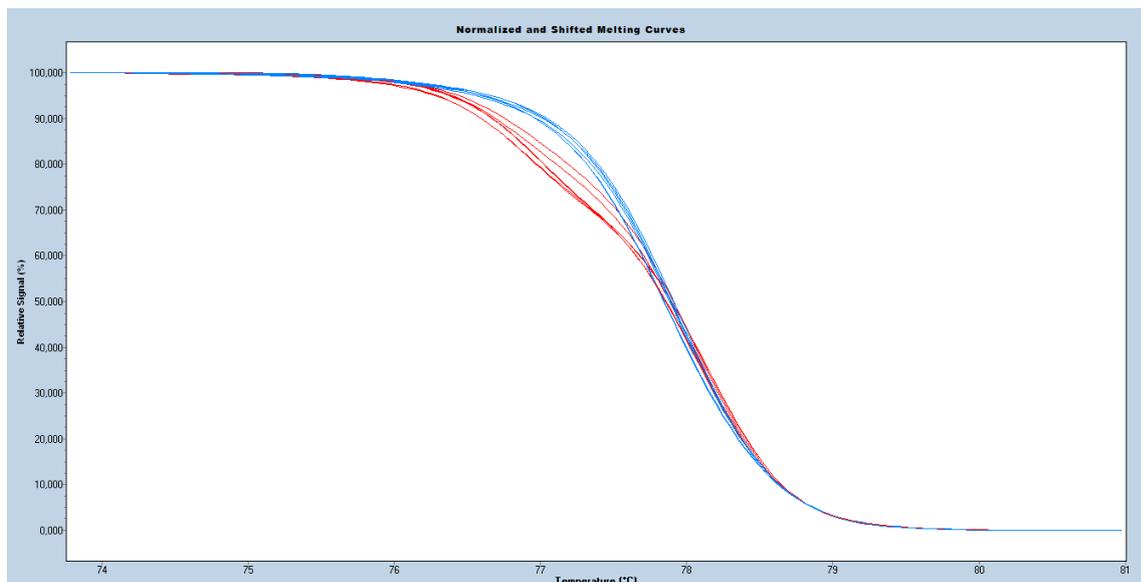


Figure 36. Courbe de fusion HRM.

Met en évidence la fluorescence en fonction de la température. En rouge les séquences mutées et en bleu les non mutées, Grand D.

Résultats obtenus par la méthode Taqman.

Pour 12 des 13 cas mutés en HRM, une recherche de mutation par technologie TaqMan a été réalisée. C'est la méthode qui recherche de façon spécifique la mutation BRAFV600E. Pour nos 12 cas mutés en HRM, nous avons obtenu deux nuages de points prouvant la BRAFV600E (figure 37). Un des 12 cas a été considéré comme douteux. Pour ce cas, une recherche tertiaire en pyroséquençage a été réalisée.

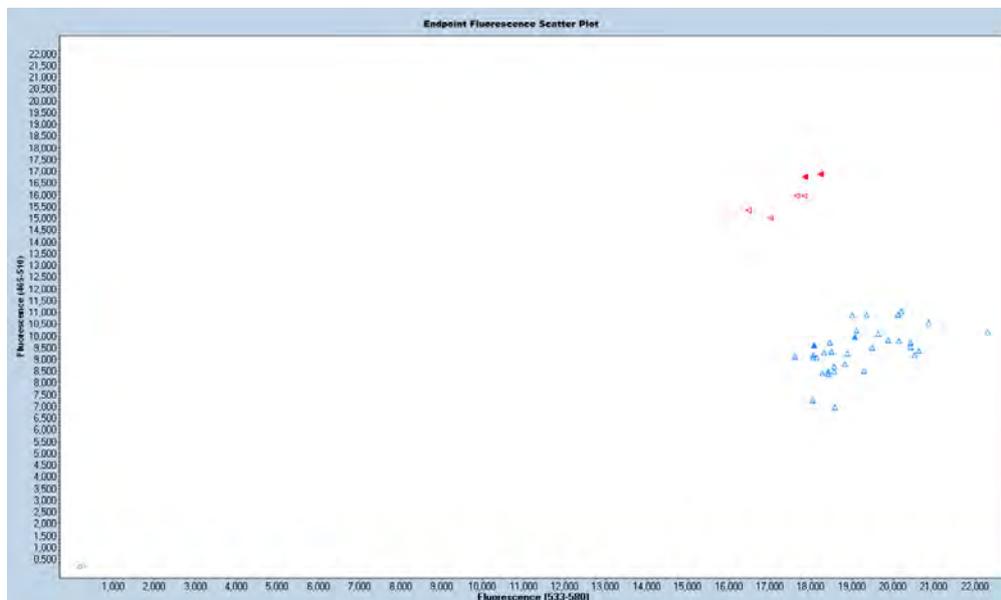


Figure 37. Nuages de points résultant de la technologie TaqMan.

Met en évidence la fluorescence des séquences mutées et non mutées. En rouge les mutés et en bleu les non mutés. En couleurs plus intenses, les témoins, Grand D.

Résultats obtenus par pyroséquence.

C'est la méthode qui permet de rechercher les différentes mutations BRAF de manière spécifique dont la V600E. Pour les deux patients mutés, une partie des séquences d'ADN possédaient une thymine (T) au lieu d'une adénine (A) en position 1799 au niveau du codon 600 (figure 38). Cette technique nous a donc permis de confirmer la positivité d'un cas douteux en HRM et d'un autre cas douteux en TaqMan.

Assay: BRAF codon 600
Sample ID: 17T055807

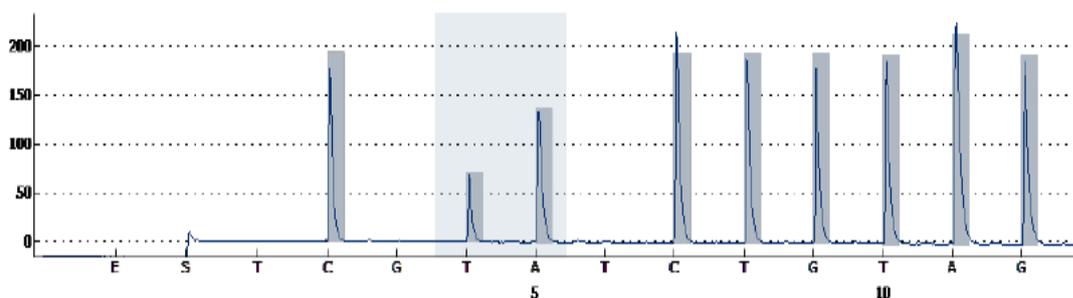


Figure 38. Cas BRAFV600E muté en pyroséquence.

Présence d'environ 30% de séquences ADN amplifiées présentant un nucléotide T et 60% présentant un nucléotide A, Grand D.

3.3 Immunohistochimies complémentaires

Les anticorps anti-CK5/6 et anti-CK14 étaient positifs dans 100% des cas. La positivité était très marquée pour tous nos cas au niveau du cytoplasme de la prolifération épithéliale. Pour les cas de sous-type folliculaire, la positivité était aussi marquée au centre qu'en périphérie des massifs épithéliaux. Le stroma était négatif dans 100% des cas (figures 39 et 40).

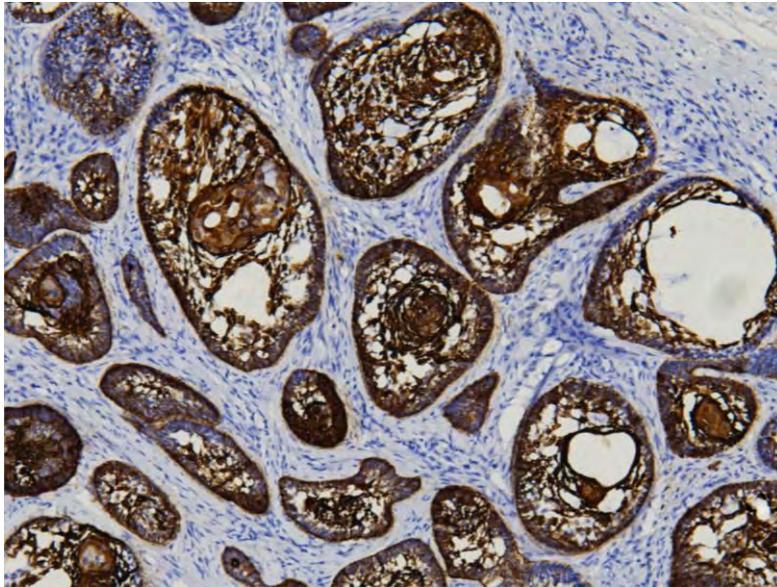


Figure 39. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK5/6.

