



HAL
open science

Évolution du statut braf dans le melanome : mythe ou Réalité ?

Elicia Molines, Aurélie Haffner, Frédéric Fina, Nausicaa Malissen, L'houcine
Ouafik, Jean-Jacques Grob, Nicolas Macagno

► **To cite this version:**

Elicia Molines, Aurélie Haffner, Frédéric Fina, Nausicaa Malissen, L'houcine Ouafik, et al.. Évolution du statut braf dans le melanome : mythe ou Réalité ?. *Annales de Pathologie*, A paraître, 10.1016/j.annpat.2021.11.001 . hal-03545740

HAL Id: hal-03545740

<https://amu.hal.science/hal-03545740v1>

Submitted on 11 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Évolution du statut braf dans le mélanome : mythe ou Réalité ?

Elicia Molines^{a,*}, Aurélie Haffner^a, Frédéric Fina^a,
Nausicaa Malissen^{c,d}, L'Houcine Ouafik^{d,e},
Jean-Jacques Grob^c, Nicolas Macagno^{a,b}

^a Anatomie Pathologique, APHM Timone, Marseille, France

^b Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

^c Dermatologie et cancérologie cutanée, APHM Timone, Marseille, France

^d Aix Marseille Univ, CRCM, Marseille, France

^e Oncologie biologique, APHM Nord, Marseille, France

Résumé La connaissance du statut mutationnel du gène *BRAF* est devenue essentielle dans la prise en charge du mélanome. Les inhibiteurs de B-Raf sont à l'origine d'une nette amélioration de la survie globale chez les patients présentant un mélanome métastatique muté *BRAF* V600. Bien que la mutation *BRAF* soit considérée comme un événement précoce et conducteur (driver), certains travaux ont émis l'hypothèse qu'elle n'était pas stable lors de l'évolution d'un mélanome, impliquant une hétérogénéité moléculaire. Cet argument est souvent utilisé pour expliquer les discordances de statut moléculaire observées chez certains patients atteints de mélanome, discordances occasionnellement rencontrées au cours de notre pratique. Nous avons rétrospectivement comparé le statut mutationnel du gène *BRAF* sur plusieurs prélèvements appariés de mélanome (primitif & localisations secondaires), soit 150 prélèvements pour 56 patients, en utilisant l'immunohistochimie anti-*BRAF*, la PCR-HRM et séquençage Sanger, le séquençage massivement parallèle (NGS) et la PCR digitale. Sept cas présentaient une apparente hétérogénéité tumorale. L'analyse de ces discordances par une technique de sensibilité croissante a permis d'identifier 1 résultat faux-négatif pour l'immunohistochimie, 1 résultat faux-négatif pour le séquençage NGS et 5 (3 %) résultats faux-négatifs par technique PCR-HRM SANGER. Nos résultats sont cohérents avec les données les plus récentes, témoignant de la stabilité de la mutation *BRAF* au cours de l'évolution d'un mélanome. L'immunohistochimie présente une sensibilité excellente pour détecter la mutation majoritaire de *BRAF*. Dans notre étude, l'hétérogénéité mutationnelle était en réalité factice, conséquence d'une sensibilité imparfaite de certaines approches moléculaires plus anciennes.

Summary Knowledge of the *BRAF* mutational status has become essential for melanoma therapeutic management. B-Raf inhibitors are associated with significant overall survival in patients with *BRAFV600*-mutated metastatic melanoma. Although the *BRAF* mutation appears to be an early and driver mutation, some authors hypothesized that its expression was not stable during melanoma progression, suggesting a molecular heterogeneity. This argument is often used to explain discrepancy in molecular status among patients with melanoma, discrepancies that we occasionally met during our practice. We retrospectively compared *BRAF* mutational status on matched melanoma samples (primary & metastatic lesions), thus 150 samples from 56 patients were analysed through immunohistochemistry anti-*BRAF*, PCR-HRM and Sanger sequencing, Next Generation Sequencing (NGS) and digital PCR. Seven cases presented an apparent tumor heterogeneity. The analysis of these discrepancies by a technique of increasing sensitivity made it possible to identify 1 false-negative result for the immunohistochemistry, 1 false-negative result for the NGS sequencing and 5 (3%) false-negative results by PCR-HRM SANGER. Our results are consistent with the most recent data, demonstrating the stability of the *BRAF* mutation during the course of melanoma. Immunohistochemistry shows excellent sensitivity for detecting the main *BRAF* mutation. In our study, the mutational heterogeneity was actually misleading, a result of imperfect sensitivity of some older molecular approaches.

