



HAL
open science

Caractérisation morphologique, immunohistochimique et moléculaire des tumeurs mésoenchymateuses avec réarrangement de NTRK

Mégane Le Quang

► **To cite this version:**

Mégane Le Quang. Caractérisation morphologique, immunohistochimique et moléculaire des tumeurs mésoenchymateuses avec réarrangement de NTRK. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03508074

HAL Id: dumas-03508074

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03508074>

Submitted on 3 Jan 2022

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

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

U.F.R. DES SCIENCES MEDICALES

Année 2021

Thèse n°3298

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN MEDECINE

Présentée et soutenue publiquement le 2 décembre 2021

par LE QUANG Mégane, Thien Huong

née le 7 décembre 1992 à Saint-Avoid

**CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE,
IMMUNOHISTOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES TUMEURS
MESENCHYMATEUSES AVEC REARRANGEMENT DE *NTRK***

Étude rétrospective et prospective de 36 cas

Sous la direction du Dr François LE LOARER, Professeur des universités

Rapporteur :

Dr Nicolas MACAGNO, Maître de conférences des universités

Membres du jury :

Dr Marie-Laure MARTIN NEGRIER, Professeur des universités

Présidente

Dr Anne RULLIER, Praticien Hospitalier

Examineur

Dr Jean-Michel COINDRE, Professeur émérite des universités

Examineur

Dr Jean-Philippe MERLIO, Professeur des universités

Examineur

Remerciements

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur François LE LOARER,

Je te remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse, ce fut un long travail très enrichissant.

A mon rapporteur,

Monsieur le Docteur Nicolas MACAGNO,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur pour ce travail de thèse. Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture et aux remarques que vous avez donné sur ce travail.

A ma présidente du jury,

Madame le Professeur Marie-Laure MARTIN-NEGRIER,

Je suis très honorée que tu aies accepté de présider ce jury et de juger ce travail de thèse. Je te remercie pour ton précieux soutien tout au long de mon internat et pour la formation en pathologie musculaire. C'est un plaisir de travailler avec toi et j'espère avoir la chance de poursuivre se compagnonnage en post-internat.

Aux membres du jury,

Madame le Docteur Anne RULLIER,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je te suis très reconnaissante de m'avoir encadrée lors de ma première présentation à Carrefour Pathologie, qui fut à l'origine de ce travail de thèse. Merci d'avoir continué à m'épauler par la suite au cours de ce travail et ce malgré les retournements de situation. Ta rigueur et ton sens critique m'ont beaucoup apporté.

Monsieur le Professeur Jean-Michel COINDRE,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je vous remercie pour vos enseignements sur les tissus mous, j'ai beaucoup aimé les séances d'EPU à Bergonié et j'éprouve le plus grand respect tant pour votre savoir que pour votre sens pédagogique.

Monsieur le Professeur Jean-Philippe MERLIO,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de faire partie de ce jury de thèse et vous en remercie. J'espère que ce travail vous aura plu.

A tous ceux qui ont participé à mon apprentissage,

A Pellegrin,

Claire, merci de m'avoir guidé lors de mon premier semestre dans cette toute nouvelle spécialité. Merci d'avoir pris le temps de partager, avec beaucoup de pédagogie, tes connaissances en ORL et en foie.

Mokrane, je te remercie pour ton soutien, ta compréhension et tout le savoir que tu m'as transmis en urologie.

Guillaume, merci pour ma progression exponentielle en neurologie tumorale ! J'espère que celle-ci n'en est qu'à son début, ce serait un plaisir de travailler avec quelqu'un d'aussi doué et bienveillant que toi.

Brigitte, merci pour votre enseignement en pathologie hépatique et pour les paquets de bonbons qui apparaissent de temps en temps dans le bureau des internes.

Skander, merci pour ton apprentissage en foie et ORL.

A l'équipe du laboratoire privé d'anapath de Pau,

Merci à **Catherine**, **Anne-Marie**, **René-Pierre** et **Éric**, pour leur accueil chaleureux à Pau, pour m'avoir choyée et avoir partagé leurs connaissances toujours dans la bonne humeur. En particulier merci à Catherine de s'être montrée si attentionnée. Je garde un excellent souvenir de ce semestre à Pau que ce soit pour la formation, les rencontres ou la découverte de la ville.

A l'équipe de Bergonié,

Gaëtan, merci d'avoir partagé avec nous ton immense savoir en pathologie mammaire.

Sabrina, merci pour ton enseignement en gynécologie et également pour les conversations sur l'escalade et la montagne qui me donnaient toujours une grande envie d'évasion !

Benjamin, merci pour ta pédagogie et ton humour, c'était toujours un plaisir de venir corriger avec toi.

Houda, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.

Merci à **Raul** et **Florence** avec qui j'ai moins travaillé mais qui ont participé à rendre ce semestre à Bergonié très agréable.

A l'équipe de neurologie dégénérative de l'IMNc et à l'équipe des pathologies neuromusculaires et des neuropathies périphériques,

Merci à tous pour ce semestre très enrichissant passé en clinique, loin du confort du microscope. Votre bienveillance et votre compréhension ont rendu ce semestre très agréable. En particulier, merci à **Antoine** pour sa patience et pour son imagination débordante pour trouver des surnoms.

A l'équipe de Haut-Lévêque,

Béatrice, je vous suis très reconnaissante pour votre enseignement en dermatologie ainsi que pour l'enthousiasme et le dynamisme que vous mettez dans notre formation d'interne.

Marion, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, tes gâteaux, tes conseils de randonnées et tes cours aux aurores qui étaient extrêmement enrichissants.

Hélène, je te remercie pour ta gentillesse et ta douceur. Merci également d'avoir partagé tes impressionnantes connaissances des bases fondamentales d'histologie, de physiologie et d'embryologie.

Marie, ce fut un plaisir et une chance d'avoir pu bénéficier de votre enseignement en hématologie.

Merci à **Hugues, Geneviève, Marie-Laure, Annick, Sarah et Elodie**, pour toutes les connaissances que vous avez partagées.

A tous les techniciens, secrétaires et aides-laboratoire,

Merci pour votre travail, votre disponibilité, votre bonne humeur. En particulier, merci aux techniciens de macroscopie auprès desquels j'ai beaucoup appris.

Un énorme merci à **Valérie**, pour toutes ces immuno et pour ta patience face à mes demandes sans fin au cours de ces quatre dernières années, tu as été d'une aide précieuse dans ce travail.

Enfin, un grand merci à **Jessica Massière** et **Rihab Azmani**, pour les analyses de biologie moléculaire et l'aide précieuse qu'elles m'ont apporté pour l'analyse des résultats.

A ma famille,

Merci à mes parents d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir toujours soutenue et merci pour tous ces moments merveilleux passés en famille. Vous êtes des parents formidables et je ne vous le dis pas assez souvent !

A ma sœur Floriane, merci de m'avoir fait rire dans ces moments où les nerfs à fleur de peau, j'ai failli pleurer pour la première fois. Merci pour les festins et les cocktails que l'on se faisait dans notre appartement du bonheur !

A mon frère Gaëtan, un grand grand merci d'avoir géré mes petits soucis techniques pendant que je faisais de la tyrolienne au Costa Rica ! Merci également pour la relecture des fautes d'orthographe pour ce manuscrit mais aussi mes CV, mes mémoires, mes mails, ... Tu es vraiment le meilleur de mes frères !

Merci à mes grands-parents, oncles, tantes, cousins et cousines pour tous les bons moments passés ensemble.

A mes amis et à mes co-internes,

Catherine, Aline et Nastasia, les « copines de toujours », pour tous ces fous rires, toutes ces pasta party, tous ces karaokés et tous ces verres (offerts) que l'on partage depuis maintenant tellement d'années !

Wendy et Léonie, merci pour toutes ces aventures de Rennes jusqu'en Bolivie et pour vos incroyablement bons goûts musicaux ! A vos côtés j'ai pu apprendre que la nuit, c'est fait pour dormir. Vivement les prochains voyages et les prochains concerts !

Merci aux CRAC, fidèles compagnons de raclette et de kokomo : **Anaïs, Pierre-Antoine, Thomas, Anna et Maëlle**. Sans vous ces longues semaines d'hiver auraient été bien moroses ! Et je vous remercie déjà par avance pour notre future victoire au quizz !

Merci à mes anciens colloc, **Aude**, pour toutes ces heures passées à guetter ton entrée à la salle d'escalade. **Pierre-Antoine**, pour ta cuisine gastronomique. **Paul**, pour tous ces conseils « d'escalade », malgré le manque d'aboutissement. **Anne-Iris**, pour ces délicieux phares bretons. Un remerciement tout particulier à Aude et à Paul de n'être jamais devenus acariâtres malgré toutes vos défaites au scrabble.

Un grand merci à **Rémi**, je ne sais pas comment j'aurais fait sans secrétaire personnel ! Ce fut un plaisir d'être ta cointerne pour 2 stages (et demi !) je ne me lasse pas de ton humour et ta manière d'en faire toujours trop. Ce fut également un honneur d'être ton binôme d'escalade pour ces quelques séances avec David !

Côme, merci pour les bons moments passés en stage et pour les soirées jusqu'au bout de la nuit, j'espère qu'il y en aura encore beaucoup d'autres !

Lucile, merci d'être toujours partante pour sortir ! En particulier petit clin d'œil aux soirées déguisées avec pizza au petit matin.

Marie, merci pour nos petites soirées en tête à tête au premier semestre.

Philippe, merci pour les bons moments passés en PACES, pour les soirées au 76r, pour les virés à Metz pour le fameux module « gérer une association » et pour tellement d'autres choses qu'il serait long de toutes les citer ! Bien que l'on se soit éloigné maintenant j'espère te revoir prochainement.

A **Camille, Julien, Mathieu, Damien, Sandra, Bertrand, Chloé C.**, ce fut un plaisir d'être en stage avec vous.

A mes co-internes de neurologie **Grégoire**, merci pour les chansons de Cher en fin de journée, **Pierre et Steven**, pour toutes les fois où vous m'avez aidé, **Chloé**, pour toutes ces PL que tu as bien voulu faire à ma place.

A **Guillaume**, anapath d'un semestre, merci d'avoir égayé nos journées par ta folie et merci pour les nombreux after work !

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
INTRODUCTION GENERALE	11
A/ LES TUMEURS FIBROBLASTIQUES/MYOFIBROBLASTIQUES	11
a) <i>Classification des tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques</i>	11
b) <i>Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques bénignes</i>	13
c) <i>Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques à malignité intermédiaire</i>	16
d) <i>Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques malignes</i>	22
B/ APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LE DIAGNOSTIC DES TUMEURS FIBROBLASTIQUES/MYOFIBROBLASTIQUES	23
a) <i>Les techniques de séquençage de l'ARN</i>	23
b) <i>Les réarrangements chromosomiques</i>	24
C/ LES REARRANGEMENTS DES GENES <i>NTRK</i> (NEUROTROPHIC TYROSINE KINASE RECEPTOR)	24
a) <i>La famille des récepteurs TRK</i>	24
b) <i>Les réarrangements des gènes NTRK dans les tissus conjonctifs</i>	27
c) <i>Les réarrangements des gènes NTRK hors des tumeurs du tissu conjonctif</i>	28
D/ ENJEU THERAPEUTIQUE DU DEPISTAGE DES REARRANGEMENTS <i>NTRK</i>	29
a) <i>La thérapie ciblée</i>	29
b) <i>Dépistage des réarrangements de NTRK</i>	30
c) <i>La technique d'immunohistochimie</i>	32
d) <i>Les anticorps ciblant les récepteurs TRK</i>	34
OBJECTIF DE L'ETUDE	36
ARTICLE ORIGINAL	37
DISCUSSION GENERALE	61
LIMITES ET PERSPECTIVES	63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	65
SERMENT D'HIPPOCRATE	69
RESUME DE LA THESE EN ANGLAIS	70
RESUME DE LA THESE	71

Tables des illustrations et des tableaux

FIGURE 1. CLASSIFICATION OMS DES TUMEURS FIBROBLASTIQUES ET MYOFIBROBLASTIQUES DES TISSUS MOUS, 5E EDITION, 2020.	12
FIGURE 2. HAMARTOME FIBREUX DE L'ENFANT	13
FIGURE 3. FIBROME APONÉVROTIQUE CALCIFIANT	14
FIGURE 4. MYOFIBROME	15
FIGURE 5. FIBROMATOSE	16
FIGURE 6. LIPOFIBROMATOSE	17
FIGURE 7. FIBROBLASTOME A CELLULES GEANTES	18
FIGURE 8. DERMATOFIBROSARCOME PROTUBERANS ET TRANSFORMATION FIBROSARCOMATEUSE.....	19
FIGURE 9. TUMEUR MYOFIBROBLASTIQUE INFLAMMATOIRE	20
FIGURE 10. FIBROSARCOME INFANTILE	21
FIGURE 11. FIBROSARCOME DE L'ADULTE	22
FIGURE 12. SCHEMA DE L'ACTIVATION DES RECEPTEURS TRK	26
FIGURE 13. RECOMMANDATION DE L'ESMO POUR LE DEPISTAGE DES REARRANGEMENTS <i>NTRK</i>	32
FIGURE 14. SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ETUDE.....	62
FIGURE 15. PROPOSITION DE PRISE EN CHARGE FACE A UNE TUMEUR FUSIFORME INCLASSEE ..	62
 TABLEAU 1. CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS ANTICORPS CIBLANT LES RECEPTEURS TRK UTILISES DANS NOTRE ETUDE	35

Liste des abréviations

AML	Actine musculaire lisse
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine tri-phosphate
DFSP	Dermatofibrosarcome protuberans
EMA	Agence Européenne du Médicament
ESMO	European Society for Medical Oncology
FDA	Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence par hybridation in situ
FSI	Fibrosarcome infantile
GIST	Tumeurs stromales gastro-intestinales
HPF	High power field
MPNST	Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor
NTRK	Neurotrophic tyrosine kinase receptor
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymérase chain réaction
RNA-seq	Séquençage de l'ARN
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SCN-NTRK	Spindle cells neoplasms with <i>NTRK</i> fusion
TKI	Inhibiteur de tyrosine kinase
TMI	Tumeur myofibroblastique inflammatoire
TRK	Tropomyosin receptor kinase

Introduction générale

A/ Les tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques

a) Classification des tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques

Les fibroblastes sont des cellules dérivant des cellules souches mésenchymateuses. Ils sont présents dans les tissus conjonctifs où ils participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire et au renouvellement du collagène via la sécrétion de protéoglycanes et de glycoprotéines. Sur le plan morphologique, ces cellules ont un aspect peu spécifique, comportant un cytoplasme peu abondant fusiforme ou étoilé et un noyau ovalaire doté d'une chromatine claire. Il n'existe pas de marqueur immunohistochimique spécifique de ces cellules.

Les myofibroblastes dérivent des fibroblastes. Ils interviennent dans la réparation tissulaire, via la sécrétion α -actine musculaire lisse (α -AML) dont les propriétés contractiles aident à la cicatrisation. Ces cellules sont fusiformes avec un cytoplasme abondant éosinophile et un noyau allongé comportant deux petits nucléoles. En immunohistochimie, ces cellules expriment l'actine musculaire lisse (AML) et la vimentine.

Les fibrocytes sont des fibroblastes matures, au repos. Contrairement aux fibroblastes, ils sont plus allongés avec un noyau plus condensé et expriment le CD34 en immunohistochimie.

Ces cellules ayant des aspects morphologiques et un profil immunohistochimique peu spécifiques, les tumeurs en dérivant présentent également des caractéristiques peu spécifiques.

La nouvelle édition de la classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) des tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques des tissus mous (5^e édition, 2020) définit 38 entités classées en bénin, à malignité intermédiaire avec agressivité locale ou rares métastases et malin (Fig1).

Nombreuses de ces entités possèdent des critères diagnostiques se recoupant rendant leur distinction parfois difficile, de reproductibilité limitée.

<i>Benign</i>		8851/1	Lipofibromatosis
8828/0	Nodular fasciitis	8834/1	Giant cell fibroblastoma
	Intravascular fasciitis		
	Cranial fasciitis		
8828/0	Proliferative fasciitis		<i>Intermediate (rarely metastasizing)</i>
8828/0	Proliferative myositis	8832/1	Dermatofibrosarcoma protuberans NOS
	Myositis ossificans and fibro-osseous pseudotumour of digits	8833/1	Pigmented dermatofibrosarcoma protuberans
	Ischaemic fasciitis	8832/3	Dermatofibrosarcoma protuberans, fibrosarcomatous
8820/0	Elastofibroma		Myxoid dermatofibrosarcoma protuberans
8992/0	Fibrous hamartoma of infancy		Dermatofibrosarcoma protuberans with myoid differentiation
	Fibromatosis colli		Plaque-like dermatofibrosarcoma protuberans
	Juvenile hyaline fibromatosis		Solitary fibrous tumour NOS
	Inclusion body fibromatosis	8815/1	Fat-forming (lipomatous) solitary fibrous tumour
8813/0	Fibroma of tendon sheath		Giant cell-rich solitary fibrous tumour
8810/0	Desmoplastic fibroblastoma		
8825/0	Myofibroblastoma	8825/1	Inflammatory myofibroblastic tumour
8816/0	Calcifying aponeurotic fibroma		Epithelioid inflammatory myofibroblastic sarcoma
	<i>EWSR1-SMAD3</i> -positive fibroblastic tumour (emerging)		
8826/0	Angiomyofibroblastoma	8825/3	Myofibroblastic sarcoma
9160/0	Cellular angiofibroma	8810/1	Superficial CD34-positive fibroblastic tumour
9160/0	Angiofibroma NOS	8811/1	Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma
8810/0	Nuchal fibroma	8814/3	Infantile fibrosarcoma
8811/0	Acral fibromyxoma		
8810/0	Gardner fibroma		<i>Malignant</i>
	<i>Intermediate (locally aggressive)</i>	8815/3	Solitary fibrous tumour, malignant
8815/0	Solitary fibrous tumour, benign	8810/3	Fibrosarcoma NOS
8813/1	Palmar/plantar-type fibromatosis	8811/3	Myxofibrosarcoma
8821/1	Desmoid-type fibromatosis		Epithelioid myxofibrosarcoma
8821/1	Extra-abdominal desmoid	8840/3	Low-grade fibromyxoid sarcoma
8822/1	Abdominal fibromatosis	8840/3	Sclerosing epithelioid fibrosarcoma

Figure 1. Classification OMS des tumeurs fibroblastiques et myofibroblastiques des tissus mous, 5e édition, 2020.

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. *Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.*

b) Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques bénignes

Parmi les tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques bénignes, notre cohorte contient les suivantes :

*Les hamartomes fibreux de l'enfant

Ces tumeurs apparaissent dans les premières années de vie, préférentiellement au niveau sous-cutané du haut des bras, du tronc, des régions axillaires, inguinales et génitales externes. Histologiquement, elles comportent trois contingents (1,2) (Fig2) :

- un contingent fibroblastique composé de faisceaux disposés au sein d'un stroma collagène plus ou moins abondant

- un contingent mésenchymateux immature composé de cellules fusiformes ou étoilées agencées en nids et souvent accompagnées d'une matrice myxoïde

- un contingent d'adipocytes matures étroitement mêlés aux deux autres contingents.

En immunohistochimie, les cellules fusiformes expriment parfois l'AML et le contingent mésenchymateux primitif le CD34 (3).

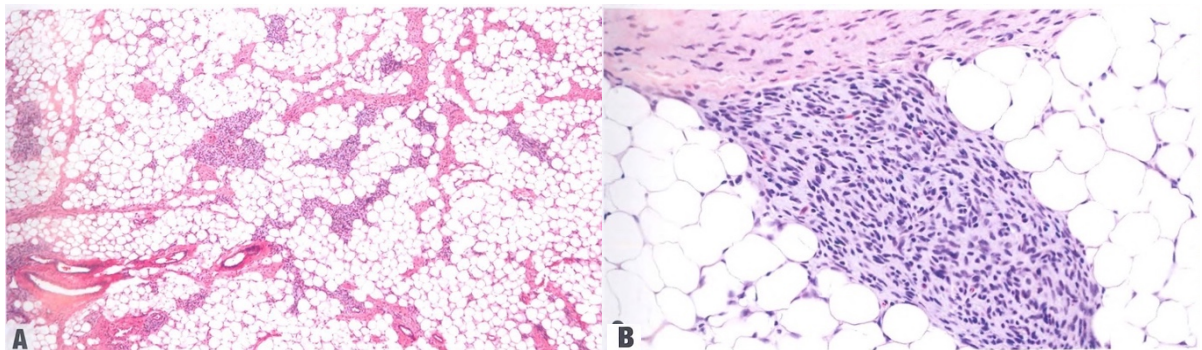


Figure 2. Hamartome fibreux de l'enfant

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Présence de trois contingents entremêlés : cellules fusiformes fibroblastiques, cellules adipeuses matures et îlots de cellules mésenchymateuses immatures, observés au faible (a) et moyen (b) grossissement.

