

UNIVERSITE D'ANGERS

FACULTE DE MEDECINE

Année 2014

N°.....

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

Qualification en DERMATOLOGIE-VENEREOLOGIE

Par

Angélique MARCHAND

Née le 02/12/1986 à ORLEANS (45)

Présentée et soutenue publiquement le : 17 juin 2014

**Mutations somatiques du gène *EZH2* au cours du mélanome:
recherche d'une corrélation entre le génotype tumoral et le
phénotype clinique**

Président : Monsieur le Professeur GUARDIOLA Philippe

Directeur : Monsieur le Professeur MARTIN Ludovic

LISTE DES ENSEIGNANTS DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE D'ANGERS

Doyen

Pr. RICHARD

Vice doyen recherche

Pr. PROCACCIO

Vice doyen pédagogie

Pr. COUTANT

Doyens Honoraire : Pr. BIGORGNE, Pr. EMILE, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. SAINT-ANDRÉ

Professeur Émérite : Pr. Gilles GUY, Pr. Jean-Pierre ARNAUD

Professeurs Honoraire : Pr. ACHARD, Pr. ALLAIN, Pr. ALQUIER, Pr. BASLÉ, Pr. BIGORGNE, Pr. BOASSON, Pr. BOYER, Pr. BREGEON, Pr. CARBONNELLE, Pr. CARON-POITREAU, Pr. M. CAVELLAT, Pr. COUPRIS, Pr. DAUVER, Pr. DELHUMEAU, Pr. DENIS, Pr. DUBIN, Pr. EMILE, Pr. FOURNIÉ, Pr. FRANÇOIS, Pr. FRESSINAUD, Pr. GESLIN, Pr. GROSIEUX, Pr. GUY, Pr. HUREZ, Pr. JALLET, Pr. LARGET-PIET, Pr. LARRA, Pr. LE JEUNE, Pr. LIMAL, Pr. MARCAIS, Pr. PARÉ, Pr. PENNEAU, Pr. PENNEAU-FONTBONNE, Pr. PIDHORZ, Pr. POUPLARD, Pr. RACINEUX, Pr. REBEL, Pr. RENIER, Pr. RONCERAY, Pr. SIMARD, Pr. SORET, Pr. TADEI, Pr. TRUELLE, Pr. TUCHAIS, Pr. VERRET, Pr. WARTEL

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

ABRAHAM Pierre	Physiologie
ASFAR Pierre	Réanimation médicale
AUBÉ Christophe	Radiologie et imagerie médicale
AUDRAN Maurice	Rhumatologie
AZZOUI Abdel-Rahmène	Urologie
BARON Céline	Médecine générale
BARTHELAIX Annick	Biologie cellulaire
BATAILLE François-Régis	Hématologie ; Transfusion
BAUFRETON Christophe	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
BEAUCHET Olivier	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
BEYDON Laurent	Anesthésiologie-réanimation
BIZOT Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
BONNEAU Dominique	Génétique
BOUCHARA Jean-Philippe	Parasitologie et mycologie
CALÈS Paul	Gastroentérologie ; hépatologie
CAMPONE Mario	Cancérologie ; radiothérapie
CAROLI-BOSC François-Xavier	Gastroentérologie ; hépatologie
CHABASSE Dominique	Parasitologie et mycologie
CHAPPARD Daniel	Cytologie et histologie
COUTANT Régis	Pédiatrie
COUTURIER Olivier	Biophysique et Médecine nucléaire
DARSONVAL Vincent	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique
de BRUX Jean-Louis	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
DESCAMPS Philippe	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
DIQUET Bertrand	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique
DUVERGER Philippe	Pédopsychiatrie
ENON Bernard	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
FANELLO Serge	Épidémiologie, économie de la santé et prévention
FOURNIER Henri-Dominique	Anatomie
FURBER Alain	Cardiologie
GAGNADOUX Frédéric	Pneumologie
GARNIER François	Médecine générale
GARRÉ Jean-Bernard	Psychiatrie d'adultes

GINIÈS Jean-Louis	Pédiatrie
GOHIER Bénédicte	Psychiatrie
GRANRY Jean-Claude	Anesthésiologie-réanimation
GUARDIOLA Philippe	Hématologie ; transfusion
HAMY Antoine	Chirurgie générale
HUEZ Jean-François	Médecine générale
HUNAULT-BERGER Mathilde	Hématologie ; transfusion
IFRAH Norbert	Hématologie ; transfusion
JEANNIN Pascale	Immunologie
JOLY-GUILLOU Marie-Laure	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LACCOURREYE Laurent	Oto-rhino-laryngologie
LASOCKI Sigismond	Anesthésiologie-réanimation
LAUMONIER Frédéric	Chirurgie infantile
LE JEUNE Jean-Jacques	Biophysique et médecine nucléaire
LEFTHÉRIOTIS Georges	Physiologie
LEGRAND Erick	Rhumatologie
LEROLLE Nicolas	Réanimation médicale
LERMITE Emilie	Chirurgie générale
LUNEL-FABIANI Françoise	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
MALTHIÉRY Yves	Biochimie et biologie moléculaire
MARTIN Ludovic	Dermato-vénérérologie
MENEI Philippe	Neurochirurgie
MERCAT Alain	Réanimation médicale
MERCIER Philippe	Anatomie
NGUYEN Sylvie	Pédiatrie
PICHARD Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
PICQUET Jean	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire
PODEVIN Guillaume	Chirurgie infantile
PROCACCIO Vincent	Génétique
PRUNIER Fabrice	Cardiologie
REYNIER Pascal	Biochimie et biologie moléculaire
RICHARD Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
RODIEN Patrice	Endocrinologie et maladies métaboliques
ROHMER Vincent	Endocrinologie et maladies métaboliques
ROQUELAURE Yves	Médecine et santé au travail
ROUGÉ-MAILLART Clotilde	Médecine légale et droit de la santé
ROUSSEAU Audrey	Anatomie et cytologie pathologiques
ROUSSELET Marie-Christine	Anatomie et cytologie pathologiques
ROY Pierre-Marie	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
SAINT-ANDRÉ Jean-Paul	Anatomie et cytologie pathologiques
SENTILHES Loïc	Gynécologie-obstétrique
SUBRA Jean-François	Néphrologie
URBAN Thierry	Pneumologie
VERNY Christophe	Neurologie
WILLOTEAUX Serge	Radiologie et imagerie médicale
ZANDECKI Marc	Hématologie ; transfusion

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

ANNAIX Claude	Biophysique et médecine nucléaire
ANNWEILER Cédric	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
AUGUSTO Jean-François	Néphrologie
BEAUVILLAIN Céline	Immunologie
BELIZNA Cristina	Médecine interne, gériatrie et biologie du vieillissement
BLANCHET Odile	Hématologie ; transfusion
BOURSIER Jérôme	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BOUTON Céline	Médecine générale
CAILLIEZ Éric	Médecine générale
CAPITAIN Olivier	Cancérologie ; radiothérapie
CASSEREAU Julien	Neurologie
CHEVAILLER Alain	Immunologie
CHEVALIER Sylvie	Biologie cellulaire
CONNAN Laurent	Médecine générale
CRONIER Patrick	Anatomie
CUSTAUD Marc-Antoine	Physiologie
de CASABIANCA Catherine	Médecine générale
DUCANCELLA Alexandra	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
DUCLUZEAU Pierre-Henri	Nutrition
FORTRAT Jacques-Olivier	Physiologie
HINDRE François	Biophysique et médecine nucléaire
JEANGUILLAUME Christian	Biophysique et médecine nucléaire
JOUSSET-THULLIER Nathalie	Médecine légale et droit de la santé
KEMPF Marie	Bactériologie-virologie ; Hygiène hospitalière
LACOEUILLE Franck	Biophysique et médecine nucléaire
LERMITTE Emilie	Chirurgie Générale
LETOURNEL Franck	Biologie cellulaire
LOISEAU-MAINIGOT Dominique	Biochimie et biologie moléculaire
MARCHAND-LIBOUBAN Hélène	Biologie cellulaire
MAY-PANLOUP Pascale	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
MESLIER Nicole	Physiologie
MOUILLIE Jean-Marc	Philosophie
PAPON Xavier	Anatomie
PASCO-PAPON Anne	Radiologie et Imagerie médicale
PELLIER Isabelle	Pédiatrie
PENCHAUD Anne-Laurence	Sociologie
PIHET Marc	Parasitologie et mycologie
PRUNIER Delphine	Biochimie et biologie moléculaire
PUISSANT Hugues	Génétique
SAVAGNER Frédérique	Biochimie et biologie moléculaire
SIMARD Gilles	Biochimie et biologie moléculaire
TANGUY-SCHMIDT Aline	Hématologie ; transfusion
TURCANT Alain	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique

COMPOSITION DU JURY

Président du jury :

Monsieur le Professeur GUARDIOLA Philippe

Directeur de thèse :

Monsieur le Professeur MARTIN Ludovic

Membres du jury :

Monsieur le Professeur GUARDIOLA Philippe

Monsieur le Professeur MARTIN Ludovic

Madame le Docteur PRUNIER Delphine

Madame le Docteur CROUE Anne

Monsieur le Docteur LE CORRE Yannick

Remerciements

A Monsieur le Professeur GUARDIOLA,

Vous me faites l'honneur de présider le jury de cette thèse. Je vous remercie d'avoir rendu ce travail possible dans votre plateforme de génomique. Je suis consciente de ce privilège et des moyens investis.

A Monsieur le Professeur MARTIN,

Vous me faites le plaisir de diriger cette thèse. Vous êtes à l'origine de ce travail et je vous remercie de me l'avoir confié. Voyez dans cette thèse l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance pour votre investissement dans la formation des internes et votre disponibilité.

A Madame le Docteur PRUNIER,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité. Grâce à vous, j'en connais un peu plus sur les techniques de séquençage.

A Madame le Docteur CROUE,

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse avec l'éclairage de votre spécialité. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Docteur LE CORRE,

Tu me fais l'honneur d'accepter de juger ma thèse. Je te remercie pour ton encadrement, tes précieux conseils et le partage de tes vastes connaissances.

A tous les médecins et co-internes, à toutes les infirmières, aides-soignantes et secrétaires du service de dermatologie d'Angers,

Je vous remercie pour votre disponibilité et votre gentillesse. Votre accueil, votre bonne humeur et vos délicates attentions ont agrémenté mon travail dans le service.

A tous les médecins qui m'ont accueillie, tout au long de mon cursus d'interne,

C'est grâce à vous que mon attrait pour l'oncologie perdure...

A mes parents,

Vous m'avez transmis la passion de la médecine. Votre dévouement et votre altruisme ont toujours été un modèle. Merci pour vos sacrifices, votre amour et votre soutien.

A mes frères, Joseph et Benjamin,

Je suis fière de vous. Pour tout ce que nous avons partagé et notre solidarité malgré les distances. Le flambeau de la médecine est bien passé. J'espère qu'un jour nous pourrons travailler ensemble...

A mes grands-parents,

J'espère vous avoir le plus longtemps à mes côtés. Grand-mère, je te dédie cette thèse car c'est toi qui crois le plus en moi.

A ma belle-famille,

Je suis heureuse de vous avoir rejoints à Angers. J'ai su trouver en vous une deuxième famille et un soutien sans limite. Merci pour votre aide précieuse lors de mon internat, notamment ces derniers mois.

A mes amies, Lina, Sophie, Laure, Marie et les autres...

Je vous remercie pour votre sincère amitié malgré les distances et les années. Je suis fière de chacune d'entre vous, et j'espère bientôt assister à vos thèses respectives...

A mon mari,

Tu es un soutien sans faille, mon âme sœur. Merci pour ta patience sans limite, ton humour et ta joie de vivre. J'espère que tu seras fier de moi...

A Talia,

Ma petite princesse. Plus rien n'est pareil depuis que tu es arrivée. Tu as illuminé ma vie et te voir grandir me motive chaque jour. J'espère rattraper le temps avec toi...

Résumé

L'oncogénèse du mélanome cutané implique la voie des MAP-kinases, et certaines mutations sont désormais des cibles thérapeutiques en routine. Pourtant, l'histoire naturelle et le pronostic du mélanome sont très variables d'un patient à l'autre, ce qui laisse supposer l'implication d'autres voies d'oncogénèse. Le gène *EZH2* est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs dans plusieurs cancers (prostate, sein, sarcome d'Ewing, glioblastome, leucémie...). L'objectif de notre étude était de déterminer si une mutation d'*EZH2* était associée à des facteurs de mauvais pronostic dans le mélanome. Nous avons effectué un séquençage direct du gène *EZH2* selon la méthode de Sanger dans une cohorte rétrospective et bicentrique de 64 patients pour qui nous disposions de matériel tumoral fixé, initialement destiné au séquençage de *BRAF*. Nous avons comparé les caractéristiques cliniques (âge au diagnostic, sexe, localisation anatomique, localisation en zone photo-exposée, présence de métastases loco-régionales ou à distance), histologiques (ulcération, indice de Breslow, type histologique, régression) et le statut *BRAF* entre les mélanomes porteurs d'une mutation somatique d'*EZH2* et les non porteurs. 4 mélanomes sur 64 (6,2%) avaient une mutation faux-sens dans l'exon 641 d'*EZH2* aboutissant probablement à sa surexpression. Chez les mélanomes mutés, l'ulcération était plus fréquente et le stade au diagnostic plus avancé. Cette mutation d'*EZH2* serait davantage associée à des facteurs de mauvais pronostic dans le mélanome et pourrait être accessible aux inhibiteurs d'*EZH2* actuellement en cours d'essais.

