



HAL
open science

Stratégie diagnostique des carcinomes colorectaux avec gènes de fusion

Claire Bocciarelli

► **To cite this version:**

Claire Bocciarelli. Stratégie diagnostique des carcinomes colorectaux avec gènes de fusion. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. 2020. dumas-03174811

HAL Id: dumas-03174811

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03174811>

Submitted on 19 Mar 2021

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

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

UNIVERSITE DES ANTILLES

2020

FACULTE DE MEDECINE
HYACINTHE BASTARAUD
N° 2020ANTI0569

STRATEGIE DIAGNOSTIQUE DES CARCINOMES COLORECTAUX AVEC GENES DE FUSION

THESE

Présentée et soutenue publiquement à la Faculté de Médecine Hyacinthe BASTARAUD des
Antilles

Et examinée par les Enseignants de la dite Faculté

Le 31 mars 2020

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

Par

BOCCIARELLI Claire

Examineurs de la thèse :

Mr Jean ROUDIE	Professeur en Médecine	Président
Mme Pascales MARCORELLES	Professeur en Médecine	Jurée
Mr Benoit TERRIS	Professeur en Médecine	Juré
Mme Aude ALINE-FARDIN	Docteur en Médecine	Jurée
Mr Arnaud UGUEN	Docteur en Médecine (MCU)	Directeur



Le Président de l'Université des Antilles : Eustase JANKY
Doyen de la Faculté de Médecine : Raymond CESAIRE
Vice-Doyen de la Faculté de Médecine : Suzy DUFLO

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers	
Pascal BLANCHET _____	Chirurgie Urologique CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 95
André-Pierre UZEL _____	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 66
Pierre COUPPIE _____	Dermatologie et vénéréologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 39
Thierry DAVID _____	Ophtalmologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 55
Suzy DUFLO _____	ORL – Chirurgie Cervico-Faciale CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 93 46 16
Eustase JANKY _____	Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel 05 90 89 13 89
François ROQUES _____	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 71
Jean ROUDIE _____	Chirurgie Digestive CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 01 - Tel : 05 96 55 22 71
Jean-Louis ROUVILLAIN _____	Chirurgie Orthopédique CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 28
André CABIE _____	Maladies Infectieuses CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 01
Philippe CABRE _____	Neurologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 61
Raymond CESAIRE _____	Bactériologie-Virologie-Hygiène option virologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 11

Maryvonne DUEYMES-BODENES _____	Immunologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 24 24
Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (<i>Suite</i>)	
Annie LANNUZEL _____	Neurologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 13
Louis JEHEL _____	Psychiatrie Adulte CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 44
Mathieu NACHER _____	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention CH de CAYENNE Tel : 05 94 93 50 24
Magalie DEMAR - PIERRE _____	Parasitologie et Infectiologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 09
Vincent MOLINIE _____	Anatomie Cytologie Pathologique CHU de FORT DE FRANCE Tel : 05 96 55 20 85/55 23 50
Philippe KADHEL _____	Gynécologie-Obstétrique CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 20
Michel DE BANDT _____	Rhumatologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 52
Karim FARID _____	Médecine Nucléaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 67
Mehdi MEJDOUBI _____	Radiodiagnostic et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 21 84
Rémi NEVIERE _____	Physiologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00
Christian SAINTE-ROSE _____	Radiodiagnostic et imagerie Médicale CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00
Sébastien BREUREC _____	Bactériologie & Vénérologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 12 80
Félix DJOSSOU _____	Maladies infectieuses et tropicales CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 50 50
Nicolas VENISSAC _____	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00
Moustapha DRAMÉ _____	Épidémiologie, Économie de la Santé CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 20 00

Christophe DELIGNY _____	Médecine Interne CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 22 55
Narcisse ELENGA _____	Pédiatrie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 77 37
Michel CARLES _____	Anesthésie Réanimation CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89

Professeur de Médecine Générale	
Jeannie HELENE-PELAGE <hr/>	Médecine Générale CHU de Pointe-à-Pitre / Cabinet libéral Tel : 05 90 84 44 40

Professeur Associé de Médecine Générale	
Franciane GANE-TROPLENT <hr/>	Médecine générale Cabinet libéral les Abymes Tel : 05 90 20 39 37

Maître de Conférences des Universités - Praticiens Hospitaliers	
Jocelyn INAMO <hr/>	Cardiologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 72 - Fax : 05 96 75 84 38
Fritz-Line VELAYOUDOM épouse CEPHISE <hr/>	Endocrinologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 03
Marie-Laure LALANNE-MISTRIH <hr/>	Nutrition CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 00
Moana GELU-SIMEON <hr/>	Gastroentérologie hépatologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10
Maturin TABUE TEGUO <hr/>	Médecine interne : Gériatrie et Biologie du vieillissement CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10
Véronique BACCINI <hr/>	Hématologie CHU de POINTE-A-PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 10 10

Maître de Conférence des Université de Médecine Générale	
Philippe CARRERE <hr/>	Médecine générale Ruelle de la colline Section Dupré 97141 VIEUX FORT Tel : 05 90 80 84 05

<u>Maître de Conférence Associé de Médecine Générale</u>	
Franck MASSE <hr/>	Médecine générale Maison de Santé de Ducos 1 Place Asselin de Beauville 97224 DUCOS Tel : 06 96

Chefs de Clinique des Universités - Assistants des Hôpitaux	
BLAIZOT Romain <hr/>	Dermatologie CH de CAYENNE Tel : 05 94 39 53 39
BROUZENG-LACOUSTILLE Charlotte <hr/>	Endocrinologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 13 03
BUTORI Pauline <hr/>	Ophthalmologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 50 / 0690
CHAUMONT Hugo <hr/>	Neurologie CHU de POINTE- À -PITRE/ABYMES Tel : 05 90 89 14 13
CHEVALLIER Ludivine <hr/>	Chirurgie Digestive et Viscérale CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
DUDOUIT Sylvain <hr/>	Chirurgie Orthopédique CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
DURTETTE Charlotte <hr/>	Médecine interne CHU de Martinique Tél. : 0596 55 22 55
HENNO Florent <hr/>	Anesthésie-Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10
HUYGHUES DES ETAGES Gunther <hr/>	ORL/Chirurgie maxillo faciale CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 60
JEREMIE Jean-Marc <hr/>	Psychiatrie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 44
LEFEVRE Benjamin <hr/>	Maladies infectieuses CHU de Pointe-à-Pitre Tel : 05 90 89 10 10
MONFORT Astrid <hr/>	Cardiologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 72

Chefs de Clinique des Universités - Assistants des Hôpitaux

(Suite)

PARSEMAIN Aurélie <hr/>	ORL/Chirurgie maxillo faciale CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 14 60
-----------------------------------	---

PASQUIER Jérémie <hr/>	Maladies Infectieuses CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
PERROT Emmanuel <hr/>	Urologie CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 13 95
POUY Sébastien <hr/>	Cardiologie CHU de Martinique Tél. : 0596 55 23 72
RENARD Guillaume <hr/>	Chirurgie Orthopédique CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
ROLLE Amélie <hr/>	Réanimation CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 10 10
SAINTE-ROSE Vincent <hr/>	Parasitologie et Mycologie CH "Andrée ROSEMON" de Cayenne Tél. : 0594 39 53 59
SYLVESTRE Emmanuelle <hr/>	Maladies Infectieuses CHU de Martinique Tél. : 0596 55 20 00
TRAMIER Ambre <hr/>	Gynécologie-Obstétrique CHU de Pointe-à-Pitre Tél. : 0590 89 19 89

Chefs de Clinique des Universités – Médecine Générale	
BONIFAY Timothée <hr/>	Médecine Générale CHU de Cayenne, Croix Rouge Tél. : 0594 39 50 50
CARPIN Jamila <hr/>	Médecine Générale Cabinet du Dr GANE-TROPLENT Tél. :
NIEMETZKI Florence <hr/>	Médecine Générale CH « Andrée Rosemon » de Cayenne/ Cabinet Tél. :
PLACIDE Axiane <hr/>	Médecine Générale CHU de Martinique, Cabinet Tél. :

Professeurs EMERITES (au 31/08/2019)	
Serge ARFI <hr/>	Médecine interne CHU de FORT- DE – France Tel : 05 96 55 22 55 - Fax : 05 96 75 84 45

Georges JEAN-BAPTISTE <hr/>	Rhumatologie CHU de FORT- DE - FRANCE Tel : 05 96 55 23 52 - Fax : 05 96 75 84 44
---------------------------------------	--

REMERCIEMENTS

A mon jury de Thèse :

A mon directeur de thèse, Monsieur le Docteur Arnaud UGUEN

Je tiens dans un premier temps à te remercier de m'avoir fait l'honneur d'être mon directeur de thèse, de m'avoir encadré et guidé tout au long de ce travail de thèse, et surtout de m'avoir fait découvrir ce sujet. Je te remercie pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton investissement, des judicieux conseils et tes encouragements malgré l'océan Atlantique sur nous sépare. Tu es et tu resteras pour moi un modèle d'investissement professionnel.

Au Président du Jury, Monsieur le Professeur Jean ROUDIE

Je tiens tout d'abord à vous remercier de m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse. En effet, une bonne relation entre les chirurgiens et les pathologistes est primordial au sein d'une équipe de soin.

Au Professeur Pascale MARCORELLES

Je vous remercie dans un premier temps, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Dans un deuxième temps, je vous remercie de m'avoir ouvert les portes du service de pathologie du CHRU de Brest en m'accueillant parmi vous avec gentillesse, humanité et une grande bienveillance. Vous avez su me donner l'envie et su me soutenir pour la réalisation de mon master 2. J'espère ne jamais vous décevoir.

Au Professeur Benoit TERRIS

Je vous remercie dans un premier temps, d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Dans un second temps, je vous remercie d'avoir accueilli au cours de ces années, dans votre région, les internes de pathologie des Antilles. Vous vous êtes toujours rendu disponible pour échanger, m'orienter sur mes stages en métropole et toujours maintenant en tant que nouveau coordinateur de DES.

Au Docteur Aude ALINE-FARDIN

Je te remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Merci de m'avoir accueilli dans le service de pathologie de la Martinique et m'avoir transmis la rigueur nécessaire pour devenir une bonne pathologiste.

A mes chefs de Pathologies : merci d'avoir contribué à ma formation

Au service de pathologie du CHU de Pointe à Pitre :

Merci au Docteur Abdoulaye DIEDHIOU de m'avoir transmis les bases de la pathologie pendant mon premier semestre. Vous resterez mon mentor.

Au service de pathologie du CHU de Fort-de-France :

Merci au Professeur Vincent MOLINIE de m'avoir toujours encouragé dans l'ensemble de mon cursus d'interne en pathologie. Vous vous êtes toujours rendu disponible pour corriger avec moi et m'expliquer plein de petits détails de physiopathologie, surtout dans le domaine de l'uropathologie.

Merci au reste de l'équipe médicale, Aude, Leila et Clémence pour leur patience, leurs conseils et leur enseignement.

Au Professeur Antoine MARTIN du CHU d'Avicenne :

Je vous remercie pour votre enseignement, de votre écoute et de votre disponibilité. Vous êtes incollable sur tous des domaines, je vous dois un grand respect.

Au service de pathologie de l'Hôpital Lariboisière à Paris:

Je tiens en remercier dans un premier temps madame le Professeur Homa ADLE-BIASSETTE de m'avoir accueilli avec bienveillance dans service et de m'avoir accepté au DIU de pathologie moléculaire. Je tiens spécialement à remercier le Professeur Anne LAVERGNE pour sa grande qualité de pédagogue et ses judicieux conseils sur l'interprétation des biopsies digestives. Je remercie aussi le Docteur Rachid KACI pour son expérience dans le pseudo-myxome péritonéale et au Docteur Françoise CORNELIS pour m'avoir transmis son enseignement et sa rigueur dans la pathologie gynécologique.

Au service de pathologie de l'Hôpital Henri-Mondor à Créteil :

Je tiens à remercier, Madame le Professeur PHILLIPE GAULARD de m'avoir ouvert les portes de son service et de m'avoir fait participer à de merveilleuses séances de lames nocturnes. Je tiens à remercier en particulier le Professeur Nicolas ORTONNE pour son enseignement et de m'avoir transmis la passion pour la dermatopathologie.

Je tiens à remercier également le Professeur Christiane COPIE pour son encadrement et ses explications qui m'ont permis de mieux appréhender la pathologie ganglionnaire avec sérénité.

Je remercie le Professeur Serge SAFRANI pour les séances de lames de pathologie hépatique du jeudi matin qui me terrorisaient tant, ainsi que sa phrase culte « Il faut lire ».

Au service de Pathologie de l'Hôpital Tenon à Paris :

Merci au Professeur Eva COMPERAT de m'avoir accueilli dans son service et de m'avoir transmis son expertise en uropathologie. Je remercie également le reste de l'équipe médicale du service, le docteur Martine ANTOINE pour son expertise de la pathologie thoracique et Fatima pour son enseignement sur la pathologie mammaire. Fatima, je te remercie d'avoir partagé ton bureau avec moi, cela a été un vrai plaisir.

A mes co-internes :

Je remercie l'ensemble de mes co-internes : Isabelle, Alice, Justine, Ioana, Marie, Lucie, Laura, Lida, Pierre, Zineb et Wiame pour leur soutien et leurs conseils. Je vous remercie aussi d'avoir toujours su être bon public à mon humour.

A mes amis :

A Marine, enfin au Docteur Bonneau, tout à commencer au CM1, puis le collègue, puis le lycée, puis la faculté de médecine. Nous avons été le meilleur binôme de tous les temps, merci pour ton soutien tout au long de ses longues années d'étude sans toi cela m'aurait été impossible.

A mes amis du collègue : Justine, Marion, Vincent, Eliott et Geoffrey.

A mes amis du lycée et de médecine : Alice, Morgane, Alexia et Myriam.

Aux copains d'Italie : Anna, Hugo, Mathieu, Adrien, Rose, Romane, Raphael et Romain de m'avoir toujours soutenu pour devenir Docteur Claire.

A mes amis de la faculté de médecine : Eléonore, Laetitia, Ileana, Julie, Hélène et Gaëlle. On a formé un groupe soudé et fort à travers les différentes épreuves des études de médecine. Vous avez été pour moi un vrai soutien. Vous êtes la Team des Zouzs pour la vie.

A la Déglingue, groupe/famille des Antilles, je remercie Elie, Monika, Quentin, Vincent, Sophie, Stéphen, Thomas, Florian, Maxime, Marion, Nathalie, Karine et Jean-Baptiste. Vous avez été pour moi, en Guadeloupe et en Martinique, une vraie famille, on a tout traversé ensemble. « La Déglingue ne meurt jamais ».

A ma famille :**A mes parents :**

Merci de m'avoir couvert d'amour tout au long de ses années, vous avez su m'inculquer le plaisir du travail bien fait, la rigueur, et la volonté de toujours vouloir atteindre mes objectifs sans jamais abandonner ni se décourager.

Merci de me faire confiance jour après jour et j'espère que vous serez toujours fier de moi.

A Papa :

Tu es pour moi un modèle de réussite, de franchise, de rigueur et une grande source d'admiration. Tu m'as transmis l'idée que dans la vie on est toujours des gagnants, que les choses on l'importance qu'on leur donne et 100% des gagnants ont joué. Tu as été là, auprès de moi au concours de P1 et de l'ECN, je te remercie pour m'avoir soutenu et avoir su me donner la confiance en moi nécessaire pour y arriver. L'échec n'est pas une option.

Sur l'ensemble de tes conseils j'ai su saisir chaque chance et chaque opportunité pour arriver à être médecin.

A Maman :

Merci à ma moumoune d'amour, tu as toujours été là pour m'encourager pour faire partie meilleure. Tu as toujours cru en moi et en le fait que j'étais capable de réussir.

Tu es la pierre angulaire de la réussite de ses études de médecine, sans toi je ne serai pas médecin.

Tout a commencé par la récitation des leçons et avec des arrachages de cheveux sur l'orthographe et la grammaire. Puis est venu le temps de médecine, tu t'es trouvée être d'un grand soutien moral (les longues soirées devant miss Swann pour se détendre) et tu as toujours su croire en moi.

Au fil des années tu es devenu une vraie professionnelle des corrections de mémoires et de thèse, sans toi tout cela me serait impossible.

Maintenant tu seras toujours ma meilleure conseillère dans tous les domaines. Tu es indispensable.

A Mathilde :

Merci à la meilleure des sœurs, tu as toujours sur me dire que j'étais la meilleure et qu'il ne faut jamais baisser les bras. Tu m'as toujours soutenu pendant les longues années de médecine en venant avec moi à la BNF, en me disant « ça va le faire ».

Je serai toujours là pour toi, pour te conseiller et te soutenir.

A mon oncle Guy :

Guy-Guy tu m'as transmis la main de la médecine de la famille.

J'espère pouvoir tout comme toi, aider et soigner de nombreuses personnes. Tu es pour moi un exemple.

A mes grands-parents :

Papi, Mami, Nono et Nona merci de tout l'amour et l'éducation que vous m'avez apporté.

Vous m'avez permis de grandir dans une famille soudée et aimante, ce qui m'a permis de devenir qui je suis.

A Wilfrid :

Mon amour, merci de m'avoir soutenu pendant les années de l'internat.

Pour toi rien ne m'est impossible et je ne peux que réussir. Tu sais toujours me rassurer et m'encourager à aller de l'avant.

A tes yeux j'apparais toujours comme la meilleure.

SOMMAIRE

Liste des enseignants	1
Remerciements	8
I) Résumé en Anglais.....	14
II) Résumé en Français.....	15
III) Revue bibliographique.....	16
IV) Contribution au travail de l'auteur.....	23
V) Statut de l'article.....	23
VI) Article en Anglais.....	24
VII) Article en Français.....	46
VIII) Bibliographie.....	70
IX) Imprimatur.....	73
X) Serment d'Hippocrate.....	74

D) RESUME EN ANGLAIS

Kinase fusions targeting therapies have improved the prognosis of many patients with advanced malignancies but they are extremely rare (<1%) in the field of colorectal cancer (CRC) making their diagnosis challenging and often under-investigated. Recently, kinase fusions have been shown to be particularly frequent among MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type CRCs.