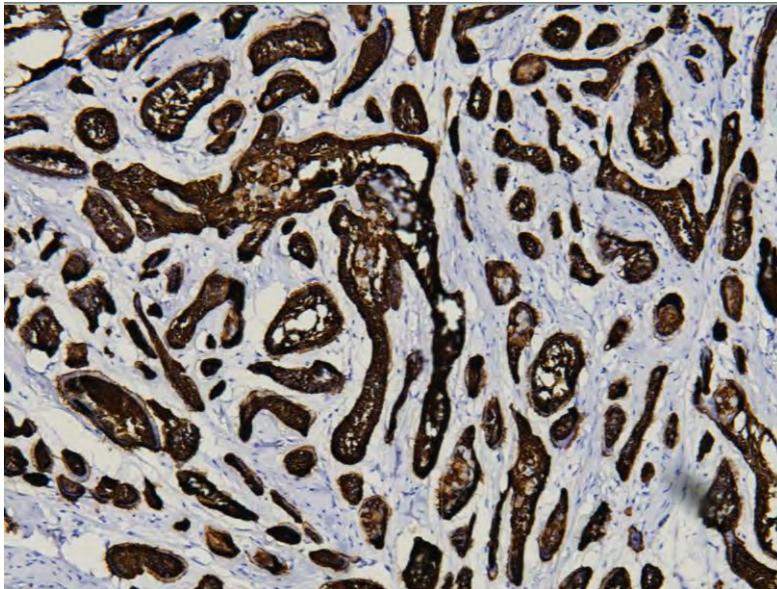


Figure 40. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK14.

L'anticorps anti-CK8/18 était positif dans 92,9% des cas au niveau du cytoplasme des cellules épithéliales tumorales (figure 41). En effet, un cas était négatif. Le stroma était quant à lui négatif.

La positivité de cet anticorps était moins marquée que la positivité des anticorps anti-CK5/6 et anti-CK14. Concernant le sous-type folliculaire, le centre des massifs épithéliaux était plus marqué que la périphérie palissadique.

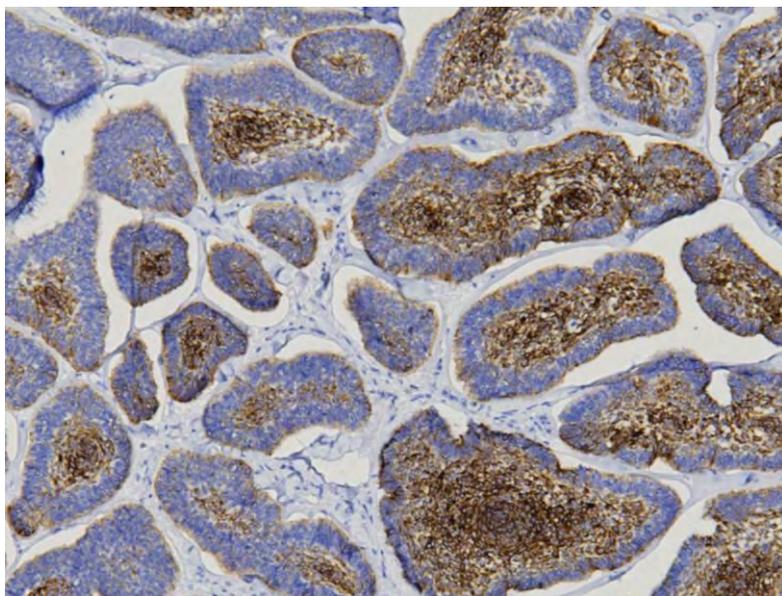


Figure 41. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-CK8/18.

L'anticorps anti-CD56 était positif dans 96,4% des cas. L'intensité de la positivité était marquée au niveau membranaire mais hétérogène au sein des différents massifs épithéliaux d'un même cas (figure 42).

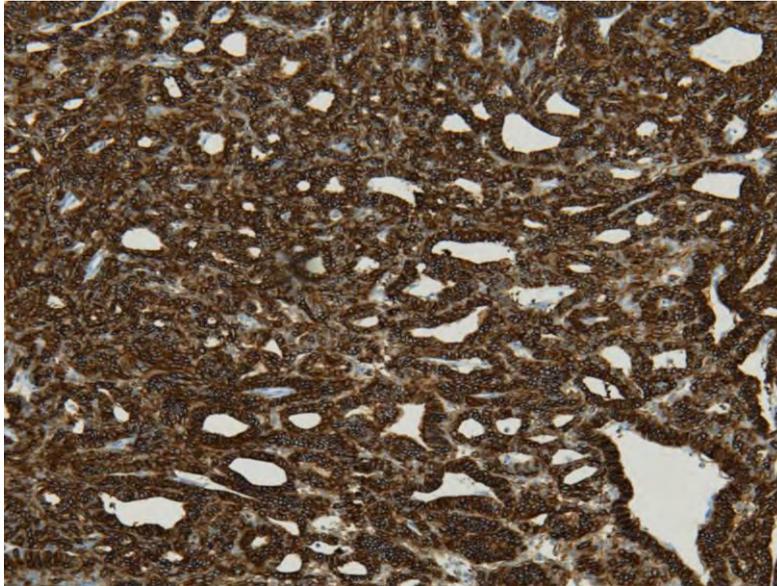


Figure 42. Cas avec marquage intense positif de l'anticorps anti-CD56.

L'anticorps anti-Cycline D1 était positif dans 96,4% des cas. L'ensemble des noyaux des massifs épithéliaux était marqué avec une intensité allant de moyenne à importante. Des noyaux du stroma étaient aussi marqués (figure 43).

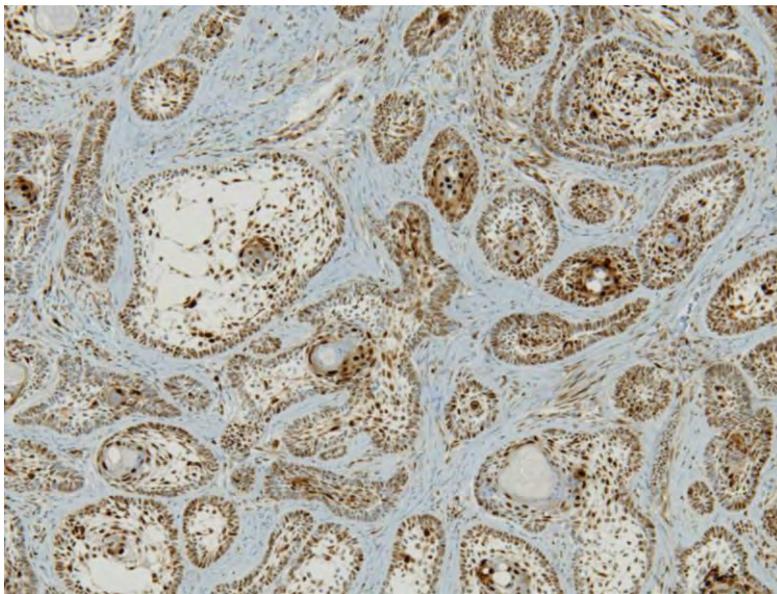


Figure 43. Cas avec marquage positif de l'anticorps anti-cycline D1.

Aucun des cas n'était marqué avec l'anticorps anti- β -caténine au niveau du noyau. Par contre, 82% des cas étaient positifs au niveau de la membrane et du cytoplasme des cellules des massifs tumoraux (figure 44).

Tous les cas étaient positifs avec l'anticorps anti-E-Cadhérine. Le marquage avec l'anti-E-Cadhérine était similaire au marquage avec de l'anti- β -caténine lorsque l'anti- β -caténine était positive (figure 45).

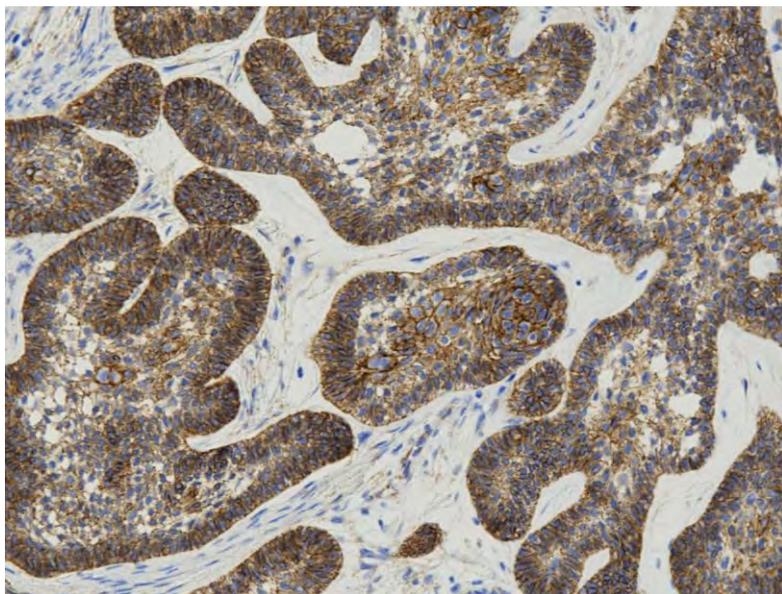


Figure 44. Cas avec marquage nucléaire négatif de l'anticorps β -caténine. Présence d'un marquage membranaire et cytoplasmique positif.