Introduction

La connaissance du statut mutationnel du gène *BRAF* dans le mélanome est essentielle tant les répercussions thérapeutiques sont importantes pour les formes métastatiques ou non-résecables, impliquant une large politique de screening. En effet, la Haute Autorité de Santé recommande une recherche systématique du statut mutationnel *BRAF* pour tous les mélanomes métastatiques et conseille que celle-ci soit réalisée, après avis d'experts, pour les mélanomes à fort risque de rechute soit stade IIC ou stade III avec métastase ganglionnaire loco-régionale. Une mutation spécifique sur le codon V600 est la condition *sine qua non* d'introduction d'un traitement inhibiteur : V600E pour le Vemurafenib [1] et/ou V600K pour le Dabrafenib [2]. Lorsque ces thérapies sont proposées en adjuvant à un stade précoce (stade III), il a été démontré une remarquable réduction de risque de récurrence et de décès [3,4]. Bien que l'immunothérapie soit de plus en plus le traitement de choix, sa cinétique d'action implique d'optimiser les différentes lignes thérapeutiques. L'oncologue doit connaître au plus tôt le statut mutationnel d'un mélanome, idéalement dès l'exérèse du primitif, mais ce dernier l'obtient généralement sur une métastase.

Plusieurs méthodes de déterminations des mutations du gène *BRAF* sont possibles : l'INCa recommande la biologie moléculaire sans toutefois préciser de technologie à privilégier. L'immunohistochimie anti-*BRAF* V600E n'est conseillée que dans certains cas comme les situations d'urgence.

Dans notre centre, l'immunohistochimie anti-*BRAF* est largement pratiquée sur tous les mélanomes. Cette pratique systématique a soulevé des discordances de résultat entre méthodes (immunohistochimie versus biologie moléculaire) et entre prélèvements chez un même patient (mélanome primitif versus métastase) avec émergence des hypothèses suivantes : soit l'une des techniques utilisées, immunohistochimie ou biologie moléculaire, manque de sensibilité et induit des faux-négatifs et donc des discordances, soit le

statut mutationnel de *BRAF* évolue chez un même patient atteint d'un mélanome. Cette seconde hypothèse est importante à déterminer : si la mutation *BRAF* est conservée et reste stable au cours du temps, alors tester un seul prélèvement suffit. A contrario, la politique de test doit être plus exhaustive. Les discordances de statut *BRAF* peuvent aussi n'être qu'apparentes et factices, liées à un manque de performance des technologies utilisées : il faut alors déterminer la ou les techniques à privilégier.

Pour y répondre, nous avons évalué rétrospectivement le statut mutationnel du gène *BRAF* chez des patients pour lesquels nous disposions de plusieurs prélèvements appariés de mélanome. Une attention particulière a été portée sur le contrôle des discordances, en évaluant le statut mutationnel du gène *BRAF* par des approches de sensibilité croissante.