In this work, we intended to study the technical and medico-economic feasibility of the detection of rare kinase fusions in CRC using non-next generation sequencing (NGS) methods, easy-to- implement in pathology laboratories without experience in NGS analyses as immunohistochemistry (IHC), fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and fully automated real-time PCR targeted analyses.

Among 84 selected MLH1 deficient (IHC) CRCs cases, first analyses using Idylla™ MSI test, Idylla™ KRAS Mutation Test and Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test permitted to individualize 19 (22.6%) MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type CRC. FISH (and when relevant IHC) analyses searching for *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET* and *NRG1* rearrangements diagnosed 5 *NTRK1*-, 3 *NTRK3*-, 1 *ALK*-, 2 *BRAF*- and 2 *RET*-rearranged tumors (i.e. gene fusions in 13/19 68.4% cases in MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type CRC). *ALK*- and *NTRK1*- rearranged tumors were IHC positive, but pan-TRK IHC was negative in the 3 *NTRK3*-rearranged tumors.

Our study demonstrated the feasibility but also the cost-effectiveness of a multistep but rapid diagnostic strategy based on non-NGS methods to identify rare and targetable kinase fusions in patients with advanced CRC. Cost-effective and easy-to-perform molecular testing strategies could be one key to diagnose rare CRC molecular subtypes candidates to therapeutic innovation.

Keywords: colorectal cancer; microsatellite instability; gene fusions; *NTRK*; immunohistochemistry

II) RESUME EN FRANÇAIS

Les thérapies ciblant les protéines chimériques à activité kinase issues de gènes de fusion ont amélioré le pronostic de nombreux patients atteints de tumeurs malignes avancées, mais elles sont extrêmement rares (<1%) dans le cancer colorectal (CCR), ce qui rend leur diagnostic difficile et souvent sous-investigué. Récemment, ces gènes de fusion se sont révélés particulièrement fréquents parmi les CCRs MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* non muté (de type sauvage).

Dans ce travail, nous étudions la faisabilité technique et médico-économique de la détection de gènes de fusion rares dans le CCR en utilisant des méthodes de séquençage de type non de nouvelle génération (non-NGS), qui seraient faciles à mettre en œuvre dans les laboratoires de pathologie, telles que l'immunohistochimie (IHC), l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) et les analyses ciblées par PCR en temps réel entièrement automatisées (Idylla™).

Parmi 84 cas sélectionnés de CCR avec perte d'expression de MLH1 (IHC), les premières analyses utilisant le test Idylla™ MSI, le test de mutation Idylla™ KRAS et le test de mutation Idylla™ NRAS-BRAF ont permis d'individualiser 19 (22,6%) cas de CCRs MLH1-, MSI-High et *BRAF/KRAS/NRAS* sauvages. Les analyses de FISH et d'IHC à la recherche de réarrangements *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET* et *NRG1* ont diagnostiqués 5 tumeurs réarrangées pour *NTRK1*, 3 pour *NTRK3*, 1 pour *ALK*, 2 pour *BRAF* et 2 pour *RET* (c'est-à-dire la présence de fusions de gènes dans 13/19 soit 68,4%). Les tumeurs réarrangées pour *ALK* et pour *NTRK1* étaient positives, en immunohistochimie pour les protéines correspondantes mais l'IHC pan-TRK était négative dans les 3 tumeurs réarrangées pour *NTRK3*.

Notre étude démontre la faisabilité mais aussi la pertinence médico-économique d'une stratégie de diagnostic rapide en plusieurs étapes, basée sur des méthodes autres que le NGS, pour identifier les gènes de fusion rares mais d'importance théranostique chez les patients atteints de CCR avancé. Des stratégies de test moléculaire rentables et faciles à réaliser pourraient être l'une des clés du diagnostic des sous-types moléculaires rares de CRC candidats à l'innovation thérapeutique.

Mots clés : cancer colorectal ; instabilité des microsatellites ; fusions de gènes ; *NTRK* ; immunohistochimie.

III) REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Le cancer colorectal (CCR) est la quatrième cause de cancer dans le monde avec 1 849 518 nouveaux cas par an en 2018. En France, il est la deuxième cause de cancer chez les femmes et la troisième cause chez les hommes, avec, tout sexe confondu, 29 614 nouveaux cas en 2018. Le cancer colorectal reste de mauvais pronostic, en étant la troisième cause de décès par cancer en France, malgré la présence d'un dépistage national via le test Hemocult II et le développement de nouvelles thérapies ciblées (i.e. anti-EGFR, anti-HER2, anti BRAF et récemment anti-TRK) et immunothérapie par inhibiteurs de checkpoints immunitaires anti-PD1/PDL1, [1, 2].

Le cancer du côlon est l'un des premiers cancers solides dont le profil moléculaire a été décrit. En effet la carcinogénèse du cancer du côlon résulte en une accumulation d'évènements génétiques au niveau des oncogènes (ex : *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* et *PI3K*) en association avec des mutations des gènes suppresseurs de tumeur (ex : *APC*, *TP53*, *SMAD4* ou *PTEN*). L'ensemble de ses altérations génétiques va entraîner une activation dérégulée des voies de signalisation intracellulaire telle que WNT- β -caténine, la voie TGF β (*transforming growth factor beta*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et la voie PI3K (*phoinoside 3-kinase*) favorisant la croissance, la survie et la prolifération cellulaire [3].

Ainsi les cancers du côlon apparaissent comme un groupe de maladie hétérogène. Un consortium international d'experts a récemment permis de dégager, à partir de classifications moléculaires et plus de 4000 patients, 4 sous-types de cancer colo-rectaux. Il s'agit de la classification CMS (*consensus molecular subtypes*) qui a permis de mettre en évidence 4 groupes définis par leur facteurs moléculaires, biologiques et cliniques. A noter cependant que 21% des CCR n'appartiennent à aucun de ces 4 groupes. Le premier groupe, CMS-1, est dit microsatellite instable (MSI) immun et représente 13% des cancers du côlon ; il correspond à des tumeurs avec une instabilité microsatellitaire (MSI High) associée à un infiltrat lymphocytaire marqué et souvent associé à un phénotype hyper-méthylateur et à des mutations *BRAF*. Ils sont de localisation colique droite et de bon pronostic en l'absence de métastase mais de mauvais pronostic en cas d'évolution métastatique. Le groupe CMS-2, dit de type canonique, représente 35% des CCR, plus souvent colique gauche, sans instabilité des microsatellites (MMS) mais avec de nombreuses altérations génétiques somatiques entraînant

la surexpression de EGRF et fréquemment l'activation de la voie WNT/MYC, avec un pronostic intermédiaire. Le groupe CMS-3, métabolique, qui représente 11% des CCRs, correspond à des CCRs MSS dans 90% des cas associés à des mutations de la famille *RAS*. Ils sont répartis de manière homogène entre le colon droit et le colon gauche et leur pronostic est intermédiaire. Enfin, le groupe CMS-4, dit type mésenchymateux, représente 20% des cas de CCR et comporte de nombreuses altérations somatiques, une activation du TGF β et de l'angiogenèse avec une localisation colique gauche avec un mauvais pronostic quand le cancer est à un stade métastatique [4].

L'utilisation de la classification CMS n'est actuellement pas utilisée en routine car elle nécessite d'analyser des mutations sur plus de 80 gènes. Seul l'examen d'un nombre restreint de gènes est à ce jour requis pour orienter les choix thérapeutiques chez les patients atteints de CCR : la recherche de mutation sur les exons 2, 3 et 4 de *KRAS* et *NRAS* (la présence de mutation sur les gènes *RAS* entraîne une résistance au traitement par anti-EGFR), la recherche de mutation *BRAF V600* (de valeur pronostique péjorative dans les CCR MSI-High), et, parfois d'autres cibles thérapeutiques potentielles telles que, la recherche de mutations de *PI3K* ou d'amplification du gène *HER2* [1,4,5].

Ainsi la caractérisation moléculaire d'un nombre restreint de gènes au sein des prélèvements tumoraux de CCRs permet de mieux apprécier leur pronostic et d'orienter la stratégie thérapeutique pour les patients de stades avancés.

Nous allons dans cette étude nous intéresser exclusivement aux CCRs présentant un statut MSI high. L'instabilité des microsatellites (MSI) est un marqueur moléculaire de la déficience du système de réparation des défauts de mésappariement (MMR), qui a pour rôle de reconnaître et de réparer les erreurs d'insertion, de suppression et de mauvaise incorporation des bases qui peuvent survenir lors de la réplication de l'ADN. Les altérations moléculaires des gènes MMR humains, dont les principaux sont *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2*, sont associés à une perte de fonction/d'expression des protéines correspondantes, elle-même responsable d'une instabilité génétique avec accumulation de mutations. Environ 15% des carcinomes colorectaux ont un statut de MSI, dont 5% sont causés par une mutation germinale d'un gène du système MMR (syndrome de Lynch). Une étude récente a montré que la méthylation de l'ADN sur les cytosines au niveau du promoteur du gène *MLH1* entraînait ainsi une inactivation épigénétique de

l'expression du gène responsable de la perte d'expression protéique de MLH1 dans plus de 80% des cancers colorectaux sporadiques ayant un statut de MSI high [4-6].

Les cancers avec un statut MSI high, présentent un bon pronostic initialement mais dès le stade métastatique atteint ils sont alors de très mauvais pronostic. Ils présentent une résistance à la chimiothérapie par 5FU en adjuvant mais, de par leurs caractéristiques hautement immunogènes et riches en infiltrat inflammatoire lymphocytaire, ces tumeurs sont d'excellentes candidates à l'immunothérapie par inhibiteurs de checkpoints immunitaires anti-PD1/PDL1 [4].

Le diagnostic du statut proficient ou déficient du système de réparation des mésappariements (pMMR ou dMMR) est d'autant plus important à connaître désormais qu'en mai 2017, la Food Drug Administration (FDA) a approuvé le pembrolizumab, une immunothérapie anti-PD1, pour les patients présentant un statut d'instabilité microsatellitaire (MSI-High), peu importe le type tumoral concerné [7].

L'hyperméthylation du promoteur de la MLH1 (*MLH1ph*) est associée à une mutation de BRAF V600E dans 50% des cas ou associée à une mutation de KRAS dans 30% des cas. Ainsi 20% des cancers colorectaux avec méthylation de la MLH1 sont sans mutation driver connue. Cocco *et al.* ont récemment rapporté que pour les CCR avec une *MLH1ph* et avec un statut de type sauvage *BRAF/KRAS/NRAS*, 42% présentent des gènes de fusion codant pour des protéines chimériques à activité kinase. [5].

La formation d'un tel gène de fusion correspond un à réarrangement chromosomique entre deux gènes dont un, codant pour une protéine kinase, voit dans le réarrangement non seulement une préservation de sa partie codant pour une protéine à activité kinase, mais également un mécanisme de ré/sur-expression et activation/dimérisation protéique accrues apporté par le gène partenaire. Les protéines chimériques qui en résultent sont des driveurs oncogéniques bien caractérisés dans diverses localisations tumorales. L'identification d'un gène de fusion peut être un élément de diagnostic ou être un biomarqueur prédictif de la réponse à une thérapie ciblée. En effet l'activité kinase de la protéine chimérique et son effet oncogénique peut parfois être ciblée par une thérapie ciblée de type inhibiteur de kinase (TKI) [8].

Ces gènes de fusion peuvent être mis en évidence par différentes approches diagnostiques moléculaires : on peut ainsi mettre en évidence la fusion des deux gènes par la technique de FISH (hybridation *in situ* fluorescente) sur une coupe de tissu tumoral, ou par la technologie NGS (séquençage nouvelle génération) avec un panel spécifique pour les mutations de fusion de kinases, sur ADN ou préférentiellement sur ARN extrait du tissu tumoral. Il est également

possible de mettre en évidence la protéine chimérique elle-même par une technique d'immunochimie (IHC) [8].

Les études MSK-IMPACT (*Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets*) et l'étude Archer NGS en 2015 et 2017 ont mis en évidence de nombreux gènes de fusions. Cocco *et al*, avec l'aide des deux études citées précédemment, ont souligné que, la présence de 21 cas de CCRs avec des gènes de fusion sur les 2314 cas de CCR analysés. Dans les CCRs les gènes de fusion intéressaient les gènes *NTRK1* (6 cas), *NTRK3* (2 cas), *BRAF* (5 cas), *RET* (4 cas), *FGFR2*(1 cas), *FGFR3*(1 cas), *ALK* (1 cas) et *ROSI*(1 cas) et survenaient pour moitié d'entre eux dans la faible proportion de CCR de type MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type [5]. La mise en évidence de ces gènes de fusion permet d'envisager de nouvelles orientations thérapeutiques.

Les gènes de la famille *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2* et *NTRK3*) codent respectivement pour les protéines TRKA, TRKB et TRKC. Ces protéines font partie de la famille des récepteurs kinases de la tropomyosine, ces récepteurs ont une haute affinité pour les facteurs de croissance tel que le NGF (nerve growth factor), le BDNF (brain derived neurotropic factor) ou encore le NT-3 (neurotrophin-3). Les récepteurs TRK ont une activité kinase favorisant la prolifération cellulaire, la différenciation et la survie cellulaire à l'aide des voie de signalisation RAS, la voie de la phospholipase-C ou encore la voie PI3K. La présence de gènes de fusion *NTRK* a été décrite initialement dans les glioblastomes pédiatriques et non pédiatriques puis dans divers cancers dont des cancers colorectaux (1.2%) et conditionne depuis 2019 l'accès à des thérapies ciblées anti-TRK dans le cadre d'ATU/AMM.[1,9].

Les réarrangements au niveau du gène *ALK* ont été décrit pour la première fois dans les lymphomes anaplasiques, puis ont été découverts dans d'autre localisations. La plus connue est celle du poumon (3 à 10% des adénocarcinomes) mais les réarrangements de *ALK* sont aussi décrits dans certains cancers du rein, sein, œsophage, thyroïde, ovaire ou de vessie. Les réarrangements d'*ALK* sont rares dans le colon (0.2%). La fusion du gène *ALK* va entraîner une activation constitutive de sa fonction tyrosine kinase et favoriser la prolifération cellulaire via la voie des MAP kinase, STAT3 ou encore PI3K. Il a été décrit que les CCRs MSI high associés à des réarrangements de *AKL* sont de pronostic plus péjoratif et sont souvent de phénotype adénocarcinome mucineux. La présence de cette mutation permet un traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) tels que le ceritinib ou le crizotinib, sans ATU/ATM dans les CCRs toutefois à ce jour [10].

RET est un récepteur tyrosine kinase sensible au GDNF (glial derived neuropeptid factor), Le réarrangement de *RET* a été mis en évidence particulièrement dans les carcinomes papillaires de la thyroïde ou des adénocarcinomes du poumon (2%) avec un traitement ciblé tel que le sunitinib ou, sorafenib ou encore le carbozantinib faisant l'objet d'études cliniques. Les réarrangements de *RET* dans 1 à 2% des CCRs seraient un marqueur de mauvais pronostic [11,12]. Dans les CCR, il n'y a pas à ce jour de traitement anti-RET bénéficiant d'une ATU/AMM.

Les fusions du gène *BRAF* entraînent une activation de la voie des MAPK et ont récemment été découvertes dans le CCR auquel elles confèrent une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR. Ces mutations sont rares dans les cancers solides tout confondus avec une fréquence de 0.2 à 3% [13].

ROS1 code pour un récepteur tyrosine kinase est fait partie de la famille des proto-oncogène (de type *V-Ros UR2 sarcoma virus oncogène homolog*). Ce récepteur présente de très nombreuses homologues avec la protéine codée par le gène *ALK*. Les gènes de fusions impliquant *ROS1* ont été décrits pour la première fois dans les adénocarcinomes du poumon. Leur fréquence est très faible dans les CCRs (0.8%). La présence de cette mutation serait prédictive d'une réponse au TKI sans ATU/AMM dans le CCR à ce jour [14].

Devant la signification prédictive avérée ou à venir de ces différents gènes de fusion, leur mise en évidence dans les prélèvements tumoraux peut être importante pour l'orientation thérapeutique d'un patient atteint de CCR de stade avancé. Le pathologiste a ainsi un rôle de plus en plus important dans l'orientation de la stratégie thérapeutique des patients. Il permet de renseigner le clinicien sur le type histologique de la tumeur, sur son stade TNM, sur son pronostic ou mais également désormais sur la sensibilité ou résistance à certains traitements (ex : TKI ou résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase). Pour accéder à ces nouveaux paramètres prédictifs, il existe différentes approches diagnostiques, morphologique ou sur extrait tissulaires, recherchant les gènes de fusions ou leurs conséquences au niveau chromosomique, ADN, ARN ou protéique, chaque méthode ayant ses propres avantages et performances. Il appartient ainsi au pathologiste de mettre en œuvre de façon rationnelle ces différentes méthodes d'analyse pour être à même de fournir un compte rendu aussi complet que possible et surtout pertinent pour la prise en charge des patients, aussi bien sous l'angle du diagnostic, du pronostic que du théranostic.

L'objectif de notre étude est de tester la faisabilité de la détection de gènes de fusion impliquant les gènes *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *BRAF*, *RET*, *NGR1*, *ALK* et *ROS1*, dans les CRCs en utilisant des techniques simples permettant un test interne simple dans les laboratoires de pathologie ne bénéficiant pas de plateau technique spécialisé en biologie moléculaire en combinant l'immunochimie, la FISH et des tests de diagnostic mutationnel entièrement automatisés.