Plan

1) Introduction

- a) Généralités sur le mélanome
- b) Place du gène *EZH2* dans l'épigénétique
- c) Rôle de la protéine EZH2 dans la cancérogenèse
- d) Objectifs de l'étude

2) Matériels et Méthodes

- a) Patients
- b) Matériels
- c) Critères de jugement
- d) Analyse statistique

3) Résultats

- a) Diagramme de flux
- b) Caractéristiques cliniques
- c) Caractéristiques histologiques et statut *BRAF*
- d) Stade au diagnostic

4) Discussion

- a) Phénotype des mélanomes mutés *EZH2*
- b) Hypothèses physiopathologiques
- c) Perspectives thérapeutiques

5) Conclusion

Liste des abréviations

ALM= Acral Lentiginous Melanoma

ARNnc= Acide ribonucléique non codant

BRAF= v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

C-myc= C-avian myelocytomatosis viral oncogene homolog

CdK= Cycline dependant kinase

CDKN2A= Cycline dependant kinase inhibitor 2A

DZNep= 3-Deazaneoplanocin A

E2F= E2 promoter binding factor

EED= Embryonic ectoderm development

EZH2 = Enhancer of zeste homolog 2

DNMT = DNA methyltransferase

FFPE = Formalin-fixed paraffin-embedded

HDAC = Histone désacétylase

HMTase = Histone méthyltransférase

HR = Hazard ratio

IPSS= International Prognostic Scoring System

LAM= Leucémie aigüe myéloblastique

MAP-kinase = Mitogen activated protein kinase

Mi-ARN= Micro-Acide ribonucléique

MEK= Mitogen / extracellular signal- regulated kinase

MITF= Microphthalmia-associated transcription factor

NF-κB = Nuclear Factor- Kappa B

NRAS= N-Rat Sarcoma

OR = Odds-ratio

p-RB= Retinoblastoma protein

PcG = Polycomb group of genes

PI3K = Phosphoinositide-3 kinase

PRC2= Polycomb Repressive Complex 2

PTEN = Phosphatase and tensin homolog

SSM = Superficial Spreading Melanoma

SUZ12= Suppressor of Zeste 12

1) Introduction :

a) Généralités sur le mélanome :

Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes. Bien que son incidence ait doublée durant les deux dernières décennies, avec 11000 cas estimés en 2012 en France, il ne représente que 4% des cancers cutanés [1]. Néanmoins, le mélanome est responsable de 80% de la mortalité des cancers dermatologiques [2]. Il est généralement de bon pronostic avec une survie relative de plus de 90 % à 5 ans, tous stades confondus [3]. Au stade précoce, la chirurgie demeure le seul traitement curatif. Il y a encore quelques années, la majorité des mélanomes métastatiques était réfractaire à la dacarbazine, chimiothérapie de référence, avec un taux de réponse inférieur à 15% [4]. Le risque de développer un mélanome dépend d'interactions entre une prédisposition génétique constitutionnelle et des facteurs environnementaux, en particulier l'exposition solaire excessive. Les facteurs de risque de survenue clairement établis sont les antécédents personnels ou familiaux de mélanome, la présence de naevi multiples ou atypiques et le phototype clair [5]. Durant la dernière décennie, des progrès majeurs ont été faits quant à la compréhension de la tumorigénèse dans le mélanome. L'étude du microenvironnement tumoral a pris des proportions considérables et les éléments qui le composent (matrice extracellulaire, cellules stromales, effecteurs immunitaires...) sont devenus des cibles efficaces des nouvelles stratégies thérapeutiques : c'est le principe de l'immunothérapie, avec l'émergence de nouvelles molécules qui stimulent l'immunité anti-tumorale, telles que l'Ipilimumab, un anti-CTLA4 ou le Nivolumab, un anti-PD1, tous deux utilisés au stade métastatique. Le caractère invasif est en outre déterminé par le génotype des cellules tumorales avec la découverte récente de nouveaux gènes de prédisposition ainsi que certaines mutations somatiques qui interviennent, via des voies de transduction du signal, à chaque étape de la tumorigénèse, à savoir la transformation des mélanocytes, la progression du mélanome et la réponse aux traitements. La principale voie connue est la voie des MAP-kinases où des mutations récurrentes de diverses kinases (BRAF, NRAS, MEK) sont responsables de l'augmentation de l'expression de ERK. Cette dernière protéine est directement impliquée dans la prolifération, l'angiogenèse, la capacité à métastaser, et dernièrement dans la dérégulation de l'épigénétique (méthylation de gènes suppresseurs de tumeurs). L'identification de la mutation V600E dans l'exon 15 du gène

BRAF dans 50 à 70% des mélanomes a permis la mise au point de nouveaux traitements ciblés chez les patients mutés, sous la forme d'inhibiteurs de la protéine *BRAF*, le Vemurafenib ou le Dabrafenib, ayant tous les deux l'AMM en première ligne au stade métastatique [6,7]. Pour la première fois, une réduction du taux de mortalité de 74% a pu être observée dans les premiers essais thérapeutiques [6]. Malheureusement, ces traitements spectaculairement efficaces dans les premières semaines n'empêchent pas le développement de résistances qui conduisent au décès en 6 mois environ [5]. Pour les mutations *drivers*, seuls les inhibiteurs de la voie des MAP-kinases (anti-*BRAF* et anti-MEK) ont eu un impact thérapeutique. Actuellement, aucun traitement n'est disponible en cas de mutation somatique des gènes *NRAS* ou *CKIT*, présentes respectivement dans 26% et 9% des mélanomes [8].

A ce jour, les seuls marqueurs prédictifs d'évolutivité dans le mélanome sont l'indice de Breslow et l'ulcération, selon la classification de l'AJCC [9]. Le statut de la mutation *BRAF* est toujours un objet de controverse. Dans les tumeurs primitives, une mutation de *BRAF* est associée à un âge de survenue plus jeune, une localisation en zone non photo-exposée et un plus grand nombre de naevi. En revanche, en ce qui concerne la survie sans progression ou la survie globale, les avis divergent : d'une part, certaines études ont supposé que cette mutation augmenterait le risque de mortalité dans les cancers colorectaux et le mélanome, avec un HR respectivement de 2 et 1,7 [10]. D'autre part, chez les mélanomes mutés, l'intervalle entre le diagnostic de la tumeur primitive et la survenue de métastases serait le même que chez les non mutés. Ainsi, la survie médiane au stade métastatique était de 5,7 mois chez les *BRAF* mutés vs 8,5 mois chez les non mutés [11]. Depuis l'utilisation des anti-*BRAF* en pratique courante, les courbes de survie des mélanomes mutés et non mutés ont tendance à se superposer.

b) Place du gène *EZH2* dans l'épigénétique:

Malgré la découverte récente des mutations « drivers » (ou « activatrices ») telles que *BRAF*, *NRAS* et *CKIT*, aucune mutation « driver » n'a pu être identifiée dans les mélanomes *BRAF*, *CKIT* ou *NRAS* sauvages, suggérant que la compréhension des mécanismes génétiques demeure incomplète. Le développement récent des techniques de profilage génomique par puces à ADN, hybridation génomique comparative (CGH-array), analyse des polymorphismes mononucléotidique (SNP-array) ou du transcriptome ont permis un séquençage de l'exome à plus grande échelle. Plusieurs études ont tenté d'isoler de nouveaux

marqueurs biologiques qui permettraient de distinguer les formes agressives des formes indolentes dans le mélanome, néanmoins aucune d'entre elles n'a abouti. En 2012, afin de caractériser de nouvelles mutations *drivers*, le séquençage complet de l'exome provenant de l'ADN tumoral de 135 mélanomes a permis de mettre en évidence une mutation du gène *EZH2* dans 3% des cas [8]. Il s'agit de la première étude s'intéressant à cette mutation à une telle échelle dans le mélanome.

EZH2 est une protéine impliquée dans la régulation de la transcription, plus particulièrement dans la méthylation de l'ADN et l'épigénétique des cancers. Cette branche de la génétique met l'accent sur les variations de la structure de la chromatine, affectant à la fois l'expression et l'héritabilité génétique. Le gène codant pour cette enzyme, *EZH2*, est situé sur le chromosome 7 et fait partie du groupe des PcG (Polycomb group of Genes) qui rassemble les gènes intervenant dans la modification du nucléosome, le remodelage de la chromatine et l'interaction avec les autres facteurs de transcription. Le produit de ce gène, *EZH2* est la sous-unité catalytique du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), responsable de la tri-méthylation de la lysine en position 27 de l'histone H3 (H3K27) [12]. Une fois triméthylée, H3K27 devient H3K27me3, dont le maintien est indispensable à de nombreux processus physiologiques tels que l'inactivation du chromosome X, le développement des cellules germinales ou la pluripotence des cellules souches [13]. Le domaine N-terminal d'*EZH2* sert de point d'ancrage pour ses partenaires du complexe PRC2 : EED, SUZ12 et RBAP48 (trois autres protéines du groupe PcG). Son domaine SET, quant à lui, catalyse la méthylation de H3K27, par son activité d'histone méthyltransférase (HMTase) [13-15]. H3K27me3 va maintenir la chromatine sous forme condensée, et empêcher la liaison des facteurs transcriptionnels aux sites promoteurs de nombreux gènes, ainsi rendus inaccessibles à la transcription. Lors du développement embryonnaire, alors que les gènes homéotiques vont entraîner la différenciation cellulaire des cellules souches pluripotentes pour la constitution des futurs organes, *EZH2* va bloquer la différenciation d'un pool cellulaire au sein de chaque tissu, et maintenir des cellules progénitrices capables de se différencier ultérieurement, tels que les neurones ou les hépatocytes (Figure 1) [16-18]. Ce stock dépendra du taux d'expression d'*EZH2*, spécifique à chaque tissu. D'après ce modèle, il a été prouvé qu'*EZH2* participait à l'inhibition de la différenciation des cellules souches dans l'épiderme [19-20].

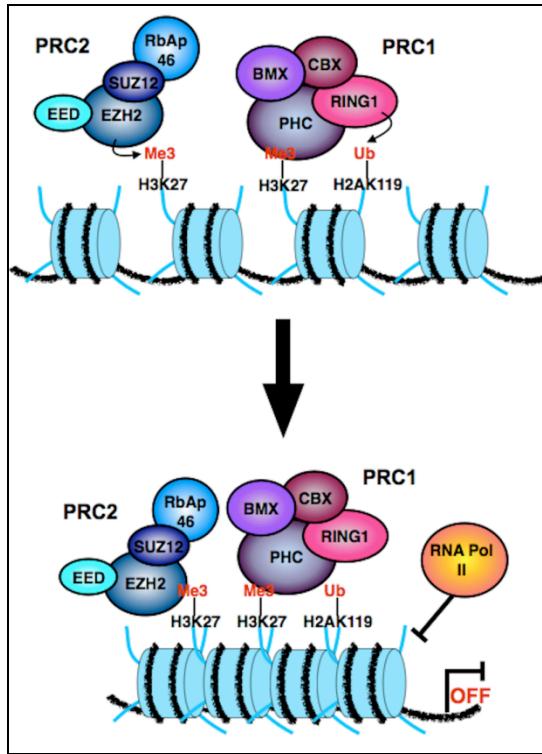


Figure 1: Inhibition épigénétique de la transcription par les PcG (d'après Marchesi et al) [18].

La triméthylation de H3K27 par PRC2, permet le recrutement de PRC1, qui ubiquitile H2AK119, induisant une compaction de la chromatine et l'inhibition de la transcription.

De nouvelles études ont prouvé que cette protéine était en mesure de coopérer avec les DNA-méthyltransférases (DNMT), via des mécanismes incomplètement élucidés. Les gènes cibles seraient d'abord réprimés par H3K27me3 puis PRC2 recruterait, à son tour, des DNMT pour maintenir la méthylation de l'ADN durant la réplication, et ainsi bloquer la transcription de ces gènes en empêchant leur interaction avec les facteurs transcriptionnels [12,18,21,22]. En outre, la régulation de l'expression d'*EZH2* se produit à 2 niveaux :

- Transcriptionnel, par des facteurs qui vont maintenir l'expression des sous-unités de PRC2, tels que E2F ou c-myc (un proto-oncogène notamment impliqué dans certains lymphomes), ou au contraire la bloquer, tels que pRb et p16. Dans le rétinoblastome, l'inactivation de pRb, un gène suppresseur de tumeurs, empêche le recrutement des autres sous-unités de PRC2 et des gènes cibles [23]. pRb est biologiquement actif sous sa forme hypo-phosphorylée et inactive E2F. Une fois phosphorylé par Cdk2, pRb est inactivé et E2F peut recruter effectuer les sous-unités de PRC2. L'expression d'*EZH2*

est inhibée pendant ou après la transcription par des mi-ARN (micro-ARN), de courtes portions d'ARNnc qui, une fois réprimées, entraînent une surexpression d'*EZH2* [24].

- Post-traductionnel, principalement par la phosphorylation d'*EZH2* qui passe par 2 phénomènes. Le premier implique des protéines régulatrices du cycle cellulaire, Cdk1 et Cdk2 qui potentialisent le rôle de la protéine *EZH2* en la phosphorylant à 2 sites différents et en maintenant des taux élevés d'H3K27me3 [25]. Le second met en scène différentes kinases extracellulaires régulatrices modulées par divers signaux environnementaux. Une activation de la protéine AKT mène à une phosphorylation excessive d'*EZH2*, donc une baisse de la méthylation de H3K27 et une levée d'inhibition de la transcription [26].

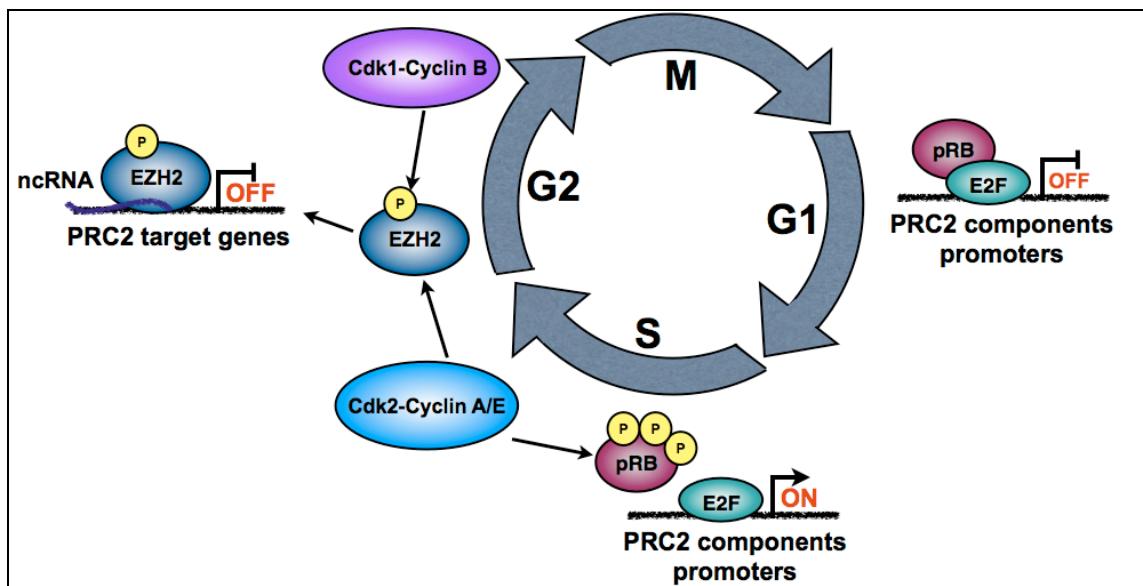


Figure 2: Modèle de la régulation de la protéine EZH2 durant le cycle cellulaire (d'après Marchesi et al) [18].