Matériel et méthodes

Sur une période d'un an, les patients pris en charge pour un mélanome, avec examen histopathologique dans le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et Neuropathologie des hôpitaux universitaires de la Timone à Marseille, et dont plusieurs prélèvements tumoraux étaient disponibles (primitif & métastase), ont été retenus pour cette étude. Les patients présentant des histoires cliniques de mélanomes multiples ont été exclus. Au total, 150 prélèvements provenant de 56 patients ont été exploités soit 21 mélanomes primitifs et 129 métastases. Une base de données rétrospective, avec anonymisation complète des données, en accord avec le Règlement Général européen relatif à la Protection des Données personnelles (RGPD, Fiche de déclaration n°2019-100 auprès de l'AP-HM) a été établie et le consentement éclairé des patients a été recueilli.

L'immunohistochimie dirigée contre la forme mutée V600E de la protéine B-Raf a été réalisée sur tous les 150 prélèvements, après confection de coupes de 3,5 µm d'épaisseur, sur automate d'immunohistochimie Benchmark

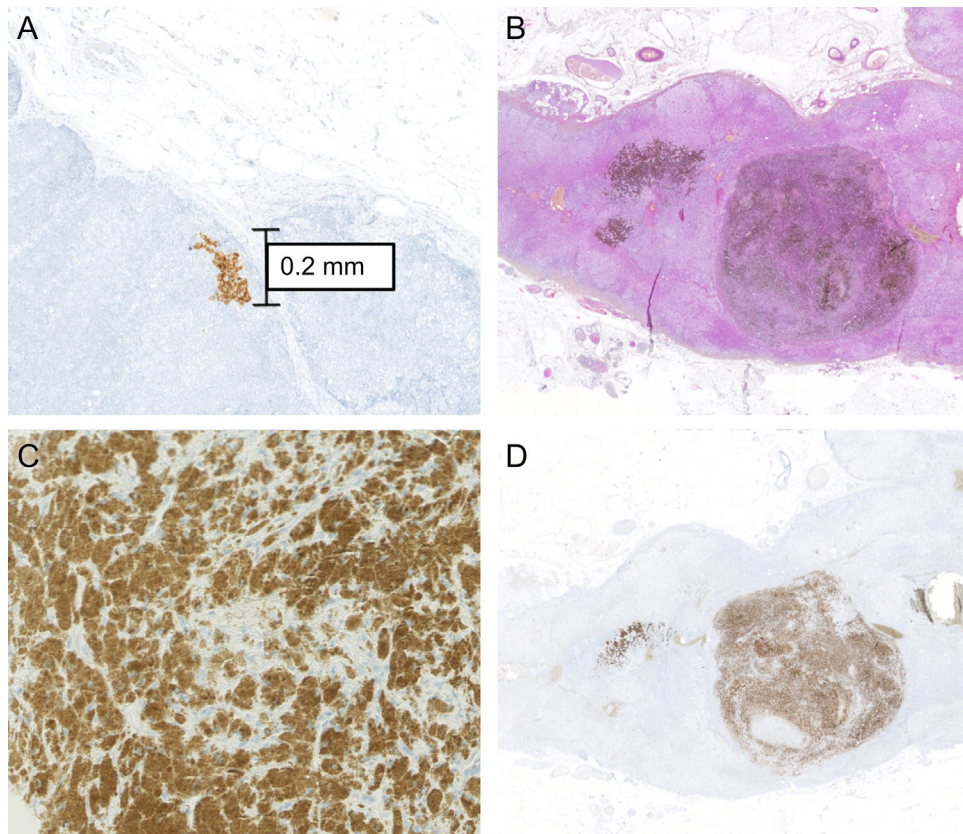


Figure 1. Immunohistochimie anti-BRAF. A. Micrométastase ganglionnaire de mélanome, pauvre en cellules tumorales : très faible cellularité et la taille de cette métastase complique la dissection du matériel pour l'extraction en vue des analyses moléculaires alors que l'immunohistochimie permet d'évaluer la présence de la protéine B-Raf mutée. Ces difficultés techniques peuvent en partie expliquer certains cas faux-négatifs. Dans certains cas, le matériel tumoral s'épuise avec les recoupes ultérieures, d'où l'intérêt d'évaluer le statut mutationnel sur le primitif ou sur des lames déjà colorées. (immunohistochimie anti-BRAF V600E, $\times 200$). B. Métastase pigmentée de mélanome au niveau de la surrénale : dès l'examen morphologique, le pigment est annonciateur de difficultés d'interprétation. C-D. Immunomarquages BRAF douteux ou ininterprétables dans les tumeurs intensément pigmentées ou riches en mélanophage. Un contrôle par biologie moléculaire ou une révélation par un chromogène différent est impérative pour être formel sur le résultat. *Anti-BRAF immunohistochemistry. A. Melanoma lymph node micrometastasis, poor in tumour cells: very low cellularity and the size of this metastasis complicates dissection of the material for extraction for molecular analysis, whereas immunohistochemistry allows assessment of the presence of mutated B-Raf protein. These technical difficulties may partly explain some false-negative cases. In some cases, the tumour material becomes exhausted with subsequent re-cutting, hence the interest in assessing the mutation status on the primary or on previously stained slides. (anti-BRAF V600E immunohistochemistry, $\times 200$) B. Pigmented metastasis of melanoma in the adrenal gland: on morphological examination, the pigment is a sign of interpretation difficulties. C-D. Questionable or uninterpretable BRAF immunostaining in intensely pigmented or melanophage-rich tumours. Molecular biology control or revelation with a different chromogen is imperative to be definitive about the result.*