BIBLIOGRAPHIE :

1. DeStefanis RA, Kratz JD, Emmerich PB, Deming DA. Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Current Standards and Novel Agents in Review. *Curr Colorectal Cancer Rep.* avr 2019;15(2):61-9.
2. Cancer today [Internet]. Disponible sur: <http://gco.iarc.fr/today/home>
3. Dienstmann R, Salazar R, Taberero J. Molecular Subtypes and the Evolution of Treatment Decisions in Metastatic Colorectal Cancer. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 23 mai 2018;38:231-8.
4. Cancer du côlon : classifications moléculaires et anatomiques nécessaires à la décision thérapeutique – FMC-HGE [Internet]. [cité 22 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.fmcgastro.org/texte-postu/postu-2018-paris/cancer-du-colon-classifications-moleculaires-et-anatomiques-necessaires-a-la-decision-therapeutique/>
5. Cocco E, Benhamida J, Middha S, Zehir A, Mullaney K, Shia J, et al. Colorectal Carcinomas Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Res.* 15 2019;79(6):1047-53
6. Ma Y, Chen Y, Petersen I. Expression and promoter DNA methylation of MLH1 in colorectal cancer and lung cancer. *Pathol Res Pract.* avr 2017;213(4):333-8.
7. Boyiadzis MM, Kirkwood JM, Marshall JL, Pritchard CC, Azad NS, Gulley JL. Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *J Immunother Cancer.* 14 2018;6(1):35
8. Détection des gènes de fusion en oncologie moléculaire : nouvelles technologies et enjeux thérapeutiques [Internet]. Disponible sur: <https://www.edimark.fr/correspondances-onco-theranostic/detection-genes-fusion-oncologie-moleculaire-nouvelles-technologies-enjeux-theranostiques>
9. Khotskaya YB, Holla VR, Farago AF, Mills Shaw KR, Meric-Bernstam F, Hong DS. Targeting TRK family proteins in cancer. *Pharmacol Ther.* mai 2017;173:58-66
10. Yakirevich E, Resnick MB, Mangray S, Wheeler M, Jackson CL, Lombardo KA, et al. Oncogenic ALK Fusion in Rare and Aggressive Subtype of Colorectal Adenocarcinoma as a Potential Therapeutic Target. *Clin Cancer Res.* 01 2016;22(15):3831-40.
11. Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Schrock AB, Lee J, Morano F, Fuca G, et al. RET fusions in a small subset of advanced colorectal cancers at risk of being neglected. *Ann Oncol.* 01 2018;29(6):1394-401.

12. Kim SY, Oh SO, Kim K, Lee J, Kang S, Kim K-M, et al. NCOA4-RET fusion in colorectal cancer: Therapeutic challenge using patient-derived tumor cell lines. *J Cancer*. 2018;9(17):3032-7.
13. Stangl C, Post JB, van Roosmalen MJ, Hami N, Verlaan-Klink I, Vos HR, et al. Diverse BRAF Gene Fusions Confer Resistance to EGFR-Targeted Therapy via Differential Modulation of BRAF Activity. *Mol Cancer Res*. 7 janv 2020;
14. Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, Le AT, Haney J, Schulte N, et al. ROS1 and ALK fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. *Mol Cancer Res*. janv 2014;12(1):111-8

IV) CONTRIBUTION AU TRAVAIL DE L'AUTEUR

A. Uguen et moi-même avons conçu l'étude ; L.Samaison, M. Cariou, L. Doucet, A. Uguen et moi-même avons collecté les échantillons et les données anatomo-cliniques associées, L.Samaison a effectué les analyses moléculaire sur le système IdyllaTM; A. Uguen et moi-même avons effectué les analyse d'hybridation *in situ* par fluorescence

V) STATUT DE L'ARTICLE

Formaté pour la revue HUMAN PATHOLOGY (Elsevier, impact factor : 2.740) en vue d'une prochaine soumission

VI) ARTICLE EN ANGLAIS

Title: More than half of MLH1-, MSI-High, *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type colorectal cancers harbor targetable oncogenic gene fusions requiring an extension of molecular testing for relevant therapeutic choices

Running head: Kinase fusions diagnosis in colorectal cancer

Introduction

Microsatellite instability (MSI) is a molecular marker of the deficient mismatch repair (MMR) system that occurs in about 15% of colorectal cancers (CRCs). Sporadic MSI-High cases consist in about two-thirds of MSI-High CRCs and are related to epigenetic inactivation of the *MLH1* gene (methylation of the promoter of *MLH1*). Other MSI-High CRCs are associated with Lynch syndrome, related to a germline mutation of one of the MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*). Whereas early-stage MSI-High CRCs are of better prognosis than MSS (Microsatellite Stable) ones, in metastatic disease, MSI-High status seems to confer a negative prognosis. Albeit still debated with contradictory results in the literature, it is suggested a possible resistance to 5-FU in MSI-High CRCs [1]. Recently, further interest was given to MSI-High CRCs because of their responsiveness to anti-PD-1 immunotherapy [2;3]. Indeed, the higher mutational load in MSI-High CRCs can elicit an endogenous immune anti-tumor response, counterbalanced by the expression of immune inhibitory signals, such as PD-1 or PD-L1, that resist to tumor elimination. Independently of any PD-L1 expression, MSI-High CRC is a model of cancer that is particularly responsive to anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy [4]. In May 2017, the FDA has approved the pembrolizumab anti-PD-1 immunotherapy in the treatment of pediatric and adult patients with MSI-High cancers including CRC independently of any PD-L1 testing [2;3;5;6].

More recently, novel therapeutic opportunities have been pointed in a subset of MSI-High CRC that harbors frequent kinase fusions. Indeed, in a total of 21 CRCs with kinase fusions (6 *NTRK1*, 2 *NTRK3*, 5 *BRAF*, 4 *RET*, 1 *FGFR2*, 1 *FGFR3*, 1 *ROS1* and 1 *ALK*) among 2314 tested CRCs (i.e. 0.9% of CRCs with kinase fusions), Cocco et al. have reported that all kinase fusions (100%) occurred in *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type tumors and that 12 (57%) cases were MSI-High, all with a loss of *MLH1* and *PMS2* and, for 10 (47.6%) cases, with a hypermethylation of the promoter of *MLH1*. In their study, Cocco et al. reported that the frequency of kinase fusions among *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type and *MLH1*-deficient MSI-

High CRCs with hypermethylation of *MLH1* promoter (i.e. sporadic - non Lynch MSI-High CRCs with loss of MLH1 that consist only in 2% of the CRC in their study) can reach 42% [7].

Given the well-demonstrated therapeutic effects of anti-ALK and anti-ROS1 therapies in non-small-cell lung cancers but also in other tumor subtypes, reports of response to MEK inhibition in cancers with *BRAF* fusion and the recent approval of anti-TRK therapies for *NTRK*-rearranged tumors independently of their histological type, added to in-development/trials strategies targeting chimerical proteins, the detection of kinase fusions could become important for current and future treatment choices in patients with advanced CRCs [8-15].

Beyond large gene panels-based molecular analyses comprising gene fusions analyses as those reported in the study by Cocco et al., for different workflow, technical and medico-economic reasons, and because gene fusions testing is actually outside of CRC-dedicated guidelines, genetic testing in CRC is often restricted to *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutational analyses and MSI/MSS testing for prognostic and theranostic purposes [16-18]. Potential access to the new therapeutic opportunities offered by kinase fusions targeting therapies would in this manner require additional testing. On the basis of the results of these recommended markers, it could be notably feasible to prioritize kinase fusions testing in the subset of *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type and MLH1-deficient MSI-High CRCs. In addition, kinase fusion detection could be assessed by morphological *in situ* analyses as fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with appropriate probes with no need of systematic complex and often outsourced additional genetics analyses.

In this study, we intend to test the feasibility but also the cost-effectiveness of the detection of kinase fusions CRCs using simple tests permitting a simple in-house testing in pathology laboratories by combining immunohistochemistry (IHC), FISH and fully automated real-time DNA-based reaction tests.

Materials and methods

Cases studied

The cases included in this study were patients with CRC analyzed in the Finistère between January, 2015 and May, 2019 who were diagnosed with a loss of expression of the MLH1 protein for diagnostic, prognostic and theranostic purposes. Formalin fixed paraffin-

embedded tumor samples were selected for the pursue of molecular analyses. The present study was conducted following our national and institutional guidelines. All samples were included in a registered tumor tissue collection and the present study was conducted in compliance with the Helsinki Declaration and after approval by our institutional review board (CHRU Brest, CPP n° DC – 2008 – 214).

Microsatellite instability, BRAF, KRAS and NRAS testing

Microsatellite instability, *BRAF*, *KRAS* and *NRAS* analyses were performed using the fully-automated Idylla™ platform (Biocartis, Mechelen, Belgium) for each case as in previous studies [19;20]. The proportion of tumor cells was established on each sample by a pathologist on a dedicated 3- μ m-thick haematoxylin-eosin-saffron (HES) stained tissue slide. Serial 10 μ m tissue sections were produced for molecular analyses. Serial 10 μ m tissue sections were produced for molecular analyses with the three cartridges Idylla™ MSI Assay, Idylla™ *NRAS-BRAF* Mutation Test and Idylla™ *KRAS* Mutation Test (Biocartis). Tissue sections (1 per cartridge) were transferred in each Idylla™ cartridge itself inserted in the instrument. Inside the cartridge, the sample was homogenized and cells lysed using a combination of high-intensity-focused ultrasound, enzymatic/chemical digestion and heat. The nucleic acids were liberated and ready for subsequent PCR amplification. The PCR was real time and used a fluorophore-based detection system. After 120 min (*NRAS-BRAF* and *KRAS* tests) to 150 min run (MSI assay), all steps were automatically performed inside the cartridges and final reports were directly available on the system after an automatic on-board post-PCR curve analysis. These final reports contained the final result in terms of "MSS" or "MSI-High" or the name of the mutation(s) of *KRAS*, *NRAS* or/and *BRAF* if any detected by the different cartridges as detailed in a previous review [20].

Kinase fusions testing using fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry

Cases which were MSI-High with loss of MLH1 expression and a *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type status were tested for kinase fusions using FISH. Pan-TRK, ALK and ROS1 IHC were performed in the 84 samples..

About IHC analyses, pan-TRK (clones EPR17341, 6 μ g/mL dilution, Abcam, Cambridge, MA and clone A7H6R, 1:50 dilution, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), ALK (clone 5A4, dilution 1:25, Clinisciences, Nanterre, France) and ROS1 (clone D4D6,

dilution 1:50, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) immunohistochemistry (IHC) tests were performed using Ventana Benchmark Ultra® automated slide preparation system with OptiView DAB IHC Detection Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) as reported in previous studies [21;22]. The staining intensity was quoted as follows: 0: no staining; 1+: weak staining; 2+ moderate staining; 3+ strong staining, The percentage of positive tumor cells was also noted. No IHC testing was performed about BRAF, RET and NRG1 as none has shown to be relevant to date searching the corresponding rearrangements.

About FISH, the analyses were performed for every samples with the different following probes: *ZytoLight SPEC BRAF Dual Color Break Apart*, *ZytoLight SPEC RET Dual Color Break Apart*, *ZytoLight SPEC NRG1 Dual Color Break Apart*, *ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart*, *ZytoLight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart*, and *ZytoLight SPEC NTRK3 Dual Color Break Apart Probes* (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany) and the *Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart Rearrangement* and *Vysis 6q22 ROS1 Break Apart FISH Probes* (Abbott Molecular, Rungis, France) on 3µm tissue sections with a Dako Histology FISH Accessory kit following the manufacturer's instructions. FISH slides were read using an epifluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) at ×1,000 magnification with DAPI, green™, red and double green-plus-red filters. The microscope was connected to a charge-coupled device camera and a software (In Situ Imaging System version 5.3; MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim, Germany) for analyzing fluorescent signals. A rearrangement was concluded if at least 15% of 100 tumor nuclei contained rearranged signals (i.e. single 3' or split signals) [21-23].

Cost-effectiveness analysis of different testing strategies from a French healthcare point of view

We simulated the costs of analyzing 1,000 CRC samples using different strategies based on 1) the tests required for therapeutic choices given the current approved (not in trials) treatments (i.e. *KRAS*, *NRAS*, *BRAF* mutation testing, MSI testing and also *NTRK1/2/3* testing); 2) the prices of molecular tests used in France: €882.9 for a <20kb coverage gene-panel DNA based -NGS analysis, €882.9 for the minimal gene-panel RNA based-NGS analysis, €162 for MSI testing, €553.5 for *KRAS-NRAS-BRAF* restricted analyses, €95.2 for a FISH analysis and 56€ for an IHC analysis (using 1 or 2 antibodies) [24-26]. We compared the costs of 1) DNA- and RNA-based NGS and MSI testing for every samples; 2) first line DNA-based NGS and

MSI testing followed by RNA based-NGS analysis in cases with MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status; 3) first line DNA-based NGS and MSI testing followed by *NTRK1, NTRK2, NTRK3* FISH tests in cases with MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status; 4) first line DNA-based NGS and MSI testing followed by pan-TRK-IHC and *NTRK1, NTRK2, NTRK3* FISH tests in cases with MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status; 5) first line *KRAS-NRAS-BRAF* restricted non-NGS analyses and MSI testing followed by pan-TRK-IHC and *NTRK1, NTRK2, NTRK3* FISH tests in cases with MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status; 6) first line *KRAS-NRAS-BRAF* restricted non-NGS analyses, MSI testing and pan-TRK-IHC in cases with *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status or pan-TRK-IHC plus *NTRK1, NTRK2, NTRK3* FISH tests in cases with MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type status.

Results

Cases studied

Samples of 84 patients (26 men and 58 women of mean age of 69.4 years, range from 45 years to 95 years) with a CRC harboring a loss of expression of the MLH1 protein were included in the study. The vast majority of tumors involved the right colon (71 cases, 84,5%). Every CRC were adenocarcinoma with good (22, 26.2%) , moderate (41,48.8%) or poor (21, 25%) differentiation. A mucinous component was reported in 31 (36.9%) cases. Nodal metastases were diagnosed in 24 (28.6%) cases. (Table I and Supplementary Table I for details).

Cases	Gender (F/H)	Age (years)	Tumor site	Tumor grade	T stage	N stage	Mucinous part	% of tumor cells	MSI test	<i>BRAF</i> test	<i>NRAS</i> test	<i>KRAS</i> test	Pan-TRK EPR 17341 IHC	Pan-TRK A7H6R IHC	ALK IHC	Gene fusions results using FISH tests (% of positive tumor nuclei)
#66	F	80	Left colon	Well	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	2+ (70%)	2+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (80%)
#67	F	85	Right colon	Well	NA	NA	Yes	90	MSI-High	no	no	no	2+ (100%)	2+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (70%)
#68	F	59	Transverse colon	Moderate	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	3+ (100)	3+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (80%)
#69	M	52	Left colon	Well	T4	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	1+ (100%)	1+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (60%)
#70	F	68	Transverse colon	Moderate	T3	N0	Yes	90	MSI-High	no	no	no	3+ (100%)	3+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (90%)
#71	F	66	Right colon	Moderate	T3	N2a	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>NTRK3</i> (95%)
#72	F	64	Right colon	Moderate	T3	N2a	Yes	70	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>NTRK3</i> (100%)
#73	M	56	Right colon	Moderate	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>NTRK3</i> (95%)
#74	M	68	Left colon	Moderate	NA	NA	no	30	MSI-High	no	no	no	0	0	3+ (100%)	<i>ALK</i> (80%)
#75	F	95	Right colon	Moderate	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>BRAF</i> (40%)

#76	F	56	Right colon	Well	T3	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>BRAF</i> (100%)
#77	M	69	Right colon	Poor	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>RET</i> (30%)
#78	F	56	Transverse colon	Poor	T4a	N2a	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	<i>RET</i> (95%)
#79	F	79	Right colon	Moderate	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#80	M	45	Transverse colon	Moderate	T3	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#81	M	75	Left colon	Well	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#82	F	75	Right colon	Moderate	T3	N0	no	50	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#83	F	64	Right colon	Poor	NA	NA	no	10	MSI-High*	no	no	no	0	0	0	No
#84	M	57	Right colon	Well	NA	NA	no	10	MSI-High*	no	no	no	0	0	0	No

Table 1. Summary of clinical, pathological and molecular data of the 19 MSI-High MLH1- *BRAF/KRAS/NRAS* wild-type CRC cases.

F: female; M: man; IHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescent in situ hybridization; NA: data not available; MSI: microsatellite instable ; *: samples initially diagnosed without MSI but confirmed to be MSI using new analyses on macrodissected tumor cells ; Well: well-differentiated; Moderate: moderately differentiated; Poor: poorly-differentiated. *MSI-High, BRAF, KRAS and NRAS testing*

MSI-High, BRAF, KRAS and NRAS testing

Idylla™ MSI Assay concluded in a MSI-High status for 84/84 (100%) cases. Of note, for 3 cases (cases #20, #83 and #84), first analyses without macrodissection of tumor area had resulted in MSS status because of a poor percentage of tumor cells within the samples (<10% of tumor cells within the tissue sections; nevertheless, new analyses focusing on macrodissected tumor areas permitted to confirm the diagnosis of MSI-High status.

Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test and Idylla™ KRAS Mutation Test diagnosed 55 (65.5%) *BRAFV600* mutations, 11 (13.1%) *KRAS* mutations and 2 (2.4%) *NRAS* mutations. Of note, 3 samples (cases #53, #54, #55) had concomitant *RAS* (1 *KRAS*, 2 *NRAS*) and *BRAFV600*

Idylla™ tests resulted in contributive molecular analyses in the 84 (100%) tumor samples, with no invalid analysis and permitted to diagnose 19 (22.6%) cases MSI-High with loss of MLH1 expression and a *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type status. (Table I and Supplementary Table I for details)

Kinase fusions testing

FISH analyses were performed in the 19 cases with MSI-High with loss of MLH1 expression and a *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type status. FISH analyses diagnosed 5 (5.9%) *NTRK1*-rearranged tumors (cases #66, #67, #68, #69 and #70), 3 (3.6%) *NTRK3*-rearranged tumors (cases #71, #72 and #73), 2 (2.4%) *BRAF*-rearranged tumors (cases #75 and #76), 2 (2.4%) *RET*-rearranged tumors (cases #77 and #78), 1 (1.2%) *ALK*-rearranged tumor (case #74) resulting in 13/19 (68.4%) cases with MSI-High with loss of MLH1 expression and a *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type status with identified genes fusions. No *NTRK2*, *ROS1* or *NRG1* rearrangement was diagnosed.

ALK, ROS1 and EPR17341 and A7H6R pan-TRK IHC tests were performed for the 84 tumor samples. ALK IHC was only positive (score 3+) in the *ALK*-rearranged tumor with no staining in the remaining 83 cases. ROS1 IHC was negative (score 0) for the 84 tumors. Pan-TRK IHC was positive with similar intensities and cellular staining patterns in the 5 *NTRK1*-rearranged tumors but was negative in the 3 *NTRK3*-rearranged tumors as well as in other cases with other gene fusions, *RAS-BRAF* mutations or no mutation/rearrangement identified. (Table I and Supplementary Table I for details and Figures 1 and 2).