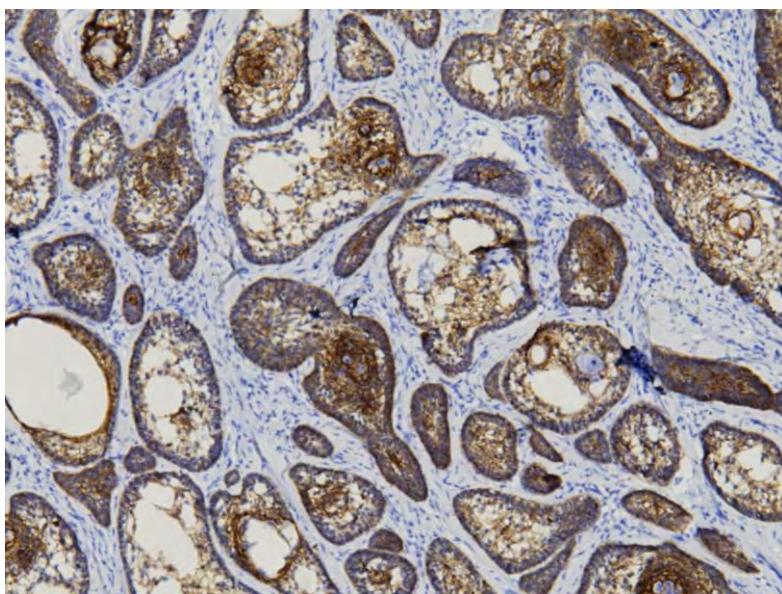


Figure 45. Cas avec marquage membranaire et cytoplasmique positif de l'anticorps anti-E-cadhérine, corrélé au marquage de l'anticorps β -caténine.

3.4 Analyse des mutations EZH2

La recherche des deux mutations, qui se situaient sur le gène EZH2, s'est avérée négative. Elles avaient été retrouvées initialement par la technique NGS RNAseq.

La mutation c. 148513869T>C, qui a pour conséquence le remplacement d'une valine par une alanine, p.V466A, et la mutation c. 148524298C>T, qui a pour conséquence le remplacement d'une sérine par une lysine, p.S229L, n'ont pas été retrouvées par les deux techniques réalisées : PCR en temps réel avec HRM et la méthode Sanger.

Les résultats du RNAseq étaient donc des faux positifs.

Résultats obtenus par PCR en temps réel et l'HRM.

Pour les deux mutations les résultats étaient similaires.

Dans un premier temps, on a réalisé une courbe d'amplification pour chaque cas. La technique a fonctionné pour les deux cas (figure 46).

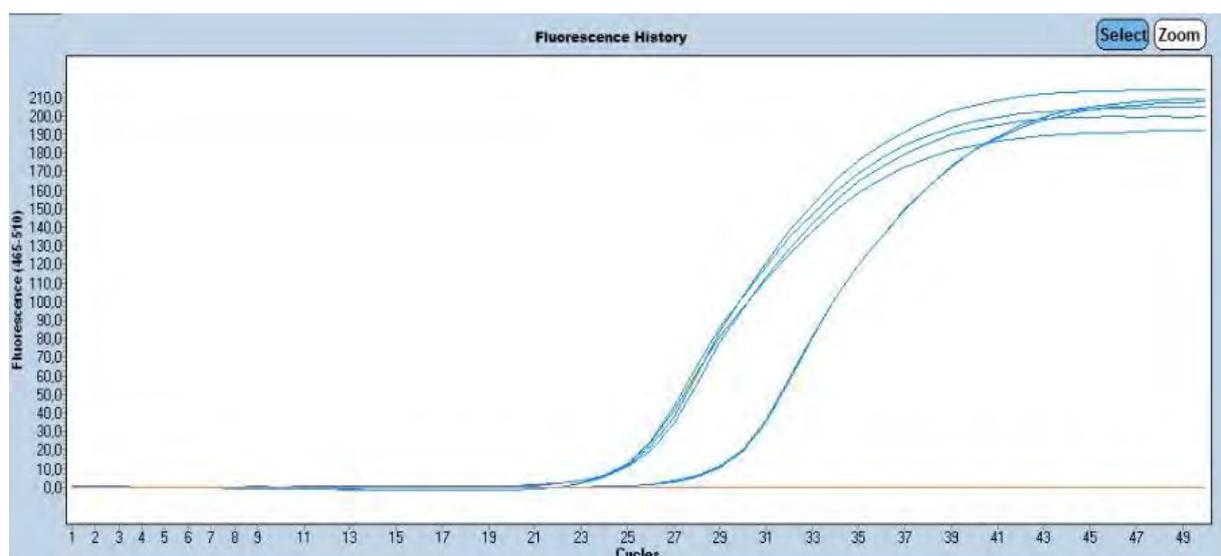


Figure 46. Courbe d'amplification dans le cadre de l'HRM.

Met en évidence la fluorescence en fonction du nombre de cycle, Grand D.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une courbe de fusion qui résultait de l'HRM. Pour les deux patients, une seule courbe de fusion était présente, ils n'étaient donc pas mutés (figure 47).

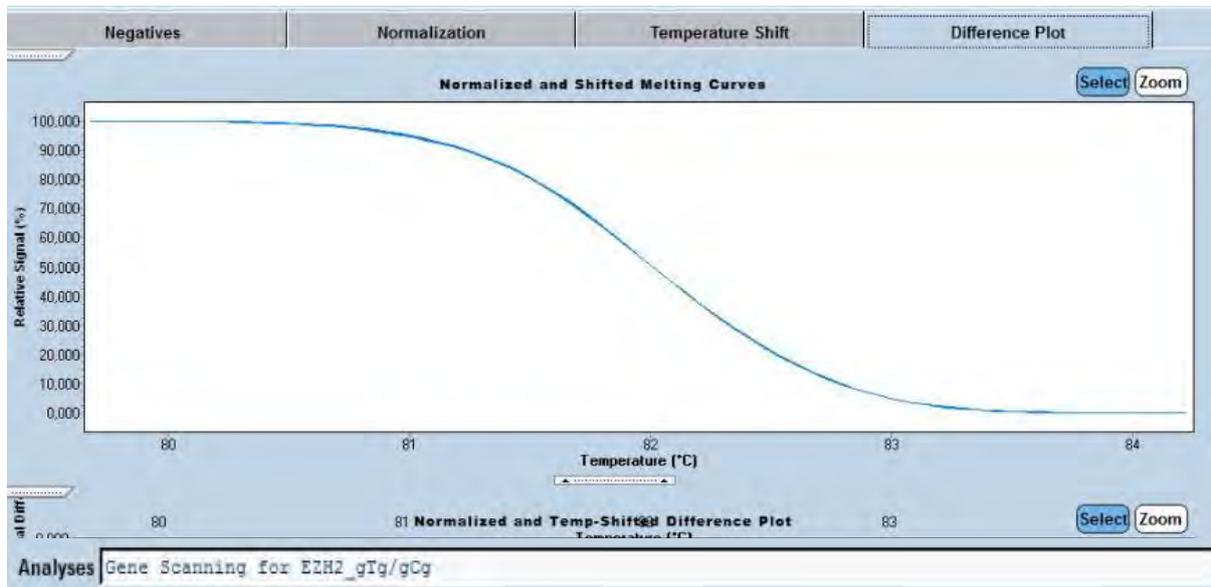


Figure 47. Courbe de fusion HRM.

Met en évidence la fluorescence en fonction de la température. Dans notre cas, nous n’avons obtenu qu’une seule courbe ; il n’y avait donc pas de mutation. Grand D.

Résultats obtenus par méthode Sanger

Pour les deux mutations les résultats étaient similaires.

L’enchaînement des nucléotides obtenu avec la méthode Sanger était le même que dans le gène EZH2 de référence sans mutation. Les deux patients n’avaient donc pas de mutation du gène EZH2 (figure 48).

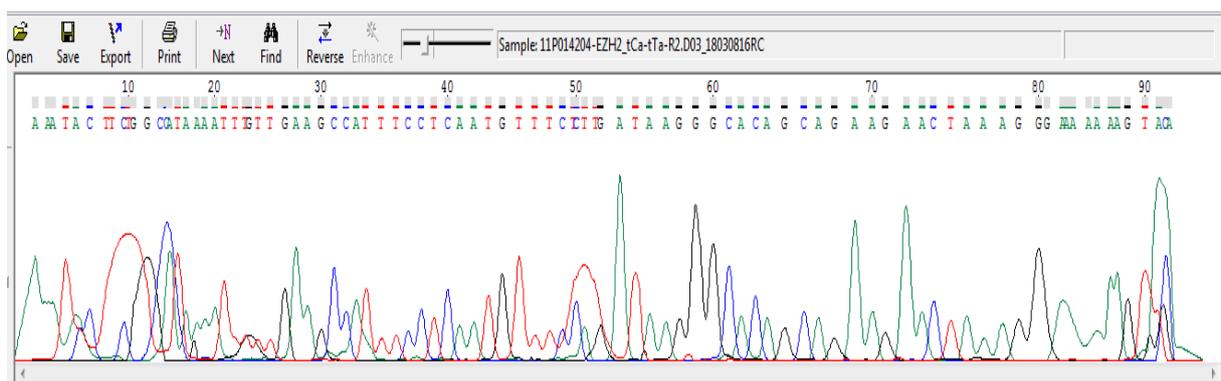


Figure 48. Electrophérogramme.