ULTRA (Ventana, Roche Diagnostics), en utilisant l'anticorps anti-BRAF dirigée contre la forme mutée V600 (clone VE1, Eurobio Scientific), dilution 1 :250, révélation Optiview DAB (Ventana). La confection des lames incluait systématiquement un témoin extrinsèque de mélanome avec mutation de BRAF V600E, prouvée par biologie moléculaire (Fig. 1).

L'interprétation des lames était réalisée en double aveugle par deux pathologistes (NM & EM), avec évaluation consensuelle des cas discordants au microscope multi-tête. Les lames avec artefacts histologiques, bruit de fond, témoin extrinsèque négatif étaient d'abord contrôlées sur une nouvelle coupe d'immunohistochimie avant de conclure. Les cas très riches en pigment mélanique, limitant de fait l'interprétation de la DAB, étaient classés douteux et contrôlés systématiquement par une ou des techniques de biologie moléculaire. Les analyses moléculaires ont été réalisées par trois techniques différentes, PCR-HRM suivi de séquençage Sanger, séquençage massivement parallèle NGS et PCR digitale qui ont été réalisées respectivement sur LightCycler 480 (Roche), séquenceur 3500Dx (Applied

Biosystem™), séquenceur IonS5™ XL System (ThermoFisher) et sur automate QX200™ Droplet Digital TM (Bio-Rad). La PCR digitale était réalisée après macro-dissection des zones contenant les cellules tumorales. L'ADN était ensuite extrait des tissus fixés à l'aide du kit IDXTRACT-mag-FFPE (ID-Solutions, Grabels France) couplé à l'automate IDEAL-32 (ID-Solutions) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN étaient qualifiés et quantifiés grâce à un ADN calibré par gamme étalon externe à l'aide du kit IDQUANTq (ID-Solutions) et de l'appareil de PCR quantitative Mic® (Bio Molecular Systems, Queensland, Australia). Si nécessaire, les ADN étaient dilués ou concentrés (Vivacon 500, Sartorius Göttingen Allemagne) afin de pouvoir effectuer une prise d'essai de dPCR de 8 μ L d'ADN dont la quantité serait comprise entre 1 et 10 ng d'ADN. Concernant la validation d'un dosage de PCR digitale les revues [3] et [4] décrivent les différents étapes nécessaires. Dans notre étude, les échantillons étaient analysés à l'aide d'un jeu d'amorces/sondes spécifiques de la mutation c.1799T > C (p.Val600Glu) dans le gène BRAF. Le test de dPCR était composé d'un duplex

Tableau 1 Analyse des discordances de statut mutationnel BRAF entre mélanome primitif et ses localisations secondaires.