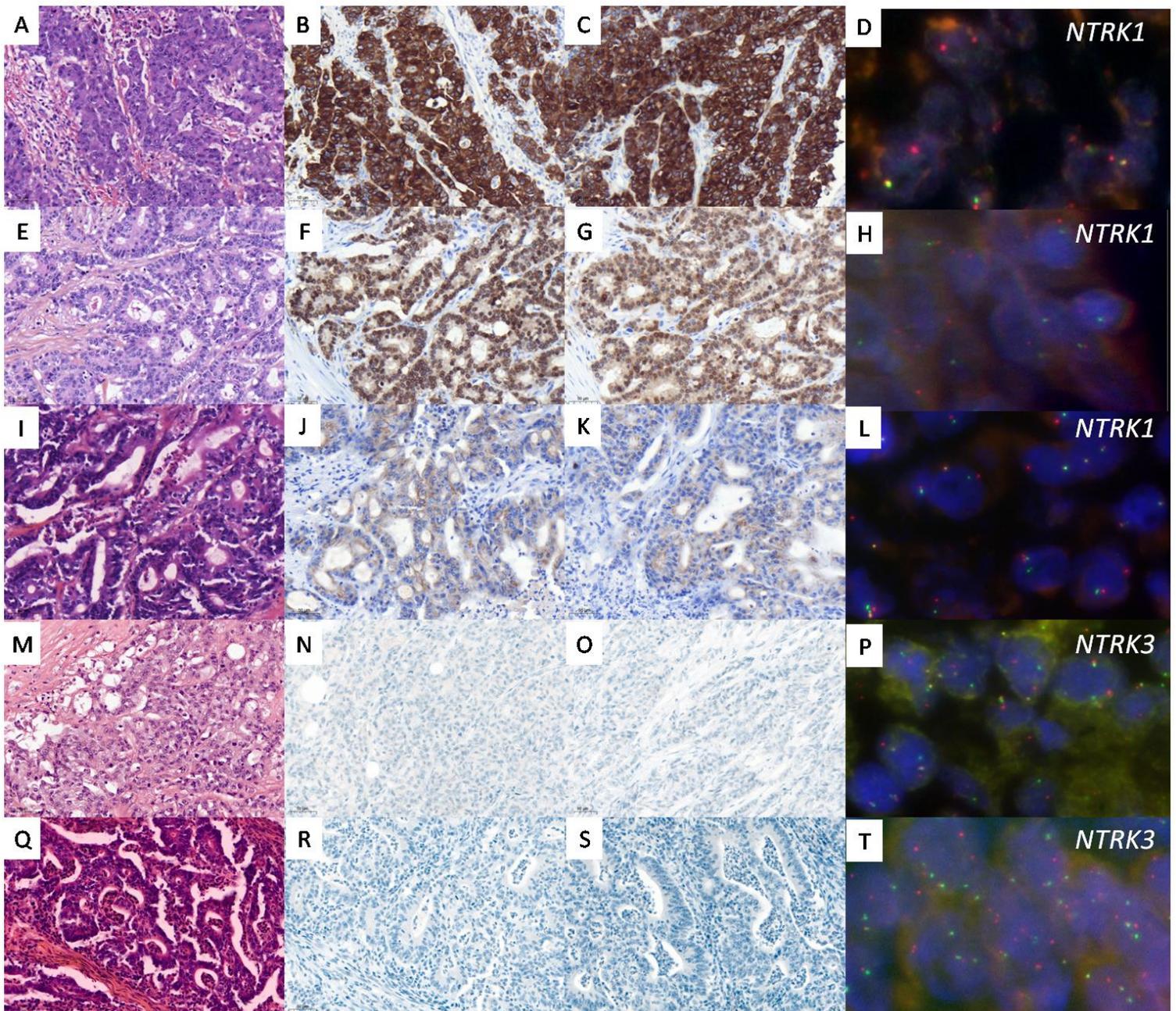


Figure 1: Examples of *NTRK*-rearranged colorectal cancers: 3 *NTRK1*-rearranged tumors (cases #68, #70 and #66 from up to bottom) and 2 *NTRK3*-rearranged tumors (cases #71 and #73 from up to bottom) (A, E, I, M, Q: hematoxylin-eosin-saffron, x20 magnification; B, F, J, N, R: A7H6R pan-TRK immunohistochemistry, C, G, K, O, S: and EPR17341 pan-TRK immunohistochemistry, x20 magnification, hematoxylin counterstaining; D, H, L, P, T: FISH results with *NTRK1* and *NTRK3* ZytoVision GmbH break apart probes, x 100 magnification, DAPI counterstaining).

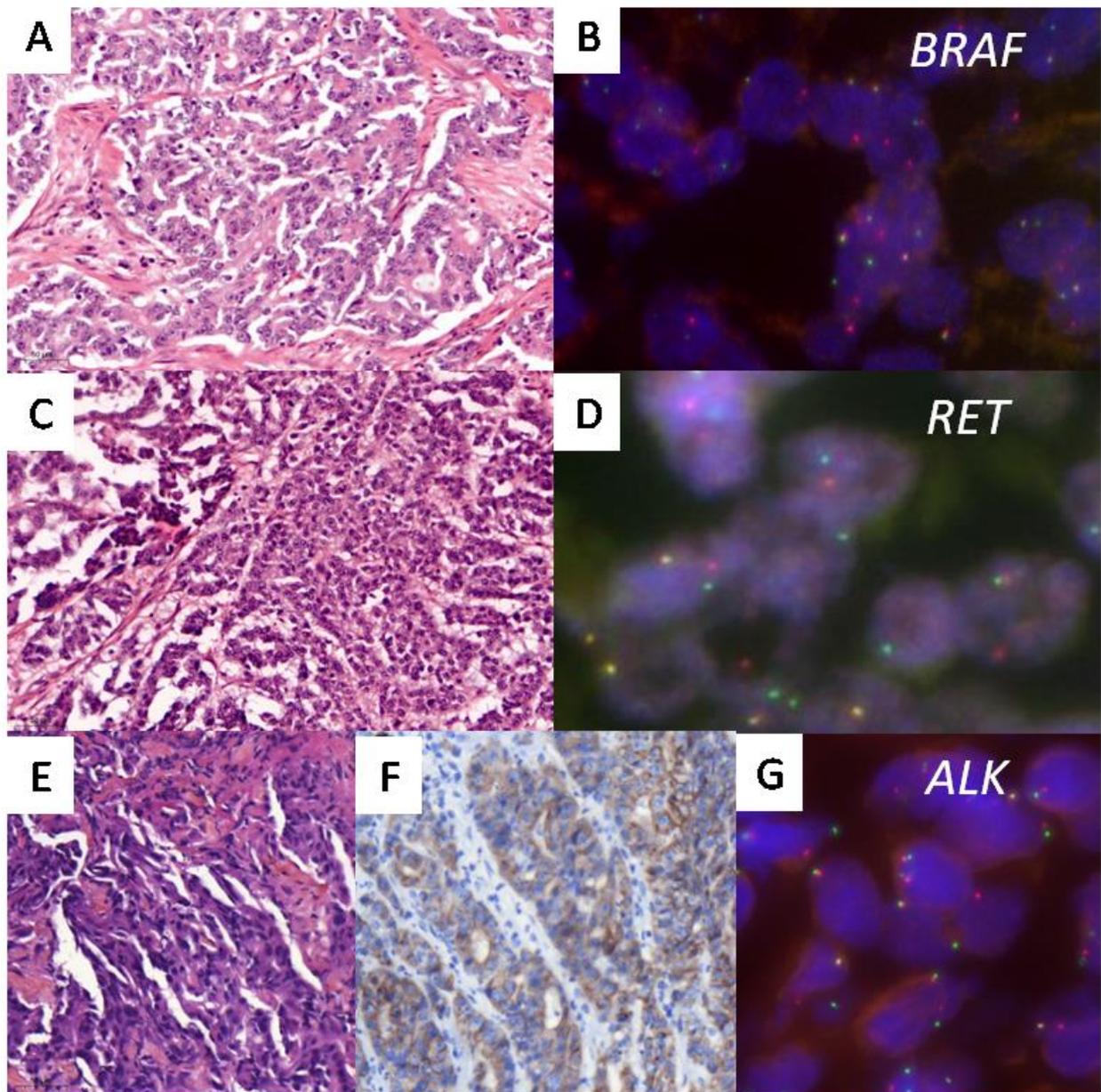


Figure 2: Examples of 1 *BRAF*- (case #76), 1 *RET*- (case #77) and 1 *ALK*-rearranged (case #74) colorectal cancers (A, C, E: hematoxylin-eosin-saffron, x20 magnification; B, D, F: FISH results with ZytoVision GmbH break apart probes for *BRAF* and *RET* and Vysis Abbott Molecular break apart probe for *ALK*, x 100 magnification, DAPI counterstaining; F *ALK* immunohistochemistry, clone 5A4, x20 magnification, hematoxylin counterstaining).

Cost-effectiveness analysis of different testing strategies from a French healthcare point of view

In a previous large study about 2,314 CRC, Cocco et al. diagnosed 230 (9.9%) MSI-High CRC including 74 (3.2%) *BRAFV600E*, 83 (3.6%) *KRAS*, 2 (0.08%) *NRAS* mutants and 71 (3%) of MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type comprising 47/71 (66%) of MLH1-tumors (i.e. 47/2314 2% of MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type CRCs). This subgroup of MLH1- MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type CRCs contains 7 of the 8 *NTRK*-rearranged CRCs in their study (1 CRC was MSS) [7]. Among MSS CRCs (90% of CRCs in Cocco et al.), the frequencies of *BRAFV600E*, *KRAS* and *NRAS* mutations to about 5%, 45% and 5% respectively resulting in about 45% of MSS MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type CRCs [27]. Given these frequencies, we estimated the costs of various strategies to test for 1,000 CRCs samples from €1,927,800 (DNA- & RNA- NGS testing and MSI testing for the 1,000 samples, allowing the diagnosis of every *NTRK*-rearranged cases) to €722,032 using non-NGS methods and testing for *NTRK* gene fusions with pan-TRK and FISH tests only MLH1-MSI-High *KRAS-NRAS-BRAF* wild-type cases (and preventing the diagnosis of *NTRK*-rearranged CRC without MLH1- MSI-High status). Nevertheless, a strategy based on non-NGS methods using TRK testing in *BRAF-KRAS-NRAS* wild type CRC is also proposed with a cost of €723,412 (Figure 3).

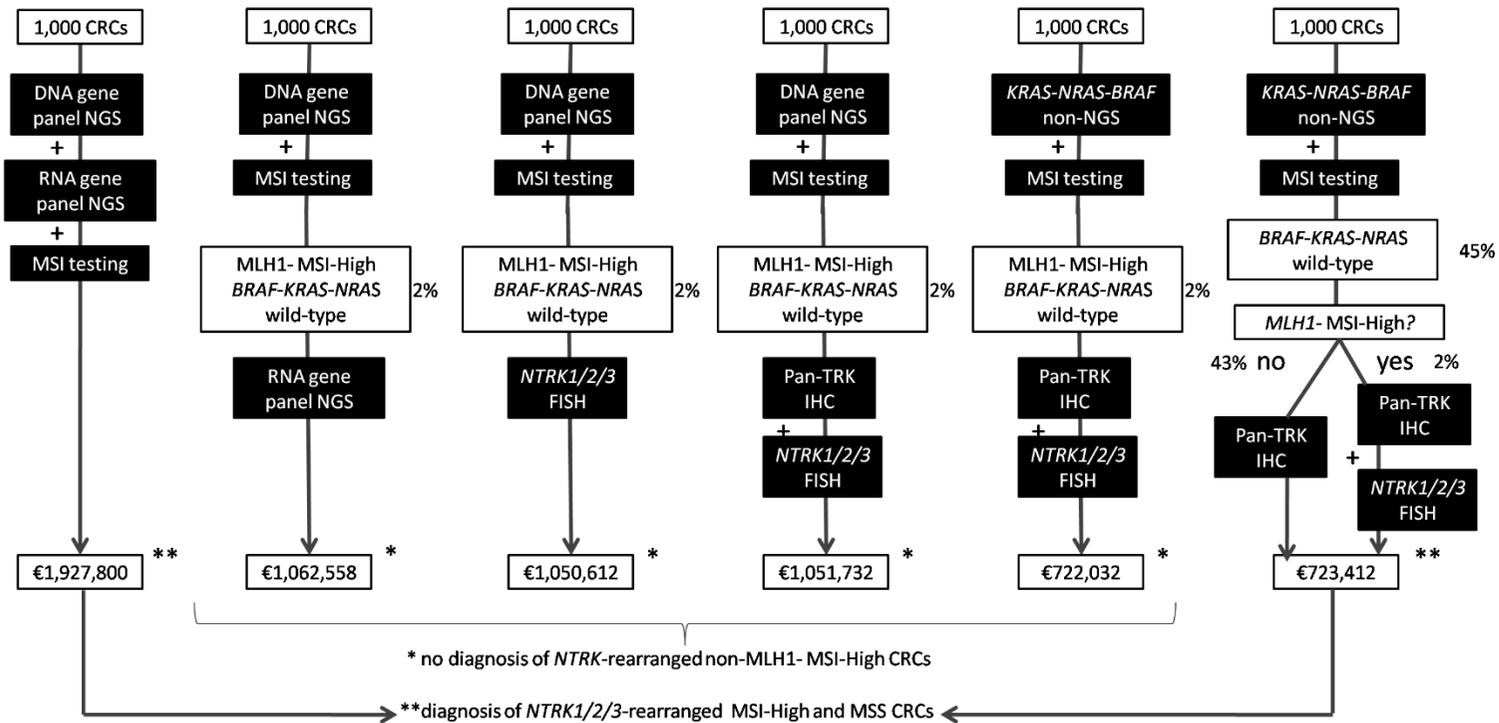


Figure 4: Estimation of the costs related to molecular tests including *NTRK* testing using various testing strategies; final costs correspond to the global costs for 1,000 colorectal cancer samples.

CRC: colorectal cancer; NGS: next generation sequencing; MSI: microsatellite instability; MLH1 -: loss of expression of MLH1 protein in tumor cells; IHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescent in situ hybridization

Discussion

With the increased number of targeted therapies available to treat patients with advanced cancers with various kinase fusions, the identification of the tumor samples with specific genes rearrangements has become worth for treatment choices. NGS analyses, especially RNA-based ones, consist in promising tools to search concomitantly for several molecular alterations including kinase fusions in a single analysis. Nevertheless, several obstacles in terms of workflow, technical and medico-economic parameters still impair the generalization of dual DNA- and RNA-NGS-based approaches analyzing large gene panels exceeding the tests recommended in treatment guidelines. Moreover, about 10% to 20% of tumor samples can result in non-contributive RNA-based NGS analyses due to inappropriate RNA quality and/or quantity [28]. In addition, the vast majority of the potential targets including *BRAF*-, *RET*-, *NRG1*-, but also *ALK*-, and *ROS1*- gene fusions are only the subject of clinical trials with no approved treatment in the field of CRC and thus no mandatory testing in this field. For these reasons, targeted multistep testing strategies remain actually relevant trying to maximize the detection of rare molecular subtypes of cancers of theranostic signification on the basis of clinical, pathological and routinely available molecular features. These multistep testing strategies nevertheless require to be applicable in turnaround times compatible with the therapeutic management of patients at a reasonable cost. Appropriate fast and easy to perform in pathology laboratories tests as IHC, FISH and full automated real-time PCR Idylla™ones as used in our study may be particularly valuable in this quest of short turnaround time analyses, but also, according to our simulation on the basis of the costs of molecular analyses proposed in our French healthcare system, from a medico-economic point of view. Then, either outsourcing for NGS analyses (requiring in our experience several days to weeks before the delivery of a molecular result contributive for treatment choices) but also "in-house" FISH and IHC methods (requiring 1 to 2 days of analyses only) could be chosen for the detection of the main kinase fusions with potential theranostic relevance to date [29]. The choice between different testing strategies has to take into account the medico-economic and technical context proper to each pathology laboratory and healthcare system

In our study, the selection of CRCs with MLH1-negative, MSI-High and *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type status has permitted to identify rapidly the patients for which kinase fusions testing was the more relevant and to diagnose 13 cases of CRCs with kinase fusions including 5 for which clinical trials and drug development are ongoing (i.e. *ALK*, *BRAF* and *RET* -

rearranged CRCs) but also 8 for which a targeted therapy is already approved in case of no other treatment alternatives (i.e. *NTRK* genes fusions), including the field of CRC, with an inclusion to the last CRC treatment guidelines of the U.S. National Comprehensive Cancer Network [30].

In the field of *NTRK* genes fusions, the IHC results were concordant with FISH ones only for *NTRK1*-rearrangements (5/5 FISH+ IHC+ cases) but not for *NTRK3* (0/3 FISH+ IHC + cases). As a consequence, beyond an excellent specificity of the pan-TRK IHC (100% in our study with no false positive), its sensitivity (only 62.5% if calculated about the 19 cases tested with *NTRK1/2/3* FISH and pan-TRK IHC in our study) is insufficient to propose it as a stand-alone pre-screening test at current time. Indeed, *NTRK3*-rearranged CRC, more at risk of pan-TRK false negative results, consisted in about 37.5% % of *NTRK*-rearranged CRC in our study and had been also reported in others works. In the study by Cocco et al., 2/8 (25%) *NTRK*-rearranged tumors were *NTRK3*-rearranged with 1 pan-TRK IHC+ and 1 pan-TRK IHC - cases versus 6/6 *NTRK1*-rearranged and pan-TRK IHC + cases [7]. In a study by Solomon et al. about 33,997 cases containing 2929 CRCs among which 9 (0.31%) were diagnosed as *NTRK*-rearranged ones, 3/9 (33%) *NTRK* rearranged CRCs were *NTRK3* rearranged tumors (versus 6 *NTRK1*) with only 1/3 pan-TRK IHC+ case (1 negative, 1 N/A) [31]. Gatalica et al diagnosed no *NTRK3* (and no *NTRK2*) rearranged CRC in a file of 11,502 patients including 1272 CRCs (2 *NTRK1*-rearranged CRCs in their file with 1/2 pan-TRK IHC+ case) [32]. No *NTRK3*-rearranged CRC was also diagnosed by Chou et al. about 4569 CRCs screened for TRK-rearranged tumors but the method used for screening was the two pan-TRK IHC clones EPR17341 and A7H6R and false-negative pan-TRK IHC results in case of *NTRK3*-rearrangement could explain why, beyond 9 *NTRK*-rearranged CRC (8 *NTRK1* and 1 *NTRK2*), no *NTRK3*-rearranged CRC was diagnose in their large file of CRCs [33]. *NTRK*-rearranged but pan-TRK IHC - CRC cannot be ruled out also in the study by Lasota et al. also who used A7H6R pan-TRK IHC to search for *NTRK*-rearranged CRC in a file of 7,008 tumors which permitted the detection of 16 pan-TRK IHC+ tumors among which 15 were further test using targeted RNA-NGS and comprised 14 *NTRK1*- and 1 *NTRK3*-rearranged tumors (1 pan-TRK IHC + tumor had no molecular test) [34]. So, given the actual performances of pan-TRK IHC with notably insufficient performances in the detection of *NTRK3*-rearranged tumors, we recommend the use of molecular tests instead of or as as complement to immunohistochemistry in a screening strategy aiming to diagnose *NTRK*-rearranged CRCs, at least in case of MLH1-MSI-high, *RAS-RAF* wild type tumors in which *NTRK* fusions appear to be frequent (8/19 42.1

% in our study). Optimization of pan-TRK IHC with special focus on TRK-C protein detection must be a subject of future studies for improving its performances.