* Les fibromes aponévrotiques calcifiants

Ces lésions atteignent majoritairement le jeune enfant, préférentiellement au niveau des extrémités, avec un fort potentiel de récurrence. Histologiquement, il s'agit d'une prolifération fibroblastique d'architecture fasciculée, associée à des îlots chondroïdes plus ou moins calcifiés. A un stade précoce les îlots chondroïdes peuvent manquer et être précédés par des amas de fibroblastes épithélioïdes aiguillant alors le diagnostic (4,5) (Fig3). En immunohistochimie, les cellules tumorales expriment l'AML. Les îlots chondroïdes sont positifs pour la protéine S100. Elles n'expriment pas le CD34 (3). Les études de biologie moléculaire récentes ont montré qu'une fraction de ces lésions sont associées à des fusions récurrentes *FNI-EGF* (6), également retrouvées dans certaines lipofibromatoses, suggérant qu'ils représentent un stade évolutif fibreux tardif et que les lipofibromatoses seraient un stade prolifératif cellulaire précoce appartenant au même spectre de lésions (7).

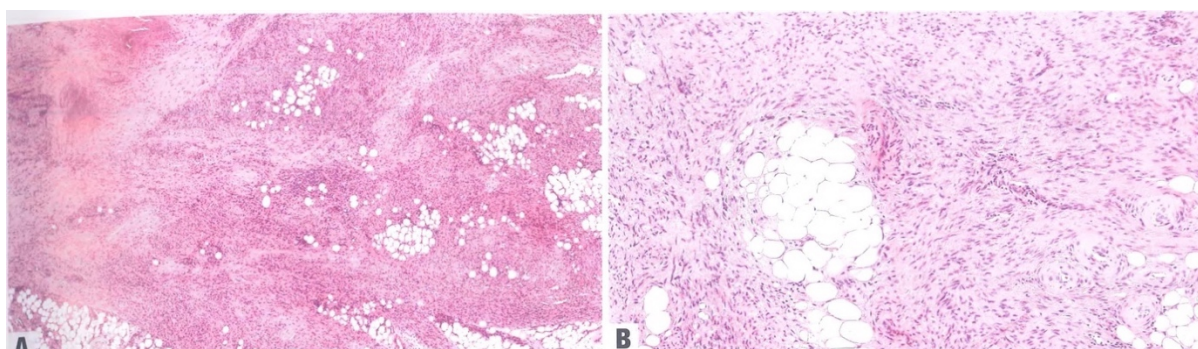


Figure 3. Fibrome aponévrotique calcifiant

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. *Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.*

Lésion fasciculée infiltrant la graisse sous-cutanée avec un foyer de calcification (en haut à gauche) (a). Au plus fort grossissement, on observe des faisceaux de cellules fusiformes dont le caractère infiltrant peut évoquer une fibromatose (b).

*Les myofibromes

Ces tumeurs, plus fréquemment décrites chez le jeune enfant, sont préférentiellement localisées au niveau de la tête et du cou. Elles peuvent être uniques ou multiples, alors dénommées myofibromatoses. Les formes solitaires atteignent uniquement les tissus mous tandis que les myofibromatoses peuvent également toucher les muscles, les os et les organes internes. Histologiquement, il s'agit d'une prolifération nodulaire de cellules à différenciation myofibroblastique. Les cellules tumorales adoptent une architecture storiforme ou forment des enroulements caractéristiques de cette entité. Un aspect biphasique lié à l'alternance de zones cellulaires et de zones pauci-cellulaires est observé. Les zones cellulaires sont constituées de cellules rondes ou polygonales, au noyau hyperchromatique et au cytoplasme éosinophile, étroit, mal limité. Les zones pauci-cellulaires sont composées de cellules fusiformes dodues, au noyau allongé clair et au cytoplasme éosinophile. Une vascularisation hémangiopéricytaire est souvent présente (Fig4). En immunohistochimie, les cellules tumorales expriment l'AML mais pas la desmine. Le CD34 et la protéine S100 sont dans la majorité des cas négatifs (8). Récemment, des mutations de *PDGFRB* ont été rapportées dans des formes sporadiques myofibromatoses (9,10).

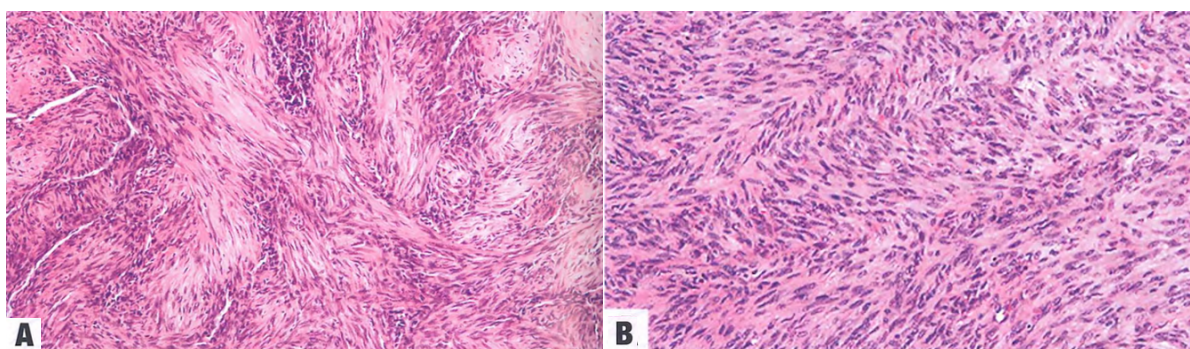


Figure 4. Myofibrome

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Aspect biphasique avec alternance de zones hypercellulaires et de zones paucicellulaires plus hyalines (a). Au grossissement intermédiaire on observe une prolifération fasciculée de cellules fusiformes pouvant mimer un sarcome à cellules fusiformes (b).

c) Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques à malignité intermédiaire

Les tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques d'agressivité intermédiaire incluses dans cette étude comprennent :

*Les fibromatoses

Ces tumeurs majoritairement décrites chez l'adulte sont de localisation ubiquitaire. Histologiquement, elles sont caractérisées par une prolifération de fibroblastes agencés en longs faisceaux au sein d'un stroma collagénique, avec une infiltration des structures adjacentes (11)(Fig5). En immunohistochimie, les cellules tumorales expriment l'AML et sont négatives pour le CD34 et la PS100. Certaines fibromatoses comportent des altérations moléculaires spécifiques : des mutations du gène *CTNNB1* codant pour la β -caténine ou des mutations du gène suppresseur de tumeur *APC* rentrant alors dans le cadre du syndrome de Gardner, également appelé polypose adénomateuse familiale.

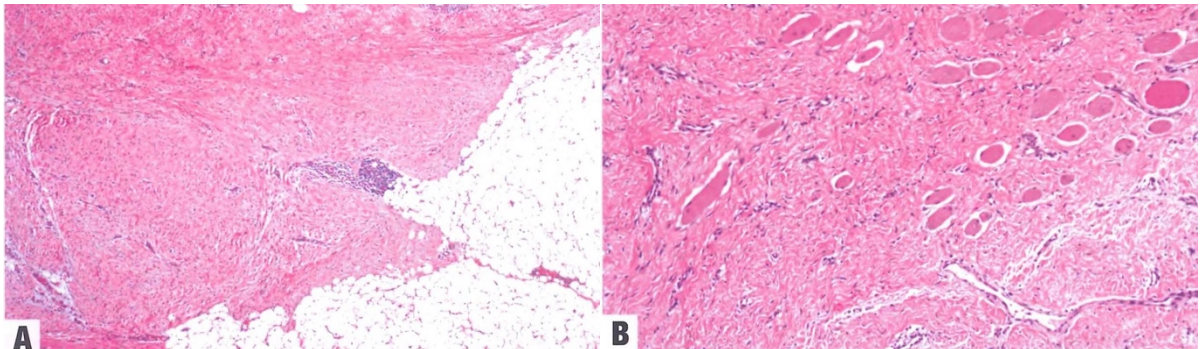


Figure 5. Fibromatose

D'après, CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération fait de longs faisceaux infiltrant le tissu adjacent (a). Infiltration du tissu musculaire adjacent (b).

*Les lipofibromatoses

Il s'agit d'une entité récente, distinguée des fibromatoses en 2000 (12). Ces tumeurs pédiatriques sous-cutanées surviennent préférentiellement au niveau des mains, des bras, des pieds, des jambes et du tronc. Histologiquement, elles sont constituées de tissu adipeux mature mêlé à des faisceaux de fibroblastes, enserrant les lobules adipeux sans les détruire, contrairement aux fibromatoses. L'interface entre le tissu adipeux et fibreux contient classiquement des cellules univacuolisées nommées pseudo-lipoblastes. Il s'y associe un stroma collagénique plus ou moins important (Fig6). Les cellules fusiformes expriment le CD34, l'AML et de manière inconstante la protéine S100. Ces caractéristiques morphologiques sont peu spécifiques. Les anomalies moléculaires observées dans ces tumeurs sont disparates, avec une fraction comportant des fusions *FNI-EGF*, faisant discuter un continuum lésionnel avec les fibromes aponévrotiques calcifiants (7), tandis qu'une autre minorité, exprimant en immunohistochimie le CD34 et la protéine S100, présentent des fusions de *NTRK1*. Ces tumeurs avaient initialement été dénommées tumeur nerveuse pseudo-lipofibromateuse du fait de leur profil immunohistochimique (13).

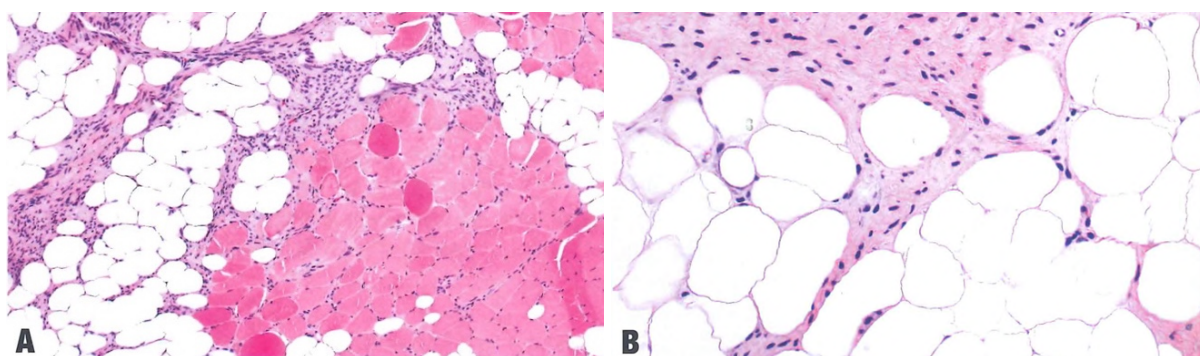


Figure 6. Lipofibromatose

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération constituée de faisceaux de fibroblastes enserrant des lobules de tissus adipeux matures avec une infiltration du tissu musculaire adjacent (a, b).

*Les fibroblastomes à cellules géantes

Ces tumeurs sont majoritairement retrouvées chez le jeune enfant avec une prédominance chez les garçons. Elles sont sous-cutanées, préférentiellement localisées au niveau du tronc, de l'aîne et de la région axillaire. Histologiquement, elles ont des aspects très proches des dermatofibrosarcomes portuberans (DFSP). Il s'agit d'une prolifération tumorale d'architecture fasciculée. Les cellules tumorales sont monotones, fusiformes ou étoilées, accompagnées de cellules géantes multinucléées, dont les noyaux adoptent une disposition en couronne. La prolifération s'accompagne d'un stroma abondant collagénique ou myxoïde. Ces tumeurs infiltrent le tissu adipeux selon un pattern dit « en rayon de miel » et épargnent les annexes cutanées (Fig7). Les mitoses sont rares et la nécrose tumorale absente. En immunohistochimie, les cellules tumorales expriment le CD34. Au niveau moléculaire, les fibroblastomes à cellules géantes sont caractérisés par la présence d'un transcrite de fusion *COL1A1-PDGFB*, également retrouvé dans les DFSP (3).

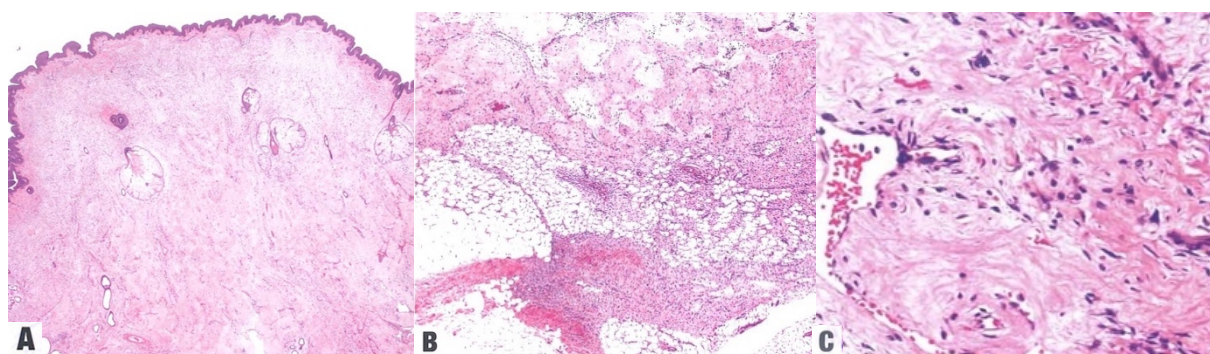


Figure 7. Fibroblastome à cellules géantes

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération sous-cutanée accompagnée d'un stroma riche en collagène (a), infiltrant l'hypoderme en « rayon de miel » (b) avec au plus fort grossissement la présence de cellules fusiformes associées à des cellules multinucléées (c).

Notre étude a également inclus plusieurs tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques d'agressivité intermédiaire, très rarement métastatiques :

*Les dermatofibrosarcomes protuberans (DFSP)

Ces tumeurs atteignent la plus souvent l'adulte bien que quelques cas congénitaux et pédiatriques soient décrits. Il s'agit de tumeurs cutanées à croissance lente, préférentiellement

localisées au niveau du tronc et des membres supérieurs (14). Histologiquement, ces tumeurs sont caractérisées par une prolifération d'architecture storiforme atteignant le derme ou l'hypoderme. Les cellules tumorales sont fusiformes avec un cytoplasme abondant éosinophile et des noyaux allongés d'aspect monotone. Des mitoses peuvent être présentes. En périphérie, la prolifération infiltre le tissu adipeux selon un pattern dit « en rayon de miel ». Classiquement, les structures annexielles sont épargnées. Le stroma peut être collagénique, myxoïde ou microkystique (Fig8). Plusieurs variants sont décrits, les plus fréquents étant : la tumeur de Brednar, correspondant à la présence de mélanocytes pigmentés accompagnant la lésion, le variant avec cellules géantes et le variant avec stroma myxoïde. En immunohistochimie, les cellules tumorales expriment de manière forte et diffuse le CD34. La protéine S100 est négative. Ces tumeurs peuvent se transformer en fibrosarcome, tumeur maligne de plus mauvais pronostic. Histologiquement, cette transformation se caractérise par une hypercellularité, une architecture fasciculée, une vascularisation hémangiopéricytaire, des atypies cytonucléaires marquées avec des noyaux pléomorphes et hyperchromatiques, ainsi qu'un nombre de mitoses augmenté et une expression du CD34 diminuée voir absente (Fig8). Au niveau moléculaire, les DFSP sont caractérisés par la présence de réarrangements des gènes *PDGFB* ou *PDGFD* avec comme chef de file le transcrite de fusion *COL1A1-PDGFB*, et plus rarement décrites les fusions *COL1A2-PDGFB*, *COL6A3-PDGFD* et *EMILIN2-PDGFD* (3).

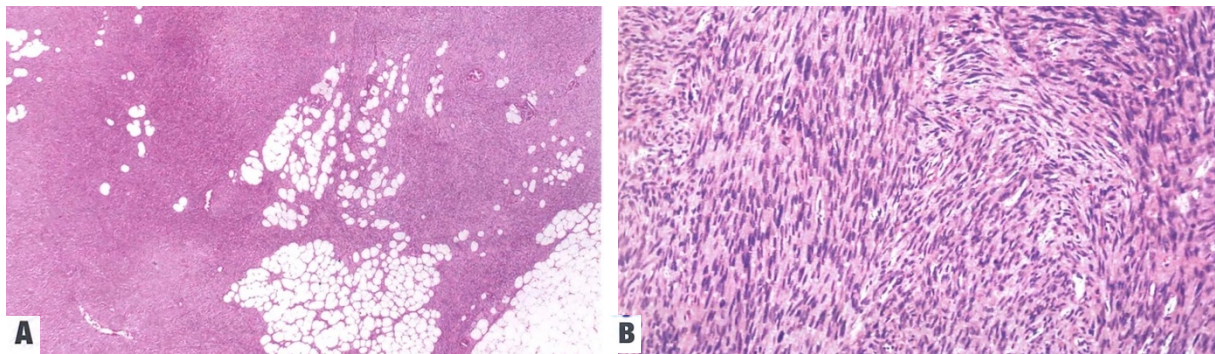


Figure 8. Dermatofibrosarcome protuberans et transformation fibrosarcomateuse

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération storiforme avec infiltration en « rayon de miel » du tissu adipeux adjacent, correspondant à un DFSP (a). Transformation fibrosarcomateuse caractérisée par une prolifération fasciculée hypercellulaire avec atypies cytonucléaires et nombreuses mitoses (b).

*Les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires (TMI)

Ces tumeurs atteignent préférentiellement l'enfant ou le jeune adulte, principalement au niveau de l'abdomen suivi des poumons, du médiastin, de la tête, du cou, du tractus intestinal et du tractus uro-génital. Histologiquement, il s'agit d'une prolifération fait de courts faisceaux de cellules myofibroblastiques fusocellulaires ou stellaires, étroitement mêlées à un infiltrat inflammatoire. Cet infiltrat se compose majoritairement de lymphocytes et plasmocytes et plus rarement de polynucléaires éosinophiles ou de cellules géantes. Des mitoses ainsi que des atypies peuvent être présentes. Un stroma myxoïde ou hyalin accompagne fréquemment la prolifération tumorale (Fig9). Le variant épithélioïde de la TMI, caractérisé par une composante majoritaire de cellules épithélioïdes, est de plus mauvais pronostic. Il s'accompagne souvent d'un abondant contingent neutrophilique et d'un abondant stroma myxoïde. En immunohistochimie les cellules tumorales expriment de manière variable l'AML. Au niveau moléculaire, les TMI sont caractérisées par la présence d'un réarrangement du gène *ALK* ou plus rarement des gènes *ROSI* ou *RET* (3).

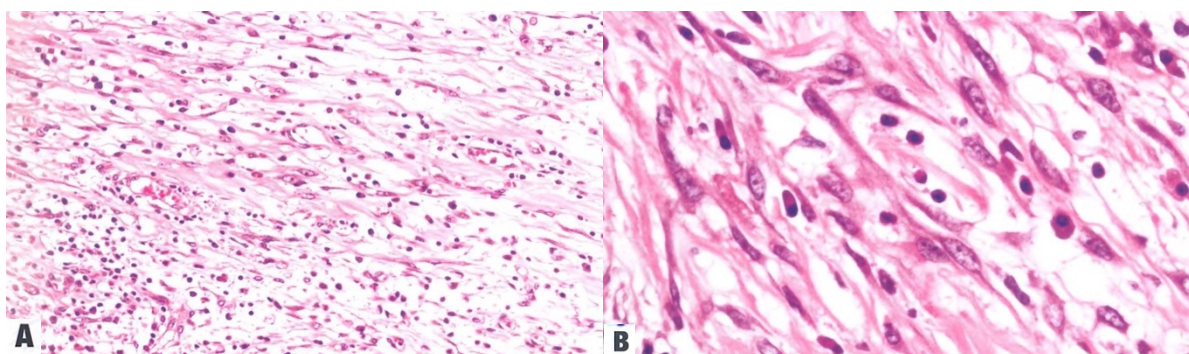


Figure 9. Tumeur myofibroblastique inflammatoire

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération de myofibroblastes agencés en courts faisceaux disposés sur un fond myxoïde et inflammatoire (a, b).

*Les fibrosarcomes infantiles (FSI)

Ces tumeurs atteignent les enfants, le plus souvent avant 2 ans. Elles sont localisées préférentiellement au niveau des extrémités. Il s'agit de masses dont la croissance rapide se fait au dépend des structures adjacentes. Le traitement est chirurgical, parfois très délabrant, et peut s'accompagner d'une chimiothérapie. Histologiquement, il s'agit d'une prolifération lobulée, mal limitée, infiltrant les structures adjacentes. Cette prolifération est très cellulaire, constituée de cellules fusiformes agencées en longs faisceaux ou en « banc de poisson ». Les cellules tumorales sont monomorphes, d'aspect immature, avec des noyaux discrètement irréguliers et des cytoplasmes éosinophiles mal définis. Les mitoses sont fréquentes. La présence de plages de suffusions hémorragiques est caractéristique. De la nécrose tumorale peut être observée. La prolifération tumorale est accompagnée d'un infiltrat inflammatoire épars, composé de lymphocytes, plasmocytes et de plus rares mastocytes ou polynucléaires éosinophiles (15) (Fig10). L'étude immunohistochimique est peu spécifique avec une expression variable de l'AML, du CD34 et de la protéine S100 (3). Les FSI sont définis par la présence d'un transcrite de fusion *ETV6-NTRK3* ou plus rarement de réarrangements des gènes *NTRK1*, *NTRK2*, *BRAF* ou *MET*. Ces anomalies génétiques représentent une importante clé du diagnostic (3).

