

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement

Par

Charlotte SORBS

le 14/10/2020

Impact des altérations moléculaires associées aux mutations principales des gènes *RAS* et *BRAF* détectées par technique de séquençage à haut débit - *Next Generation Sequencing* - sur la survie globale de patients traités pour un cancer colorectal métastatique au CHU et à l'Institut régional du Cancer de Montpellier.

Directeur de thèse : Docteur Emmanuelle SAMALIN

JURY

Président : Professeur Marc YCHOU

Assesseurs :

Professeur Eric ASSENAT

Professeur Jérôme SOLASSOL

Docteur Emmanuelle SAMALIN

UNIVERSITE DE MONTPELLIER
FACULTE DE MEDECINE MONTPELLIER-NIMES

THESE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement
Par

Charlotte SORBS

le 14/10/2020

Impact des altérations moléculaires associées aux mutations principales des gènes *RAS* et *BRAF* détectées par technique de séquençage à haut débit - *Next Generation Sequencing* - sur la survie globale de patients traités pour un cancer colorectal métastatique au CHU et à l'Institut régional du Cancer de Montpellier.

Directeur de thèse : Docteur Emmanuelle SAMALIN

JURY

Président : Professeur Marc YCHOU

Assesseurs :

Professeur Eric ASSENAT

Professeur Jérôme SOLASSOL

Docteur Emmanuelle SAMALIN

ANNEE UNIVERSITAIRE 2019 - 2020

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs Honoraires

ALLIEU Yves	CALLIS Albert	JAFFIOL Claude	NAVRATIL Henri
ALRIC Robert	CANAUD Bernard	JANBON Charles	OTHONIEL Jacques
ARNAUD Bernard	CHAPTAL Paul-André	JANBON François	PAGES Michel
ASTRUC Jacques	CIURANA Albert-Jean	JARRY Daniel	PEGURET Claude
AUSSILLOUX Charles	CLOT Jacques	JOURDAN Jacques	PELISSIER Jacques
AVEROUS Michel	COSTA Pierre	LAFFARGUE François	POUGET Régis
AYRAL Guy	D'ATHIS Françoise	LALLEMANT Jean Gabriel	PUJOL Henri
BAILLAT Xavier	DEMAILLE Jacques	LAMARQUE Jean-Louis	RABISCHONG Pierre
BALDET Pierre	DESCOMPS Bernard	LAPEYRIE Henri	RAMUZ Michel
BALDY-MOULINIER Michel	DIMEGLIO Alain	LE QUELLEC Alain	RIEU Daniel
BALMES Jean-Louis	DUBOIS Jean Bernard	LESBROS Daniel	ROCHFORT Henri
BALMES Pierre	DUJOLS Pierre	LOPEZ François Michel	ROUANET DE VIGNE LAVIT Jean Pierre
BANSARD Nicole	DUMAS Robert	LORIOT Jean	SAINT AUBERT Bernard
BAYLET René	DUMAZER Romain	LOUBATIERES Marie Madeleine	SANCHO-GARNIER Hélène
BILLIARD Michel	ECHENNE Bernard	MAGNAN DE BORNIER Bernard	SANY Jacques
BLARD Jean-Marie	FABRE Serge	MARY Henri	SEGNARBIEUX François
BLAYAC Jean Pierre	FREREBEAU Philippe	MATHIEU-DAUDE Pierre	SENAC Jean-Paul
BLOTMAN Francis	GALIFER René Benoît	MEYNADIER Jean	SERRE Arlette
BONNEL François	GODLEWSKI Guilhem	MICHEL François-Bernard	SOLASSOL Claude
BOURGEOIS Jean-Marie	GRASSET Daniel	MION Charles	THEVENET André
BRUEL Jean Michel	GUILHOU Jean- Jacques	MION Henri	VIDAL Jacques
BUREAU Jean-Paul	HERTAULT Jean	MIRO Luis	VISIER Jean Pierre
BRUNEL Michel	HUMEAU Claude	NAVARRO Maurice	

Professeurs Emérites

ARTUS Jean-Claude	MARES Pierre
BLANC François	MAUDELONDE Thierry
BOULENGER Jean-Philipp	MAURY Michèle
BOURREL Gérard	MILLAT Bertrand
BRINGER Jacques	MONNIER Louis
CLAUSTRES Mireille	MOURAD Georges
DAURES Jean-Pierre	PREFAUT Christian
DAUZAT Michel	PUJOL Rémy
DAVY Jean-Marc	RIBSTEIN Jean
DEDET Jean-Pierre	SCHVED Jean-François
ELEDJAM Jean-Jacques	SULTAN Charles
GROLLEAU RAOUX Robe	TOUCHON Jacques
GUERRIER Bernard	UZIEL Alain
GUILLOT Bernard	VOISIN Michel
LANDAIS Paul	ZANCA Michel

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

PU-PH de classe exceptionnelle

ALBAT Bernard	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
ALRIC Pierre	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)
BACCINO Eric	Médecine légale et droit de la santé
BASTIEN Patrick	Parasitologie et mycologie
BLAIN Hubert	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
BONAFE Alain	Radiologie et imagerie médicale
CAPDEVILA Xavier	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CHAMMAS Michel	Chirurgie orthopédique et traumatologique
COLSON Pascal	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
COMBE Bernard	Rhumatologie
COTTALORDA Jérôme	Chirurgie infantile
COUBES Philippe	Neurochirurgie
COURTET Philippe	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
CRAMPETTE Louis	Oto-rhino-laryngologie
CRISTOL Jean Paul	Biochimie et biologie moléculaire
DE LA COUSSAYE Jean Emmanuel	Médecine d'urgence
DE WAZIERES Benoît	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
DELAPORTE Eric	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
DEMOLY Pascal	Pneumologie ; addictologie
DOMERGUE Jacques	Chirurgie viscérale et digestive
DUFFAU Hugues	Neurochirurgie
ELIAOU Jean François	Immunologie
FABRE Jean Michel	Chirurgie viscérale et digestive
FRAPIER Jean-Marc	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
HAMAMAH Samir	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale

HEDON Bernard	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
HERISSON Christian	Médecine physique et de réadaptation
JABER Samir	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
JEANDEL Claude	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
JONQUET Olivier	Médecine intensive-réanimation
JORGENSEN Christian	Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie
KOTZKI Pierre Olivier	Biophysique et médecine nucléaire
LABAUGE Pierre	Neurologie
LARREY Dominique	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
LEFRANT Jean-Yves	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
LUMBROSO Serge	Biochimie et Biologie moléculaire
MARTY-ANE Charles	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
MERCIER Jacques	Physiologie
MESSNER Patrick	Cardiologie
MONDAIN Michel	Oto-rhino-laryngologie
MORIN Denis	Pédiatrie
PAGEAUX Georges-Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
PUJOL Pascal	Biologie cellulaire
QUERE Isabelle	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
RENARD Eric	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale
REYNES Jacques	Maladies infectieuses, maladies tropicales
RIPART Jacques	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
ROUANET Philippe	Cancérologie ; radiothérapie
SOTTO Albert	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
TAOUREL Patrice	Radiologie et imagerie médicale
VANDE PERRE Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
YCHOU Marc	Cancérologie ; radiothérapie

PU-PH de 1^{re} classe

AGUILAR MARTINEZ Patricia	Hématologie ; transfusion
ASSENAT Éric	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
AVIGNON Antoine	Nutrition
AZRIA David	Cancérologie ; radiothérapie
BAGHDADLI Amaria	Pédopsychiatrie ; addictologie
BEREGI Jean-Paul	Radiologie et imagerie médicale
BLANC Pierre	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
BORIE Frédéric	Chirurgie viscérale et digestive
BOULOT Pierre	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
CAMBONIE Gilles	Pédiatrie
CAMU William	Neurologie
CANOVAS François	Anatomie
CAPTIER Guillaume	Anatomie
CARTRON Guillaume	Hématologie ; transfusion
CAYLA Guillaume	Cardiologie
CHANQUES Gérard	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
CORBEAU Pierre	Immunologie
COSTES Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
COULET Bertrand	Chirurgie orthopédique et traumatologique
CYTEVAL Catherine	Radiologie et imagerie médicale
DADURE Christophe	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DAUVILLIERS Yves	Physiologie
DE TAYRAC Renaud	Gynécologie-obstétrique, gynécologie médicale
DE VOS John	Histologie, embryologie et cytogénétique
DEMARIA Roland	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire

DEREURE Olivier	Dermatologie - vénéréologie
DROUPY Stéphane	Urologie
DUCROS Anne	Neurologie
DUPEYRON Arnaud	Médecine physique et de réadaptation
FESLER Pierre	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
GARREL Renaud	Oto-rhino-laryngologie
GENEVIEVE David	Génétique
HAYOT Maurice	Physiologie
KLOUCHE Kada	Médecine intensive-réanimation
KOENIG Michel	Génétique
LAFFONT Isabelle	Médecine physique et de réadaptation
LAVABRE-BERTRAND Thierry	Histologie, embryologie et cytogénétique
LAVIGNE Jean-Philippe	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
LE MOING Vincent	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
LECLERCQ Florence	Cardiologie
LEHMANN Sylvain	Biochimie et biologie moléculaire
MARIANO-GOULART Denis	Biophysique et médecine nucléaire
MATECKI Stéfan	Physiologie
MEUNIER Laurent	Dermato-vénéréologie
MOREL Jacques	Rhumatologie
NAVARRO Francis	Chirurgie viscérale et digestive
NOCCA David	Chirurgie viscérale et digestive
PETIT Pierre	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PERNEY Pascal	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
PRUDHOMME Michel	Anatomie
PUJOL Jean Louis	Pneumologie ; addictologie
PURPER-OUAKIL Diane	Pédopsychiatrie ; addictologie



TOUITOU Isabelle

Génétique

TRAN Tu-Anh

Pédiatrie

VERNHET Hélène

Radiologie et imagerie médicale

PU-PH de 2ème classe

BOURDIN Arnaud

Pneumologie ; addictologie

CANAUD Ludovic

Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option chirurgie vasculaire)

CAPDEVIELLE Delphine

Psychiatrie d'Adultes ; addictologie

CLARET Pierre-Géraud

Médecine d'urgence

COLOMBO Pierre-Emmanuel

Cancérologie ; radiothérapie

COSTALAT Vincent

Radiologie et imagerie médicale

CUVILLON Philippe

Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire

DAIEN Vincent

Ophthalmologie

DORANDEU Anne

Médecine légale et droit de la santé

FAILLIE Jean-Luc

Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie

FUCHS Florent

Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale

GABELLE DELOUSTAL Audrey

Neurologie

GAUJOUX Viala Cécile

Rhumatologie

GODREUIL Sylvain

Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

GUILLAUME Sébastien

Psychiatrie d'adultes ; addictologie

GUILPAIN Philippe

Médecine Interne, gériatrie et biologie du vieillissement; addictologie

GUIU Boris

Radiologie et imagerie médicale

HERLIN Christian

Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique, brulologie

HOUEDE Nadine

Cancérologie ; radiothérapie

JACOT William

Cancérologie ; Radiothérapie

JUNG Boris

Médecine intensive-réanimation

KALFA Nicolas

Chirurgie infantile

KOUYOUMDJIAN Pascal	Chirurgie orthopédique et traumatologique
LACHAUD Laurence	Parasitologie et mycologie
LALLEMANT Benjamin	Oto-rhino-laryngologie
LE QUINTREC DONNETTE Moglie	Néphrologie
LETOUZEY Vincent	Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale
LONJON Nicolas	Neurochirurgie
LOPEZ CASTROMAN Jorge	Psychiatrie d'Adultes ; addictologie
LUKAS Cédric	Rhumatologie
MAURY Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
MILLET Ingrid	Radiologie et imagerie médicale
MORANNE Olivier	Néphrologie
MURA Thibault	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
NAGOT Nicolas	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de la communication
PANARO Fabrizio	Chirurgie viscérale et digestive
PARIS Françoise	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
PASQUIE Jean-Luc	Cardiologie
PELLESTOR Franck	Histologie, embryologie et cytogénétique
PEREZ MARTIN Antonia	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (option médecine vasculaire)
POUDEROUX Philippe	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
RIGAU Valérie	Anatomie et cytologie pathologiques
RIVIER François	Pédiatrie
ROGER Pascal	Anatomie et cytologie pathologiques
ROSSI Jean François	Hématologie ; transfusion
ROUBILLE François	Cardiologie
SEBBANE Mustapha	Médecine d'urgence
SIRVENT Nicolas	Pédiatrie
SOLASSOL Jérôme	Biologie cellulaire



STOEBNER Pierre	Dermato-vénérologie
SULTAN Ariane	Nutrition
THOUVENOT Éric	Neurologie
THURET Rodolphe	Urologie
VENAIL Frédéric	Oto-rhino-laryngologie
VILLAIN Max	Ophthalmologie
VINCENT Denis	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement, médecine générale, addictologie
VINCENT Thierry	Immunologie
WOJTUSCISZYN Anne	Endocrinologie-diabétologie-nutrition

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

1^{re} classe :

COLINGE Jacques (Cancérologie, Signalisation cellulaire et systèmes complexes)

2^{ème} classe :

LAOUDJ CHENIVESSE Dalila (Biochimie et biologie moléculaire)

VISIER Laurent (Sociologie, démographie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - Médecine générale

1^{re} classe :

LAMBERT Philippe

2^{ème} classe :

AMOUYAL Michel

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine Générale

CLARY Bernard

DAVID Michel

GARCIA Marc

PROFESSEURS ASSOCIES - Médecine

BESSIS Didier (Dermato-vénéréologie)

MEUNIER Isabelle (Ophtalmologie)

MULLER Laurent (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

PERRIGAULT Pierre-François (Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire)

QUANTIN Xavier (Pneumologie)

ROUBERTIE Agathe (Pédiatrie)

VIEL Eric (Soins palliatifs et traitement de la douleur)

Maîtres de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers

MCU-PH Hors classe

BADIOU Stéphanie	Biochimie et biologie moléculaire
BOULLE Nathalie	Biologie cellulaire
CACHEUX-RATABOUL Valère	Génétique
CARRIERE Christian	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
CHARACHON Sylvie	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
FABBRO-PERAY Pascale	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
GIANSILY-BLAIZOT Muriel	Hématologie ; transfusion
HILLAIRES-BUYS Dominique	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
PUJOL Joseph	Anatomie
RICHARD Bruno	Médecine palliative
RISPAIL Philippe	Parasitologie et mycologie
SEGONDY Michel	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 1^{re} classe

BERTRAND Martin	Anatomie
BOUDOUSQ Vincent	Biophysique et médecine nucléaire
BOURGIER Céline	Cancérologie ; Radiothérapie
BRET Caroline	Hématologie biologique
COSSEE Mireille	Génétique
GIRARDET-BESSIS Anne	Biochimie et biologie moléculaire
LAVIGNE Géraldine	Hématologie ; transfusion
LESAGE François-Xavier	Médecine et Santé au Travail
MATHIEU Olivier	Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie
MENJOT de CHAMPFLEUR Nicolas	Radiologie et imagerie médicale
MOUZAT Kévin	Biochimie et biologie moléculaire
OLIE Emilie	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
PANABIERES Catherine	Biologie cellulaire
PHILIBERT Pascal	Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale
RAVEL Christophe	Parasitologie et mycologie
SCHUSTER-BECK Iris	Physiologie
STERKERS Yvon	Parasitologie et mycologie
THEVENIN-RENE Céline	Immunologie
TUAILLON Edouard	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

MCU-PH de 2^{ème} classe

CHIRIAC Anca	Immunologie
DE JONG Audrey	Anesthésiologie-réanimation et médecine péri-opératoire
DU THANH Aurélie	Dermato-vénérologie
GOUZI Farès	Physiologie



HERRERO Astrid

Chirurgie viscérale et digestive

JEZIORSKI Éric

Pédiatrie

KUSTER Nils

Biochimie et biologie moléculaire

MAKINSON Alain

Maladies infectieuses, Maladies tropicales

PANTEL Alix

Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière

PERS Yves-Marie

Thérapeutique; addictologie

ROUBILLE Camille

Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ;
addictologie

SZABLEWSKY

Anatomie et cytologie pathologiques

Maîtres de Conférences des Universités - Médecine Générale

MCU-MG de 1^{re} classe

COSTA David

MCU-MG de 2^{ème} classe

FOLCO-LOGNOS Béatrice

OUDE ENGBERINK Agnès

Maîtres de Conférences associés - Médecine Générale

LOPEZ Antonio

MILLION Elodie

PAVAGEAU Sylvain

REBOUL Marie-Catherine

SERAYET Philippe

Praticiens Hospitaliers Universitaires

BARATEAU Lucie	Physiologie
BASTIDE Sophie	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
DAIEN Claire	Rhumatologie
GATINOIS Vincent	Histologie, embryologie et cytogénétique
GOULABCHAND Radjiv	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
LATTUCA Benoît	Cardiologie
MIOT Stéphanie	Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; addictologie
PINETON DE CHAMBRUN Guillaume	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
SOUCHE François-Régis	Chirurgie viscérale et digestive

Remerciements

Aux membres du jury

A Monsieur le Professeur YCHOU

Vous me faites l'honneur de présider ce travail de thèse.

Je tiens à vous remercier pour votre accompagnement et votre bienveillance tout au long de ces années d'internat.

Je suis très reconnaissante de poursuivre ma formation à vos côtés.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de la fierté de compter parmi vos élèves.

A Monsieur le professeur Eric ASSENAT

C'est un immense privilège que de vous compter parmi mon jury de thèse.

Au-delà de vos qualités de professeur, je souhaitais vous remercier pour votre gentillesse et votre accessibilité. Ce fut un réel plaisir de pouvoir apprendre et travailler à vos côtés.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jérôme SOLASSOL

Je vous remercie grandement de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire de biologie à Arnaud De Villeneuve. Sans vous, ce travail n'aurait pas pu voir le jour et votre présence dans ce jury est essentielle.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance

A Madame le Dr Emmanuelle SAMALIN

Je te suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté de diriger ce projet. Merci d'avoir partagé ton expertise et ton savoir-faire, le tout avec autant de bienveillance. Tes remarques et corrections ont été précieuses pour la réalisation et l'aboutissement de ce travail.

Ce fut un réel plaisir de t'avoir en tant que directrice de thèse mais également comme cheffe de service, lors de mon arrivée à l'ICM.

A l'unité de Biométrie de l'ICM

A Monsieur Simon Thezenas

Un grand merci pour l'ensemble des analyses statistiques. Sans toi ce travail n'aurait jamais pu aboutir.

Je te suis extrêmement reconnaissante pour ta disponibilité, ton écoute et ta patience face à mes nombreuses requêtes.

Ce fut un plaisir de travailler avec toi et j'espère que nous pourrons de nouveau collaborer dans le futur.

Aux équipes médicales et paramédicales

Aux médecins du service d'oncologie de Saint Eloi : le Dr Delphine TOPART, le Dr Clothilde LINDET-BOURGEOIS, le Dr Marie LARUELLE, le Dr Marie DUPUY. Ce fut une chance de faire mes premiers pas en tant qu'interne à vos côtés.

Merci également au Dr SERRE Delphine, nouvelle membre de l'équipe. Je suis très heureuse de t'avoir eu en tant que cheffe de clinique. Ce semestre à tes côtés a été un réel plaisir et j'espère que l'on perpétuera nos soirées tapas/vin.

Aux médecins du service d'hématologie de la clinique du parc : le Dr Carole EXBRAYAT, le Dr Jérémy DELAGE et le Dr Marjorie ROQUES. Je garde un excellent souvenir de ce semestre à vos côtés, autant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Aux médecins du service d'oncologie du CHU de Nîmes : le Pr Nadine HOUEDE, le Dr Miruna TIMAR-DAVID, le Dr Frederic FITENI, le Dr Emanuel NICOLAS et le Dr Delphine DULIEGE. Merci pour la formation mais également l'ambiance de travail exceptionnelle.

A la grande famille de l'ICM, particulièrement aux équipes du service de médecine B1 et de médecine B3

A toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire d'Arnaud de Villeneuve qui a su m'intégrer, fût-il pour un temps très limité, et tout particulièrement au Dr Julie VENDRELL, et au Dr Benoît BEGANTON grâce à qui j'ai pu développer (modestement) mais compétences Excel.

A toute l'équipe du service de la réanimation du CH de Perpignan. Merci pour votre enseignement, votre humour, et les cafés de 9h sur la terrasse ensoleillée.

A mes amis

A toutes les Pampams (anciennes, actuelles et futures) ; une équipe de volley au top, une bande de copines géniales mais surtout des apéros et des soirées de folie (...à la TARTANE).

A Marine, Armelle, Kevin ; je ne peux qu'avoir le sourire quand je pense à vous et aux moments qu'on a partagés, à ces soirées. Pourvu qu'il y en ait encore plein d'autres.

Marine ...euh par où commencer ??

Armelle, la fille au 10 000 milles projets ...mais bon pas après 21h s'il vous plait !

Kevin, parce que je suis enfin Neurochirurgienne !

A mes amis d'enfance de Villeneuve Les Maguelones :

Adrien, je suis très heureuse de voir que tu construis ta petite famille. Nos repas (bien que trop rares) sont toujours un vrai plaisir.

Laurie, merci d'être l'amie que tu es, tout simplement. Je te souhaite plein de bonheur avec tes 2 amours et de la réussite dans tes nouveaux projets professionnels.

Maxou, je pense très souvent à toi et j'aime à croire que tu nous accompagnes de là-haut.

A mes amours de copains et copines de l'externat. Un ENORME MERCI pour avoir marqué ces années de bonheur, de rire, de souvenirs et de soirées inoubliables.

Eline, ne perd jamais ce grain de folie qui te rend unique et qui nous fait tant rire.

Félicité, ma partenaire de dance-floor. J'admire ta force de caractère et la passion que tu mets dans ton travail.

Charlotte, et dire que j'aurai pu passer à coter d'une amie comme toi (merci le ski-med et le génépi). Merci d'avoir toujours été là pour moi.

Pauline, mon coup de cœur de l'intégration, et ça continue. J'ai hâte de venir te rendre visite en Australie.

Charline, à tes anecdotes de manades (promis on n'en parlera -presque- plus) mais aussi toutes nos heures de sous colles, passées à déchiffrer ton écriture de médecin.

Laura, parce que tu es la pro des tenues de manades. Merci pour ta bonne humeur en toutes circonstances...Bon excepté cette fois où l'on a légèrement sali ta voiture ...

Jessica, Jessichou, je ne me laisserai jamais de tes fossettes. Je sais que c'est là que tu ranges tout ton savoir...Merci d'avoir été mon pense-bête pendant toutes ces années et pour tes remakes de Tragédie en soirée.

Marie, LA chirurgienne du groupe. Je te souhaite bonheur et réussite pour la suite et un joli mariage.

Clémentine, à nos soirées en tête à tête à se raconter nos vies et bien sûr à nos soirées danses qui me manquent !

Emmanuelle, tu es quelqu'un d'exceptionnel. Merci pour toutes ces années d'externat et ce voyage aux États-Unis.

Sami, mon petit escargot. A nos soirées vidéoprojecteurs et tacos. Je suis tellement heureuse de te voir créer (de loin) ta petite famille, je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Matthieu, à notre passion commune pour le volley et à toutes nos soirées. Que de bons souvenirs !

A mes rencontres de l'internat

Une mention particulière pour la promo 2015 d'oncologie et à nos RCP de 2 heures du mat'. Je n'aurai pas pu rêver mieux comme oncoteam.

Marie, ou devrai-dire Mme Khayat ! Ma partenaire de congrès. A notre semestre au top en B1 et ta « rencontre » avec Salah. Je vous souhaite plein de bonheur (et de bébés) pour la suite.

Sophie, à mon grand regret pas un seul semestre partagé, mais j'ai énormément plaisir à te découvrir en dehors du travail.

Alexis, merci pour tous ces strip-teases dans le bureau du B3, pour ton humour et tes talents de photographes. Je vous souhaite plein de bonheur avec Julie et l'arrivée du petit Didier.

Quentin, le professeur parisien de la bande. Quand je pense qu'on était à 2 doigts de ne pas te rencontrer...Merci pour ces années d'internats, ces soirées et surtout pour ton investissement dans la filière d'oncologie et notre formation.

Mes colocs et la team doudou villa 2, une entrée dans l'internat juste inoubliable.

Hélène, mon énorme coup de cœur de l'internat. Merci pour ces fou-rires, ta bonne humeur, ton écoute, tes photos/vidéo/Snap/Insta en toutes circonstances et tes cours de cheval avec Lili.

Héloïse, la super maman. Merci pour ton énergie et ton rire communicatif.

Anne, une superbe rencontre, il n'aura fallu que 6 ans d'externat pour se découvrir enfin. Je te souhaite plein de bonheur à venir avec tes deux bouts de chou et Guillaume.

Le couple le plus soudé de l'internat, les inséparables Nico et Philou. Jusqu'à la thèse il ne se seront pas lâchés...je garde un super souvenir de nos aventures !

Olivier, tu m'auras bien fais rire lors de ce 1^{er} semestre Nîmois.

Seb, notre lillois préféré à la personnalité unique et au grand cœur.

Valerian, mon partenaire officiel de baby-foot. Merci pour tous ses cafés préparés avec soin. On aura quand même bien ri (et râlé) pendant ces 2 semestres.

A mes co-internes

Mohamed, comme dirait les infirmières, Monsieur génial.

Elodie, à nos talents de chanteuses qui ont résonné dans le bureau du B3.

Bader, notre badou, le chirurgien qui met des mots de synthèse.

Justin, Matteo et Batiste, que de bons souvenir pour ce passage avec vous en réanimation

Cécile, ma presque co-interne de biologie, et surtout ma partenaire de baby. Comment ne pas oublier de toutes nos victoires ...

Julien, je suis heureuse d'avoir pu t'accompagner pour ton baptême de transfert en réanimation.

Je te souhaite du bonheur avec ta femme et bien sûr tout plein de chèvres.

Olivia, une co-interne au top, j'espère que l'on aura l'occasion de se recroiser par la suite.

A tous mes co-internes, le plus jeunes comme les plus anciens, des promotions d'oncologie.

A ma famille

Ma maman, Colette Sorbs, sans qui rien de tout ça ne serai possible. Merci pour ton soutien pendant toutes ces années de médecine. Même si je ne l'exprime pas souvent, je mesure vraiment la chance que j'ai d'avoir une super maman comme toi.

Tu es tout simplement la personne la plus exceptionnelle et la plus importante à mes yeux.

Je t'aime très fort et encore un immense merci pour tout.

Mon (très) beau-père Jesus Martinez. Tu m'as vu grandir et évoluer depuis mes 7 ans, merci d'avoir été à mes côtés. J'espère que tu es fière de ta (très) belle fille.

Je t'aime fort.

A Bruno, toi qui partages ma vie. Merci de m'avoir supportée pendant ces derniers mois et de m'avoir prêtée tes talents pour la mise en forme de ce travail. Merci de ne pas avoir craqué face à mon incompétence informatique...

Je suis heureuse d'avancer avec toi.

A nos prochaines vacances bien méritées.

Je t'aime

A ceux qui nous ont quittés. Mes grand parents, mon Papé et ma Mamé et mon papa, qui je l'espère sont fiers de moi là où ils sont.

A mes oncles et tantes, Evelyne, Michel, Christiane, Michel, Yvan et Pascale.

A tous mes cousins et cousines ainsi que leurs enfants.

A mes belles-sœurs Carole et Céline et mon beau-frère Frederic ainsi que leurs enfants. Parce qu'ils ont un sacré caractère mais aussi un grand cœur dans la famille Martinez.

Sommaire

Remerciements	16
Sommaire	25
Préambule	26
I-INTRODUCTION	27
1-Le cancer en général	27
Epidémiologie	27
Cancérogenèse et hétérogénéité tumorale	28
Oncogénétique constitutionnelle et somatique	33
Thérapies ciblées et biomarqueurs	36
Implications pour la recherche	40
2-Le cancer colorectal	56
Epidémiologie	56
Facteurs de risques et dépistage	57
Cancérogenèse et classification moléculaire des cancers colorectaux	58
Facteurs prédictifs et pronostiques	64
Recommandations du thésaurus national de cancérologie digestive (TNCD) pour les explorations pré-thérapeutiques dans le CCR métastatique (57)	71
II-PRESENTATION DE L'ETUDE ET RESULTATS	72
Introduction	72
Matériel et Méthode	73
Résultats	77
Tableaux et figures	84
III-DISCUSSION	97
IV-CONCLUSION	104
V-BIBLIOGRAPHIE	105
VI-ANNEXES	113
Annexe 1 : Panels de gènes	113
Annexe 2 : Figures supplémentaires	115
VII-ABREVIATIONS	123

Préambule

A l'occasion de mon internat en DES d'oncologie médicale, j'ai eu la chance de pouvoir réaliser un stage en biologie moléculaire, dans le laboratoire des tumeurs solides du CHU de Montpellier, à l'hôpital Arnaud de Villeneuve. Ce choix était guidé par plusieurs motivations ; celle de s'éloigner un peu de la clinique pour revenir à une base plus scientifique, toucher un peu du doigt le secteur de la Recherche, et découvrir l'environnement du laboratoire, le tout en restant dans un domaine en lien avec ma spécialité d'origine.

Pourquoi pas un stage en biologie moléculaire à l'ère du développement des thérapeutiques dites « ciblées » et de la recherche de biomarqueurs, notamment génétiques ?

En effet, connaître le profil moléculaire d'une tumeur est devenu indispensable pour certaines pathologies cancéreuses afin de proposer aux patients des thérapies ciblées adaptées au profil de leur tumeur, mais également pour comprendre le comportement des cellules tumorales, les phénomènes qui régissent leur développement, la réponse aux traitements et les éventuelles résistances qu'elles peuvent développer.

C'est ce que j'ai pu approfondir lors de mon court passage dans ce laboratoire, en parallèle de la découverte de différentes techniques utilisées pour établir ces profils moléculaires, notamment ce que l'on appelle communément le *Next Generation Sequencing*.

Ce stage m'a réellement ouvert l'accès à un univers différent qu'est celui du laboratoire, avec une organisation, des règles et contraintes qui lui sont propres mais également avec un champ de possibilité infinie en lien étroit avec la recherche. C'est tout naturellement dans ce contexte et parce que ce domaine est en lien direct avec la spécialité oncologique que le sujet de ma thèse s'est dessiné.

I-INTRODUCTION

1-Le cancer en général

Epidémiologie

Le cancer est une cause majeure de morbidité et de mortalité. Sur la planète dans son ensemble, il a été responsable en 2012 de 14 millions de nouveaux cas et de 8 millions de décès.

En 2018, le nombre de nouveaux cas dans le monde était estimé à 18,1 millions et celui des décès par cancer de 9,6 millions. Tous sexes confondus, le cancer du poumon reste le plus diagnostiqué (environ 12% des cancers) ainsi que le plus mortel (18% des décès par cancer). Le cancer colorectal est au 4^{ème} rang des incidences (6,1%) derrière le cancer du sein chez la femme (11.6%) et le cancer de la prostate (7,1%) chez l'homme (1).