MSS CRCs were not studied in our previous work. Nevertheless, albeit rarer than in MSI-High CRCs, CRCs with targetable kinase-fusions are also reported as, taking the example of *NTRK*-rearranged CRCs, 3/16 (18.8%) cases in the study by Lasota et al., 1/9 (11.1%) case in the study by Chou et al., 1/8 (12.5%) case in the study by Cocco et al., all consisting in *NTRK1*-rearranged tumors with *RAS-BRAF* wild type status [7;33;34]. Beside a strategy of DNA- and RNA-NGS plus MSI testing for every CRC, which would in theory permit the detection of every *NTRK*-rearranged cases but would also greatly increase the cost of molecular analyses, in our opinion, a generalization of pan-TRK IHC use in case of *RAS-BRAF* wild type CRC completed by *NTRK1/2/3* FISH test in case of MSS pan-TRK IHC + or MSI-High pan-TRK +/-), would also permit to maximize the detection of *NTRK*-rearranged CRCs with greatly inferior costs.

Conclusion

To conclude, our study not only confirms the high prevalence of targetable genes fusions in MLH1-negative, MSI-High and *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type but it also points that the testing for these targetable genes fusions is also feasible in pathology laboratories lacking access to RNA-/DNA- NGS methods. Multistep molecular testing (i.e. testing for gene fusions only in *BRAF-KRAS-NRAS* wild-type, especially when associated with a MLH1-negative and MSI-High status) also appears as a cost-effective and, albeit multistep, rapid approach and valuable approach in comparison with a first line NGS testing with large gene panels. Efforts must be pursued to improve the performances on pan-TRK IHC especially to improve its ability to detect TRK-C proteins related to *NTRK3*-rearrangements.

Acknowledgements: The authors would like to acknowledge the technical staff of the Department of Pathology of the Brest University Hospital as well as the pathologists of Ouest Pathology for their collaboration in this work as well as Omnium group and Biocartis for support.

Compliance with Ethical Standards: The present study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and after approval by our institutional review board with tumor samples registered in a tumor tissue collection (CHRU Brest, CPP n° DC – 2008 – 214).

Funding: No funding in this work.

Conflict of Interest: Biocartis company has provided Idylla™ dedicated cartridges for this study but has not taken part in data interpretation or manuscript writing in this work. The authors declare no funding, employment or any financial or non-financial competing interests in this work.

Cases	Gender (F/H)	Age (years)	Tumor site	Tumor differentiation	T stage	N stage	Mucinous part	% of tumor cells	MSI test	<i>BRAFV600</i> test	<i>NRAS</i> test	<i>KRAS</i> test	Pan-TRK EPR 17341 IHC	Pan-TRK A7H6R IHC	ALK IHC	Gene fusion using FISH tests
#01	M	73	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#02	F	88	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#03	F	60	Right colon	Moderately differentiated	NA	NA	no	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#04	F	86	Right colon	Poorly differentiated	NA	NA	no	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#05	M	80	Right colon	Poorly differentiated	NA	NA	Yes	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#06	F	86	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#07	M	83	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#08	F	85	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#09	F	85	Right colon	Moderately differentiated	NA	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#10	F	88	Left colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#11	F	60	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#12	F	90	Right colon	Well-differentiated	T4a	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#13	M	88	Right colon	Well-differentiated	T4a	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#14	F	71	Right colon	Well-differentiated	T3	N0	Yes	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#15	M	72	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested

#16	F	88	Left colon	Poorly differentiated	T4b	N2b	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#17	M	82	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	Yes	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#18	F	94	Right colon	Well-differentiated	T3	N1b	Yes	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#19	F	81	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#20	M	61	Right colon	Poorly differentiated	T4a	N2b	no	10	MSI-High*	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#21	F	76	Right colon	Poorly differentiated	T4	N1a	no	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#22	F	93	Right colon	Moderately differentiated	T4b	N2b	Yes	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#23	M	69	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	Yes	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#24	F	76	Right colon	Moderately differentiated	T4	N2b	Yes	20	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#25	F	91	Transverse colon	Well-differentiated	NA	NA	Yes	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#26	F	82	Right colon	Poorly differentiated	T4a	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#27	F	80	Right colon	Moderately differentiated	T3	N2a	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#28	F	72	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	Yes	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#29	F	52	Right colon	Moderately differentiated	NA	NA	no	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#30	F	83	Right colon	Well-differentiated	T4	N2b	no	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#31	F	60	Right colon	Moderately differentiated	NA	N0	Yes	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#32	M	79	Right colon	Moderately differentiated	T3	N1b	no	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#33	F	62	Right colon	Poorly differentiated	NA	N0	Yes	60	MSI-High	<i>bBRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested

#34	F	75	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#35	F	69	Right colon	Well-differenciated	T3	N1a	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#36	F	57	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#37	F	75	Right colon	Poorly differentiated	T4b	N1b	Yes	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#38	F	77	Right colon	Well-differenciated	T3	N0	no	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#39	F	84	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#40	F	68	Right colon	Poorly differentiated	T4b	N1a	Yes	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#41	F	75	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	90	MIS-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#42	M	77	Right colon	Moderately differentiated	T2	N0	no	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#43	F	74	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	Yes	75	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#44	F	82	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#45	F	91	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#46	F	77	Right colon	Poorly differentiated	T3	N1a	no	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#47	M	83	Right colon	Moderately differentiated	NA	N0	no	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#48	F	65	Right colon	Poorly differentiated	T4b	N2a	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#49	F	65	Right colon	Moderately differentiated	NA	N0	Yes	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#50	M	68	Right colon	Moderately differentiated	T3	N2b	no	80	MSI-High	<i>bBRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#51	F	67	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	Yes	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested

#52	F	75	Right colon	Moderately differentiated	NA	NA	no	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Not tested
#53	M	76	Right colon	Moderately differentiated	T3	N1b	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	<i>NRAS</i> codon 61	no	0	0	0	Not tested
#54	M	66	Right colon	Well-differentiated	T3	N0	Yes	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	<i>NRAS</i> codon 146	no	0	0	0	Not tested
#55	F	56	Right colon	Poorly differentiated	T3	N1a	no	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Not tested
#56	M	58	Right colon	Moderately differentiated	T4a	N2a	no	80	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 12	0	0	0	Not tested
#57	F	82	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 12	0	0	0	Not tested
#58	M	47	Right colon	Moderately differentiated	T4b	N1b	Yes	80	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Not tested
#59	M	75	Right colon	Well-differentiated	T1	N0	no	60	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Not tested
#60	F	59	Left colon	Well-differentiated	Tis	NA	Yes	20	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Not tested
#61	M	46	Left colon	Moderately differentiated	NA	NA	no	80	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Not tested
#62	F	77	Right colon	Moderately differentiated	T4	N1b	no	60	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 61	0	0	0	Not tested
#63	F	54	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	no	90	MSI-High	no	no	<i>KRAS</i> codon 146	0	0	0	Not tested

#64	F	54	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	Yes	80	MSI-High	no	no	KRAS codon 146	0	0	0	Not tested
#65	M	48	Right colon	Moderately differentiated	T4a	N2b	no	90	MSI-High	no	no	KRAS codon 146	0	0	0	Not tested
#66	F	80	Left colon	Well-differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	2+ (70%)	2+ (100%)	0	NTRK1
#67	F	85	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	Yes	90	MSI-High	no	no	no	2+ (100%)	2+ (100%)	0	NTRK1
#68	F	59	Transverse colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	3+ (100)	3+ (100%)	0	NTRK1
#69	M	52	Left colon	Well-differentiated	T4	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	1+ (100%)	1+ (100%)	0	NTRK1
#70	F	68	Transverse colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	90	MSI-High	no	no	no	3+ (100%)	3+ (100%)	0	NTRK1
#71	F	66	Right colon	Moderately differentiated	T3	N2a	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	NTRK3
#72	F	64	Right colon	Moderately differentiated	T3	N2a	Yes	70	MSI-High	no	no	no	0	0	0	NTRK3
#73	M	56	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	NTRK3
#74	M	68	Left colon	Moderately differentiated	NA	NA	no	30	MSI-High	no	no	no	0	0	3+ (100%)	ALK
#75	F	95	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	BRAF
#76	F	56	Right colon	Well-differentiated	T3	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	BRAF
#77	M	69	Right colon	Poorly differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	RET
#78	F	56	Transverse colon	Poorly differentiated	T4a	N2a	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	RET
#79	F	79	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	90	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#80	M	45	Transverse colon	Moderately differentiated	T3	N0	Yes	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No

#81	M	75	Left colon	Well-differentiated	T3	N0	no	80	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#82	F	75	Right colon	Moderately differentiated	T3	N0	no	50	MSI-High	no	no	no	0	0	0	No
#83	F	64	Right colon	Poorly differentiated	NA	NA	no	10	MSI-High*	no	no	no	0	0	0	No
#84	M	57	Right colon	Well-differentiated	NA	NA	no	10	MSI-High*	no	no	no	0	0	0	No

Supplementary table I: Summary of clinical, pathological and molecular data of the 84 MLH1- CRC cases.

F: female; M: man; IHC: immunohistochemistry; FISH: fluorescent in situ hybridization; NA: data not available; MSI: microsatellite instable ; *: samples initially diagnosed without MSI but confirmed to be MSI using new analyses on macrodissected tumor cells.

VII) ARTICLE EN FRANÇAIS

Titre : Plus de la moitié des cancers colorectaux de type sauvage MLH1-, MSI-High, BRAF/KRAS/NRAS non mutés comportent des gènes de fusion nécessitant une extension des tests moléculaires pour des choix thérapeutiques pertinents

Titre courant : Diagnostic des gènes de fusion dans le cancer colorectal

Introduction

L'instabilité des microsatellites (MSI) est un marqueur moléculaire du système de réparation des défauts d'appariement (MMR) qui se produit dans environ 15% des cancers colorectaux (CCR). Les cas sporadiques de MSI-High consistent en environ deux tiers des CCRs MSI-High et sont liés à l'inactivation épigénétique du gène MLH1 (méthylation du promoteur de *MLH1*). D'autres cas de CCR MSI-High sont associés au syndrome de Lynch, qui est lié à une mutation germinale de l'un des gènes du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Le pronostic des CCRs MSI-High de stade précoce est meilleur que celui des CRC de stade MSS (Microsatellite Stable), dans le cas des maladies métastatiques, le statut de MSI-High semble conférer un pronostic négatif. Bien que les résultats de la littérature soient encore contradictoires, il est suggéré qu'il existe une résistance possible au 5-FU (5-fluoro-uracile) dans les CCRs MSI-High [1].

Récemment, un intérêt accru a été porté aux CCRs MSI-High en raison de leur bonne réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 [2;3]. En effet, la charge de mutationnelle est plus élevée dans les CCRs de type MSI-High ce qui peut entraîner une réponse immunitaire anti-tumorale endogène. Cette réponse est contrée par l'expression de signaux immunitaires inhibiteurs, tels que PD-1 ou PD-L1, qui entraîne une réponse anergique à l'élimination de la tumeur par le système immunitaire. Indépendamment de toute expression de PD-L1 en IHC, le CCRMSI-High est un modèle de cancer qui répond particulièrement bien à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 [4]. En mai 2017, la FDA a approuvé l'immunothérapie anti-PD-1 par le pembrolizumab pour le traitement des enfants et des adultes atteints de cancers MSI-High, y compris le CRC, indépendamment de tout test PD-L1 [2;3;5;6].

Plus récemment, de nouvelles possibilités thérapeutiques ont été mises en évidence dans un sous-groupe de CCRs MSI-High qui abrite de fréquentes mutations de type gènes de fusion codant pour des protéines à activité kinase. En effet, il a été mis en évidence la présence de 21 CCRs avec gènes de fusion (6 *NTRK1*, 2 *NTRK3*, 5 *BRAF*, 4 *RET*, 1 *FGFR2*, 1 *FGFR3*, 1 *ROSI*

et 1 *ALK*) parmi 2314 CCRs testés (soit 0,9 % des CCRs). Cocco *et al.* ont rapporté que toutes les fusions de kinases (100%) se produisaient dans des tumeurs de type sauvage *BRAF/KRAS/NRAS* et que 12 (57%) des cas étaient MSI-High, tous avec une perte de *MLH1* et de *PMS2* et, pour 10 (47,6%) cas, avec la présence d'une hyperméthylation du promoteur de *MLH1*. Dans leur étude, Cocco *et al.* ont rapporté que la fréquence des fusions de kinases parmi les CCRs de type sauvage pour les gènes *BRAF/KRAS/NRAS* et les CCRs de type MSI-High déficients en *MLH1* avec hyperméthylation du promoteur de *MLH1* (c'est-à-dire des CCRs sporadiques - non de type MSI-High de Lynch - avec perte de *MLH1* qui ne représentent que 2% des CCRs de leur étude) peut atteindre 42% [7].

Actuellement, les effets thérapeutiques des thérapies ciblées anti-*ALK* et anti-*ROS1* dans les cancers du poumon non à petites cellules sont bien démontrés. Des réponses à l'inhibition de *MEK* dans les cancers avec fusion de *BRAF* ont également été rapportées. Des thérapies anti-*TRK* pour les tumeurs avec réarrangement des gènes *NTRK* indépendamment de leur type histologique ont été approuvées. A travers ces différents exemples, la détection des gènes de fusion pourrait devenir importante pour les choix de traitement actuels et futurs chez les patients atteints de CCR avancés [8-15].

L'analyse moléculaire basée sur de grands panels de gènes comprenant des analyses de fusions de gènes comme celles rapportées dans l'étude de Cocco *et al.* est pour des raisons de flux de travail, techniques et médico-économiques parfois difficilement réalisable en pratique courante. Par conséquent, les tests génétiques dans le CCR sont souvent limités aux analyses de mutations *KRAS*, *NRAS* et *BRAF* et aux tests MSI/MSS. Ces tests sont réalisés à des fins pronostiques et théranostiques. Les tests de fusions de gènes sont encore peu réalisés en routine pour les CCRs et pour beaucoup du domaine de travaux de recherche [16-18]. L'accès potentiel aux nouvelles possibilités thérapeutiques offertes par les l'identification des gènes de fusions dont les protéines chimériques sont des cibles de thérapies ciblés nécessiterait des tests supplémentaires spécifiques. Sur la base des résultats des marqueurs recommandés pour la prise en charge des patients à ce jour, il pourrait être notamment possible de prioriser les tests de gènes de fusion dans le sous-ensemble des CCRs *BRAF/KRAS/NRAS* de type sauvage et MSI-High avec perte d'expression de *MLH1*.

Ainsi, la détection de ces gènes de fusion pourrait être évaluée par des analyses morphologiques *in situ* telles que l'hybridation par fluorescence *in situ* (*FISH*) avec l'aide des sondes appropriées, ce qui permettrait d'obtenir des résultats sans qu'il soit nécessaire de

procéder à des analyses génétiques supplémentaires complexes (type NGS) et nécessitant souvent une externalisation dans des centres spécialisés.

Dans cette étude, nous avons l'intention de tester la faisabilité technique mais aussi médico-économique de la détection des fusions de kinases dans les CCRs à l'aide de tests simples réalisables en interne dans les laboratoires de pathologie sans plateau technique de biologie moléculaire en combinant l'immunohistochimie (IHC), la FISH et des tests de réaction basés sur l'ADN en temps réel entièrement automatisés (PCR).

Matériels et méthodes

Cas étudiés

Les cas inclus dans cette étude sont des patients atteints de CCRs analysés dans le Finistère entre janvier 2015 et mai 2019, avec une perte d'expression de la protéine MLH1. Des échantillons de tumeurs fixées en paraffine ont été sélectionnés pour la poursuite des analyses moléculaires. La présente étude a été menée conformément à nos directives nationales et institutionnelles. Tous les échantillons ont été inclus dans une collection de tissus tumoraux enregistrée et cette étude a été menée conformément à la déclaration d'Helsinki et après approbation de notre comité de révision institutionnel (CHRU Brest, CPP n° DC - 2008 - 214).

Instabilité des microsatellites, tests BRAF, KRAS et NRAS

Les analyses d'instabilité des microsatellites, et des mutations des gènes *BRAF*, *KRAS* et *NRAS* ont été effectuées en utilisant la plateforme entièrement automatisée Idylla™ (Biocartis, Malines, Belgique) pour chaque cas [19;20]. La proportion de cellules tumorales a été établie sur chaque échantillon par un pathologiste sur une lame de tissu colorée à l'hématéine-éosine-safran (HES) de 3 µm d'épaisseur. Des copeaux de tissu de 10 µm ont été produits en série pour les analyses moléculaires avec les trois cartouches : Idylla™ MSI Assay, Idylla™ NRAS-BRAF Mutation Test et Idylla™ KRAS Mutation Test (Biocartis). Les copeaux tissulaires ont été transférés dans chaque cartouche Idylla™ elle-même ensuite insérée

dans l'instrument. À l'intérieur de la cartouche, l'échantillon a été homogénéisé et les cellules ont été lysées en utilisant une combinaison d'ultrasons focalisés à haute intensité, de digestion enzymatique, chimique et de chaleur. Les acides nucléiques ont été libérés et sont ainsi prêts pour une amplification PCR ultérieure. La PCR était en temps réel et utilisait un système de détection basé sur les fluorochromes. Après 120 min (tests *NRAS-BRAF* et *KRAS*) ou 150 min (test MSI), toutes les étapes ont été automatiquement effectuées à l'intérieur des cartouches et les rapports finaux étaient directement disponibles sur le système après une analyse automatique de la courbe post-PCR. Ces rapports finaux contenaient le résultat final en termes de "MSS" ou "MSI-High" ou le nom de la ou des mutations de *KRAS*, *NRAS* et/ou *BRAF* éventuellement détectées par les différentes cartouches [20].