Séquence du patient identique à la séquence de référence, Grand D.

4. DISCUSSION

4.1 BRAF : étude immunohistochimie et en biologie moléculaire

Immunohistochimie

Deux cas négatifs en immunohistochimie, étaient mutés BRAF en biologie moléculaire, ce qui représente 20 % de cas faux négatifs. Une étude en biologie moléculaire est donc indispensable pour détecter de nouveaux cas mutés.

A contrario, 100% des cas positifs en immunohistochimie étaient retrouvés mutés en biologie moléculaire. Le taux de faux positif était de 0%. L'étude en biologie moléculaire des cas positifs n'est donc pas indispensable.

Des résultats similaires sont rapportés dans la littérature. Kurppa et al ⁷⁴ a retrouvé une mutation BRAF en biologie moléculaire par technique Sanger, alors que l'expression en immunohistochimie de BRAF de ce même cas était négative. Ce cas avait été décalcifié par acide chlorhydrique. L'étude de Brown et al montrait une concordance de 100% entre l'évaluation moléculaire et le statut immunohistochimique de BRAF¹¹ mais aucun des améloblastomes étudiés n'avait été décalcifié.

Analyse moléculaire de BRAF

Nous avons rapportés dans notre série que **61,9%** de nos cas étaient mutés BRAFV600E, en accord avec les données de la littérature, avec 25% des cas non évaluables en biologie moléculaire du fait de la décalcification. L'étude de Gültekin et al retrouvait un taux de 60% de mutation BRAFV600E par NGS (34 cas sur 62), avec 18,4% non évaluables (14/76)¹³. L'étude de Brown et al indiquait un taux de mutation BRAFV600E, évalué par méthode Sanger, de 62%. (31/50¹¹). Enfin, l'étude de Kurppa et al signalait 63% de cas BRAFV600E mutés en Sanger (15/24)⁷⁴.

Notre étude pose le problème de l'analyse en biologie moléculaire des cas décalcifiés par acide chlorhydrique ou nitrique. En effet, ces solutions sont à base d'acides forts. Elles sont délétères pour les acides nucléiques et les protéines. Les solutions à base d'acide formique, appelée aussi méthanoïque, qui est un acide faible, semblent moins délétères.

En effet, une étude multicentrique française réalisée par le GFPO (groupe français des pathologistes osseux) a évalué l'impact de la décalcification par différents acides (formique,

chlorhydrique, nitrique) sur la préservation des acides nucléiques et sur la préservation protéique. Il a été clairement démontré qu'une décalcification à l'acide formique permettait une meilleure préservation des acides nucléiques et des protéines par rapport à une décalcification à l'acide chlorhydrique¹³⁵. Le seul avantage de l'acide chlorhydrique par rapport à l'acide formique était, un temps de décalcification 2 à 3 fois plus court. Aucun impact sur la morphologie cellulaire n'avait été noté entre les différents acides.

La décalcification par acide fort induisait une perte de marquage pour la plupart des anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires, alors qu'ils étaient conservés dans les mêmes prélèvements décalcifiés par l'acide formique. Les marquages par les anticorps dirigés contre les antigènes membranaires ou cytoplasmiques étaient, pour la plupart, conservés quel que soit le décalcifiant utilisé. Ceci a été confirmé par d'autres études^{136 137}. Cela pourrait expliquer l'absence de cas positif au niveau nucléaire avec l'anticorps anti- β -caténine dans notre étude.

Ceci laisse entrevoir, sur ces tissus, la possibilité d'une meilleure analyse en biologie moléculaire. Dans notre laboratoire, nous avons donc récemment introduit des solutions à base d'acide formique.

4.2 Immunohistochimies complémentaires

Les résultats des différentes immunohistochimies étaient globalement comparables à ceux de la littérature.

Concernant les anticorps anti-cytokératines CK5/6, CK 14, CK8/18, nous avons un taux de positivité de 100% pour les deux premiers et de 92,9% pour l'anticorps anti-CK8/18.

Les cytokératines sont les constituants des filaments intermédiaires de kératine, que l'on retrouve spécifiquement dans les tissus épithéliaux. Elles sont positives dans les améloblastomes^{138 139}.

Une étude montrait que la CK5 est plus intensément exprimée au niveau de l'épithélium central stellaire des améloblastomes, tandis que la CK14 était positive de manière diffuse. La CK8 était quant à elle négative¹⁴⁰. Notre anti-CK8 était couplé à l'anti-CK18, ce qui ne permettait pas d'étudier l'anti-CK8 seul.

Concernant l'anticorps anti-CD56, nous avons un taux de positivité de 96,4%. Dans la littérature, des études ont mentionné des taux de positivité de 97%, 91% et de 74% de l'anti-CD56 dans les améloblastomes^{141 142 143}.

CD56 appelée aussi NCAM, est une glycoprotéine exprimée sur la surface de plusieurs types cellulaires tels que les neurones et les lymphocytes NK. Elle est impliquée dans l'adhérence cellulaire et est essentielle dans le développement du système nerveux central et intervient dans le développement de la dent par le biais de l'ectomésenchyme¹⁴¹.

L'expression de CD56 était membranaire. Le marquage était intense mais hétérogène en terme de positivité au sein d'un même cas. De plus, dans certaines zones tumorales des cas de sous-type folliculaire, les cellules périphériques étaient marquées, contrairement aux cellules du réticulum stellaire.

La positivité de CD56 n'est pas exclusive aux améloblastomes, dans l'étude des tumeurs odontogènes. En effet, une étude a rapporté une positivité de 50% dans les kératokystes¹⁴³.

Concernant l'anticorps anti-cycline D1, nous avons un taux de positivité de 96,4%.

La cycline D1 est codée par le gène CCND1. Elle est dérégulée dans de nombreux cancers¹⁴⁴. Les cyclines sont des régulateurs de cdk. Le complexe cycline D1/cdk intervient dans le cycle cellulaire à la phase G1. Il inhibe pRb par phosphorylation, permettant aux facteurs de transcription E2F de transcrire les gènes requis pour l'entrée dans la phase S. Le pRb inactif permet la progression du cycle cellulaire à travers la transition G1 / S et donc la synthèse de l'ADN.

Dans la littérature, une étude décrivait 79,5% de cas positifs (31/39) avec l'anticorps anti-cycline D1¹⁴⁵. L'expression de la cycline D1 était soit nucléaire (2/31), soit nucléaire et cytoplasmique (19/31) soit cytoplasmique (10/31). Dans notre étude la positivité de l'anti-Cycline D1 était nucléaire. Parfois, le cytoplasme était très faiblement marqué mais le caractère réellement positif de ce marquage cytoplasmique était difficile à affirmer.

Concernant l'anticorps anti- β -caténine, nous avons un taux de positivité de 0% au niveau du noyau et de 82% au niveau du cytoplasme et de la membrane. Dans la littérature, une étude retrouvait une expression nucléaire de la β -caténine de 61%¹⁴⁶. Une deuxième étude a rapporté une positivité cytoplasmique de 30 cas d'améloblastomes sur 30 et une positivité nucléaire de 8 cas sur 30. La décalcification pourrait expliquer l'absence de positivité nucléaire dans notre étude.

La β -caténine est exprimée dans la muqueuse orale normale, sans expression aberrante dans le cytoplasme et le noyau¹⁴⁷. En effet, l'expression normale de la β -caténine dans la cellule est

membranaire. Cette protéine intervient dans le développement dentaire via la voie Wnt¹⁴⁶. La β -caténine se lie à des protéines d'adhérences nommées cadhérines, tel que l'E-cadhérine, au niveau des jonctions cellulaires, ce qui explique que leur marquage est similaire. Une étude montre une absence de différence d'expression de la β -caténine et de l'E-cadhérine dans les améloblastomes et le tissu dentaire¹⁴⁸.

L'excès de β -caténine produit est constamment dégradé par le protéasome. En cas de dérégulation, l'excès de β -caténine cytoplasmique est transporté vers le noyau et s'associe à des facteurs de transcription. Cela permet l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles. Le plus souvent en cancérogénèse, c'est la mutation du gène APC qui entraîne une dérégulation de la voie Wnt¹⁴⁹.

Trois mutations différentes de l'exon 3 de CTNNB1 sur trois cas différents d'améloblastomes ont été décrites dans la littérature¹⁵⁰. CTNNB1 étant le gène de la protéine β -caténine.

La différence constatée entre l'expression nucléaire élevée de la β -caténine et le faible nombre de mutation du gène CNNT1 retrouvé est contradictoire. L'accumulation de β -caténine est probablement secondaire à une autre mutation que celle du gène de la β -caténine.

4.3 Analyse des mutations EZH2 : limites de l'approche NGS (RNAseq)

Dans la littérature, aucune mutation du gène EZH2 n'a été décrite dans les améloblastomes ou les autres tumeurs odontogènes.