En France, l'institut national du cancer (INCa) publie chaque année les principales données du cancer en France en termes d'épidémiologie, prévention, dépistage, soins, ou encore de recherche.

Les données d'incidences viennent du registre français des cancers FRANCIM (18% de la population) et les données de mortalités sont fournies par l'INSERM.

En France, le cancer constitue la 1^{ère} cause de mortalité devant les maladies cardiovasculaires. L'incidence des cancers, qui augmentait depuis les années 1980 est en diminution depuis 2005 chez l'homme et s'est stabilisée chez la femme sauf dans le cas du cancer du poumon.

En 2018, le nombre de nouveaux cas de cancers toutes localisations cancéreuses confondues en France métropolitaine est estimé à 382 000 (204 600 chez l'homme et 177 400 chez la femme). Le nombre de décès par cancer est estimé à 157 400, dont 89 600 chez l'homme et 67 800 chez la femme (2).

Le cancer de la prostate reste de loin le cancer le plus fréquent chez l'homme (50 430 nouveaux cas estimés en 2015), devant le cancer du poumon et le cancer colorectal (46 363 et 43 336 cas estimés respectivement en 2018).

Chez la femme, le cancer du sein se situe en tête (58 459 cas estimés en 2018), devant le cancer colorectal (20 120 cas) et le cancer du poumon (15 132 cas).

En termes de mortalité, le cancer du poumon se situe au premier rang chez l'homme (33 117 décès en 2018), devant le cancer colorectal (17 117 décès) et le cancer de la prostate (8 115 décès). Chez la femme, le cancer du sein est la première cause de décès par cancer (12 146 décès), devant le cancer du poumon (10 356 décès) et le cancer colorectal (7 908 décès).

Ainsi, l'augmentation du nombre de décès est de 6 % chez l'homme sur la période 1990-2018 (84 400 et 89 600 respectivement) et de 26 % chez la femme (54 000 et 67 800). Cette augmentation s'explique par l'augmentation de la population et le vieillissement, tandis que la part des décès attribuable au cancer lui-même est en recul de -54 % chez l'homme et -25 % chez la femme (3).

Cancérogénèse et hétérogénéité tumorale

a. **Cancérogénèse**

La cancérogénèse désigne l'ensemble des événements qui conduisent à la transformation d'un tissu physiologique (normal) en tissu tumoral.

En permanence, à l'état physiologique, nos cellules sont le lieu d'une régulation entre des protéines activatrices et inhibitrices de la croissance cellulaire. Le cancer résulte d'un échappement aux mécanismes de régulation de cette homéostasie tissulaire (prolifération, survie, différenciation), et de l'acquisition de propriétés d'invasion locale et à distance.

On définit comme onco-protéine, une protéine dont l'activation va venir stimuler le signal de prolifération cellulaire ; à l'inverse, une protéine onco-suppressive est une protéine dont la perte d'expression va constituer une levée de frein au signal de prolifération cellulaire. Dans les deux cas, la résultante est un déséquilibre en faveur de la croissance cellulaire.

Le cancer est une maladie de L'ADN (acide désoxyribonucléique) dont le processus est multi-étape et peut se dérouler sur une période de temps assez longue (plusieurs années à plusieurs dizaines d'années).

L'étude des modèles expérimentaux, animaux et cellulaires, a permis de définir trois étapes clés dans le développement d'un cancer : (4,5)

- Une phase d'**Initiation** : par l'action d'un **agent carcinogène** (physique, chimique, viral) qui va entraîner la survenue d'une lésion rapide, irréversible et transmissible de l'ADN.
- Une phase de **Promotion** : par l'action de co-carcinogènes (ex : tabac, alcool, facteurs hormonaux...) permettant la stabilisation de la lésion initiale et l'acquisition d'autres évènements (mutation de l'ADN, régulation épigénétique) plus ou moins réversibles.
- Une phase de **Progression** : caractérisée par l'acquisition de capacités de prolifération et de survie cellulaire, la perte de différenciation du tissu, le développement de capacités d'invasion locales et de dissémination à distance.

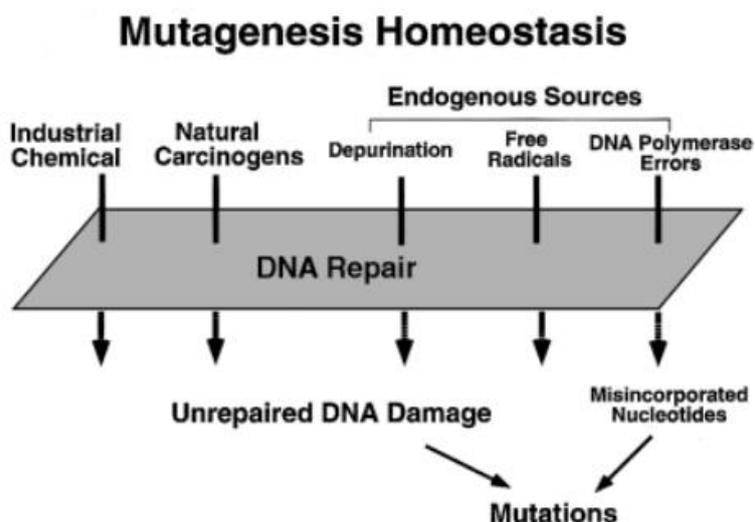


Figure 1. Facteurs impliqués dans l'accumulation de mutations dans la cellule cancéreuse. (Source : Keith R. Loeb et Lawrence A. Loeb et al. Significance of multiple mutations in cancer, Carcinogenesis)

Ainsi, les cellules cancéreuses accumulent des anomalies génétiques multiples au cours des divisions cellulaires. Le taux de mutation peut varier selon le type de cancer et notamment de l'exposition à certains carcinogènes où le nombre sera plus élevé (cas du tabac et du cancer du poumon par exemple).

Les mutations qui jouent un rôle dans le développement sont regroupées sous le terme de mutations motrices ou *drivers* oncogéniques et sont celles qui touchent les proto-oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs, comme décrit précédemment ; elles restent limitées en nombre.

Pour les autres mutations, plus fréquentes, elles sont le reflet de l'exposition aux substances carcinogènes et de l'instabilité génétique tumorale.

C'est bien l'ensemble de ces altérations génétiques qui confère à la cellule ses nouvelles propriétés dont l'objectif est la survie cellulaire et la progression tumorale.

Dans les années 2000, les principales caractéristiques de la cellule cancéreuse connues étaient leur capacité autocrine, l'insensibilité aux signaux de régulation cellulaire, le processus invasif local et à distance, un potentiel répliatif illimité, une angiogénèse, un échappement à l'apoptose (6).

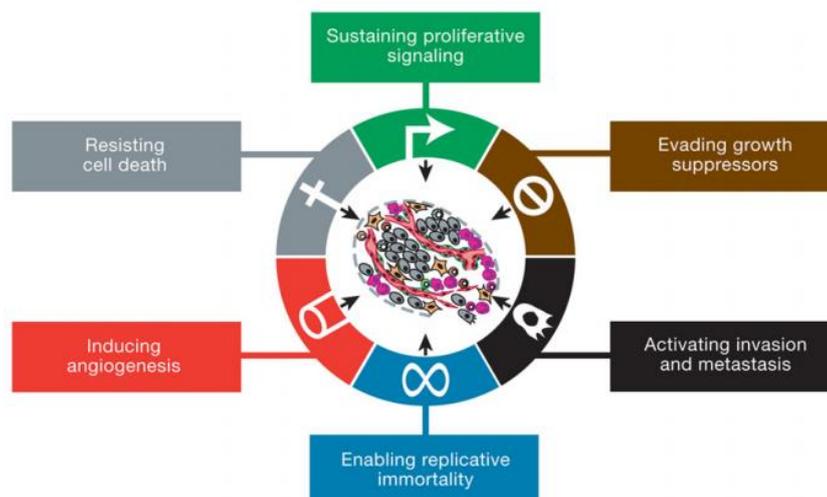


Figure 2. Schéma illustrant les caractéristiques acquises par les cellules cancéreuses. (Source : Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of cancer : The Next Generation*, Cell, 2011)

Depuis les années 2011, d'autres caractéristiques ont pu être décrites et ont permis d'élargir le champ de connaissance et de traitement des cancers, notamment les propriétés d'induction d'un phénomène inflammatoire, d'indépendance aux facteurs énergétiques, d'échappement au système immunitaire (développement de l'immunothérapie), ou encore d'une **instabilité génomique** à l'origine de **l'hétérogénéité tumorale**, phénomène bien décrit aujourd'hui et indispensable à intégrer dans la prise en charge des cancers.

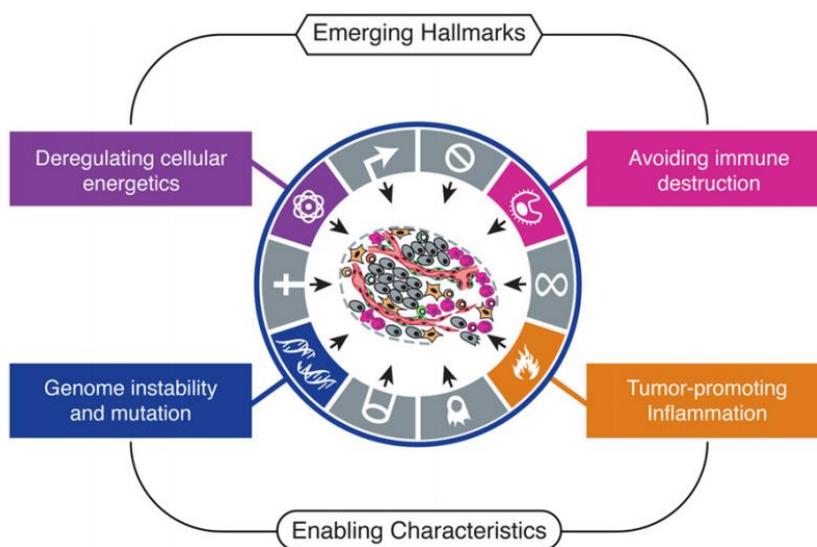


Figure 3. Schéma illustrant la découverte des nouvelles propriétés des cellules cancéreuses. (Source :_Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, *Hallmarks of cancer : The Next Generation, Cell, 2011*)

b. Hétérogénéité tumorale

Les études génétiques sur les cancers, notamment les grands projets collaboratifs autour du séquençage de l'ADN tel que le *Cancer Genome Atlas* et l'*International Cancer Genome Consortium* ont permis de mettre en évidence une **hétérogénéité inter-patients** pour des tumeurs d'un même type histologique. D'autre part, la caractérisation génétique de différents clones tumoraux chez un même patient est venue illustrer un autre type d'hétérogénéité : **l'hétérogénéité intra-tumorale**. Celle-ci se divise elle-même en deux sous-groupes : d'une part par

l'hétérogénéité **spatiale**, lorsqu'elle survient sur différentes régions d'une même tumeur ; d'autre part par l'hétérogénéité **temporale** lorsqu'elle survient entre la tumeur primaire et les sites métastatiques ou de rechute tumorale (5).

C'est cette hétérogénéité tumorale qui donne tout son sens au terme de médecine "personnalisée" et qui constitue un véritable défi pour l'oncologue quand la simple biopsie diagnostique n'est plus à même de dévoiler l'intégralité du génome tumoral mais seulement celui d'un clone tumoral (7,8).

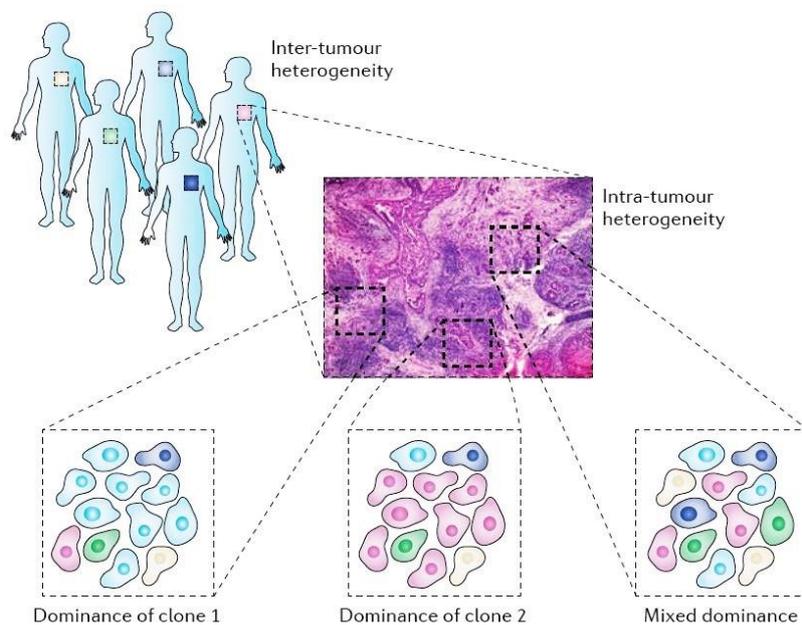


Figure 4. Schéma illustrant l'hétérogénéité inter et intra-tumorale. (Source : Modeling of Inter- and Intra-Tumor Heterogeneity, Harvard, 2012)

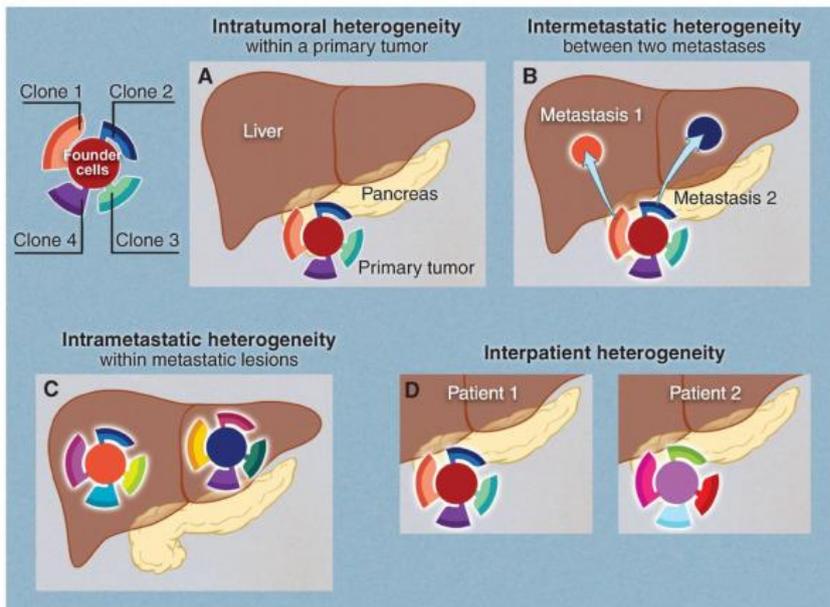


Figure 5. Exemple d'hétérogénéité spatiale et temporelle. (Source : Volgestein et al., *Cancer Genome Landscape, Science*)

Ainsi, le développement des thérapeutiques actuelles ne joue plus uniquement sur le type histologique d'une tumeur mais bien sur des profils génétiques tumoraux, dont la plupart sont caractérisés par l'activation anormale de voies de signalisation aboutissant à la prolifération cellulaire. L'ensemble de ces thérapeutiques sont regroupées sous le terme de "thérapies ciblées".

Oncogénétique constitutionnelle et somatique

a. Constitutionnelle

Les tests de génétique constitutionnelle (ou héréditaire) reposent sur l'**étude du patrimoine génétique d'un individu, transmissible** à la descendance. Les altérations génétiques constitutionnelles se retrouvent dans l'ensemble des cellules de l'organisme ; c'est pourquoi, on les recherche le plus souvent à partir d'une prise de sang, sur l'ADN extrait des lymphocytes. L'ADN est donc de bonne qualité

et non limité en quantité. L'information génétique ne varie pas au cours du temps ou de la maladie.

Les altérations recherchées sont dans la plupart des cas homozygotes ou hétérozygotes (le mosaïsme existe mais est beaucoup plus rare en oncogénétique).

Ces tests peuvent être réalisés avant la naissance (test prénatal) ou après, à n'importe quel âge (test postnatal).

Des règles de bonne pratique concernant l'utilisation de ces tests et l'information à délivrer aux patients et à leur famille sont régies par la loi de bioéthique et recommandées par l'Agence de biomédecine et la Haute autorité de santé.

En France, ces tests sont toujours effectués dans un cadre médical, après consultation avec un généticien, permettant d'éclairer le patient et sa famille sur l'intérêt du test et sur les conséquences éventuelles de son résultat (risque pour la descendance, suivi thérapeutique à mettre en place...). Seul le généticien est habilité à rendre les résultats au patient testé. Les délais de rendu des résultats peuvent aller d'un mois à un an selon l'urgence (9).

Ces tests sont effectués dans 3 situations :

1-Le diagnostic de maladies génétiques (dont le diagnostic préimplantatoire) :

Un test génétique diagnostique est effectué en cas de symptômes évocateurs d'une maladie génétique.

2-Le diagnostic de maladies pré-symptomatiques (tests prédictifs) :

Il existe des tests prédictifs en cancérologie, notamment proposés lorsqu'une mutation a déjà été identifiée dans la famille. Ces tests apportent une indication concernant le risque de développer la maladie, mais en aucun cas une certitude : les facteurs environnementaux et personnels contribuent largement à la survenue d'un cancer, et les mutations génétiques recherchées lors de ces tests ne sont ni nécessaires, ni suffisantes à l'apparition d'un cancer (un exemple est celui des mutations BRCA1 et 2 qui prédisposent aux cancers du sein et de l'ovaire).

3-Les tests de pharmacogénétique :

La pharmacogénétique consiste à étudier les caractéristiques génétiques d'un individu pour prédire la réponse de son organisme à un médicament : effets secondaires, risques de surdosages, ou encore inefficacité (Exemple de la recherche d'un déficit en DPD -*Dihydropyrimidine Deshydrogénase*- en cas de traitement par 5-FU -*5-Fluoro-uracile*-).

b. Somatique :

Les tests de génétique somatique (**non héréditaire**) consistent à analyser le génome des cellules cancéreuses pour détecter des mutations survenues spécifiquement dans la tumeur et prédire la réponse à un traitement ciblé. On parle aussi de « test compagnon ». Ils sont réalisés à partir d'une biopsie, d'une pièce tumorale ou d'une prise de sang pour les cancers hématopoïétiques.

La plupart du temps, le matériel extrait est, à l'inverse du constitutionnel, limité, issu d'un tissu hétérogène, et pouvant évoluer au cours du temps et sous la pression médicamenteuse. Par ailleurs, les tissus sont souvent inclus en paraffine ce qui peut altérer la qualité de l'ADN (liaisons covalentes ADN-histones, formation d'adduits ADN-formaldéhyde ; liaisons covalentes ADN-protéines, liaisons covalentes ADN-ADN, modifications de bases -ex : désaminations de cytosines).

Le diagnostic ayant pour but l'administration ou non d'un traitement, le délai de rendu des résultats doit être court (si possible dans un délai de 10 jours après réception de l'échantillon).

Une étude observationnelle rétrospective française de *Lièvre et al* (10) réalisée sur 375 patients au diagnostic de cancer colorectal métastatique en 2014, retrouvait un délai moyen de 24.6 +/- 17,2 jours entre la demande de recherche de mutation RAS/KRAS et l'obtention des résultats. La réduction de ce délai est donc un enjeu important afin que ces patients puissent avoir un traitement adapté dans un délai le plus court possible.

Thérapies ciblées et biomarqueurs

Depuis le début des années 2000, l'oncologie connaît une révolution dans le développement de nouvelles thérapeutiques dites « ciblées » possible grâce aux progrès technologiques qui permettent une meilleure compréhension des interactions moléculaires à l'échelle de la cellule cancéreuse mais aussi la fabrication de molécules complexes et hybrides. Ces thérapeutiques viennent compléter un arsenal thérapeutique jusqu'alors limité, représenté essentiellement par la classe des chimiothérapies conventionnelles (cytotoxiques) et pour lesquelles le développement venait à s'essouffler.

Le terme « médecine de précision » fait référence à cette médecine qui repose sur des traitements développés sur les bases d'une meilleure connaissance des mécanismes biologiques conduisant à l'apparition et au développement des tumeurs. En outre, la médecine de précision a pour objectif de proposer au patient un traitement adapté aux anomalies de sa tumeur. Elle repose actuellement sur deux types de traitements, les thérapies ciblées et l'immunothérapie spécifique (non développée ici).

En 2000, le trastuzumab a été la première thérapie ciblée à avoir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans le traitement des cancers du sein métastatiques HER2 positifs (11).

Quinze ans plus tard, 43 thérapies ciblées étaient autorisées par les agences de santé du médicament (EMA et ANSM) dans le traitement des cancers. Le développement a été particulièrement important ces dernières années puisque 28 thérapies ciblées sur les 43 autorisées (65 %) l'ont été entre 2012 et 2015, représentant sur cette période plus de 60 % des AMM initiales dans le traitement du cancer (12).

Fin 2015, un médicament anticancéreux sur quatre appartient à la classe des thérapies ciblées.

Actuellement, la prescription des thérapies ciblées est guidée, dans la mesure du possible, par les caractéristiques moléculaires de la tumeur de chaque patient (propriété à « cibler » la cellule cancéreuse). Des biomarqueurs peuvent

être associés (mais pas systématiquement) à ces traitements. Ils permettent alors de tester les patients afin d'identifier ceux qui sont porteurs (ou non porteurs) d'une altération moléculaire.

Dans la plupart des cas, ces biomarqueurs sont des anomalies moléculaires survenues très tôt dans l'histoire naturelle de la tumeur. On parle ainsi d'addiction oncogénique pour qualifier le fait que l'activité continue d'un seul oncogène puisse parfois être responsable de la survie anormale d'une cellule (ce sont les anomalies « conductrices » ou driver évoquées précédemment). À l'inverse, lorsqu'une aberration génétique n'est présente qu'en raison de l'instabilité génétique des cellules tumorales mais ne contribue pas aux mécanismes de l'oncogenèse, on parle d'anomalies « passagères » (*passenger*) (13).

Les enjeux actuels sont donc autour de la recherche de biomarqueurs forts, avec une spécificité importante pour les cellules cancéreuses ou leur micro-environnement afin de développer de nouvelles thérapies ciblées (14).

Par ailleurs, la meilleure connaissance des mécanismes d'échappement et de résistance aux thérapies ciblées et l'enrichissement notable de cette classe pharmacothérapeutique ont permis d'améliorer encore la prise en charge des patients. Plusieurs thérapies ciblées sont désormais utilisées chez un même patient, de façon séquentielle ou concomitante, afin de contrôler plus durablement sa maladie (15).

Parmi les exemples phares de thérapies ciblées ayant révolutionné la prise en charge de certains cancers avec des taux de réponse très élevés (plus d'un patient sur deux) en monothérapie, on retrouve :

- les thérapies ciblant des réarrangements du gène ALK ou encore les mutations du gène de l'EGFR dans les adénocarcinomes du poumon (16).
- les thérapies ciblant la mutation du gène *BRAF* (position V600) dans les mélanomes (17).

Actuellement, plus d'une vingtaine de mécanismes oncogéniques sont bloqués par une ou plusieurs thérapies ciblées.

Les thérapies ciblées disposant d'un biomarqueur associé à leur prescription sont indiquées par le symbole ^{BM}

THÉRAPIES CIBLÉES	
INHIBITEURS INTRACELLULAIRES (PETITES MOLÉCULES)	INHIBITEURS EXTRACELLULAIRES (BIOMÉDICAMENTS)
INHIBITEURS DE PROTÉINE KINASE	AC DIRIGÉS SUR RTK MEMBRANAIRE
Afatinib ^{BM}	Cetuximab ^{BM}
Axitinib	Panitumumab ^{BM}
Osimertinib ^{BM} (ATU de cohorte)	Pertuzumab ^{BM}
Bosutinib ^{BM}	Ramucirumab
Cabozantinib	Trastuzumab ^{BM}
Ceritinib ^{BM}	Trastuzumab emtansine ^{BM}
Cobimetinib ^{BM}	
Crizotinib ^{BM}	
Dabrafenib ^{BM}	
Dasatinib ^{BM}	
Erlotinib ^{BM}	AUTRES BIOMÉDICAMENTS
Everolimus	Aflibercept
Gefitinib ^{BM}	Bevacizumab
Ibrutinib	Denosumab
Idelalisib	
Imatinib ^{BM}	
Lapatinib ^{BM}	
Lenvatinib	
Nilotinib ^{BM}	
Nintedanib	
Palbociclib (ATU de cohorte)	
Pazopanib	
Ponatinib ^{BM}	
Regorafenib	
Ruxolitinib	
Sonidégib	
Sorafenib	
Sunitinib	
Temsirolimus	
Trametinib ^{BM}	
Vandetanib	
Vemurafenib ^{BM}	
Vismodégib	

Figure 6. Liste des 43 thérapies ciblées autorisées (AMM et ATU de cohorte) dans le traitement du cancer fin 2015. (Source : Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015/Etat des lieux et enjeux, INCa, 2015)

Mécanismes oncogéniques	THÉRAPIES CIBLÉES	
	Inhibiteurs intracellulaires	Inhibiteurs extracellulaires
ALK	crizotinib, ceritinib	
BCR-ABL	imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib	
BTK	ibrutinib	
CDK	palbociclib	
KIT	imatinib, sunitinib, regorafenib (bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafenib, pazopanib, lenvatinib, cabozantinib)	
EGFR	erlotinib, gefinitib, afatinib, osimertinib (vandetanib)	cetuximab, panitumumab
HEDGEHOG	vismodegib	
HER	lapatinib (afatinib)	trastuzumab, trastuzumab emtansine, pertuzumab
JAK	ruxolitinib	
MEK	trametinib, cobimetinib	
m-TOR	temsirolimus, everolimus	
PARP	olaparib	
PDGFR	imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib, sorafenib, sunitinib, regorafenib, pazopanib, lenvatinib, nintedanib	
PI3K	idelalisib	
BRAF	vemurafenib, dabrafenib (sorafenib, regorafenib)	
RANK		denosumab
RET	ponatinib, sunitinib, regorafenib, lenvatinib, vantedanib, cabozantinib	
VEGF/VEGFR	axitinib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, nintedanib, regorafenib lenvatinib, vantedanib, cabozantinib, (ponatinib)	bevacizumab, aflibercept, ramucirumab
MET	cabozantinib (crizotinib)	
ROS1	crizotinib	

Figure 7. Mécanismes oncogéniques inhibés par les thérapies ciblées en 2015.
(Source : Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015/Etat des lieux et enjeux, INCa, 2015)

Implications pour la recherche

a. Développement du séquençage à haut débit - *Next Generation Sequencing (NGS)*

Depuis la connaissance du modèle de cancérogénèse, le nombre identifié d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs n'a cessé d'augmenter avec respectivement plus de 150 et plus de 40 gènes à l'heure actuelle, tous cancers confondus.

C'est en parallèle d'une demande de plus en plus élargie non seulement en nombres de patients mais également en termes de couverture génique, que les techniques de séquençage ont dû se développer pour répondre aux besoins quotidiens des cliniciens mais également de la recherche (18). Ajouté à cela, des contraintes techniques liées à la qualité altérée des échantillons conservés dans le formol (FFPE) et le besoin d'améliorer les techniques afin de pouvoir analyser ces ADN dégradés. En effet, la taille des régions d'ADN à séquencer est généralement trop longue quand il s'agit d'ADN fortement dégradé après extraction du formol, ce qui réduit la chance pour les patients de pouvoir bénéficier de ces analyses.

Les variants génétiques cliniquement pertinents ont donc largement augmentés ces dernières années, amenant à l'optimisation et au développement de nouvelles méthodes permettant la détection non plus d'une simple mutation sur un gène mais, simultanément, de multiples mutations sur de nombreux gènes impliqués dans les cancers.

En effet, les méthodes de séquençage conventionnelles de type *Sanger* permettant une analyse gène par gène, laissent, peu à peu la place depuis les années 2006 à des techniques beaucoup plus modernes regroupées sous le nom de séquençage à haut débit ou *Next Generation Sequencing (NGS)*. Ces nouvelles techniques de séquençage permettent l'analyse simultanée de plusieurs centaines à des milliers de régions d'intérêts (dits *hotspot*) parmi un PANEL de gènes, et ce sur plusieurs échantillons tumoraux (donc plusieurs patients) en une seule analyse ou « run » (19).

Ainsi, plusieurs techniques de séquençage à haut débit ont été développées en oncologie telles que les techniques par amplicons et par capture, toutes deux basées sur des panels de gènes ou encore *le Whole Genome Sequencing* (WGS, séquençage complet du génome).

- Exemple d'une technique conventionnelle : Le séquençage par méthode de Sanger

Il s'agit d'une méthode développée par Frederick Sanger et son équipe à la fin des années 70. Le premier organisme biologique dont le génome a été séquencé en 1977 est le virus bactériophage ϕ X174 (20,21).

1. Amplification

Dans un 1^{er} temps, l'ADN à séquencer doit être amplifié. Un fois dénaturé, la région d'ADN à séquencer est fixée d'une amorce ou primer (région complémentaire connue au début de la région d'intérêt) marquée. L'ADN avec son amorce est alors dispersé dans 4 tubes à essai.

Dans chaque tube est ajouté l'ADN polymérase ainsi que les 4 désoxy-nucléotides, composants nécessaires à la fabrication du brin complémentaire.

Enfin, dans chacun des tubes, on ajoute un seul type de di-desoxy-nucléotide (ddNTP) : 1^{er} tube avec les ddATP, 2^{ème} tube avec ddTTP, 3^{ème} tube avec ddCTP, 4^{ème} tube avec ddGTP.

2. Séquençage :

Pour séquencer l'ADN, on utilise une électrophorèse sur gel polyacrylamide. Chaque tube est déposé en haut du gel, sur une rangée qui lui est propre. Les fragments d'ADN migrent du pôle négatif au pôle positif (en bas du gel). Les brins les plus légers/courts, migrent le plus rapidement, formant des bandes de long du gel d'électrophorèse. A noter que le gel polyacrylamide est

préféré au gel d'agarose pour son fort pouvoir résolutif puisqu'il permet de distinguer des fragments différant d'une seule paire de base.

La séquence est ensuite lue de bas en haut, nucléotide par nucléotide, en remontant le gel d'électrophorèse ; elle correspond à la séquence du brin complémentaire de l'ADN à séquencer.

Aujourd'hui, il existe des séquenceurs automatiques capables de réaliser les réactions de séquençage, puis de les lire. Les 4 types de ddNTP sont incorporés dans un même tube, marqué par un fluorochrome diff rent dont le spectre d'émission est spécifique. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

Les séquenceurs permettent de lire plusieurs centaines de nucléotides avec une très bonne qualité, jusqu'à 1000 pour les appareils les plus performants.