Recherche des gènes de fusion par hybridation fluorescente in situ et immunohistochimie

Les cas qui étaient de type MSI-High avec perte de l'expression de MLH1 et un statut de type sauvage pour *BRAF-KRAS-NRAS* ont tous été testés pour les fusions de kinases en utilisant la FISH. Des analyses d'IHC pan-TRK, ALK et ROS1 ont été réalisées sur l'ensemble des 84 prélèvements.

À propos des analyses IHC, pan-TRK (clones EPR17341, dilution 6µg/mL, Abcam, Cambridge, MA et clone A7H6R, dilution 1:50, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), ALK (clone 5A4, dilution 1:25, Clinisciences, Nanterre, France) et ROS1 (clone D4D6, dilution 1 :50, Cell Signaling Technology, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France) ont été réalisés à l'aide du système de préparation automatisée de lames Ventana Benchmark Ultra® avec le kit de détection OptiView DAB IHC (Roche Diagnostics, Meylan, France), comme indiqué dans les études précédentes [21;22]. L'intensité de la coloration a été citée comme suit : 0 : pas de coloration ; 1+ : coloration faible ; 2+ coloration modérée ; 3+ coloration forte, Le pourcentage de cellules tumorales positives a également été noté. Aucun test IHC n'a été effectué concernant les protéines BRAF, RET ou NRG1, car aucun ne s'est révélé pertinent à ce jour pour rechercher les réarrangements correspondants.

Les analyses en FISH ont été effectuées pour chaque échantillon avec les différentes sondes suivantes : ZytoLight SPEC BRAF Dual Color Break Apart, ZytoLight SPEC RET Dual Color Break Apart, ZytoLight SPEC NRG1 Dual Color Break Apart, ZytoLight SPEC NTRK1 Dual Color Break Apart, ZytoLight SPEC NTRK2 Dual Color Break Apart, et ZytoLight SPEC

NTRK3 Dual Color Break Apart Probes (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Allemagne) et les sondes Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart Rearrangement et Vysis 6q22 ROS1 Break Apart FISH (Abbott Molecular, Rungis, France) sur des coupes de tissu de 3µm avec un kit d'accessoires Dako Histology FISH en suivant les instructions du fabricant. Les lames de FISH ont été lues à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) à un grossissement de ×1000 avec DAPI, green™, filtres rouge et double vert plus rouge. Le microscope était connecté à une caméra à dispositif à couplage de charge et à un logiciel (In Situ Imaging System version 5.3 ; MetaSystems Hard & Software GmbH, Altlußheim, Allemagne) pour l'analyse des signaux fluorescents. Un réarrangement était diagnostiqué si au moins 15% des 100 noyaux de tumeur contenaient des signaux réarrangés (c'est-à-dire des signaux simples en 3' ou fractionnés) [21-23].

Analyse médico-économique des différentes stratégies de diagnostic des gènes de fusion

Nous avons simulé les coûts d'analyse de 1 000 échantillons de CCRs en utilisant différentes stratégies basées sur 1) les tests recommandés pour les choix thérapeutiques compte tenu des traitements actuellement approuvés (c'est-à-dire les tests de mutation *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, les tests MSI et également les tests *NTRK1/2/3*) ; 2) les prix des tests moléculaires utilisés en France : 882,9€ pour une analyse d'un panel de gènes en NGS-ADN pour une couverture <20kb, 882,9 € pour l'analyse minimale –d'un panel de gène ARN, 162 € pour les tests MSI, 553,5 € pour les analyses restreintes aux gènes *KRAS-NRAS-BRAF*, 95,2 € pour une analyse de FISH et 56 € pour une analyse IHC (utilisant 1 ou 2 anticorps) [24-26]. Nous avons comparé les coûts 1) des tests NGS ADN et ARN et MSI à réalisés pour chaque échantillon ; 2) des tests NGS ADN et MSI en première ligne suivis d'une analyse NGS ARN dans les cas de statut MLH1-MSI-High et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvages; 3) des tests NGS ADN et MSI en première ligne, suivis par des tests de FISH *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* dans les cas de statut MLH1- MSI-High et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage; 4) des tests NGS ADN et MSI en première ligne, suivis par des tests d'IHC pan-TRK et de FISH *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* dans les cas de MLH1- MSI-High et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage; 5) des analyses de première ligne restreintes à *KRAS-NRAS-BRAF* (dont technique non NGS) et tests MSI suivis de tests d'IHC pan-TRK et de tests FISH *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* dans les cas de statut MLH1- MSI-High et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage ; 6) analyses de première ligne restreintes à *KRAS-NRAS-BRAF*, tests MSI et IHC pan-TRK dans les cas de statut *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage ou d'IHC pan-TRK et de FISH

NTRK1, NTRK2, NTRK3 dans les cas de statut MLH1- MSI-High et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage.

Résultats

Cas étudiés

Des échantillons de 84 patients (26 hommes et 58 femmes avec un âge moyen de 69,4 ans, allant de 45 à 95 ans) atteints d'un CCR associé à une perte d'expression de la protéine MLH1 ont été inclus dans l'étude. La grande majorité des tumeurs étaient localisées au côlon droit (71 cas, 84,5%). Tous les CCR étaient des adénocarcinomes avec une bonne (22, 26,2%), une moyenne (41, 48,8%) ou mauvaise (21, 25%) différenciation. Une composante mucineuse a été signalée dans 31 cas (36,9%). Des métastases ganglionnaires ont été diagnostiquées dans 24 cas (28,6 %) (Tableau I et Tableau des données complémentaires).

Cas	Sexe (F/H)	Age (année)	Site de la tumeur	Grade de la tumeur	Stade T	Stade N	Contingent mucineux	% de cellules tumorales	Test MSI	Test BRAF	Test N RAS	Test K RAS	Pan-TRK EPR 17341 IHC	Pan-TRK A7H6R IHC	ALK IHC	Résultat en FISH des fusion de gènes (% de Noyau de tumeur positif)
#66	F	80	Côlon gauche	Bien	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	2+ (70%)	2+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (80%)
#67	F	85	Côlon droit	Bien	NA	NA	Oui	90	MSI-High	Non	Non	Non	2+ (100%)	2+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (70%)
#68	F	59	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	3+ (100)	3+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (80%)
#69	M	52	Côlon gauche	Bien	T4	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	1+ (100%)	1+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (60%)
#70	F	68	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Oui	90	MSI-High	Non	Non	Non	3+ (100%)	3+ (100%)	0	<i>NTRK1</i> (90%)
#71	F	66	Côlon droit	Modéré	T3	N2a	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>NTRK3</i> (95%)
#72	F	64	Côlon droit	Modéré	T3	N2a	Oui	70	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>NTRK3</i> (100%)
#73	M	56	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>NTRK3</i> (95%)
#74	M	68	Côlon gauche	Modéré	NA	NA	Non	30	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	3+ (100%)	<i>ALK</i> (80%)
#75	F	95	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>BRAF</i> (40%)

#76	F	56	Côlon droit	Bien	T3	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>BRAF</i> (100%)
#77	M	69	Côlon droit	Peu	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>RET</i> (30%)
#78	F	56	Côlon transverse	Peu	T4a	N2a	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	<i>RET</i> (95%)
#79	F	79	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#80	M	45	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#81	M	75	Côlon gauche	Bien	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#82	F	75	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	50	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#83	F	64	Côlon droit	Peu	NA	NA	Non	10	MSI-High*	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#84	M	57	Côlon droit	Bien	NA	NA	Non	10	MSI-High*	Non	Non	Non	0	0	0	Non

Tableau 1 : Résumé des données cliniques, pathologiques et moléculaires des 19 cas de CCR MSI-High MLH1-*BRAF/KRAS/NRAS*sauvage.

F : femelle ; M : homme ; IHC : immunohistochimie ; FISH : hybridation *in situ* par fluorescence ; NA : données non disponibles ; MSI : microstatélite instable ; * : échantillons initialement diagnostiqués sans MSI mais dont le statut de MSI a été confirmé par de nouvelles analyses sur des cellules tumorales macrodisséquées ; Bien : bien différencié ; Modéré : modérément différencié ; Mauvais : peu différencié. Tests MSI-High, *BRAF*, *KRAS* et *NRAS*

Analyse du statut MSI-High et des mutations BRAF, KRAS et NRAS

Le test Idylla™ MSI est revenu positif pour un statut MSI-High dans 100% des cas (84/84 cas). A noter que pour 3 cas (cas n°20, n°83 et n°84), les premières analyses sans macrodissection de la zone tumorale avaient abouti à un statut MSS en raison d'un faible pourcentage de cellules tumorales dans les échantillons (<10% de cellules tumorales dans les coupes de tissus ; néanmoins, de nouvelles analyses centrées sur les zones tumorales macrodissequées ont permis de confirmer le diagnostic de statut MSI-High).

Le test de mutation Idylla™ NRAS-BRAF et le test de mutation Idylla™ KRAS ont diagnostiqué 55 (65,5 %) mutations *BRAFV600*, 11 (13,1 %) mutations *KRAS* et 2 (2,4 %) mutations *NRAS*. Il est à noter que 3 échantillons (cas n°53, n°54, n°55) présentaient des mutations concomitantes de *RAS* (1 *KRAS*, 2 *NRAS*) et des mutations *BRAFV600*.

Ainsi les tests Idylla™ ont donné lieu à des analyses moléculaires contributives dans les 84 (100%) échantillons de tumeurs, sans aucune analyse non valide et ont permis de diagnostiquer 19 (22,6%) cas de MSI-High avec perte d'expression de *MLH1* et un statut de type sauvage pour les gènes *BRAF-KRAS-NRAS*. (Tableau I et Tableau I des données complémentaires).

Recherche des gènes de fusion

Des analyses FISH ont été effectuées dans les 19 cas de CCRs MSI-High avec perte de l'expression *MLH1* et un statut *BRAF-KRAS-NRAS* sauvage. Les analyses en FISH ont permis de diagnostiquer 5 (5,9%) tumeurs avec réarrangements de *NTRK1* (cas #66, #67, #68, #69 et #70), 3 (3,6%) tumeurs avec réarrangements de *NTRK3* (cas #71, #72 et #73), 2 (2,4%) tumeurs avec réarrangements de *BRAF* (cas #75 et #76), 2 (2,4%) tumeurs avec réarrangements de *RET* (cas #77 et #78), 1 (1,2%) tumeur avec un réarrangement de *ALK* (cas #74). Il est ainsi retrouvé 13 cas (68,4%) sur les 19 cas, de CCR MSI-High avec perte de l'expression de *MLH1* et *BRAF-KRAS-NRAS* sauvage pour lesquels un gène de fusion a été identifié. Aucun réarrangement de *NTRK2*, *ROS1* ou *NRG1* n'a été diagnostiqué.

Des analyses ALK, ROS1 et EPR17341 et A7H6R pan-TRK IHC ont été effectués pour les 84 échantillons de tumeurs. L'étude en IHC ALK n'a été positive (score 3+) que pour la tumeur avec réarrangement de *ALK* en FISH, sans marquage dans les 83 cas restants. L'étude en IHC de ROS1 était négative (score 0) pour les 84 tumeurs. L'étude par IHC avec les anticorps

pan-TRK présentait une positivité avec des intensités similaires entre les deux clones dans les 5 avec réarrangement de *NTRK1*, mais était négative dans les 3 tumeurs avec réarrangement de *NTRK3* (Tableau I et Tableau I des données complémentaires et les figures 1 et 2).

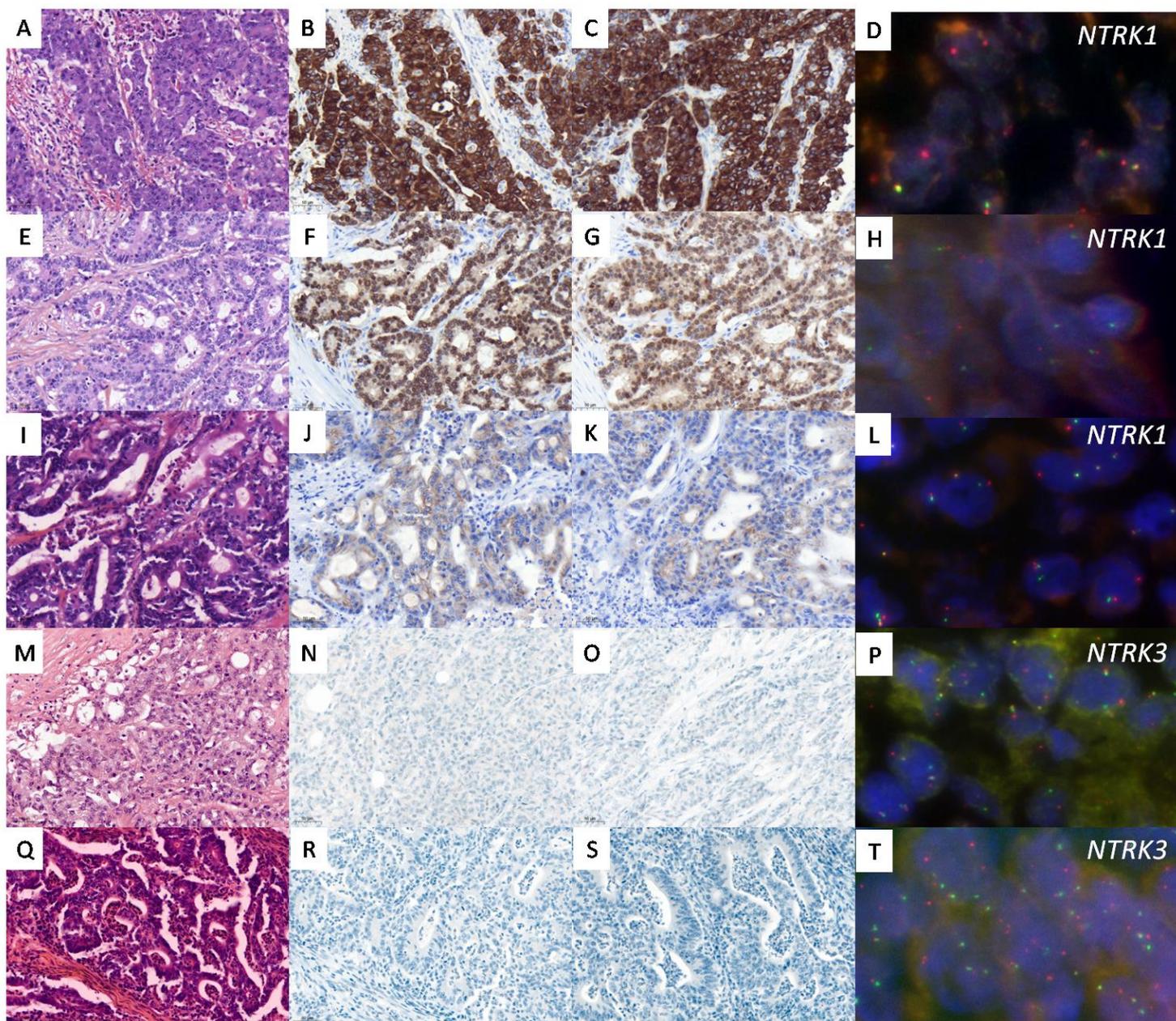


Figure 1 : Exemples de cancers colorectaux avec réarrangements des gènes *NTRK* : 3 tumeurs *NTRK1* (cas n° 68, n° 70 et n° 66 de haut en bas) et 2 tumeurs *NTRK3* (cas n° 71 et n° 73 de haut en bas) (A, E, I, M, Q : hématoxyline-éosine-safran, grossissement x20 ; B, F, J, N, R : A7H6R pan-TRK immunohistochimie, C, G, K, O, S : et EPR17341 immunohistochimie pan-TRK, grossissement x20, contre-coloration de l'hématoxyline ; D, H, L, P, T : résultats FISH avec les sondes *NTRK1* et *NTRK3* de ZytoVision GmbH, grossissement x100, contre-coloration DAPI).