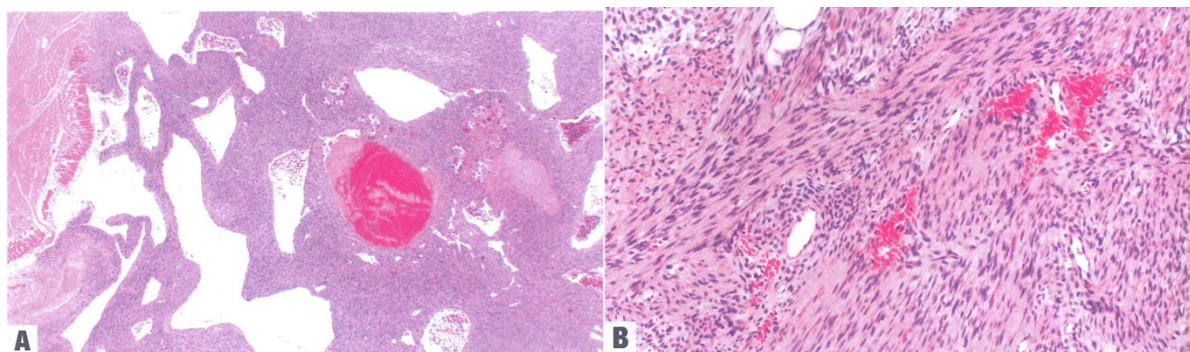


Figure 10. Fibrosarcome infantile

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération densément cellulaire accompagnée de nombreux vaisseaux ectasiques et de zones de suffusions hémorragiques (a). Au plus fort grossissement on observe des cellules fusiformes d'aspect monotone disposées en « banc de poissons » (b).

d) Tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques malignes

*Les fibrosarcomes de l'adulte

Cette entité débattue du fait de ses aspects peu spécifiques est un diagnostic d'élimination. Ces tumeurs surviennent majoritairement chez l'homme d'âge moyen ou âgé, préférentiellement au niveau des extrémités, du tronc, de la tête et du cou. Histologiquement, leur aspect est semblable à celui des fibrosarcomes infantiles avec une prolifération fasciculée, fait de longs ou de courts faisceaux en banc de poissons, très cellulaire. Les cellules sont fusiformes et monotones. Les noyaux peuvent être discrètement irréguliers, hyperchromatiques ou avec des nucléoles proéminents. De nombreuses mitoses et de la nécrose tumorale sont souvent retrouvées. Un stroma collagénique d'abondance variable accompagne fréquemment la lésion. La présence d'une vascularisation hémangiopéricytaire est classique (Fig11). En immunohistochimie, il existe une expression focale de l'AML, tandis qu'une expression du CD34 par les cellules tumorales doit orienter vers les diagnostics de DFSP transformé en fibrosarcome ou de tumeur fibreuse solitaire maligne (3).

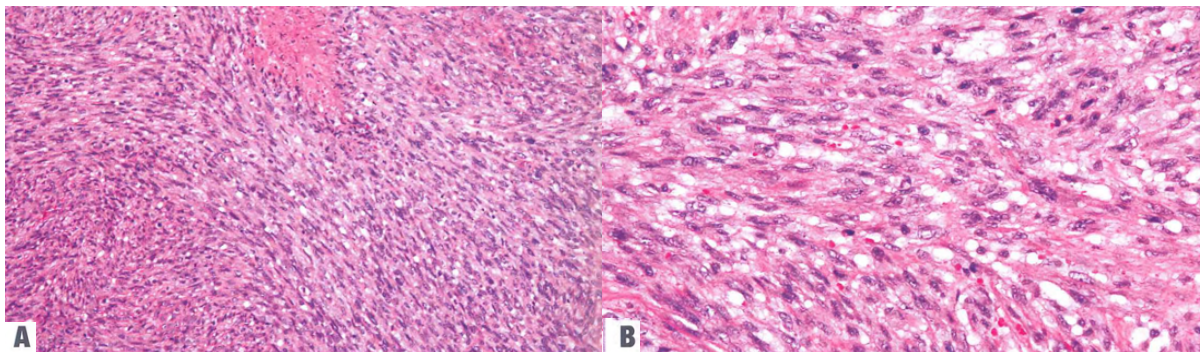


Figure 11. Fibrosarcome de l'adulte

D'après CDM F, JA B, PCW H, F M. Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.

Prolifération fasciculée, densément cellulaire, avec nécrose tumorale (a). Au plus fort grossissement on observe des cellules fusiformes, d'aspect monotones, avec atypies cytonucléaires modérées (b).

B/ Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques

a) Les techniques de séquençage de l'ARN

Au cours des dernières années la prise en charge diagnostique des tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques a beaucoup évolué du fait de l'avènement des techniques de biologie moléculaire et notamment du séquençage de l'ARN. Le séquençage de l'ARN (RNA-seq) permet l'étude du transcriptome, correspondant à l'ensemble des ARN présents dans une cellule à un moment donné. Ce transcriptome est le reflet de l'expression des gènes. Il existe deux types de RNA-seq : le RNA-seq ciblé, permettant d'identifier des gènes appartenant à un panel connu et prédéfini, et le RNA-seq non ciblé (whole RNA-seq), identifiant l'ensemble des transcrits d'ARN messenger (ARNm) -mais selon les protocoles d'extraction des fractions spécifiques d'ARNs peuvent être étudiées comme les microARNs (miARNs)- extraits du prélèvement, permettant ainsi de mettre en évidence des transcrits de fusion dont les partenaires de fusion et la localisation des points de cassure sont inconnus. Les deux techniques diffèrent au niveau des premières étapes : le RNA-seq ciblé comporte une étape de capture/sélection d'une fraction des ARN extraits qui seront ensuite transformés en ADN alors que pour le whole RNA-seq l'ensemble des ARN extraits seront transformés en ADN puis fragmentés en segments de taille uniforme. Les brins d'ADN ainsi obtenus vont être amplifiés par PCR (réaction de polymérase en chaîne) afin de former des clusters de brins d'ADN dont les signaux seront détectables. Ces brins seront alors séquencés, afin de déterminer pour chacun sa séquence nucléotidique. Notre étude utilise la technique de séquençage développée par Illumina. Cette technique se base sur des PCR utilisant 4 terminateurs réversibles marqués avec différents fluorophores. A l'aide d'un laser, la fluorescence émise par chaque cluster est mesurée à chaque cycle permettant d'identifier au fil du séquençage la base incorporée. Entre deux cycles les réactifs sont lavés et de nouveaux terminateurs réversibles marqués sont ajoutés. L'opération est ainsi répétée jusqu'au séquençage complet des brins d'ADNc. Les séquences nucléotidiques ainsi obtenues sont dénommées « read ». Ce séquençage dit « haut débit » génère des millions de « read ». Lors du séquençage utilisé pour cette étude 72,86 millions de reads ont été obtenus en moyenne par échantillon avec des extrêmes variant de 2,27 millions de reads à 273,12 millions de reads. Afin de rendre ces données exploitables des analyses bioinformatiques sont nécessaires.

b) Les réarrangements chromosomiques

Un réarrangement chromosomique est une altération génétique provenant d'une cassure d'un ou plusieurs chromosomes suivis d'une réparation entraînant une modification de la structure du chromosome. Les réarrangements intéressant des segments de différents chromosomes sont appelés translocations. Ces cassures peuvent être à l'origine de nouveaux gènes appelés gènes de fusion, qui pourront être transcrits en ARN, formant alors des transcrits de fusion. Ces derniers pourront être traduits en protéines chimériques, potentiellement à l'origine d'un processus oncogène. Certains réarrangements chromosomiques surviennent à faible fréquence dans de nombreuses tumeurs communes, ils sont dits réarrangements « passager ». Ils ne sont pas initiateurs de l'oncogenèse mais apparaissent secondairement lors de la progression tumorale. Par opposition, les réarrangements récurrents dits « driver » jouent un rôle dans l'initiation de l'oncogenèse et sont retrouvés à haute fréquence dans des tumeurs rares. Au cours de ces dernières années de nombreux réarrangements récurrents spécifiques de certaines tumeurs conjonctives ont été découverts et ont apporté une importante aide diagnostique.

C/ Les réarrangements des gènes *NTRK* (Neurotrophic tyrosine kinase receptor)

a) La famille des récepteurs TRK

La famille des récepteurs TRK (Tropomyosin receptor kinase) est composée des protéines TRK-A, TRK-B et TRK-C respectivement codées par les gènes *NTRK1* (chromosome 1q21-q22), *NTRK2* (chromosome 9q22.1) et *NTRK3* (chromosome 15q25). Ces récepteurs sont principalement présents dans les tissus neuronaux mais également retrouvés au niveau des vaisseaux, des ovaires et du système immunitaire. Il s'agit de protéines transmembranaires à activité tyrosine kinase, activées par les neurotrophines, famille de molécules comportant NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-4 (neurotrophin 4) et NT-3 (neurotrophin 3). Ces ligands possèdent des affinités différentes en fonction du récepteur TRK. La liaison des neurotrophines aux récepteurs TRK entraîne leur dimérisation, responsable d'une autophosphorylation des résidus tyrosine de leur domaine intracellulaire, à l'origine de l'activation de différentes voies de signalisation :

- TRK-A va entraîner une activation de la voie RAS/ERK
- TRK-B active les voies de signalisation RAS/ERK, PI3K et PLC γ

- TRK-C active la voie de signalisation PI3K/AKT

L'activation de ces voies de signalisation va provoquer une augmentation de la prolifération et de la croissance cellulaire, une prévention de l'apoptose et/ou une différenciation neuronale, jouant un rôle essentiel lors du développement embryologique, de la différenciation et de la survie des neurones. Ils sont également impliqués dans la formation synaptique, la plasticité, la formation axonal et dendritique, éléments essentiels notamment pour la formation et la rétention de la mémoire. De plus, ils interviennent dans la survie et la différenciation des ganglions sensitifs avec des rôles différents selon le type de récepteur :

- les récepteurs TRK-A sont exprimés au niveau des neurones de la racine dorsale et du ganglion trigéminal et orientent vers une différenciation nociceptive, expliquant leur association avec des maladies héréditaires sensorielles comme l'insensibilité congénitale avec anhidrose.

- les récepteurs TRK-C sont également exprimés au niveau des neurones de la racine dorsale mais orientent vers une différenciation proprioceptive.

- les récepteurs TRK-B sont retrouvés au niveau des neurones du ganglion inférieur du nerf vague, impliqués dans l'innervation sensorielle des viscères (cœur, tractus respiratoire et gastro-intestinal) et véhiculant les informations sensorielles concernant la pression sanguine et le pH. Ainsi, des anomalies au niveau de ces récepteurs peuvent entraîner la perte du contrôle de l'appétit. (16,17) (Fig12)

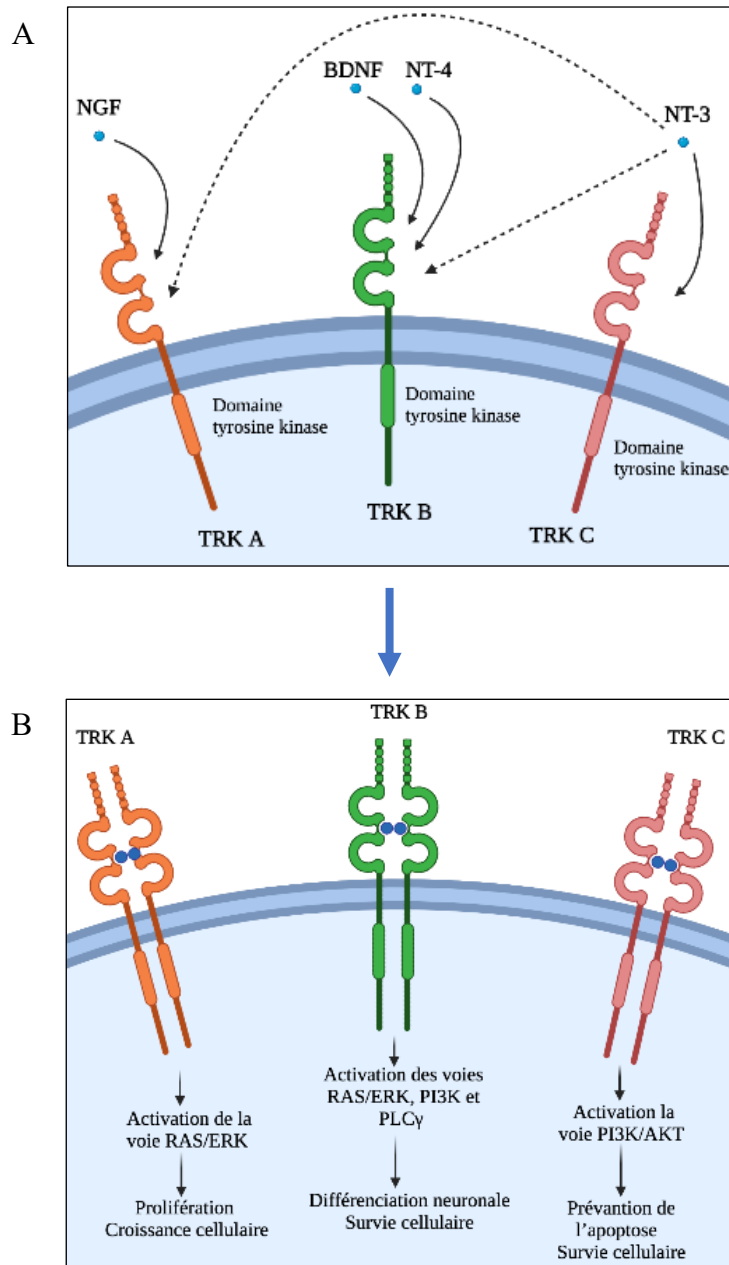


Figure 12. Schéma de l'activation des récepteurs TRK

(Réalisé avec BioRender.com)

Récepteurs TRK non activés (a). Les neurotrophines se lient aux récepteurs TRK selon leur affinité, entraînant leur dimérisation, responsable de l'activation de diverses voies cellulaires (b).

b) Les réarrangements des gènes *NTRK* dans les tissus conjonctifs

En 1996, des fusions récurrentes *ETV6-NTRK3* ont été décrites pour la première fois dans les fibrosarcomes infantiles (18). En 2016, des réarrangements du gène *NTRK1* ont été mis en évidence dans des lipofibromatoses au profil immunohistochimique particulier, exprimant la protéine S100 et le CD34. Cette nouvelle entité fut initialement dénommée tumeur neurale pseudo-lipofibromateuse, en rapport avec son immunophénotype neural (13). Par la suite, il a été révélé que d'autres tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques associées à d'autres patterns morphologiques comportaient des réarrangements des gènes *NTRK*, complexifiant la vision initiale de ces tumeurs. Devant le caractère peu spécifique de ces lésions, tant au niveau clinique que morphologique, elles ont été renommées tumeurs fusocellulaires avec réarrangement de *NTRK*. Ces tumeurs sont considérées comme à malignité intermédiaire, d'agressivité locale (19–23) mais de rares évolutions métastatiques sont décrites, seulement dans certains sous types morphologiques comme les fibrosarcomes de l'adulte (20,21,23–26).

Les tumeurs à malignité intermédiaire surviennent majoritairement chez l'enfant. Leur localisation est ubiquitaire avec une prédominance au niveau du tronc et des membres. Leur aspect histologique, caractérisé par une prolifération de cellules fusiformes, monomorphes, est peu spécifique. Ces proliférations s'accompagnent d'un stroma collagénique ou focalement myxoïde d'abondance variable, avec fréquemment un renforcement hyalin péri-vasculaire. Une vascularisation hémangiopéricytaire est souvent décrite ainsi qu'un infiltrat inflammatoire chronique. Les mitoses sont peu nombreuses et la nécrose tumorale absente. En immunohistochimie, la plupart de ces lésions expriment le CD34 et la protéine S100. Les diagnostics initiaux sont très variables, comportant des myopéricytomes/myofibromes, des hémangiomes infantiles, des schwannomes, des tumeurs histiocytaires ou néoplasmes à cellules dendritiques inclassés, des tumeurs neuroectodermiques primitives (PNET) et des pseudo-sarcomes hémangiopéricytaires, myofibroblastiques ou myopéricytaires. Les réarrangements retrouvés intéressent le plus souvent le gène *NTRK1* mais des réarrangements des gènes *NTRK2* et *NTRK3* sont également décrits. Les partenaires de fusion les plus fréquemment retrouvés sont *LMNA*, *TPM3* et *TPR* (19–23).

Les tumeurs malignes intéressent quant à elles majoritairement la femme adulte, bien que des cas pédiatriques aient également été décrits. Leur localisation est ubiquitaire, touchant les tissus mous et les organes internes tels que les poumons, l'utérus ou le tractus digestif. Histologiquement, ces tumeurs sont densément cellulaires ou hétérogènes alternant des zones très cellulaires et peu cellulaires. Elles ont une architecture storiforme ou fasciculée. Les cellules tumorales sont fusiformes avec des atypies modérées à sévères. Le stroma est plus ou

moins collagénique, parfois accompagné de foyers myxoïdes. Une vascularisation hémangiopéricytaire est parfois décrite. Les mitoses sont le plus souvent nombreuses et de la nécrose tumorale est fréquemment observée. En immunohistochimie, l'expression de la protéine S100 et du CD34 sont très variables. Les diagnostics différentiels pour ces tumeurs comportent les tumeurs malignes des gaines périphériques (MPNST), la tumeur fibreuse solitaire maligne, le fibrosarcome de l'adulte, le synoviosarcome. Les réarrangements intéressent le plus souvent le gène *NTRK3* avec comme partenaires de fusion les gènes *ETV6*, *STRN*, *STRN3* ou *TGF*. Plus rarement, des réarrangements du gène *NTRK1* sont rapportés avec comme partenaires de fusion les gènes *TPM3* ou *LMNA* ainsi qu'un transcrite *NTRK2-MTMR2*. (20,21,24–26). Parmi ces tumeurs malignes, les sarcomes utérins avec réarrangement de *NTRK* ont été individualisés. Ces tumeurs atteignent préférentiellement la femme jeune. L'histologie est superposable à celle des autres tumeurs malignes avec réarrangements de *NTRK*. Au niveau de l'immunohistochimie la majorité des cas rapportés expriment la protéine S100 et le CD34. Les diagnostics différentiels comportent les sarcomes du stroma endométrial de haut grade, les MPNST et les adénosarcomes. Les réarrangements concernent majoritairement le gène *NTRK1* avec comme partenaires *TPM3*, *LMNA* ou *TPR* et plus rarement le gène *NTRK3* avec comme partenaire *RBPMS*, *EML4* ou *SPECC1L* (27–30). Enfin, des réarrangements de *NTRK* ont été décrits dans des tumeurs présentant classiquement d'autres fusions récurrentes, comme les TMI avec plusieurs cas comportant des transcrits de fusion *ETV6-NTRK3* (20,25,31,32), les DFSP où des fusions *EML4-NTRK3* ont été décrites (33) et *LMNA-NTRK1* (34), ainsi que des tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) (35,36).

c) Les réarrangements des gènes *NTRK* hors des tumeurs du tissu conjonctif

Les réarrangements des gènes *NTRK* hors tissus conjonctifs sont principalement des réarrangements « passager » retrouvées à faible fréquence dans de nombreuses tumeurs communes telles que les carcinomes colorectaux, les carcinomes papillaires de la thyroïde, les carcinomes pulmonaires non à petites cellules, les mélanomes, les tumeurs du système nerveux central ainsi que dans certains cancers hématologiques tels que la leucémie lymphoblastique aigue et la leucémie myéloïde aigue (16).

Des réarrangements récurrents « driver » du gène *NTRK*, jouant un rôle dans l'initiation de l'oncogénèse ont également été rapportés hors des tissus mous. Le transcrite de fusion *ETV6-NTRK3* a été mis en évidence dans les néphromes congénitales mésoblastiques, tumeurs rénales dont les caractéristiques cliniques et histologiques sont proches de ceux des fibrosarcomes infantiles (37), ainsi que dans les carcinomes sécrétant mammaires, sous-type rare de carcinome

mammaire infiltrant (38) et son homologue salivaire la carcinome sécrétant salivaire de type mammaire (39). Des réarrangements récurrents de *NTRK1*, 2 et 3 ont également été rapportés dans des gliomes pédiatriques (40). Enfin, les tumeurs mélanocytaires de Spitz possèdent des voies d'oncogénèse différentes des tumeurs mélanocytaires classiques caractérisées par des réarrangements de gènes codant pour les protéines kinases *ROS1*, *NTRK1/2/3*, *ALK*, *BRAF* ou *RET*. Ces tumeurs surviennent préférentiellement chez l'enfant, avec un spectre lésionnel s'étendant du nævus au mélanome spitzoïde (41,42).