Concernant la régulation transcriptionnelle de PRC2, les sous-unités, en particulier EZH2 et EED, sont des cibles des protéines de la famille E2F. L'activité d'E2F est inhibée par une hypo-phosphorylation de pRb durant la phase G1. Le complexe Cdk-Cycline induit la transition de la phase G1 à la phase S, par la phosphorylation de pRb et donc l'activation des sous-unités de PRC2. Par ailleurs, Cdk1 et Cdk2 sont capables de phosphoryler directement EZH2 et ainsi permettre la liaison de l'ARN non codant (ARNnc) à EZH2, indispensable au recrutement des gènes cibles par PRC2.

c) Mutations du gène EZH2 et cancérogenèse :

Dans la cellule normale, la déméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs permet leur expression et leur transcription. De manière générale, *EZH2* n'est pas exprimée dans les différents tissus à l'âge adulte. Dans la cellule tumorale, il a été démontré que les gènes suppresseurs de tumeurs étaient méthylés et par conséquent réprimés, tandis qu'une déméthylation générale de l'ADN était observée [25]. En revanche, aucune étude n'a permis d'élucider les mécanismes exactes de cette dérégulation car il a été observé d'une part que les gènes cibles présentaient un faible taux de méthylation au niveau de leur promoteurs et d'autre part que l'inhibition d'*EZH2* réactivait des centaines de gènes réprimés par H3K27me3 sans modification de leur taux de méthylation [26,27]. Des données récentes stipulent qu'*EZH2* favorise la cancérogenèse via une activation épigénétique en cascade et une inhibition de la différenciation cellulaire, en ciblant les molécules des voies de signalisation qui la contrôlent [28]. Par analogie, la cellule cancéreuse partage de nombreuses caractéristiques phénotypiques avec la cellule souche pluripotente, tels qu'un taux de prolifération important, et le rôle d'*EZH2* dans l'inhibition de la différenciation ainsi que le maintien de la pluripotence a fait l'objet de maintes publications [21,29]. Il a été mis en exergue qu'une surexpression d'*EZH2* ou des autres sous-unités de PRC2 était corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire, par défaut de différenciation, tel que dans les hémopathies malignes ou de nombreuses tumeurs solides, par exemple par stimulation directe du gène de fusion impliqué dans le Sarcome d'Ewing (Tableau I) [30]. Le lien entre une surexpression d'*EZH2* et un pronostic péjoratif a été établi pour la première fois dans le cancer de la prostate métastatique hormono-résistant, avec une augmentation du risque de récidive après prostatectomie [23]. A l'inverse, la perte d'expression d'*EZH2* était associée à une inhibition de la croissance des cellules tumorales, corroborant l'hypothèse précédemment formulée [13,23,32]. Ainsi dans la cellule cancéreuse, une réactivation de gènes normalement réprimés par H3K27me3 et impliqués dans la différenciation, la prolifération ou la survie cellulaire, est suscitée par l'action d'histones désacétylases (HDAC), potentialisée de manière synergique par l'inhibition d'*EZH2* [23,29]. Dans une étude récente portant sur le mélanome et le carcinome de l'endomètre, les auteurs ont illustré *in vitro* les conséquences d'une surexpression d'*EZH2* sur le cycle cellulaire, à savoir l'inhibition de la transcription des gènes suppresseurs de tumeurs, *p53* et *p16*, qui régulent négativement la mitose et la prolifération

[27,31-33]. Dans cette optique, *EZH2* participe à toutes les étapes de l'oncogenèse : l'initiation, la transformation des cellules précancéreuses devenues immortelles par inhibition de l'apoptose, la progression tumorale avec la promotion de la migration et de l'invasion, et enfin la dissémination métastatique [27,34-36]. A la lumière des mécanismes précédemment décrits, *EZH2* est désormais considéré comme un proto-oncogène déterminant qui fait appel aux principales voies de signalisation cellulaire : de la voie des MAP-kinases, actuellement au centre des enjeux thérapeutiques dans le mélanome, en passant par les voies PI3K-AKT, NF-κB, β-adrénergique ou encore par la voie Notch, nécessaire à l'homéostasie des cellules souches [27].

Tableau I : Cancers dans lesquels est surexprimé *EZH2* et implications en cancérogenèse (d'après Tsang et Cheng)[27].

Type of cancer	Functions
Prostate cancer	Cellular transformation Proliferation Invasion and metastasis
Breast carcinoma	Cellular transformation Proliferation Invasion and metastasis
Lymphomas	Proliferation
Myeloma	Proliferation
Bladder carcinoma	Anti-differentiation Cellular transformation Proliferation
Colon cancer	Proliferation
Cutaneous melanoma	Proliferation
Hepatocellular carcinoma	Proliferation Invasion and metastasis
Endometrial cancer	Proliferation
Lung cancer	Proliferation Anti-differentiation
Pancreatic cancer	Proliferation Anti-apoptosis
Gastric cancer	Proliferation Invasion and metastasis
Ewing's sarcoma	Proliferation Invasion and metastasis

d) Objectifs de l'étude :

L'objectif principal de notre étude était de démontrer qu'une mutation du gène *EZH2* présente sur le mélanome primitif était associée à des facteurs de mauvais pronostic, à savoir un stade plus avancé au diagnostic, en comparaison avec les mélanomes non mutés. Nos objectifs secondaires étaient de comparer les caractéristiques histo-cliniques entre les mélanomes porteurs d'une mutation d'*EZH2* et les mélanomes non mutés, afin d'identifier le profil phénotypique des mélanomes ayant une mutation d'*EZH2*.

2) Matériels et méthodes :

a) Patients :

Il s'agissait d'une étude de cohorte rétrospective, bicentrique, menée au sein du CHU d'Angers (Maine et Loire) et du Centre Hospitalier du Mans (Sarthe). La période d'inclusion s'étendait de janvier 2011 à décembre 2013.

Critères d'inclusion :

L'inclusion dans l'étude a été proposée à tous les patients âgés de 15 à 90 ans, porteurs d'un mélanome confirmé histologiquement par un centre d'anatomo-pathologie expérimenté dans le diagnostic du mélanome, sans distinction du stade, de la localisation ou du type histologique (SSM, nodulaire, muqueux, naevocytoïde, acro-lentigineux ou inclassable) et pour qui nous disposions de matériel tumoral fixé. Les prélèvements ont été réalisés en dehors d'une phase de traitement spécifique. Les sujets devaient être affiliés à un régime de sécurité sociale. Les échantillons tumoraux étaient issus de mélanomes pour lesquels un génotypage de *BRAF*, *CKIT* ou *NRAS* était en cours, à des fins thérapeutiques (afin de proposer un anti-*BRAF* en raison d'une évolution métastatique), ou scientifiques.

Critères d'exclusion :

Les patients porteurs d'une tumeur pour laquelle le diagnostic de mélanome paraissait douteux étaient exclus, de même que les mélanomes métastatiques sans tumeur primitive identifiée. Les sujets porteurs de plusieurs mélanomes ne pouvaient être inclus. Les mineurs n'ayant pas d'accord de soins signé par le tuteur légal et les patients incapables de donner personnellement leur consentement ou non affiliés à un régime de sécurité sociale n'avaient pu être pris en compte.

Recueil des données :

Pour chaque patient, nous avons recueilli les données suivantes et les avons réparties en 3 catégories :

- cliniques : âge au diagnostic, sexe, localisation du mélanome primitif, présence de métastases locorégionales ou à distance (stade TNM)

- histologiques : sous-type histologique du mélanome (SSM, nodulaire, muqueux, ALM, naevocytoïde, inclassable), indice de Breslow (épaisseur maximale histologique), présence ou absence d'une ulcération et d'une régression, stade selon la classification de l'AJCC 2009⁹
- génétique : statut de la mutation *BRAF*.

Nous avons colligé tous ces renseignements dans un tableau anonymisé sous un fichier EXCEL.

Considérations éthiques :

Nous avons obtenu l'avis favorable du comité d'Ethique de la région Maine et Loire pour la réalisation de notre projet, enregistré sous le numéro 2014-43. Nous avons envoyé un courrier postal à tous les patients inclus dans notre étude pour les informer de la recherche génétique en cours et avons communiqué les coordonnées nécessaires à l'obtention des résultats génétiques s'ils désiraient en prendre connaissance.

b) Matériels :

La recherche de la mutation du gène *EZH2* a été réalisée de manière prospective, à partir de tissus tumoraux préalablement fixés à la paraffine et divisés en 3 coupes de 10 microns, soit une surface de 575mm². L'extraction de l'ADN à partir des tissus inclus en paraffine a été réalisée à l'aide du kit Machery Nagel « DNA isolation from FFPE samples », via 3 étapes se déroulant sur 2 jours :

- le déparaffinage des sections de tissu, par dissolution (dissolvant organique).
- la digestion du tissu tumoral par une protéinase (rDNase) afin de solubiliser le tissu fixé et libérer l'ADN et l'ARN dans la solution. Le matériel est ensuite lavé dans différents tampons de faible teneur en sel.
- l'élution (par centrifugation et incubation) et enfin la purification de l'ADN.

L'ADN a ensuite été conservé à une température de -20° C avant l'analyse génétique. La mutation du gène *EZH2* a été détectée par séquençage selon la méthode de SANGER. Nous avons procédé à l'amplification de l'ADN par PCR, grâce au kit d'amplification Red'Y'StarMix (Eurogentec), fonctionnant avec les appareils suivants : PTC-200 (MJResearch) et DNA engine DYAD (Biorad). Pour le séquençage du gène *EZH2*, nous

avons utilisé les séquenceurs CEQ8000 et CEQ8800 (Beckman Coulter), ainsi que le kit de séquençage GenomeLab DTCS-Quick Star Kit (Beckman Coulter). La séquence nucléotidique mutée était repérée grâce au logiciel « CEQ8000 software» ou « CEQ8800 software » fournis avec les séquenceurs.

c) Critères de jugement :

Le critère de jugement principal était le stade au diagnostic selon la dernière version de la classification de l’AJCC datant de 2009. Nous avons défini un stade localement avancé s'il était supérieur ou égal au stade II B (Tableau II). En effet, entre les stades IIA et II B, le taux de survie à 5 ans passe de 82% à 68% [9].

Les critères de jugement secondaires étaient les taux d’ulcération, de régression, de localisation en zone photo-exposée, de mutation BRAF sur la lésion primitive ainsi que l’indice de Breslow en mm.

Tableau II : Classification TNM du mélanome cutané selon l’AJCC (American Joint Committee on Cancer) en 2009 [9].

Classification		Thickness (mm)	Ulceration Status/Mitoses
T			
Tis	NA		NA
T1	≤ 1.00		a: Without ulceration and mitosis < 1/mm ² b: With ulceration or mitoses ≥ 1/mm ²
T2	1.01-2.00		a: Without ulceration b: With ulceration
T3	2.01-4.00		a: Without ulceration b: With ulceration
T4	> 4.00		a: Without ulceration b: With ulceration
N	No. of Metastatic Nodes	Nodal Metastatic Burden	
N0	0	NA	
N1	1	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis†	
N2	2-3	a: Micrometastasis* b: Macrometastasis† c: In transit metastases/satellites without metastatic nodes	
N3	4+ metastatic nodes, or matted nodes, or in transit metastases/satellites with metastatic nodes		
M	Site	Serum LDH	
M0	No distant metastases	NA	
M1a	Distant skin, subcutaneous, or nodal metastases	Normal	
M1b	Lung metastases	Normal	
M1c	All other visceral metastases	Normal	
	Any distant metastasis	Elevated	

Abbreviations: NA, not applicable; LDH, lactate dehydrogenase.
*Micrometastases are diagnosed after sentinel lymph node biopsy.
†Macrometastases are defined as clinically detectable nodal metastases confirmed pathologically.

d) Analyse statistique :

Nous avons divisé notre cohorte en 2 groupes en fonction de la présence ou l'absence de mutation du gène *EZH2*. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS. Afin d'analyser les caractéristiques cliniques et biologiques des mélanomes dans les 2 groupes, nous avons exprimé les variables qualitatives sous forme d'effectif et de pourcentages, et les variables quantitatives sous forme de moyenne, médiane et écart-type. Nous avons ensuite comparé les données qualitatives nominales (sexe, localisation anatomique, localisation en zone photo-exposée, présence d'une ulcération, d'une régression, sous-type histologique, statut *BRAF*) entre les 2 groupes grâce aux test exact de Fisher et au test du Chi-2, si la variable pouvait prendre plus de 2 modalités. La différence étaient considérée comme significative pour un $p < 0,05$. Pour les variables quantitatives (âge au diagnostic, indice de Breslow en mm), nous les avons comparées grâce au test de Wilcoxon et avons calculé le p , avec un seuil de significativité à 5%. Nous avons également calculé l'odds-ratio (OR) avec un intervalle de confiance à 95%. Nous avons exprimé la fréquence des stades au diagnostic selon la classification AJCC 2009 en pourcentage puis stratifié les données en fonction du caractère localement invasif ou non invasif. Pour ce faire, nous avons considéré que les mélanomes invasifs localement possédaient au moins un indice de Breslow $> 2\text{mm}$ ainsi qu'une ulcération (stade $\geq \text{II B}$) ou un indice de Breslow $> 4\text{mm}$ sans ulcération. Nous les avons alors comparés grâce au test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis, avec pour seuil de significativité un $p < 0,05$.

3) Résultats :

a) Diagramme de flux :

Entre janvier 2011 et décembre 2013, 73 patients porteurs de mélanome étaient éligibles à notre étude. Neuf patients ont été exclus car ils étaient atteints d'un mélanome d'emblée métastatique sans identification de la lésion primitive. Sur les 64 patients inclus, 4 avaient un mélanome porteur d'une mutation d'*EZH2* (6,2%) (Figure 3). Les 4 mutations correspondaient à des mutations faux-sens portant sur la tyrosine située dans le codon 641 du gène *EZH2* (NM_004456.4), chacune étant différente (Figure 4) : c.1936T>A (substitution par l'aspartate), c.1937A>G (substitution par la cystéine), c.1937A>T (substitution par la phénylalanine) et c.1936T>C (substitution par l'histidine).