La confirmation des résultats du NGS RNAseq s'est avérée négative. En effet, ceux-ci n'ont pas été retrouvés par deux techniques de biologie moléculaire différentes. Les deux mutations n'étaient donc en réalité pas présentes chez les deux patients.

La méthode Sanger était adaptée dans notre situation puisque nous n'avions que 2 patients avec deux régions cibles dans le même gène. Le NGS, qui permet un séquençage massif d'un grand nombre de patient et d'un grand nombre de gène, n'était pas adapté dans notre cas.

La deuxième technique utilisée était l'HRM. Les mutations recherchées étant inconnues, les sondes TaqMan n'ont pas été envisagées.

Limites des résultats RNAseq

Ce qui permet d'expliquer les faux résultats du RNAseq est une erreur d'amplification.

Erreur d'amplification lors de l'étape de PCR

Lors de cette étape, un nucléotide peut être remplacé par un autre. En effet, la PCR permet de recopier un grand nombre de fois un fragment d'ARN ou d'ADN d'intérêt. Si cette erreur intervient lors des premiers cycles de PCR, le fragment comportant l'erreur va être amplifié un grand nombre de fois, au même titre que le fragment sans erreur. Cette erreur va entraîner la présence dans le milieu réactionnel, de deux fragments différents, celui que l'on souhaitait recopier au départ et celui avec l'erreur. Ce dernier va être interprété comme la présence d'une mutation. Cette situation est la plus probable puisque la mutation a été retrouvée sur des fragments de même taille.

Nos résultats soulèvent le problème de la fiabilité et des limites des études en RNAseq, et montre qu'une technique doit toujours être contrôlée par une autre.

Profondeur et couverture de lecture de la technique RNAseq.

Deux critères fondamentaux permettent d'évaluer la qualité des données de séquençage à haut débit. Ces deux critères sont la profondeur et la couverture.

La profondeur est le nombre de lectures (ou reads). Il est recommandé une profondeur minimum de 20X, selon les recommandations de l'European Society of Human Genetic (ESHG)^{151 152}.

La notion de couverture correspond au pourcentage de bases effectivement séquencées par rapport au nombre total de bases ciblées au départ.

La qualité globale de l'analyse sera donc appréciée par le pourcentage de couverture pour une profondeur minimale fixée ou pour une profondeur moyenne (figure 49).

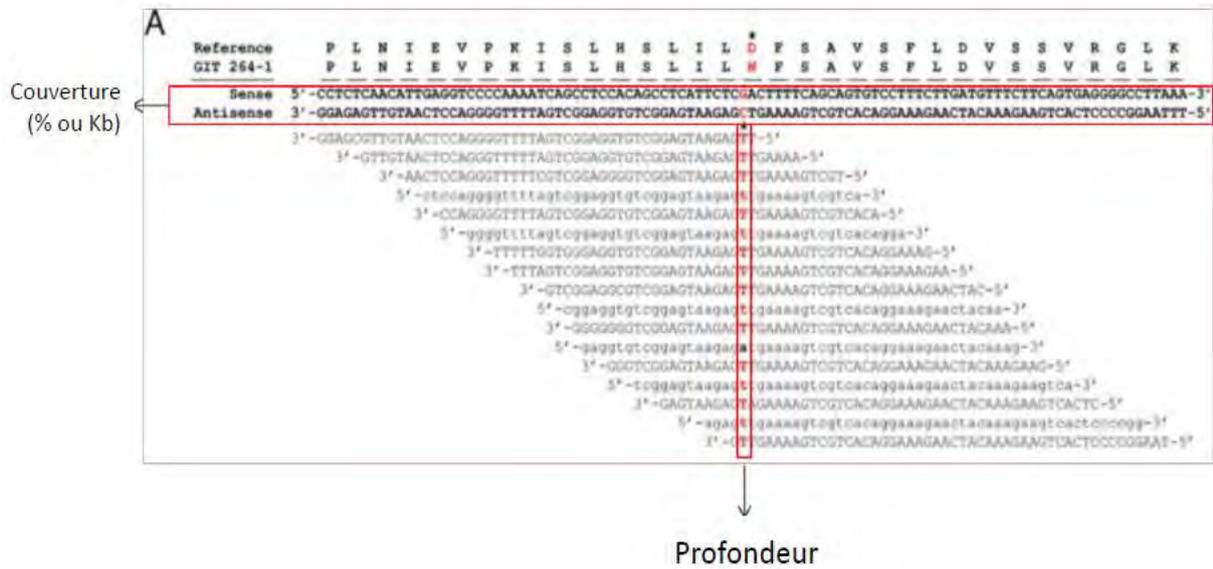


Figure 49. Notion de profondeur et de couverture, Pr E. Uro-Coste, D. Grand.

Pour nos deux patients, les profondeurs de lecture étaient assez faibles. En effet, elles étaient respectivement de 15 et 16X. Les erreurs d'amplification ont donc été artificiellement augmentées car 4 copies mutées ont été trouvées pour chacun des patients. Ce qui représente des taux de 27% et 25% de mutations.

Les couvertures étaient quant à elles complètes.

4.4 Ethique et NGS

Le NGS pose des problèmes éthiques et sociétaux. En effet, lors du séquençage à haut débit, on obtient des millions de reads pour chaque échantillon. Ceux-ci sont ensuite alignés informatiquement sur le génome de référence, c'est ce qu'on appelle le mapping. On se trouve confronté à des variants décrits comme étant pathogènes, mais dans des gènes que l'on ne souhaitait pas forcément explorer. Les résultats récents d'exploitation des données du projet 1000 Genomes par exemple, montrent qu'un individu considéré comme exempt de toute pathologie porte entre 40 et 110 variants classés comme potentiellement pathogènes à l'issue de l'analyse, sans que cela soit toujours explicable dans l'état actuel des connaissances¹⁵³.

4.5 Autres mutations décrites dans les améloblastomes

BRAF est la mutation la plus décrite dans les améloblastomes mais d'autres mutations ont été décrites. Les mutations du gène SMO, intervenant de la voie sonic hedgehog, sont les

deuxièmes atteintes les plus décrites dans la littérature. Enfin, des effecteurs autres que BRAF de la voie MAPK sont aussi mutés.

Deux études ont rapportées des mutations du gène SMO, respectivement à 39% et 14%^{12 13}. Dans ces deux études, les atteintes BRAF et SMO sont mutuellement exclusives. Les mutations SMO sont significativement plus fréquentes dans les améloblastomes de localisation maxillaire (75%), tandis que les BRAFV600E sont significativement plus fréquentes dans les améloblastomes de localisation mandibulaire (97,1%)¹³. De plus, les patients BRAF mutés sont plus jeunes que les patients SMO mutés (42 ans vs 67 ans)¹³. Ensuite, les mutations de SMO touchent plus les hommes que les femmes, contrairement aux mutations BRAF, avec un sex-ratio homme/femme de 7/1 vs 1,6/1¹³. Les améloblastomes BRAF mutés ont un risque diminué de récurrence contrairement aux améloblastomes SMO mutés, qui ont un risque augmenté¹². Dans notre étude, un cas BRAF muté concernait un améloblastome de localisation maxillaire et 12 cas concernaient des améloblastomes de localisation mandibulaire.

Devant la présence importante de cas SMO mutés, il serait intéressant d'étudier les thérapies ciblant SMO et la voie sonic hedgehog dans les améloblastomes. Actuellement, une seule publication a montré des effets neutralisants *in vitro* avec des anticorps anti-SHH sur des modèles cellulaires d'améloblastomes¹³³.

Le fait que BRAF et SMO soient mutuellement exclusives, suggère, qu'il y a deux voies étiogéniques dans les améloblastomes.

D'autres gènes de la voie MAPK sont mutés. Sweeney, R. T. *et al* ont rapportés dans quatre améloblastomes, des mutations de KRAS (15%) et cinq mutations de FGFR2 (19%)¹². Brown, N. A. *et al* a retrouvé des atteintes de KRAS, HRAS, NRAS et FGFR, respectivement dans 8%, 6%, 6% et 6% des cas¹¹. Les mutations de la voie MAPK sont mutuellement exclusives des mutations BRAF^{11 12 13}. Ils pourraient être aussi utilisés comme cible thérapeutique.

Enfin, des atteintes de PIK3CA, PTEN, CDKN2A, SMARCB1 et CTNNB1, non exclusives de la voie des MAPK ont été retrouvées à un faible pourcentage^{11 13}.

5. CONCLUSION

L'améloblastome est une tumeur épithéliale odontogène bénigne, principalement intra-osseuse, de localisation mandibulaire et maxillaire. L'améloblastome est caractérisé par une agressivité locale et une tendance à la récurrence. La chirurgie est le traitement de référence.