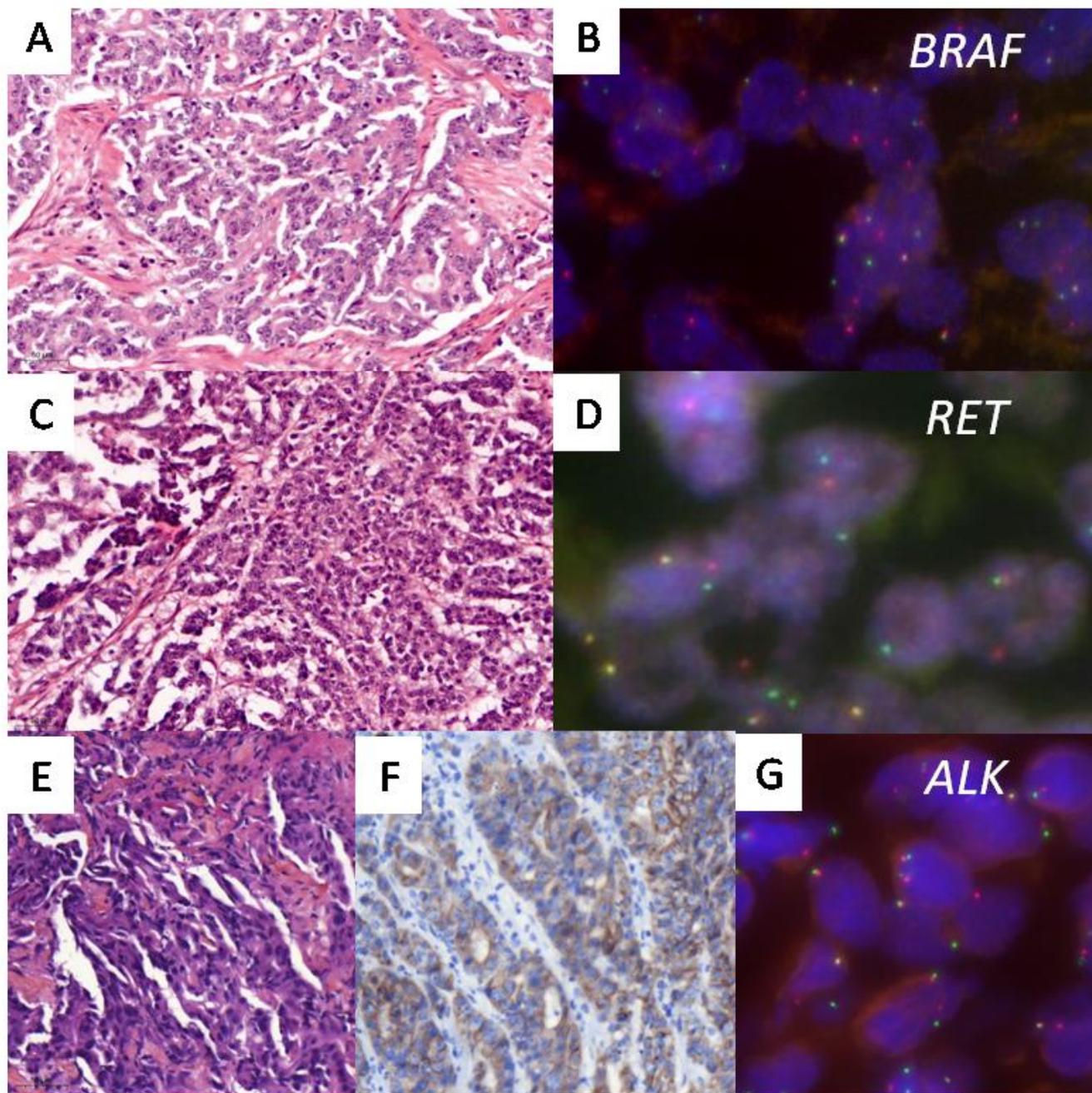


Figure 2 : Exemples de 1 cancer colorectal *BRAF*-réarrangé (cas n°76), 1 *RET*- réarrangé (cas n°77) et 1 *ALK*- réarrangé (cas n°74) (A, C, E : hématoxyline-éosine-safran, grossissement x20 ; B, D, F : Résultats FISH avec sondes break apart ZytoVision GmbH : pour *BRAF* et *RET* et sonde break apart Vysis Abbott pour *ALK*, grossissement x 100, contre-coloration DAPI ; F : immunohistochimie *ALK*, clone 5A4, grossissement x20, contre-coloration de l'hématoxyline).

Analyse médico-économique des différentes stratégies de diagnostic des gènes de fusion

Dans une étude précédente de grande envergure portant sur 2 314 cas de CCRs, Cocco *et al.* ont diagnostiqué 230 cas (9,9 %) de CCRs MSI-high, dont 74 cas (3,2 %) avec une mutation BRAFV600E, 83 cas (3,6 %) de mutation de KRAS, 2 (0,08%) mutants NRAS et 71 (3%) de MSI-High KRAS-NRAS-BRAF de type sauvage. Cette dernière catégorie comportait 47/71 (66%) de tumeurs MLH1- (c'est-à-dire 47/2314, 2%, de cas avec un statut MLH1- MSI-High KRAS-NRAS-BRAF sauvage). Ce sous-groupe contenait 7 des 8 CCRs réarrangés pour NTRK car dans leur étude 1 CRC était MSS [7]. Parmi les CCRs MSS (90% des CCRs dans Cocco *et al.*), les fréquences des mutations BRAFV600E, KRAS et NRAS sont respectivement d'environ 5%, 45% et 5%, ce qui donne environ 45% de CCRs MSS ou MSI-High avec un phénotype sauvage pour KRAS-NRAS-BRAF [27].

Compte tenu de la fréquence de ces mutations, nous avons estimé les coûts des différentes stratégies de dépistage de 1 0000 échantillons de CCRs. Le coût serait de 1 927 800 € en cas d'analyse NGS ADN et NGS ARN ainsi que MSI systématique sur les 1000 échantillons, permettant le diagnostic de tous les cas de NTRK-arrangés. Le coût serait de 722 032 € en utilisant des méthodes non de type NGS pour les gènes KRAS-NRAS-BRAF et le statut MSI puis en testant les fusions de gènes NTRK en IHC avec l'anticorps pan-TRK et en FISH uniquement pour les cas MLH1- MSI-High KRAS-NRAS-BRAF sauvage. Néanmoins, une stratégie basée sur des méthodes non NGS pour les gènes KRAS-NRAS-BRAF ainsi que pour le statut MSI associé à une IHC Pan-TKK et une analyse en FISH uniquement pour les cas MLH1- et MSI-high présenterait un coût de 723 412 euros et cela permettrait ainsi de diagnostiquer les cas réarrangés quel que soit leur statut microsatellitaire (dont les rares cas MSS) avec un prix de revient qui resterait inférieur à une analyse en NGS (Figure 3).

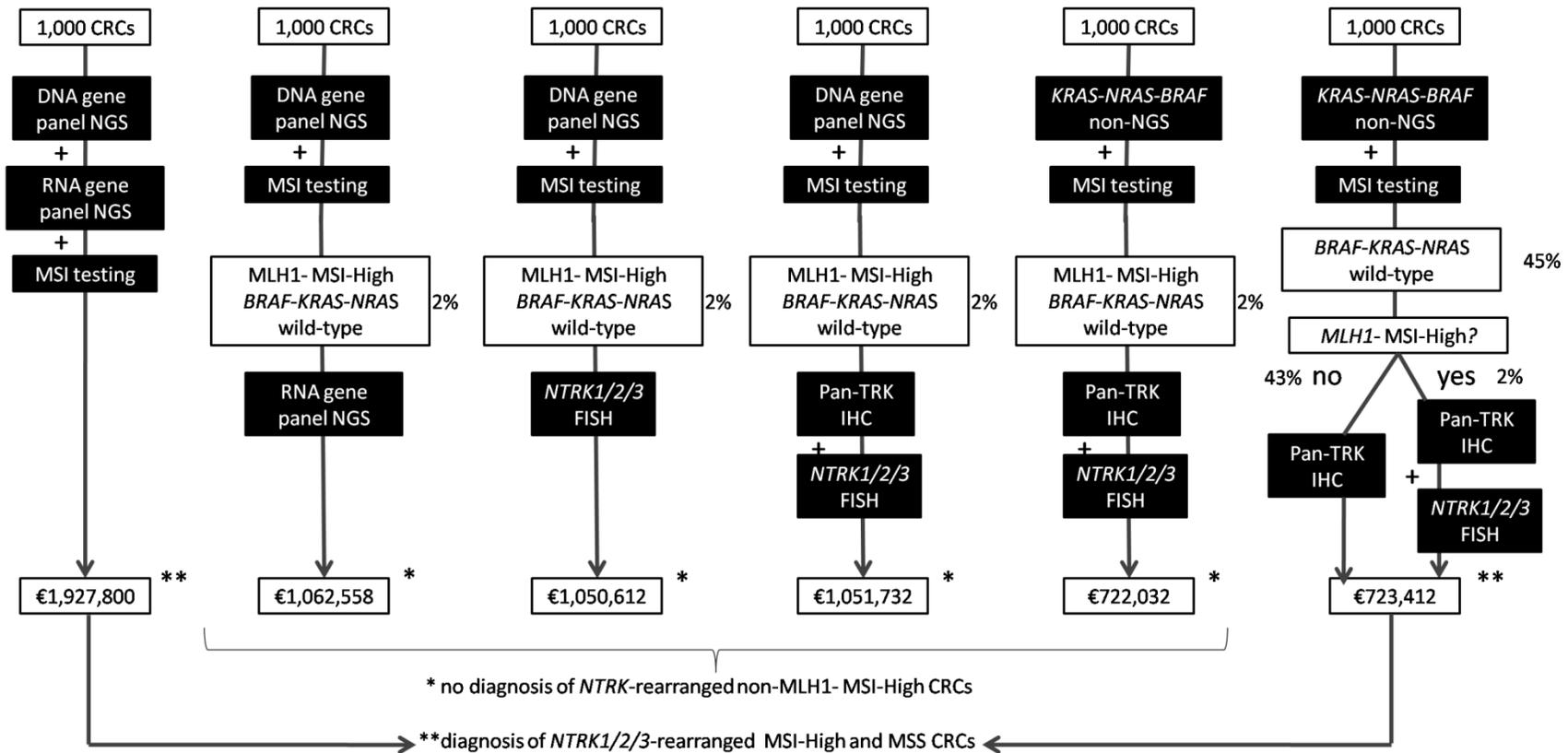


Figure 3 : Estimation des coûts liés aux tests moléculaires, y compris les tests NTRK utilisant diverses stratégies d'analyse ; les coûts finaux correspondent aux coûts globaux pour 1 000 échantillons de cancer colorectal.

CRC : cancer colorectal ; NGS : séquençage de nouvelle génération ; MSI : instabilité des microsatellites ; MLH1- : perte d'expression de la protéine MLH1 dans les cellules tumorales ; IHC : immunohistochimie ; FISH : hybridation *in situ* par fluorescence

Discussion

Avec le nombre croissant de thérapies ciblées disponibles pour traiter les patients atteints de cancers avancés et en particulier ceux avec fusions de kinases, l'identification des échantillons de tumeurs avec des réarrangements de gènes spécifiques est devenue importante pour adapter la stratégie thérapeutique. Les analyses NGS, en particulier celles basées sur l'ARN, consistent en des outils prometteurs permettant de rechercher simultanément plusieurs altérations moléculaires, y compris des fusions de kinases en une seule analyse. Néanmoins, plusieurs obstacles en termes de quantité de travail et de paramètres techniques et médico-économiques entravent encore la généralisation de ces doubles approches à base d'ADN et d'ARN. Ces techniques permettent une analyse d'un grand panel de gènes dont nombreux sont en dehors des recommandations standards. En outre, environ 10 à 20 % des échantillons de tumeurs peuvent donner lieu à des analyses non contributives basées sur l'ARN-NGS en raison d'une qualité et/ou d'une quantité d'ARN inappropriée [28].

Par ailleurs, la grande majorité des cibles moléculaires potentielles, y compris les fusions de gènes *BRAF*-, *RET*-, *NRG1*-, mais aussi *ALK*-, et *ROS1*-, ne font qu'aujourd'hui l'objet d'essais cliniques sans traitement approuvé dans le CCR et ne sont donc pas de recherche obligatoire. Pour ces raisons, les stratégies d'analyses ciblées en plusieurs étapes restent pertinentes pour tenter de maximiser la détection de sous-types moléculaires rares associés à une signification théranostique sur la base de caractéristiques moléculaires cliniques, pathologiques et couramment disponibles.

Ces stratégies de tests en plusieurs étapes doivent néanmoins être applicables dans des délais compatibles avec la prise en charge thérapeutique des patients et associées à un coût raisonnable. Des tests appropriés, rapides et faciles à réaliser dans les laboratoires de pathologie, tel que les analyses en IHC, FISH et PCR via le système Idylla™, tels qu'ils ont été utilisés dans notre étude, peuvent être particulièrement précieux dans cette recherche en raison de délais d'analyse courts, mais aussi d'un point de vue médico-économique selon notre simulation sur la base des coûts des analyses moléculaires en France. Le choix d'externaliser les analyses NGS qui nécessiterait, selon notre expérience, plusieurs jours ou semaines avant le rendu d'un résultat moléculaire, nous conforte dans l'utilisation des méthodes FISH et IHC en "internes" (nécessitant 1 à 2 jours d'analyses seulement) pour la détection des principales fusions de kinases potentiellement pertinentes pour le théranostic à ce jour [29]. Le choix entre les différentes stratégies de testing doit tenir compte du contexte médico-économique et technique propre à chaque laboratoire de pathologie et à chaque système de santé.

Dans notre étude, la sélection des CRCs ayant un statut MLH1-négatif, MSI-High et *BRAF-KRAS-NRAS* sauvage a permis d'identifier rapidement les patients pour lesquels les tests de fusion de kinases étaient les plus pertinents. Et ainsi permettre de diagnostiquer 13 cas de CRCs avec fusion de kinases dont 5 pour lesquels les essais cliniques et le développement de médicaments sont en cours (i.e. *ALK*, *BRAF* et *RET*), et 8 cas pour lesquels une thérapie ciblée est déjà approuvée en l'absence d'autres alternatives de traitement (c'est-à-dire des fusions de gènes *NTRK*) avec une inclusion de ce traitement anti-TRK dans les dernières directives du CCR du *National Comprehensive Cancer Network* des États-Unis [30].

Dans le domaine des fusions de gènes *NTRK*, les résultats de l'IHC ont été concordants avec ceux de la FISH mais uniquement pour les réarrangements *NTRK1* (5/5 cas FISH+ IHC+) mais pas pour *NTRK3* (0/3 cas IHC+ et 3/3 cas FISH +). En conséquence, au-delà d'une excellente spécificité de l'IHC pan-TRK IHC (100% dans notre étude sans faux positif), sa sensibilité de seulement 62,5% si on la calcule sur les 19 cas testés à la fois en FISH *NTRK1/2/3* et en IHC pan-TRK dans notre étude, apparaît alors insuffisante pour le proposer comme test de présélection à l'heure actuelle. En effet, les CRCs réarrangés pour *NTRK3* (environ 37,5 % des cas de réarrangements *NTRK* dans les CRCs dans notre étude) sont plus exposés au risque de faux négatifs avec l'anticorps anti pan-TRK. Les réarrangements *NTRK3* représentent un défaut de sensibilité qui a également été signalé dans d'autres travaux. Dans l'étude de Cocco *et al.*, 2/8 (25%) des tumeurs réarrangées pour *NTRK* étaient des tumeurs *NTRK3* avec 1 cas de pan-TRK IHC+ et 1 cas de pan-TRK IHC - contre 6/6 cas de *NTRK1* réorganisés et de pan-TRK IHC + [7].

Dans une étude de Solomon *et al.*, sur 33 997 cas de cancer dont 2 929 CCRs, 9 cas (0,31 %) ont été diagnostiqués comme des CCRs avec un réarrangement d'un gène *NTRK*, et 3/9 (33 %) étaient des tumeurs réarrangées pour *NTRK3*, (contre 6 *NTRK1*), avec seulement 1/3 des cas pan-TRK IHC+ (1 négatif, 1 non étudié) [31]. Gatalica *et al.* n'ont diagnostiqué aucun cas de CCRs réarrangé pour *NTRK3* (et aucun cas de CCR réarrangé pour *NTRK2*) dans un panel de 11 502 patients, comportant 1272 CCRs (2 CCR réarrangés pour *NTRK1* avec 1/2 cas pan-TRK IHC+) [32]. Aucun cas de CCRs réarrangé pour *NTRK3* n'a également été diagnostiqué par Chou *et al.* Leur étude portait sur 4569 cas de CCRs pour lesquels une recherche de réarrangements *NTRK* a été réalisée, mais la méthode utilisée pour le dépistage était via les deux clones pan-TRK IHC EPR17341 et A7H6R. Ainsi les résultats faussement négatifs de l'IHC pan-TRK en cas d'arrangement *NTRK3* pourraient expliquer pourquoi sur un

panel aussi important aucun cas n'était *NTRK3* réarrangé malgré la présence de 8 réarrangements *NTRK1* et 1 *NTRK2* [33].

Le CCR réarrangé pour *NTRK3* mais avec une IHC pan-TRK - ne peut pas non plus être exclu formellement dans l'étude de Lasota *et al.* qui ont également utilisé l'IHC pan-TRK A7H6R IHC pour rechercher les CCRs réarrangés pour *NTRK* dans un panel de 7 008 tumeurs. Cette étude a permis de détecter 16 tumeurs pan-TRK IHC+, dont 15 ont été soumises à des tests supplémentaires à l'aide d'ARN-NGS ciblés et comprenaient ainsi 14 tumeurs réarrangées *NTRK1* et 1 seule tumeur *NTRK3* (1 tumeur pan-TRK IHC + n'avait pas de test moléculaire) [34].

Ainsi, les performances de l'IHC pan-TRK apparaissent nettement insuffisantes dans la détection des tumeurs réarrangées pour *NTRK3*. Nous recommandons l'utilisation de tests moléculaires à la place ou en complément de l'immunohistochimie dans le cadre d'une stratégie de dépistage visant à diagnostiquer les CCR réarrangés pour *NTRK*, au moins dans le cas des tumeurs MLH1- MSI-high, *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage et dans lesquelles les fusions de *NTRK* semblent être fréquentes (8/19 42,1 % dans notre étude). L'optimisation de l'IHC pan-TRK avec un accent particulier sur la détection de la protéine TRK-C doit faire l'objet d'études futures pour améliorer ses performances.

Les CCRs de statut MSS n'ont pas été étudiés dans cette étude. Néanmoins, bien que plus rares que dans les CCRs MSI-High, les CCRs MSS avec fusion de kinases existent. En effet certaines études ont retrouvées 3/16 (18,8%) cas dans l'étude de Lasota *et al.*, 1/9 (11,1%) cas dans l'étude de Chou *et al.*, 1/8 (12,5%) cas dans l'étude de Cocco *et al.*, de tumeurs toutes réarrangées par *NTRK1* en association avec un profil MSS et *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage [7,33,34]. La stratégie d'analyse NGS ADN et ARN plus test MSI pour chaque CCR, permettrait en théorie de détecter tous les cas de tumeurs réarrangées *NTRK* mais augmenterait aussi considérablement le coût des analyses moléculaires. Notre avis penchent ainsi plus vers une généralisation de l'utilisation de l'IHC pan-TRK en cas de CCRs *KRAS-NRAS-BRAF* sauvage, complétée par une analyse en FISH de *NTRK1/2/3* en cas de CCRs MSS pan-TRK IHC positif ou MSI-High que le test pan-TRK soit négatif ou positif, ce qui permettrait également de maximiser la détection des CCRs de type MSS *NTRK* réarrangé avec des coûts nettement inférieurs.