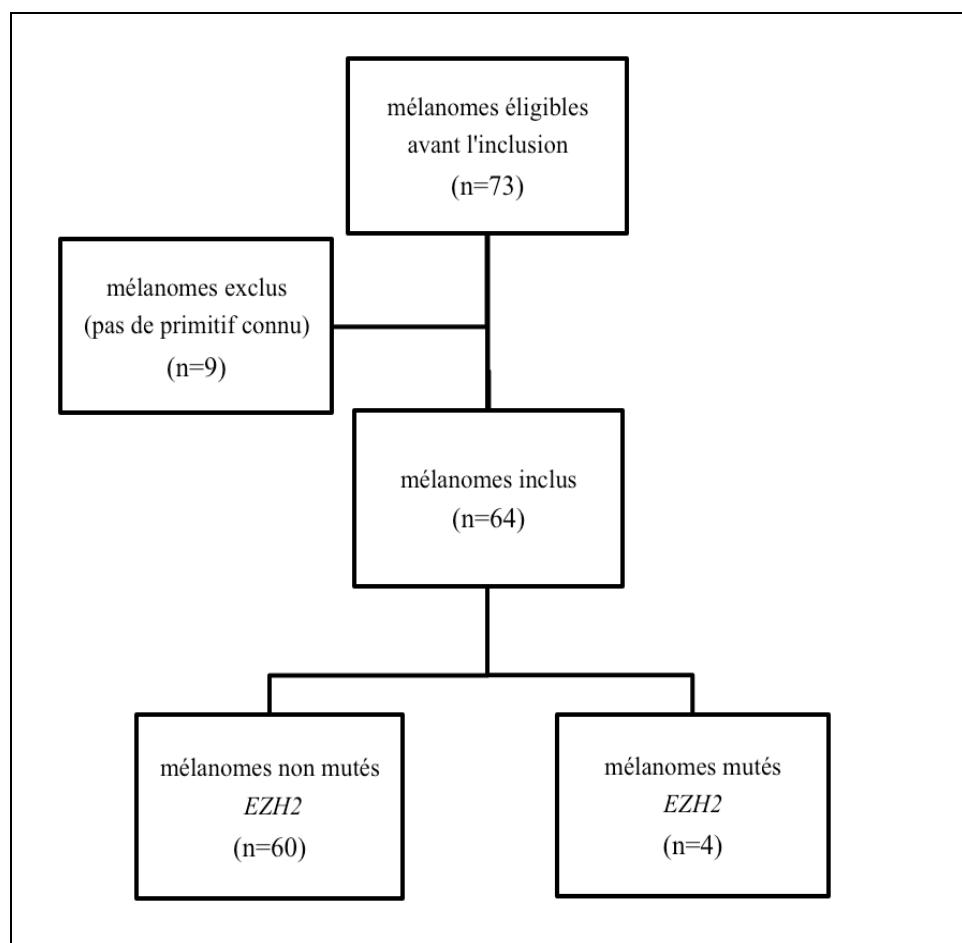


Figure 3: Diagramme de flux

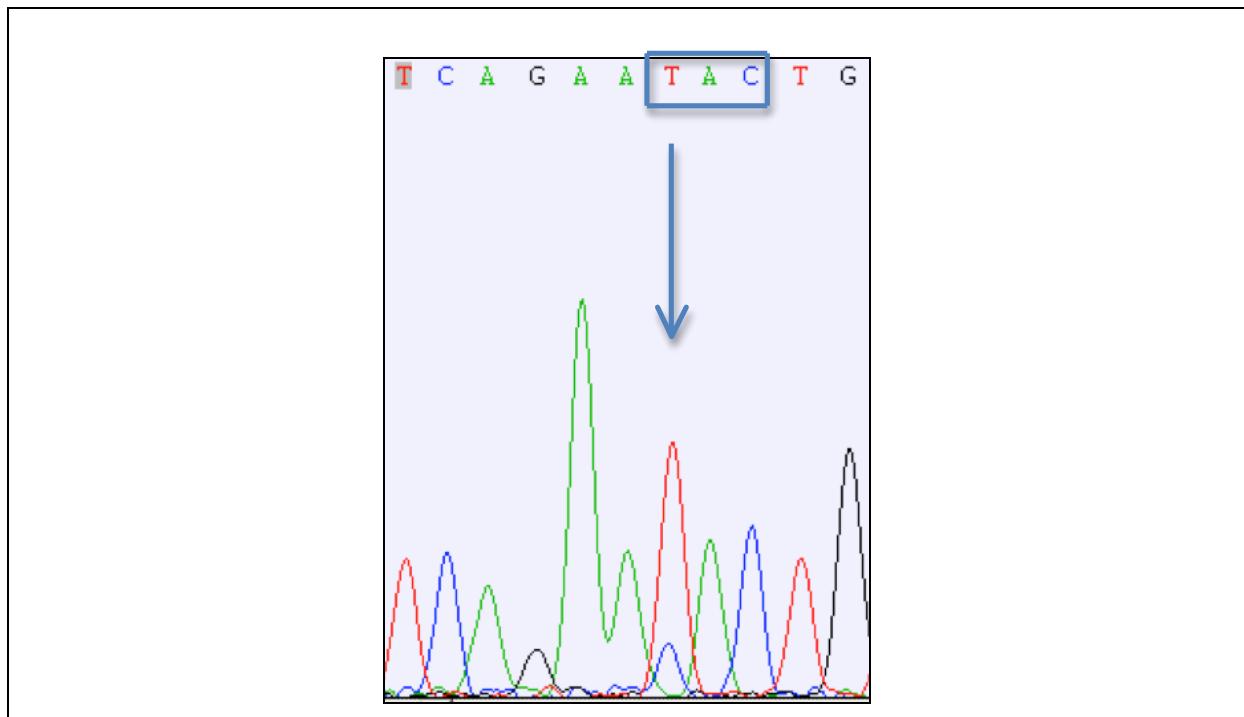


Figure 4 : Mutation faux-sens située sur le codon 641 du gène *EZH2* détectée par séquençage Sanger, probablement responsable d'une expression aberrante d'*EZH2*

b) Caractéristiques cliniques :

Au plan épidémiologique, les groupes de mélanomes mutés *EZH2* et non mutés étaient globalement comparables. Parmi les 4 mélanomes mutés, 3 étaient survenus chez des femmes (75%) et le dernier chez un homme (25%), contre 40 hommes (67%) et 20 femmes (33%) dans le groupe des mélanomes non mutés ($p=0.31$). De plus, l'âge moyen des patients était de $70,5 \pm 12,07$ ans (extrêmes 61-87 ans) pour les mélanomes mutés versus $64,8 \pm 15,26$ ans (extrêmes 16-87 ans) chez les non mutés, sans différence significative ($p=0,83$). De même, l'âge médian était respectivement de 67 et 68,5 ans. Pour les mélanomes mutés, les localisations anatomiques étaient réparties ainsi : 2 mélanomes localisés sur les membres (50%), 1 sur le tronc (25%) et 1 sur l'extrémité céphalique (25%). Pour les mélanomes non mutés, la distribution était la suivante : 34 sur les membres (57%), 15 sur le tronc (25%) et enfin 11 sur la tête ou le cou (18%) (Tableau III). Il n'y avait pas de différence significative entre les 2 groupes en ce qui concerne la localisation anatomique ($p=0,94$). Le constat est identique pour la localisation en zone photoexposée avec 1 mélanome situé en zone photo-

exposée parmi ceux qui ont une mutation d'*EZH2* (25%) versus 12 (20%) dans le groupe des non mutés (p=1 et OR=1.3, IC 95% [0.0235 ; 18.3024]).

Tableau III : Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients porteurs de mélanomes mutés *EZH2* et des non mutés

	<i>EZH2</i> muté	<i>EZH2</i> non muté	
caractéristiques cliniques	n=4 (%)	n=60 (%)	<i>p</i>
âge (années)			
moyenne±DS	70,5±12,07	64,8±15,26	0,83*
extrêmes	61-87	16-87	
médiane	67	68,5	
sexes			
♂	1 (25%)	40 (67%)	0,31†
♀	3 (75%)	20 (33%)	OR = 0.67 IC 95%[0.0121 ; 8.9782]
localisation			
membre	2 (50%)	34 (57%)	
tronc	1 (25%)	15 (25%)	0,94‡
tête/cou	1 (25%)	11 (18%)	
zone photo-exposée			
oui	1 (25%)	12 (20%)	1†
non	3 (75%)	48 (80%)	OR = 1.33 IC 95%[0.0235 ; 18.3024]
DS déviation standard, % pourcentage, ♂ homme, ♀ femme, * test de Wilcoxon, † test exact de Fisher, ‡ test du Chi-2, IC 95% intervalle de confiance à 95%, OR Odds-ratio			

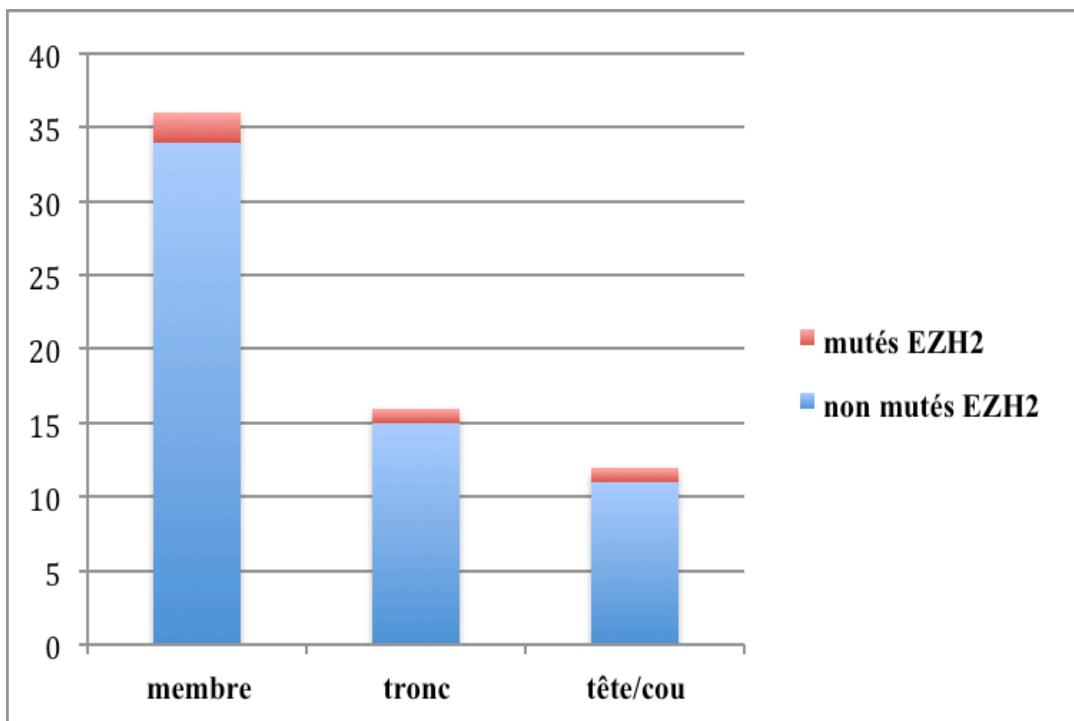


Figure 5 : Localisation anatomique des mélanomes mutés *EZH2* et des non mutés

(pour les membres : n= 2 chez les mélanomes mutés *EZH2* versus n=34 chez les non mutés ; pour le tronc : n=1 chez les mutés *EZH2* versus n=15 pour les non mutés ; pour la tête ou le cou : n=1 chez les mutés *EZH2* versus n= 11 chez les non mutés)

c) Caractéristiques histologiques et statut *BRAF* :

Pour les 4 mélanomes porteurs d'une mutation d'*EZH2*, 3 étaient de type SSM (75%) et le 4^{ème} était de type nodulaire (25%). Dans le groupe des mélanomes non mutés, 17 étaient de type SSM (28%), 20 de type nodulaires (33%), 15 inclassables (25%), 3 de type muqueux (5%), 3 de type ALM (5%), 1 de type Dubreuilh (2%) et 1 de type naevocytoïde (2%) (Figure 6). Il n'y avait pas de différence significative pour la prévalence des mélanomes de type SSM entre les 2 groupes ($p=0,08$, $OR=7,3$ IC 95 % [0.5451 ; 406.288]), ni pour les types nodulaires ($p=0,3$).

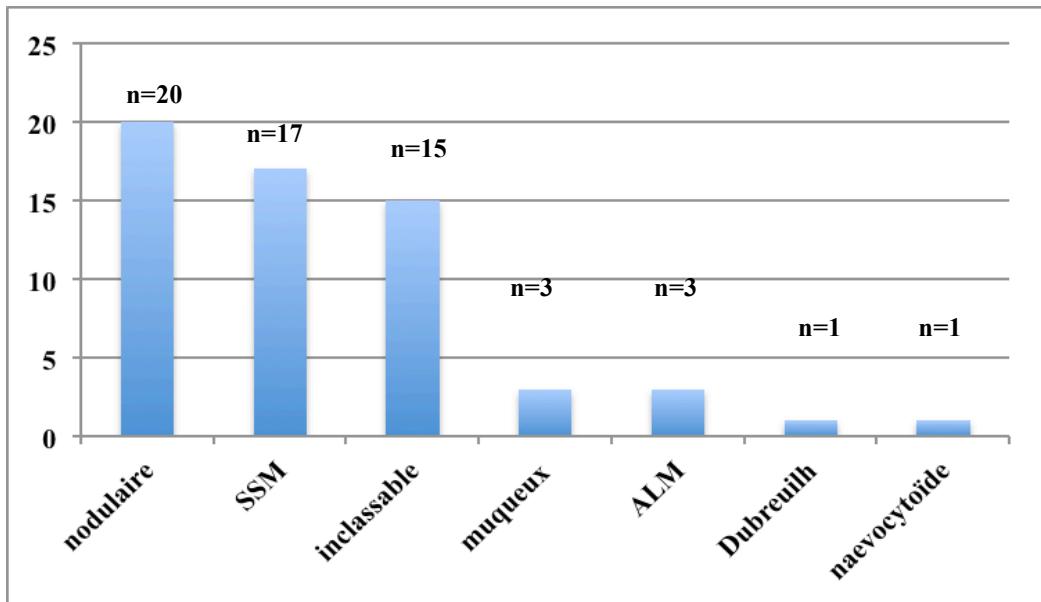


Figure 6 : Histogramme de répartition des sous-types histologiques des mélanomes non mutés *EZH2*

Dans le groupe muté, la prévalence de l’ulcération était de 100% contre 45% pour les mélanomes non mutés (n=27). Cette différence était significative ($p=0,049$). Le phénomène de régression n’a pas été observé au sein des mélanomes porteurs d’une mutation d’*EZH2* et seulement chez 8 mélanomes non mutés, soit 13%, sans différence significative entre les 2 groupes ($p=1$). Pour les mélanomes peu épais (indice de Breslow $< 1,01\text{mm}$), l’index mitotique était $\geq 1/\text{mm}^2$ pour 2 d’entre eux (2 mélanomes sur 6, soit 33%).

Quant à l’épaisseur maximale tumorale, l’indice de Breslow moyen était de 6,5 mm versus 4,3 mm respectivement pour les mélanomes mutés *EZH2* et non mutés, sans différence significative ($p=0,12$, IC 95% [-1.3581 ; 5.7934]). L’indice de Breslow médian était de 7,35 mm (extrêmes = 2,3-9) pour les mélanomes mutés versus 3,35 mm (extrêmes = 0,2-18) pour les non mutés.

Concernant le statut de la mutation *BRAF* : au total 22 mélanomes sur 64 (34%) étaient mutés dont 3 mélanomes sur les 4 porteurs de mutations du gène *EZH2* (75%) et les 19 autres mélanomes provenaient du groupe non muté pour le gène *EZH2* (32%), sans différence

significative entre les 2 groupes ($p=0,10$, OR= 6,27 IC 95% [0.4691 ; 347.1581]) (Tableau IV).