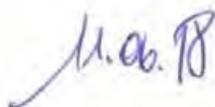
Dans notre cohorte toulousaine comportant 28 améloblastomes, nous avons étudié l'expression en immunohistochimie de BRAF et recherché la présence de la mutation BRAFV600 par trois techniques de biologie moléculaire différentes : HRM, technologie TaqMan et pyroséquençage. Onze cas sur les 28 étudiés (39,3%) présentaient une expression de BRAF en immunohistochimie et 13 cas sur 21 (61,9%) présentaient une mutation BRAFV600E, en biologie moléculaire. L'étude en biologie moléculaire a permis de rectifier la négativité des résultats en immunohistochimie pour 2 cas, soulignant l'intérêt de l'étude en biologie moléculaire pour les cas négatifs en immunohistochimie. A contrario, 100% des cas positifs en immunohistochimie étaient retrouvés mutés en biologie moléculaire. L'étude en biologie moléculaire des cas positifs n'est donc pas indispensable. Sept cas n'étaient pas analysables du fait de l'altération trop importante des acides nucléiques extraits liée à la décalcification, en biologie moléculaire, renforçant les difficultés d'analyse des échantillons décalcifiés, et incitant à prélever un fragment de tumeur pour une conservation sous forme congelée.

Les deux mutations, qui se situaient sur le gène EZH2, initialement retrouvées par la technique NGS RNAseq, n'ont pas été retrouvées par des techniques de biologie moléculaire ciblées, prouvant que les résultats des techniques effectuées à haut débit doivent être contrôlés par d'autres approches moléculaires pour validation définitive.

Ainsi, la présence de la mutation BRAF dans les améloblastomes ouvre une perspective thérapeutique intéressante du fait de l'existence de traitement anti-BRAF. Ce traitement serait utilisé en alternative ou en complément de la chirurgie dans des améloblastomes inopérables.

Professeur Emmanuelle URO-COSTE
Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques
INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER
1 Avenue Irène Joliot Curie
31050 TOULOUSE CEDEX 9
Tél. 05 31 15 62 02

Vu permis d'imprimer
Le Doyen de la Faculté
De Médecine Ranguel



E. SERRANO

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO Classification of Head and Neck Tumors 4th Edition. (2017).
2. Buchner, A., Merrell, P. W. & Carpenter, W. M. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **64**, 1343–1352 (2006).
3. Hertog, D. & van der Waal, I. Ameloblastoma of the jaws: a critical reappraisal based on a 40-years single institution experience. *Oral Oncol.* **46**, 61–64 (2010).
4. Intapa, C. Analysis of Prevalence and Clinical Features of Ameloblastoma and its Histopathological Subtypes in Southeast Myanmar and Lower Northern Thailand Populations: A 13-Year Retrospective Study. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **11**, ZC102–ZC106 (2017).
5. Singh, M. *et al.* Treatment algorithm for ameloblastoma. *Case Rep. Dent.* **2014**, 121032 (2014).
6. Becelli, R., Carboni, A., Cerulli, G., Perugini, M. & Iannetti, G. Mandibular ameloblastoma: analysis of surgical treatment carried out in 60 patients between 1977 and 1998. *J. Craniofac. Surg.* **13**, 395–400; discussion 400 (2002).
7. Hertog, D., Bloemena, E., Aartman, I. H. A. & van-der-Waal, I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. *Med. Oral Patol. Oral Cirurgia Bucal* **17**, e76-82 (2012).
8. Fulco, G. M., Nonaka, C. F. W., Souza, L. B. de, Miguel, M. C. da C. & Pinto, L. P. Solid ameloblastomas - Retrospective clinical and histopathologic study of 54 cases. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **76**, 172–177 (2010).
9. Reichart, P. A., Philipsen, H. P. & Sonner, S. Ameloblastoma: Biological profile of 3677 cases. *Eur. J. Cancer. B. Oral Oncol.* **31**, 86–99 (1995).
10. Dhanuthai, K. *et al.* Ameloblastoma: a multicentric study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **113**, 782–788 (2012).
11. Brown, N. A. *et al.* Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 5517–5526 (2014).
12. Sweeney, R. T. *et al.* Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat. Genet.* **46**, 722–725 (2014).
13. Gültekin, S. E. *et al.* The landscape of genetic alterations in ameloblastomas relates to clinical features. *Virchows Arch.* 1–8 (2018). doi:10.1007/s00428-018-2305-5
14. Masthan, K. M. K., Anitha, N., Krupaa, J. & Manikkam, S. Ameloblastoma. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **7**, S167-170 (2015).
15. Morgan, P. R. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol. 2000* **57**, 160–176 (2011).
16. Siar, C. H., Lau, S. H. & Ng, K. H. Ameloblastoma of the jaws: a retrospective analysis of 340 cases in a Malaysian population. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **70**, 608–615 (2012).
17. Philipsen, H. P., Reichart, P. A. & Takata, T. Desmoplastic ameloblastoma (including ‘hybrid’ lesion of ameloblastoma). Biological profile based on 100 cases from the literature and own files. *Oral Oncol.* **37**, 455–460 (2001).

18. Heikinheimo, K. *et al.* Early dental epithelial transcription factors distinguish ameloblastoma from keratocystic odontogenic tumor. *J. Dent. Res.* **94**, 101–111 (2015).
19. Juuri, E., Isaksson, S., Jussila, M., Heikinheimo, K. & Thesleff, I. Expression of the stem cell marker, SOX2, in ameloblastoma and dental epithelium. *Eur. J. Oral Sci.* **121**, 509–516 (2013).
20. Georg, S. Actualisation des données acquises sur les améloblastomes et impact des études immunohistochimiques et de biologie moléculaire sur leur prise en charge diagnostique et thérapeutiques. (2017).
21. Vickers, R. A. & Gorlin, R. J. Ameloblastoma: Delineation of early histopathologic features of neoplasia. *Cancer* **26**, 699–710 (1970).
22. Philipsen, H. P. & Reichart, P. A. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncol.* **34**, 317–325 (1998).
23. Ackermann, G. L., Altini, M. & Shear, M. The unicystic ameloblastoma: a clinicopathological study of 57 cases. *J. Oral Pathol.* **17**, 541–546 (1988).
24. Hirschhorn, A. I., Vered, M., Buchner, A., Greenberg, G. & Yahalom, R. Unicystic ameloblastoma in an infant: A management dilemma. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **41**, e226–e230 (2013).
25. Lau, S. L. & Samman, N. Recurrence related to treatment modalities of unicystic ameloblastoma: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **35**, 681–690 (2006).
26. Leider, A. S., Eversole, L. R. & Barkin, M. E. Cystic ameloblastoma. A clinicopathologic analysis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **60**, 624–630 (1985).
27. Rosenstein, T., Pogrel, M. A., Smith, R. A. & Regezi, J. A. Cystic ameloblastoma—behavior and treatment of 21 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **59**, 1311–1316 (2001).
28. Li, T. J., Kitano, M., Arimura, K. & Sugihara, K. Recurrence of unicystic ameloblastoma: a case report and review of the literature. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **122**, 371–374 (1998).
29. Philipsen, H. P., Reichart, P. A., Nikai, H., Takata, T. & Kudo, Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. *Oral Oncol.* **37**, 17–27 (2001).
30. Vanoven, B. J., Parker, N. P. & Petruzzelli, G. J. Peripheral ameloblastoma of the maxilla: a case report and literature review. *Am. J. Otolaryngol.* **29**, 357–360 (2008).
31. Smullin, S. E., Faquin, W., Susarla, S. M. & Kaban, L. B. Peripheral desmoplastic ameloblastoma: report of a case and literature review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **105**, 37–40 (2008).
32. Moro, A. *et al.* Ameloblastic carcinoma of the maxilla: A case report and an updated review of the literature. *Oncol. Lett.* **12**, 4339–4350 (2016).
33. Rizzitelli, A., Smoll, N. R., Chae, M. P., Rozen, W. M. & Hunter-Smith, D. J. Incidence and Overall Survival of Malignant Ameloblastoma. *PLoS ONE* **10**, (2015).
34. Regezi, J. A., Kerr, D. A. & Courtney, R. M. Odontogenic tumors: analysis of 706 cases. *J. Oral Surg. Am. Dent. Assoc. 1965* **36**, 771–778 (1978).
35. Dissanayake, R. K. G., Jayasooriya, P. R., Siriwardena, D. J. L. & Tilakaratne, W. M. Review of metastasizing (malignant) ameloblastoma (METAM): pattern of metastasis and treatment. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **111**, 734–741 (2011).