Conclusion

Pour conclure, notre étude confirme dans un premier temps la forte prévalence des fusions de gènes, conditionnant l'accès à des thérapies ciblées, dans les cas de CCR MLH1-négatif, MSI-high et *BRAF-KRAS-NRAS* sauvage. Dans un deuxième temps elle souligne également que l'analyse des fusions de gènes ciblés est également possible dans les laboratoires de pathologie qui n'ont pas accès aux méthodes NGS. Les tests moléculaires en plusieurs étapes (c'est-à-dire des analyses de fusions de gènes uniquement dans *BRAF-KRAS-NRAS* sauvage et en particulier lorsqu'ils sont associés à un statut MLH1-négatif et MSI-High) semblent également constituer une approche aussi pertinente du point de vue médico-économique et, bien que nécessitant plusieurs étapes, également rapide par rapport à un test NGS de première ligne avec de grands panels de gènes. Les efforts doivent être poursuivis pour améliorer les performances de l'IHC pan-TRK, en particulier pour améliorer sa capacité à détecter les protéines TRK-C liées aux réarrangements *NTRK3*.

Remerciements : Les auteurs tiennent à remercier le personnel technique du service de pathologie du CHU de Brest ainsi que les pathologistes de Ouest Pathologie pour leur collaboration à ce travail, de même que le groupe Omnium et Biocartis pour leur soutien.

Respect des normes éthiques : La présente étude a été menée conformément à la Déclaration d'Helsinki et après approbation de notre commission de révision institutionnelle avec des échantillons de tumeurs enregistrés dans une collection de tissus tumoraux (CHRU Brest, CPP n° DC - 2008 - 214).

Financement : Aucun financement dans ce travail.

Conflit d'intérêts : La société Biocartis a fourni des cartouches Idylla™ pour cette étude mais n'a pas participé à l'interprétation des données ni à la rédaction des manuscrits de ce travail. Les auteurs ne déclarent aucun financement, emploi ou intérêt financier ou non financier concurrent dans ce travail.

Cas	Sexe (F/H)	Age (année)	Site de la tumeur	Grade de la tumeur	Stade T	Stade N	Contingent mucineux	% de cellules tumorales	Test MSI	Test <i>BRAF</i>	Test <i>NRAS</i>	Test <i>KRAS</i>	Pan-TRK EPR 17341 IHC	Pan-TRK A7H6R IHC	ALK IHC	Résultat en FISH des fusion de gènes (% de Nonyau de tumeur positif)
#01	M	73	Côlon droit	Modéré	T3	N0	no	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#02	F	88	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Yes	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#03	F	60	Côlon droit	Modéré	NA	NA	no	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#04	F	86	Côlon droit	Peu	NA	NA	no	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#05	M	80	Côlon droit	Peu	NA	NA	Yes	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#06	F	86	Côlon droit	Modéré	T3	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#07	M	83	Côlon droit	Bien	NA	NA	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#08	F	85	Côlon droit	Bien	NA	NA	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#09	F	85	Côlon droit	Modéré	NA	N0	no	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#10	F	88	Côlon gauche	Modéré	T3	N0	no	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	no	no	0	0	0	Non testé
#11	F	60	Côlon droit	Bien	NA	NA	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#12	F	90	Côlon droit	Bien	T4a	N0	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#13	M	88	Côlon droit	Bien	T4a	N0	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé

#14	F	71	Côlon droit	Bien	T3	N0	Oui	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#15	M	72	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#16	F	88	Côlon gauche	Peu	T4b	N2b	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#17	M	82	Côlon droit	Peu	T3	N0	Oui	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#18	F	94	Côlon droit	Bien	T3	N1b	Oui	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#19	F	81	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Oui	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#20	M	61	Côlon droit	Peu	T4a	N2b	Non	10	MSI-High*	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#21	F	76	Côlon droit	Peu	T4	N1a	Non	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#22	F	93	Côlon droit	Modéré	T4b	N2b	Oui	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#23	M	69	Côlon droit	Peu	T3	N0	Oui	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#24	F	76	Côlon droit	Modéré	T4	N2b	Oui	20	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#25	F	91	Côlon transverse	Bien	NA	NA	Oui	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#26	F	82	Côlon droit	Peu	T4a	N0	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#27	F	80	Côlon droit	Modéré	T3	N2a	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#28	F	72	Côlon droit	Peu	T3	N0	Oui	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#29	F	52	Côlon droit	Modéré	NA	NA	Non	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#30	F	83	Côlon droit	Bien	T4	N2b	Non	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#31	F	60	Côlon droit	Modéré	NA	N0	Oui	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé

#32	M	79	Côlon droit	Modéré	T3	N1b	Non	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#33	F	62	Côlon droit	Peu	NA	N0	Oui	60	MSI-High	<i>bBRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#34	F	75	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#35	F	69	Côlon droit	Bien	T3	N1a	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#36	F	57	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Oui	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#37	F	75	Côlon droit	Peu	T4b	N1b	Oui	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#38	F	77	Côlon droit	Bien	T3	N0	Non	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#39	F	84	Côlon droit	Peu	T3	N0	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#40	F	68	Côlon droit	Peu	T4b	N1a	Oui	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#41	F	75	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Oui	90	MIS-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#42	M	77	Côlon droit	Modéré	T2	N0	Non	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#43	F	74	Côlon droit	Peu	T3	N0	Oui	75	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#44	F	82	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#45	F	91	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Oui	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#46	F	77	Côlon droit	Peu	T3	N1a	Non	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#47	M	83	Côlon droit	Modéré	NA	N0	Non	30	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#48	F	65	Côlon droit	Peu	T4b	N2a	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#49	F	65	Côlon droit	Modéré	NA	N0	Oui	60	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé

#50	M	68	Côlon droit	Modéré	T3	N2b	Non	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#51	F	67	Côlon droit	Peu	T3	N0	Oui	80	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#52	F	75	Côlon droit	Modéré	NA	NA	Non	40	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	Non	0	0	0	Non testé
#53	M	76	Côlon droit	Modéré	T3	N1b	Non	90	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	<i>NRAS</i> codon 61	Non	0	0	0	Non testé
#54	M	66	Côlon droit	Bien	T3	N0	Oui	50	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	<i>NRAS</i> codon 146	Non	0	0	0	Non testé
#55	F	56	Côlon droit	Peu	T3	N1a	Non	70	MSI-High	<i>BRAFV600</i>	Non	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Non testé
#56	M	58	Côlon droit	Modéré	T4a	N2a	Non	80	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 12	0	0	0	Non testé
#57	F	82	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 12	0	0	0	Non testé
#58	M	47	Côlon droit	Modéré	T4b	N1b	Oui	80	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Non testé
#59	M	75	Côlon droit	Bien	T1	N0	Non	60	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Non testé
#60	F	59	Côlon gauche	Bien	Tis	NA	Oui	20	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Non testé
#61	M	46	Côlon gauche	Modéré	NA	NA	Non	80	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 13	0	0	0	Non testé
#62	F	77	Côlon droit	Modéré	T4	N1b	Non	60	MSI-High	Non	Non	<i>KRAS</i> codon 61	0	0	0	Non testé

#63	F	54	Côlon droit	Bien	NA	NA	Non	90	MSI-High	Non	Non	KRAS codon 146	0	0	0	Non testé
#64	F	54	Côlon droit	Bien	NA	NA	Oui	80	MSI-High	Non	Non	KRAS codon 146	0	0	0	Non testé
#65	M	48	Côlon droit	Modéré	T4a	N2b	Non	90	MSI-High	Non	Non	KRAS codon 146	0	0	0	Non testé
#66	F	80	Côlon gauche	Bien	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	2+ (70%)	2+ (100%)	0	NTRK1
#67	F	85	Côlon droit	Bien	NA	NA	Oui	90	MSI-High	Non	Non	Non	2+ (100%)	2+ (100%)	0	NTRK1
#68	F	59	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	3+ (100)	3+ (100%)	0	NTRK1
#69	M	52	Côlon gauche	Bien	T4	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	1+ (100%)	1+ (100%)	0	NTRK1
#70	F	68	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Oui	90	MSI-High	Non	Non	Non	3+ (100%)	3+ (100%)	0	NTRK1
#71	F	66	Côlon droit	Modéré	T3	N2a	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	NTRK3
#72	F	64	Côlon droit	Modéré	T3	N2a	Oui	70	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	NTRK3
#73	M	56	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	NTRK3
#74	M	68	Côlon gauche	Modéré	NA	NA	Non	30	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	3+ (100%)	ALK
#75	F	95	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	BRAF
#76	F	56	Côlon droit	Bien	T3	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	BRAF
#77	M	69	Côlon droit	Peu	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	RET
#78	F	56	Côlon transverse	Peu	T4a	N2a	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	RET

#79	F	79	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	90	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#80	M	45	Côlon transverse	Modéré	T3	N0	Oui	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#81	M	75	Côlon gauche	Bien	T3	N0	Non	80	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#82	F	75	Côlon droit	Modéré	T3	N0	Non	50	MSI-High	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#83	F	64	Côlon droit	Peu	NA	NA	Non	10	MSI-High*	Non	Non	Non	0	0	0	Non
#84	M	57	Côlon droit	Bien	NA	NA	Non	10	MSI-High*	Non	Non	Non	0	0	0	Non

Tableau complémentaire I : Résumé des données cliniques, pathologiques et moléculaires des 84 cas de MLH1-CCr.

F : femme ; M : homme ; IHC : immunohistochimie ; FISH : hybridation fluorescente in situ ; NA : données non disponibles ; MSI : microstatélie instable ; * : échantillons initialement diagnostiqués sans MSI mais confirmés comme étant des MSI par de nouvelles analyses sur des cellules tumorales macrodisséquées ;

VIII) BIBLIOGRAPHIE

1. Gelsomi N, Barbolini M, Spallanzani A, et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat Rev.* 2016;51:19-26
2. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med.* 2015;372:2509-20.
3. Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 2017;357:409-13.
4. Le Flahec G, Badic B, Guibourg B, et al. Mismatch repair-deficient colorectal cancer: a model of immunogenic and immune cell-rich tumor despite nonsignificant programmed cell death ligand-1 expression in tumor cells. *Hum Pathol.* 2018;72:135-43.
5. Chang L, Chang M, Chang HM, et al. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018;26:e15-e21.
6. FDA News Release. FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature. 2017. Available at: www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm560167.htm. Accessed on December 03, 2018.
7. Cocco E, Benhamida J, Middha S, et al. Colorectal Cancers Containing Hypermethylated MLH1 Promoter and Wild-Type BRAF/KRAS Are Enriched for Targetable Kinase Fusions. *Cancer Res.* 2019;79:1047-53.
8. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ, et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014;371:1963-71.
9. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007;448:561-6.
10. Ross JS, Wang K, Chmielecki J, et al. The distribution of BRAF gene fusions in solid tumors and response to targeted therapy. *Int J Cancer.* 2016;138:881-90.
11. Li AY, McCusker MG, Russo A, et al. RET fusions in solid tumors. *Cancer Treat Rev.* 2019 ;81:101911.
12. Drilon A, Somwar R, Mangatt BP, et al. Response to ERBB3-Directed Targeted Therapy in NRG1-Rearranged Cancers. *Cancer Discov.* 2018;8:686-95.
13. Drilon A, Laetsch TW, Kummar S, et al. Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children. *N Engl J Med* 2018;378:731-9.
14. Laetsch TW, DuBois SG, Mascarenhas L, et al. Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study. *Lancet Oncol.* 2018;19:705-14.

15. Drilon A, Siena S, Ou SI, et al. Safety and Antitumor Activity of the Multitargeted Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor Entrectinib: Combined Results from Two Phase I Trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1). *Cancer Discov.* 2017; 7:400-9.
16. Yamazaki K, Taniguchi H, YoshiNon T, et al. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: Molecular Testing for Colorectal Cancer Treatment, Third Edition. *Cancer Sci* 2018;109:2074-9.
17. Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer: Guideline From the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2017;35:1453-86.
18. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2016;27:1386-422.
19. Samaison L, Grall M, Staroz F, et al. Microsatellite instability diagnosis using the fully automated Idylla platform: feasibility study of an in-house rapid molecular testing ancillary to immunohistochemistry in pathology laboratories. *J Clin Pathol.* 2019;72:830-5.
20. Uguen A, Troncone G. A review on the Idylla platform: towards the assessment of actionable genomic alterations in one day. *J Clin Pathol.* 2018;71:757-62.
21. Bourhis A, Redoulez G, Quintin-Roué I, et al. Screening for NTRK-rearranged Tumors Using Immunohistochemistry: Comparison of 2 Different pan-TRK Clones in Melanoma Samples. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2019 Mar 27. doi: 10.1097/PAI.0000000000000708. [Epub ahead of print]
22. Ginestet F, Lambros L, Le Flahec G, et al. Evaluation of a Dual ALK/ROS1 Fluorescent In Situ Hybridization Test in Non-small-cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer.* 2018;19:e647-e653.
23. Le Flahec G, Briolais M, Guibourg B, et al. Testing for BRAF fusions in patients with advanced BRAF/NRAS/KIT wild-type melanomas permits to identify patients who could benefit of anti-MEK targeted therapy. *J Clin Pathol.* 2020;73:116-19.
24. RIHN. Le Référentiel Des actes enoncants hors Nomenclature de biologie et d'anatomocytopathologie (RIHN). 2020 https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/xlsx/ahn_rihn_v2020.xlsx accessed on 23rd February 2020
25. RIHN. Le Référentiel Des actes enoncants hors Nomenclature de biologie et d'anatomocytopathologie (RIHN). 2020 Liste complémentaire d'actes https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/xlsx/ahn_liste-complementaire_v2020.xlsx accessed on 23rd February 2020

26. Actes CCAM V51 02.04.2018 <http://www.sfpathol.org/media/pdf/ccam-v51-02042018.pdf> accessed on 23rd February 2020
27. Ogura T, Kakuta M, Yatsuoka T, et al. Clinicopathological characteristics and prognostic impact of colorectal cancers with NRAS mutations. *Oncol Rep.* 2014 ;32:50-6.
28. Kresse SH, Namløs HM, Lorenz S, et al. Evaluation of commercial DNA and RNA extraction methods for high-throughput sequencing of FFPE samples. *PLoS One.* 2018;13:e0197456.
29. Barel F, Doucet L, Uguen A. Towards a RAS mutation status in a single day for patients with advanced colorectal cancers. *Dig Liver Dis.* 2018;50:736-9
30. Jin Z, Hubbard JM. Optimizing biologic sequencing in metastatic colorectal cancer: first line and beyond. *Curr Oncol.* 2019;26(Suppl 1):S33-S42.
31. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol.* 2020;33:38-46.
32. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* 2019;32:147-53.
33. Chou A, Fraser T, Ahadi M, et al. NTRK gene rearrangements are highly enriched in MLH1/PMS2 deficient, BRAF wild-type colorectal carcinomas—a study of 4569 cases. *Mod Pathol.* 2019 Dec 2. doi: 10.1038/s41379-019-0417-3. [Epub ahead of print]
34. Lasota J, Chłopek M, Lamoureaux J, et al. Colonic Adenocarcinomas Harboring NTRK Fusion Genes: A Clinicopathologic and Molecular Genetic Study of 16 Cases and Review of the Literature. *Am J Surg Pathol.* 2020;44:162-73.

X) SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, en présence des maîtres de cette école et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité qui la régissent.

Mon premier souci sera, de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous les éléments physiques et mentaux, individuels collectifs et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients de décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer leurs consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai influencer ni par la recherche du gain ni par la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés.

Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers.

Et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances, sans acharnement.

Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Que je sois modéré en tout, mais insatiable de mon amour de la science.

Je n'entreprendrai rien qui ne dépasse mes compétences ; je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

BOCCIARELLI Claire

SUJET DE LA THSE : Stratégie diagnostiques des carcinomes colorectaux avec gènes de fusion

THESE : MEDECINE SPECIALISES- ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES

ANNEE : 2020

NUMERO D'IDENTIFICATION : 2020ANTI0569

MOTS CLEFS : cancer colorectal ; instabilité des microsatellites ; fusions de gènes ; *NTRK* ; immunohistochimie.

RESUME :

Introduction : Les thérapies ciblant les fusions de kinases ont amélioré le pronostic de nombreux patients atteints de tumeurs malignes avancées, mais elles sont extrêmement rares (<1%) dans le cancer colorectal (CCR), ce qui rend leur diagnostic difficile et souvent sous-investigué. Dans ce travail, nous avons l'intention d'étudier la faisabilité technique et médico-économique de la détection de fusions de kinases rares dans le CCR en utilisant des méthodes de séquençage qui seraient faciles à mettre en œuvre dans les laboratoires de pathologie, comme l'immunohistochimie (IHC), l'hybridation par fluorescence *in situ* (FISH) et les analyses ciblées par PCR en temps réel entièrement automatisées.

Résultats : Parmi 84 cas sélectionnés de CCR déficient en MLH1 (IHC), les premières analyses utilisant le test Idylla™ MSI, *KRAS* et *NRAS-BRAF* ont permis d'individualiser 19 (22,6%) cas de CCRs MLH1-, MSI-High et *BRAF/KRAS/NRAS* sauvage. Les analyses FISH (et le cas échéant IHC) à la recherche de réarrangements *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK*, *ROS1*, *BRAF*, *RET* et *NRG1* ont diagnostiqués 5 tumeurs réarrangées : *NTRK1*-, 3 *NTRK3*-, 1 *ALK*-, 2 *BRAF*- et 2 *RET* (c'est-à-dire la présence de fusions de gènes dans 13/19, 68,4%). Les tumeurs réarrangées *ALK* et *NTRK1* étaient IHC positives, mais l'IHC pan-TRK était négatif dans les 3 tumeurs réarrangées *NTRK3*.

Discussion : Notre étude a démontré la faisabilité mais aussi la rentabilité d'une stratégie de diagnostic rapide en plusieurs étapes, pour identifier les fusions de kinases rares et ciblées chez les patients atteints de CCR avancé. Des stratégies de test moléculaire rentables et faciles à réaliser pourraient être l'une des clés du diagnostic des sous-types moléculaires rares du CRC candidats à l'innovation thérapeutique.

JURY :

Mr Jean ROUDIE	Professeur en Médecine	Président
Mme Pascales MARCORELLES	Professeur en Médecine	Jurée
Mr Benoit TERRIS	Professeur en Médecine	Juré
Mme Aude ALINE-FARDIN	Docteur en Médecine	Jurée
Mr Arnaud UGUEN	Docteur en Médecine (MCU)	Directeur