D/ Enjeu thérapeutique du dépistage des réarrangements *NTRK*

a) La thérapie ciblée

Le dépistage des tumeurs avec réarrangements de *NTRK* est devenu particulièrement important depuis l'existence de thérapies ciblées visant ces altérations génétiques. Le larotrectinib (également nommé BAY2757556, LOXO-101 et ARRY-470) est la première molécule à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour le traitement des patients adultes et pédiatriques atteints de tumeurs porteuses de réarrangements des gènes *NTRK* en novembre 2018 par la U.S. Food and Drug Administration (FDA) puis en 2019 par l'Agence Européenne du Médicament (EMA) (43–45). Il s'agit d'un inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) hautement spécifique des récepteurs TRK-A, B et C. Cette petite molécule agit en bloquant le site de liaison de l'ATP du domaine kinase. De nombreuses études de phase 1 et 2 menées sur des cohortes adultes et pédiatriques, ont montré une régression durable des tumeurs solides dans la majorité des cas traités, indépendamment de leur localisation et du type de tumeur. Les effets secondaires rapportés étaient tolérables avec majoritairement des effets de grade I ou II correspondant à de la fatigue, des céphalées, des nausées, des vomissements, de l'anémie, de la leucopénie et de la neutropénie (43–45).

L'entrectinib est la seconde molécule à avoir obtenu en 2019 l'approbation de la FDA et en 2020 de l'EMA pour le traitement des tumeurs solides métastatiques ou localement avancées avec réarrangements de *NTRK* (46,47). Cette molécule est un inhibiteur multikinase ciblant les récepteurs ALK, ROS et TRK. Les essais cliniques ont montré des effets anti-tumoraux durables du traitement. Les effets secondaires sont fréquents comportant des infections pulmonaires, de la prise de poids, de la fatigue, de la dyspnée, des troubles cognitifs, de l'hypotension et de la diarrhée, ... Des effets secondaires sévères ont également été rapportés : insuffisance cardiaque, effet sur le système nerveux central, fracture osseuse, hépatotoxicité,

hyperuricémie, prolongation du QT et troubles de la vision. Ces effets secondaires étaient réversibles suite à l'arrêt ou à la diminution du traitement (46,48,49).

Des résistances à ces traitements se sont développées, liées soit à des mutations survenant au niveau du site ciblé par les traitements, soit au développement de voies d'oncogenèse non dépendantes des récepteurs TRK. Afin de pallier aux résistances dû aux mutations du site de liaison des TKI, des inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération, ciblant d'autres sites du domaine kinase, ont été développés : le selitrectinib (BAY 2731954, LOXO-195), inhibiteur de tyrosine kinase sélectif ciblant TRK-A/B/C, et le repotrectinib (TPX-0005), inhibiteur de tyrosine kinase non spécifique ciblant TRK-A/B/C, ROS1 et ALK (50,51).

b) Dépistage des réarrangements de *NTRK*

Étant donné l'existence d'une thérapie ciblée, l'ESMO (European Society for Medical Oncology) recommande un dépistage systématique des réarrangements *NTRK* pour les sarcomes où des réarrangements de *NTRK* sont retrouvés à forte fréquence (FSI, TMI sans fusion de *ALK* ni de *ROS*) ou à faible fréquence (sarcome à génomique complexe, GIST sans autre fusion retrouvée) en cas de stade localement avancé, non résécable ou métastatique (52)(Fig13). Les sarcomes comportant des fusions canoniques sont éliminés de ce screening.

Les techniques de séquençage massif, tel que le whole RNA-seq, sont les techniques de référence à utiliser selon l'ESMO pour confirmer la présence de réarrangements *NTRK* avant d'initier la thérapie ciblée. Ces techniques possèdent une très haute sensibilité et spécificité pour la détection de réarrangements chromosomiques, même lorsque les partenaires de fusion sont inconnus. Néanmoins, elles requièrent une expertise pour la réalisation de la technique et l'interprétation des résultats, elles sont coûteuses et comportent de longs délais de réponse, les rendant non utilisables en pratique quotidienne.

Les recommandations de l'ESMO font une exception pour les tumeurs avec réarrangements de *NTRK* retrouvés à haute fréquence (FSI, TMI sans autre fusion), où une FISH positive suffit pour initier la thérapie ciblée. La FISH (fluorescence par hybridation in situ) est une technique utilisant des sondes marquées par des fluorophores ciblant les gènes d'intérêt. La FISH « break apart » utilise deux sondes se fixant de part et d'autre du gène principal de la fusion, en cas de réarrangement les signaux des deux sondes seront séparés. La FISH « fusion » quant à elle utilise deux sondes ciblant chaque partenaire de la fusion. En cas de fusion les signaux des sondes seront alors superposés. Cette technique est peu coûteuse et ne nécessite pas de longs délais de réalisation, néanmoins son interprétation requière également une expertise dans le

domaine et nécessite de connaître les deux partenaires de fusion pour les sondes de « fusion » et au moins un des partenaires pour les sondes « break apart ».

Enfin, les techniques d'immunohistochimie sont recommandées par l'ESMO pour le dépistage de première intention. Ces techniques peu coûteuses, rapides et faciles d'interprétation, sont fréquemment utilisées en pratique quotidienne. Dans le cadre du dépistage préconisé par l'ESMO, une expression des marqueurs immunohistochimiques de TRK dans un sarcome avec forte fréquence de réarrangements de *NTRK* nécessitera une confirmation par une technique de séquençage massif avec toutefois la possibilité d'initier la thérapie ciblée en parallèle. En cas de négativité du marquage une confirmation par séquençage sera nécessaire pour les sarcomes avec haute fréquence de réarrangements de *NTRK* alors qu'aucune analyse supplémentaire ne sera recommandée pour les sarcomes avec faible fréquence de réarrangement *NTRK* (52).

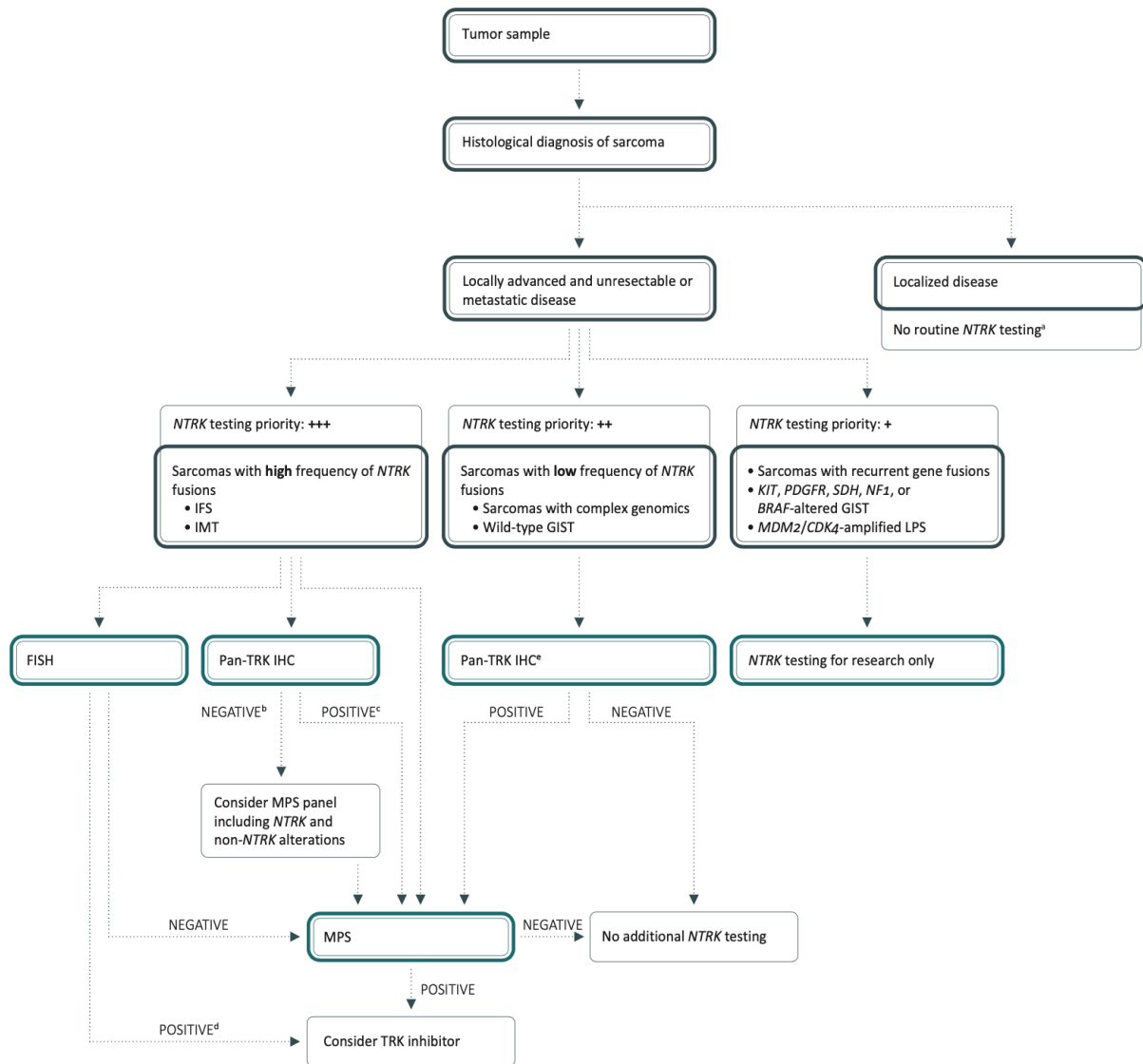


Figure 13. Recommandation de l’ESMO pour le dépistage des réarrangements *NTRK*
 D’après, *Diagnosis and management of tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion sarcomas: expert recommendations from the World Sarcoma Network, Demetri 2020*

c) La technique d’immunohistochimie

La technique d’immunohistochimie repose sur l’utilisation d’anticorps ciblant des déterminants antigéniques, encore appelés épitopes, propres à une protéine d’intérêt. Ces anticorps sont combinés à un procédé enzymatique permettant de révéler leur présence par une coloration visible au microscope.

Un anticorps est une immunoglobuline produite par l’organisme suite à la reconnaissance d’une molécule étrangère. Les immunoglobulines possèdent un domaine constant et un domaine variable, qui sera à l’origine de la spécificité de l’anticorps pour un épitope. Les anticorps

utilisés en immunohistochimie proviennent de différentes espèces animales, les anticorps de souris et de lapin étant les plus fréquents. Les anticorps peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. Un anticorps monoclonal ne reconnaît qu'un seul des épitopes d'un antigène, il est donc très spécifique mais peu sensible. Au contraire, un anticorps polyclonal reconnaît plusieurs épitopes d'un même antigène, ce qui lui confère une plus grande sensibilité, mais une spécificité moindre.

Lors de la réalisation de cette technique, l'échantillon à analyser va tout d'abord subir plusieurs étapes permettant de rendre les épitopes accessibles. Ces étapes comportent le déparaffinage du prélèvement, suivie de l'imprégnation d'une solution tampon ou « reaction buffer », saturant les sites antigéniques non spécifiques, puis d'une réhydratation de la lame. Selon les prélèvements et les anticorps utilisés une étape de démasquage antigénique à l'aide de protéases peut être ajoutée afin d'augmenter l'antigénicité du prélèvement au risque d'également augmenter la présence d'un marquage non spécifique appelé bruit de fond.

A la suite de ces étapes, l'anticorps primaire, ciblant la protéine d'intérêt, va être déposé sur la lame. La dilution de l'anticorps ainsi que le temps et la température d'incubation sont des paramètres variables permettant d'obtenir un signal plus ou moins fort. Un signal fort est idéal mais s'accompagne souvent d'un bruit de fond également plus fort. Ces paramètres doivent donc être ajustés afin d'obtenir le meilleur rapport signal/bruit de fond.

Enfin, la dernière étape est celle de la détection de l'anticorps. Le plus souvent cette étape se base sur une révélation indirecte : l'anticorps ciblant la protéine d'intérêt, appelé anticorps primaire, est reconnu par un anticorps dit secondaire qui est couplé à une enzyme. Grâce à l'utilisation d'un réactif chromogène réagissant avec cette enzyme, la présence de la protéine d'intérêt est alors révélée. Le système enzymatique le plus fréquemment utilisé est le système peroxydase-diaminobenzidine (DAB). Le prélèvement va subir une inhibition des protéases endogènes par du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 afin d'éviter toute réaction non spécifique. Ensuite, l'anticorps secondaire couplé à une enzyme de type peroxydase sera déposé sur la lame. Enfin, la DAB sera rajoutée sur la lame où sa précipitation avec la peroxydase sera à l'origine d'une coloration marron.

Des biais pré-analytiques responsables d'altérations des épitopes de la protéine d'intérêt peuvent entraîner de fausses négativités. Ces biais comportent notamment l'utilisation de certains fixateurs (ex : Bouin) ou un trop long délai de conservation.

d) Les anticorps ciblant les récepteurs TRK

A l'état physiologique, les neurones, les plexus myentériques, les cellules endothéliales et les podocytes sont les seules cellules à exprimer les protéines TRK. En cas de réarrangement de *NTRK* les cellules vont avoir une surexpression des protéines TRK, qui pourra alors être révélée en immunohistochimie.

Il existe plusieurs anticorps ciblant les récepteurs TRK, certains ciblent des domaines spécifiques des protéines TRK-A, B ou C, d'autres anticorps appelés pan-TRK ciblent des antigènes communs aux trois récepteurs, par exemple le domaine C-terminal. Tous ces anticorps n'ont pas la même sensibilité, ni la même spécificité. L'anticorps le plus fréquemment rapporté dans la littérature est l'anticorps pan-TRK clone EPR17341 (Abcam) avec une sensibilité de 75-88% et une spécificité de 81-96%. Ces pourcentages varient en fonction du gène *NTRK* réarrangé avec une sensibilité plus faible pour les tumeurs avec réarrangement de *NTRK3* (55-79%) (53,54). Le marquage peut être cytoplasmique, membranaire ou nucléaire et oriente vers le gène réarrangé avec un marquage majoritairement cytoplasmique pour les fusions *NTRK1/2* et majoritairement nucléaire pour les fusions impliquant *NTRK3* (55–57). Parmi les autres anticorps nettement moins décrits dans la littérature on trouve d'autres pan-TRK (clones ABCAM, C17F1 et EPR18413), des anticorps ciblant spécifiquement TRK-C (clone C44H5) et des anticorps ciblant spécifiquement TRK-A (clone Ab76291).

Dans notre étude nous avons testé les anticorps suivants (Tableau1) :

- pan-TRK clone A7H6R (Cell Signaling Technology)
- pan-TRK clone EPR17341 (Abacam)
- pan-TRK clone RBT-TRK (Bio SB)
- TRK-C clone C44H5 (Cell Signaling Technology)

Anticorps et clone	Fabricant	Antigène ciblé	Type d'anticorps	Dilution	Temps d'incubation	Système de révélation
Pan-TRK A7H6R	Cell Signaling Technology	TRK-A, B et C	Ac monoclonal de lapin	1/50	52 min	OptiView Universal DAB
Pan-TRK EPR17341	Abcam	TRK-A, B et C	Ac monoclonal de lapin	1/300	60 min	OptiView Universal DAB
Pan-TRK RBT-TRK	Bio SB	TRK-A, B et C	Ac monoclonal de lapin	Pré-dilué	24 min	OptiView Universal DAB
TRK-C C44H5	Cell Signaling Technology	TRK-C	Ac polyclonal de lapin	1/50	60 min	OptiView Universal DAB

Tableau 1. Caractéristiques des différents anticorps ciblant les récepteurs TRK utilisés dans notre étude

Ac : anticorps, *DAB* : diaminobenzydine

Objectif de l'étude

L'existence d'une thérapie ciblée a rendu le dépistage des tumeurs avec réarrangements *NTRK* particulièrement important. Néanmoins, leurs aspects morphologiques et leurs profils immunohistochimiques peu spécifiques rendent difficile leur dépistage. De même, un seul anticorps ciblant TRK, la pan-TRK clone EPR17341 (Abcam), a largement été étudié et montre une sensibilité imparfaite ; limitant leur diagnostic.

L'objectif de cette étude est de décrire les aspects morphologique, immunohistochimique et moléculaire de 36 tumeurs mésenchymateuses avec réarrangement de *NTRK* et de tester les performances diagnostiques de 4 anticorps ciblant TRK afin d'améliorer le dépistage de ces tumeurs.

Article en cours de finalisation ici présenté dans une version partielle

Article original

Morphological, immunohistochemical and molecular characterization of 36 *NTRK*-fused mesenchymal tumors

M. Le Quang^{1,2,3}, R. Boidot⁴, V. Velasco¹, R. Azmani¹⁴, J. Massière¹, M. Tallegas⁵, G. Chotard³, S. Croce¹, R. Perret^{1,3}, C. Charon-Barra⁶, A. Michot⁷, N. Weinbreck⁸, I. Soubeyran¹, N. Macagno⁹, V. Audard¹⁰, F. Larousserie¹¹, C. Verite¹², F. Lavrand¹³, C. Bouvier⁹, D. Geneste¹⁴, S. Lassale¹⁵, G. Mac Grogan¹, I. Hostein¹, C. Lucchesi¹⁴, JM. Coindre¹, A. Rullier³, F. Le Loarer^{1,2}

Authors' affiliations

¹ Institut Bergonié, Department of Pathology, Bordeaux, France

² University of Bordeaux, Talence, France

³ CHU Bordeaux, Department of Pathology, France

⁴ Centre Georges-François Leclerc, Department of Biopathology, Dijon, France

⁵ CHRU Tours, Department of Pathology, Tours, France

⁶ Centre Georges-François Leclerc, Department of Pathology, Dijon, France

⁷ CHU Bordeaux, Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Bordeaux, France

⁸ Medipath Pathology Laboratory, Frejus, France

⁹ Aix Marseille University, CHU Timone, Department of Pathology, Marseille, France

¹⁰ Department of Pathology, Hôpital Cochin, APHP, Paris, France

¹¹ Hôpital Cochin, Department of Pathology, Paris, France

¹² CHU Bordeaux, Department of Pediatric Onco-hematology, Bordeaux, France

¹³ Department of Pediatric Surgery, University Hospital, Bordeaux, France

¹⁴ Bioinformatics Department, Institut Bergonié, Bordeaux, France

¹⁵ CHU Nice, Hôpital Pasteur, Department of Pathology, Nice, France

Introduction

TRK receptors are membrane proteins with kinase activity including TRKA, B and C respectively encoded by *NTRK1*, *NTRK2* and *NTRK3*. *NTRK*-rearrangements are found at low frequency in many carcinomas as rearrangements “passenger” and in some rare tumors as recurrent rearrangements “driver” of the oncogenesis (16). The recurrent fusion *ETV6-NTRK3* was first found in infantile fibrosarcomas (IFS) in 1996 (37), then in secretory breast carcinomas (38) and then in mammary analogue secretory carcinomas of salivary gland (39). Because of the progress made in molecular biology techniques, many other fusions “driver” involving *NTRK1*, 2 or 3 were discovered in soft tissues’ tumors. First, recurrent fusions of *NTRK1* were reported in lipofibromatosis with an abnormal expression in immunohistochemistry of the S100 protein and CD34 (13). Afterwards rearrangements of *NTRK1*, 2 or 3 were described in many other fibroblastic/myofibroblastic tumors without specific morphology but often with an expression of CD34 and S100 (19–24). Given the unspecific characteristics of these tumors, they were named spindle cells neoplasms with *NTRK* fusion (SCN-NTRK). Some of these tumors were benign, others malignant, as the uterine fibrosarcomas with *NTRK* fusions (25,27,29,30). *NTRK* fusions were also found in some tumors classically known for having recurrent fusions of other genes than *NTRK*, as the dermatofibrosarcomas protuberans (DFSP) (33,34), the inflammatory myofibroblastic tumors (IMT) (20,25,31,32) and the gastrointestinal stromal tumors (GIST) (35,36). Outside the soft tissues, recurrent *NTRK* fusions were also reported in pediatric gliomas (40) and spitzoid melanocytic tumors (41,42).