36. Kunze, E., Donath, K., Luhr, H. G., Engelhardt, W. & De Vivie, R. Biology of metastasizing ameloblastoma. *Pathol. Res. Pract.* **180**, 526–535 (1985).
37. Laughlin, E. H. Metastasizing ameloblastoma. *Cancer* **64**, 776–780 (1989).
38. Slootweg, P. J. & Müller, H. Malignant ameloblastoma or ameloblastic carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **57**, 168–176 (1984).
39. Newman, L., Howells, G. L., Coghlan, K. M., DiBiase, A. & Williams, D. M. Malignant ameloblastoma revisited. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **33**, 47–50 (1995).
40. LI, J. *et al.* Ameloblastic carcinoma: An analysis of 12 cases with a review of the literature. *Oncol. Lett.* **8**, 914–920 (2014).
41. Kar, I. B., Subramanyam, R. V., Mishra, N. & Singh, A. K. Ameloblastic carcinoma: A clinicopathologic dilemma – Report of two cases with total review of literature from 1984 to 2012. *Ann. Maxillofac. Surg.* **4**, 70–77 (2014).
42. Ndukwe, K. C. *et al.* Ameloblastic Carcinoma: A Multicenter Nigerian Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **68**, 2111–2114 (2010).
43. Kruse, A. L., Zwahlen, R. A. & Grätz, K. W. New classification of maxillary ameloblastic carcinoma based on an evidence-based literature review over the last 60 years. *Head Neck Oncol.* **1**, 31 (2009).
44. Yoon, H.-J., Hong, S.-P., Lee, J.-I., Lee, S.-S. & Hong, S.-D. Ameloblastic carcinoma: an analysis of 6 cases with review of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **108**, 904–913 (2009).
45. Lei, Y. *et al.* Evaluation of SOX2 as a potential marker for ameloblastic carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **117**, 608-616.e1 (2014).
46. Bologna-Molina, R., Mosqueda-Taylor, A., Molina-Frechero, N., Mori-Estevez, A. D. & Sánchez-Acuña, G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **18**, e174–e179 (2013).
47. Sun, Z.-J., Wu, Y.-R., Cheng, N., Zwahlen, R. A. & Zhao, Y.-F. Desmoplastic ameloblastoma - A review. *Oral Oncol.* **45**, 752–759 (2009).
48. Lièvre, A. & Laurent-Puig, P. La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Dig Vol.* **2**, 38–42 (2010).
49. Payraastre, B. Notion de transduction du signal: voie de signalisation, seconds messagers, lipases kinases. (2014).
50. Yarden, Y. The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur. J. Cancer* **37**, 3–8 (2001).
51. Collins, M. A. *et al.* Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 639–653 (2012).
52. Imperial, R., Toor, O. M., Hussain, A., Subramanian, J. & Masood, A. Comprehensive Pancancer Genomic Analysis Reveal (RTK)-RAS-RAF-MEK as a key Dysregulated Pathway in Cancer: its Clinical Implications. *Semin. Cancer Biol.* (2017). doi:10.1016/j.semcancer.2017.11.016
53. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689 (1989).
54. Millington, G. W. M. Mutations of the BRAF gene in human cancer, by Davies *et al.* (Nature 2002; 417: 949-54). *Clin. Exp. Dermatol.* **38**, 222–223 (2013).

55. Morrison, D. K. & Cutler, R. E. The complexity of Raf-1 regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 174–179 (1997).
56. Ross, J. S. *et al.* The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *Int. J. Cancer* **138**, 881–890 (2016).
57. Davies, H. *et al.* Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. *Nature* **417**, 949 (2002).
58. Boussemart, L. Inhibiteurs de BRAF dans le traitements du cancer: Contribution de l'étude des mécanismes de résistance et des effets secondaires paradoxaux. (2014).
59. Ghorbani-Aghbolaghi, A. *et al.* An extremely rare case of concurrent BRAF V600E mutation driven hairy cell leukemia and melanoma: case report and review of literature. *Autopsy Case Rep.* **7**, 13–19 (2017).
60. Rauen, K. A. The RASopathies. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **14**, 355–369 (2013).
61. Huang, T., Karsy, M., Zhuge, J., Zhong, M. & Liu, D. B-Raf and the inhibitors: from bench to bedside. *J. Hematol. Oncol.* **6**, 30 (2013).
62. Pakneshan, S., Salajegheh, A., Smith, R. A. & Lam, A. K.-Y. Clinicopathological relevance of BRAF mutations in human cancer. *Pathology (Phila.)* **45**, 346–356 (2013).
63. Pollock, P. M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat. Genet.* **33**, 19–20 (2003).
64. Xing, M. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **12**, 245–262 (2005).
65. Grisham, R. N. *et al.* BRAF Mutation is associated with early stage disease and improved outcome in patients with low-grade serous ovarian cancer. *Cancer* **119**, 548–554 (2013).
66. Jones, D. T. W. *et al.* Oncogenic *RAF1* rearrangement and a novel *BRAF* mutation as alternatives to *KIAA1549:BRAF* fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene* **28**, 2119 (2009).
67. Lawson, A. R. J. *et al.* *RAF* gene fusions are specific to pilocytic astrocytoma in a broad paediatric brain tumour cohort. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **120**, 271–273 (2010).
68. Kadota, K. *et al.* KRAS Mutation Is a Significant Prognostic Factor in Early-stage Lung Adenocarcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **40**, 1579–1590 (2016).
69. Illei, P. B. *et al.* Clinical mutational profiling of 1006 lung cancers by next generation sequencing. *Oncotarget* **8**, 96684–96696 (2017).
70. Paik, P. K. *et al.* Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29**, 2046–2051 (2011).
71. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* **489**, 519–525 (2012).
72. Colombino, M. *et al.* BRAF and PIK3CA genes are somatically mutated in hepatocellular carcinoma among patients from South Italy. *Cell Death Dis.* **3**, e259 (2012).
73. Falini, B., Martelli, M. P. & Tiacci, E. BRAF V600E mutation in hairy cell leukemia: from bench to bedside. *Blood* **128**, 1918–1927 (2016).

74. Kurppa, K. J. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J. Pathol.* **232**, 492–498 (2014).
75. Zhang, J., Yang, P. L. & Gray, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 28–39 (2009).
76. Chapman, P. B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).
77. Boussemart, L. *et al.* Prospective study of cutaneous side-effects associated with the BRAF inhibitor vemurafenib: a study of 42 patients. *Ann. Oncol.* **24**, 1691–1697 (2013).
78. Sibaud, V., Lamant, L., Maisongrosse, V. & Delord, J.-P. [Adverse skin reactions induced by BRAF inhibitors: a systematic review]. *Ann. Dermatol. Venereol.* **140**, 510–520 (2013).
79. Long, G. V. *et al.* Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1877–1888 (2014).
80. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343–349 (2011).
81. Ding, X. *et al.* The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells Dev.* **23**, 931–940 (2014).
82. Cao, R. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**, 1039–1043 (2002).
83. Chaïb, H., Prébet, T., Vey, N. & Collette, Y. Histone méthyltransférases - Une nouvelle classe de cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer ? *médecine/sciences* **27**, 725–732
84. Arents, G. & Moudrianakis, E. N. The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11170–11174 (1995).
85. Viré, E. *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**, 871–874 (2006).
86. O’Meara, M. M. & Simon, J. A. Inner workings and regulatory inputs that control Polycomb repressive complex 2. *Chromosoma* **121**, 221–234 (2012).
87. Marchesi, I. & Bagella, L. Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation. *Chromatin Remodel.* (2013). doi:10.5772/55370
88. Tan, J., Yan, Y., Wang, X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2: biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* **35**, 161–174 (2014).
89. Kaneko, S. *et al.* Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* **24**, 2615–2620 (2010).
90. Kim, K. H. & Roberts, C. W. M. Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.* **22**, 128–134 (2016).
91. Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myeloid disorders. *Nat. Genet.* **42**, 722–726 (2010).
92. Nikoloski, G. *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene *EZH2* in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **42**, 665–667 (2010).
93. Khan, S. N. *et al.* Multiple mechanisms deregulate EZH2 and histone H3 lysine 27 epigenetic changes in myeloid malignancies. *Leukemia* **27**, 1301–1309 (2013).

94. Chen, J.-F. *et al.* EZH2 promotes colorectal cancer stem-like cell expansion by activating p21cip1-Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* **7**, 41540–41558 (2016).
95. Feinberg, A. P., Ohlsson, R. & Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 21–33 (2006).
96. Xu, K. *et al.* EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* **338**, 1465–1469 (2012).
97. Morin, R. D. *et al.* Somatic mutation of EZH2 (Y641) in Follicular and Diffuse Large B-cell Lymphomas of Germinal Center Origin. *Nat. Genet.* **42**, 181–185 (2010).
98. Bödör, C. *et al.* EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* **25**, 726–729 (2011).
99. Chase, A. & Cross, N. C. P. Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **17**, 2613–2618 (2011).
100. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–263 (2012).
101. Bachmann, I. M. *et al.* EZH2 Expression Is Associated With High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *J. Clin. Oncol.* **24**, 268–273 (2006).
102. Makishima, H. *et al.* Novel homo- and hemizygous mutations in *EZH2* in myeloid malignancies. *Leukemia* **24**, 1799–1804 (2010).
103. Weikert, S. *et al.* Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int. J. Mol. Med.* **16**, 349–353 (2005).
104. Arisan, S. *et al.* Increased expression of EZH2, a polycomb group protein, in bladder carcinoma. *Urol. Int.* **75**, 252–257 (2005).
105. Matsukawa, Y. *et al.* Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci.* **97**, 484–491 (2006).
106. Watanabe, H. *et al.* Deregulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. *Cancer Cell Int.* **8**, 15 (2008).
107. Sudo, T. *et al.* Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br. J. Cancer* **92**, 1754–1758 (2005).
108. Takawa, M. *et al.* Validation of the histone methyltransferase EZH2 as a therapeutic target for various types of human cancer and as a prognostic marker. *Cancer Sci.* **102**, 1298–1305 (2011).
109. Glazer, R. I. *et al.* 3-Deazaneplanocin: a new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 688–694 (1986).
110. Fiskus, W. *et al.* Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* **114**, 2733–2743 (2009).
111. Tan, J. *et al.* Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* **21**, 1050–1063 (2007).
112. Li, Z. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is a novel therapeutic target in tongue cancer. *Oncotarget* **4**, 2532–2549 (2013).