Tableau IV :Caractéristiques histologiques et statut *BRAF*

	<i>EZH2</i> muté		<i>EZH2</i> non muté	<i>p</i>
	n=4 (%)	n=60 (%)		
Caractéristiques histologiques				
Type histologique				
SSM	3 (75%)	17 (28%)		0,08*
non SSM	1 (25%)	43 (72%)	OR = 7,3 IC 95%[0.5451 ; 406.288]	
Ulcération				
oui	4 (100%)	27 (45%)		0,049*
non	0 (0%)	33 (55%)	OR = $+\infty$ IC 95%[0.7338 ; $+\infty$]	
Régression				
oui	0 (0%)	8 (13%)		1*
non	4 (100%)	52 (87%)		
Indice de Breslow (mm)				
moyenne	6,5 \pm 3,05	4,3 \pm 3,5		0,12†
médiane	7,35	3,35	IC 95%[-1.3581 ; 5.7934]	
extrêmes	2,3-9	0,2-18		
Statut <i>BRAF</i>				
muté	3 (75%)	19 (32%)		0,10*
non muté	1 (25%)	41 (68%)	OR= 6.27 IC 95%[0.4691 ; 347.1581]	

*test exact de Fisher

†test de Wilcoxon

OR Odds-ratio

d) Stade au diagnostic :

Trois des 4 mélanomes ayant une mutation d'*EZH2* étaient de stade II C et pour le dernier, il s'agissait d'un mélanome de stade II B. Dans le groupe des non mutés, l'on comptait : 4 mélanomes de stade I A, 12 de stade I B, 15 de stade II A, 5 de stade II B, 19 au stade II C, aucun pour les stades III A et III B, 1 de stade III C et enfin 4 de stade IV. Au total, cela correspondait à 29 mélanomes de stade supérieur ou égal à II B dans le groupe non muté versus 4 dans le groupe muté (Figure 6). Si l'on prenait en compte le critère de jugement principal, en excluant tous les mélanomes métastatiques (métastases ganglionnaires ou viscérales à distance, soit 5 patients), il y avait, dans le groupe non muté, 24 mélanomes dont le stade était supérieur ou égal à II B versus 4 dans le groupe muté ($p=0,031$). Cette différence demeurait significative si l'on incluait les 5 mélanomes métastatiques dans l'analyse ($p=0,048$) (Tableau V).

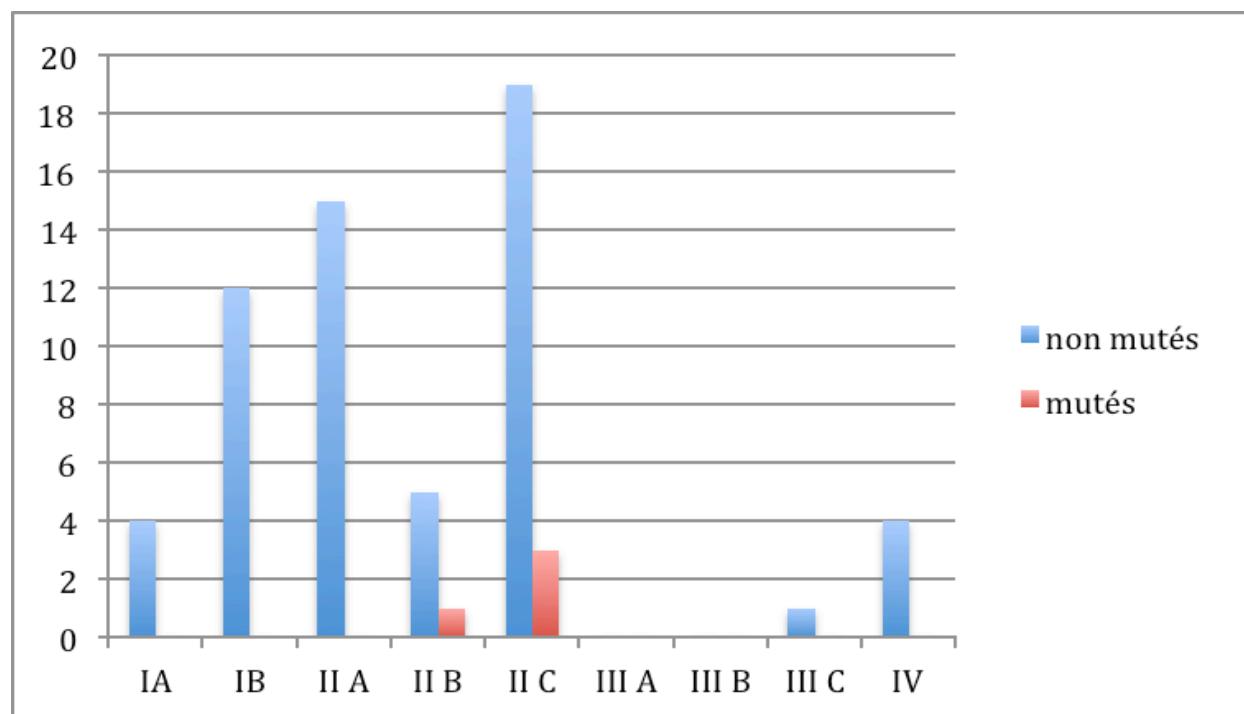


Figure 7 : Histogramme de répartition des différents stades au diagnostic selon la classification de l'AJCC de 2009, tous mélanomes confondus

Tableau V : Répartition des mélanomes en fonction du stade au diagnostic (avant et après stratification en fonction du stade locorégional)

Stade au diagnostic	<i>EZH2</i> muté	<i>EZH2</i> non muté	<i>p</i> *
	n=4 (%)	n=4 (%)	
<II A	0	31 (56%)	0,031
≥IIB	4 (100%)	24 (44%)	
(stades III C et IV exclus)			
<II A	0	31 (52%)	0,048
≥IIB	4 (100%)	29 (48%)	
(stades III C et IV inclus)			
*(test de la somme des rangs de Kruskal-Wallis)			

4) Discussion :

a) Phénotype des mélanomes mutés *EZH2* :

Outre les mutations *BRAF*, *NRAS* et *c-KIT* recherchées en routine, plusieurs autres gènes seraient impliqués dans le mélanome. Le séquençage de ces derniers a pour but de nous guider dans une approche thérapeutique personnalisée et permettrait ainsi l'identification de biomarqueurs prédictifs du profil évolutif, voire même de réponse ou de résistance aux traitements. En 2012, une cartographie génétique d'échantillons tumoraux issus de 135 mélanomes par séquençage du génome entier avait permis de détecter de nombreuses mutations récurrentes plus ou moins connues. Parmi les moins courantes, figuraient *WT1*, *FBXW7* ou *EZH2* avec une prévalence non négligeable de 3% [8]. Même si dans notre étude, une mutation d'*EZH2* était présente chez 6% des mélanomes, soit 2 fois plus que dans la littérature, elle n'est pas aussi fréquente que dans certaines hémopathies telles que dans le lymphome B diffus à grandes cellules (22%), le lymphome folliculaire (7%), les syndromes myélodysplasiques, myéloprolifératifs (10-13%), ou encore la myélofibrose (13%) [37,38]. Des altérations du gène *EZH2* ont été décrites pour la première fois dans les cancers du sein et de la prostate où l'hypothèse qu'*EZH2* agisse comme un proto-oncogène par amplification ou surexpression était soulevée [36,39]. Ces données ont ensuite été validées *in vitro* après confirmation du rôle d'*EZH2* dans l'initiation de la cancérogenèse à partir de fibroblastes ou dans la prolifération de cellules myélomateuses, par exemple. Cliniquement, des mutations du gène *EZH2* seraient associées à un pronostic péjoratif, avec une survie globale diminuée. Dans les pathologies myéloïdes, cela se traduirait par un score IPPS plus élevé et une survie sans maladie abaissée [40,41]. Paradoxalement, des mutations faux-sens et non-sens, à l'origine d'une surexpression dans le premier cas et de la synthèse d'une protéine tronquée dans le deuxième cas, ont été observés dans divers cancers, ce qui a porté à confusion [39]. En effet, cela suggère qu'*EZH2* agisse tantôt comme un proto-oncogène, tantôt comme un gène suppresseur de tumeurs [41,42]. Ainsi, une délétion du chromosome 7 (monosomie) est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans les syndromes myélodysplasiques avec une évolution vers une LAM plus fréquente, le locus du gène *EZH2* étant situé en position 7q36.1 [43].

Dans une étude préliminaire menée en 2006, les auteurs ont tenté de caractériser le profil histo-clinique et évolutif de mélanomes cutanés, de cancers de l'endomètre, de la prostate ou du sein issus d'une cohorte de 696 patients. Dans cette cohorte rétrospective, figuraient 202 mélanomes nodulaires. Une surexpression d'*EZH2* était associée à un indice de Breslow plus élevé qu'en l'absence de surexpression (4,4 mm versus 3,6 mm, $p=0,034$), ainsi qu'un niveau d'invasion de Clark et un index mitotique significativement supérieur. La présence de métastases loco-régionales ou à distance faisait également partie des critères pronostiques. Une augmentation de l'index Ki-67 et l'absence d'expression de p16 en immunohistochimie était corrélée à une majoration du taux de prolifération en cas de surexpression d'*EZH2* [34]. Depuis l'actualisation de la classification de l'AJCC pour le mélanome en 2009, l'indice de Clark n'est plus considéré comme un facteur pronostic et l'indice de Breslow, l'ulcération et l'index mitotique (pour le stade T1) sont les seuls critères pris en compte. Dans cette perspective, il était nécessaire de tenir compte de ces changements pour conforter la théorie qu'une mutation d'*EZH2*, à l'image des hémopathies malignes ou le cancer de la prostate pour lesquels la littérature abonde, soit également associé à un pronostic défavorable dans le mélanome. Malgré la faible puissance de notre étude, nous sommes parvenus à démontrer qu'une mutation d'*EZH2* était plus souvent corrélée à un stade localement avancé avec l'association systématique à une ulcération microscopique. Quant à l'indice de Breslow, la médiane dans le groupe muté était nettement supérieure au groupe non muté (respectivement 7,35 versus 3,35 mm) sans que cette différence ne soit significative. Cela peut non seulement être expliqué par le manque de puissance dû à notre petit effectif, mais également par un biais de sélection indiscutable : nos échantillons sont issus d'une population suivie dans une structure hospitalière pour la plupart d'entre elle. Effectivement, ces derniers étaient principalement destinés au génotypage du gène *BRAF* pour des mélanomes ayant évolué vers le stade métastatique, afin de proposer une thérapie ciblée par anti-*BRAF*. En réalité, en effectuant une étude de cohorte prospective, nous aurions pu éviter ce biais qui gène l'interprétation des résultats, avec des coûts considérables et une période d'inclusion s'étendant sur plusieurs années. Pourtant, une grande partie des biais de confusion a peu été évitée grâce à la recherche prospective de la mutation. A l'heure actuelle, nous disposons de très peu d'éléments qui permettraient de prédire le profil évolutif du mélanome. A indice de Breslow égal, nous ne savons toujours pas pourquoi certains patients évolueront vers un stade métastatique alors que d'autres ne connaîtront pas de dissémination à distance. Le statut pronostique de la régression histologique est très souvent débattu, mais dans notre cas, on note l'absence de ce phénomène chez les 4 patients mutés, suggérant ici le rôle anti-

apoptotique d'EZH2 [15,27]. Le phénomène de régression témoigne d'une réaction immunologique anti-tumorale efficace mais entraîne un retard diagnostique, bien souvent au stade métastatique, car la perte de la pigmentation d'une lésion tumorale diminue la probabilité qu'elle soit dépistée à temps [44]. Il ne s'agit donc pas d'un marqueur pronostic à proprement parler mais plutôt d'un facteur de sous-diagnostic.

b) Hypothèses physiopathologiques :

En règle générale, *EZH2* n'est quasiment pas exprimé dans les naevi composé ordinaires ou dysplasique, ce qui sous-entend qu'ils sont en état de dormance, du moins pas en phase de réplication cellulaire. A l'inverse, les mélanomes invasifs ou avec métastases loco-régionales ganglionnaires présentent une surexpression d'*EZH2* qui atteint un taux paroxystique en présence de métastases viscérales, avec une survie globale à 5 ans qui passe de 71% à 48% [45]. Cela laisse supposer qu'*EZH2* soit en partie responsable de la transformation maligne de naevi préexistants et entretienne ce processus jusqu'à la dissémination métastatique. Néanmoins, selon une étude très récente, une grande majorité (72%) des mélanomes seraient développés de novo et non pas à partir d'un naevus préexistant [46]. Les mélanomes survenant sur naevus dysplasique sont toutefois de pronostic plus péjoratif avec bien souvent un indice de Breslow plus élevé [47]. *EZH2* est suspecté de causer la perte de la sénescence mélanocytaire dans les mélanomes, comparé aux naevi, via l'inhibition du complexe p21/CDKN1a et la voie de la protéine p53 [48]. Pour les mélanomes de novo, l'hypothèse la plus plausible est qu'un emballlement du cycle cellulaire conduise à l'apparition du mélanome. Nous avons vu précédemment que l'expression de *p16*, un gène suppresseur de tumeur codé par le gène *CDKN2A* et qui bloque la cellule en phase G1, était inhibée par *EZH2*. Dernièrement, l'analyse immunohistochimique de l'expression de *p16* et d'autres protéines impliquées dans la voie des MAPK-kinases effectuée sur un panel de mélanomes à différents stades (non métastatiques pour la majorité) ainsi que des naevi bénins, a permis de démontrer que l'absence d'expression de *p16* était corrélée à un pronostic défavorable avec un stade plus avancé (davantage d'ulcération et un indice de Breslow plus élevé) et une survie globale sans récidive inférieure, indépendamment des autres facteurs pronostiques péjoratifs, à savoir l'indice de Breslow, l'ulcération ou le stade tumoral [49]. Dès lors, 2 mécanismes complémentaires peuvent expliquer ce profil agressif. D'une part, des mutations somatiques de *CDKN2A* (une délétion serait présente dans 38% des mélanomes) entraîneraient l'absence

d'expression de *p16*, avec une levée d'inhibition sur le recrutement des sous-unités de PRC2, en particulier EZH2 [8,18,23]. D'autre part, c'est l'expression aberrante d'*EZH2* qui conduirait à l'inhibition de *p16*. D'après Asangani et al, une délétion de *CDKN2A* serait souvent associée à une délétion de mi-R31, un mi-ARN qui bloque habituellement la transcription d'*EZH2*, de part la proximité de leur loci tous deux situés sur la région 9p21. Même en l'absence de délétion de *CDKN2A*, l'expression de mi-R31 est toujours abaissée dans les mélanomes, par surexpression d'*EZH2* [50].