The larotrectinib (43–45) and the entrectinib (46,47) are two tyrosine kinase inhibitors that got the Food and Drug Administration (FDA) approbation, respectively in 2018 and 2019, for the treatment of adult and pediatric patients with metastatic or locally advanced solid tumors with *NTRK*-rearrangement. According to the ESMO (European Society for Medical Oncology), techniques of massive panel sequencing are the gold standard to confirm or infirm the existence of *NTRK*-rearrangements before the introduction of a targeted therapy. An exception is made for the sarcomas with high frequency of *NTRK* fusions (IFS and IMT) for which a positive FISH is sufficient to initiate the targeted therapy (52). Nevertheless, these techniques, especially the massive panel sequencing, are expensive, time consuming and require an expertise, preventing their implementation in routine. This is the reason why several antibodies were developed to detect these fusions. The antibody pan-TRK clone EPR17341, Abcam (targeting TRKA, B and C) is the most reported in the literature with several assessments on large cohorts. His sensibility reaches 75-88% and his specificity 81-96%, with a poorer sensibility for the

tumors with *NTRK3*-rearrangement (55-79%) (53,54). The other antibodies, such as pan-TRK clones C17F1 or EPR18413, TRK-C clone C44H5 or TRK-A clone Ab76291 (13,57), have only been described in small cohorts. Although these tumors are now well known, their morphology is unspecific with new histotype frequently reported. Moreover, only one antibody has been largely assessed, with a limited sensibility, especially for the *NTRK3* fusions. Yet, it is particularly important to avoid misdiagnosed cases since a specific treatment exists.

We report herein the clinicopathological features and molecular alterations of 36 mesenchymal tumors with *NTRK* fusions to further delineate the morphological landscape associated with these fusions. Furthermore, we assessed the performances of 4 different antibodies anti-TRK.

Material and method

Sample selection

We retrieved 122 spindle cells mesenchymal neoplasms of the pathology departments of Bordeaux University Hospital (Hôpital Pellegrin) and of the comprehensive cancer center of Bordeaux (Institut Bergonié) diagnosed between 1998 and 2021. We selected histotypes where *NTRK*-rearrangements have been already described and their differential diagnosis: IFS (n=10), myofibroma/myofibromatosis (n=23), DFSP (n=11), lipofibromatosis (n=10), fibroma/fibromatosis (n=8), IMT (n=6), histiocytofibroma (n=2) and fibrous hamartoma of infancy (n=4). We also retrieved cases diagnosed as unclassified fibroblastic tumor/sarcoma (n=27). Besides we used as control cohort for the clustering analysis, calcifying aponeurotic fibroma (n=4), fasciitis (n=7), giant cell fibroblastoma (n=3), lipoblastoma (n=6) and ossifying myositis (n=1). Samples were used for the immunohistochemical and/or molecular analysis depending on material availability. All samples were fixed in 10% buffered formalin and then embedded in paraffin. All cases were centrally reviewed by pathologists (FLL, MLQ). All mesenchymal tumors are recorded in the databases of the national sarcoma pathology networks RREPS and RESOS, approved by the National Committee for Protection of Personal Data (CNIL, n°910390), in compliance with ethics principles of the chart of Helsinki. The study was approved by the scientific board of Netsarc+ and the ethical committee of Institut Bergonie.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on freshly cut (<7 days) 3 μ m-thick formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) whole tissue sections. Heat-induced antigen retrieval was

performed by Cell Ventana Conditioning buffer CC1 standard at 100°C for 64 min (pan-TRK clone ABCAM and clone RBT-TRK) or 88 min (pan-TRK clone EPR17341 and TRK-C). Staining was performed on a Benchmark ultra-automated stainer (Roche-Ventana, Tucson, AZ) with detection Kit Optiview DAB IHC (reference: 760-500). Four different antibodies targeting TRK proteins were used: three pan-TRK rabbit monoclonal antibodies targeting TRK A, B and C: clone A7H6R (Cell Signaling technology, reference: 92991, dilution: 1/50, incubation: 52 min), clone EPR17341 (Abcam, dilution: 1/300, incubation: 60 min), clone RBT-TRK (Bio SB, reference: BSB-2376-3, prediluted, incubation: 24 min) and one rabbit polyclonal targeting TRK-C (clone C44H5, Abcam, dilution: 1/50, incubation: 88 min). A spindle cell neoplasm with a known *NTRK1*-rearrangement and an IFS with a *NTRK3* fusion were used as positive external controls. The staining was reported as negative when less than 5% of cells were stained, focal between 5% and 35%, heterogeneous between 35% and 75% and diffuse beyond 75%.

Whole RNA-sequencing

Whole RNA-sequencing was performed on 106 tumors using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) material and all samples met the quality criteria. Total RNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue section using the Maxwell® RSC RNA FFPE Kit (Promega) following manufacturers' recommendations. Quantity and quality of total RNA were evaluated using Qubit (Invitrogen) and Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent) using a cut off of DV200 (defined as the percentage of RNA fragments above 200 nucleotides) above 20%. All samples passed quality criteria. Libraries were prepared with 20-100 ng of total RNA using TruSeq RNA Access Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA). Libraries were pooled by group of 12 samples. Paired-end sequencing was performed using the NextSeq 500/550 High Output V2 kit (150 cycles) on Illumina NextSeq 500 platform (Illumina, San Diego, CA). To perform the clustering analysis, gene expression values were extracted using Kallisto v0.42.5 tool8 with GENECODE release 23 genome annotation based on GRCh38 genome reference. Kallisto TPM expression values were transformed in $\log_2(\text{TPM}+2)$ and all samples were normalized together using the quantile method from the R limma package within R (version 3.1.1) environment. Clustering was performed with the R package Cluster v2.0.3 ConsensusClusterPlus v 1.46 using 1000 permutations of 80% of both samples and genes9. Agnes was used as the clustering algorithm with Pearson correlation distance and Ward's clustering method.

Anchored multiplex PCR (Archer FusionPlex)

Anchored multiplex PCR was performed as the first exploratory method in a subset of cases as previously described (58). RNA was extracted from macrodissected FFPE tumor blocks according to the protocol Maxwell® RSC RNA formalin fixed paraffin embedded Kit (Promega®). Total RNA (200 to 250 ng) was reverse transcribed to cDNA. Libraries were prepared using the CTL FusionPlex Assay for Illumina Platform (ArcherDx®) following the manufacturer's Protocol and sequenced using a MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA). Data were analysed using the CTL Target Region File with the software (Archer Analysis, version 5.0). To validate a fusion, we used a cutoff value of 5 reads with 3 unique sequencing start sites crossing the breakpoints. The quality of sequences was assessed with the following criteria: QC score of <30, a minimal total read number of 1.5 million with >7% unique fragments and >40% RNA reads.

Results

Morphological analyzes

On morphological review the 36 tumors with *NTRK* fusion displayed 6 main morphological patterns (Table1, Fig1). First tumors associated with a fibrosarcoma pattern (n=14), including the IFS (n=9), were made of long intersecting fascicles. These tumors were highly cellular with a variable amount of stroma. Areas of hemorrhage were often seen. Tumor cells had medium-sized ovoid monotonous nuclei. Mild to severe atypia characterized by important anisocaryosis and hyperchromatism were seen in 2 cases. Mitotic activity varied from 2,6 to 10 mitosis/mm² (mean of 6,6 mitosis/mm²). One case presented tumoral necrosis. Excluding the IFS, all cases expressed the S100 protein and CD34 in immunochemistry.

Some tumors were reminiscent of spindle cell neoplasms associated with *NTRK*-fusion (n=12) as they were made of a spindle cell proliferation associated with a fibrous stroma. Tumor cells had small elongated monotonous nuclei and rare cases had giant cells (n=2) or focal rhabdoid areas (n=1). Mild atypia were found in only one case. Mitotic activity varied from 0 to 12,2 mitosis/mm² (mean of 1,7 mitosis/mm²). No tumoral necrosis was seen. These tumors often infiltrated the adjacent tissue, sometimes with an aspect reminding of a lipofibromatosis (n=3). This poorly specific pattern was ascertained by the positivity of S100 protein (n=8/12) or CD34 (n=11/12).

Two tumors had DFSP pattern as they were made of a storiform proliferation of cells infiltrating fat with a honeycomb pattern. Both tumors expressed CD34 in immunohistochemistry and one also expressed the S100 protein.

One tumor had a myofibroma pattern characterized by a highly cellular, fascicular, immature proliferation with zonal appearance. The cells had abundant eosinophilic cytoplasm and ovaloid nuclei with clear chromatin. Whorling, endovascular protrusion and hemangiopericytic vascularization were often found. Mitotic activity was brisk (17,9 mitosis/mm²). This tumor expressed CD34 and the S100 protein.

A pattern reminiscent of IMT was present in one tumor. This tumor was made of spindle cells forming fascicles of variable size admixed in an inflammatory stroma. It didn't express CD34 neither the S100 protein in immunohistochemistry.

Finally, some tumors had hybrid pattern (n=6) mingling characteristics of DFSP, IMT, myofibroma and/or fibrosarcoma patterns. All these tumors expressed CD34 and the S100 protein.

Case ID	Tumor histotype	Fusion transcript*	Age(y) /Gender	Location/tumor size(mm)
NTRK-FS-like-1	Fibrosarcoma	<i>IRF2BP2(ex2)-NTRK1(ex10)</i>	66/F	Ankle (cutaneous)/25
NTRK-FS-like-2	Fibrosarcoma	<i>ETV6(ex4)-NTRK3(ex13)</i>	50/F	Stomach/300
NTRK-FS-like-3	Fibrosarcoma	<i>ETV6(ex4)-NTRK3(ex13)</i>	48/F	Pancreas/30
NTRK-FS-like-4	Fibrosarcoma	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	31/F	Cervix/30
NTRK-FS-like-5	Fibrosarcoma	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	32/F	Cervix/26
NTRK-MF-like	Myofibroma-like	<i>TPM3(ex8)-NTRK1(int11)</i>	1/M	Gingiva/NS
NTRK-SCN-1	NTRK-SCN	<i>TPR(ex21)-NTRK1(ex10)</i>	36/F	Foot sole (cutaneous)/25
NTRK-SCN-2	NTRK-SCN	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	9/F	Orbit/45
NTRK-SCN-3	NTRK-SCN	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	21/F	Thorax (soft tissue)/NS
NTRK-SCN-4	NTRK-SCN	<i>IRF2BP2(ex1)-NTRK1(ex10)</i>	32/F	Hand/NS
NTRK-SCN-7	NTRK-SCN	<i>TPM3(ex2)-NTRK1(ex10)</i>	29/F	Uterus/NS
NTRK-SCN-8	NTRK-SCN	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex12)</i>	14/M	Brain/NS
NTRK-SCN-10	Fibroblastic connective tissue nevus	<i>LMNA-NTRK1</i>	6(mo)/M	Paravertebral (cutaneous)/75
NTRK-SCN-11	Dermic fibroma	<i>RBPMS(ex5)-NTRK3(ex14)</i>	38/F	Breast (cutaneous)/NS
NTRK-SCN-12	NTRK-SCN	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex13)</i>	9/M	Abdominal wall (soft tissue)/95
NTRK-SCN-13	NTRK-SCN	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	48/F	Hand (soft tissue)/15
NTRK-SCN-14	IMT-like	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	23/F	Cervix/NS
NTRK-SCN-15	IMT-like	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	38/F	Cervix/40
IMT-6	IMT-like	<i>TPM3(ex8)-NTRK1(ex12)</i>	14(d)/M	Tibia/NS
NTRK-Hybrid-1	Hybrid IMT/ myofibroma	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex10)</i>	56/M	Finger (cutaneous)/70
NTRK-Hybrid-3	Hybrid DFSP/ myofibroma	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	44/F	Cervix/35
NTRK-Hybrid-4	Hybrid IMT/ DFSP	<i>EML4(ex2)-NTRK3(ex14)</i>	26/F	Cervix/35

Case ID	Tumor histotype	Fusion transcript*	Age(y) /Gender	Location/tumor size(mm)
NTRK-Hybrid-5	Hybrid IMT/ fibrosarcoma	<i>EML4(ex2)-NTRK3(ex14)</i>	52/F	Uterus/12
NTRK-Hybrid-6	Hybrid DFSP/ fibrosarcoma	<i>TMP3(ex4 partial)- NTRK1(ex10 partial)</i>	43/F	Cervix/48
NTRK-Hybrid-7	Hybrid IMT/LPF	<i>KHDRBS1(ex8)-NTRK3(ex14)</i>	17/F	Thigh/ND
DFSP-4	DFSP	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex10)</i>	27/M	Neck (fascia)/10
DFSP-8	DFSP	<i>KHDRBS1(ex8)-NTRK3(ex11)</i>	4(mo)/F	Abdominal wall (cutaneous)/ NS
IFS-2	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex14)</i>	1/F	Axillar (soft tissue)/NS
IFS-3	IFS	<i>ETV6-NTRK3</i>	2(mo)/M	Parotid/100
IFS-4	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	7(mo)/M	Thigh/70
IFS-5	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	3(d)/M	Bowel/16
IFS-6	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex14)</i>	2(mo)/M	Presacral (soft tissue)/NS
IFS-7	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	5(mo)/F	Chest wall (soft tissue)/NS
IFS-8	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	1/F	Paravertebral (soft tissue)/40
IFS-9	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	1(mo)/F	Pelvis (soft tissue)/NS
IFS-10	IFS	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex15)</i>	13(d) /M	Lung/100

Table 1. Cohort of *NTRK*-fused tumors

NTRK-SCN: spindle cell neoplasm with *NTRK*-fusion ; *IMT*: inflammatory myofibroblastic tumor ; *DFSP*: dermatofibrosarcoma protuberans ; *IFS*: infantile fibrosarcoma ; *y*: years ; *mo*: months ; *d*: days

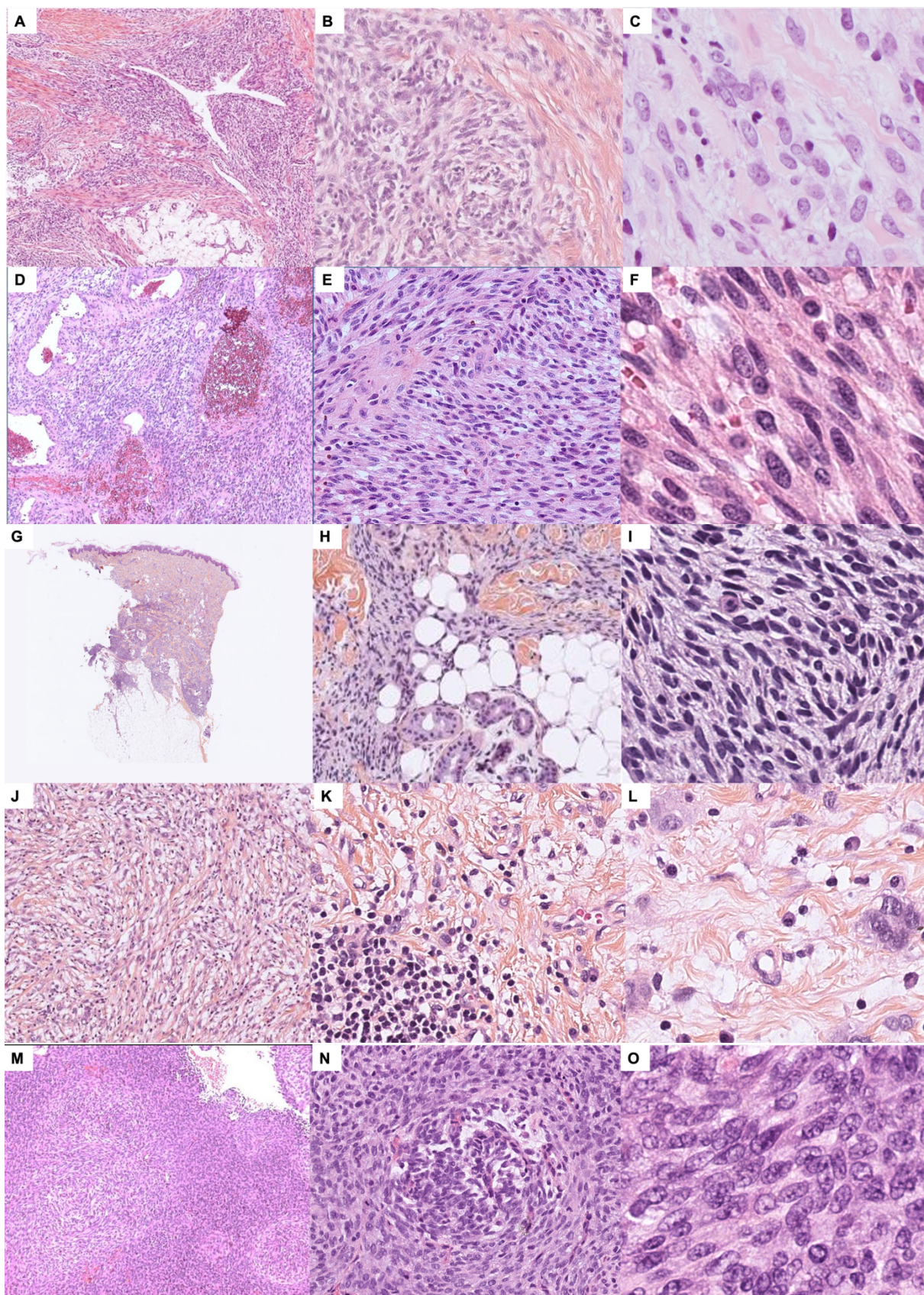


Figure 1. Morphological spectrum of *NTRK* fused tumors

Spindle cell neoplasm pattern made of fascicles infiltrating the adipose tissue associated with a fibrous stroma and hemangiopericytar vascularization (**a, b**). Cells were monomorphic without nuclear atypia (**c**).

Fibrosarcoma-like tumor made of a dense proliferation with a herringbone patten of growth, ectatic vessels and hemorrhagic areas (**d, e**). Tumors cells were fusocellular with an elongated monotonous nuclei and granular chromatin (**f**).

DFSP made of storiforme fascicles infiltrating the subcutaneous tissue with a 'honeycomb' pattern (**g, h**). Tumoral cells were bland spindle cells with elongated hyperchromatic nuclei (**i**).

IMT characterized by a proliferation of short fascicles associated with a fibrous stroma and an abundant inflammatory infiltrate (**j, k**) composed of lymphocytes, plasma cells and histiocytes including giant cells (**l**)

Myofibroma made of a highly cellular immature proliferation with zonal appearance (**m**) and whorling (**n**). Cells were bland without nuclear atypia (**o**).

RNA-sequencing results and morphological correlation

Twenty tumors had *NTRK1* fusions with the following partners: *TPM3* (n=12), *LMNA* (n=5), *IRF2BP2* (n=2) and *TPR* (n=1). Sixteen displayed *NTRK3* fusions with partners *ETV6* (n=11), *EML4* (n=2), *RBPMS* (n=1) and *KHDRBS1* (n=1) (Table1). All the breakpoints preserved the kinase domain of *NTRK1* (Fig2), but some fusions lead to a partial loss of the tyrosine kinase domain of *NTRK3* (Fig3). Among the 18 cases of *NTRK*-fused tumors other than the IFS including prospectively in our cohort, the diagnosis was made on morphology in 61% of cases, was mentioned in 17% and not mentioned in 22%. Conversely, 5 tumors suspected to represent a *NTRK*-fused neoplasm harbored no fusion or other fusions that included *BRAF*, *MET*, *RAF1* and *NCOA1*. The *NTRK1*-fused cases displayed several morphological patterns including spindle cells neoplasms (n=11), fibrosarcoma-like tumors (n=3), hybrid tumors (n=3), myofibroma (n=1), IMT (n=1) or DFSP (n=1). *NTRK3* fusions displayed also several morphological patterns including IFS (n=9), hybrid tumors (n=3), fibrosarcomas-like tumors (n=2), spindle cells neoplasm (n=1) or DFSP (n=1).

The tumors with fusions of other genes than *NTRK* were spindle cells neoplasms (n=3), hybrid DFSP/lipofibromatosis (n=1) and hybrid IFS/myofibroma (n=1).