113. Daley, T. D., Wysocki, G. P. & Pringle, G. A. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **77**, 276–280 (1994).
114. Philipsen, H. P. & Reichart, P. A. Adenomatoid odontogenic tumour: facts and figures. *Oral Oncol.* **35**, 125–131 (1999).
115. Buchner, A. & Vered, M. Ameloblastic fibroma: a stage in the development of a hamartomatous odontoma or a true neoplasm? Critical analysis of 162 previously reported cases plus 10 new cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **116**, 598–606 (2013).
116. Philipsen, H. P., Reichart, P. A. & Praetorius, F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol.* **33**, 86–99 (1997).
117. Mosby, E. L., Russell, D., Noren, S. & Barker, B. F. Ameloblastic fibroma in a 7-week-old infant: a case report and review of the literature. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **56**, 368–372 (1998).
118. Johnson, N. R., Gannon, O. M., Savage, N. W. & Batstone, M. D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J. Investig. Clin. Dent.* **5**, 9–14 (2014).
119. Jones, A. V., Craig, G. T. & Franklin, C. D. Range and demographics of odontogenic cysts diagnosed in a UK population over a 30-year period. *J. Oral Pathol. Med.* **35**, 500–507 (2006).
120. Carlson, E. R. & Marx, R. E. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **64**, 484–494 (2006).
121. Jebblaoui, Y., Ben Neji, N., Haddad, S., Ouertatani, L. & Hchicha, S. [Algorithm for the treatment of ameloblastoma in Tunisia]. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **108**, 419–423 (2007).
122. Ord, R. The pathology and management of aggressive odontogenic tumours. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **47**, 340 (2009).
123. El Mazghi, A. *et al.* Rôle de la radiothérapie dans le traitement de l'améloblastome: à propos de deux cas. *Pan Afr. Med. J.* **19**, (2014).
124. Atkinson, C. H., Harwood, A. R. & Cummings, B. J. Ameloblastoma of the jaw. A reappraisal of the role of megavoltage irradiation. *Cancer* **53**, 869–873 (1984).
125. Iraqi, M. *et al.* Rôle de la radiothérapie dans le traitement des améloblastomes. [/data/revues/12783218/00120006/08002722/](#) (2008).
126. Chehal, A., Lobo, R., Naim, A. & Azinovic, I. Améloblastome du sinus maxillaire traité par radiothérapie. *Pan Afr. Med. J.* **26**, (2017).
127. Milman, T., Ying, G.-S., Pan, W. & LiVolsi, V. Ameloblastoma: 25 Year Experience at a Single Institution. *Head Neck Pathol.* **10**, 513–520 (2016).
128. Amzerin, M. *et al.* Metastatic ameloblastoma responding to combination chemotherapy: case report and review of the literature. *J. Med. Case Reports* **5**, 491 (2011).
129. Tan, S., Pollack, J. R., Kaplan, M. J., Colevas, A. D. & West, R. B. BRAF inhibitor treatment of primary BRAF-mutant ameloblastoma with pathologic assessment of response. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **122**, e5-7 (2016).

130. Kaye, F. J., Ivey, A. M., Drane, W. E., Mendenhall, W. M. & Allan, R. W. Clinical and Radiographic Response With Combined BRAF-Targeted Therapy in Stage 4 Ameloblastoma. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).
131. Mishra, P., Panda, A., Bandyopadhyay, A., Kumar, H. & Mohiddin, G. Sonic Hedgehog Signalling Pathway and Ameloblastoma – A Review. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **9**, ZE10–ZE13 (2015).
132. Gurgel, C. A. S. *et al.* Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J. Oral Pathol. Amp Med.* **43**, 619–626 (2014).
133. KANDA, S. *et al.* Anti-apoptotic role of the sonic hedgehog signaling pathway in the proliferation of ameloblastoma. *Int. J. Oncol.* **43**, 695–702 (2013).
134. Falque, M. EVOLUTION DES METHODES DE GENOTYPAGE. (2011).
135. Miquelstorena-Standley, E. & Gonzague de Pinieux. Principes de la décalcification, Académie Internationale de Pathologie, bulletin n° 63. (2016).
136. Maclary, S. C., Mohanty, S. K., Bose, S., Chung, F. & Balzer, B. L. Effect of Hydrochloric Acid Decalcification on Expression Pattern of Prognostic Markers in Invasive Breast Carcinomas: *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **25**, 144–149 (2017).
137. Gertych, A. *et al.* Effects of tissue decalcification on the quantification of breast cancer biomarkers by digital image analysis. *Diagn. Pathol.* **9**, (2014).
138. Fukumashi, K., Enokiya, Y. & Inoue, T. CYTOKERATINS EXPRESSION OF CONSTITUTING CELLS IN AMELOBLASTOMA. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **43**, 13–21 (2002).
139. Harada, H. *et al.* Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1. *J. Oral Pathol. Med.* **27**, 207–212 (1998).
140. Martínez-Martínez, M. *et al.* Comparative histological and immunohistochemical study of ameloblastomas and ameloblastic carcinomas. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* **22**, e324–e332 (2017).
141. Kusafuka, K., Hirobe, K., Wato, M., Tanaka, A. & Nakajima, T. CD56 expression is associated with neuroectodermal differentiation in ameloblastomas: an immunohistochemical evaluation in comparison with odontogenic cystic lesions. *Med. Mol. Morphol.* **44**, 79–85 (2011).
142. Cairns, L. *et al.* CD56 (NCAM) expression in ameloblastomas and other odontogenic lesions. *Histopathology* **57**, 544–548 (2010).
143. Jaafari-Ashkavandi, Z., Dehghani-Nazhvani, A. & Razmjouyi, F. CD56 Expression in Odontogenic Cysts and Tumors. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects* **8**, 240–245 (2014).
144. Todd, R. *et al.* Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **13**, 51–61 (2002).
145. Kumar, H., Vandana, R. & Kumar, G. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* **15**, 283–287 (2011).
146. Tanahashi, J. *et al.* Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of beta-catenin. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **37**, 565–570 (2008).
147. Wei, Z. *et al.* Expression of β -catenin and AXIN2 in ameloblastomas. *Contemp. Oncol.* **17**, 250–256 (2013).

148. Alves Pereira, K. M. *et al.* Immunohistochemical expression of E-cadherin and beta-catenin in ameloblastomas and tooth germs. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **109**, 425–431 (2010).
149. Blanpain, C. [Impact of beta-catenin signaling pathway on stem cell differentiation in the skin]. *Med. Sci. MS* **23**, 34–36 (2007).
150. Miyake, T. *et al.* Gene mutation analysis and immunohistochemical study of β -catenin in odontogenic tumors. *Pathol. Int.* **56**, 732–737 (2006).
151. Matthijs, G. *et al.* Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 2–5 (2016).
152. Matthijs, G., Dierking, A. & Schmidtke, J. New EuroGentest/ESHG guidelines and a new clinical utility gene card format for NGS-based testing. *Eur. J. Hum. Genet.* **24**, 1 (2016).
153. Rabbani, B., Tekin, M. & Mahdieh, N. The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *J. Hum. Genet.* **59**, 5–15 (2014).

ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE D'UNE SERIE DE 28 AMELOBLASTOMES.

RESUME EN FRANÇAIS :

L'améloblastome est une tumeur épithéliale odontogène bénigne. Cette tumeur est caractérisée par une agressivité locale et une tendance à la récurrence. La chirurgie est le traitement de référence. Récemment, des mutations du gène BRAF ont été décrites dans les améloblastomes.

Nous avons évalué l'incidence des mutations BRAF dans notre cohorte toulousaine de 28 améloblastomes par une double approche, immunohistochimique et moléculaire. De plus, nous avons vérifié les résultats que nous avons obtenus par une technique de séquençage de dernière génération sur deux cas améloblastomes. En effet, nous avons retrouvé deux mutations inconnues du gène EZH2.

Nous avons retrouvé 61,9% de cas mutés BRAFV600E dans notre cohorte d'améloblastomes. Les deux mutations retrouvées par technique NGS, n'ont pas été validées par deux autres techniques ciblées de biologie moléculaire. Les résultats du NGS étaient des faux positifs.

Le traitement anti-BRAF pourrait donc être une alternative thérapeutique en cas de traitement chirurgical impossible.

TITRE EN ANGLAIS: Immunohistochemistry and molecular study of 28 ameloblastomas.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée : Anatomie et cytopathologie

MOTS-CLÉS : Améloblastome, mutation BRAF, décalcification, immunohistochimie, mutation EZH2.

INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

Université Toulouse III-Paul Sabatier
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

Directeur de thèse : Pr Anne GOMEZ-BROUCHET