Analysis of BRAF mutation status mismatches between primary melanoma and its secondary sites.

Cas	Métastase	PCR-HRM SANGER	IHC	NGS	dPCR	FA (%)
#1	Peau	(-)	(+)	(+)	/	4,8
#2	Peau	(-)	(+)	(+)	/	97,9
#3	Ganglion	(-)	(+)	(-)	(+)	1,8
#4	Ganglion	(-)	(+)	/	(+)	1,38
#5	Os	(-)	(-)	échec	(+)	37

PCR-HRM SANGER : polymérase chain reaction, high-resolution melting et séquençage SANGER, (+) : positif, (-) : négatif, / : non-réalisés. IHC : immunohistochimie anti-BRAF V600E ; NGS : next generation sequencing (séquençage massivement parallèle) ; dPCR : digital polymérase chain reaction ; FA : fréquence allélique. Les 5 prélèvements discordants renfermaient des métastases de mélanome, dont le mélanome primitif et éventuellement d'autres localisations secondaires présentaient une mutation BRAF V600E, le siège et le détail des résultats selon les techniques réalisées sont détaillés : 5 cas faux-négatifs par PCR-HRM-SANGER, 1 cas faux-négatif en immunohistochimie et 1 cas faux-négatif en NGS.

de sondes marquées : la première sonde marquée HEX cible l'allèle de type sauvage (WT) et la seconde, marquée 6-FAM, cible l'allèle mutant. Les tests proviennent de Bio-Rad (Hercules, California) qui a préalablement déterminé la mesure de la limite de bruit de fond (LoB) et la limite de détection (LoD) du duplex. Ainsi, selon les données fournies par Bio-Rad, la LoD de 3 gouttelettes positives en FAM permet de valider un résultat positif. Les conditions de dPCR ont été réalisées suivant les recommandations du fournisseur. La lignée de colon HT29 était utilisée comme contrôle positif, la lignée pulmonaire H1650 était utilisée comme contrôle non-muté et un contrôle négatif de dPCR, sans ADN, était aussi systématiquement inclus. Excepté 36 prélèvements pour lesquels aucune analyse moléculaire n'a été réalisée, tous les autres prélèvements ont bénéficié de façon rétrospective d'une confirmation moléculaire : 69 par PCR-HRM/Sanger et 45 par NGS.

Au cours de l'étude 6 nouvelles analyses par NGS et 5 par PCR digitale ont été réalisées.

Lorsqu'un résultat négatif était discordant avec les autres prélèvements d'un même patient ou avec une autre analyse, le prélèvement était dans un premier temps recontrôlé en immunohistochimie puis l'ADN initialement extrait était analysé par une approche de sensibilité supérieure. Dans certains cas, l'ADN était ré-extrait, voire une nouvelle zone de tumeur était sélectionnée pour extraction. Le statut mutationnel final d'un prélèvement était déterminé comme positif sur la base de la concordance d'au moins deux techniques positives différentes, et négatif si tous les prélèvements étaient négatifs. Tout résultat rentrant en contradiction avec le statut du mélanome primitif, des localisations secondaires ou d'une technique différente entraînait un contrôle systématique par une ou des techniques de sensibilité supérieure.

Résultats

Pour 47 prélèvements soit 21 patients la mutation *BRAFV600E* a été identifiée par immunohistochimie et dans 70 % des cas confirmé par biologie moléculaire. Pour le reste des prélèvements aucune mutation *BRAFV600E* n'a été retrouvée par l'immunohistochimie, donnée confirmée par la biologie moléculaire pour 60 % des cas.

Le nombre de faux-négatifs était variable selon l'approche utilisée : 5 cas (3,3 %) pour la

PCR-HRM/séquençage Sanger, 1 cas (0,7 %) pour le séquençage NGS et 1 cas (0,7 %) pour l'immunohistochimie anti-BRAF.

En immunohistochimie, 150 prélèvements ont été analysés chez 56 patients. Un seul prélèvement (0,7 %), négatif en immunohistochimie, en PCR-HRM et en séquençage SANGER, rentrait en contradiction avec tous les autres prélèvements BRAF-mutés du patient : une métastase osseuse de mélanome. Le séquençage NGS réalisé sur ce prélèvement était inexploitable. Un contrôle par PCR digitale révéla la présence d'une mutation BRAF pour ce prélèvement (fraction allélique : 37 %).

Concernant la technique de séquençage massivement parallèle NGS, 45 prélèvements ont été analysés chez 33 patients. Un prélèvement s'est révélé négatif en contradiction avec le résultat immunohistochimique et le reste des prélèvements : ce prélèvement a bénéficié d'un contrôle par PCR digitale ce qui a permis d'établir la mutation, avec une fréquence allélique faible évaluée à 1,38 %.

Enfin l'approche par PCR-HRM & séquençage Sanger était la moins efficace, avec 5 prélèvements négatifs contradictoires : 2 cas furent rattrapés par NGS et 3 cas par PCR digitale.

Le prélèvement pour lequel un faux-négatif a été donné par l'IHC correspondait à une métastase osseuse ayant nécessité une décalcification. Or l'impact de la décalcification a été étudié par Bourhis et al. qui a constaté sur des échantillons jumelés non décalcifiés et décalcifiés mutés *BRAFV600E*, la disparition de l'immunomarquage sur les prélèvements décalcifiés [5].

En synthèse, hormis un unique cas de métastase osseuse, tous les cas faux-négatifs via les approches moléculaires présentaient une forte positivité de l'immunohistochimie. Nous ne rapportons pas de cas faux-positif par biologie moléculaire ou immunohistochimie (Tableau 1).

Discussion

L'intérêt d'utiliser des approches diagnostiques de sensibilité croissante a permis de révéler une cohérence de statut mutationnel de *BRAF* entre mélanome primitif et localisations secondaires pour 56 patients, soit 150 prélèvements différents.

En termes de performances diagnostiques, nos résultats sont concordants avec l'abondante littérature

rapportant les excellentes performances diagnostiques de l'immunohistochimie, avec une sensibilité > 98 %, soit des performances supérieures à certaines approches de biologie moléculaire encore utilisées [5–10]. Dans des conditions pré-analytiques optimales, notamment une concentration abondante d'ADN, la fréquence allélique nécessaire à la détection d'une mutation est estimée à 20 % pour le séquençage direct SANGER, 10 % pour la PCR-HRM, 2 % pour le séquençage NGS et 0,0001 % pour la PCR digitale. Les conditions pré-analytiques sont rarement idéales sur tissu fixé en formol et inclus en paraffine et ce, plus particulièrement pour les prélèvements pauvres en cellules tumorales, pour lesquels il est difficile d'obtenir des ADN mutants abondants par rapport aux ADN dégradés ou sauvages. Ces mauvaises conditions deviennent problématiques lorsqu'il s'agit de tester une micrométastase de mélanome, constitué de 50 à 100 cellules et qui n'est présente que sur un unique plan de coupe d'un ganglion sentinelle : dans cette situation l'immunohistochimie anti-BRAF prend tout son sens car il peut être difficile voire impossible de démontrer la présence d'une mutation par des techniques de biologie moléculaire quand le matériel tumoral est si peu abondant.

Le développement de résistances aux anti-BRAF est constant dans l'année où le traitement est introduit [6] et l'hétérogénéité tumorale est la base explicative à la survenue d'un clone résistant. Cependant, la démonstration d'une variation de profil mutationnel entre mélanome primitif et métastase n'est pas claire dans la littérature [7]. Nos résultats sont cohérents avec deux autres études récentes rapportant une parfaite homogénéité du statut mutationnel du gène *BRAF* entre primitif et localisations secondaires en utilisant l'immunohistochimie, alors que 16 % des patients présentaient une apparente hétérogénéité mutationnelle sur la base des résultats moléculaires seuls [11,12]. Ces données sont tout à fait compréhensibles compte-tenu des nombreux biais qui peuvent affecter la sensibilité des approches moléculaires. L'analyse morphologique des prélèvements est un avantage du pathologiste sur le biologiste moléculaire et lui permet une appréciation rigoureuse des zones à analyser et à exclure des analyses. Ces résultats vont à l'encontre des études antérieures, ayant pour point commun des approches moléculaires certes sensibles, mais déconnectées de la morphologie avec des taux de 15 à 55 % d'hétérogénéité moléculaire entre primitif et métastases [13,14] et entre différentes localisations analysées [8–10,15,16]. Il est important de préciser ici que certaines études ont pu démontrer que certains cas d'hétérogénéité étaient liés à la survenue chez un même patient de différents mélanomes primitifs renfermant des panoramas génomiques différents (par exemple, un premier mélanome renfermant une mutation *BRAF* puis un second renfermant une mutation *NRAS*).

S'être intéressé uniquement aux discordances constitue le principal biais de notre étude, une limitation imposée par le coût des techniques : ainsi 25 % des prélèvements ont bénéficié d'une analyse immunohistochimique seule car aucune discordance n'avait été mise en évidence entre les prélèvements pour un même patient.

L'un des autres biais de cette étude concerne l'absence d'analyse de l'hétérogénéité intra-tumorale de l'expression de l'immunomarquage BRAF V600E. Bien que des variations d'intensité de marquage aient pu être observées, aucune analyse de l'hétérogénéité n'a été effectuée. Alors que plusieurs articles relatent une hétérogénéité intra-tumorale [7] du statut BRAF, l'exploitation de ces données aurait pu

contredire l'hypothèse d'une homogénéité du statut BRAF au cours du temps.

Concernant l'évolution du statut BRAF en fonction de l'introduction d'un traitement, 23 % des prélèvements concernaient des patients en cours de traitement ou ayant été traité par inhibiteur de B-Raf, sans association à une modification du statut BRAF au cours du temps. La mutation de *BRAF* constitue un événement précoce et conservé au cours de l'initiation et de la progression des tumeurs mélanocytaires, cette mutation est conservée tant qu'elle confère un avantage sélectif. De manière intéressante, une étude de Schirosi et al. rapporte une diminution de l'intensité d'expression immunohistochimique de la forme mutée de B-Raf après introduction d'un inhibiteur [11] et suggère que la pression de sélection induite modifie le clone dominant. Nous n'avons cependant pas étudié les variations d'intensité de l'immunohistochimie. Cette diminution d'intensité est surprenante compte-tenu des amplifications de *BRAF* constatées dans les mélanomes résistants [12]. D'autres mécanismes de résistances supposés des B-Raf-inhibiteurs portent non pas sur BRAF mais sur d'autres protéines et gènes de la voie des MAP-Kinases, comme *NRAS*, *MAP2K1* and *MAP2K2* [12].

Conclusion

L'immunohistochimie anti-BRAF, lorsqu'elle est rigoureusement encadrée et interprétée, présente des performances diagnostiques excellentes, supérieures à certaines approches de biologie moléculaire. Dans notre centre, la sensibilité imparfaite de la PCR-HRM-SANGER et du séquençage NGS a pu entretenir l'illusion d'une hétérogénéité mutationnelle de *BRAF* alors qu'avec des approches très sensibles, comme l'immunohistochimie et la PCR digitale, le statut mutationnel reste homogène entre mélanome primitif et les différentes localisations secondaires.

Références

- [1] Kim G, McKee AE, Ning Y-M, Hazarika M, Theoret M, Johnson JR, et al. FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation. Clin Cancer Res 2014;20:4994–5000, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0776>.
- [2] Ballantyne AD, Garnock-Jones KP. Dabrafenib: First Global Approval. Drugs 2013;73:1367–76, <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-013-0095-2>.
- [3] Denis JA, Perrier A, Nectoux J, Lamy P-J, Alary A-S, Sarafan-Vasseur N, et al. [Development of molecular analysis by digital PCR for clinical practice: positioning, current applications and perspectives]. Ann Biol Clin (Paris) 2019;77:619–37, <http://dx.doi.org/10.1684/abc.2019.1502>.
- [4] Denis JA, Nectoux J, Lamy P-J, Rouillac Le Sciellour C, Guermouche H, Alary A-S, et al. Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. Ann Biol Clin (Paris) 2018;76:505–23, <http://dx.doi.org/10.1684/abc.2018.1372>.
- [5] Bourhis A, Le Flahec G, Uguen A. Decalcification can cause the failure of *BRAF* molecular analyses and anti-BRAFV600E VE1 immunohistochemistry. Pathology International 2019;69:219–23, <http://dx.doi.org/10.1111/pin.12784>.

- [6] Hatzivassiliou G, Song K, Yen I, Brandhuber BJ, Anderson DJ, Alvarado R, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* 2010;464:431–5, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08833>.
- [7] Grzywa TM, Paskal W, Włodarski PK. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. *Translational Oncology* 2017;10:956–75, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.007>.
- [8] Bradish JR, Richey JD, Post KM, Meehan K, Sen JD, Malek AJ, et al. Discordancy in BRAF mutations among primary and metastatic melanoma lesions: clinical implications for targeted therapy. *Modern Pathology* 2015;28:480–6, <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2014.136>.
- [9] Lee S-H, Kim JE, Jang HS, Park KH, Oh BH, Shin SJ, et al. Genetic Alterations among Korean Melanoma Patients Showing Tumor Heterogeneity: A Comparison between Primary Tumors and Corresponding Metastatic Lesions. *Cancer Research and Treatment* 2018, <http://dx.doi.org/10.4143/crt.2017.535>.
- [10] Yancovitz M, Litterman A, Yoon J, Ng E, Shapiro RL, Berman RS, et al. Intra- and Inter-Tumor Heterogeneity of BRAFV600E Mutations in Primary and Metastatic Melanoma. *PLoS ONE* 2012;7:e29336, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029336>.
- [11] Schirosi L, Strippoli S, Gaudio F, Graziano G, Popescu O, Guida M, et al. Is immunohistochemistry of BRAF V600E useful as a screening tool and during progression disease of melanoma patients? *BMC Cancer* 2016;16, <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2951-4>.
- [12] Nielsen Line B, et al. Concordance in BRAF V600E status over time in malignant melanoma and corresponding metastases. *Histopathology* 2018;72:7095–107, <http://dx.doi.org/10.1111/his.13431>.
- [13] Valachis A, Ullenhag GJ. Discrepancy in BRAF status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. *European Journal of Cancer* 2017;81:106–15, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2017.05.015>.
- [14] Saint-Jean M, Quéreux G, Nguyen J-M, Peuvrel L, Brocard A, Vallée A, et al. Is a Single BRAF Wild-Type Test Sufficient to Exclude Melanoma Patients from Vemurafenib Therapy? *Journal of Investigative Dermatology* 2014;134:1468–70, <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.378>.
- [15] Colombino M, Lissia A, Capone M, De Giorgi V, Massi D, Stanganelli I, et al. Heterogeneous distribution of BRAF/NRAS mutations among Italian patients with advanced melanoma. *Journal of Translational Medicine* 2013;11:202, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-202>.
- [16] Heinzerling L, Baiter M, Kühnapfel S, Schuler G, Keikavoussi P, Agaimy A, et al. Mutation landscape in melanoma patients clinical implications of heterogeneity of BRAF mutations. *British Journal of Cancer* 2013;109:2833–41, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2013.622>.