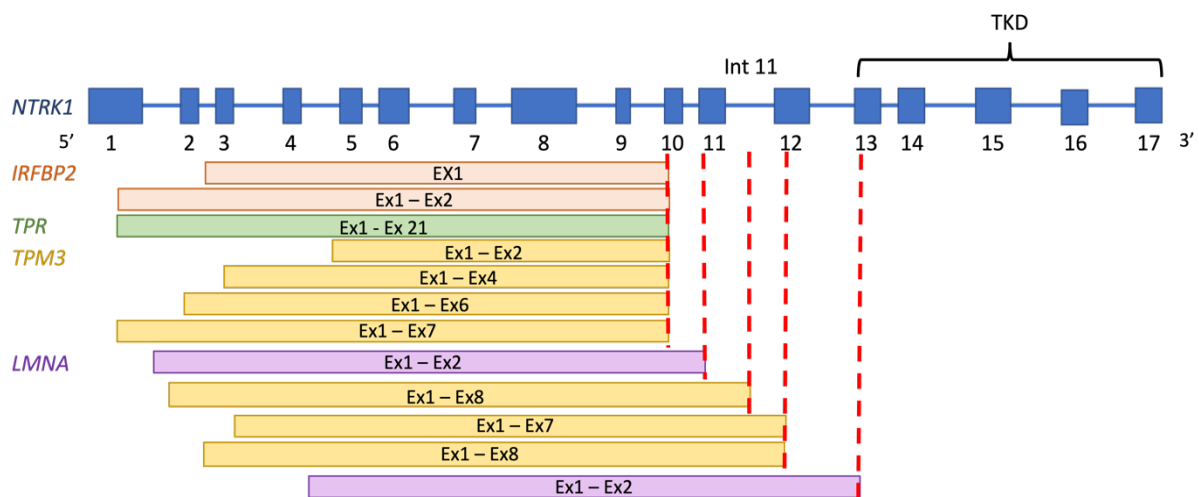


Figure 2. *NTRK1*-fusion breakpoints

Ex: exon ; *Int* : intron ; *TKD* : tyrosine kinase domain

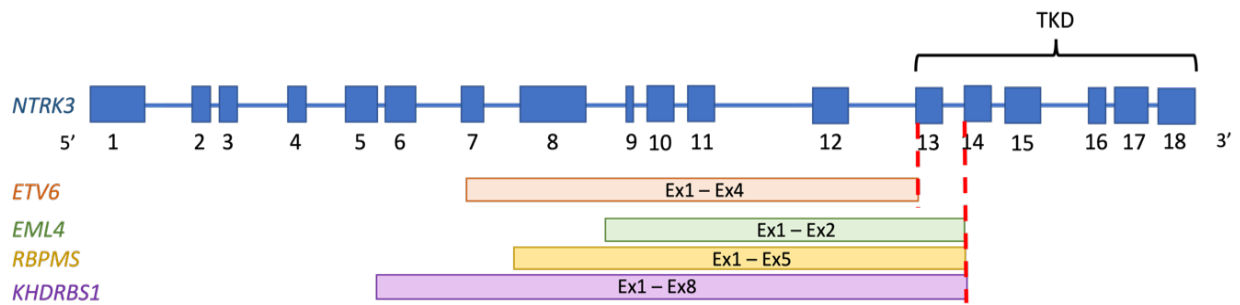


Figure 3. *NTRK3*-fusion breakpoints

Ex: exon ; *TKD:* tyrosine kinase domain

Clinical review

These tumors occurred in infants, children or adults without correlation between the age and a specific pattern or a specific fusion. Tumors with fibrosarcomas pattern were frequently developed in internal organs. Hybrid tumors were mostly located in the uterus. Other pattern occurred mostly in superficial tissues. Except for the uterine tumors which had mostly *NTRK1*-fusions (78%), tumors in internal organs had mostly *NTRK3*-fusions (71%). Superficial tumors were ubiquitous and had as well *NTRK1* and *NTRK3* fusions (Table 1). Among the 8 cases with a known follow up of at least 1 year, 2 relapsed. Patients were 1 and 36 years old at the diagnosis. Tumors were located at the gingival and the foot sole (cutaneous). Tumors histotypes were myofibroma and NTRK-SCN, both with a *NTRK1*-fusion. Two patients died of the disease, they were 52 and 66 years old at the diagnosis. Tumors were located at the ankle (cutaneous) and at the uterus. These tumors had fibrosarcoma-like and hybrid (IMT/fibrosarcoma) patterns with respectively *NTRK1* and *NTRK3*-fusion (Table2).

Case ID	Last known evolution	Clinical presentation	Mets	Treatment and response
NTRK-FS-like-1	DOD (12/2020)	Cutaneous lesion (02/2018)	Yes (multifocal)	- Surgical resection of the foot lesion (05/2018) and lung lobectomy (07/2020) : mets progression (lymph node and lung) - Doxorubicine (03/2019) : mets progression - Larotrectinib (04/2019) : mets progression and apparition of new mets - Selitrectinib (03/2020) : multifocal mets progression
NTRK-MF-like	Local relapse (07/2021)	Gingival mass	No	Surgical resection (10/2018) : relapse
NTRK-LPF-NT-1	ANED (04/2019)	Abdominal mass syndrome and general status deterioration	No	Surgical resection (04/2017)
NTRK-SCN-1	Local relapse (2017)	Foot lesion	No	- Surgical resection (12/2013) : relapse - Second surgical resection (2017) : relapse
NTRK-SCN-2	ANED (2021)	Orbit lesion	No	- Corticotherapy (10/2017 - 02/2018) : stability of the lesion - Larotrectinib (02/2018 - 04/2019) : total regression at 6 month
NTRK-Hybrid-5	DOD (3 years after resection)	Uterus mass	UK	Surgical resection (UK)
IFS-3	ANED (08/2019)	Parotid mass	No	- Neoadjuvant treatment: vincristine-actinomycine (29/04/2016 to 05/09/2016) - Parotidectomy (05/12/2016)
IFS-11	ANED (09/2020)	Unique pulmonary mass	No	Surgical resection (06/2004)

Table 2. Clinical features of *NTRK*-rearranged mesenchymal tumors

DOD : died of the disease ; *ANED* : alive with no evidence of the disease ; *UK* : unknown

Assessment of the performances of TRK antibodies by immunohistochemistry

Altogether *NTRK*-fused tumors were positive for pan-TRK (Cell Signaling) in 80,6% and pan-TRK (Abcam) in 82,9% (Table 3). Focusing on tumors with *NTRK1* fusions, the rate of staining with at least one of the antibodies was 95%. In tumors with *NTRK3* fusions, staining was positive in 68,8%. Staining in the *NTRK1*-fused tumors were mostly cytoplasmic, heterogeneous or diffuse, moderate to strong, sometimes with perinuclear dot enhancement and/or peripheral enhancement. For the *NTRK3*-fused tumors the staining was cytoplasmic or nuclear, mostly focal, weak to moderate with a peripheral enhancement. (Fig. 4)

Concerning the TRK-C antibody, none of the *NTRK3*-fused tumors expressed it.

Pan-TRK antibodies (Cell Signaling/Abcam) had been performed on 41 fibroblastic/myofibroblastic tumors without *NTRK*-rearrangement, included myofibromas (n=18), lipofibromatosis (n=7/n=8), fibromatosis (n=7), tumors suspected to have *NTRK*-fusion on morphology (n=4/n=2), CAF (n=2), unclassified fibroblastic tumor (n=1), DFSP (n=0/n=1), fibromatous hamartoma of the infancy (n=0/n=1), fasciitis (n=1) and lipoblastoma (n=1).

Pan-TRK (Cell Signaling) was expressed in 32% of the cases, mainly myofibromas. Staining was cytoplasmic, focal or heterogeneous, mostly weak to moderate, with perinuclear dot enhancement in one case. Pan-TRK (Abcam) was expressed in 10% of the cases. Staining was cytoplasmic, focal or heterogeneous. (Table 4)

This represented a sensitivity of 80,6% for pan-TRK (Cell Signaling) against 82,9% for pan-TRK (Abcam) and a specificity of 68,3% % for pan-TRK (Cell Signaling) against 90,2% for pan-TRK (Abcam). Concerning the *NTRK3*-fused tumors sensitivity reached 68,8% for pan-TRK (Cell Signaling) and 66,7% for pan-TRK (Abcam).

Pan-TRK (Bio SB) had been performed on 16 *NTRK*-fused tumors, comprising mainly cases that presented a negative or focal staining with the other pan-TRK. Pan-TRK (Bio SB) was positive in 93,8% of these cases with cytoplasmic staining, mostly weak to moderate and heterogeneous.

Case ID	Fusion transcript	pan-TRK (Cell Signaling)*	pan-TRK (Abcam)*	pan-TRK (BioSB)*	TRK-C*
NTRK-FS-like-1	<i>IRF2BP2(ex2)-NTRK1(ex10)</i>	Negative	Heterogeneous with PE	Diffuse	Negative
NTRK-FS-like-2	<i>ETV6(ex4)-NTRK3(ex13)</i>	Negative	Negative	Focal	Negative
NTRK-FS-like-3	<i>ETV6(ex4)-NTRK3(ex13)</i>	Focal peripheral staining	Negative	Focal peripheral staining	Negative
NTRK-FS-like-4	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-FS-like-5	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-MF-like	<i>TPM3(ex8)-NTRK1(int11)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	ND
NTRK-SCN-1	<i>TPR(ex21)-NTRK1(ex10)</i>	Negative	Negative	Heterogeneous	Negative
NTRK-SCN-2	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	Heterogeneous with dot and PE	Heterogeneous	Heterogeneous	Negative
NTRK-SCN-3	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	Diffuse	Diffuse (PE)	ND	Focal with PE
NTRK-SCN-4	<i>IRF2BP2(ex1)-NTRK1(ex9)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-SCN-7	<i>TPM3(ex2)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Diffuse	Diffuse	ND
NTRK-SCN-8	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex12)</i>	Diffuse	Heterogeneous	ND	ND
NTRK-SCN-10	<i>LMNA-NTRK1</i>	Diffuse	Diffuse	ND	ND
NTRK-SCN-11	<i>RBPM5(ex5)-NTRK3(ex14)</i>	Diffuse	Heterogeneous	Heterogeneous	Negative
NTRK-SCN-12	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex13)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-SCN-13	<i>LMNA(ex2)-NTRK1(ex11)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-SCN-15	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Heterogeneous with dot	ND	Negative
IMT-6	<i>TPM3(ex8)-NTRK1(ex12)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-Hybrid-1	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-Hybrid-3	<i>TMP3(ex6)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
NTRK-Hybrid-4	<i>EML4 (ex2)-NTRK3(ex14)</i>	Diffuse	Negative	ND	Negative
NTRK-Hybrid-5	<i>EML4 (ex2)-NTRK3(ex14)</i>	Heterogeneous	Diffuse	ND	Negative
NTRK-Hybrid-6	<i>TMP3(ex4)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse	Focal	ND	Negative

Case ID	Fusion transcript	pan-TRK (Cell Signaling)*	pan-TRK (Abcam)*	pan-TRK (BioSB)*	TRK-C*
NTRK-Hybrid-7	<i>KHDRBS1(ex8)-NTRK3(ex14)</i>	Diffuse	Diffuse	ND	Negative
DFSP-4	<i>TPM3(ex7)-NTRK1(ex10)</i>	Diffuse with PE	Diffuse	ND	Negative
DFSP-8	<i>KHDRBS1(ex8)-NTRK3(ex11)</i>	Negative	Diffuse	Heterogeneous	Negative
IFS-2	<i>ETV6(ex5)-NTRK3(ex14)</i>	Negative	Negative	Heterogeneous cytoplasmic and PN	Negative
IFS-3	<i>ETV6-NTRK3</i>	Heterogeneous	ND	Heterogeneous cytoplasmic and nuclear	ND
IFS-4	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Heterogeneous with PE	Focal PN	Heterogeneous cytoplasmic and PN	Negative
IFS-5	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Focal peripheral nuclear and cytoplasmic staining	Focal PN	Heterogeneous cytoplasmic and PN	Negative
IFS-6	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex14)</i>	Negative	Focal (nuclear)	Diffuse	Negative
IFS-7	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Focal PN	Focal PN	Heterogeneous cytoplasmic and PN	Negative
IFS-8	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Focal PN	Focal PN	Heterogeneous cytoplasmic and PN	Negative
IFS-9	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Negative	Negative	Negative	Negative
IFS-10	<i>ETV6 (ex5)-NTRK3(ex15)</i>	Focal PN	Focal PN	ND	Negative

Table 3. Immunohistochemistry TRK in *NTRK*-fused tumors

*cytoplasmic staining if not specified, PE : peripheral enhancement ; PN : peripheral nuclear staining ; ND: not done

Negative <5%, focal 5%-35%, heterogeneous 35%-75% and diffuse >75%

Histotype	Pan-TRK Cell Signaling*	panTRK Abcam*
Myofibroma	9/18 (4 heterogeneous, 5 focal)	2/17 (Heterogeneous)
LPF	2/7 (Heterogeneous and focal)	1/8 (Focal)
Fibromatosis	0/7	1/7 (Heterogeneous)
NTRK-SCN/hybrid	1/3 (Diffuse)	0/1
IFS	1/1 (Heterogeneous with dot)	0/1
UFibT	0/1	0/1
CAF	0/2	0/2
DFSP	ND	0/1
Fasciite	0/1	0/1
iFHa	ND	0/1
Lipoblastoma	0/1	0/1

Table 4. Immunohistochemistry TRK in the control cohort

*cytoplasmic staining if not specified, ND: not done, LPF : lipofibromatosis, UFibT : unclassified fibroblastic tumor; CAF: calcifying aponeurotic fibroma, DFSP : dermatofibrosarcoma protuberans, iFHa : fibrous hamartoma of the infancy
 Negative <5%, focal 5%-35%, heterogeneous 35%-75% and diffuse >75%

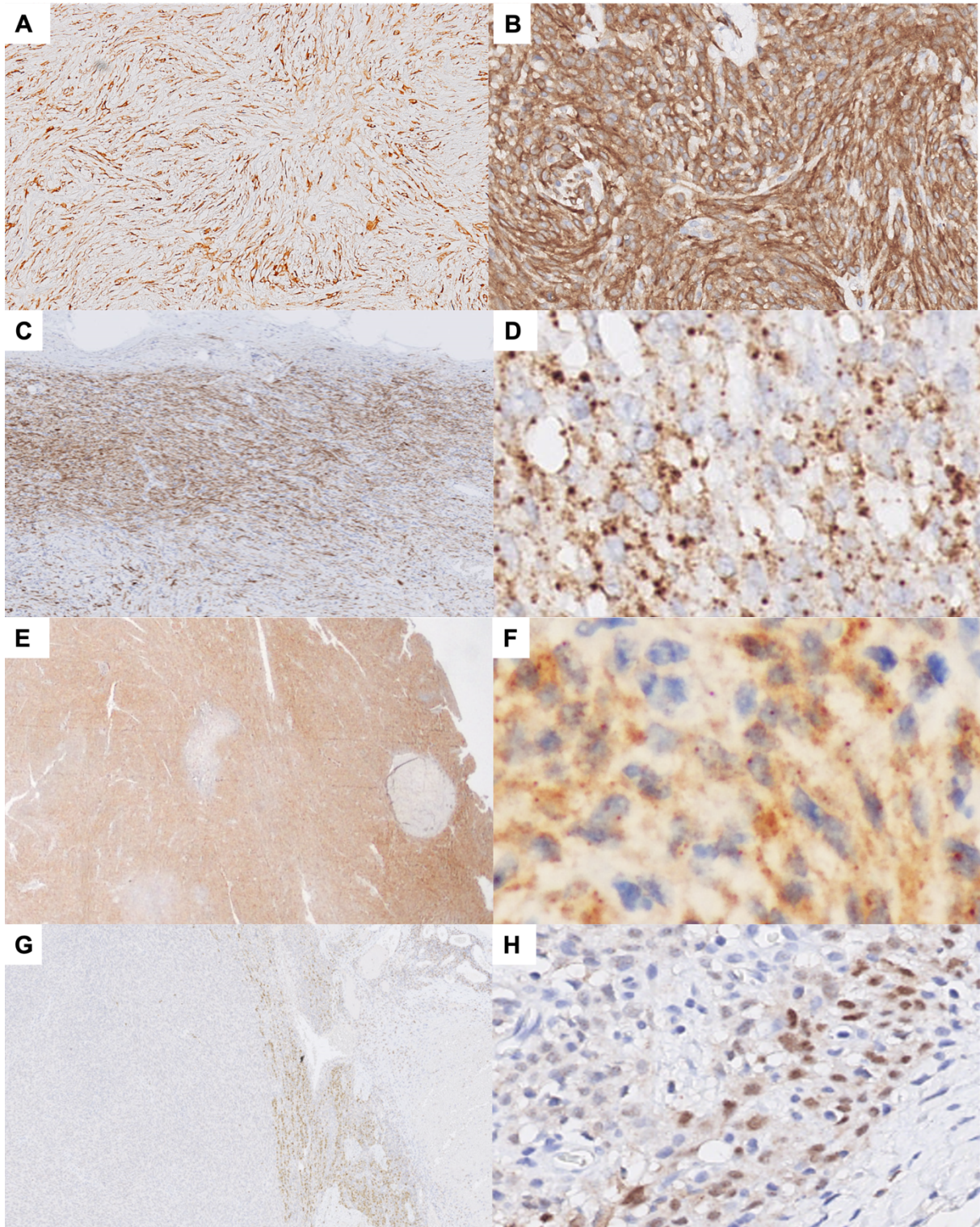


Figure 4. Immunohistochemistry anti-TRK assessment.

Pan-TRK (Cell Signaling): diffuse cytoplasmic expression in DFSP (a) and myofibroma (b).

Pan-TRK (Abcam): heterogeneous staining with peripheral enhancement in a NTRK-SCN (c) and diffuse cytoplasmic staining with perinuclear dot enhancement in a NTRK-SCN (d).

Pan-TRK (Bio SB): diffuse staining in a IFS (e) and cytoplasmic staining in a NTRK-SCN (f).

Focal peripheral nuclear staining in a IFS with pan-TRK (Abcam) (g, h).

Whole RNA-sequencing-based clustering analysis

Our clustering analysis bring 10 molecular clusters (Fig 5). *NTRK*-fused tumors were mainly found in 2 clusters, independently of their morphology. One of these clusters intermingled pattern reminiscent of *NTRK-SCN* (n=6), *NTRK-FS-like* (n=2), hybrid tumor (n=2), myofibroma (n=1) and DFSP (n=1). These tumors had fusions of *NTRK1*, *NTRK3*, *RAF1* or *MET*. They occurred in infants, children and adults. The other cluster contained IFS (n=8), *NTRK-SCN* (n=2) and *NTRK-FS-like* (n=1) with fusions of *NTRK1* or *NTRK3*. These tumors also occurred in infants, children and adults. Two tumors with *NTRK* fusions were apart. One was an IFS which clustered with myofibromas/myofibromatosis (n=6) and fasciitis (n=1). The IFS had the classical *ETV6-NTRK3* fusion, the fasciitis presented a fusion of *USP6* and one of the myofibromatosis had a fusion *TIMM23B-PARGP1*. These tumors reached both children and adults. The last tumor with *NTRK* fusion had a pattern reminiscent of DFSP and clustered with a Brednar tumor, a fasciitis and an unclassified fibroblastic tumor. These tumors respectively had the fusions *KHDRBS1-NTRK3*, *EML4-ALK*, *COL1A1-USP6* and *MINK1-PPP1R9B*. The *NTRK*-rearranged tumor was congenital, the other tumors interested children or adults.

Concerning the other myofibromas/myofibromatosis, one myofibroma and one hybrid tumor with myofibromatosis and IFS characteristics, clustered with fasciitis (n=4), including one initially diagnosed as myofibroma, one ossifying myositis and one IMT with an atypical myogenic immunophenotype. The myofibroma had a fusion *ARID1B-IL17RD*, the myofibromatosis a fusion *EML4-BRAF*, all fasciitis had *USP6* rearrangement, the ossifying myositis had no fusion and the IMT had a fusion *DCTN1-ALK*. These tumors were observed for both adults and children. The last myofibroma didn't cluster with any tumor. It had a fusion *SRF-CITED1* and occurred in a child.

Except the IMT previously described, all the others clustered together with one CAF. IMT had fusion of *ALK* or *ROS1* and the CAF presented a fusion *FNI-FGFR2*. Most of the IMT were typical, only one case was epithelioid. The cluster interested mainly adults except the IMT epithelioid that occurred in a child.

The DFPS with traditional fusion of *PDGFB* or *PDGFD*, comprising those with a fibrosarcomatous transformation, clustered together except for one case. All the DFSP arose in adults. The case apart clustered with lipoblastoma (n=6), lipofibromatosis (n=3), calcifying aponeurotic fibroma (n=3) and undetermined fibroblastic tumor (n=1). All lipoblastoma except one had fusion of *PLAG1*. CAF had fusions *FNI-FGFR2* and *FNI-EGF*. Only one LPF had a fusion that was *LRRC37B-FOSL2*. The UFibT had no fusion. These tumors concerned adults, children and infant.

One cluster molecularly close to the main cluster of DFSP gathered iFHa (n=3), GCFb (n=3) and LPF (n=2). GCFb all had fusion *COL1A1-PDGFB*. No fusion was found for the iFHa. One LPF had a fusion *ERBB3-EGFR*. These tumors arose in adults, children and infants.

The Gardner fibromas clustered together except for one. This cluster also contained fasciitis (n=1) and UFibT (n=3), including one with a fibromatosis pattern. The UFibT with fibromatosis pattern had a fusion *ABL1-DAB2IP*. The fasciitis had a fusion *VMP1-USP6*. These tumors arose in adults and children. The last Gardner fibroma didn't cluster with any other tumors. It arose in a younger patient than the other Gardner fibroma of our cohort.

Finally, the last UFibT didn't cluster with any other tumors. It had a pattern reminding a histiocytofibroma. No fusion was found for this case.