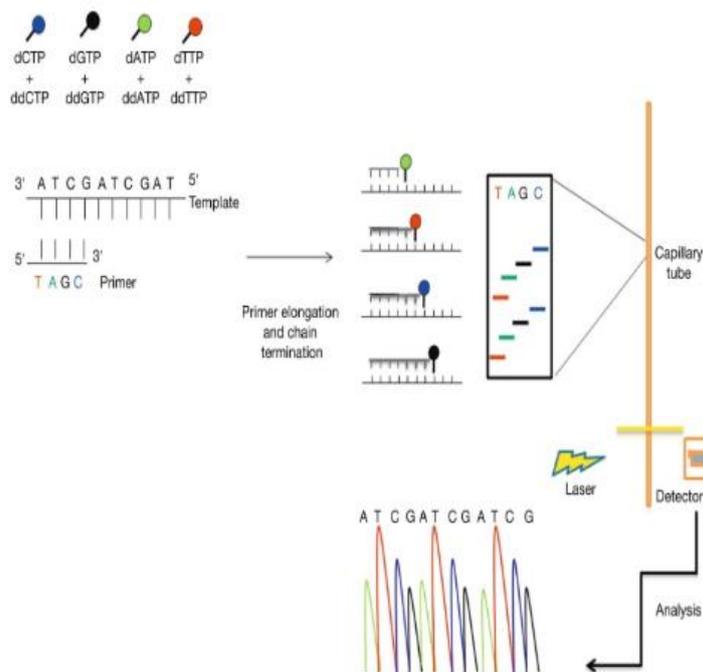


Figure 8. Principe du séquençage par Sanger. (Source : P. Zhang, H. Fernandes et al., *Pathobiology of Human Disease*, 2014, Sanger (Coventional) Sequencing)

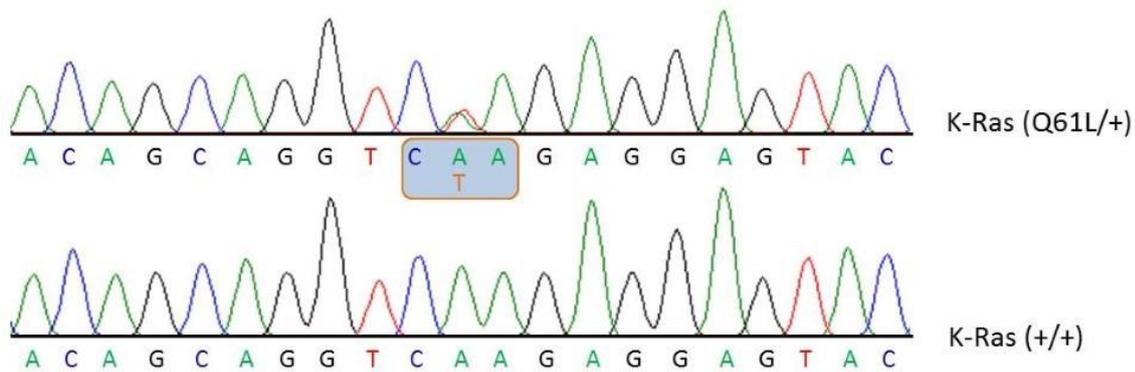


Figure 9. Exemple d'une mutation sur l'exon 3 du gène KRAS au niveau de l'acide aminé en position 61, en Sanger.

(Source : <https://horizondiscovery.com/en/products/diagnostic-reference-standards/PIFs/KRAS-Q61L-Reference-Standard-50>)

- Description de la technique NGS par amplicons sur séquenceur Illumina

Cette technique a été validée par la plateforme de biologie moléculaire du CHU de Montpellier avec création d'un panel intégrant les 16 gènes recommandés par l'INCa (22).

Il s'agit d'un processus en **4 étapes** : 3 étapes techniques et une analyse bio-informatique.

1. Préparation des bibliothèques :

Il s'agit de sélectionner l'ensemble des régions d'intérêt à séquencer à l'aide de *primers*/amorces spécifiques, de les amplifier par PCR puis d'ajouter des codes-barres -ou *barcodes* - (pour identifier le patient) et des régions dites « adaptateurs ».

Les adaptateurs sont formés de 2 parties ; une région de fixation de la polymérase et une région complémentaire des « oligonucléotides », séquences d'ADN

courtes fixées sur la « FLOW Cell ». Une fois ces étapes terminées, les librairies sont quantifiées (taux d'ADN suffisant) et normalisées avant d'être poolées.

Avec le panel « TSCA » utilisé au CHU, il y a préparation d'une double librairie correspondant aux deux brins sens ou *Forward* et anti-sens ou *Reverse* de l'ADN afin de limiter les erreurs qui seraient dues à une altération de l'ADN par le formol.

2. Génération des clusters :

Il s'agit du procédé pendant lequel chaque fragment est isothermiquement amplifié.

La FLOW CELL évoquée plus haut est une plaque vitrée composée de rangées, chacune recouverte d'une surface arborant deux types d'oligonucléotides.

La 1^{ère} dimérisation est possible par l'un des 2 types d'oligonucléotide. Cet oligonucléotide est complémentaire à l'adaptateur de l'un des deux brins d'ADN (*Forward* ou *Reverse*). Une polymérase vient alors synthétiser le brin complémentaire au brin hybridé. La synthèse double brin est alors dénaturée et le brin original est éliminé.

Le brin restant est ensuite cloné par une **amplification en pont**.

Dans ce procédé, le brin se recourbe est la région de l'adaptateur s'hybride avec le second type d'oligonucléotides de la *flow cell*, formant ainsi un pont.

Une polymérase génère alors le brin complémentaire formant un pont double brin. Ce pont est ensuite dénaturé, résultant en 2 simples brins – copies de la même molécule- fixés à la *flow cell*. Ce procédé est répété encore et encore, aboutissant simultanément à l'amplification de tous les fragments d'ADN, représentés par des millions de « *CLUSTERS* ».

Après l'amplification par pont, les brins *Reverse* sont éliminés, ne laissant que les brins *Forward*.

3. Séquençage par synthèse :

Le séquençage débute avec l'extension de la 1^{ère} séquence correspondant au *primer* pour produire le 1^{er} « *READ* » (brin lu). Pour chaque cycle, des nucléotides marqués par fluorescence sont incorporés un à un selon la séquence complémentaire. A chaque intégration de nucléotide, les clusters (représentant chacun un même fragment amplifié) sont excités par une source lumineuse et une fluorescence est émise permettant d'identifier la base nucléotidique : rouge pour cytosine, bleue pour guanine, vert pour thymine, jaune pour adénine.

C'est le séquençage par synthèse. Pour chaque cluster, les brins sont lus simultanément. Ces centaines de millions de clusters sont également analysés simultanément (on peut imaginer une sorte de photographie à chaque émission de fluorescence, chaque zone représentant un cluster).

Après la réalisation du 1^{er} « *Read* » ; celui-ci est éliminé et le processus recommence après une synthèse en pont pour obtenir et séquencer le brin *Reverse*.

4. L'analyse bio-informatique des données :

Le séquençage haut débit va générer pour chaque brin séquencé des millions de « *reads* ». Les *reads* sont appariés (F et R) et sont ensuite alignés sur un génome de référence.

Ces données sont initialement sous la forme d'un fichier informatique associé à un score de probabilité d'erreur pour chaque base (*Fastq*). L'ensemble de ces données est illisible en tant que tel, et cette masse de données est triée grâce à des logiciels spécifiques (*pipeline*) de bio-informatique. Le *pipeline* permet de générer une interface lisible permettant l'interprétation des résultats du séquençage patient par patient et gène par gène.

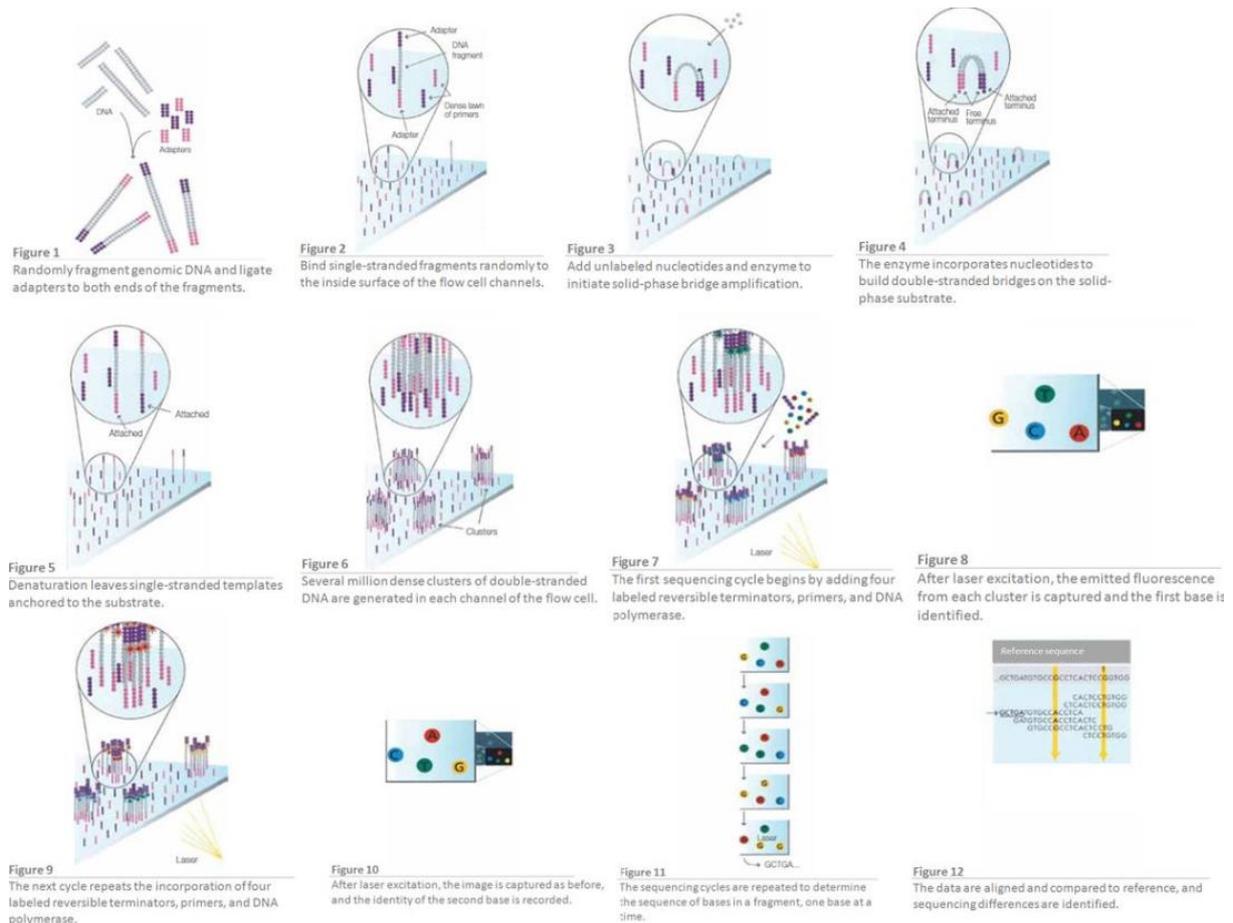


Figure 10. Illustration des étapes du séquençage par synthèse selon la technique Illumina. (Source : <http://www.biorigami.com/?p=2490>)

Ces techniques de NGS représentent un avantage en termes de couverture génique, de rapidité dans l'obtention de résultats pour un plus grand nombre d'échantillons et l'accès potentiel à des « basket protocole ». Les panels de gènes, selon les techniques utilisées, peuvent également être implémentés rapidement en cas de nouvelles recommandations de l'HAS ou de nouvelles AMM pour des thérapies ciblées (23).

Les inconvénients sont qu'elles reposent sur l'accès à du tissu frais ou inclus en paraffine, que ce dernier est hétérogène, et que la cellule cancéreuse évolue au cours du temps et sous la pression médicamenteuse (hétérogénéité intra-tumorale spatiale et temporelle).

b. Développement des plateformes de biologie moléculaire, de panels de gènes et génération d'un modèle de compte rendu de génétique moléculaire par l'INCA.

En France, en 2006, l'Institut National du Cancer (INCa) a fondé un programme national pour les analyses systématiques des mutations génétiques en routine. Ce programme est basé sur l'établissement d'un réseau de 28 plateformes de génétique moléculaire certifiées. Localisées dans les hôpitaux publics, chaque plateforme offre les tests génétiques pour les établissements privés comme publics pour la zone géographique rattaché à la plateforme. Le but est de pouvoir assurer l'accès pour tous les patients à ces tests génétiques et aux thérapies ciblées qui en découlent, ainsi que de promulguer des *guidelines* pour ces analyses.

Afin d'accompagner les plateformes dans ces évolutions technologiques, l'Institut a mis en place un soutien spécifique pour aider à la structuration des laboratoires et au développement des compétences nouvelles nécessaires. Ces financements ont permis le transfert vers le NGS d'une part significative de l'activité des plateformes de génétique moléculaire à partir de 2015. En 2016, 83 000 patients ont bénéficié d'un test pour l'accès à une thérapie ciblée et 35 000 tests ont été réalisés par NGS (12). L'INCa est également responsable, par l'intermédiaire d'un groupe indépendant d'experts, de l'implémentation en routine des nouveaux biomarqueurs. Ainsi, une liste limitée, couvrant actuellement des biomarqueurs sélectionnés sur un panel de 16 gènes impliqués dans les cancers et relevant d'un intérêt en pratique clinique pour plusieurs cancers solides, a été élaborée pour identifier des altérations :

1. En rapport avec la prescription d'un traitement ciblant directement ou indirectement les gènes
2. Qui prédisent la résistance à un traitement
3. Pour lesquelles une molécule à l'étude dans un essai Clinique de phase II ou III est disponible
4. Orientant le processus diagnostique
5. Orientant la stratégie de traitement du patient

6. Permettant le suivi de la maladie résiduelle.

Panel tumeurs solides				
Gène	Exons / hotspots	Transcrit de référence	Molécule associée	utilité clinique
AKT1	3	NM_001014431.1	AKT inhibitors	essais cliniques
ALK	23+24+25	NM_004304.1	crizotinib, ALK inhibitors	AcSé, essais cliniques
BRAF	11+15	NM_004333.4	vemurafenib, dabrafenib	AMM
EGFR	18+19+20+21	NM_005228.3	anti EGFR	AMM
ERBB2 (HER2)	20	NM_004448.2	trastuzumab, neratinib	essais cliniques
ERBB4	E452K et R393W	NM_005235.2	Afatinib	essais cliniques
FGFR2	S252, N549, K659	NM_000141.4	FGFR inhibitors	essais cliniques
FGFR3	7+9+14 (R248 àS249 et G370 à Y373)	NM_000142.4	FGFR inhibitors	essais cliniques
HRAS	2+3+4	NM_005343.2	inhibiteurs de MEK	essais cliniques
KIT	8+9+11+13+17+18	NM_000222.2	imatinib	AMM
KRAS	2+3+4	NM_033360.2	panitumumab et cetuximab	AMM
MAP2K1 (MEK1)	2	NM_002755.3	inhibiteurs de MEK	essais cliniques
MET	2 + 14 (de c.2942-63 en 5' à c.3082+20 en 34) à 20	NM_001127500.1	crizotinib	AcSé
NRAS	2+3+4	NM_002524.3	panitumumab, MEK inhibitors, BRAF inhibitors	pré-AMM, essais cliniques
PDGFRA	12+14+18	NM_006206.4	imatinib	AMM
PIK3CA	9 + 20	NM_006218.2	PI3K inhibitors	essais cliniques

Figure 11. Listes de gènes minimales à analyser dans le cadre d'un usage à visée diagnostique du NGS (février 2016). (Source : <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Les-tests-de-genetique-somatique, INCa>)

L'implémentation du NGS ciblé en routine clinique, ainsi que la multiplication des programmes de *screening* moléculaire sur des panels plus larges développés dans de nombreux centres, ont également amené l'Institut à élaborer et diffuser une liste des essais cliniques ouverts dans les centres labellisés de phase précoce (CLIP) ayant la présence/la recherche d'un biomarqueur donné comme critère d'inclusion. L'objectif est de favoriser l'accès des patients concernés à ces essais.

L'utilisation de ces panels de gènes permet donc de séquencer simultanément des tumeurs de primitifs multiples dont les gènes d'intérêts peuvent se recouper ou être totalement différents. Cela entraîne souvent l'identification de mutations dont la valeur clinique n'est pas connue, de même que l'effet de la présence de co-altérations moléculaires (2 mutations/autre ou plus). Ainsi, l'Inca a émis en 2012 un 1^{er} **modèle de compte rendu de génétique moléculaire**, réactualisée en 2016 (24).

Pour le rendu des résultats, il est recommandé d'indiquer le nom du gène, la séquence génomique de référence (code NM_), la description de la mutation et l'altération protéique correspondante. Les résultats doivent être donnés selon la nomenclature HGVS.

Les techniques NGS fournissent une grande quantité d'informations qui doivent être hiérarchisées en fonction de leur niveau de validation clinique. Les mutations actionnables ou ayant fait l'objet de prescription doivent être mises en avant. Il est proposé de hiérarchiser les résultats selon la classification UNCseq (*Hayes et Kim, 2015*) qui se résume ainsi (25) :

Classe 5 : variant actionnable

Classe 4 : variant sans effet thérapeutique connu mais avec un effet potentiel activateur (oncogène) ou délétère

Classe 3 : variant sans effet connu dans la littérature. Des données de modélisation peuvent orienter vers un effet de la mutation

Classe 2 : variant potentiellement neutre

Classe 1 : variant connu comme un polymorphisme constitutionnel.

Dans le cas du cancer colorectal, le rapport final du programme européen 2011 de contrôle qualité externe pour la recherche de mutation *KRAS* précise le point suivant :

En cas de mutation *KRAS*, il est nécessaire d'établir l'association mutation/résistance aux anticorps anti-EGFR et en cas d'absence de mutation, il est nécessaire de préciser que le patient ne présente pas de résistance aux anticorps anti-EGFR.

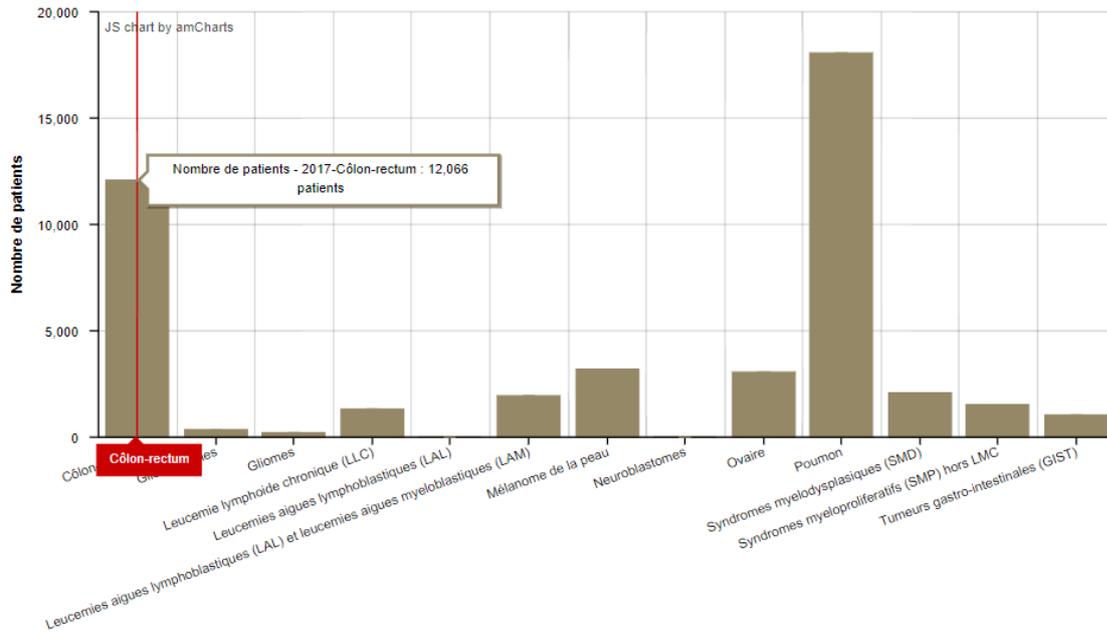


Figure 12. Activité détaillée de génétique somatique par NGS en 2017. (Source : <http://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/Soins/Les-tests-de-genetique-somatique/Les-tests-de-genetique-somatique>, INCa)

IDENTIFICATION DU LABORATOIRE			
Titre de l'examen			
EXAMEN N° : [code ou identifiant unique de l'échantillon par le laboratoire de génétique somatique]			
▪ Patient :	Nom	Prénom	Nom de naissance
▪ Né(e) le		Sexe :	F/H
▪ Réalisé à partir du prélèvement référencé	[n° identification du bloc dans le laboratoire pathologie d'origine]		
	datant du [date du prélèvement]		
▪ Reçu le	[date d'arrivée du prélèvement sur la plateforme]		
▪ Prescrit par :	[nom, prénom et coordonnées du prescripteur]	le	[date de la prescription]
▪ Motif de l'analyse demandée :	[préciser ici le contexte clinique de la demande]		
RENSEIGNEMENTS ANATOMO-CYTO-PATHOLOGIQUES :			
▪ Type de prélèvement [pièce opératoire, biopsie, cytologie...] et organe :			
▪ Type histologique et état tumoral (primitif, métastase et origine) :			
▪ Pathologiste responsable du diagnostic : [nom, prénom et coordonnées du pathologiste responsable du diagnostic initial]			
▪ Type de matériel tumoral : [FFPE, matériel congelé] et type de prélèvement [fragment, ponction, ctDNA...]			
▪ Analyse réalisée sur une zone sélectionnée par le Dr [pathologiste de la plateforme] comportant [x] % de cellules tumorales.			
RÉSULTATS			
▪ Variants dont l'impact clinique est connu classe 5, avec AMM dans la pathologie, à décrire selon la nomenclature HGVS			
Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
Ex : EGFR	NM_005228.3	c.2573T>G	p.Leu858Arg
▪ Variants à discuter en RCP moléculaire classes 4 et 5 sans AMM dans la pathologie, à décrire selon la nomenclature HGVS			
Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
Ex : MET	NM_001127500.1	c.2942-2A>G	variant d'épissage
▪ Autres variants dont la valeur prédictive est inconnue classe 3, à décrire selon la nomenclature HGVS			
Gène	Séquence de référence	Variant	Altération protéique
▪ Gènes pour lesquels aucune anomalie n'a été retrouvée les lister, selon la nomenclature HGVS			
▪ Résultat non interprétable pour les gènes les lister, en raison d'une profondeur de séquençage insuffisante			
▪ Résultat non interprétable [préciser la raison]			
▪ Analyse non réalisable [préciser la raison]			
Fait à [lieu]		le [date du compte rendu]	
Signature			
CONCLUSION / INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS EN L'ÉTAT ACTUEL DES CONNAISSANCES :			
▪ Dans la limite des techniques utilisées, aucune mutation n'a été détectée dans le(s) exon(s) X du gène X. <i>Commentaire éventuel pour un patient ayant un cancer colorectal et sans mutation de KRAS : Il n'est pas détecté de mutations de résistance aux traitements par des anticorps anti-EGFR.</i>			
▪ Présence de la mutation [nom usuel, par exemple L858R] du gène X conférant une sensibilité à [nom de la classe de thérapie ciblée].			
▪ Présence de la mutation [nom usuel] du gène X conférant une résistance à [nom de la classe de thérapie ciblée].			
▪ Présence d'une mutation du gène X de valeur prédictive indéterminée de réponse à [nom de la classe de thérapie ciblée].			
▪ Dans la limite des techniques utilisées, aucune mutation n'a été détectée dans le(s) exon(s) X du gène X. Étant donné le faible % (< X %) de cellules tumorales présentes dans l'échantillon analysé, ce résultat est non contributif : il est donc recommandé d'effectuer un contrôle sur un prélèvement plus riche en cellules tumorales.			
▪ Étant donnée la qualité et/ou [au choix] quantité de l'ADN extrait du prélèvement transmis, l'analyse n'est pas réalisable et/ou [au choix] interprétable. Un nouveau prélèvement serait nécessaire.			
▪ Analyse non réalisable car [tissu nécrosé, bloc épuisé].			
▪ Présence d'une mutation du gène [altération de classe 4 ou 5, nom usuel] à discuter en RCP moléculaire. [possibilité d'ajouter des précisions sur l'existence d'essais cliniques sur ce gène, notamment pour le programme AC5é]			
▪ Détection d'un gain/perte de copies du gène [altération de classe 4 ou 5, nom usuel] suggérant l'existence d'une amplification/délétion du gène. Ce résultat doit impérativement être vérifié par une technique complémentaire validée. L'intérêt clinique de cette altération est à discuter en RCP moléculaire.			
MÉTHODE			
▪ Analyse réalisée à partir d'un prélèvement (bloc / nombre de lames blanches / copeaux / tissu congelé) fixé au [si information disponible], après macrodissection [ou selon autre méthode] de la zone d'intérêt.			
▪ Méthode d'extraction de l'ADN génomique tumoral [si un kit commercial est utilisé : nom et version]			
▪ Méthode d'analyse [si un kit commercial est utilisé : nom et version], séquenceur utilisé, sensibilité, profondeur minimale, liste des gènes et des exons analysés, version du génome de référence utilisé, niveau de couverture des exons et séquence de référence [accession number]			
▪ Version du pipeline d'analyse			

Figure 13. Modèle de compte rendu de génétique moléculaire pour la recherche de mutations somatiques. (Source : Modèle de compte rendu de génétique moléculaire pour la recherche de mutations somatiques dans les tumeurs solides, INCa, 2016)

c. Développement de « BASKET » et « UMBRELLA » protocoles

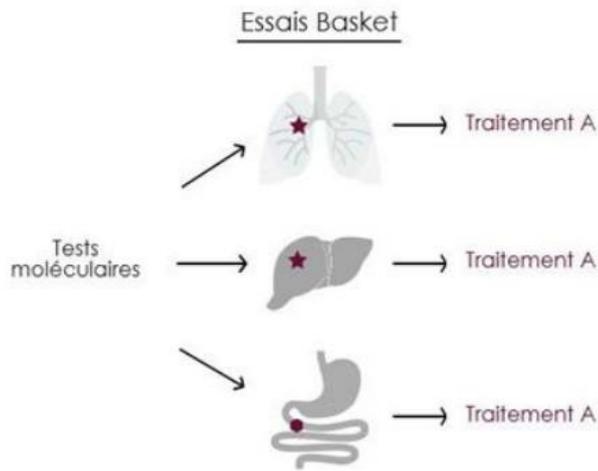
Afin de permettre aux patients de bénéficier le plus rapidement possible de molécules innovantes, plusieurs dispositifs d'essais cliniques portant sur des molécules, ayant obtenu une AMM ou non, ont été mis en place.

Des essais d'un nouveau genre : "basket", "umbrella", guidés par **la génomique**, prennent en compte la rareté des altérations moléculaires dans une localisation donnée et la possibilité qu'elles soient présentes dans différents types de cancers.

Par ailleurs, un programme d'accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes (**AcSé**) a été lancé en 2013. Il visait à proposer à des patients en échec thérapeutique de nouvelles thérapies ciblant des altérations génétiques présentes dans leur tumeur, indépendamment de l'organe concerné (26-28).

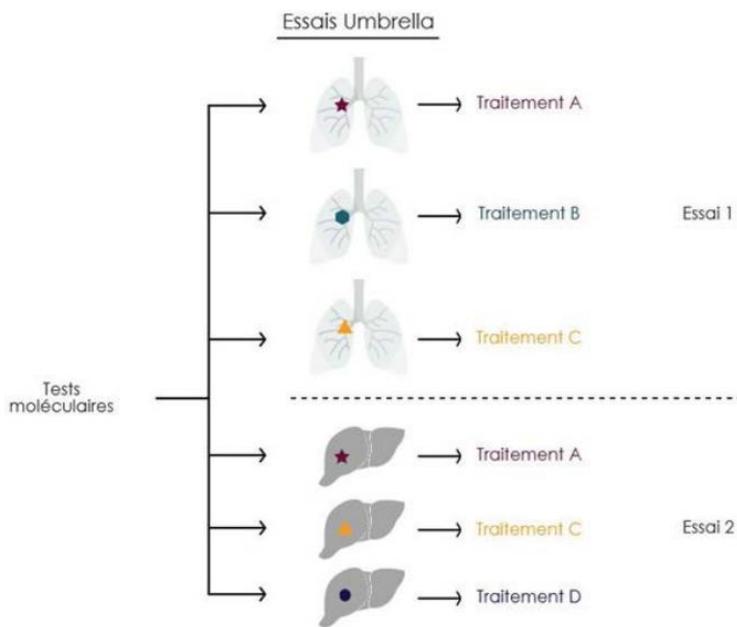
AcSé crizotinib permettait l'accès au crizotinib à des patients adultes, adolescents ou enfants, atteints de cancer en situation d'échec thérapeutique, qui présentait une altération génétique d'au moins une des cibles du crizotinib (*ALK*, *MET* ou *ROS1*).

AcSé vémurafénib, lancé en octobre 2014, visait à évaluer l'efficacité et la tolérance du vemurafenib sur environ 500 patients atteints de divers types de cancers, ayant comme point commun de présenter une anomalie génétique précise, les mutations V600 du gène *BRAF*, ciblées par ce traitement (29).



Un seul traitement visant une ou plusieurs cibles dans différentes tumeurs

Figure 14. Schéma d'un « Basket » protocole. (Source : Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015/Etat des lieux et enjeux, INCa, 2015)



Plusieurs traitements visant différentes cibles dans une même localisation

Figure 15. Schéma d'un protocole « umbrella ». (Source : Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015/Etat des lieux et enjeux, INCa, 2015)

d. Un exemple concret : le cancer du poumon

- **Thérapies ciblées et bio-marqueurs**

Fin 2015, 7 thérapies ciblées étaient autorisées dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé et agissaient sur trois mécanismes oncogéniques : trois inhibiteurs de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), deux inhibiteurs de ALK, deux anti-angiogéniques. Les anti-angiogéniques s'adressent à une population large, non restreinte à une anomalie moléculaire mais leurs utilisations sont restreintes à une histologie particulière : les cancers non à prédominance épidermoïde.

Les inhibiteurs d'EGFR et d'ALK s'adressent eux à des populations définies par la présence d'une anomalie moléculaire ; elles sont peu fréquentes voire rares et généralement mutuellement exclusives. La population cible des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ciblant EGFR se situe entre 2300 et 3300 nouveaux patients par an (1^{ère} ligne de traitement des stades avancés en présence de la mutation EGFR). La population cible du crizotinib est de l'ordre de 600 nouveaux patients par an (1^{ère} ligne de traitement des stades avancés en présence d'un réarrangement ALK) ; celle du céritinib de 400 nouveaux patients par an (1^{ère} ligne de traitement des stades avancés en présence d'un réarrangement ALK) (12).

Dans le cancer du poumon, les thérapies ciblées sont donc une option potentiellement efficace chez une faible proportion de patients atteints par la maladie compte tenu de leurs utilisations restreintes aux stades avancés, à certaines histologies ou à la présence d'altérations moléculaires (16,30).

- **Impact des co-altérations moléculaires ?**

Des études se sont penchées sur l'impact des co-altérations moléculaires associées aux mutations des gènes principaux dans les adénocarcinomes pulmonaires.