L'association de mutations du codon 641 d'*EZH2* avec 4 cas de mélanomes ne paraît pas fortuite. Il s'agit du même exon impliqué dans les pathologies lymphoïdes (lymphomes B diffus à grandes cellules et lymphomes folliculaires), mais à plus petite échelle [16,51-53]. En effet, dans les hémopathies lymphoïdes, la prévalence de la mutation du codon 641 d'*EZH2* est de 22% contrairement à 6% dans notre étude portant sur le mélanome. Par analogie, nous pouvons supposer que ces mutations causeraient une surexpression d'*EZH2*, avec toutes les conséquences physiopathologiques déjà connues dans certains lymphomes. Ces hypothèses méritent d'être vérifiées grâce à une étude de plus grande ampleur, car cela pourrait expliquer en partie le profil évolutif de certains mélanomes agressifs. Si tel est le cas, cela constituerait une avancée indéniable dans la compréhension des mécanismes de l'oncogenèse, avec des implications thérapeutiques exploitables dans un futur proche.

Des mutations somatiques affectant *CDK4* ont également été identifiées, avec une prévalence de 3%, et seraient impliquées dans la cancérogenèse du mélanome [8,54]. Encore une fois, elles font appel à EZH2 via la voie CDK4/6-pRb-E2F1 : CDK4 et CDK6 sont des régulateurs du cycle cellulaire qui stimulent la transition de la phase G1 à la phase S, par phosphorylation de pRb et permettant ainsi le recrutement d'EZH2 par E2F [23,55]. En cas d'amplification de *CDK4*, la phosphorylation de pRb est quasi-permanente de même que le recrutement d'EZH2 par E2F, conduisant à l'entretien de la prolifération des cellules cancéreuses, comme dans le glioblastome (prolifération des cellules cancéreuses développées à partir des cellules gliales) [56,57]. Un tel scénario pourrait être étendu au mélanome. Par ailleurs, une stimulation de CDK4 par différents signaux, entretiendrait ce phénomène, en particulier si des protéines de la voie des MAP-Kinases sont hyper-activées (mutation de NRAS, BRAF...) ou si des thérapies ciblées sont administrées, via certains mécanismes de résistance [8]. De même, chez les souris knock-down pour la mutation BRAF^{V600E}, il a été observé une suppression de

l'expression d'*EZH2*. En effet, non seulement *EZH2* exerce une activation de la voie des MAP-kinases à l'origine de la prolifération cellulaire, mais en parallèle, la mutation *BRAF*^{V600E}, via des mécanismes épigénétiques encore non élucidés, est responsable d'une méthylation du gène *EZH2*, suggérant le rôle crucial de ce dernier dans la cancérogenèse du mélanome [58]. Dans cette perspective, un déficit en protéine *PTEN* est constaté dans environ 25% des mélanomes et est à l'origine d'une réactivation de la voie PI3-AKT-mTOR et donc une répression de PRC2 et ses sous-unités, dont *EZH2*. Cela conduit à une dérépression de la transcription de certains gènes dont des proto-oncogènes et favoriser la prolifération des cellules cancéreuses [59]. De même, une activation de la protéine AKT a récemment été incriminée dans la physiopathologie de l'ulcération des mélanomes, en réponse à une hypoxie cellulaire. Or, cette activation peut-être expliquée par la délétion de *PTEN* précédemment rapportée, responsable d'une stimulation de CDK4 et donc une inhibition d'*EZH2* [26,60].

Ainsi, il semblerait qu'*EZH2* soit un élément important impliqué dans toutes les voies de signalisation cellulaires participant à la cancérogenèse, en passant par la voie des MAP-kinases, la voie PI3-AKT-mTOR, NFKB ou encore diverses voies de l'épigénétique.

c) Perspectives thérapeutiques:

Dans l'innovation pharmaceutique, la recherche contre le cancer repose sur la découverte de molécules anti-cancéreuses ciblées sur les cellules tumorales, tout en épargnant les cellules saines, et avec le moins d'effets secondaires attendus. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des cibles thérapeutiques qui soient quasi-exclusivement exprimées dans la cellule cancéreuse, ce qui est le cas de la protéine *EZH2*, dont l'avantage principal est son expression à peine décelable dans la cellule normale [61]. Les altérations épigénétiques sont réversibles et permettent la restauration d'un cycle cellulaire « normal », en favorisant la senescence cellulaire ou l'apoptose. Comme il a été suggéré précédemment, en ciblant *EZH2*, ce n'est pas une mais plusieurs voies de signalisation cellulaires qui sont visées. Cela permettrait de remédier aux problèmes de résistance rencontrés sous inhibiteurs de la voie des MAP-kinases en mono ou poly-thérapie (anti-*BRAF* seuls ou en association avec les anti-MEK). A l'heure actuelle, de nombreux inhibiteurs des HDAC et des DNMT sont prescrits en pratique courante, tels que le romidepsin, un inhibiteur de HDAC indiqué dans le lymphome T cutané réfractaire

[62]. Récemment, DZNep, un inhibiteur de la S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase (AdoHcy), s'est avéré efficace pour réprimer *EZH2* et induire la transcription des gènes cibles impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. Pour l'instant, c'est l'inhibiteur d'*EZH2* le plus évalué en cancérologie. Par divers mécanismes, il induit l'apoptose des cellules cancéreuses dans les cancers du sein et de la prostate, tout en épargnant les cellules normales, en diminuant les taux des composants de PRC2 et ainsi réactiver des gènes réprimés dans la survie cellulaire et l'apoptose [63,64]. Dans le cancer du colorectal, l'action de DZNep était concrétisée par une diminution de la phosphorylation d'AKT et une augmentation de l'expression de *PTEN*, uniquement dans les cellules cancéreuses [65]. Quant au cancer bronchique non à petites cellules, l'effet observé de DZNep sur les cellules tumorales était un arrêt du cycle à la phase G1, avec une disparition du taux d'H3K27me3, due à l'inhibition de l'expression d'*EZH2* [66]. Dans un essai portant sur les mécanismes d'action de DZNep dans le cancer du poumon, il s'est avéré qu'il régulait également l'expression d'autres histones méthyltransférases, ce qui atteste de sa capacité à agir sur plusieurs voies épigénétiques [67]. Plusieurs études sur le cancer gastrique et le cancer de la thyroïde ont démontré que l'administration de DZNep conduisait à une diminution de la délétion de *p53* dans les cellules cancéreuses [68,69]. La modification du statut génomique de *p53* apparaît alors comme un marqueur spécifique de la réponse des cellules tumorales au traitement. Une réponse similaire a été constatée dans le carcinome épidermoïde cutané et de la langue [70,71]. Cette molécule a également fait ses preuves dans les hémopathies malignes, notamment dans le myélome, dans lequel il a été observé, non seulement une apoptose des plasmocytes anormaux, mais également qu'une surexpression de *Bcl-2* était associée à une faible réponse tumorale [72]. Dans la LAM, ce sont les cellules souches leucémique de phénotype CD34 (+) CD38 (-) qui sont la cible privilégiée de cette molécule et sont induites en apoptose [73]. DZNep aurait le pouvoir de rétablir la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, notamment les érythroblastes, avec des applications thérapeutiques multiples en hématologie, de l'anémie à la LAM [74]. Dans le lymphome, plus particulièrement en présence d'une mutation du codon 641 d'*EZH2*, un autre inhibiteur d'*EZH2*, GSK126 s'est révélé efficace dans l'inhibition de la croissance des cellules lymphomateuses, par réactivation de l'expression de nombreux gènes suppresseurs de tumeurs, dont les transcrits étaient biologiquement décelables [75]. La tendance actuelle pencherait davantage vers l'association d'une chimiothérapie anticancéreuse à un inhibiteur d'HMT ou de thérapies épigénétiques combinées : dans le carcinome épidermoïde de langue, DZNep potentialise l'effet de 5-FU ; dans le lymphome du manteau,

c'est en association avec un pan-inhibiteur d'histones désacétylases que la réponse tumorale in vitro et in vivo est obtenue avec une augmentation des taux de CdK1, p16 et p21; en association avec l'herceptin, DZNep semble donner de bons résultats dans le cancer du sein [71,76,77].

Au total, les résultats des inhibiteurs d'EZH2 semblent prometteurs dans le traitement de nombreux cancers et ces derniers mériteraient d'être sérieusement évalués dans le mélanome. A notre connaissance, aucun essai expérimentant DZNep dans le mélanome n'est en cours. Cependant, nous sommes probablement limités par l'instabilité chromosomique observée dans de nombreuses études. Ainsi, il est accusé d'être à l'origine d'une modulation de l'activité d'autres méthyltransférases et donc d'avoir un effet proto-oncogène, ce qui peut constituer un facteur limitant non négligeable pour initier ce genre d'études [67].

5) Conclusion :

EZH2 est un gène essentiel responsable de la répression épigénétique de nombreux gènes cibles impliqués dans plusieurs phénomènes physiologiques. Des mutations récurrentes à type de mutations faux-sens et conduisant à une répression de gènes suppresseurs de tumeurs sont en cause dans bon nombre de cancers. Même s'il s'agit d'une mutation récurrente de faible prévalence dans le mélanome (6%), sa participation à l'oncogenèse de ce cancer est sûrement sous-estimée car il joue un rôle majeur dans plusieurs voies de signalisation cellulaires déréglementées. Des mutations du codon 641 d'*EZH2* ont déjà été rapportées dans les hémopathies lymphoïdes. Nous sommes parvenus à démontrer qu'une mutation d'*EZH2* était fréquemment associée à des facteurs de mauvais pronostic, ce qui nous laisse penser qu'il agirait comme un proto-oncogène. Actuellement, il existe de nouveaux inhibiteurs d'*EZH2* qui laissent présager de résultats satisfaisants, qu'il conviendra de vérifier dans le mélanome.

Références bibliographiques

1. Leccia M-T, Planchamp F, Sassolas B, Combemale P, Modiano P, Bedane C, Cupissol D, et al. Prise En Charge Thérapeutique Des Patients Atteints D'un Mélanome Cutané Métastatique : Recommandations Nationales Françaises. *Annales de Dermatologie et de Vénérérologie* 141, no. 2 (February 2014): 111–121.
2. Miller A, et Mihm M. Melanoma. *New England Journal of Medicine* 355, no. 1 (2006): 51–65.
3. Howlader, N, AM Noone, M Krapcho, J Garshell, N Neyman, SF Altekruse, CL Kosary, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, *National Cancer Institute* (April 2013). http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/.
4. Bhatia S, Tykodi S, et Thompson J. Treatment of Metastatic Melanoma: An Overview. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 23, no. 6 (May 2009): 488–496.
5. Thompson J, Scolyer R, et Kefford R. Cutaneous Melanoma. *The Lancet* 365, no. 9460 (February 2005): 687–701.
6. Davies H, Bignell G, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* 417, no. 6892 (June 27, 2002): 949–954.
7. Chapman, P, Hauschild A, Robert C, Haanen J, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *New England Journal of Medicine* 364, no. 26 (2011): 2507–2516.
8. Hodis E, Watson I, Kryukov G, Arold S, Imielinski M, Theurillat J-P, Nickerson E, et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* 150, no. 2 (July 20, 2012): 251–263.
9. Balch, C, Gershenwald J, Soong S-j, Thompson J, Atkins M, Byrd D, Buzaid A, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology* 27, no. 36 (December 20, 2009): 6199–6206.
10. Ardekani S, Gholamreza, Jafarnejad S, Tan L, Saeedi A, et Li G. The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* 7, no. 10 (October 9, 2012).
11. Long G, Menzies A, Nagrial A, Haydu L, Hamilton A, Mann G, Hughes T, Thompson J, Scolyer R, et Kefford R. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 29, no. 10 (April 1, 2011): 1239–1246.
12. Cao, R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones R, et Zhang Y. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. *Science* 298, no. 5595 (November 1, 2002): 1039–1043.

13. Cao R, et Zhang Y. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Molecular Cell* 15, no. 1 (July 2, 2004): 57–67.
14. Cao R, et Zhang Y. The Functions of E(Z)/EZH2-Mediated Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Current Opinion in Genetics & Development* 14, no. 2 (April 2004): 155–164.
15. Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, et Reinberg D. Different Ezh2-Containing Complexes Target Methylation of Histone H1 or Nucleosomal Histone H3. *Molecular Cell* 14, no. 2 (April 23, 2004): 183–193.
16. Wigle T, Knutson S, Jin L, Kuntz K, Pollock R, Richon V, Copeland R et Scott P. The Y641C Mutation of EZH2 Alters Substrate Specificity for Histone H3 Lysine 27 Methylation States. *FEBS Letters* 585, no. 19 (October 3, 2011): 3011–3014.
17. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock C, Dynlacht B, et Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 Maintain Repressive Chromatin through Different Mechanisms. *Molecular Cell* 32, no. 4 (November 21, 2008): 503–18.
18. Marchesi I et Bagella L. Role of Enhancer of Zeste Homolog 2 Polycomb Protein and Its Significance in Tumor Progression and Cell Differentiation, Chromatin Remodelling (2013). Dr. Danuta Radzioch (Ed.), ISBN: 978-953-51-1087-3.
19. Mulder K, Wang X, Escriu C, Ito Y, Schwarz R, Gillis J, Sirokmany G, et al. Diverse Epigenetic Strategies Interact to Control Epidermal Differentiation. *Nature Cell Biology* 14, no. 7 (July 2012): 753–763.
20. Ezhkova E, Lien W-H, Stokes N, Pasolli A, Silva J, et Fuchs E. EZH1 and EZH2 Cogovern Histone H3K27 Trimethylation and Are Essential for Hair Follicle Homeostasis and Wound Repair. *Genes & Development* 25, no. 5 (March 1, 2011): 485–498.
21. Simon J, et Lange C. Roles of the EZH2 Histone Methyltransferase in Cancer Epigenetics. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 647, no. 1–2 (December 1, 2008): 21–29.
22. Varambally S, Dhanasekaran S, Zhou M, Barrette T, Kumar-Sinha C, Sanda M, Ghosh D, et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer. *Nature* 419, no. 6907 (October 10, 2002): 624–29.
23. Bracken A, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, et Helin K. EZH2 Is Downstream of the pRB-E2F Pathway, Essential for Proliferation and Amplified in Cancer. *The EMBO Journal* 22, no. 20 (October 15, 2003): 5323–35.
24. Friedman J, Liang G, Liu C-C, Wolff E, Tsai Y, Ye W, Zhou X, et Jones P. The Putative Tumor Suppressor microRNA-101 Modulates the Cancer Epigenome by Repressing the Polycomb Group Protein EZH2. *Cancer Research* 69, no. 6 (March 15, 2009): 2623–29.
25. Chen S, Bohrer L, Rai A, Pan Y, Gan L, Zhou X, Bagchi A, Simon J, et Huang H. Cyclin-Dependent Kinases Regulate Epigenetic Gene Silencing through Phosphorylation of EZH2. *Nature Cell Biology* 12, no. 11 (November 2010): 1108–14.