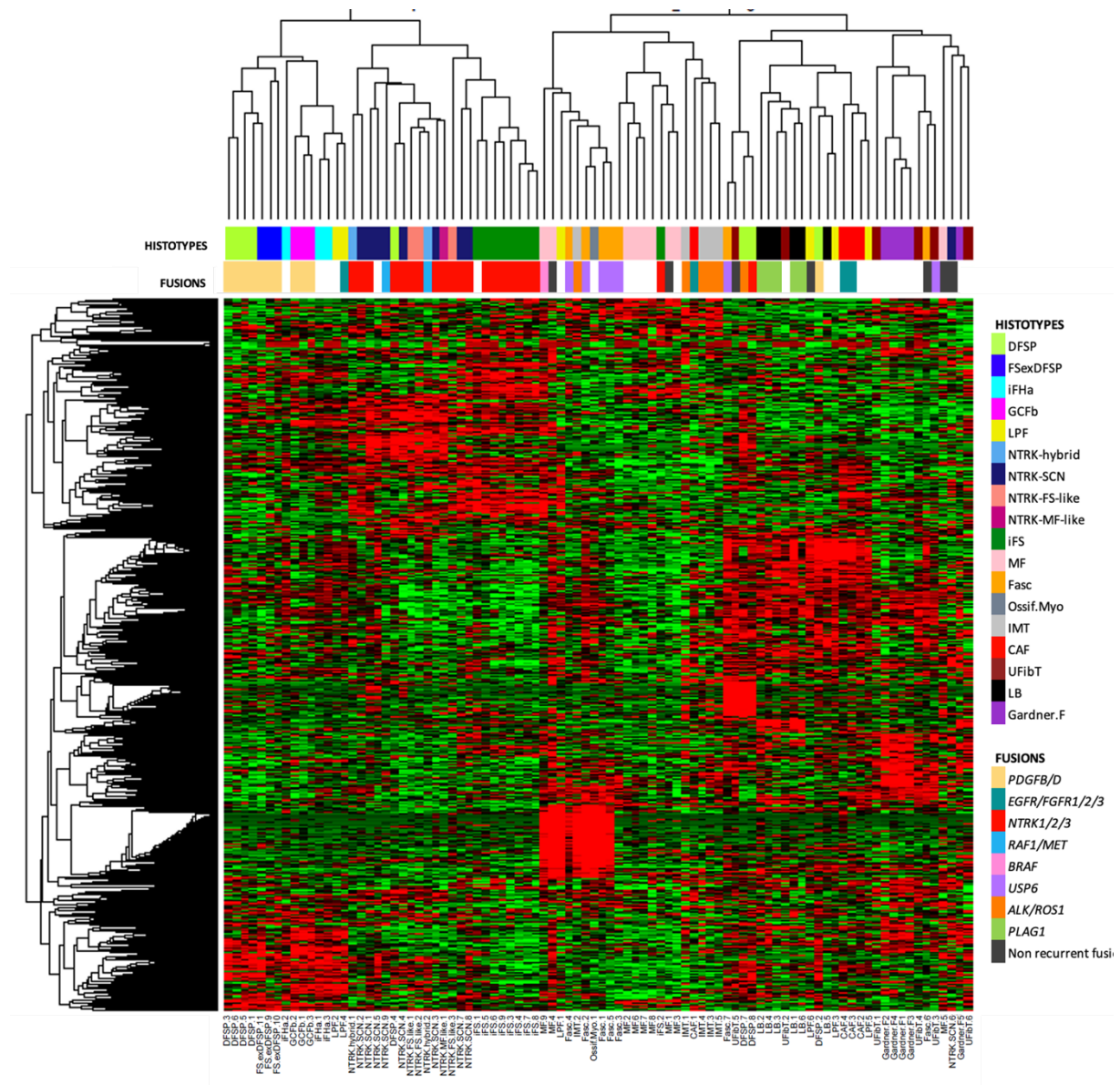


Figure 5. Clustering by columns and rows

Genes with standard deviation ≥ 2.3 and median > -10.0 , Genes: 1022, samples: 90

CAF : calcifying aponeurotic fibroma, DFSP : dermatofibrosarcoma protuberans, Fasc : fasciite, FS ex DFSP : dermatofibrosarcoma protuberans with fibrosarcomatous transformation, Gardner F. : Gardner fibroma, GCFb : Giant cell fibroblastoma, iFHa : Fibrous hamartoma of infancy, IFS : infantile fibrosarcoma, IMT : inflammatory myofibroblastic tumor, LB : lipoblastoma, MF : myofibroma, NTRK-FS-like : NTRK-rearranged fibrosarcoma-like neoplasm, NTRK-hybrid : NTRK-rearranged neoplasm with hybrid morphology, NTRK-MF-like : NTRK-rearranged myofibroma-like neoplasm, NTRK-SCN : NTRK-rearranged spindle cell neoplasm, Ossif Myo : ossifying myositis, UFibT : unclassified fibroblastic tumor

Discussion

NTRK-fused tumors have drawn attention these last years because of the development of a targeted therapy but these tumors have a wide morphological spectrum making their diagnosis difficult. Our study described the morphological and molecular characteristics of 36 tumors with *NTRK* fusions to further document this entity recently described.

We identified 6 main morphological patterns. Excluding the well-defined IFS, the most frequent morphological pattern was the spindle cell pattern. This pattern corresponded to a spindle cell proliferation associated with a fibrous stroma and a frequent infiltration of the adjacent tissue which cells harbored monotonous nuclei. Atypia were rare, mitosis and tumor necrosis were absent (low mitotic index inferior to 3/HPF). In immunohistochemistry, we found a frequent co-expression of CD34 and the S100 protein. These tumors were in majority associated with *NTRK1* fusions (91,7%). The second most frequent pattern was the hybrid pattern, which showed an intermingling of at least two different patterns among DFSP, IMT, myofibroma and/or fibrosarcoma. All these tumors had a co-expression of the S100 protein and CD34. Half of these tumors had *NTRK3* fusions, while the other half had *NTRK1* fusions. The third group displayed a fibrosarcomatous pattern. These tumors had the same morphology than the IFS with a proliferation highly cellular made of long intersecting fascicles, a variable amount of stroma and frequent areas of hemorrhage. Severe atypia and tumoral necrosis had been found. Mitotic activity was often brisk. Once again, all these cases had a co-expression of the S100 protein and CD34. These tumors had *NTRK3* fusions (60%) or *NTRK1* fusions (40%). As it has already been described, we found *NTRK* fusions in tumors with classical morphology of DFSP and IMT. One DFSP had an expression of CD34 and S100 protein, the other just an expression of CD34, one had *NTRK3* fusion the other *NTRK1* fusion. The IMT expressed neither CD34 nor the S100 protein and had *NTRK1* fusion. We also found *NTRK1* fusion in one tumor with a typical morphology of myofibroma. This tumor expressed the S100 protein and CD34.

The clinical characteristics of the tumors with *NTRK* fusions were unspecific. They occurred indiscriminately in infants, children or adults. Tumors were mostly developed in superficial tissues, but some occurred in internal organs, mostly tumors with fibrosarcoma-like pattern and *NTRK3* fusions, except for the one localized at the uterus.

All the *NTRK*-fused tumors except one IFS and one DFSP clustered in two groups molecularly close. One of these groups gathered the IFS with two *NTRK*-SCN and one *NTRK*-FS-like. Both groups interested infants, children and adults with *NTRK1* and *NTRK3* fusions in each group. The IFS apart had a classical *ETV6-NTRK3* fusion but clustered with myofibromas.

Interestingly our cohort also contained a case difficult to classify into myofibromatosis or IFS with a fusion *EML4-BRAF*. *BRAF* fusion had been already described in tumors with infantile fibrosarcoma features (23,59,60) but this tumor clustered with a myofibroma in our study. These observations rise the question of a continuum between these two entities.

Four tumors which clustered with the *NTRK*-fused tumors had no *NTRK* fusion. All these tumors were suspected to have a *NTRK* fusion on morphology. One was a hybrid tumor with characteristics reminding of DFSP and lipofibromatosis having a fusion *RPL32-RAF1*. *RAF1* fusions had already been reported in spindle cell neoplasm with co-expression of CD34 and S100 protein (23,61). Another tumor was a spindle cell neoplasm with a fusion *FTG-MET*. Fusions of *MET* had already been described in IFS (62,63). The two last had no fusion, it was a spindle cell neoplasm and an IFS with a heterogeneous staining of pan-TRK (Cell Signaling) with perinuclear dot-like enhancement.

Finally, concerning the antibodies assessment, pan-TRK (Abcam) had a best sensitivity (82,9%) and specificity (90,2%) than pan-TRK (Cell Signaling) which had a sensitivity of 80,6% and a specificity of 68,3%. The sensitivity for *NTRK3*-fused tumors was lower with 66,7% for pan-TRK (Abcam) and 68,8% for pan-TRK (Cell Signaling). Staining was mostly cytoplasmic, heterogeneous or diffuse, except for the *NTRK3*-fused tumors which often had a focal staining with peripheral nuclear enhancement. The TRK-C antibody was negative on all the tumors with *NTRK3* fusions. Concerning the false positives, it was mostly myofibromas with a cytoplasmic staining, focal, weak to moderate. Only one case had a diffuse cytoplasmic staining with pan-TRK (Cell Signaling), which misled to the diagnosis of spindle cell neoplasm with *NTRK* fusion. This case presented a fusion *PRRX1-NCOA1*. *NCOA1* fusions have been reported in biphenotypic sinonasal sarcoma with focal rhabdomyoblastic differentiation (64). Interestingly, biphenotypic sinonasal sarcomas are also known to have an abnormal surexpression of pan-TRK. Pan-TRK (RBT) was only assessed in tumors with *NTRK* fusions, mostly in cases where the other antibodies were failing. It was positive in 94% of the cases and caught up 6 cases that had a negative or weak focal staining with the other pan-TRK.

Conclusion

In line with the literature, we retrieved in this study a cohort of tumors with *NTRK* fusions which morphological and molecular spectrum span tumors of infancy of intermediate malignancy to highly malignant malignancies in older adults. Their diverse morphological patterns may yield suspicion for differential diagnosis such as DFSP, IMT and myofibroma, and raise some diagnostic controversy as to whether these tumors represent a single entity or if the fusion can be seen as an alternative event in other mesenchymal tumors. Our study confirms that the co-expression of CD34 and the protein S100, found in almost all cases, should hint to their diagnosis.

Our results highlight an incomplete sensitivity of the pan-TRK staining to detect an underlying fusion, especially for *NTRK3* fusions with several false negatives and a staining mostly focal and weak.

Discussion générale

Dans cette étude nous avons rassemblé 36 tumeurs mésenchymateuses avec réarrangement de *NTRK*. Ces tumeurs présentaient 6 principaux patterns morphologiques, en accord avec ceux déjà rapportés dans la littérature (Fig14). Le pattern « fibrosarcome », rassemblant des FSI et de plus rares « fibrosarcomes de l'adulte », était le plus fréquent. Ces tumeurs densément cellulaires étaient constituées de longs faisceaux, agencés en « banc de poissons » et mêlés à un stroma collagénique variable. Des zones de suffusions hémorragiques et des vaisseaux ectasiques étaient fréquemment retrouvés. Les mitoses étaient souvent nombreuses. Des atypies sévères ainsi que de la nécrose tumorale étaient présentes dans quelques cas. Le deuxième pattern le plus fréquent rassemblait des tumeurs fusocellulaires constituées de faisceaux d'architecture variable mêlés à un stroma collagénique. Ces tumeurs infiltraient souvent les tissus adjacents, sans signe d'agressivité (mitoses peu nombreuses, absence de nécrose tumorale ou d'atypie cytonucléaire marquée). D'autres tumeurs présentaient un pattern hybride, mêlant des caractéristiques de DFSP, TMI, myofibrome ou fibrosarcome. La quasi-totalité des tumeurs appartenant aux patterns sus-décrits exprimaient en immunohistochimie le CD34 et la protéine S100. Les autres patterns observés correspondaient à des DFSP, des TMI et un myofibrome d'aspect morphologique classique, exprimant plus ou moins le CD34 et la protéine S100.

Concernant l'étude immunohistochimique, l'anticorps pan-TRK (Abcam) avait une sensibilité de 82,9% et une spécificité de 90,2% tandis que pan-TRK (Cell Signaling) avait une sensibilité de 80,6% et une spécificité de 68,3%. Ces anticorps avaient une meilleure sensibilité pour les fusions de *NTRK1* que pour les fusions de *NTRK3*, avec un marquage le plus souvent focal pour ces dernières. L'anticorps TRK-C n'était exprimé dans aucune tumeur avec fusion de *NTRK3*. L'anticorps pan-TRK (Bio SB), testé principalement sur des tumeurs avec fusion de *NTRK* dont l'immunomarquage avec les deux autres pan-TRK était négatif ou focal, a permis de rattraper 3 cas négatifs avec les deux autres anticorps et a montré un marquage plus franc pour 3 autres cas.

Face à ces résultats nous proposons une prise en charge des tumeurs fusocellulaires inclassées en fonction de l'agressivité de la tumeur, de la co-expression du CD34 et de la protéine S100 et de l'expression de pan-TRK en immunohistochimie (Fig15) .

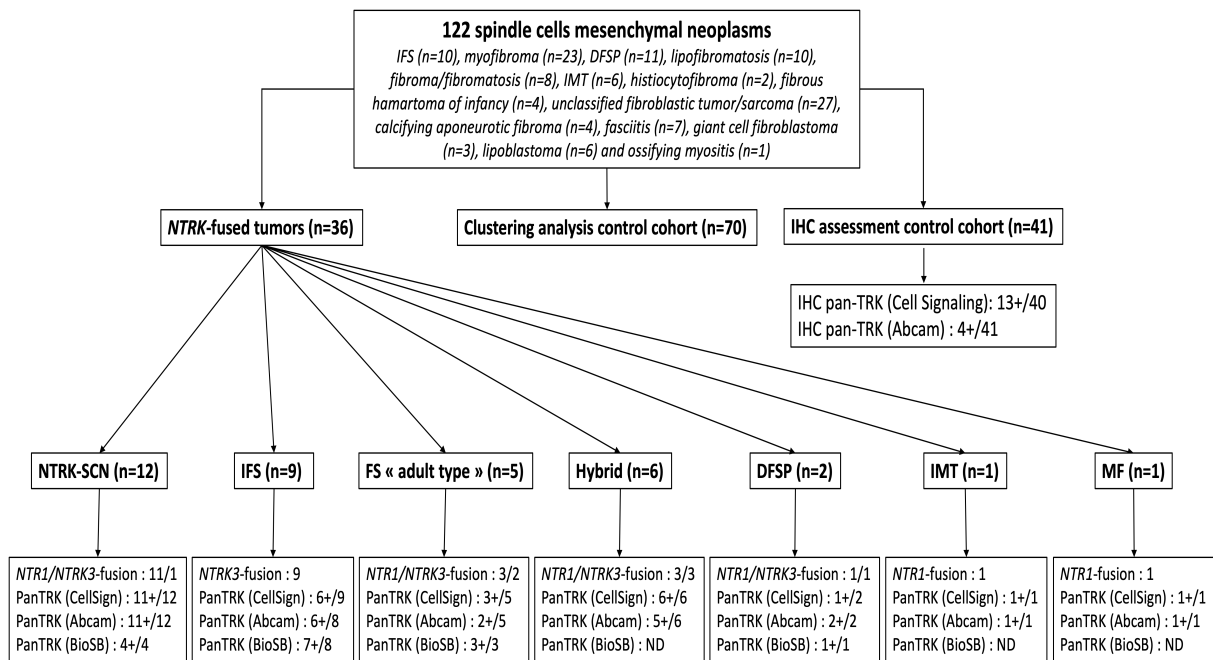


Figure 14. Schéma récapitulatif de l'étude

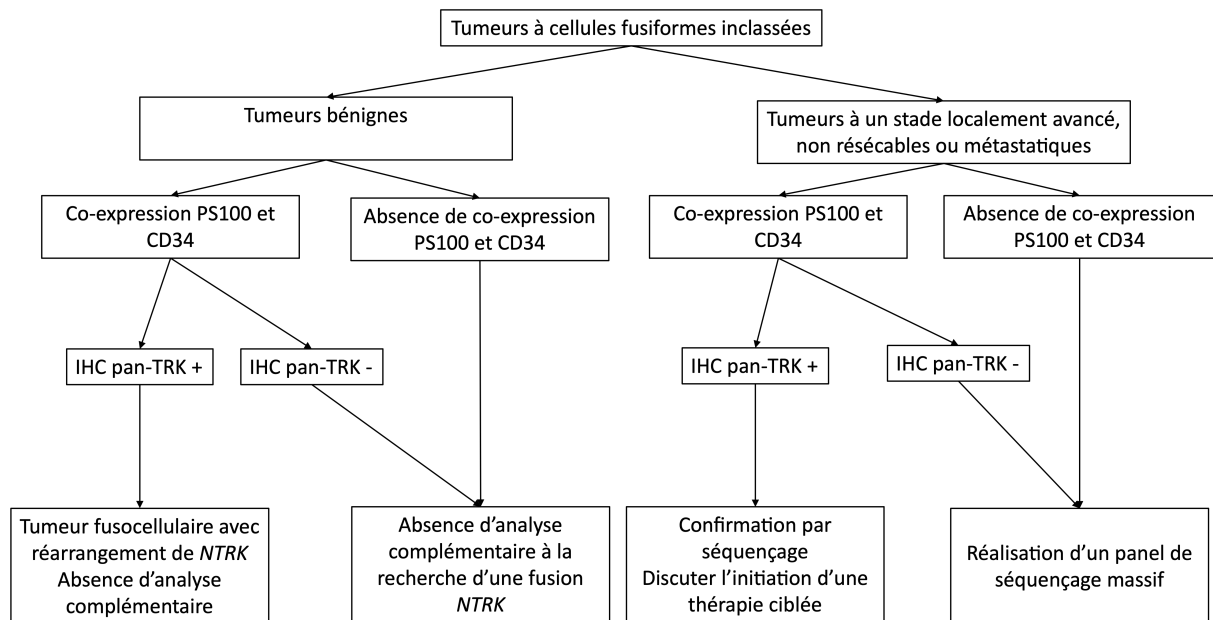


Figure 15. Proposition de prise en charge face à une tumeur fusiforme inclassée

Limites et perspectives

Contrairement aux résultats présentés dans la littérature nos marquages concernant les tumeurs avec fusion de *NTRK3* étaient majoritairement faibles et focaux. Même si un potentiel biais technique pré-analytique peut être suspecté, lié à l'inclusion de cas anciens remontant parfois à plus de 10 ans, la présence d'une positivité forte et hétérogène de l'immunomarquage pour certains des cas les plus anciens indique toutefois que ce facteur n'est probablement pas limitant pour l'étude immunohistochimique.

L'anticorps pan-TRK (Bio SB), que nous avons principalement testé sur des cas présentant un marquage négatif ou faible avec les deux autres anticorps, semble prometteur pour pallier la faiblesse des deux autres anticorps pan-TRK. En effet, celui-ci était positif dans 94% des cas et a permis de rattraper 3 cas négatifs et présentait un marquage plus franc pour 3 autres cas. Une analyse complète de sa sensibilité et spécificité, que nous n'avons pu réaliser dans cette étude faute de temps et d'anticorps disponible, serait intéressante.

Concernant les analyses de RNA-seq, un potentiel biais pré-analytique lié à l'ancienneté des prélèvements pourrait également être évoqué, notamment pour le cas de FSI et la tumeur fusocellulaire suspecte d'avoir un réarrangement *NTRK*, dépourvus de fusions. Néanmoins, ces tumeurs partagent le même profil d'expression que les tumeurs avec fusion *NTRK*, faisant suspecter un mécanisme alternatif plutôt qu'un biais pré-analytique. La recherche de voies de signalisation communes à ces tumeurs et celles comportant une fusion *NTRK* est en cours afin de trouver des anomalies moléculaires expliquant ce rassemblement au sein d'un même cluster moléculaire. Par ailleurs, on retrouve également au sein de ce cluster des tumeurs avec fusions de *RAF1* et de *MET*, dont les aspects morphologiques évoquaient des tumeurs avec réarrangement de *NTRK*. Ceci souligne l'existence de fusions alternatives impliquant d'autres kinases appartenant au même spectre que les tumeurs avec réarrangement de *NTRK*. Le dépistage de ces anomalies moléculaires alternatives, représentant d'éventuelles cibles thérapeutiques, est également particulièrement important.

Enfin, l'analyse du différentiel d'expression génétique entre les deux clusters de tumeurs avec réarrangement de *NTRK* est en cours afin de comprendre pourquoi ces tumeurs se divisent en deux groupes, cette répartition n'étant liée ni à leur morphologie, ni à leur fusion, ni à leur clinique. Peu de suivis cliniques étaient disponibles pour cette étude (cas trop anciens, pas de follow-up disponible, cas récents avec suivi <1 an). Une étude corrélant le suivi clinique avec les données des analyses de clustering serait intéressante à réaliser.