C'est le cas par exemple de l'étude publiée dans le Cancer Discovery en 2018 qui rapporte l'analyse rétrospective de l'association de co-altérations sur TP 53 ou STK11 chez des patients présentant un adénocarcinome du poumon *KRAS* muté. Cette étude a démontré que la présence d'une co-altération de STK11 avec une mutation *KRAS*, en comparaison à une co-altération TP53-*KRAS* ou d'une mutation *KRAS* isolée était associée à une résistance primaire aux inhibiteurs de PD-1 (immunothérapie) pour les adénocarcinomes du poumon testé PD-L1 positif (31).

Cet exemple illustre bien la complexité dans la compréhension des mécanismes moléculaire à l'échelle de la cellule cancéreuse.

Les analyses NGS nous donnent accès à une multitudes d'informations de plus en plus élargies dont nous ne connaissons pas encore tous les enjeux pronostiques ou encore prédictifs de réponse à des thérapies ciblées.

2-Le cancer colorectal

Epidémiologie

Le CCR est, comme énoncé précédemment, au troisième rang (3^{ème} position chez l'homme et 2^{ème} position chez la femme) des cancers les plus fréquents en France avec environ 46 000 nouveaux cas par an et au deuxième rang des décès par cancer (17117 décès en 2018).

Déjà observée aux États-Unis depuis les années 1985, la baisse de l'incidence du cancer colorectal s'observe en France une dizaine d'années plus tard, d'abord pour le cancer du rectum à partir de 1995, puis pour le cancer du côlon à partir de 2005. La mise en place du dépistage organisé avec la résection de lésions précancéreuses et la détection de cancers à un stade précoce pourraient expliquer en partie cette diminution et celle de la mortalité. L'absence de diminution de l'incidence du cancer colorectal chez la femme est toutefois difficile à expliquer.

Plus de 70 % des patients ont plus de 65 ans au diagnostic.

Les âges médians au diagnostic et au décès en 2018 sont respectivement de 71 et 77 ans chez l'homme et de 73 et 81 ans chez la femme. La survie nette à 5 ans est proche entre homme et femme et s'améliore au cours du temps, passant de 54% dans les années 1990 à 63% pour les cas diagnostiqués en 2005-2010 (2).

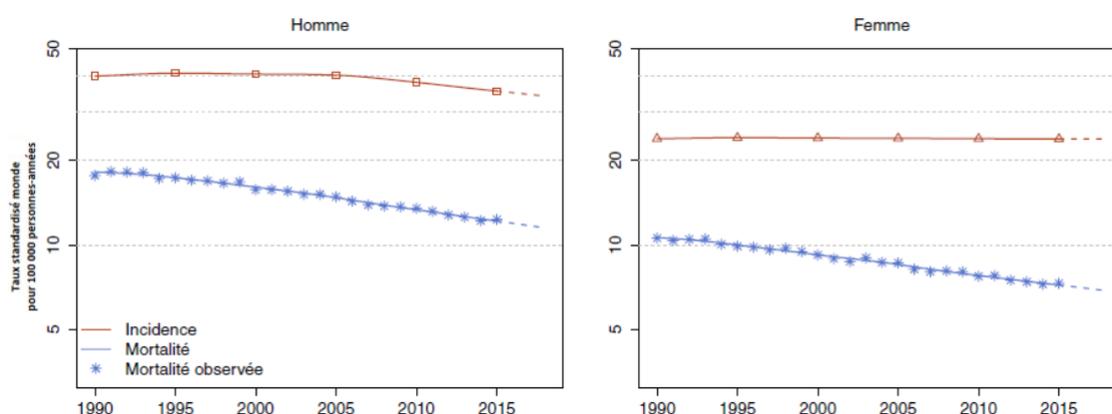


Figure 16. Taux d'incidence et de mortalité par cancer colorectal en France selon l'année (1990-2018). (Source : Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018, volume 1 : tumeurs solides, 2019)

Facteurs de risques et dépistage

a- Facteurs de risque

Dans 85% des cas, le cancer du côlon est d'origine sporadique. Il existe des formes familiales dont 5% seulement avec une anomalie génétique déterminée dont le syndrome HNPCC et la PAF que nous allons rapidement décrire.

Le principal facteur de risque de cancer du colorectal est l'âge supérieur à 50 ans (90% des cas). Parmi les autres facteurs de risque on retrouve les antécédents personnels ou familiaux d'adénome ou de CCR, les antécédents de maladies inflammatoires chroniques du tube digestif (MICI), l'acromégalie, des facteurs de risques environnementaux (tabac, alcool, alimentation riche en viande) et bien sûr les syndromes héréditaires liées à des anomalies génétiques (32).

Les principaux syndromes génétiques sont les suivants :

-**Le syndrome de LYNCh ou HNPCC** (*hereditary Non Polypsis Colorectal Cancer*), représentant 4% des CCR, lié à une déficience des protéines de réparation de l'ADN du système MMR (*Mismatch Repair*). Cela entraîne l'accumulation de mutations somatiques que l'on identifie principalement au niveau des microsatellites de l'ADN. Les tumeurs présentant ces instabilités au niveau microsatellitaire sont qualifiées de MSI pour phénotype Microsatellitaire Instable. Deux méthodes sont aujourd'hui disponibles pour déterminer ce statut : l'immuno-histochimie à la recherche d'une perte d'expression des protéines et par biologie moléculaire (PCR/NGS) (33).

-**La polypose adénomateuse familiale (PAF)** qui est une maladie héréditaire autosomique dominante liée à une mutation du gène APC et qui se caractérise par l'apparition de centaines ou milliers d'adénomes dès l'adolescence. La prise en charge consiste en une surveillance rapprochée de ces adénomes et à une chirurgie prophylactique lorsque le nombre devient trop important.

-Enfin, il existe des formes beaucoup moins fréquentes de polyposes telles que le syndrome MAP (*MYH associated polyposis*), la maladie de Cowden (mutation

PTEN), la polypose juvénile (mutation des gènes SMAD 4 ou BMPRA1) ou le syndrome de *Peut-Jeghers* (mutation LKB1/STK11) (32).

b. Dépistage

L'objectif du dépistage est de détecter les lésions cancéreuses ou pré-cancéreuses à un stade précoce et potentiellement curable. Le traitement précoce repose sur l'exérèse de polypes colorectaux par voie endoscopique. En effet, il est bien décrit dans la littérature que la polypectomie diminue l'incidence du CCR et sa mortalité (*Brenner H, Stock C et al.*, (34)).

En France, les stratégies de dépistage se déclinent selon le niveau de risque du CCR :

- Le dépistage **national** organisé pour les personnes à **risque modéré** reposant sur la réalisation d'un test immunologique de recherche de sang occulte dans les selles⁵ puis, en cas de résultat positif, la réalisation d'une coloscopie ;
- Le dépistage **individualisé** pour les personnes à **risque élevé et à risque très élevé** qui relèvent d'emblée de la coloscopie.

Cancérogenèse et classification moléculaire des cancers colorectaux

Le CCR est l'une des premières tumeurs solides à avoir été décrite à la fin des années 80, début des années 1990 par Vogelstein (Séquence de Vogelstein) qui étudiait la perte de fragments de chromosomes sur les cellules de cancers coliques, notamment de régions porteuses de gènes suppresseurs de tumeur ou oncogène (35).

Elle est actuellement bien décryptée sur le plan moléculaire avec plusieurs voies génétiques identifiés dans l'initiation et la croissance de la tumeur.

Il s'agit donc, comme vu précédemment, d'un processus en plusieurs étapes par l'accumulation de mutations génétiques impliquant des oncogènes (*KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *PIK3CA*) et de gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *APC*, *SMAD4*)

entraînant la dérégulation des voies de signalisations cellulaires impliquée dans la croissance et le développement. Les voies de signalisations principales sont les suivantes (32,36,37) :

- La voie de WNT/beta-caténine
- La voie du TGF Beta (*Transforming Growth Factor beta*)
- La voie de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*)
- La voie des MAP Kinases (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)

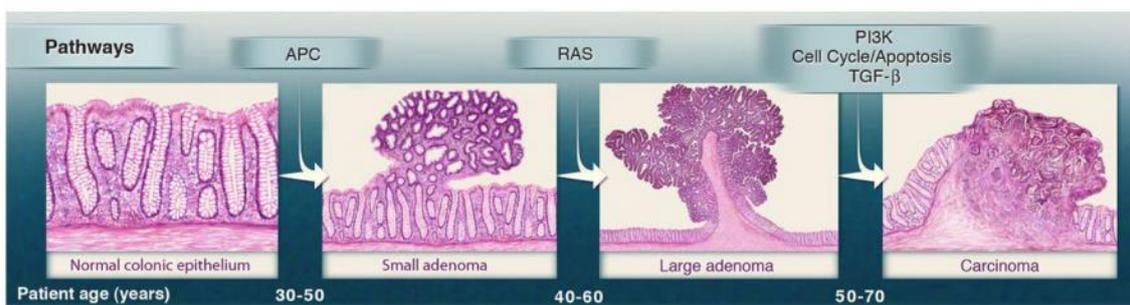


Figure 17. Illustration de la cancérogénèse du cancer colorectal. (Source : Vogelstein et al., *Cancer Genome Landscape*, Science, 2013)

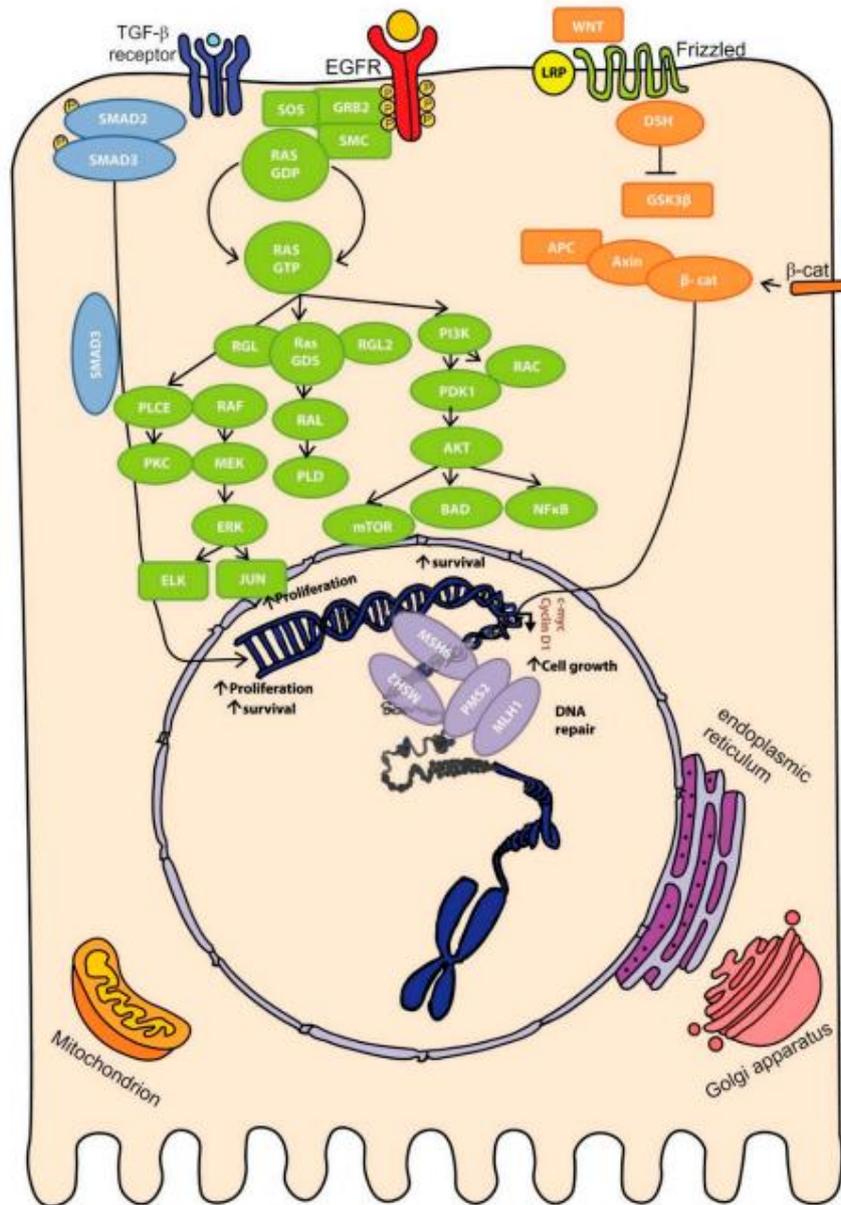


Figure 18. Voies de signalisations cellulaires impliquées dans le cancer colorectal. (Source : Inés Mármol and al, Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer, 2017, International Journal of Molecular Sciences)

Ces altérations sont retrouvées dans la plupart des cancers colorectaux avancés. On distingue classiquement 2 groupes moléculaires, selon leur profil d'altération génomiques ou chromosomiques (38,39) :

1-Les tumeurs chromosomiquement instables dites CNI+ (80-85%) : ces tumeurs sont caractérisées par une perte d'un morceau de chromosome (Loss Of Heterozygosity LOH), principalement d'un fragment du bras long du chromosome 5 (LOH 5q) mais également des chromosomes 2p, 17p, 18q. Elles présentent des mutations et perte d'APC, la majorité des mutations RAS, de P53, peu de mutations *BRAF* et se développent préférentiellement au niveau du côlon gauche et chez l'homme.

2-Les tumeurs à instabilité génétique (15%) : elles présentent une instabilité microsatellitaire (MSI), en lien avec une défaillance du système MisMatch Repair (MMR) impliquée dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN. Elles se développent principalement dans le colon droit et chez la femme.

Elles arborent des mutations diverses : hyperméthylation du promoteur de MLH1 (formes sporadiques), mutations de BAX, de la βcaténine, de TGFβ et de *BRAF*. Elles comprennent les cancers développés dans un contexte de prédisposition familiale type Lynch (30%) et sont associées aux tumeurs dites CIMP+ (CpG Island Methylator Phenotype) caractérisées par une hyperméthylation de îlots CpG (séquences nucléotidiques de la région promotrice de gènes présentant une répétition du motif Cytosine-Guanine). La méthylation des cytosines de ces séquences est responsable d'un défaut d'expression des gènes correspondants.

En 2015, un consortium international a été formé afin d'améliorer les connaissances concernant le CCR en termes de biologie moléculaire. Ainsi, une étude ayant évalué les résultats de 6 classifications moléculaires indépendantes du CCR a permis de proposer une nouvelle taxinomie basée sur les caractéristiques génomiques, biologiques, épigénétiques ainsi qu'aux taux de survie sans récurrence, de survie globale et de survie après récurrence (au total ,6 algorithmes de sous types

du CCR ont été évalués, un total de 4151 patients provenant de 18 cohortes ont été analysés) (40). Cette nouvelle classification consensuelle permet la caractérisation de la majorité des tumeurs en un des quatre sous-types robustes :

CMS 1 : “MSI *immune*” 14%, représenté par des tumeurs hypermutées et MSI (déficience du système de réparation MMR), avec une forte infiltration de cellules immunitaires et cytotoxiques. Il concerne principalement des femmes âgées atteinte d’un cancer du côlon proximal, peu ou non différenciées. De plus, elles sont associées à des mutations fréquentes de *BRAF*^{V600E}. Ce groupe est caractérisé par une meilleure SSR, une SG intermédiaire et une survie après récurrence faible.

CMS 2 : “*Canonical-Canonique*” 37% : représenté par des tumeurs épithéliales, chromosomiquement instables avec des taux élevés d’altération du nombre de copies chromosomiques (CNA), des mutations fréquentes de P53, une absence d’infiltration immunitaire, un statut MSS, une dépendance des voies de signalisation de WNT et MYC. Elles sont principalement développées au niveau du colon distal et présente un meilleur taux de survie après récurrence.

CMS 3 : “*Métabolic-Métabolique*” 13% : représenté par des tumeurs épithéliales, un statut microsatellite stable (90%) ou instables (10%) avec dysrégulation métaboliques, mutations sur la voie des *MAPK*. Ce groupe est caractérisé par une survie intermédiaire.

CMS 4 : “*Mesenchymal*” 23% : représenté par des tumeurs chromosomiquement instable avec un taux élevé de CNA, un statut MSS, une activation des voies TGF-beta et VEGF, un phénotype mésenchymateux et une forte infiltration stromale par des cellules immunosuppressives. Ce sous-groupe est associé à un pronostic péjoratif avec une signature inflammatoire, angiogénique et immunosuppressive. Il concerne principalement des patients jeunes avec un cancer de stade avancé

Enfin, 13 % des patients n'ont pu être classifiés en raison de la présence de sous-type mixte (épithéliaux et mésenchymateux).

CMS1 MSI Immune	CMS2 Canonical	CMS3 Metabolic	CMS4 Mesenchymal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP high, hypermutation	SCNA high	Mixed MSI status, SCNA low, CIMP low	SCNA high
<i>BRAF</i> mutations		<i>KRAS</i> mutations	
Immune infiltration and activation	WNT and MYC activation	Metabolic deregulation	Stromal infiltration, TGFβ activation, angiogenesis
Worse survival after relapse			Worse relapse-free and overall survival

Figure 19. Classification CMS des cancers colorectaux. (Source : J. Guinney and al, The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer, Nature Med, 2015)

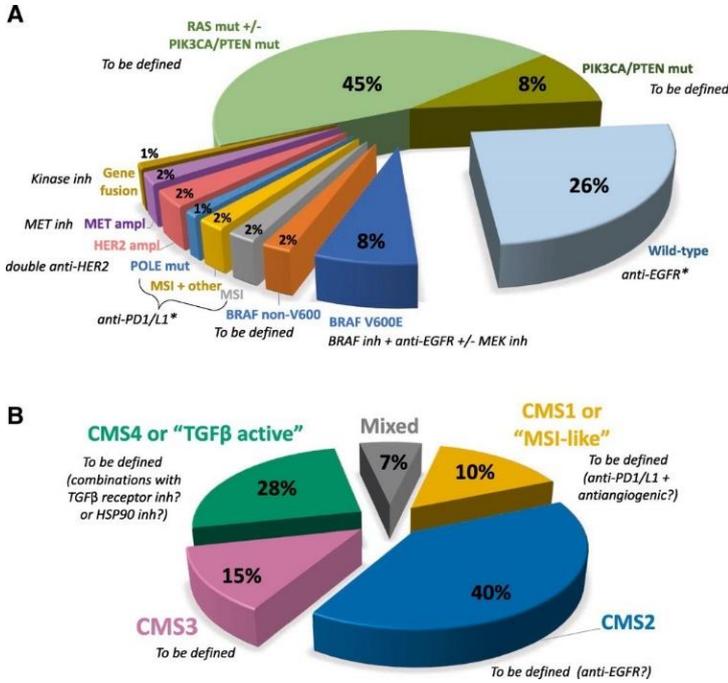


Figure 20. Classification moléculaire des CCR et implications thérapeutiques. (Source : Dienstmann et al, Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer, ASCO educationnal book 2018)

Facteurs prédictifs et pronostiques

a-Le Statut mutationnel *RAS-BRAF*

Depuis environ dix ans maintenant, les avancées dans la connaissance de la biologie moléculaire des cancers colorectaux ont permis de mettre en évidence des facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR, cetuximab et panitumumab, qui sont des anticorps monoclonaux. En effet, en situation métastatique, il est bien établi depuis le début des années 2000 que les tumeurs présentant une mutation des gènes *KRAS* ou *NRAS* exons 2, 3, 4 ont un profil de résistance à ces anti-EGFR (41-43).

Pour rappel, les gènes *KRAS* et *NRAS* codent pour des protéines la famille des GTPase et jouent un rôle dans la prolifération cellulaire. *KRAS* est un gène qualifié de proto-oncogène car des mutations de ce gène au niveau de la partie codante pour le domaine fonctionnel de la protéine, entraîne une activation de celle-ci et donc une prolifération anormale de la cellule, via la voie des MAPkinases. Les mutations du gène *KRAS* font partie des mutations les plus fréquemment retrouvées dans tous cancers confondus (25%) et concernent environ 50% des cancers colorectaux où elles surviennent précocement.

Ainsi, la recherche du statut mutationnel *KRAS* et *NRAS* est actuellement indispensable à la stratégie thérapeutique dans le CCR métastatique et les patients non mutés « Wild TYPE » (WT) pourront bénéficier d'un traitement par anti-EGFR.

Un peu plus tardivement cette connaissance s'est étayée avec la découverte de l'implication des mutations *BRAF* dans les cancers du côlon. En effet, le signal de transduction de prolifération cellulaire à partir du récepteur de l'EGFR par la voie des MAPK fait intervenir les protéines *RAS* dont *KRAS* mais également *RAF* dont *BRAF* qui intervient plus en aval dans la chaîne. Des études ont ainsi montré que les patients mutés *BRAF* avaient également un profil de résistance aux anti-EGFR par cette activation en aval du signal de transduction via la protéine *BRAF* (44,45).

Par ailleurs, les cancers colorectaux présentant une mutation *BRAF* sont associés à un très mauvais pronostic avec une survie médiane d'environ 1 an pour les cancers métastatiques (46-50).

Plus récemment, l'étude BEACON en 2^{ème} ligne chez les patients présentant un cancer du côlon muté BRAF a montré un bénéfice en survie globale (9,3 mois vs 5,9 mois (HR 0,61 [0,48-0,77] ; p=0,0003)) en faveur de l'association anti-BRAF/anti-EGFR comparé à l'association chimiothérapie/anti-EGFR (51).

b-Le Statut MSI/dMMR

Indépendamment du type tumoral, la présence d'une instabilité microsatellitaire ou déficience du système MMR, soit sporadique (par hyperméthylation du promoteur MLH1), soit dans le cadre d'un syndrome de Lynch (par mutation d'un des gènes du système MMR) est un biomarqueur majeur pour sélectionner les patients à même de bénéficier d'une immunothérapie par inhibiteur de checkpoint immunitaire.

Dans le CCR métastatique, les tumeurs MSI/dMMR représentent 5% des patients, et leurs inclusions dans des études de phase II et III ont montré de bons résultats en faveur de l'immunothérapie.

L'étude Checkmate 142 : Dans cet essai multicentrique en ouvert de phase II, incluant 74 patients atteints de CCRm statut MSI ayant reçu du Nivolumab 3mg/m² tous les 15 jours, l'objectif principal était le taux de réponse objectif. On retrouvait sur les patients traités un taux de réponse de 31.1 % (95% IC 20,8–42,9) et 51 patients (69%, 57–79) avait une maladie stable à 1 an ou plus (52).

De même, l'association Nivolumab plus Ipilimumab chez ce groupe de patients retrouvait des taux de réponse élevés et encourageants concernant la survie sans progression et la survie globale (12 mois), avec des effets secondaires acceptables (53).

L'essai KEYNOTE-177 : Dans cet essai international de phase III étaient comparés, en traitement de 1^{ère} ligne, le pembrolizumab (inhibiteur de PD-1) versus le traitement standard, la chimiothérapie ± thérapie ciblée, chez 307 patients atteints d'un CCRm MSI (PS à 0-1 selon l'OMS). 153 patients ont été randomisés dans le groupe Pembrolizumab et 154 dans le groupe chimiothérapie avec des caractéristiques initiales homogènes dans les deux groupes de traitement. On

retrouvait un doublement de la médiane de survie sans progression dans le groupe traité par Pembrolizumab de 16,5 mois versus 8,2 mois dans le groupe chimiothérapie, soit une réduction de 40% du risque de progression sous Pembrolizumab (versus chimiothérapie ; HR=0,60 [0,45-0,80] ; p=0,002). A 24 mois de la randomisation, 48,3% des patients traités par pembrolizumab n'avaient pas progressé et ont pu arrêter tout traitement vs 18,6% pour ceux traités par chimiothérapie. Le profil de tolérance s'est révélé plus favorable sous pembrolizumab avec 22% d'évènements indésirables de grade 3 ou 4 versus 66% sous chimiothérapie (54).

c-La latéralité : Colon droit Vs Colon gauche , impact pronostic et prédictif

Depuis 2016, l'analyse des données de l'étude CALGB/SWOG a mis en évidence la latéralité du cancer comme étant un facteur pronostic indépendant du statut mutationnel dans le cancer du côlon métastatique, avec un pronostic péjoratif pour les cancers du côlon droit (SG d'environ 10 mois contre 30 mois pour les tumeurs du colon gauche) (55).

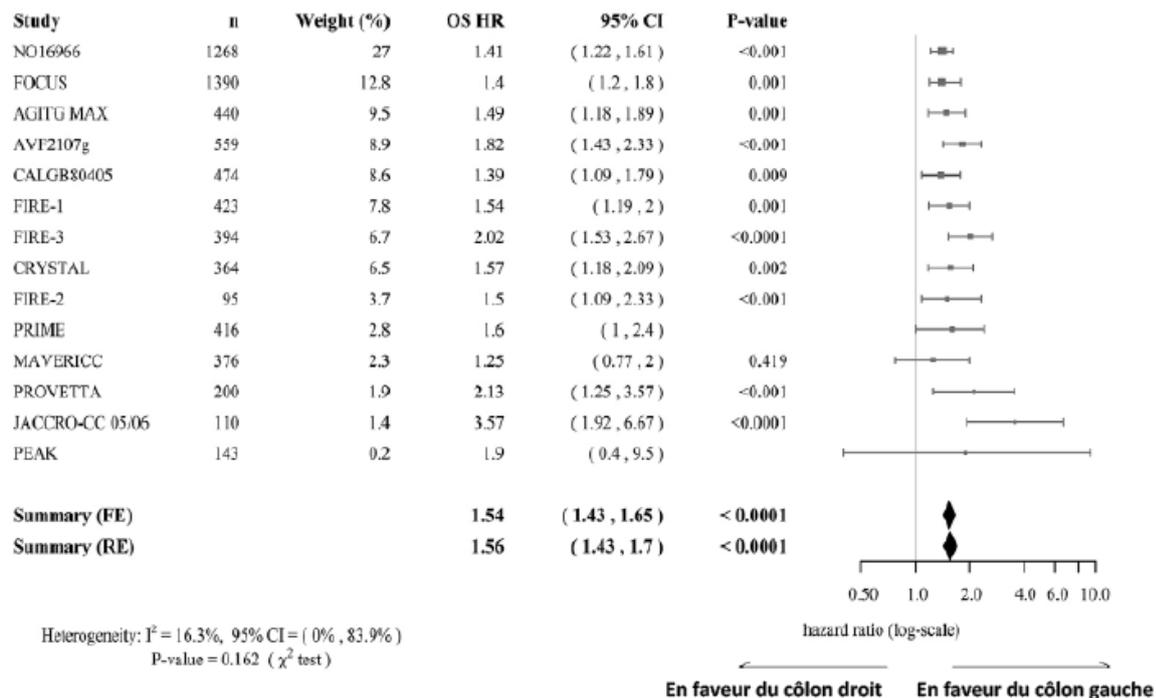


Figure 21. Impact pronostique de la localisation tumorale (côlon gauche vs côlon droit). Méta-analyse de 13 essais randomisés et d'une étude prospective de 1^{ière} ligne, D'après Holch JW et al). (Source : Cancer du côlon : classifications moléculaires et anatomiques nécessaire à la décision thérapeutique, www.fmccgastro.org)

Les données actuelles concernant l'influence de cette localisation tumorale dans le choix thérapeutique suggèrent un effet prédictif d'efficacité des anti-EGFR en termes de réponse, SG et de SSP pour les cancers du côlon gauche et à l'inverse un effet prédictif d'efficacité du bévacizumab pour les cancers du côlon droit (30 vs 25 mois). L'essai américain CALGB 80405 qui comparait une bichimiothérapie de type folfox ou folfiri associée au cetuximab ou au bevacizumab n'a pas montré de différence de SG ni de SSP entre ces deux associations (56). L'analyse en sous-groupe relevait un bénéfice en SG et SSP en faveur du bras cetuximab uniquement dans les cancers du côlon gauche (Respectivement HRSG : 0,82 [0,69-0,96] et HRSSP : 0,84 [0,72-0,98]). À l'inverse il existait un bénéfice (à la limite de la significativité pour la SG) en faveur du bevacizumab pour les cancers du côlon droit (HRSG : 1,26 [0,98-1,63] et HRSSP : 1,26 [1,0-1,62]). Les données concernant les

taux de réponses tumorales étaient moins claires pour les cancers du côlon droit avec une tendance en faveur des anti-EGFRs.

TC		Loc.	HR (95 % CI)	P (ajusté)
Total SG et SSP		Cetux vs Bev; gauche Cetux vs Bev; droit	1.53 (1.13 - 2.08)	$p_{int} = 0.005$
Cetux vs Bev	SG	Gauche	0.82 (0.69 - 0.96)	$p = 0.01$
	SSP		0.84 (0.72 - 0.98)	
Cetux vs Bev	SG	Droit	1.26 (0.98 - 1.63)	$p = 0.08$
	SSP		1.26 (1.00 - 1.62)	

Figure 22. Impact de la localisation tumorale sur l'efficacité du cetuximab et du bevacizumab (SSP et SG) à partir des données de l'essai CALGB 80405.

(Source : Cancer du côlon : classifications moléculaires et anatomiques nécessaire à la décision thérapeutique, www.fmcgastro.org)

Le degré de preuve apparaît cependant actuellement trop faible (études poolées de sous-groupes non-pré-spécifiées, peu pertinentes) pour se positionner sur des recommandations d'utilisation d'un anti-EGFR ou d'un anti-VEGF (accord d'experts). La latéralité de la tumeur primitive n'est donc pas le critère principal du choix de la thérapie ciblée en 1^{ère} ligne du CCRM (avis d'experts) (57).

d-Le statut HER2

À l'instar des adénocarcinomes gastriques et des carcinomes mammaires, la surexpression d'HER2 pourrait conférer aux CCR une sensibilité aux inhibiteurs d'HER2. Un essai de phase II (HERACLES) paru dans le *Lancet* en 2016 a suggéré que l'association du Trastuzumab (anticorps monoclonal recombinant spécifique des récepteurs HER2/neu) et du Lapatinib (un inhibiteur des domaines intracellulaires

de la tyrosine kinase des récepteurs EGFR (ErbB1) et HER2 (ErbB2)) était efficace chez 24 patients lourdement prétraités (5 lignes antérieures) pour des CCRm HER2 surexprimés. Les taux de réponse étaient de 34,7%. Un essai de phase III est en cours pour tester ce double blocage HER2 dans le CCRm (58).

A l'inverse, elle serait un facteur prédictif de mauvaise réponse aux anti-EGFR (*Raghav et al.*, JCO, 2016) (59).

e-La mutation *PIK3CA* exon 20

Le gène *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphonate 3-Kinase Catalytic Subunit ALphaexon*), impliqué dans la voie de transduction *PIK3-AKT-mTor* est souvent retrouvé associé aux mutations des gènes *RAS/BRAF* dans le cancer colorectal.

Un article publié dans le *Lancet Oncology* en 2010 soutient que la présence de cette mutation serait également un facteur de mauvaise réponse aux anti-EGFR (45) dans les CCRm. Cependant, le rôle pronostique des altérations de *PIK3CA* reste controversé (60,61).

f-L'expression de *PTEN*

Le gène *PTEN* (*Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) régule négativement l'expression de la voie *PIK3CA*.

La perte d'expression de *PTEN* dans les cancers colorectaux métastatiques serait un facteur de mauvais pronostic (58).

g-classification CMS

La classification CMS décrite précédemment a une valeur pronostique indiscutable (62,63).

Le groupe CMS 1 est associé à une meilleure SSR, une SG intermédiaire et une Survie après récidive faible.

Le groupe CMS2 présente un meilleur taux de SAR que les autres sous-types, le groupe CMS3 est caractérisé par une survie intermédiaire et enfin le groupe CMS 4 est associé à un pronostic péjoratif.

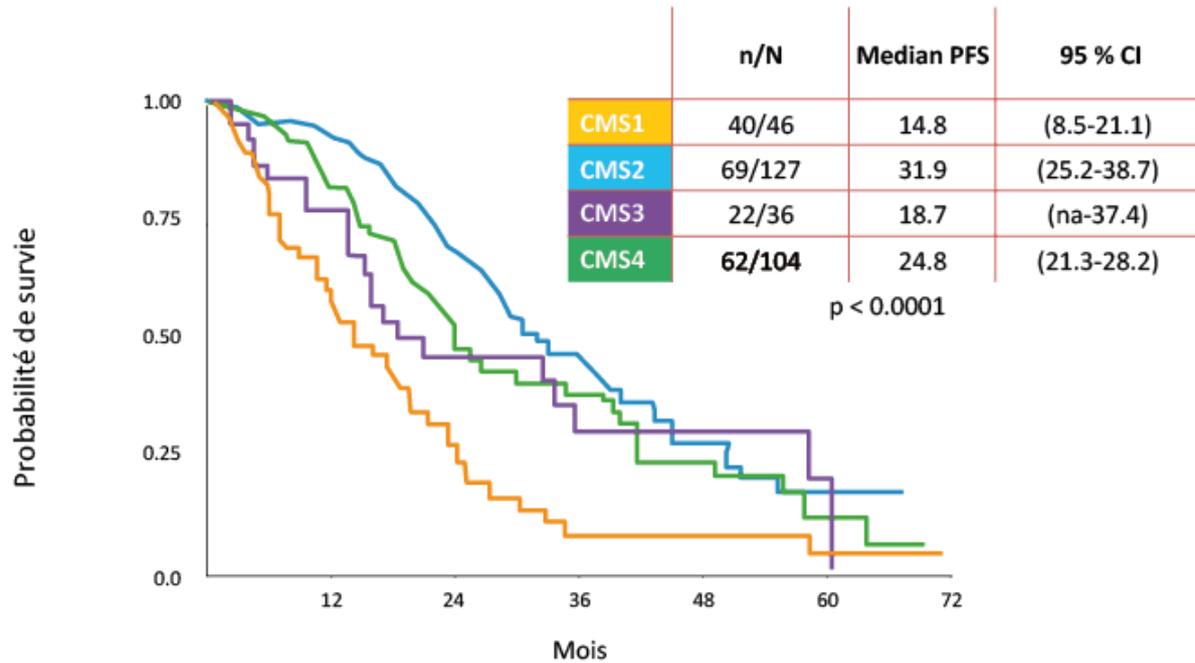


Figure 23. Impact pronostique de la classification CMS en situation métastatique à partir de 313 patients RAS WT de l'essai FIRE-3 d'après Stinzing S et al.

(Source : Cancer du côlon : classifications moléculaires et anatomiques nécessaire à la décision thérapeutique, www.fmcgastro.org).

f) La présence d'une fusion du gène NTRK

Le récepteur TRK (*tropomyosin receptor kinase*) est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase jouant un rôle dans la prolifération cellulaire et la physiologie du système nerveux. Des fusions du gène NTRK, codant pour ce récepteur, ont été retrouvées dans diverses tumeurs solides et conduisent à son activation constitutionnelle.

Deux études réalisées sur 54 et 55 patients avec des cancers digestifs avancés portant une fusion *NTRK* ont montré des résultats encourageants. Une réponse partielle a été observée chez 50 % des patients avec un CCR traités par larotrectinib. Des réponses partielles ont également été rapportées chez un patient avec un cholangiocarcinome, et un autre traité pour un adénocarcinome pancréatique. Une réponse complète a par ailleurs été mise en évidence sous traitement chez un patient présentant une GIST (*Gastro Intestinal Stromal Tumour*). Enfin, sous entrectinib, une réponse partielle a été décrite chez un patient ayant un CCR et pour deux patients avec un adénocarcinome pancréatique (64).

Recommandations du thésaurus national de cancérologie digestive (TNCD) pour les explorations pré-thérapeutiques dans le CCR métastatique (57)

1-Détermination du statut du gène RAS tumoral (*KRAS* et *NRAS*) sur tissu de tumeur primitive ou métastases (*Recommandation : grade A*).

2-Détermination du statut du gène *BRAF* tumoral (soit au niveau de la tumeur primitive, soit au niveau des métastases) (*Recommandation : grade C*)

3-Détermination du phénotype MSI afin de pouvoir proposer un essai d'immunothérapie (Anti-PD1et anti-PDL1) pour les cancers colorectaux métastatiques (accord d'experts) et dans le cadre de la recherche d'un syndrome de Lynch.

Dans ses recommandations, *l'ASCO educational book 2018* évoque également la recherche d'une fusion du gène NTRK (65).

II-PRESENTATION DE L'ETUDE ET RESULTATS

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est au 3^{ème} rang des cancers dans le monde avec plus d'un million de nouveaux cas diagnostiqués chaque année (1).

En France, il représente la 2^{ème} cause de décès par cancer (9 209 décès en 2018).

Bien que la survie nette à 5 ans s'améliore au cours du temps, passant de 54% dans les années 1990 à 63% pour les cas diagnostiqués en 2005-2010, le CCR reste un enjeu de santé publique majeur (2,3).

Depuis les années 2000, les connaissances dans la biologie moléculaire des CCR ont évolué, mettant en évidence diverses altérations génétiques au sein de ces tumeurs (33,35,37,66,67). Ces altérations moléculaires ont permis de distinguer différents profils tumoraux selon leur mécanisme de cancérogénèse, leur pronostic mais également leur profil de réponse à certaines thérapeutiques (32,36,63). Un exemple majeur est celui des mutations du gène *RAS* (exons 2,3, et 4 de *KRAS* et *NRAS*), présentes dans environ 50% des CCR, connues comme étant des biomarqueurs de résistance aux anti-EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) en situation métastatique (42). C'est pourquoi, les anti-EGFR comme le cetuximab et le panitumumab, sont utilisées en monothérapie ou en association à une chimiothérapie dans le traitement des CCR métastatiques *RAS* sauvages avec une amélioration significative de la survie globale passant de 12 mois à 2 ans (56). Plus récemment, d'autres mutations de la voie des *MAP* (*Mitogen-Activating Protein*) kinases, telle que celles du gène *BRAF* ont été identifiées. Elles représentent 8 à 10% des CCR, la plus fréquente étant la mutation *BRAF*^{V600E}. Si la valeur pronostique péjorative de la mutation de *BRAF*^{V600E} dans le CCR est incontestable, sa valeur prédictive sur la réponse aux anti EGFR reste débattue (46,48,49,68,69). Des données récentes dont l'étude BEACON suggèrent un bénéfice en termes de survie globale de l'association anti-*BRAF* et anti-EGFR chez des patients présentant un CCR métastatique *BRAF*^{V600E} muté (51,70).

Ces découvertes s'inscrivent dans un contexte d'amélioration des techniques de séquençage génétiques et de développement du séquençage à haut débit ou *Next Generation Sequencing* (NGS), permettant l'analyse de plusieurs gènes (panel) simultanément (15,18,71). Afin de recouvrir l'ensemble des gènes d'intérêt, donnant accès à des thérapies ciblées, tous cancer confondus, l'INCa (Institut National du Cancer) a mis en place depuis 2016 l'analyse d'un panel comprenant 16 gènes. L'analyse des tumeurs colorectales sur ce panel NGS donnent les informations indispensables à la prise en charge thérapeutique avec la détermination du statut mutationnel des mutations dites principales *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* mais peuvent également mettre en évidence d'autres mutations ou co-altérations moléculaires dont la valeur prédictive est encore mal connue (72,73). C'est le cas par exemple de la mutation du gène *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphonate 3-Kinase Catalytic Subunit Alphaexon*), impliquée dans la voie de transduction *PIK3-AKT-mTor*, qui est fréquemment retrouvée associée aux mutations principales de *KRAS* (45). Certaines études récentes suggèrent que les analyses en NGS pourraient améliorer les prédictions en termes de survie globale ou encore de réponse aux thérapies ciblées (74,75).

Le but de cette étude était de déterminer l'impact des altérations moléculaires associées aux mutations des gènes *RAS* et *BRAF*, détectées en NGS, sur les cancers colorectaux métastatiques.

Matériel et Méthode

Schéma de l'étude et objectifs

Nous avons réalisé une étude rétrospective basée sur les données clinico-biologiques, anatomopathologiques et moléculaires recueillies à partir des informations contenues dans les dossiers médicaux informatisés des patients du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier (Logiciel Dx Care) et de

l'Institut régional du Cancer de Montpellier (ICM) (Logiciel Crossway), ainsi que les éléments contenus dans la GED (Gestion Electronique de Documents).

L'objectif principal de l'étude était d'évaluer l'impact des altérations moléculaires associées aux mutations principales des gènes RAS et *BRAF* sur la survie globale de patients traités pour un cancer colorectal métastatique au CHU ou à l'ICM. Les objectifs secondaires incluaient l'impact de ces co-altérations sur la survie sans progression, leur impact selon les traitements reçus en 1^{ière} ligne à savoir, bichimiothérapie seule (FOLFIRI/FOLFOX) vs bichimiothérapie associée un anti-angiogénique (FOLFOX/FOLFIRI + bevacizumab ou FOLFIRI + aflibercept) vs trichimiothérapie seule (FOLFIRINOX) vs autres (monochimiothérapies, traitements combinés, autres protocoles de chimiothérapies, chirurgie/radiothérapie/radiofréquence de métastases) et selon le statut opéré de métastases vs non opéré (quel que soit le site métastatique).

Compte-tenu du caractère rétrospectif de l'étude, il n'y a pas eu de consentement requis à l'analyse des données.

Population

La population de notre étude concernait tous les patients pris en charge au CHU de Montpellier ou à l'ICM pour un cancer colorectal métastatique initial ou secondairement, et ayant bénéficié d'une analyse tumorale par NGS à partir d'un échantillon de biopsie ou de pièce opératoire (primitif ou métastase) entre le 8 avril 2017 et 1^{er} juin 2018.

Ont été exclus de l'étude, les patients dont l'analyse par NGS était ininterprétable, dont les données concernant le suivi et la prise en charge n'était pas disponibles ou encore lorsque le primitif était à postériori un cancer non colorectal.

Analyse NGS:

Pour tous les échantillons, l'analyse par NGS a été réalisée selon le protocole du laboratoire de biologie du CHU de Montpellier, en respectant les étapes suivantes :

-L'extraction de l'ADN à partir des échantillons de tissus inclus en paraffine dit FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded), en utilisant les kits « RSC DNA FFPE Kit » (extracteur Maxwell), suivie d'un contrôle de la quantité et de la qualité de l'ADN.

-La préparation des Librairies avec amplification des régions d'intérêt par PCR et ajout des adaptateurs et codes-barres nécessaires pour le séquençage. Deux techniques par amplicons ayant fait l'objet d'une validation antérieure par le laboratoire pour l'analyse moléculaire sur des échantillons de tissus FFPE ont été utilisées :

Fluidigm_Panel_v1 (technologie « Acces Array »), couvrant les 19 gènes suivants : *AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, ERBB2, ERBB4, FGFR2, FGFR3, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN.*

TSCA_Panel_INCa_v2 (technologie « TruSight »), couvrant le panel des 19 gènes suscités ainsi que les 15 suivants : *CDKN2A, , DDR2, FGFR1, GNA11, GNAQ, GNAS, H3F3A, H3F3B, HIST1H3B, JAK2, POLE, RAC1, SMAD4, STK11, TERT.*

-Le séquençage en haut débit, réalisé par les automates MiniSeq (Illumina) pour le panel Fluidigm et MiSeq (Illumina) pour le panel TSCA, avec contrôle de la qualité des paramètres de ce dernier (vérification de la couverture des régions d'intérêts et de la profondeur de lecture).

-L'analyse bio-informatique, réalisée par le pipeline SARDINE_V1 + GSM_MTP_V2 à partir de l'alignement sur le génome humain de référence.

Les altérations étaient relevées pour un seuil de fréquence allélique supérieur ou égal à 5% (hors cas spécifiques à l'expérience du médecin biologiste).

Les variants dit actionnables (classe 5 de la classification de UNCseq) et sans effet connu dans la littérature (classe 3) étaient rendus dans l'analyse finale.

Les variants connus comme un polymorphisme constitutionnel (classe 1) n'était pas rendu dans l'analyse finale.

Chaque résultat était validé après une double lecture par deux opérateurs différents comprenant un docteur en biologie.

Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées en intention de traiter.

Les comparaisons entre les différents groupes ont été faites par le test du Qui2 ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives, et par le test t de *Student* ou le test de *Kruskal-Wallis* pour les variables quantitatives.

Pour la survie globale (SG), les délais ont été mesurés entre la date du diagnostic de cancer métastatique et la date de décès (toute cause), ou la date des dernières nouvelles la cas échéant (données censurées).

Pour la survie sans progression (SSP), les délais ont été mesurés entre la date du diagnostic de cancer métastatique et la date de survenue de la première progression ou du décès.

Les données de survies (SG et SSP) ont été estimées selon la méthode de Kaplan-Meier et présentées sous forme de médiane et taux accompagnées de leurs intervalles de confiance à 95% et comparées par le test du Logrank.

Les médianes de suivi ont été calculées selon la méthode dite “reverse Kaplan Meier” globalement et dans chaque bras, avec son intervalle de confiance à 95%.

Tous les tests statistiques réalisés étaient bilatéraux avec un seuil de significativité fixé à 5% ($p < 0,05$) et réalisés sur PC via le logiciel STATA 16,2 (*Stata Corporation, College Station, TX, USA*).

Résultats

Sélection de l'échantillon

Entre le 8/04/2017 et le 1/06/2018, un total de 414 échantillons issus de biopsies ou de pièce opératoires de CCR (site primitif ou métastases) ont été soumis pour une analyse NGS à la plateforme de génétique moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier.

Parmi ces échantillons analysés, ont été exclus : 18 dont l'analyse par NGS était ininterprétable, 26 ne correspondant finalement pas à des tumeurs colorectales, et 91 correspondants à des patients non suivis sur L'ICM ou le CHU de Montpellier.

Pour les patients des 279 échantillons restants, 229 présentaient une évolution métastatique (synchrone ou métachrone) de leur CCR et ont été inclus dans notre étude. **(Figure 1)**

Caractéristiques des patients

Sur les 229 patients inclus, 114 étaient des hommes et 115 des femmes. L'âge médian au diagnostic était de 64,7 ans [extrêmes : 27-91]. La tumeur était localisée à gauche pour 157 patients (68,7%) , dont 90 au niveau rectal, et 72 patients (31,4%) présentaient un cancer du côlon droit. Le délai médian de diagnostic de métastase était estimé à 1,3 ans [extrêmes : 0-4]. Cent vingt-deux patients (53,3%) étaient métastatiques synchrones et 107 patients (46,7%) métastatiques métachrones. Les sites métastatiques les plus fréquents étaient hépatiques (55,5%) et péritonéaux (35,8%).

Quatre-vingt-cinq % (n=196) des patients présentaient un adénocarcinome lieberkühnien et 9,17% un adénocarcinome mucineux.

Le statut microsatellitaire était connu pour 215/229 patients, avec 90,8% de statut microsatellitaire stable (MSS) et 3,1% de statut microsatellitaire instable (MSI).

Soixante-dix-huit % (n=180) des patients avaient bénéficié d'une chirurgie initiale de la tumeur primitive, et 65,1% (n=149) avaient reçu une chimiothérapie adjuvante.

Soixante-dix-sept patients (33,6%) avaient reçu un traitement par FOLFOX/FOLFIRI, 27 (11,8%) par FOLFOX/FOLFIRI + anti-angiogénique, 17 (7,4%) par FOLFIRINOX, et 94 (41%) un autre traitement.

Seulement 29 patients (12,7%) avaient reçu un traitement par anti-EGFR et 58 (25,3%) un anti-angiogénique. Cent quarante-deux patients (62%) n'avaient pas reçu de thérapie ciblée en 1^{ière} ligne.

Quinze % (n=34) des patients avaient bénéficié d'une chirurgie de leur métastase(s). Six % (n=14) des patients n'avaient reçu aucun traitement.

L'ensemble des caractéristiques des patients sont répertoriées dans le **tableau 1**.

Caractéristiques des prélèvements

Parmi les échantillons reçus au laboratoire, seulement 45 (19,7%) provenaient d'un laboratoire d'anatomopathologie extérieur. Cent quarante-huit (64,6%) provenaient de pièces opératoires, quatre-vingt-six (32,3%) de biopsie diagnostiques.

Un total de 115 échantillons (50,2%) étaient issus de localisations métastatiques (tous sites confondus), et 111 de la tumeur primitive (48,5%). Les informations concernant la technique de prélèvement et le site de prélèvement n'était pas données pour respectivement 7 et 3 des échantillons.

La quasi-totalité des échantillons était reçus sous forme de copeaux de tissus fixés dans du formol et le pourcentage moyen de cellules tumorales était de 50%.

L'ensemble des caractéristiques des prélèvements sont répertoriées dans le **tableau 1bis**.

Distribution des altérations moléculaires :

Pour l'ensemble des 229 échantillons sélectionnés, un total de 81 séquençages (runs) ont été réalisés, dont 79 avec le panel *Fluidigm* et 2 avec le panel TSCA.

Parmi ces tumeurs colorectales, 69 (30,1%) ne présentaient aucune altération moléculaire concernant les gènes couverts par les panels, 125 (54,6%) présentaient une altération isolée, 33 (14,4%) présentaient 2 altérations et 2 (0,9%) présentaient 3 altérations.

Cent-quarante-neuf (65,1%) présentaient au moins une des mutations principales : 118 étaient mutées *KRAS* (51,1%) dont 1 avec une double mutation *KRAS* (présence d'une double mutation sur l'exon 2), 17 étaient mutées *BRAF* (7,4%, dont 14 *BRAF*^{V600E} et 3 MSI), et 15 étaient mutées *NRAS* (6,1%). Un échantillon portait la double mutation *KRAS* + *NRAS*.

Parmi les 160 tumeurs présentant une ou plusieurs altérations, seulement onze (4,8%), n'étaient pas mutées *RAS* ou *BRAF*.

Sur les 197 altérations détectées en NGS, 46 (23,4%) portaient sur les gènes *PIK3CA*(17,2%), *CTNNB1*, *cMET*, *MAP2K1*, *FGFR2*, *ERBB4*, *HRAS*, *IDH1*, *PDGFRA* et *ALK*.

Sur les 33 échantillons (14,4%) présentant 2 altérations, la totalité arborait au moins une des mutations principales (*KRAS*, *BRAF* ou *NRAS*). La co-altération la plus fréquemment retrouvée était l'association *KRAS* et *PIK3CA* (22 fois au total).

Les co-altérations moléculaires sont représentées sur le diagramme de Vein.

(Figure 2)

Les liste des altérations moléculaire est présentée dans le **tableau 2**.

Fréquence allélique des altérations moléculaires

Pour les mutations du gène *KRAS*, la fréquence allélique médiane était de 31% [extrêmes : 3%-91%] avec 75,4% présentant une fréquence allélique au-dessus de 20%.

Pour les mutations du gène *NRAS*, la fréquence allélique médiane était de 29% [extrêmes : 11%-65%] avec 73,3% présentant une fréquence allélique au-dessus de 20%.

Pour les mutations du gène *BRAF*, la fréquence allélique médiane était de 24% [extrêmes : 4%-45%] avec 64,7% présentant une fréquence allélique au-dessus de 20%.

Pour les altérations moléculaires restantes, toutes confondues, la fréquence allélique médiane était de 23,5% [extrêmes : 3%-64%] avec 60% présentant une fréquence allélique au-dessus de 20%.

Corrélation entre altérations moléculaires et caractéristiques clinico-pathologiques

Les associations entre les altérations moléculaires et les caractéristiques clinico-pathologiques sont analysées et résumées dans les **tableaux 3a et 3b**.

L'absence de mutation était plus fréquemment associée une localisation gauche de la tumeur primaire, 81% contre 17,6% pour le côlon droit ($p=0,0230$).

Pour les autres caractéristiques clinico-pathologiques comme l'âge au diagnostic, le sexe, le stade au diagnostic initial, la chirurgie du primitif, la présence de métastases hépatiques initiales, la présence de métastases péritonéales initiales, le type histologique, la fréquence allélique ou encore la localisation du prélèvement, on ne mettait pas en évidence de corrélation statistiquement significative avec le type ou le nombre de mutations génétiques retrouvées.

Suivi des patients

Aux dernières nouvelles, 109 (47,6%) patients étaient vivants, 61 (26,6%) patients étaient décédés dont 55 (87,5%) en rapport avec une progression de la maladie et 59 patients (24,2%) étaient perdus de vue. Les autres causes de décès retrouvées étaient un choc septique, une détresse respiratoire, et 4 décès d'origine non précisée.

Survie globale

Pour les 229 patients inclus, la médiane de survie globale (SG) était de 51,8 mois [38,9-67,6] avec des taux de survie à 12 mois, 24 mois et 36 mois respectivement de 89%, 75% et 63%. **(Figure 3)**

En analyse univariée, un âge supérieur ou égal à 65 ans au moment du diagnostic de CCR métastatique était associé à un risque significativement accru de décès avec un Hazard Ratio (HR) à 2,08 [IC95% : 1,24-3,48], et des médianes de survie de 44.2 mois [25,9-51,8] contre 66,2 mois [52,9-NC] pour les moins de 65 ans ($p=0,005$).

De même, la localisation colique droite était associée à une diminution de la survie globale avec une médiane de 38,9 mois [26,3-59,2] contre 67,6 mois [45,6- NC] pour les colons gauches (HR à 1,71 [IC95% : 1,04-2,79], $p=0,039$).

Les autres facteurs significativement associés à une réduction de la survie globale étaient : la présence de métastases synchrones ($p=0,010$), un type histologique rare ($p=0,004$), et l'absence de chirurgie du primitif ($p<0,001$).

Les patients présentant une atteinte péritonéale avaient un risque accru de décès avec une médiane de survie de 38,9 mois [25,9-52,9] contre 67,6 mois [45,6-NC] chez ceux qui n'avaient pas de métastases péritonéales (HR 2,57 [IC95% : 1,58-4,18], $p=0,0001$).

La survie globale était indépendante du sexe, de la présence de métastases hépatiques initiales ou encore de la localisation du prélèvement.

Concernant les caractéristiques moléculaires, le nombre d'altérations moléculaires détectées en NGS de même qu'une fréquence allélique < 20% n'étaient pas associées à une diminution significative de la SG.

Il n'y avait pas de différence significative sur la survie globale entre les patients présentant une co-altération (mutation principale et altération additionnelle), les patients présentant une mutation principale seule, ceux qui présentaient d'autres altérations et ceux qui ne présentaient pas d'altérations (*wild type*).

En revanche, la présence d'une mutation *BRAF* était associée à une diminution de la survie globale, 23,4 mois [6,4-NC] contre 67,6 mois [51,8-NC] pour les patients avec une co-altération *RAS*, 44,2 [33,7-NC] mois pour les patients avec une mutation *RAS* seule ou avec une autre altération et 52,9 [45,6-NC] mois pour les patients *wild type* (HR 2,72 [IC95% : 1,11-6,64], p=0,013). **(Figure 4)**

En analyse multivariée, un âge inférieur à 65 ans au diagnostic, l'absence de métastases péritonéales initiales, la chirurgie du primitif, un traitement par chimiothérapie (avec un avantage numérique en faveur du FOLFIRINOX) et l'absence de mutation *BRAF* étaient statistiquement associées à une augmentation de la survie globale. En revanche, comme en analyse univariée, la présence d'une co-altération avec *RAS* n'avait pas d'influence statistiquement significative.

(Tableau 4)

Survie Sans progression

La médiane de survie sans progression (SSP) était de 13,9 mois [IC95% : 12,7-15,4], avec des taux SSP à 12 mois, 24 mois et 36 mois respectivement de 60% [IC95% : 0,53-0,66] ; 20% [IC95% : 0,14-0,27] et 13% [IC95% : 0,07-0,20]. **(Figure 5)**

En analyse univariée, la présence d'une mutation *BRAF* étaient associée à une diminution de la médiane de SSP avec 6,4 mois contre 11,5 mois pour les patients avec co-altération *RAS*, et 15 mois pour les patients avec une mutation *RAS* seule, avec une autre altération ou *wild type* (HR à 2,95 [IC 95% : 1,66-5,27], p=0,001).

(Figure 6)

Les patients opérés de la tumeur primitive avaient un allongement de leur SSP avec une médiane de 15,2 mois contre 8,5 mois pour les non opérés (HR à 0,52 [IC95% 0,37-0,75 ; $p < 0,0001$]).

En revanche, l'âge, le sexe, la localisation, le statut synchrone des métastases, la présence de métastases hépatiques ou péritonéales, le nombre de mutations génétiques, la fréquence allélique et le type histologique n'avaient pas d'influence sur la SSP.

En analyse multivariée, la chirurgie du primitif était significativement associée à une augmentation de la survie sans progression avec un HR à 0,4 [IC95% : 0,3-0,69], $p < 0,001$. La présence d'une mutation *BRAF* était significativement associée à une diminution de la survie sans progression avec un HR à 3,1 [IC95% : 1,84-5,30] $p < 0,001$). En revanche, le type de traitement reçu n'avait pas d'influence sur la PFS. (**Tableau 5**)

Survie sans progression selon le traitement

La médiane de survie sans progression était de 19,2 mois dans le groupe FOLFIRINOX contre 15,2 mois dans le groupe FOLFOX/FOLFIRI+ anti-angiogénique et 13 mois dans le bras FOLFOX/FOLFIRI, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives ($p = 0,180$).

Pour les différents sous-groupes mutationnels, le type de traitements reçus n'avait pas d'influence sur la SSP.

Les patients avec une altération moléculaire (quelles que soient la ou les altérations) et opérés de métastases, avaient une SSP numériquement augmentée avant 12 mois, sans que ce bénéfice soit statistiquement significatif.

Tableaux et figures

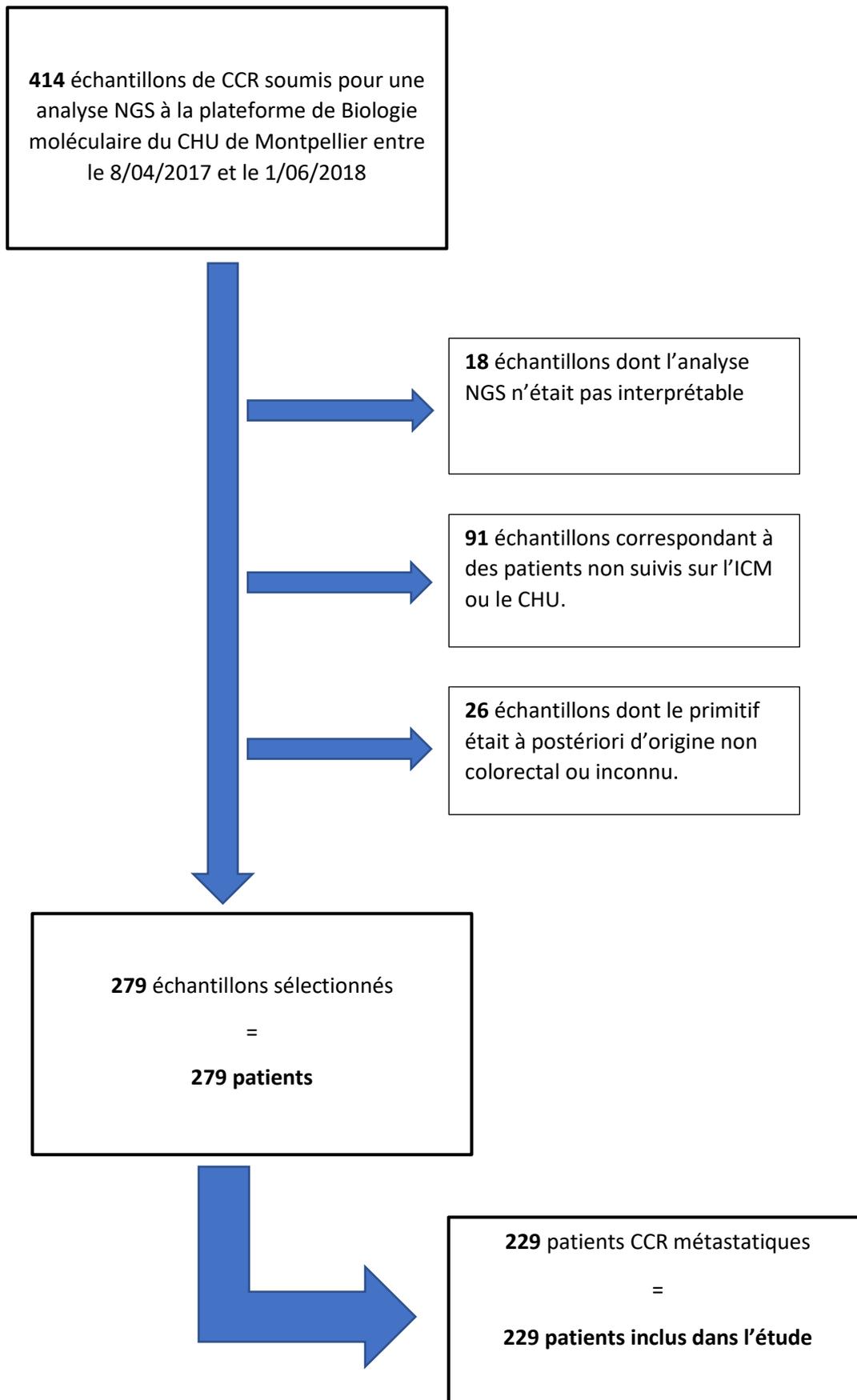


Figure 1. Flow-Chart.

Tableau 1. Caractéristiques clinico-pathologiques des 229 patients atteints de CCR sélectionnés.

<i>Paramètres</i>	<i>N (%)</i>
<i>Sexe</i>	
Homme	114 (50)
Femme	115 (50)
<i>Age (diagnostic)</i>	
< 65 ans	119 (52)
65 ans et plus	110 (48)
<i>Coté</i>	
Colon droit	72 (31,4)
Colon gauche	67 (29,3)
Rectum	90 (39,3)
<i>Stade (diagnostic)</i>	
I	4 (1,7)
II	30 (13,1)
III	63 (30,1)
IV	122 (53,3)
Non connu	4 (1,7)
<i>Type histologique</i>	
Adénocarcinome Lieberkühnien (ADK L)	196(85,59)
Adénocarcinome mucineux (ADK M)	21 (9,17)
Adénocarcinome mixte (ADK L et ADK M)	2 (0,87)
Adénocarcinome avec cellules en bague à chaton	2 (0,87)
Carcinome peu différencié	3 (1,31)
Autres	5 (2,19)
<i>Statut Microsatellitaire</i>	
MSS	208 (90,8)
MSI	7 (3,1)
Non connu	14 (6,1)
<i>Evolution métastatique</i>	
Synchrone	122 (53,3)
Métachrone	107 (46,7)
<i>Nombre de site métastatiques initial</i>	
1	162(70,7,3)
2	60 (26,2)
3	6 (2,0)
4	1 (0,4)

Tableau 1. (Suite)

<i>Paramètres</i>	<i>N(%)</i>
<i>Sites métastatiques initiaux</i>	
Foie	131 (57,2)
Péritoine	82 (35,8)
Poumons	50 (21,8)
Pelvis	13 (5,7)
Ganglions	10 (4,4)
Os	9 (3,9)
Ovaires	6 (2,6)
Autres (cutané, cérébral, pleural, surrénalien, colique)	8 (3,4)
<i>Chirurgie du primitif</i>	
Oui	180 (78,6)
Non	49 (21,4)
<i>Chimio et/ou radiothérapie adjuvante</i>	
Oui	149 (65,1)
Non	80 (34,9)
<i>Dosage de l'ACE (diagnostic)</i>	
Normal	68 (29,6)
Supérieur à la normale	84 (36,7)
Non connu	77 (33,6)
<i>1^{ère} ligne de traitement</i>	
Folfox/Folfiri	77 (33,6)
Folfox/Folfiri + anti-angiogénique	27 (11,8)
Folfirinox	17 (7,4)
Autre	94 (41,1)
Non traité	14 (6,1)
<i>Thérapie ciblée</i>	
Anti-EGFR	29 (12,7%)
Anti-VEGF	58 (25,3%)
Aucune	142 (62%)
<i>Chirurgie de métastase(s)</i>	
Oui	34 (14,85)
Non	195 (85,15)

Tableau 1 bis. Caractéristiques des 229 échantillons de CCRm.

<i>Paramètres</i>	<i>N (%)</i>
<i>Origine du prélèvement</i>	
Externe	45 (19,7)
Interne (CHU-ICM)	184 (82,6)
<i>Type de prélèvement</i>	
Biopsie	74 (32,3)
Pièce opératoire	148 (64,6)
Non connu	7 (3%)
<i>Localisation du prélèvement</i>	
Métastase	115 (50,2)
Tumeur primitive	111 (48,5)
Non connu	3 (1,3)
<i>Forme de l'échantillon</i>	
Copeaux	228 (99,6)
Non connu	1 (0,4)
<i>Fixateur</i>	
Formol	201 (87,8)
Non connu	28 (12,2)
<i>Pourcentage de cellules tumorales (pour n=296 échantillons, Q2 et IQ en %)</i>	
Quart Q2	50,00
IQ	30,00

Q2 = Quartile 2

IQ interquartile

Tableau 2. Liste des altérations moléculaires retrouvées en NGS sur les 229 échantillons

KRAS	Exon	Fréquence	%
p.Ala146Pro	4	1	1%
p.Ala146Thr	4	5*	4%
p.Ala146Val	4	2	2%
p.Gln61His	3	3	3%
p.Gln61Leu	3	2	2%
p.Gly12Ala	2	6	5%
p.Gly12Arg	2	1	1%
p.Gly12Asp	2	32	27%
p.Gly12Cys	2	9	8%
p.Gly12Ser	2	5	4%
p.Gly12Val	2	23	19%
p.Gly13Arg	2	1	1%
p.Gly13Asp	2	26	22%
p.Lys117Arg	4	1	1%
p.Lys117Asn	4	1	1%
p.Lys117Asp	4	1	1%
	Total :	119	100%

* Dont 1 double mutation KRAS

NRAS	Exon	Fréquence	%
p.Gln61Arg	3	4	27%
p.Gln61Lys	3	6	40%
p.Gly12Asp	2	1	7%
p.Gly12Val	2	2	13%
p.Gly13Arg	2	2	13%
	Total :	15	100%

BRAF	Exon	Fréquence	%
p.Asp594Gly	15	2	12%
p.Leu597Gln	15	1	6%
p.Val600Glu	15	14	82%
	Total :	17	100%

Tableau 2. (Suite)

Gènes	Positions	Exon	Fréquence	%
ALK	Thr1151Met	22	1	2%
cMET	p.Asn375Ser	2	1	2%
CTNNB1	p.Leu7Val	3	1	2%
-	p.Ser45Phe	3	1	2%
ERBB4	p.Ala455Thr	12	1	2%
-	p.His470Gln	12	1	2%
FGFR2	p.Gly298Ser	7	1	2%
HRAS	p.Val125Ala	4	1	2%
IDH1	p.Pro127Leu	4	1	2%
MAP2K1	p.Phe53Leu	2	1	2%
-	p.Gln58_Glu62del	2	1	2%
PDGFRA	p.Ile831LeufsTer#2	18	1	2%
PIK3CA	p.Gln546Arg	10	1	2%
-	p.Gln546Lys	10	1	2%
-	p.Gln546Pro	10	1	2%
-	p.Glu542Lys	10	8	17%
-	p.Glu545Asp	10	1	2%
-	p.Glu545Gln	10	2	4%
-	p.Glu545Lys	10	13	28%
-	p.Gly1049Arg	21	1	2%
-	p.His1047Arg	21	3	7%
-	p.His1047Leu	21	1	2%
-	p.His1047Tyr	21	1	2%
-	p.His104Leu	21	1	2%
		Total :	46	100%

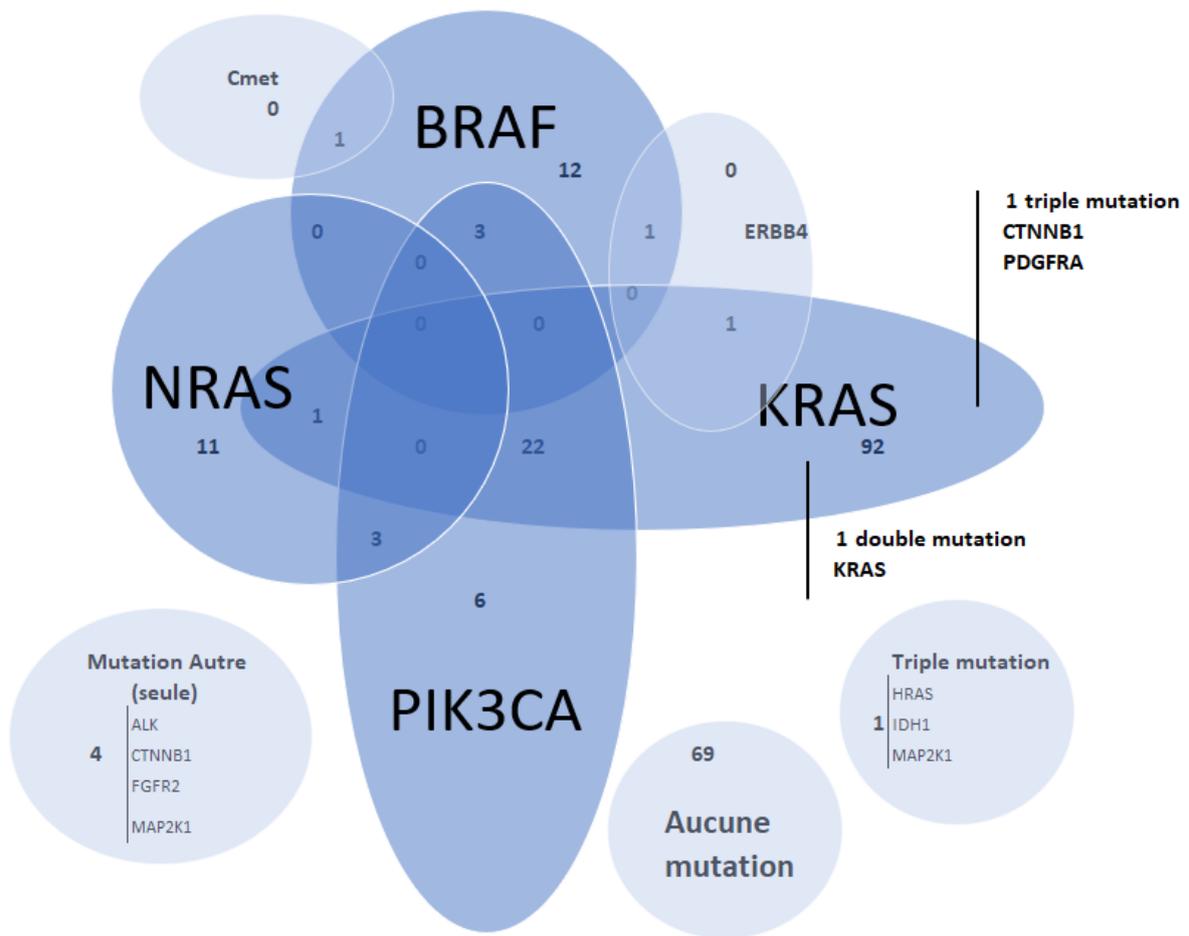


Figure 2. Diagramme de Venn montrant la répartition des altérations et co-altérations moléculaires retrouvées sur les 229 échantillons.

Tableau 3. Corrélation entre altérations moléculaires et caractéristiques clinico-pathologiques :

(a) selon les groupes mutationnels 1 : aucune altération , co-altération avec RAS/BRAF, mutation RAS/BRAF seule, autres altérations.

Paramètres	Groupes mutationnels 1				p
	Aucune altération n=69	Mutation RAS/BRAF seule n=116	Co-altération RAS/BRAF n=33	Autre(s) altération(s) n=11	
Age (diag)					
< 65 ans	41 (59,4%)	54 (46,6%)	17 (51,5%)	7 (63,6%)	p = 0,3206 (chi-2)
65 ans et plus	28 (40,6%)	62 (53,4%)	16 (48,5%)	4 (36,4%)	
Sexe					
Masculin	41 (59,4%)	48 (41,4%)	19 (57,6%)	6 (54,5%)	p = 0,0806 (chi-2)
Féminin	28 (40,6%)	68 (58,6%)	14 (42,4%)	5 (45,5%)	
Localisation					
Gauche	56 (81,2%)	75 (64,7%)	19 (57,6%)	7 (63,6%)	p = 0,0386 (exact)
Droite	13 (18,8%)	41 (35,3%)	14 (42,4%)	4 (36,4%)	
Stade (diag initial)					
I-II	13 (18,8%)	12 (10,6%)	7 (21,9%)	2 (18,2%)	p = 0,1435 (exact)
III	15 (21,7%)	44 (38,9%)	7 (21,9%)	3 (27,3%)	
IV	41 (59,4%)	57 (50,4%)	18 (56,3%)	6 (54,5%)	
Non connu	0	3	1	0	
Métastases hépatiques					
Non	28 (40,6%)	54 (46,6%)	14 (42,4%)	6 (54,5%)	p = 0,7657 (exact)
Oui	41 (59,4%)	62 (53,4%)	19 (57,6%)	5 (45,5%)	
Métastases péritonéales					
Non	48 (69,6%)	73 (62,9%)	21 (63,6%)	5 (45,5%)	p = 0,4510 (exact)
Oui	21 (30,4%)	43 (37,1%)	12 (36,4%)	6 (54,5%)	
Type histologique					
Adénocarcinome Lieberkuhnien	63 (91,3%)	92 (79,3%)	31 (93,9%)	10 (90,9%)	p = 0,1812 (exact)
Adénocarcinome muqueux	3 (4,3%)	18 (15,5%)	2 (6,1%)	1 (9,1%)	
Autres	3 (4,3%)	6 (5,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Chirurgie primitive					
Non	14 (20,3%)	25 (21,6%)	7 (21,2%)	3 (27,3%)	p = 0,9434 (exact)
Oui	55 (79,7%)	91 (78,4%)	26 (78,8%)	8 (72,7%)	
Localisation prélèvement					
Métastase Primitive	38 (55,1%)	59 (51,3%)	13 (41,9%)	5 (45,5%)	p = 0,8393 (exact)
Non connu	31 (44,9%)	56 (48,7%)	18 (58,1%)	6 (54,5%)	
Non connu	0	1	2	0	
Fréquence allélique					
< 20%	NA	25 (21,6%)	5 (15,2%)	2 (18,2%)	p = 0,8393 (exact)
≥ 20%	NA	91 (78,4%)	28 (84,8%)	9 (81,8%)	

Tableau 3. (Suite)

(b) Selon les groupes mutationnels 2 : aucune altération, mutation *BRAF* +/- autres altération, co-altération avec *RAS*, mutation *RAS* seule et autre(s) altération(s).

(b)

Paramètres	Groupes mutationnels 2				p
	Aucune altération n=69	<i>BRAF</i> n=17	Co-altération <i>RAS</i> n=29	Mutation <i>RAS</i> seule / Autre(s) altération(s) n=14	
Age (diag)					
< 65 ans	41 (59,4%)	11 (64,7%)	15 (51,7%)	52 (45,6%)	p = 0,2137 (chi-2)
65 ans et plus	28 (40,6%)	6 (35,3%)	14 (48,3%)	62 (54,4%)	
Sexe					
Masculin	41 (59,4%)	10 (58,8%)	16 (55,2%)	47 (41,2%)	p = 0,0788 (chi-2)
Féminin	28 (40,6%)	7 (41,2%)	13 (44,8%)	67 (58,8%)	
Localisation					
Gauche	56 (81,2%)	13 (76,5%)	16 (55,2%)	72 (63,2%)	p = 0,0230 (exact)
Droite	13 (18,8%)	4 (23,5%)	13 (44,8%)	42 (36,8%)	
Stade (diag initial)					
I-II	13 (18,8%)	3 (18,8%)	5 (17,9%)	13 (11,6%)	p = 0,3430 (exact)
III	15 (21,7%)	6 (37,5%)	7 (25,0%)	41 (36,6%)	
IV	41 (59,4%)	7 (43,8%)	16 (57,1%)	58 (51,8%)	
Non connu	0	1	1	2	
Métastases hépatiques					
Non	28 (40,6%)	11 (64,7%)	11 (37,9%)	52 (45,6%)	p = 0,2836 (exact)
Oui	41 (59,4%)	6 (35,3%)	18 (62,1%)	62 (54,4%)	
Métastases péritonéales					
Non	48 (69,6%)	8 (47,1%)	20 (69,0%)	71 (62,3%)	p = 0,3199 (exact)
Oui	21 (30,4%)	9 (52,9%)	9 (31,0%)	43 (37,7%)	
Type histologique					
Adénocarcinome Lieberkuhnier	63 (91,3%)	13 (76,5%)	27 (93,1%)	93 (81,6%)	p = 0,1193 (exact)
Adénocarcinome mucineux	3 (4,3%)	2 (11,8%)	2 (6,9%)	17 (14,9%)	
Autres	3 (4,3%)	2 (11,8%)	0 (0,0%)	4 (3,5%)	
Chirurgie primitif					
Non	14 (20,3%)	4 (23,5%)	5 (17,2%)	26 (22,8%)	p = 0,9171 (exact)
Oui	55 (79,7%)	13 (76,5%)	24 (82,8%)	88 (77,2%)	
Localisation prélèvement					
Métastase	38 (55,1%)	7 (41,2%)	12 (44,4%)	58 (51,3%)	p=0,6634 (chi-2)
Primitif	31 (44,9%)	10 (58,8%)	15 (55,6%)	55 (48,7%)	
Non connu	0	0	2	1	
Fréquence allélique					
< 20%	NA	6 (35,3%)	11 (64,7%)	21 (18,4%)	p = 0,1058 (exact)
≥ 20%	NA	11 (64,7%)	24 (82,8%)	93 (81,6%)	

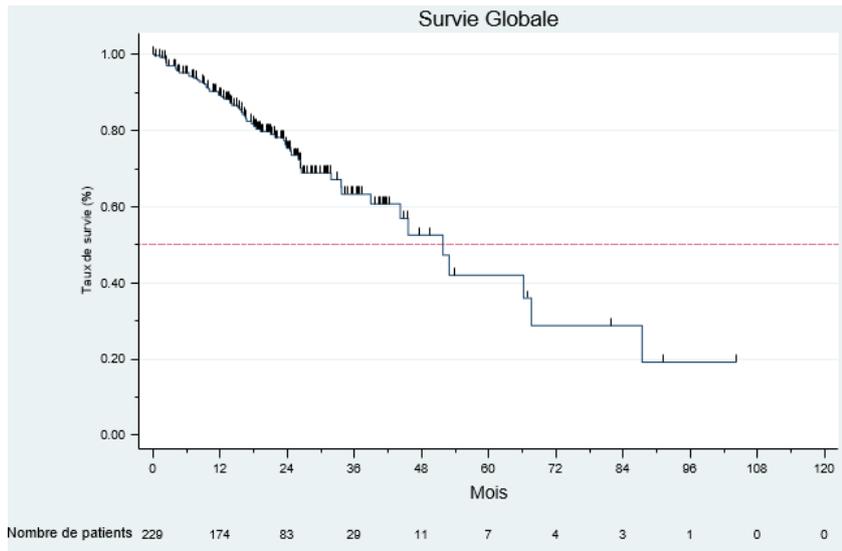


Figure 3. Survie globale des 229 patients CCRm inclus.

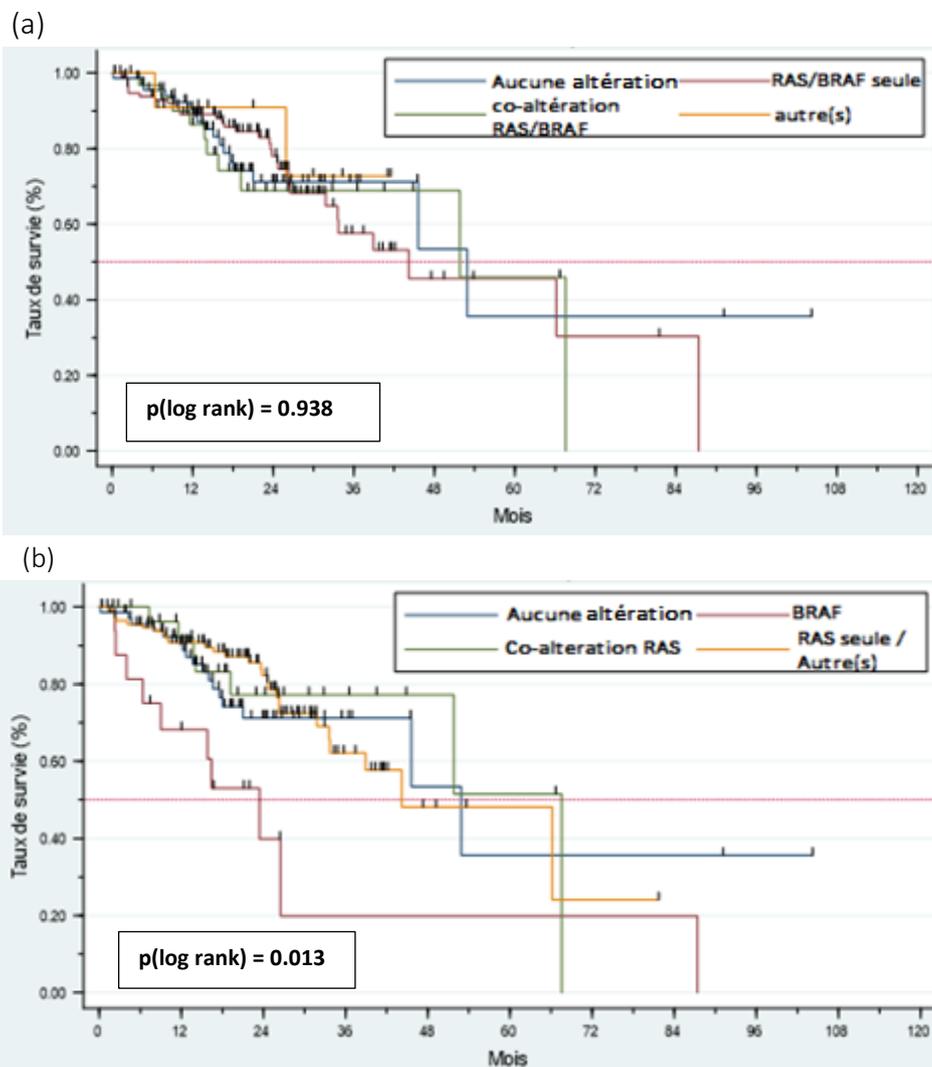


Figure 4. Survie globale en fonction de différents groupements moléculaires des CCRm : (a) Selon les groupes mutationnels 1, (b) Selon les groupes mutationnels 2.

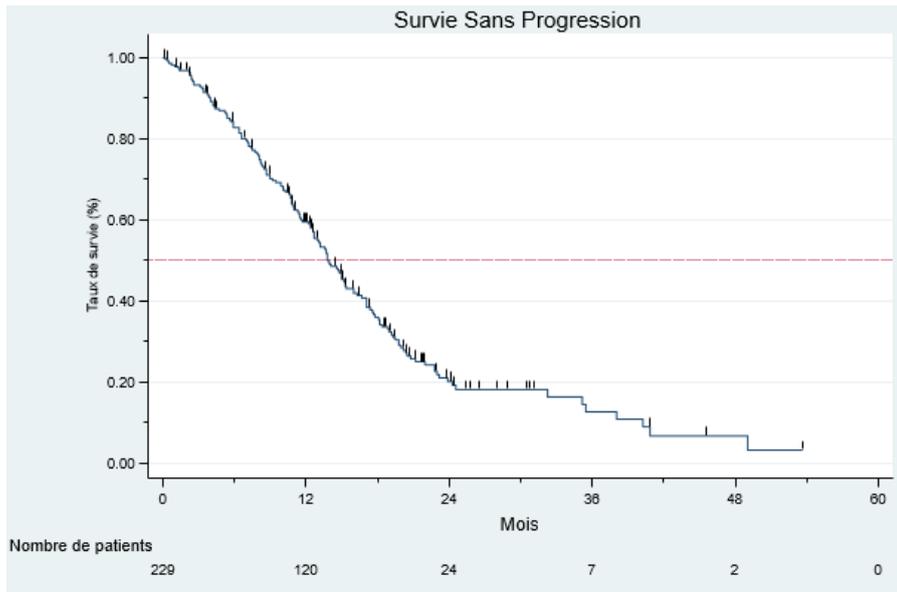


Figure 5. Survie sans progression des 229 patients CCRm.

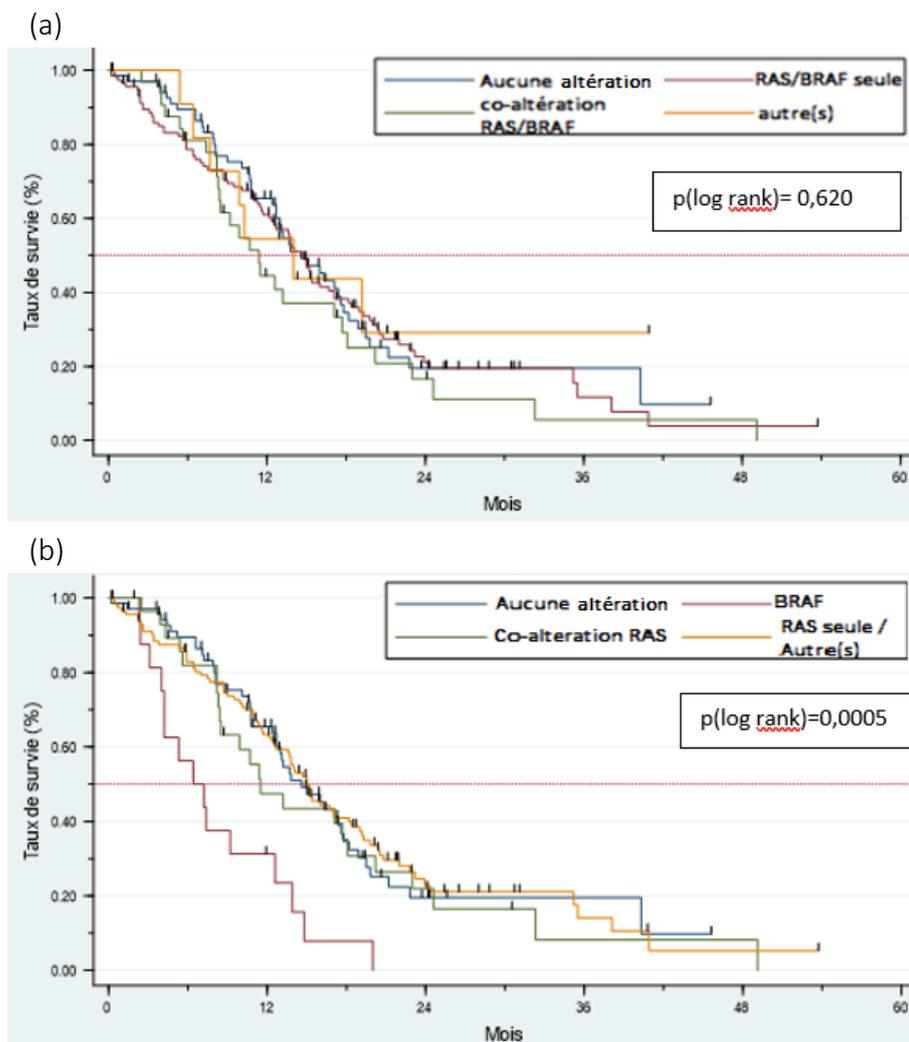


Figure 6. Survie sans progression en fonction de différents groupements moléculaires des CCRm : (a) Selon les groupes mutationnels 1, (b) Selon les groupes mutationnels 2.

Tableau 4. Analyse multivariée des paramètres influençant la survie globale (SG).

Paramètres	Hazard Ratio	p	IC 95%	
Age				
<65 ans	1			
65 ans et plus	2,34	0,005	1,297828	4,20325
Métastases péritonéales				
Non	1			
Oui	2,79	0,001	1,562482	4,969521
Chirurgie primitif				
Non	1			
Oui	2,79	0,001	0,0841803	0,2683077
Traitement				
Non traité	1			
FOLFOX/FOLFIRI	0,21	0,005	0,0723679	0,6304004
FOLFIRINOX	0,1	0,003	0,0224315	0,4464155
FOLFOX/FOLFIRI + AA	0,18	0,009	0,0509453	0,6480895
Autres traitements	0,18	0,002	0,0619013	0,5339845
Altérations moléculaires				
Aucune	1			
BRAF	2,86	0,028	1,118322	7,312499
Co-altération RAS	1,12	0,811	0,4547024	2,737596
Altération RAS seule / autres altérations	0,81	0,547	0,4181296	1,586849

Tableau 5. Analyse multivariée des facteurs influençant la survie sans progression (SSP).

Paramètres	Hazard Ratio	p	IC 95%	
Type histologique				
ADK L	1			
ADK mucineux	1,17	0,0621	0,6312456	2,161457
Autre	2,1	0,114	0,8331832	5,518354
Chirurgie primitif				
Non	1			
Oui	0,45	<0,001	0,2975385	0,6936741
Traitement				
Non traité	1			
FOLFOX/FOLFIRI	1,29	0,636	0,4388316	3,848306
FOLFIRINOX	0,59	0,388	0,1801186	1,946176
FOLFOX/FOLFIRI+AA	0,8	0,709	0,2477816	2,58429
Autres traitements	1,21	0,73	0,4096083	3,576707
Altérations moléculaires				
Aucune	1			
BRAF	3,12	<0,001	1,843693	5,304828
Co-altération RAS	1,27	0,365	0,7595581	2,111733
Altération RAS seule / autres altérations	0,9	0,597	0,066751	1,332857

III-DISCUSSION

Avec le développement des thérapies ciblées, la recherche de biomarqueurs moléculaires à la fois pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements tels que *RAS*, *BRAF* et le statut microsatellitaire, est devenue déterminante dans la prise en charge des cancers colorectaux métastatiques (18,75,76).

Si les altérations sur *RAS* et *BRAF* ont démontré leur intérêt, la présence d'autres altérations moléculaires associées est moins connue. Dans notre étude, nous avons voulu déterminer si la présence de co-altérations moléculaires associées à celles des gènes *RAS* et *BRAF*, détectées en NGS (panels communs pour 19 gènes dont les 16 gènes recommandés par le panel INCa), avait un impact sur la survie globale des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques.

Sur les 229 patients atteints de CCRm de notre étude, les fréquences des mutations *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* et *PIK3CA* étaient de 51,1%, 6,1%, 7,4% et 14,8% respectivement. Même si cette répartition des mutations dans le CCR varie dans la littérature selon la taille des échantillons, la population ou encore la sensibilité des techniques de détection, nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs cohortes. Dans l'étude de *Al-Shamsi et al.*, sur 198 échantillons tumoraux (FFPE) de CCR analysés en NGS, les fréquences de mutation des gènes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* était de 44,4%, 4,0%, 4,0%, et 12,1% respectivement et de 48,4%, 4%, et 12, 1% selon l'origine de la population (Golfe Persique ou Etats-Unis) (77). De même, dans l'étude prospective de *Gao et al*, les fréquences étaient respectivement de 46,8%, 3,3%, 2% et 20,3% sur 207 CCR analysés en NGS (74). Environ 3% (n=7) des patients avaient une tumeur de phénotype micro satellitaire instable (MSI) dans notre étude, et 33% (n=3) étaient associées à une mutation *BRAF*. Nos données sont cohérentes avec la fréquence des tumeurs MSI estimée à 4% et l'association entre phénotype MSI et mutation *BRAF*^{V600E} retrouvée dans 20 à 40% des cas dans la littérature (48,78).

Dans notre étude, la localisation droite de la tumeur (31,4%) était associée à la présence d'altérations moléculaires (81,9%). L'étude chinoise récente de *Li et al.* (79) sur 526 tumeurs colorectales analysées en NGS, retrouvait une corrélation entre la présence d'une mutation KRAS et la localisation droite ou rectale (colon droit 55,4% vs colon gauche 39,6% vs rectum 50,6%, $p=0,023$) ainsi qu'entre la présence d'une mutation PIK3CA et une localisation colique droite (17,8% colon droit vs 15% colon gauche $p=0,004$). D'autre part, les mutations de *BRAF*^{V600E}, connues pour être de mauvais pronostic en situation métastatique, sont plus fréquemment rapportées comme associées à des cancers coliques droits, un statut MSI et la présence de métastases péritonéales d'après l'étude de *Tran et al.* (80). Dans notre étude, l'âge supérieur à 65 ans au diagnostic, la localisation droite et la présence de métastases péritonéales ressortaient comme des facteurs de mauvais pronostic ce qui va dans le sens des paramètres ayant un impact pronostique dans le CCR métastatique (50,80,81). En revanche, quel que soit le statut mutationnel, la prise en charge chirurgicale de la tumeur primitive était un facteur de bon pronostic sur la survie sans progression et sur la survie globale, en accord avec les données d'études de la littérature (82,83).

Pour ce qui est de l'objectif principal, la présence d'une co-altération avec RAS ou BRAF en analyse NGS n'était pas un facteur pronostique de la survie globale, de même que le nombre de mutations, indépendamment des gènes mutés. Les médianes de survie sans progression étaient diminuées chez les patients avec une co-altération RAS, 11,5 mois [8,5-18,5] vs 15,5 mois [12,7-18,2] chez ceux qui étaient seulement porteurs d'une mutation RAS ou autre mutation isolée (hors BRAF) mais la différence n'était pas significative (NS). Cela contraste avec les résultats de l'étude prospective de *Gao et al.* sur 207 patients dans laquelle un seuil d'au moins 2 mutations retrouvées en NGS sur un panel de 22 gènes était associé à une diminution de la survie sans progression et de la survie globale (74). Par ailleurs, le panel de gènes utilisé couvrait les régions d'intérêt des gènes *TP53* et *FXB7* qui faisaient parti des 4 gènes les plus fréquemment mutés : or, ces derniers ne faisaient pas partie de nos panels. La différence entre ces panels et le caractère

rétrospectif de notre étude avec un manque de données est un biais majeur qui peut expliquer la discordance avec nos résultats.

La co-altération la plus représentée était l'association *RAS/BRAF + PIK3CA*, *PIK3CA* étant le 2^{ème} gène le plus fréquemment muté de notre panel (15% des patients). Le gène *PIK3CA* jouent un rôle important dans la prolifération et la survie des cancers, mais l'impact pronostique de ces mutations, notamment dans les cancers colorectaux, reste controversé (45). Nos résultats en termes de survie globale semblent conforter ceux d'une étude de 2012 de *Liao et al.* réalisée sur 1170 patients, où la présence d'une mutation du gène *PIK3CA* seule ou associée à une mutation *RAS/BRAF* n'était pas un facteur pronostique de la survie globale (60). En revanche, la présence d'une mutation *PIK3CA* était associée à des cancers proximaux et la présence d'une double mutation sur les exons 9 et 20 de *PIK3CA* était également un facteur de mauvais pronostic, mais cet évènement restait rare. Le rôle prédictif de *PIK3CA*, qui serait un facteur de résistance aux anti-EGFR est également débattue. Notre échantillon comptait seulement 6 mutations isolées de *PIK3CA*, ne permettant pas d'explorer cette question.

La présence d'une mutation *BRAF* ressortait en revanche comme un facteur de mauvais pronostic de façon indépendante, autant sur la survie globale (médiane de 23,4 mois) que sur la survie sans progression (médiane de 6,4 mois). Ce résultat est concordant avec l'étude suscitée de *Gao et al.* en termes de survie globale avec un sur-risque de décès pour les patients *BRAF* mutés (HR à 7,3 [2,0-25,5], p=0,002). Dans cette même étude, la présence indépendante d'une mutation de *CTNNB1* ou *NRAS* étaient également des facteurs prédictifs d'une diminution de la survie globale (73). Encore une fois, ces résultats viennent confirmer le pronostic péjoratif associé à la présence des mutations *BRAF^{V600E}* avec une survie sans progression rapportée dans la littérature variant de 4 à 7 mois et une survie globale de 9 à 19 mois selon les études, soit environ deux fois moindres que celles observées chez les patients avec CCRm *BRAF^{V600E}* sauvage (6,50,84).

Parmi nos échantillons, nous avons mis en évidence 2 mutations de *ERBB4* (*Erb-b2 Récepteur Tyrosine kinase 4*), un gène membre de la famille des tyrosine protéine kinase et du récepteur de l'EGF. Certaines mutations du gène *ERBB4* sont

dites activatrices et pourraient être impliquées dans la cancérogenèse mais leur action in vivo est peu connue (85,86). Dans les cancers du sein triples négatifs (ne surexprimant pas les récepteurs hormonaux ni la protéine HER2) la surexpression de la protéine ERBB4 serait associée à un mauvais pronostic (85).

Dans notre étude, si le bénéfice de la chimiothérapie sur la survie globale était observé, l'allongement de la survie globale était particulièrement en faveur d'une chimiothérapie par FOLFIRINOX (HR 0,24 IC[0,074-0,78], médiane à 51.8 mois, SG à 1 ans de 93,8%), par rapport aux traitements par bichimiothérapie seule ou avec anti-angiogénique, et ce indifféremment du statut mutationnel. Ces données s'accordent avec celles de *Falcone et al.* mettant en évidence un bénéfice de la trichimiothérapie par FOLFOXIRI (irinotecan 165 mg/m² Jour 1, oxaliplatine 85 mg/m² Jour 1, acide folinique 200 mg/m² Jour 1, 5-fluorouracile 3,200 mg/m² en perfusion continue sur 48 heures à partir du jour 1, toutes les 2 semaines) vs FOLFIRI en 1^{ère} ligne à la fois sur le taux de réponse objective, la survie sans progression et la survie globale (médiane de survie globale de 22,6 vs 16,7 mois respectivement ; HR 0,70, p=0,032) (87). Par ailleurs, les données de l'étude TRIBE sont en faveur d'un bénéfice du FOLFOXIRI+bevacizumab vs FOLFIRI+bevacizumab chez les patients CCRm *RAS* mutés et *BRAF* mutés sur la survie globale et la survie sans progression, respectivement 19,0 vs 10,7 mois (HR: 0,84 IC[0,24–1,2]) chez les patients *RAS* mutés et 7,5 vs 5,5 mois (HR, 0,57; IC[0,27–1,23]) chez les *BRAF* mutés (88). À la suite de ces résultats, et malgré le faible nombre de patients, le protocole FOLFOXIRI-bevacizumab s'est imposé dans la communauté médicale française et internationale comme le traitement « standard » de 1^{ère} ligne métastatique pour les patients porteurs d'un CCRm avec mutation *BRAF*^{V600E} en bon état général (PS 0-1) (56). Récemment, l'étude TRIBE 2 a rapporté l'intérêt d'une séquence trichimiothérapie+bevacizumab suivie d'un traitement d'entretien par 5fu+bevacizumab avec réintroduction de la quadrithérapie par rapport à un schéma séquentiel alternant bi-chimiothérapie+bevacizumab et entretien sur la survie sans progression et la survie globale particulièrement chez les patients *RAS* ou *BRAF* mutés associés à une tumeur du colon droit (89).

Concernant les patients éligibles à un traitement par anti-EGFR en 1^{ère} ligne, seulement 29 en avait bénéficiés sur les 80 potentiels ne présentant pas de mutation *RAF/BRAF*. En 2016, l'étude rétrospective française de *Lièvre et al.* retrouvait un délai moyen de 24.6 +/- 17,2 jours entre la demande de recherche de mutation *RAS/KRAS* et l'obtention des résultats pour des patients CCRm (83) ; ces délais peuvent en partie expliquer pourquoi seulement 36% des patients *RAS* et *BRAF wild type* n'avaient pas reçu d'anti-EGFR à ce stade dans notre étude. Il aurait été intéressant d'observer la réponse aux anti-EGFR pour les patients *RAS/BRAF wild type* mais présentant une autre altération (n=6, *wild type* seul), versus ceux ne présentant aucune mutation concernant l'ensemble des gènes des panels (n=23, « Super *wild type* »). Cependant, le manque d'évènements dans notre étude ne nous permettait pas de réaliser cette analyse. Plusieurs études ont tenté d'identifier les patients qui seraient de meilleurs répondeurs aux anti-EGFR. Dans l'étude de 2019 de *Li et al.* suscitée, les patients *wild type* sur le panel de 22 gènes et non uniquement pour le gène *RAS*, traités par anti-EGFR, avaient une survie sans progression augmentée par rapport aux patients présentant une ou plusieurs altérations (79). Dans une autre étude, prospective, sur des patients avec un CCRm *RAS* et *BRAF wild type*, *Cremolini et al.* ont testé la valeur prédictive négative d'un panel de gènes avec des altération moléculaires rares : amplification de *HER2/MET*, fusion de *ALK/ROS1/NTRK1-3/RET*, mutations du gène *PIK3CA* (90). La présence d'une altération sur ce *PRESSING* panel (PRimary rESistance IN *RAS* and *BRAF* wild-type metastatic colorectal cancer patients treated with anti-eGfr monoclonal antibodies) était plus fréquemment retrouvée chez les patients présentant une résistance aux anti-EGFR (24/47 vs 1/47, p<0,001) et pour les tumeurs du colon droit (12/29 vs 13/65, p<0,03). La valeur prédictive combinant l'évaluation par le *PRESSING* panel et la localisation était de 80,4%. Ces données suggèrent l'intérêt du développement de ces panels afin de cibler les meilleurs candidats pour des traitements ciblant l'EGFR ou des altérations génétiques plus rares. C'est dans ce sens que la surexpression des récepteurs *HER2*, présente chez environ 5% des patients *RAS/BRAF wild type*, est recherchée en immunohistochimie (58).

De nos jours, la classification moléculaire consensuelle des cancers colorectaux reste un des outils de choix en termes d'évaluation pronostique des CCR (91). Cependant, celle-ci n'est actuellement pas réalisable en routine car elle nécessite d'analyser plus de 80 gènes.

L'avantage la technique NGS utilisée dans notre étude est sa faisabilité en routine et les nombreuses possibilités qu'elle offre : analyse de transcrits (ARN), d'exons, d'épigénétique ou encore du statut microsatellitaire (92). Le défi est donc à la détection de biomarqueurs moléculaires forts.

Cette recherche se heurte à de nombreuses difficultés comme par exemple le coût des analyses, les délais d'obtention des résultats mais également aux caractéristiques propres de la cellule cancéreuse, en particulier l'hétérogénéité tumorale. En ce sens, la sélection de clones résistant sous pressions des thérapies ciblées et des chimiothérapies donne tout son intérêt aux analyses sur ADN tumoral circulant ou « biopsies liquides » à partir d'un prélèvement sanguin (93). Dans l'étude rétrospective de *Toledo et al.*, le monitoring par biopsie liquide de patients CCRm RAS *wild-type* (WT) sous anti-EGFR avait une valeur pronostique de réponse prolongée pour les patients WT en continu sur ADN circulant, alors qu'une « explosion » de mutations était prédictive d'une altération clinique imminente (94). Ce monitoring pourrait être un outil dans le choix du traitement, par exemple pour le rechallenge des anti-EGFR des patients répondeurs en 1^{ère} ligne, comme évoquée dans l'étude CRICKET (95).

L'accès à des molécules innovantes face à ces biomarqueurs détectés est en cours comme en témoigne les résultats de l'étude BEACON qui ont modifié la prise en charge des CCRm BRAF^{V600E} mutés en 2^{ème} ligne avec l'association encorafenib et cetuximab (anti-BRAF+anti-EGFR) qui augmente la survie globale de ces patients de 5,9 à 9,3 mois par rapport à l'irinotecan+cetuximab (HR 0,61 [0,48-0,77] ; p=0,0003) avec un profil de tolérance favorable par rapport à la triple association encorafenib-binimetinib-cetuximab (anti-BRAF+anti-MEK+anti-EGFR)(96). D'autres études récemment communiquées ouvrent la voie de nouvelles molécules ciblant

spécifiquement les mutations de KRAS G12C (3% des KRAS mutés codon 12) ou des CCRm surexprimant HER2 (97-99).

Ainsi, l'intégration de toutes ces données et la complexité des interactions à l'échelle de la cellule cancéreuse donne tout son sens aux réunions de concertation multidisciplinaire, en intégrant les spécialités de biologie moléculaire (RCP moléculaires), à l'ère de la médecine dite de précision.

IV-CONCLUSION

Les analyses NGS permettent de répondre à la forte demande de détection d'altération génétiques, tous cancers confondus, et ce à partir de faible quantité d'ADN extraite d'échantillon de tissu FFPE.

Dans notre étude rétrospective réalisée sur 229 patients CCRm, la détection de co-altérations moléculaires en NGS sur un panel de 19 gènes, associées aux mutations principales des gènes *RAS* et *BRAF*, n'était pas un facteur pronostique de la survie globale ni de la survie sans progression.

En revanche, la détection d'une mutation *BRAF* était associée à un pronostic péjoratif. Des études prospectives sont nécessaires pour confirmer ces données et déterminer l'impact des co-altérations sur la stratégie thérapeutique des cancers colorectaux métastatiques.

V-BIBLIOGRAPHIE

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424.
2. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Résultats préliminaires. Synthèse. Saint Maurice: Santé publique France, 2019. 20 p. Disponible à partir de: www.santepubliquefrance.fr et <https://www.ecancer.fr>
3. ©Les cancers en France, l'essentiel des faits et chiffres / Édition 2019, INCa, 2019. Disponible à partir de www.ecancer.fr
4. Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):379-85.
5. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
7. Molinari C, Marisi G, Passardi A, Matteucci L, De Maio G, Ulivi P. Heterogeneity in Colorectal Cancer: A Challenge for Personalized Medicine? *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):37-33
8. Stanta G, Bonin S. A Practical Approach to Tumor Heterogeneity in Clinical Research and Diagnostics. *Pathobiology*. 2018;85(1-2):7-17.
9. ©Oncogénétique en 2018 /consultations, laboratoires et suivi (2017 et 2018), INCa, 2020. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogenetique-et-plateformes-de-genetique-moleculaire/Le-dispositif-national-d-oncogenetique>
10. Lièvre A, Merlin J-L, Sabourin J-C, Artru P, Tong S, Libert L, et al. RAS mutation testing in patients with metastatic colorectal cancer in French clinical practice: A status report in 2014. *Dig Liver Dis*. 2018;50(5):507-12.
11. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344(11):783-92.
12. ©Les thérapies ciblées dans le traitement du cancer en 2015 /États des lieux et enjeux, appui à la décision, INCa, juillet 2016.
13. Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):845-56.
14. Diamandis EP. Cancer biomarkers: can we turn recent failures into success? *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(19):1462-7.

15. Andre F, Nowak F, Arnedos M, Lacroix L, Viens P, Calvo F. Biomarker Discovery, Development, and Implementation in France: A Report from the French National Cancer Institute and Cooperative Groups. *Clin Cancer Res.* 2012;18(6):1555-60.
16. Hanna N, Johnson D, Temin S, Baker S, Brahmer J, Ellis PM, et al. Systemic Therapy for Stage IV Non–Small-Cell Lung Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update. *J Clin Oncol.* 2017;35(30):3484-515.
17. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.
18. Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet.* 2010;11(10):685-96.
19. Wagle N, Berger MF, Davis MJ, Blumenstiel B, Defelice M, Pochanard P, et al. High-throughput detection of actionable genomic alterations in clinical tumor samples by targeted, massively parallel sequencing. *Cancer Discov.* 2012;2(1):82-93.
20. Bayrak-Toydemir P, Wooderchak-Donahue W. Gene/Genome Mutation Detection and Testing. In: McManus LM, Mitchell RN, éditeurs. *Pathobiology of Human Disease.* San Diego: Academic Press. 2014;3408-17.
21. Mahdieh N, Rabbani B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iran J Pediatr.* 2013;23(4):375-88.
22. Vendrell JA, Grand D, Rouquette I, Costes V, Icher S, Selves J, et al. High-throughput detection of clinically targetable alterations using next-generation sequencing. *Oncotarget.* 2017;8(25):40345-58.
23. Pennell NA, Mutebi A, Zhou Z-Y, Ricculi ML, Tang W, Wang H, et al. Economic impact of next generation sequencing vs sequential single-gene testing modalities to detect genomic alterations in metastatic non-small cell lung cancer using a decision analytic model. *J Clin Oncol.* 2018;36(15_suppl):9031-9031.
24. ©Institut National du Cancer. Modèle de compte rendu de génétique moléculaire pour la recherche de mutations somatiques dans les tumeurs solides, INCa, 2016.
25. Hayes DN, Kim WY. The next steps in next-gen sequencing of cancer genomes. *J Clin Invest.* 2015;125(2):462-8.
26. Menis J, Hasan B, Besse B. New clinical research strategies in thoracic oncology: clinical trial design, adaptive, basket and umbrella trials, new end-points and new evaluations of response. *Eur Respir Rev.* 2014;23(133):367-78.
27. Hainsworth JD, Meric-Bernstam F, Swanton C, Hurwitz H, Spigel DR, Sweeney C, et al. Targeted Therapy for Advanced Solid Tumors on the Basis of Molecular Profiles: Results From MyPathway, an Open-Label, Phase IIa Multiple Basket Study. *J Clin Oncol.* 2018;36(6):536-44.
28. ©Institut National du Cancer. Charte d'engagement au développement de protocoles d'accès sécurisé a une thérapeutique ciblée innovante : « AcSé ». 2016.
29. Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, Faris JE, Chau I, Blay J-Y, et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med.* 2015;373(8):726-36.

30. Su D, Zhang D, Chen K, Lu J, Wu J, Cao X, et al. High performance of targeted next generation sequencing on variance detection in clinical tumor specimens in comparison with current conventional methods. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):121.
31. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS -Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov.* 2018;8(7):822-35.
32. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1).
33. Nojadeh JN, Behrouz Sharif S, Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J.* 2018;17:159-68.
34. Brenner H, Stock C, Hoffmeister M. Effect of screening sigmoidoscopy and screening colonoscopy on colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies. *The BMJ.* 2014;348.
35. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
36. Herzig DO, Tsikitis VL. Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy. *J Surg Oncol.* 2015;111(1):96-102.
37. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487(7407):330-7.
38. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4):1079-99.
39. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-72.
40. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer. *Nat Med.* 2015;21(11):1350-6.
41. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1626-34.
42. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2008;359(17):1757-65.
43. Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(11):1023-34.
44. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26(35):5705-12.
45. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in

chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):753-62.

46. Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, Di Bartolomeo M, Borgonovo K, Maggi C, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab: a meta-analysis. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990.* 2015;51(5):587-94.
47. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, Takahashi A, Arai Y, Nishimura Y, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2015;21(4):1275-83.
48. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, et al. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut.* 2009;58(1):90-6.
49. Chen J, Guo F, Shi X, Zhang L, Zhang A, Jin H, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2014;14:802.
50. de la Fouchardière C, Cohen R, Malka D, Guimbaud R, Bourien H, Lièvre A, et al. Characteristics of BRAFV600E Mutant, Deficient Mismatch Repair/Proficient Mismatch Repair, Metastatic Colorectal Cancer: A Multicenter Series of 287 Patients. *The Oncologist.* 2019;24(12):e1331-40.
51. Kopetz S, Grothey A, Van Cutsem E, Yaeger R, Wasan HS, Yoshino T, et al. Encorafenib plus cetuximab with or without binimetinib for BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer: Quality-of-life results from a randomized, three-arm, phase III study versus the choice of either irinotecan or FOLFIRI plus cetuximab (BEACON CRC). *J Clin Oncol.* 2020;38(4_suppl):8-8.
52. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz H-J, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1182-91.
53. Overman MJ, Lonardi S, Wong KYM, Lenz H-J, Gelsomino F, Aglietta M, et al. Durable Clinical Benefit With Nivolumab Plus Ipilimumab in DNA Mismatch Repair–Deficient/Microsatellite Instability–High Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(8):773-9.
54. Diaz LA, Le DT, Yoshino T, André T, Bendell JC, Rosales M, et al. KEYNOTE-177: Phase 3, open-label, randomized study of first-line pembrolizumab (Pembro) versus investigator-choice chemotherapy for mismatch repair-deficient (dMMR) or microsatellite instability-high (MSI-H) metastatic colorectal carcinoma (mCRC). *J Clin Oncol.* 2018;36(4_suppl):TPS877-TPS877.
55. Venook AP, Niedzwiecki D, Innocenti F, Fruth B, Greene C, O'Neil BH, et al. Impact of primary (1°) tumor location on overall survival (OS) and progression-free survival (PFS) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): Analysis of CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):3504-3504.
56. Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz H-J, Innocenti F, Fruth B, Meyerhardt JA, et al. Effect of First-Line Chemotherapy Combined With Cetuximab or Bevacizumab on Overall Survival in Patients With KRAS Wild-Type Advanced or Metastatic Colorectal Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2017;317(23):2392-401.
57. Phelip JM, Tougeron D, Léonard D, Benhaim L, Desolneux G, Dupré A, et al. Metastatic colorectal cancer (mCRC): French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and

- follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO, SFR). *Dig Liver Dis.* 2019;51(10):1357-63.
58. Sartore-Bianchi A, Trusolino L, Martino C, Bencardino K, Lonardi S, Bergamo F, et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): a proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(6):738-46.
 59. Raghav KPS, Overman MJ, Yu R, Meric-Bernstam F, Menter D, Kee BK, et al. HER2 amplification as a negative predictive biomarker for anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2016;34(15_suppl):3517-3517.
 60. Liao X, Morikawa T, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Yamauchi M, et al. Prognostic Role of PIK3CA Mutation in Colorectal Cancer: Cohort Study and Literature Review. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18(8):2257-68.
 61. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PLoS One.* 2013;8(6):e65479.
 62. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, Burnett-Hartman AN, Weisenberger DJ, Laird PW, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology.* 2015;148(1):77-87.e2.
 63. Stintzing S, Wirapati P, Lenz H-J, Neureiter D, Fischer von Weikersthal L, Decker T, et al. Consensus molecular subgroups (CMS) of colorectal cancer (CRC) and first-line efficacy of FOLFIRI plus cetuximab or bevacizumab in the FIRE3 (AIO KRK-0306) trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2019;30(11):1796-803.
 64. Ouali K, Pellat A, Cohen R, Svrcek M, Penault-Llorca F, André T. Fusions NTRK : une nouvelle piste dans les cancers digestifs ? *Bull Cancer (Paris).* 2020;107(4):447-57.
 65. Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2018;(38):231-8.
 66. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 1988;319(9):525-32.
 67. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:479-507.
 68. Heinemann V, Douillard JY, Ducreux M, Peeters M. Targeted therapy in metastatic colorectal cancer – An example of personalised medicine in action. *Cancer Treat Rev.* 2013;39(6):592-601.
 69. Lieu CH, Corcoran RB, Overman MJ. Integrating Biomarkers and Targeted Therapy Into Colorectal Cancer Management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2019;(39):207-15.
 70. Corcoran RB, André T, Atreya CE, Schellens JHM, Yoshino T, Bendell JC, et al. Combined BRAF, EGFR, and MEK Inhibition in Patients with BRAFV600E-Mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2018;8(4):428-43.
 71. D'Haene N, Le Mercier M, De Nève N, Blanchard O, Delaunoy M, El Housni H, et al. Clinical Validation of Targeted Next Generation Sequencing for Colon and Lung Cancers. *PLoS ONE.* 2015;10(9).

72. Rey J-M, Ducros V, Pujol P, Wang Q, Buisine M-P, Aissaoui H, et al. Improving Mutation Screening in Patients with Colorectal Cancer Predisposition Using Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn*. 2017;19(4):589-601.
73. McDermott U. Next-generation sequencing and empowering personalised cancer medicine. *Drug Discov Today*. 2015;20(12):1470-5.
74. Gao XH, Yu GY, Hong YG, Lian W, Chouhan H, Xu Y, et al. Clinical significance of multiple gene detection with a 22-gene panel in formalin-fixed paraffin-embedded specimens of 207 colorectal cancer patients. *Int J Clin Oncol*. 2019;24(2):141-52.
75. Li W, Qiu T, Guo L, Ying J, Zhou A. NGS-based oncogenic mutations analysis in advanced colorectal cancer patients improves targeted therapy prediction. *Pathol - Res Pract*. 2019;215(3):483-9.
76. Van Cutsem E, Cervantes A, Nordlinger B, Arnold D, ESMO Guidelines Working Group. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014;25 Suppl 3:iii1-9.
77. Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, Dahbour I, Tabash A, Abdel-Wahab R, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol*. 2016;7(6):882-902.
78. Cohen R, Cervera P, Svrcek M, Pellat A, Dreyer C, de Gramont A, et al. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr Treat Options Oncol*. 2017;18(2):9.
79. Li W, Qiu T, Guo L, Ying J, Zhou A. NGS-based oncogenic mutations analysis in advanced colorectal cancer patients improves targeted therapy prediction. *Pathol - Res Pract*. 2019;215(3):483-9.
80. Tran B, Kopetz S, Tie J, Gibbs P, Jiang Z-Q, Lieu CH, et al. Impact of BRAF mutation and microsatellite instability on the pattern of metastatic spread and prognosis in metastatic colorectal cancer. *Cancer*. 2011;117(20):4623-32.
81. Edwards BK, Noone A-M, Mariotto AB, Simard EP, Boscoe FP, Henley SJ, et al. Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer. *Cancer*. 2014;120(9):1290-314.
82. Morris EJA, Forman D, Thomas JD, Quirke P, Taylor EF, Fairley L, et al. Surgical management and outcomes of colorectal cancer liver metastases. *Br J Surg*. 2010;97(7):1110-8.
83. Ferrand F, Malka D, Bourredjem A, Allonier C, Bouché O, Louafi S, et al. Impact of primary tumour resection on survival of patients with colorectal cancer and synchronous metastases treated by chemotherapy: Results from the multicenter, randomised trial Fédération Francophone de Cancérologie Digestive 9601. *Eur J Cancer*. 2013;49(1):90-7.
84. Van Cutsem E, Köhne C-H, Láng I, Folprecht G, Nowacki MP, Cascinu S, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2011;29(15):2011-9.

85. Williams CS, Bernard JK, Demory Beckler M, Almohazey D, Washington MK, Smith JJ, et al. ERBB4 is over-expressed in human colon cancer and enhances cellular transformation. *Carcinogenesis*. 2015;36(7):710-8.
86. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, Jakobsen JN, de Stricker K, Grauslund M, et al. Intrinsic Resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers*. 2019;11(7):923.
87. Falcone A, Ricci S, Brunetti I, Pfanner E, Allegrini G, Barbara C, et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2007;25(13):1670-6.
88. Cremolini C, Loupakis F, Antoniotti C, Lupi C, Sensi E, Lonardi S, et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival and molecular subgroup analyses of the open-label, phase 3 TRIBE study. *Lancet Oncol*. 2015;16(13):1306-15.
89. Cremolini C, Marmorino F, Loupakis F, Masi G, Antoniotti C, Salvatore L, et al. TRIBE-2: a phase III, randomized, open-label, strategy trial in unresectable metastatic colorectal cancer patients by the GONO group. *BMC Cancer*. 2017;17(1):408.
90. Cremolini C, Morano F, Moretto R, Berenato R, Tamborini E, Perrone F, et al. Negative hyper-selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR monoclonal antibodies: the PRESSING case-control study. *Ann Oncol*. 2017;28(12):3009-14.
91. Lenz H-J, Ou F-S, Venook AP, Hochster HS, Niedzwiecki D, Goldberg RM, et al. Impact of Consensus Molecular Subtype on Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Results From CALGB/SWOG 80405 (Alliance). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2019;37(22):1876-85.
92. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clin Chem*. 2014;60(9):1192-9.
93. Russo M, Siravegna G, Blazzkowsky LS, Corti G, Crisafulli G, Ahronian LG, et al. Tumor Heterogeneity and Lesion-Specific Response to Targeted Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer Discov*. 2016;6(2):147-53.
94. Toledo RA, Cubillo A, Vega E, Garralda E, Alvarez R, de la Varga LU, et al. Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget*. 2016;8(21):35289-300.
95. Rossini D, Cremolini C, Conca E, Del Re M, Busico A, Pietrantonio F, et al. Liquid biopsy to predict benefit from rechallenge with cetuximab (cet) + irinotecan (iri) in RAS/BRAF wild-type metastatic colorectal cancer patients (pts) with acquired resistance to first-line cet+iri: Final results and translational analyses of the CRICKET study by GONO. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl):12007-12007.
96. Kopetz S, McDonough SL, Lenz H-J, Magliocco AM, Atreya CE, Diaz LA, et al. Randomized trial of irinotecan and cetuximab with or without vemurafenib in BRAF-mutant metastatic colorectal cancer (SWOG S1406). *J Clin Oncol*. 2017;35(15_suppl):3505-3505.

97. Hallin J, Engstrom LD, Hargis L, Calinisan A, Aranda R, Briere DM, et al. The KRASG12C Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov.* 2020;10(1):54-71.
98. Christensen JG, Olson P, Briere T, Wiel C, Bergo MO. Targeting Kras g12c -mutant cancer with a mutation-specific inhibitor. *J Intern Med.* 2020;288(2):183-91.
99. Siena S, Di Bartolomeo M, Singh Raghav KP, et al. A phase II, multicenter, open-label study of trastuzumab deruxtecan (T-DXd; DS-8201) in patients (pts) with HER2-expressing metastatic colorectal cancer (mCRC): DESTINY-CRC01. *J Clin Oncol.* 2020;38(15 suppl; abstr 4000) doi:10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.4000

VI-ANNEXES

Annexe 1 : Panels de gènes

- Fluidigm_Panel_v1

Gène : Exons (Transcrit de référence)

AKT1 : 3 (NM_001014431.1) **ALK** : 22+23 +24+25 +26 (NM_004304.1) **BRAF** : 11+15

(NM_004333.4) **CTNNB1** : 3 (NM_001904)

EGFR : 18+19+20+21 (NM_005228.3) **ERBB2** : 20 (NM_004448.2) **ERBB4** : 10+12 (NM_

005235.2) **FGFR2** : 7+9 +12+14 (NM_000141.4)

FGFR3 : 7+9+14 +16 (NM_000142.4) **HRAS** : 2+3+4 (NM_005343.2) **IDH1** : 4

(NM_005896) **IDH2** : 4 (NM_002168)

KIT : 8+9+11+13+14 +17+18 (NM_000222.2) **KRAS** : 2+3+4 (NM_033360.2) **MAP2K1** : 2

(NM_002755.3)

MET : 2+14+16+17+18+19+20 (NM_001127500.1) **NRAS** : 2+3+4 (NM_002524.3) **PDGFRA**

: 12+14+18 (NM_006206.4)

PIK3CA : 10+21 (NM_006218.2) **PTEN** : 7 (NM_000314)

- TSCA_Panel INCa_v2

AKT1 : 3 (NM_001014431); **ALK** : 20+21+22+23+24+25 (NM_004304); **BRAF** : 11+15

(NM_004333); **CDKN2A** : 1+2+3 (NM_000077); **CTNNB1** : 3 (NM_001904); **DDR2** : 17

(NM_006182); **EGFR** : 18+19+20+21 (NM_005228); **ERBB2** : 20 (NM_004448); **ERBB4** :

10+12 (NM_005235); **FGFR1** : 12+14 (NM_023110); **FGFR2** : 7+12+14 (NM_000141);

FGFR3 : 7+9+14 (NM_000142); **GNA11** : 4+5 (NM_002067); **GNAQ** : 5 (NM_002072);

GNAS : 8+9 (NM_000516); **H3F3A** : 2 (NM_002107); **H3F3B** : 2 (NM_005324); **HIST1H3B** :

1 (NM_003537); **HRAS** : 2+3+4 (NM_005343); **IDH1** : 4 (NM_005896); **IDH2** : 4
(NM_002168); **JAK2** : 12+13+14 (NM_004972); **KIT** : 8+9+11+13+17+18 (NM_000222);
KRAS : 2+3+4 (NM_033360); **MAP2K1** : 2 (NM_002755); **MET** :
2+intron13+14+intron14+15+16+17+18+19+20 (NM_001127500); **NRAS** : 2+3+4
(NM_002524); **PDGFRA** : 12+14+18 (NM_006206); **PIK3CA** : 10+21 (NM_006218); **POLE** :
9+10+11+12+13+14 (NM_006231); **PTEN** : 1+2+3+4+5+6+7+8+9 (NM_000314); **RAC1** : 2
(NM_018890); **SMAD4** : 2+3+9+10+11+12 (NM_005359); **STK11** : 1+2+3+4+5+6+7+8+9
(NM_000455); **TERT** : Promoteur (NM_198253)

Annexe 2 : Figures supplémentaires

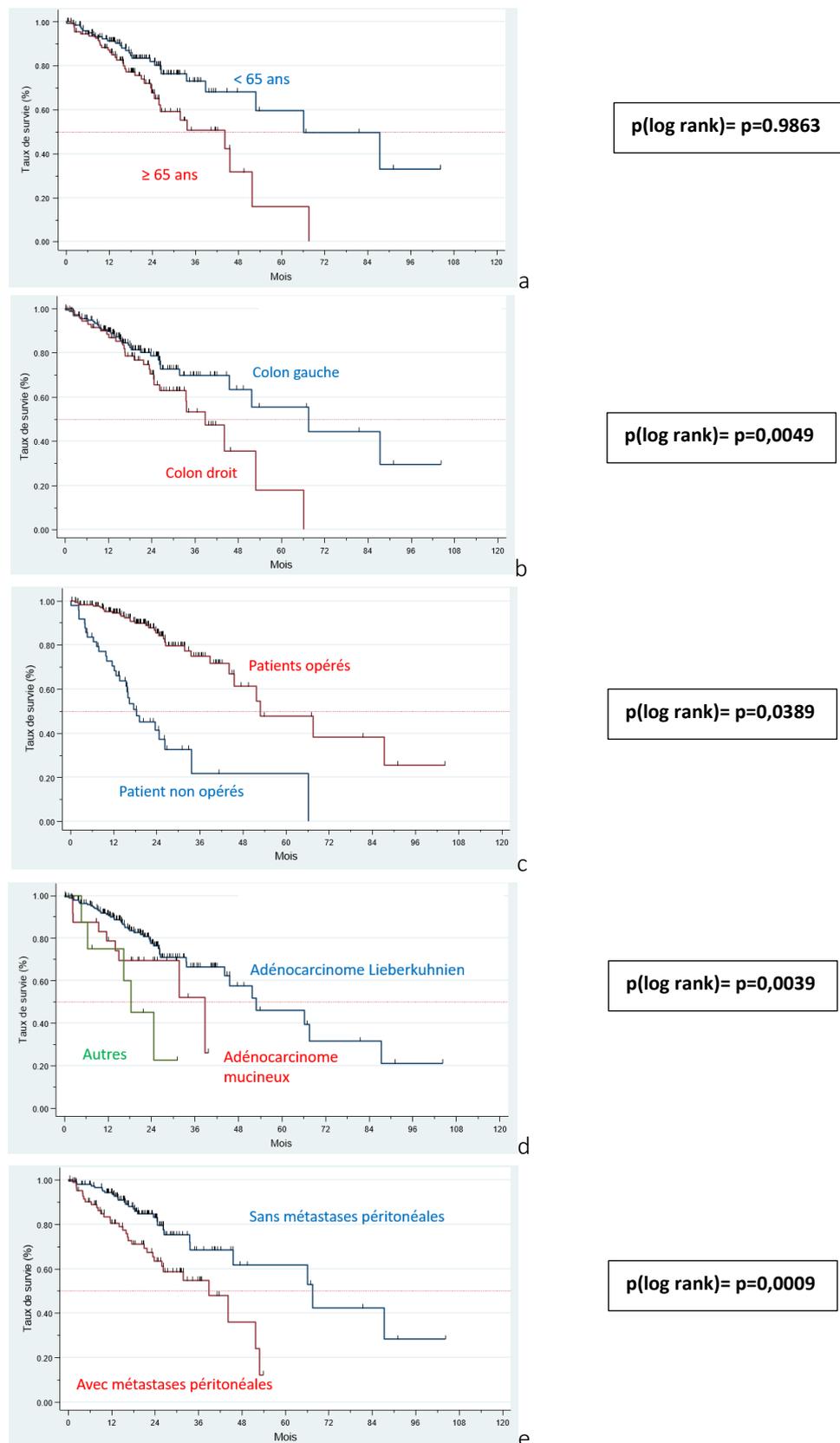


Figure sup.1. Paramètres influençant la survie globale en analyse univariée (a) Age ; (b) localisation ; (c) Chirurgie du primitif ; (d) Type histologique ; (e) Métastases péritonéales ; (f) Stade.

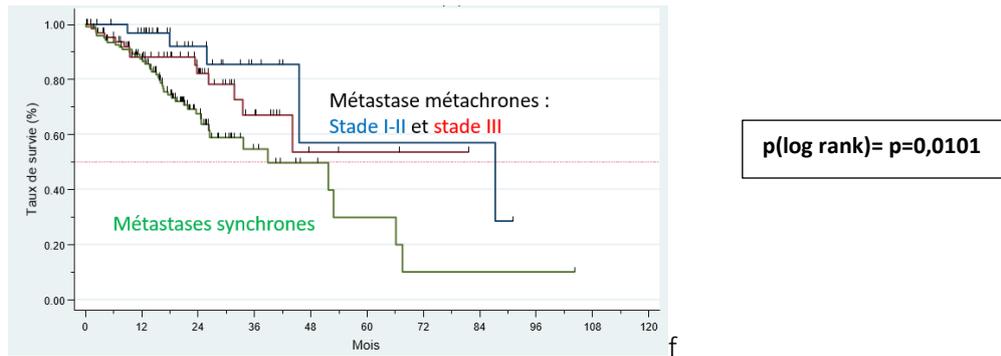


Figure sup. 3. (Suite) Paramètres influençant la survie globale en analyse univariée : (a) Age ; (b) localisation ; (c) Chirurgie du primitif ; (d) Type histologique ; (e) Métastases péritonéales ; (f) Stade.

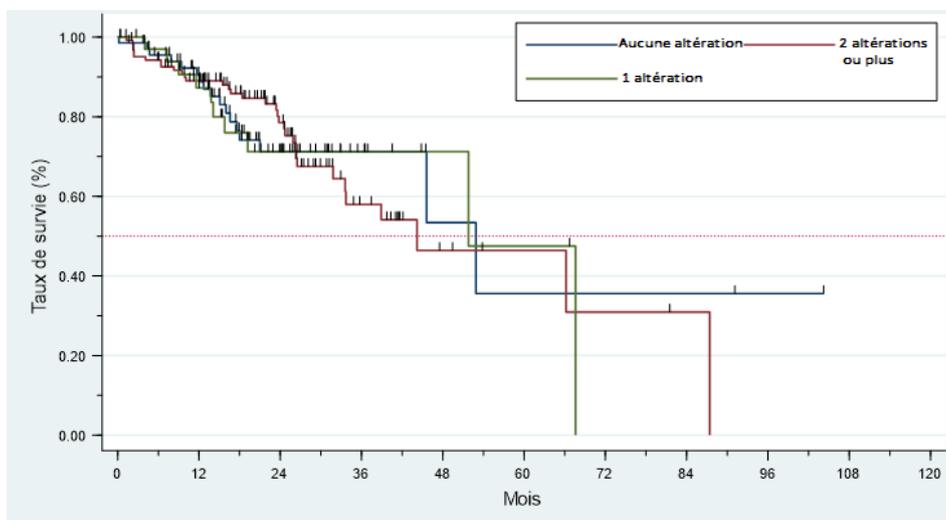


Figure sup. 2. Survie globale selon le nombre d'altérations moléculaires.

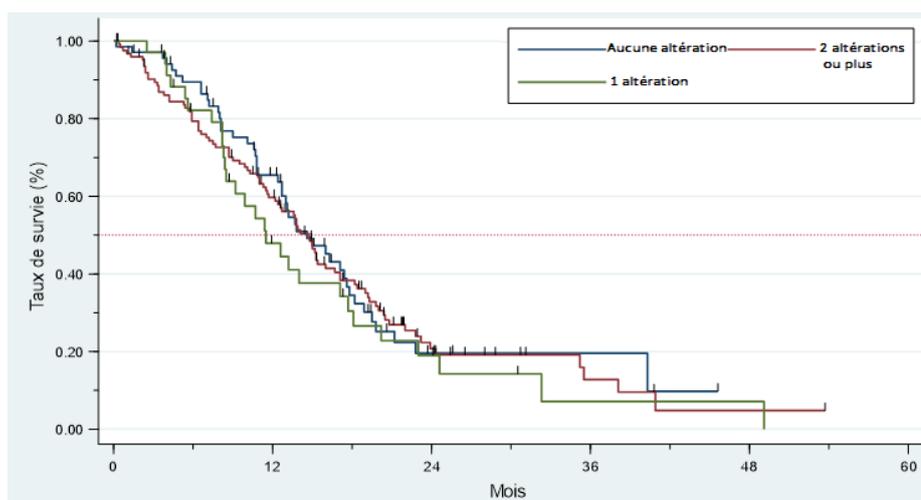
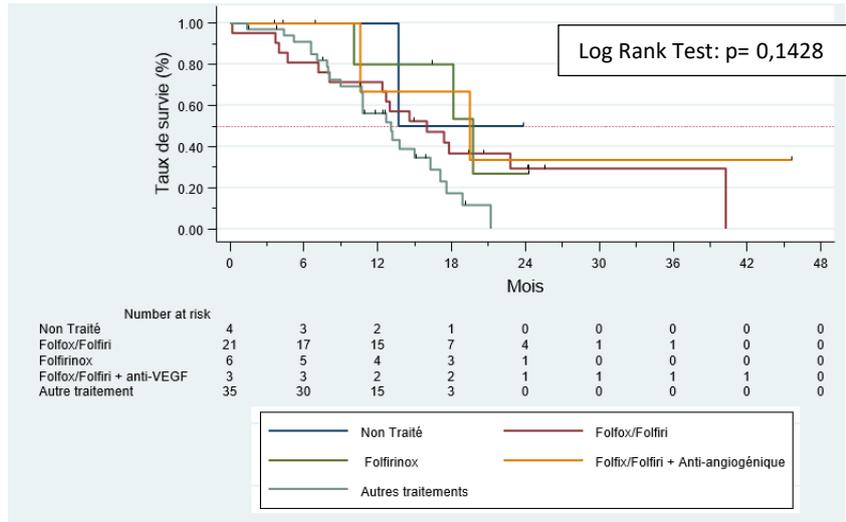
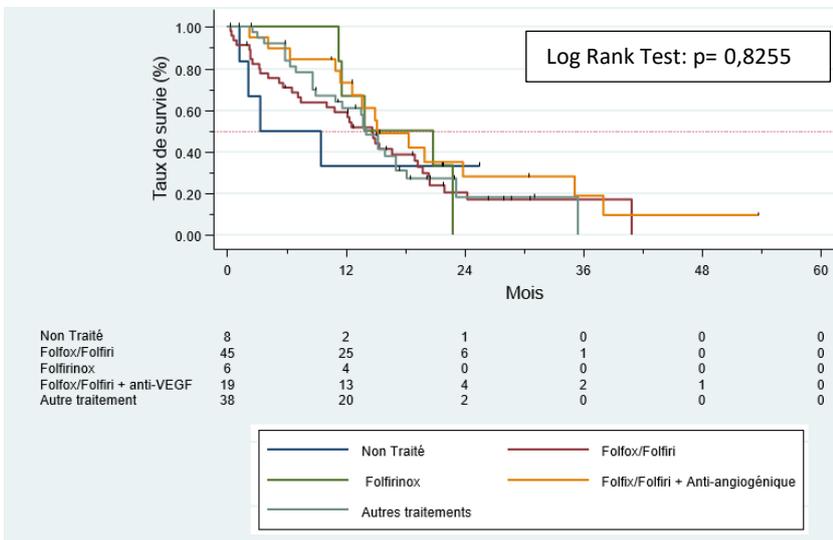


Figure sup. 3. Survie sans progression selon le nombre d'altérations moléculaires.

(a) Aucune altération



(b) Mutation RAS/BRAF seule



(c) Co-altération avec RAS/BRAF

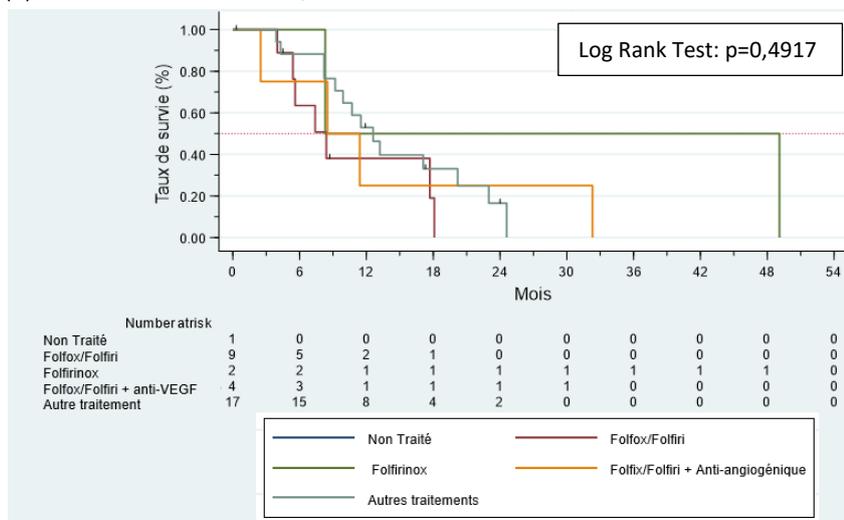


Figure sup. 4. Survie sans progression pour les groupes mutationnels 1, selon le traitement reçu.

(c)Autre(s) altération(s)

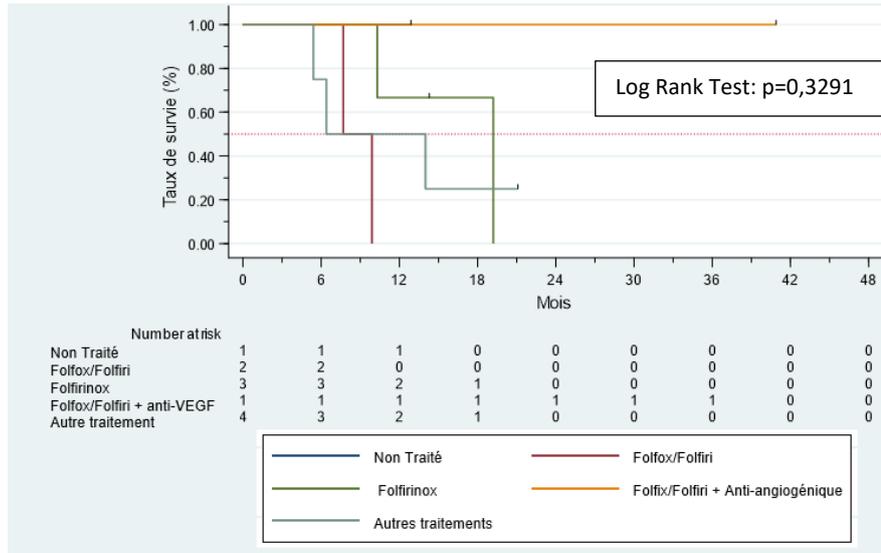
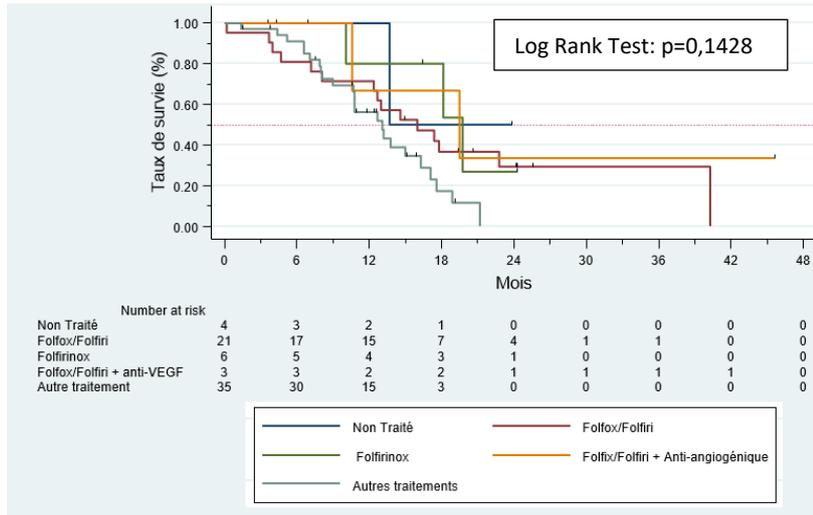
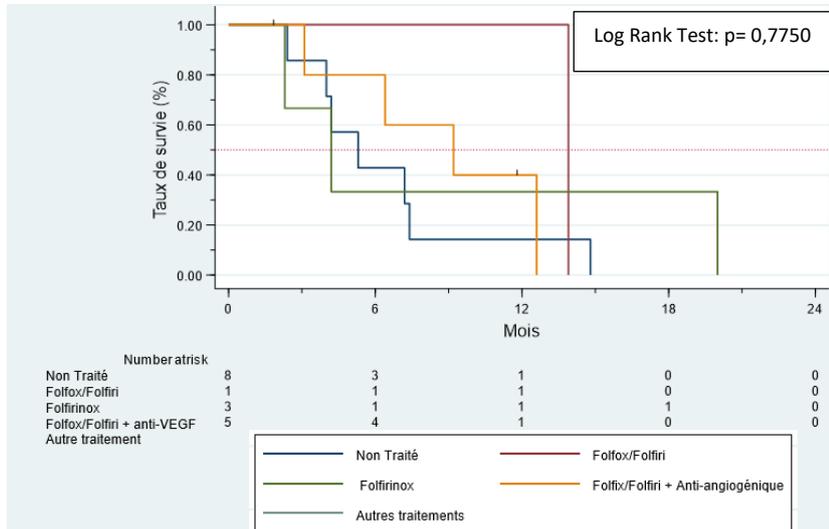


Figure sup. 4. (Suite) Survie sans progression pour les groupes mutationnels 1, selon le traitement reçu.

(a) Aucune altération



(b) Mutation BRAF (+/- autre altération)



(c) Co-altération avec RAS

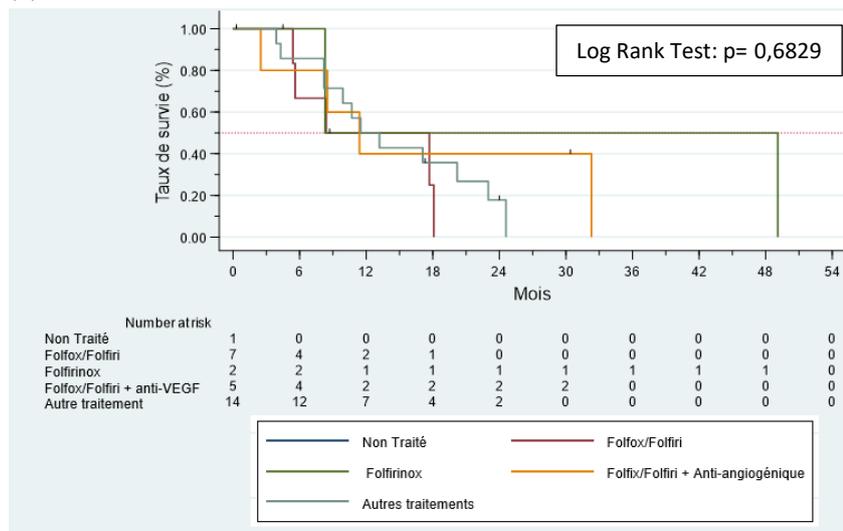


Figure sup. 5. Survie sans progression pour les groupes mutationnels 2, selon le traitement reçu.

(d) Mutation RAS seule et Autre(s) altération(s)

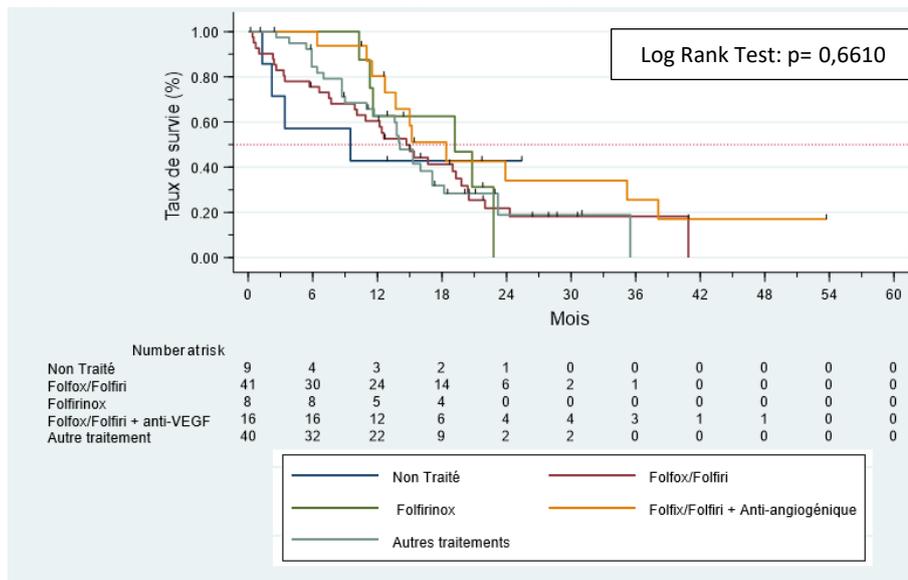
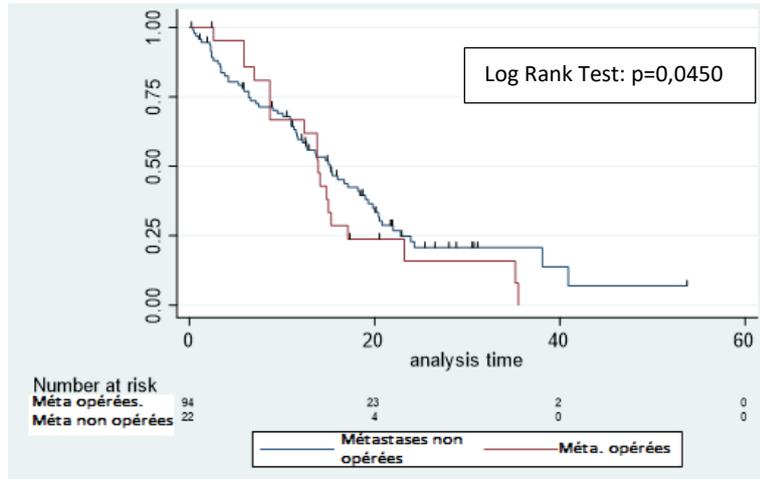
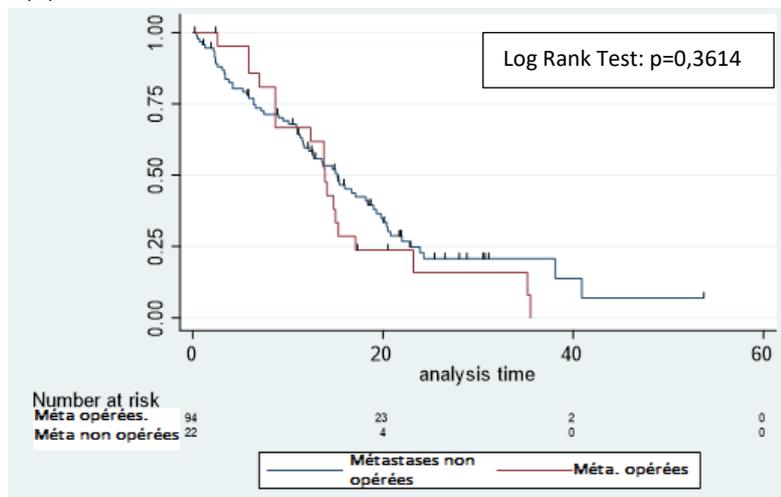


Figure sup. 5. (Suite) Survie sans progression pour les groupes mutationnels 2, selon le traitement reçu.

(a)Aucune altération



(b)Mutation RAS/BRAF seule



(c)Co-altation avec RAS/BRAF

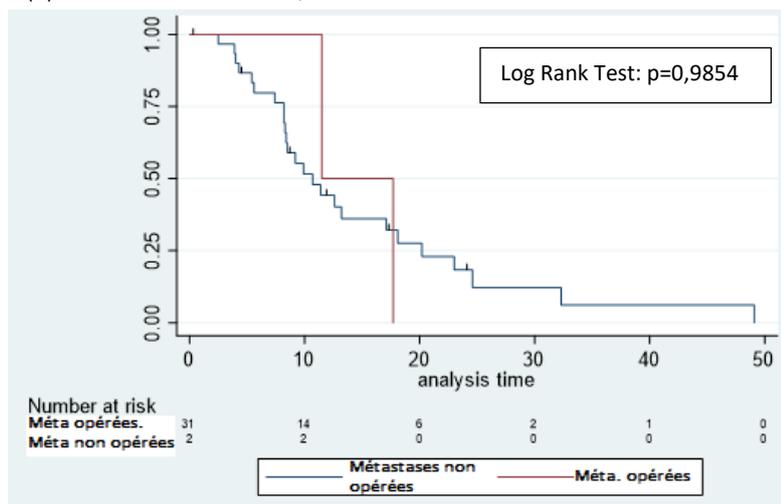


Figure sup. 6. Survie sans progression pour les groupes mutationnels 1, selon chirurgie ou non de métastases.

(d)Autre(s) altération(s)

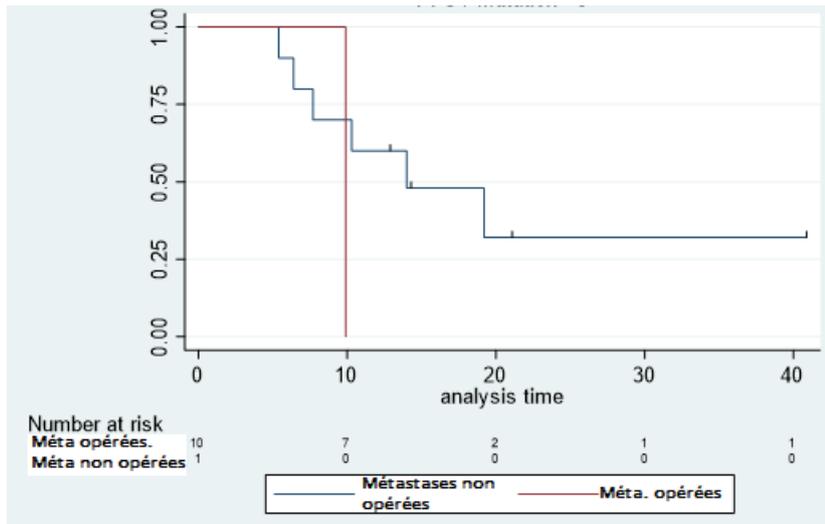


Figure sup. 6. (Suite) Survie sans progression pour les groupes mutationnels 1, selon chirurgie ou non de métastases.

VII-ABREVIATIONS

ALK : *Anaplastic Lymphoma Kinase*

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé.

BRAF : *B-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

CCR : Cancer Colorectal

CCRm : Cancer Colorectal Métastatique

EGFR : *Epidermal Growth Factor Receptor* / Recepteur du Facteur de Croissance Epidermique

EMA : *European Medicines Agency* / Agence Européenne du Médicament

ERBB4 : *Erb-b2 Récepteur Tyrosine kinase 4*

GIST : *GastroIntestinal Stromal Tumor* / Tumeurs stromales gastro-intestinales

HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor-2*

HNPC : *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* / Cancer colorectal héréditaire sans polypose ou syndrome de Lynch.

INCa : Institut National du Cancer

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

KRAS : *Kirsten rat oncogène homolog*

MAPK : *Mitogen-Activating Protein Kinase*

MIC : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MMR : *Mismatch Repair*

MSI : MicroSatellites Instables

MSS : MicroSatellites Stables

NGS : *Next génération séquencing* / Séquençage à haut débit

NRAS : *Neuroblastoma RAS viral oncogène homolog*

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PDL1 : *Programmed Death Ligand 1*

PIK3CA : *Phosphidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha.*

PS : *Performans Status*

RCP : Réunion de Concertation Pluri-disciplinaire

ROS1 : *ROS proto-oncogene 1*

SG : Survie Globale

SSP : Survie Sans Progression

VEGF : *Vascular Epidermal Growth Factor* / Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire

SERMENT

- *En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.*
- *Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.*
- *Admis (e) dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.*
- *Respectueux (se) et reconnaissant (e) envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*
- *Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert (e) d'opprobre et méprisé (e) de mes confrères si j'y manque.*

INTRODUCTION : Les recherches des mutations RAS (*KRAS/NRAS*), *BRAF* et d'instabilité microsatellitaire (MSI) jouent un rôle déterminant dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques (CCRm) et sont réalisées en routine par séquençage (Next-Generation-Sequencing/NGS).

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact pronostique des altérations moléculaires associées aux mutations *RAS/BRAF* de CCRm détectées en NGS.

METHODE : Les données clinico-bio-pathologiques de patients CCRm testés en NGS (19 gènes), traités au CHU et à l'institut du cancer de Montpellier ont été analysées rétrospectivement. L'objectif principal était la survie globale (SG).

RESULTATS : Sur 229 patients CCRm (50% femmes, âge médian 64,7[26,73-90,98] ans, 30% colons droits) inclus, 3% étaient MSI. 160/229 patients étaient mutés dont 149 (65%) avec mutation principale (*KRAS* 51%, *NRAS* 6,6%, *BRAF* 7,4%). Trente-trois (14,4%) présentaient une co-altération avec *RAS/BRAF* (*KRAS+PIK3CA2* 9,6%, 1 double mutations *KRAS*, 1 *NRAS+KRAS*). La présence d'une co-altération n'était pas statistiquement associée à une diminution de la SG ou de la survie sans progression (SSP). L'âge < 65 ans (HR 2,33 [1,3-4,2] ; p=0,005), la chirurgie du primitif (HR 2,7 [1,6-5] ; p=0,001), l'absence d'atteinte péritonéale (HR 0,15 [0,08-0,7]; p<0,001) et de mutation *BRAF* (HR 2,8 [1,1-7,3] ; p=0,028) étaient associés à un allongement de la SG. La chirurgie du primitif (HR 0,45 [0,3-0,7] ; p<0,001) et l'absence de mutation *BRAF* (HR 3,12 [1,8-5,3] ; p<0,001) augmentaient la SSP.

CONCLUSION : La présence de co-altérations détectées en NGS n'avait pas d'impact sur la survie des patients CCRm dans cette étude rétrospective. La détection d'une mutation *BRAF* était associée à un pronostic péjoratif. Des études prospectives sont nécessaires pour confirmer ces données et déterminer l'impact des co-altérations sur la stratégie thérapeutique des CCRm.

MOTS CLES (8) : cancer colorectal métastatique, mutations génétiques, Next-Generation-Sequencing (NGS), *RAS*, *BRAF*, *PIK3CA*, co-altération moléculaire, pronostic.