26. Cha T-L, Zhou B, Xia W, Wu Y, Yang C-C, Chen C-C, Ping B, Otte A, et Hung M-C. Akt-Mediated Phosphorylation of EZH2 Suppresses Methylation of Lysine 27 in Histone H3. *Science* 310, no. 5746 (October 14, 2005): 306–10.
27. Tsang D, et Cheng A. Epigenetic Regulation of Signaling Pathways in Cancer: Role of the Histone Methyltransferase EZH2. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26, no. 1 (2011): 19–27.
28. Crea F, Hurt E, Mathews L, Cabarcas S, Sun L, Marquez V, Danesi R, et Farrar W. Pharmacologic Disruption of Polycomb Repressive Complex 2 Inhibits Tumorigenicity and Tumor Progression in Prostate Cancer. *Molecular Cancer* 10 (April 18, 2011): 40.
29. Kondo Y, Shen L, Cheng A, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, Yamochi T, et al. Gene Silencing in Cancer by Histone H3 Lysine 27 Trimethylation Independent of Promoter DNA Methylation. *Nature Genetics* 40, no. 6 (June 2008): 741–50.
30. Feinberg A, Ohlsson R, et Henikoff S. The Epigenetic Progenitor Origin of Human Cancer. *Nature Reviews. Genetics* 7, no. 1 (January 2006): 21–33.
31. Richter G, Plehm S, Fasan A, Rössler S, Unland R, Bennani-Baiti I, Hotfilder M, et al. EZH2 Is a Mediator of EWS/FLI1 Driven Tumor Growth and Metastasis Blocking Endothelial and Neuro-Ectodermal Differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 13 (March 31, 2009): 5324–29.
32. Tang X, Milyavsky M, Shats I, Erez N, Goldfinger N, et Rotter V. Activated p53 Suppresses the Histone Methyltransferase EZH2 Gene. *Oncogene* 23, no. 34 (June 21, 2004): 5759–5769.
33. Gonzalez M, Li X, Toy K, DuPrie M, Ventura A, Banerjee M, Ljungman M, Merajver S, et Kleer C. Downregulation of EZH2 Decreases Growth of Estrogen Receptor-Negative Invasive Breast Carcinoma and Requires BRCA1. *Oncogene* 28, no. 6 (February 12, 2009): 843–53.
34. Bachmann I, Halvorsen O, Collett K, Stefansson I, Straume O, Haukaas S, Salvesen H, Otte A, et Akslen L. EZH2 Expression Is Associated with High Proliferation Rate and Aggressive Tumor Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium, Prostate, and Breast. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 24, no. 2 (January 10, 2006): 268–73.
35. Bryant, R J, Cross N, Eaton C, Hamdy F, et Cunliffe V. EZH2 Promotes Proliferation and Invasiveness of Prostate Cancer Cells. *The Prostate* 67, no. 5 (April 1, 2007): 547–56.
36. Karanikolas B, Figueiredo M, et Wu L. Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste 2 Is an Oncogene That Promotes the Neoplastic Transformation of a Benign Prostatic Epithelial Cell Line. *Molecular Cancer Research: MCR* 7, no. 9 (September 2009): 1456–65.
37. McCabe M, Graves A, Ganji G, Diaz E, Halsey W, Jiang Y, Smitheman K, et al. Mutation of A677 in Histone Methyltransferase EZH2 in Human B-Cell Lymphoma Promotes

Hypertrimethylation of Histone H3 on Lysine 27 (H3K27). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, no. 8 (February 21, 2012): 2989–94.

38. Chase A, Cross N. Aberrations of EZH2 in Cancer. *Clinical Cancer Research* 17, no. 9 (May 1, 2011): 2613–18.
39. Roy D, Walsh L, et Chan T. Driver Mutations of Cancer Epigenomes. *Protein & Cell* 5, no. 4 (April 2014): 265–96.
40. Guglielmelli, P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, Fanelli T, et al. EZH2 Mutational Status Predicts Poor Survival in Myelofibrosis. *Blood* 118, no. 19 (November 10, 2011): 5227–34.
41. Khan S, Jankowska A, Mahfouz R, Dunbar A, Sugimoto Y, Hosono N, Hu Z, et al. Multiple Mechanisms Deregulate EZH2 and Histone H3 Lysine 27 Epigenetic Changes in Myeloid Malignancies. *Leukemia* 27, no. 6 (June 2013): 1301–9.
42. Ernst T, Chase A, Score J, Hidalgo-Curtis C, Bryant C, Jones A, Waghorn K, et al. Inactivating Mutations of the Histone Methyltransferase Gene EZH2 in Myeloid Disorders. *Nature Genetics* 42, no. 8 (August 2010): 722–26.
43. Nikoloski G, Langemeijer S, Kuiper R, Knops R, Massop M, Tönnissen E, van der Heijden A, et al. Somatic Mutations of the Histone Methyltransferase Gene EZH2 in Myelodysplastic Syndromes. *Nature Genetics* 42, no. 8 (August 2010): 665–67.
44. McKay K, Moore P, Smoller B, et Hiatt K. Association between Natural Killer Cells and Regression in Melanocytic Lesions. *Human Pathology* 42, no. 12 (December 2011): 1960–64.
45. McHugh J, Fullen D, Ma L, Kleer C, et Su L. Expression of Polycomb Group Protein EZH2 in Nevi and Melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 34, no. 8 (2007): 597–600.
46. Betti, R, Santambrogio R, Cerri A, Vergani R, Moneghini L, and Menni S. Observational Study on the Mitotic Rate and Other Prognostic Factors in Cutaneous Primary Melanoma Arising from Naevi and from Melanoma de Novo. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, February 14, 2014.
47. Weatherhead, S C, Haniffa M, and Lawrence C. Melanomas Arising from Naevi and de Novo Melanomas--Does Origin Matter? *The British Journal of Dermatology* 156, no. 1 (January 2007): 72–76.
48. Fan T, Jiang S, Chung N, Alikhan A, Ni C, Lee C-C, et Hornyak T. EZH2-Dependent Suppression of a Cellular Senescence Phenotype in Melanoma Cells by Inhibition of p21/CDKN1A Expression. *Molecular Cancer Research : MCR* 9, no. 4 (April 2011): 418–29.
49. Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldberg P, Schmidt H, Hamilton-Dutoit S J, et Steiniche T. Immunohistochemical Analysis of Molecular Drivers in Melanoma Identifies p16 as an Independent Prognostic Biomarker. *Journal of Clinical Pathology*, March 7, 2014.

50. Asangani , Harms P, Dodson L, Pandhi M, Kunju L, Maher C, Fullen D, et al. Genetic and Epigenetic Loss of microRNA-31 Leads to Feed-Forward Expression of EZH2 in Melanoma. *Oncotarget* 3, no. 9 (August 31, 2012): 1011–25.
51. Guo S, Chan J, Iqbal J, McKeithan T, Fu K, Meng B, Pan Y, et al. EZH2 Mutations in Follicular Lymphoma from Different Ethnic Groups and Associated Gene Expression Alterations. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, March 14, 2014.
52. Ryan R, Nitta M, Borger D, Zukerberg L, Ferry J, Harris N, Iafrate J, Bernstein B, Sohani A, et Le L. EZH2 Codon 641 Mutations Are Common in BCL2-Rearranged Germinal Center B Cell Lymphomas. *PLoS One* 6, no. 12 (2011): e28585.
53. Yap D, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng S-W, Moradian A, Morin R, et al. Somatic Mutations at EZH2 Y641 Act Dominantly through a Mechanism of Selectively Altered PRC2 Catalytic Activity, to Increase H3K27 Trimethylation. *Blood* 117, no. 8 (February 24, 2011): 2451–59.
54. Young R, Waldeck K, Martin C, Foo J, Cameron D, Kirby L, Do H, et al. Loss of CDKN2A Expression Is a Frequent Event in Primary Invasive Melanoma and Correlates with Sensitivity to the CDK4/6 Inhibitor PD0332991 in Melanoma Cell Lines. *Pigment Cell & Melanoma Research*, February 3, 2014.
55. Chen H-Z, Tsai S-Y, et Leone G. Emerging Roles of E2Fs in Cancer: An Exit from Cell Cycle Control. *Nature Reviews Cancer* 9, no. 11 (November 2009): 785–97.
56. Qiu S, Huang D, Yin D, Li F, Li X, Kung H-F, et Peng Y. Suppression of Tumorigenicity by MicroRNA-138 through Inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 Signal Loop in Glioblastoma Multiforme. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1832, no. 10 (October 2013): 1697–1707.
57. Alonso M., Fueyo J, Shay J, Aldape K, Jiang H, Lee O-H, Johnson D, et al. Expression of Transcription Factor E2F1 and Telomerase in Glioblastomas: Mechanistic Linkage and Prognostic Significance. *Journal of the National Cancer Institute* 97, no. 21 (November 2, 2005): 1589–1600.
58. Hou P, Liu D, Dong J, et Xing M. The BRAF(V600E) Causes Widespread Alterations in Gene Methylation in the Genome of Melanoma Cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 11, no. 2 (January 15, 2012): 286–95.
59. Kaur M, et Cole M. MYC Acts via the PTEN Tumor Suppressor to Elicit Autoregulation and Genome-Wide Gene Repression by Activation of the Ezh2 Methyltransferase. *Cancer Research* 73, no. 2 (January 15, 2013): 695–705.
60. Bezrookove V, Semir D, Nosrati M, Tong S, Wu C, Thummala S, Dar A, et al. Prognostic Impact of PHIP Copy Number in Melanoma: Linkage to Ulceration. *The Journal of Investigative Dermatology* 134, no. 3 (March 2014): 783–90.

61. Takawa M, Masuda K, Kunizaki M, Daigo Y, Takagi K, Iwai Y, Cho H-S, et al. Validation of the Histone Methyltransferase EZH2 as a Therapeutic Target for Various Types of Human Cancer and as a Prognostic Marker. *Cancer Science* 102, no. 7 (2011): 1298–1305.
62. Whittaker S, Demierre M-F, Kim E, Rook A, Lerner A, Duvic M, Scarisbrick J, et al. Final Results from a Multicenter, International, Pivotal Study of Romidepsin in Refractory Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28, no. 29 (October 10, 2010): 4485–91.
63. Tan J, X Yang, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee P, Karuturi M, Tan P, Liu E, et Yu Q. Pharmacologic Disruption of Polycomb-Repressive Complex 2-Mediated Gene Repression Selectively Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Genes & Development* 21, no. 9 (May 1, 2007): 1050–63.
64. Crea F, Hurt E, Mathews L, Cabarcas S, Sun L, Marquez V, Danesi R, and Farrar W. Pharmacologic Disruption of Polycomb Repressive Complex 2 Inhibits Tumorigenicity and Tumor Progression in Prostate Cancer. *Molecular Cancer* 10 (April 18, 2011): 40.
65. Benoit Y, Witherspoon M, Laursen K, Guezguez A, Beauséjour M, Beaulieu J-F, Lipkin S, et Gudas L. Pharmacological Inhibition of Polycomb Repressive Complex-2 Activity Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Stem Cells. *Experimental Cell Research* 319, no. 10 (June 10, 2013): 1463–70.
66. Kikuchi J, Takashina T, Kinoshita I, Kikuchi E, Shimizu Y, Sakakibara-Konishi J, Oizumi S, Marquez V, Nishimura M, et Dosaka-Akita H. Epigenetic Therapy with 3-Deazaneplanocin A, an Inhibitor of the Histone Methyltransferase EZH2, Inhibits Growth of Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 78, no. 2 (November 2012): 138–43.
67. Lee J-K, et Kim K-C. DZNep, Inhibitor of S-Adenosylhomocysteine Hydrolase, down-Regulates Expression of SETDB1 H3K9me3 HMTase in Human Lung Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 438, no. 4 (September 6, 2013): 647–52.
68. Cheng L, Itahana Y, Lei Z, Chia N-Y, Wu Y, Yu Y, Zhang S, et al. TP53 Genomic Status Regulates Sensitivity of Gastric Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep). *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18, no. 15 (August 1, 2012): 4201–12.
69. Cui B, Yang Q, Guan H, Shi B, Hou B, et Ji M. PRIMA-1, a Mutant p53 Reactivator, Restores the Sensitivity of TP53 Mutant-Type Thyroid Cancer Cells to the Histone Methylation Inhibitor 3-Deazaneplanocin A (DZNep). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, February 10, 2014, jc20133147.
70. Choudhury S, Balasubramanian S, Chew Y, Han B, Marquez V, et Eckert R. Epigallocatechin-3-Gallate and DZNep Reduce Polycomb Protein Level via a Proteasome-Dependent Mechanism in Skin Cancer Cells. *Carcinogenesis* 32, no. 10 (October 2011): 1525–32.

71. Li Z, Wang Y, Qiu J, Li Q, Yuan C, Zhang W, Wang D, et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is a Novel Therapeutic Target in Tongue Cancer. *Oncotarget* 4, no. 12 (December 2013): 2532–49.
72. Xie Z, Bi C, Cheong L-L, Liu S, Huang G, Zhou J, Yu Q, Chen C-S, et Chng W. Determinants of Sensitivity to DZNep Induced Apoptosis in Multiple Myeloma Cells. *PLoS One* 6, no. 6 (2011): e21583.
73. Zhou J, Bi C, Cheong L-L, Mahara S, Liu S-C, Tay K-G, Koh T-L, Yu Q, and Chng W-J. The Histone Methyltransferase Inhibitor, DZNep, up-Regulates TXNIP, Increases ROS Production, and Targets Leukemia Cells in AML. *Blood* 118, no. 10 (September 8, 2011): 2830–39.
74. Fujiwara T, Saitoh H, Inoue A, Kobayashi M, Okitsu Y, Katsuoka Y, Fukuwara N, et al. 3-Deazaneplanocin A (DZNep), an Inhibitor of S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase, Promotes Erythroid Differentiation. *The Journal of Biological Chemistry* 289, no. 12 (March 21, 2014): 8121–34.
75. McCabe M, Ott H, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller G, Liu Y, et al. EZH2 Inhibition as a Therapeutic Strategy for Lymphoma with EZH2-Activating Mutations. *Nature* 492, no. 7427 (December 6, 2012): 108–12.
76. Fiskus W, Rao R, Balusu R, Ganguly S, Tao J, Sotomayor E, Mudunuru U, et al. Superior Efficacy of a Combined Epigenetic Therapy against Human Mantle Cell Lymphoma Cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18, no. 22 (November 15, 2012): 6227–38.
77. Hayden A, Johnson P, Packham G, et Crabb S. S-Adenosylhomocysteine Hydrolase Inhibition by 3-Deazaneplanocin A Analogues Induces Anti-Cancer Effects in Breast Cancer Cell Lines and Synergy with Both Histone Deacetylase and HER2 Inhibition. *Breast Cancer Research and Treatment* 127, no. 1 (May 2011): 109–19.

Liste des figures

Figure 1: Inhibition épigénétique de la transcription par les PcG (d'après Marchesi et al ¹⁸)	15
Figure 2: Modèle de la régulation de la protéine <i>EZH2</i> durant le cycle cellulaire	16
Figure 3: Diagramme de flux	25
Figure 4 : Mutation faux-sens du gène <i>EZH2</i> détectée par séquençage Sanger, responsable d'une expression aberrante d' <i>EZH2</i>	26
Figure 5 : Localisation anatomique des mélanomes mutés <i>EZH2</i> et des non mutés	28
Figure 6 : Histogramme de répartition des sous-types histologiques des mélanomes non mutés <i>EZH2</i>	29
Figure 7 : Histogramme de répartition des différents stades des mélanomes à leur diagnostic	31

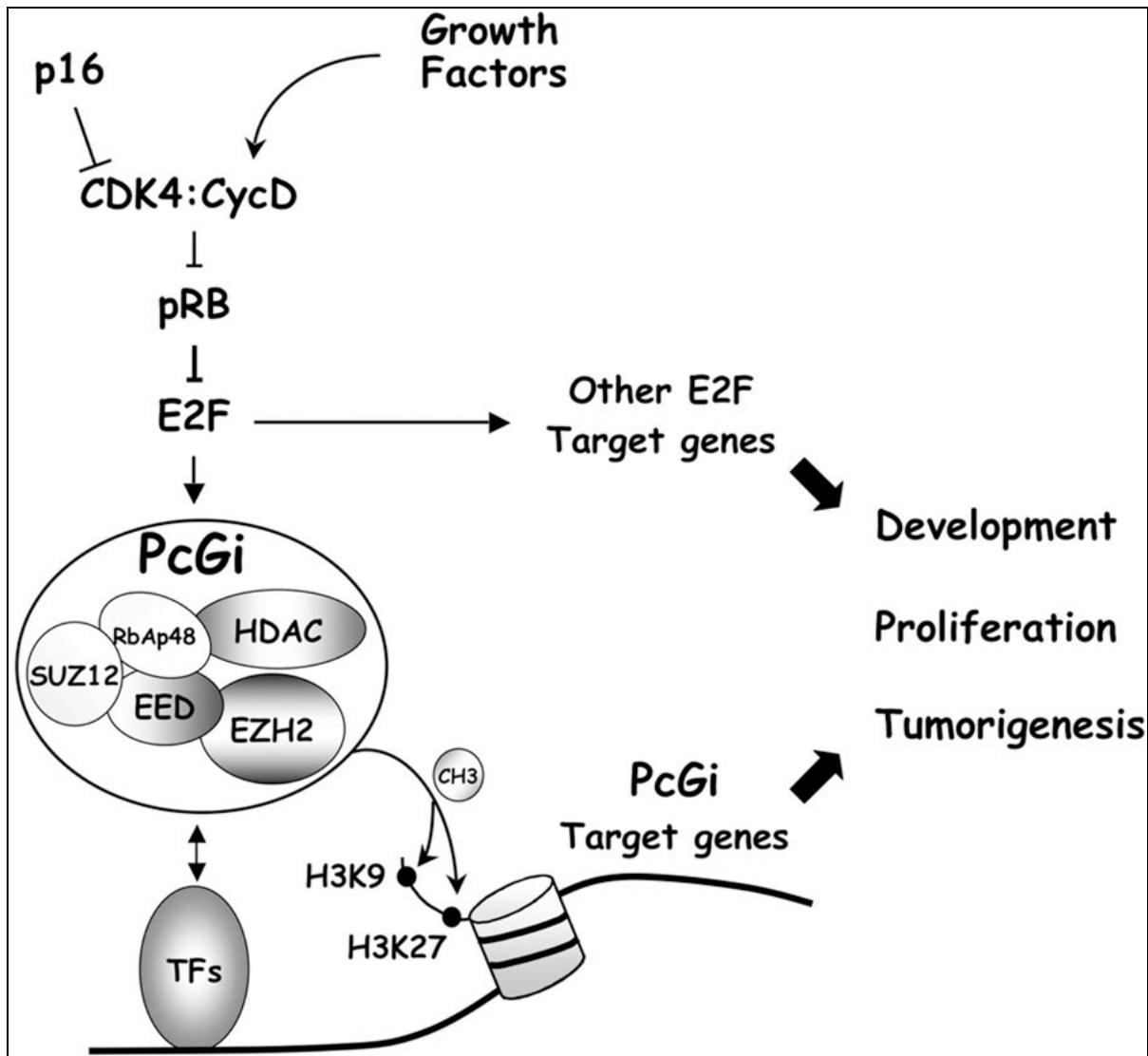
Liste des Tableaux

Tableau I : Cancers dans lesquels est surexprimé <i>EZH2</i> et implications en cancérogenèse (d'après Tsang et Cheng) ²⁷	p 18
Tableau II : Classification TNM du mélanome cutané selon l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) en 2009 ⁹	p 23
Tableau III : Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des mélanomes mutés <i>EZH2</i> et des non mutés	p 27
Tableau IV : Caractéristiques histologiques et statut <i>BRAF</i>	p 30
Tableau V : Répartition des mélanomes en fonction du stade au diagnostic (avant et après stratification en fonction du stade locorégional)	p 32

Table des matières

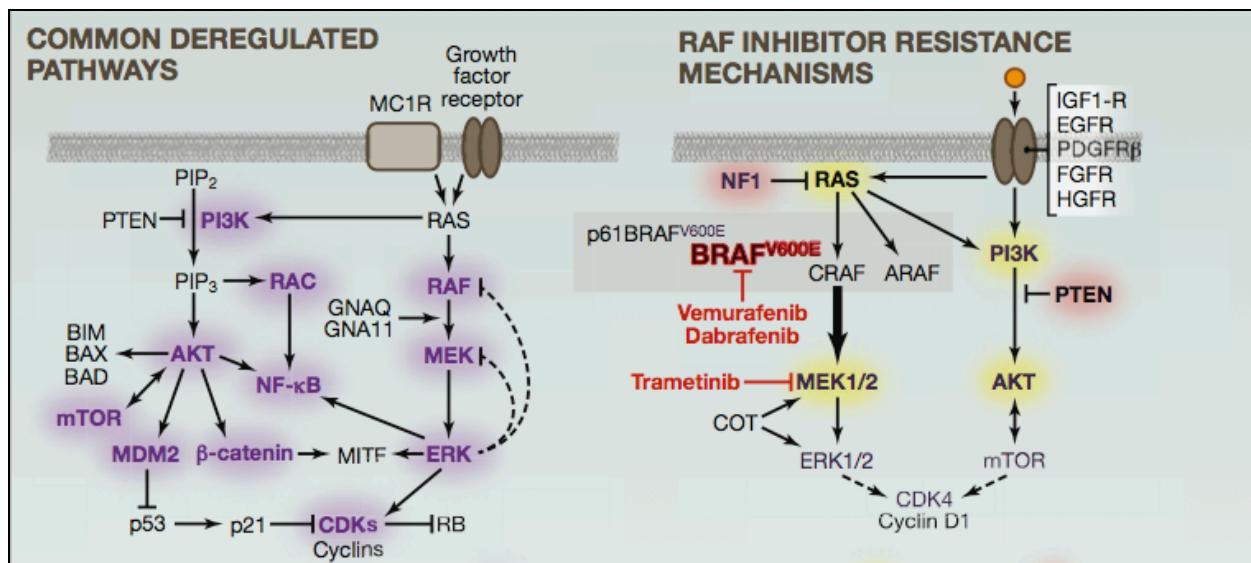
Plan.....	9
Liste des abréviations	10
1) Introduction :	12
a) Généralités sur le mélanome :	12
b) Place du gène <i>EZH2</i> dans l'épigénétique:	13
c) Mutations du gène <i>EZH2</i> et cancérogenèse :	17
b) Objectifs de l'étude :	19
2) Matériels et méthodes :	20
a) Patients :.....	20
b) Matériels :.....	21
c) Critères de jugement :	22
d) Analyse statistique :	24
3) Résultats :.....	25
a) Diagramme de flux	25
b) Caractéristiques cliniques :	26
c) Caractéristiques histologiques et statut <i>BRAF</i> :	28
d) Stade au diagnostic.....	31
4) Discussion :	33
a) Phénotype des mélanomes mutés <i>EZH2</i> :	33
b) Hypothèses physiopathologiques :	35
c) Perspectives thérapeutiques:	37
5) Conclusion :.....	40
Références bibliographiques.....	41
Liste des figures	48
Liste des Tableaux.....	49
Table des matières.....	50
Annexes.....	51

Annexes

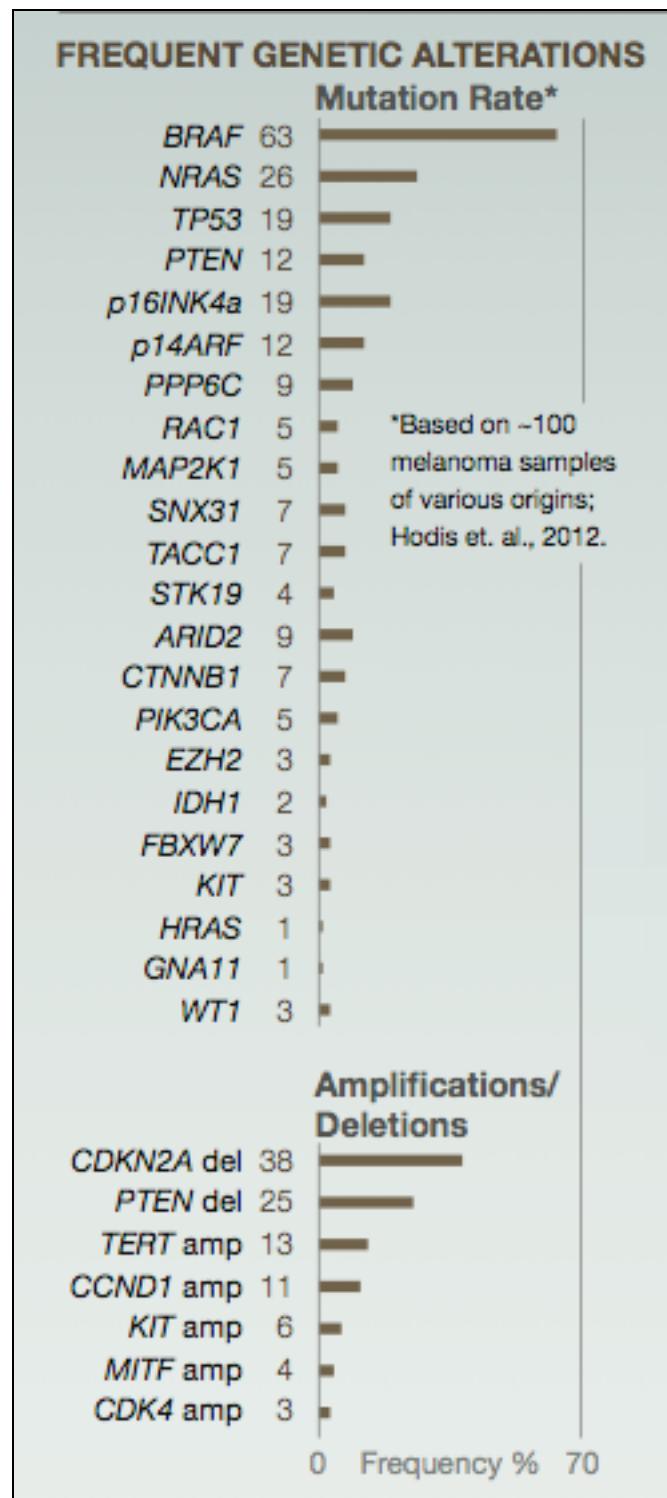


Annexe 1: Modèle décrivant la coopération entre la voie pRb et le complexe PRC2 [25].Chen

CDK4 est un régulateur positif du cycle cellulaire qui stimule la transition de la phase G1 à la phase S, par phosphorylation de pRb, qui ainsi inhiber peut laisser le champ libre à E2F pour recruter les sous-unités de PRC2, notamment EZH2. P16 a la capacité d'inhiber CDK4 et ainsi bloquer la cellule au stade G1.



Annexe 2 : Principales voies de signalisation dérégulées dans le mélanome (rôles de p53, MITF, pRB et CdK en particulier) et mécanismes de résistance aux anti-BRAF (notamment par PTEN, CDK4 et AKT)⁸



Annexe 3 : Prévalence des mutations somatiques les plus fréquentes dans une centaine d'échantillons de mélanomes environ⁸

MARCHAND Angélique

Mutations somatiques du gène EZH2 au cours du mélanome: recherche d'une corrélation entre le génotype tumoral et le phénotype clinique

RESUME

L'oncogénèse du mélanome cutané implique la voie des MAP-kinases, et certaines mutations sont désormais des cibles thérapeutiques en routine. Pourtant, l'histoire naturelle et le pronostic du mélanome sont très variables d'un patient à l'autre, ce qui laisse supposer l'implication d'autres voies d'oncogénèse. Le gène *EZH2* est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs dans plusieurs cancers (prostate, sein, sarcome d'Ewing, glioblastome, leucémie...). L'objectif de notre étude était de déterminer si une mutation d'*EZH2* était associée à des facteurs de mauvais pronostic dans le mélanome. Nous avons effectué un séquençage direct du gène *EZH2* selon la méthode de Sanger dans une cohorte rétrospective et bicentrique de 64 patients pour qui nous disposions de matériel tumoral fixé, initialement destiné au séquençage de *BRAF*. Nous avons comparé les caractéristiques cliniques (âge au diagnostic, sexe, localisation anatomique, localisation en zone photo-exposée, présence de métastases loco-régionales ou à distance), histologiques (ulcération, indice de Breslow, type histologique, régression) et le statut *BRAF*, entre les mélanomes porteurs d'une mutation somatique d'*EZH2* et les non porteurs. 4 mélanomes sur 64 (6,2%) avaient une mutation faux-sens du codon 641 d'*EZH2* aboutissant probablement à sa surexpression. Chez les mélanomes mutés, l'ulcération était plus fréquente et le stade au diagnostic plus avancé. Cette mutation d'*EZH2* serait associée à des facteurs de mauvais pronostic dans le mélanome et pourrait être accessible aux inhibiteurs d'*EZH2* actuellement en cours d'essais.

MOTS-CLES

Mélanome

Epigénétique

EZH2

Histone-méthyl-transférase

Ulcération

Mutation somatique

PRC2

Pronostic

FORMAT

Mémoire

Article¹ :

à soumettre

soumis

accepté pour publication

publié

suivi par : MARTIN Ludovic

¹ statut au moment de la soutenance