A côté de cela, cette étude soulève la question d'un continuum lésionnel entre les FSI et les myofibromes. En effet, l'appartenance d'un FSI de morphologie classique avec fusion *ETV6-NTRK3* au cluster moléculaire des myofibromes et l'existence d'une tumeur aux aspects histologiques à la croisée d'un FSI et d'un myofibrome, présentant une fusion de *BRAF*, déjà rapportée dans des tumeurs avec des caractéristiques de FSI (23,60,65) se regroupant également dans un cluster avec un myofibrome semble indiquer l'existence d'un lien ténu entre les deux tumeurs.

Pour finir, nous avons testé en immunohistochimie les anticorps pan-TRK (Cell Signaling et Abcam) et TRK-C sur des tumeurs connues pour surexprimer TRK sans anomalie des gènes *NTRK*. On retrouvait ainsi une expression de pan-TRK (Abcam) dans 9/11 sarcomes biphénotypiques sinonasaux, dans 10/13 tumeurs desmoplasiques à petites cellules rondes et dans aucun des sarcomes BCOR (n=9). Pan-TRK (Cell Signaling) a été uniquement testé sur des tumeurs desmoplasiques à petites cellules rondes (n=11) et n'était exprimé dans aucun cas. TRK-C était exprimé dans la totalité des sarcomes biphénotypiques sinonasaux (n=11), dans 11/13 tumeurs desmoplasiques à petites cellules rondes et dans 14/18 des sarcomes BCOR. Les marquages étaient le plus souvent forts et diffus. Ces données doivent mettre en garde sur la spécificité des anticorps ciblant TRK, qui peuvent cependant être une aide au diagnostic des tumeurs sus-citées compte tenu du fort pourcentage d'expression retrouvé.

Références bibliographiques

1. Sotelo-Avila C, Bale PM. Subdermal fibrous hamartoma of infancy: pathology of 40 cases and differential diagnosis. *Pediatr Pathol.* févr 1994;14(1):39-52.
2. Dickey GE, Sotelo-Avila C. Fibrous hamartoma of infancy: current review. *Pediatr Dev Pathol.* juin 1999;2(3):236-43.
3. CDMF, JA B, PCW H, F M. *Soft Tissue and Bone Tumours. The WHO Classification of Tumours Editorial Board. Vol. 5th edition. 2020.*
4. Keasbey LE. Juvenile aponeurotic fibroma (calcifying fibroma); a distinctive tumor arising in the palms and soles of young children. *Cancer.* mars 1953;6(2):338-46.
5. Fetsch JF, Miettinen M. Calcifying aponeurotic fibroma: a clinicopathologic study of 22 cases arising in uncommon sites. *Hum Pathol.* déc 1998;29(12):1504-10.
6. Puls F, Hofvander J, Magnusson L, Nilsson J, Haywood E, Sumathi VP, et al. FN1-EGF gene fusions are recurrent in calcifying aponeurotic fibroma. *J Pathol.* mars 2016;238(4):502-7.
7. Al-Ibraheemi A, Folpe AL, Perez-Atayde AR, Perry K, Hofvander J, Arbajian E, et al. Aberrant receptor tyrosine kinase signaling in lipofibromatosis: a clinicopathological and molecular genetic study of 20 cases. *Mod Pathol.* mars 2019;32(3):423-34.
8. Oudijk L, den Bakker MA, Hop WCJ, Cohen M, Charles AK, Alaggio R, et al. Solitary, multifocal and generalized myofibromas: clinicopathological and immunohistochemical features of 114 cases. *Histopathology.* mai 2012;60(6B):E1-11.
9. Agaimy A, Bieg M, Michal M, Geddert H, Märkl B, Seitz J, et al. Recurrent Somatic PDGFRB Mutations in Sporadic Infantile/Solitary Adult Myofibromas But Not in Angioleiomyomas and Myopericytomas. *Am J Surg Pathol.* févr 2017;41(2):195-203.
10. Arts FA, Sciot R, Brichard B, Renard M, de Rocca Serra A, Dachy G, et al. PDGFRB gain-of-function mutations in sporadic infantile myofibromatosis. *Hum Mol Genet.* 15 mai 2017;26(10):1801-10.
11. Schmidt D, Harms D. Fibromatosis of infancy and childhood. Histology, ultrastructure and clinicopathologic correlation. *Z Kinderchir.* févr 1985;40(1):40-6.
12. Fetsch JF, Miettinen M, Laskin WB, Michal M, Enzinger FM. A clinicopathologic study of 45 pediatric soft tissue tumors with an admixture of adipose tissue and fibroblastic elements, and a proposal for classification as lipofibromatosis. *Am J Surg Pathol.* nov 2000;24(11):1491-500.
13. Agaram NP, Zhang L, Sung YS, Chen CL, Chung CT, Antonescu CR, et al. Recurrent NTRK1 Gene Fusions Define A Novel Subset Of Locally Aggressive Lipofibromatosis-Like Neural Tumors. *Am J Surg Pathol.* oct 2016;40(10):1407-16.
14. Allen A, Ahn C, Sangüeza OP. Dermatofibrosarcoma Protuberans. *Dermatologic Clinics.* 1 oct 2019;37(4):483-8.
15. Chung EB, Enzinger FM. Infantile fibrosarcoma. *Cancer.* août 1976;38(2):729-39.
16. Amatu A, Sartore-Bianchi A, Bencardino K, Pizzutilo EG, Tosi F, Siena S. Tropomyosin receptor kinase (TRK) biology and the role of NTRK gene fusions in cancer. *Ann Oncol.* nov 2019;30(Suppl 8):viii5-15.
17. Ruiz-Cordero R, Ng DL. Neurotrophic receptor tyrosine kinase (NTRK) fusions and their role in cancer. *Cancer Cytopathol.* nov 2020;128(11):775-9.
18. Knezevich SR, McFadden DE, Tao W, Lim JF, Sorensen PH. A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma. *Nat Genet.* févr 1998;18(2):184-7.

19. Haller F, Knopf J, Ackermann A, Bieg M, Kleinheinz K, Schlesner M, et al. Paediatric and adult soft tissue sarcomas with NTRK1 gene fusions: a subset of spindle cell sarcomas unified by a prominent myopericytic/haemangiopericytic pattern. *The Journal of Pathology*. 2016;238(5):700-10.
20. Pavlick D, Schrock AB, Malicki D, Stephens PJ, Kuo DJ, Ahn H, et al. Identification of NTRK fusions in pediatric mesenchymal tumors. *Pediatric Blood & Cancer*. 2017;64(8):e26433.
21. Suurmeijer AJ, Dickson BC, Swanson D, Zhang L, Sung Y-S, Huang H-Y, et al. The histologic spectrum of soft tissue spindle cell tumors with NTRK3 gene rearrangements. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2019;58(11):739-46.
22. Davis JL, Lockwood CM, Albert CM, Tsuchiya K, Hawkins DS, Rudzinski ER. Infantile NTRK-associated Mesenchymal Tumors. *Pediatr Dev Pathol*. févr 2018;21(1):68-78.
23. Suurmeijer AJH, Dickson BC, Swanson D, Zhang L, Sung Y-S, Cotzia P, et al. A novel group of spindle cell tumors defined by S100 and CD34 co-expression shows recurrent fusions involving RAF1, BRAF, and NTRK1/2 genes. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2018;57(12):611-21.
24. Yamazaki F, Nakatani F, Asano N, Wakai S, Sekimizu M, Mitani S, et al. Novel NTRK3 Fusions in Fibrosarcomas of Adults. *The American Journal of Surgical Pathology*. avr 2019;43(4):523-30.
25. Wong DD, Vargas AC, Bonar F, Maclean F, Kattampallil J, Stewart C, et al. NTRK-rearranged mesenchymal tumours: diagnostic challenges, morphological patterns and proposed testing algorithm. *Pathology*. juin 2020;52(4):401-9.
26. Davis J, Lockwood C, Stohr B, Boecking C, Al-Ibraheemi A, DuBois S, et al. Expanding the Spectrum of Pediatric NTRK-rearranged Mesenchymal Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology*. avr 2019;43(4):435-45.
27. Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, et al. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2018;(6):791.
28. Chiang S. S100 and Pan-Trk Staining to Report NTRK Fusion-Positive Uterine Sarcoma: Proceedings of the ISGyP Companion Society Session at the 2020 USCAP Annual Meeting. *International Journal of Gynecological Pathology*. 1 janv 2021;40(1):24.
29. Croce S, Hostein I, Longacre TA, Mills AM, Pérot G, Devouassoux-Shisheboran M, et al. Uterine and vaginal sarcomas resembling fibrosarcoma: a clinicopathological and molecular analysis of 13 cases showing common NTRK -rearrangements and the description of a COL1A1-PDGFB fusion novel to uterine neoplasms. *Mod Pathol*. juill 2019;32(7):1008-22.
30. Rabban JT, Devine WP, Sangoi AR, Poder L, Alvarez E, Davis JL, et al. NTRK fusion cervical sarcoma: a report of three cases, emphasising morphological and immunohistochemical distinction from other uterine sarcomas, including adenosarcoma. *Histopathology*. juill 2020;77(1):100-11.
31. Yamamoto H, Yoshida A, Taguchi K, Kohashi K, Hatanaka Y, Yamashita A, et al. ALK, ROS1 and NTRK3 gene rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumours. *Histopathology*. juill 2016;69(1):72-83.
32. Alassiri AH, Ali RH, Shen Y, Lum A, Strahlendorf C, Deyell R, et al. ETV6-NTRK3 Is Expressed in a Subset of ALK-Negative Inflammatory Myofibroblastic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(8):1051-61.
33. Olson N, Rouhi O, Zhang L, Angeles C, Bridge J, Lopez-Terrada D, et al. A novel case of an aggressive superficial spindle cell sarcoma in an adult resembling fibrosarcomatous dermatofibrosarcoma protuberans and harboring an EML4-NTRK3 fusion. *Journal of Cutaneous Pathology*. 2018;45(12):933-9.

34. Panse G, Reisenbichler E, Snuderl M, Wang W-L, Laskin W, Jour G. LMNA-NTRK1 rearranged mesenchymal tumor (lipofibromatosis-like neural tumor) mimicking pigmented dermatofibrosarcoma protuberans. *J Cutan Pathol.* févr 2021;48(2):290-4.
35. Brenca M, Rossi S, Polano M, Gasparotto D, Zanatta L, Racanelli D, et al. Transcriptome sequencing identifies ETV6-NTRK3 as a gene fusion involved in GIST. *J Pathol.* mars 2016;238(4):543-9.
36. Blay J-Y, Kang Y-K, Nishida T, von Mehren M. Gastrointestinal stromal tumours. *Nat Rev Dis Primers.* 18 mars 2021;7(1):1-22.
37. Rubin BP, Chen CJ, Morgan TW, Xiao S, Grier HE, Kozakewich HP, et al. Congenital mesoblastic nephroma t(12;15) is associated with ETV6-NTRK3 gene fusion: cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol.* nov 1998;153(5):1451-8.
38. Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA, et al. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell.* 1 nov 2002;2(5):367-76.
39. Skálová A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol.* mai 2010;34(5):599-608.
40. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* mai 2014;46(5):444-50.
41. Wiesner T, He J, Yelensky R, Esteve-Puig R, Botton T, Yeh I, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun.* 2014;5:3116.
42. Goto K, Pissaloux D, Tirode F, de la Fouchardière A. Spitz nevus with a novel TFG-NTRK2 fusion: The first case report of NTRK2-rearranged Spitz/Reed nevus. *J Cutan Pathol.* 12 mai 2021;
43. Laetsch TW, DuBois SG, Mascarenhas L, Turpin B, Federman N, Albert CM, et al. Larotrectinib for paediatric solid tumours harbouring NTRK gene fusions: phase 1 results from a multicentre, open-label, phase 1/2 study. *The Lancet Oncology.* 1 mai 2018;19(5):705-14.
44. Hong DS, Bauer TM, Lee JJ, Dowlati A, Brose MS, Farago AF, et al. Larotrectinib in adult patients with solid tumours: a multi-centre, open-label, phase I dose-escalation study. *Ann Oncol.* 01 2019;30(2):325-31.
45. Filippi R, Depetris I, Satolli MA. Evaluating larotrectinib for the treatment of advanced solid tumors harboring an NTRK gene fusion. *Expert Opinion on Pharmacotherapy.* 13 avr 2021;22(6):677-84.
46. Marcus L, Donoghue M, Aungst S, Myers CE, Helms WS, Shen G, et al. FDA Approval Summary: Entrectinib for the Treatment of NTRK gene Fusion Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 15 févr 2021;27(4):928-32.
47. Delgado J, Pean E, Melchiorri D, Migali C, Josephson F, Enzmann H, et al. The European Medicines Agency review of entrectinib for the treatment of adult or paediatric patients with solid tumours who have a neurotrophic tyrosine receptor kinase gene fusions and adult patients with non-small-cell lung cancer harbouring ROS1 rearrangements. *ESMO Open.* avr 2021;6(2):100087.
48. Drilon A, Siena S, Ou S-HI, Patel M, Ahn MJ, Lee J, 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(4):400-9.
49. Doebele RC, Drilon A, Paz-Ares L, Siena S, Shaw AT, Farago AF, et al. Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1-2 trials. *Lancet Oncol.* févr 2020;21(2):271-82.

50. Drilon A, Nagasubramanian R, Blake JF, Ku N, Tuch BB, Ebata K, et al. A Next-Generation TRK Kinase Inhibitor Overcomes Acquired Resistance to Prior TRK Kinase Inhibition in Patients with TRK Fusion-Positive Solid Tumors. *Cancer Discov.* 2017;7(9):963-72.
51. Hemming ML, Nathenson MJ, Lin J-R, Mei S, Du Z, Malik K, et al. Response and mechanisms of resistance to larotrectinib and selitrectinib in metastatic undifferentiated sarcoma harboring oncogenic fusion of NTRK1. *JCO Precis Oncol.* 2020;4:79-90.
52. Demetri GD, Antonescu CR, Bjerkehagen B, Bovée JVMG, Boye K, Chacón M, et al. Diagnosis and management of tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion sarcomas: expert recommendations from the World Sarcoma Network. *Ann Oncol.* nov 2020;31(11):1506-17.
53. Gatalica Z, Xiu J, Swensen J, Vranic S. Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions. *Mod Pathol.* janv 2019;32(1):147-53.
54. Solomon JP, Linkov I, Rosado A, Mullaney K, Rosen EY, Frosina D, et al. NTRK fusion detection across multiple assays and 33,997 cases: diagnostic implications and pitfalls. *Mod Pathol.* 2 août 2019;1-9.
55. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* nov 2017;41(11):1547-51.
56. Hung YP, Fletcher CDM, Hornick JL. Evaluation of pan-TRK immunohistochemistry in infantile fibrosarcoma, lipofibromatosis-like neural tumour and histological mimics. *Histopathology.* 2018;73(4):634-44.
57. Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology.* juill 2018;42(7):927.
58. Dadone-Montaudié B, Alberti L, Duc A, Delespaul L, Lesluyes T, Pérot G, et al. Alternative PDGFD rearrangements in dermatofibrosarcomas protuberans without PDGFB fusions. *Mod Pathol.* nov 2018;31(11):1683-93.
59. Kao Y-C, Fletcher CDM, Alaggio R, Wexler L, Zhang L, Sung Y-S, et al. Recurrent BRAF Gene Fusions in a Subset of Pediatric Spindle Cell Sarcomas: Expanding the Genetic Spectrum of Tumors With Overlapping Features With Infantile Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* janv 2018;42(1):28-38.
60. Penning AJ, Al-Ibraheemi A, Michal M, Larsen BT, Cho S-J, Lockwood CM, et al. Novel BRAF gene fusions and activating point mutations in spindle cell sarcomas with histologic overlap with infantile fibrosarcoma. *Mod Pathol.* août 2021;34(8):1530-40.
61. Hicks JK, Henderson-Jackson E, Duggan J, Joyce DM, Brohl AS. Identification of a novel MTAP-RAF1 fusion in a soft tissue sarcoma. *Diagn Pathol.* 12 oct 2018;13(1):77.
62. Gupta A, Belsky JA, Schieffer KM, Leraas K, Varga E, McGrath SD, et al. Infantile fibrosarcoma-like tumor driven by novel RBPMS-MET fusion consolidated with cabozantinib. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* oct 2020;6(5):a005645.
63. Flucke U, van Noesel MM, Wijnen M, Zhang L, Chen C-L, Sung Y-S, et al. TFG-MET fusion in an infantile spindle cell sarcoma with neural features. *Genes Chromosomes Cancer.* sept 2017;56(9):663-7.
64. Huang S-C, Ghossein RA, Bishop JA, Zhang L, Chen T-C, Huang H-Y, et al. Novel PAX3-NCOA1 Fusions in Biphenotypic Sinonasal Sarcoma With Focal Rhabdomyoblastic Differentiation. *Am J Surg Pathol.* janv 2016;40(1):51-9.
65. Kao Y-C, Sung Y-S, Argani P, Swanson D, Alaggio R, Tap W, et al. NTRK3 overexpression in undifferentiated sarcomas with YWHAE and BCOR genetic alterations. *Modern Pathology.* 7 févr 2020;1-9.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels 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 leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des 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 les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) 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. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui 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(e) et méprisé(e) si j'y manque.

Résumé de la thèse en Anglais

Morphological, immunohistochemical and molecular characterization of 36 *NTRK*-fused mesenchymal tumors

Introduction: *NTRK*-fused tumors have drawn attention these last years because of the development of a targeted therapy but these tumors have a wide unspecific morphological spectrum making their diagnosis difficult. Our study described the morphological and molecular characteristics of 36 tumors with *NTRK* fusion to further document this entity.

Material and method: 122 fibroblastic/myofibroblastic tumors whose initial diagnosis belonged to the *NTRK* fused tumors spectrum, to their differential diagnosis or remained unclassified were removed from the archives of the Institut Bergonié or the Bordeaux University Hospital. A histological review was performed for each case with additional immunohistochemistry and/or molecular biology analyses depending on the material availability.

Results: *NTRK* rearrangements were found in six main morphological patterns: unspecific spindle cell tumors with fascicles of variable architecture and a collagenous stroma, infantile and adult fibrosarcomas, hybrid tumors combining several histological patterns, dermatofibrosarcoma protuberans, inflammatory myofibroblastic tumors and a myofibroma. Almost all these tumors had a co-expression of S100 and CD34 on immunohistochemistry. The pan-TRK antibodies study reported a sensitivity of 82,9% for pan-TRK (Abcam) and 80.6% for pan-TRK (Cell Signaling). Most of the fusions involved *NTRK1* and less frequently *NTRK3*. Many fusion partners were reported.

Conclusion: Co-expression of CD34 and S100 in a spindle cell tumor with unspecific or hybrid aspects is suggestive of *NTRK* rearrangement. Pan-TRK antibodies have an incomplete sensitivity for the detection of *NTRK* fused tumors.

Résumé de la thèse

Introduction : Les tumeurs avec réarrangement de *NTRK* ont attiré l'attention dernièrement du fait de l'apparition d'une thérapie ciblée. Leur large spectre morphologique peu spécifique rend leur diagnostic difficile. Notre étude décrit les caractéristiques morphologiques, immunohistochimiques et moléculaires de 36 tumeurs avec réarrangement de *NTRK* afin de mieux documenter cette entité.

Matériel et méthode : 122 tumeurs fibroblastiques/myofibroblastiques dont le diagnostic initial appartenait au spectre des tumeurs *NTRK*, à leur diagnostic différentiel ou restant inclassées ont été retirées des archives de l'Institut Bergonié ou du CHU de Bordeaux. Une relecture histologique a été faite pour chaque cas ainsi que des analyses supplémentaires d'immunohistochimie et/ou de biologie moléculaire en fonction du matériel disponible.

Résultats : Des réarrangements de *NTRK* ont été retrouvés dans six principaux patterns morphologiques : des tumeurs fusocellulaires d'aspect peu spécifique mêlant des faisceaux d'architecture variable à un stroma collagénique, des fibrosarcomes infantiles et de l'adulte, des tumeurs hybrides combinant plusieurs patterns histologiques, des dermatofibrosarcomes protuberans, des tumeurs inflammatoires myofibroblastiques et un myofibrome. La quasi-totalité de ces tumeurs présentaient une coexpression de PS100 et CD34 en immunohistochimie. L'anticorps pan-TRK (Abcam) avait une sensibilité de 82,9% et l'anticorps pan-TRK (Cell Signaling) de 80,6%. Les fusions ont intéressé *NTRK1* en majorité et moins fréquemment *NTRK3*. Les partenaires de fusion étaient nombreux.

Conclusion : La coexpression de CD34 et PS100 en immunohistochimie dans une tumeur fusocellulaire aux aspects peu spécifiques ou hybrides est évocateur d'un réarrangement de *NTRK*. Les anticorps pan-TRK ont une sensibilité incomplète concernant le dépistage de ces fusions.

Mots-Clés : *NTRK1*, *NTRK3*, lipofibromatose, myofibrome, fibrosarcome, fibrosarcome infantile, tumeur myofibroblastique inflammatoire, dermatofibrosarcome protuberans

Spécialité : Anatomie et cytologie pathologiques

UFR : Université de Bordeaux – UFR des Sciences médicales - 146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex