

**RISQUES BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
QUALITE DES LABORATOIRES**

**COMMISSION DE BIOLOGIE CLINIQUE et D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE
COMITE DES EXPERTS**

**EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE
DES ANALYSES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE**

RAPPORT GLOBAL

Examens de génétique

Détection de mutations BRAFV600 dans le cadre du mélanome

ENQUETE 2024/4

Sciensano/Examens génétique-6-FR

Risques biologiques pour la santé
Qualité des laboratoires
Rue J. Wytsman, 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

COMITE DES EXPERTS

Sciensano					
Secrétariat		TEL:	02/642.55.21	FAX:	02/642.56.45
		e-mail	ql_secretariat@sciensano.be		
Joséphine Lantoine	Coordinateur d'enquête	TEL:	02/642 53 94		
		e-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be		
Bernard China	Coordinateur d'enquête remplaçant	TEL:	02/642 52 08		
		e-mail:	bernard.china@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Coordinateur d'enquête remplaçant	TEL:	02/642 53 85		
		e-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be		
Experts	Institution				
Ina Benoy	Rode Kruis				
Elke Boone	AZ Delta				
Barbara Depreter	AZ Delta				
Evelien Heylen	ZNA				
Marie LeMercier	UZA				
Patrick Pauwels	UZA				
Freya Vaeyens	UZ Brussel				
Jacques Van Huysse	AZ Sint Jan Brugge				

Un draft de ce rapport a été transmis aux experts le 04/07/2024

Ce rapport n'a été discuté lors d'une réunion du comité des experts ; ceux-ci ont été invités à émettre leurs commentaires par email.

Autorisation du rapport : par Joséphine Lantoine, coordinateur d'enquête

Date de publication : 28/08/2024

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:

<https://www.sciensano.be/fr/qualite-des-laboratoires/eeq-biologie-moleculaire-hemato-oncologie>

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

1. ECHANTILLONS.....	4
2. PARTICIPATION.....	4
3. RÉSULTATS.....	5
3.1 Résultats par échantillon	5
3.2 Résultats par laboratoire.....	8
3.3 Distribution des fréquences alléliques	14
3.4 Commentaires	14
4. MÉTHODOLOGIES UTILISÉES	15
5. CONCLUSIONS SUR LES PERFORMANCES DES LABORATOIRES	16

1. Echantillons

Les échantillons patient proviennent de la biobanque Discovery Life Science (900 Hudson Way Huntsville, AL 35806). Dans le cadre de cette enquête, 2 blocs FFPE provenant de deux biopsies de mélanomes ont été achetés. Les blocs ont été ensuite sectionnés en coupes FFPE de 4µm d'épaisseur. La firme confirme par NGS (Qiagen Multimodal panel) la présence de la mutation NM_004333.6 BRAF c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg) avec une fréquence allélique de 86%.

Afin de vérifier l'homogénéité tumoral des blocs, nous avons demandé une évaluation du pourcentage tumoral en début, milieu et fin de blocs.

Les résultats de cette évaluation sont présentés ci-après :

- Cas F00301815:

Slide #1: 80% de cellules tumorales

Slide #50: 85% cellules tumorales

Slide #100: 50% cellules tumorales

Slide #147: 5% cellules tumorales

Afin de garantir un maximum de cellules tumorales dans les coupes envoyées aux laboratoires, seules les lames 1 à 100 ont été envoyées au laboratoires pour ce cas.

- Cas F00316105:

Slide #1: 70% cellules tumorales

Slide #50: 50% cellules tumorales

Slide #100: 40% cellules tumorales

Slide #133: 30% cellules tumorales

Afin de garantir un maximum de cellules tumorales dans les coupes envoyées aux laboratoires, seules les lames 1 à 100 ont été envoyées au laboratoires pour ce cas.

Les échantillons sont accompagnés des données cliniques relatives à chaque patient : age, sexe, race, site de la tumeur, type de tumeur, données pathologiques, indications sur le traitement reçu par le patient si disponible.

Cas clinique F00316105

Homme de 56 ans présentant une tumeur de stade IV (TNM=T4bN2bM1d) au niveau de l'avant-bras droit. Il s'agit d'un mélanome malin dont des métastases ont été trouvées au niveau des 2 ganglions lymphatiques qui ont été examinés (pN2b).

Cas clinique F00301815

Femme de 74 ans présentant une tumeur de stade III-C (TNM=T4bN1cM0) au niveau du pied gauche. Il s'agit d'un mélanome malin avec ulcération. Les marges de la dissection ne sont pas impliquées. Présence de mélanome satellitaire dans les tissus graisseux sous-cutanés.

2. Participation

10 laboratoires de biologie clinique et 11 laboratoires d'anatomopathologie étaient inscrits pour cette enquête.

Seul un laboratoire de biologie clinique n'a pas répondu.

3. Résultats

Les laboratoires ont reçu 4 coupes FFPE de biopsies pour 2 cas cliniques différents. Une lettre accompagnante contenant les informations sur les intervalles de pourcentage tumoraux des coupes qu'ils avaient reçu leur a également été envoyée avec les échantillons.

3.1 Résultats par échantillon

Echantillon	Mutation attendue (AF)	Mutation encodée	Nombre de laboratoires (%)
F00316105	BRAF c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg) NM_004333.6 (86%)	NM_004333.6* c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	7 (35)
		NM_004333.5 c.1798.1799 delins AG p.(Val600Arg)	2 (10)
		NM_004333.4 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	3 (15)
		BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg BRAF Val600Met	3 (15)
		BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg	2 (10)
		BRAF Val600Arg	1 (5)
		Aucune	2* (10)

*Les résultats sont sous-réserve pour 1 laboratoire suite à la qualité suboptimale de l'échantillon.

*Veuillez noter qu'un des deux laboratoires nous a envoyé les rapports cliniques émis suite à l'analyse des échantillons EEQ et celui-ci a bien retrouvé le groupe de mutation Val600K/Val600M/Val600R dans cet échantillon et a donc commis une erreur de recopiage.

Echantillon	Mutation attendue (AF)	Mutation encodée	Nombre de laboratoire (%)
F00301815	Aucune-BRAF Wild Type	Aucune-Wild Type*	14 (70)
		BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg BRAF Val600Glu	1* (5)
		Echantillon non interprétable/qualité de l'ADN insuffisante	5 (25)

*Les résultats sont sous-réserve pour 4 laboratoires suite à la qualité suboptimale de l'échantillon.

*Veuillez noter que ce laboratoire nous a envoyé les rapports cliniques émis suite à l'analyse des échantillons EEQ et celui-ci a bien détecté cet échantillon comme Wild-Type et n'a pas retrouvé de mutation BRAFV600 dans celui-ci et a donc commis une erreur de recopiage.

Classifications Groupe PCR (7/20)

Dans un but éducatif, sont affichées ci-dessous les classifications rendues par les laboratoires utilisant la PCR comme technique :

Echantillon	Classification biologique attendue	Classification biologique encodée	Nombre de laboratoire (%)
F00316105	pathogène	pathogène	3 (43)
		non mentionnée	4 (57)

Echantillon	Classification clinique attendue	Classification clinique encodée	Nombre de laboratoire (%)
F00316105	Tier I	Tier I	2 (28.5)
		non mentionnée	5 (71)

Classifications Groupe NGS (13/20)

Echantillon	Classification biologique attendue	Classification biologique encodée	Nombre de laboratoire (%)
F00316105	pathogène	pathogène	13 (100)

Echantillon	Classification clinique attendue	Classification clinique encodée	Nombre de laboratoire (%)
F00316105	Tier I	Tier I	11 (85)
		Tier IA	2 (15)

Conclusions thérapeutiques

Echantillon	Conclusions thérapeutiques encodées	Nombre de laboratoire (%)
F00316105	Mutation BRAFV600R prédictive de sensibilité aux inhibiteurs de la voie BRAF associé avec les anti MEK/ERK et d'une sensibilité moindre aux monothérapies anti-BRAF que les variants classique BRAF V600E/K.	1 (5)
	Le variant BRAF détecté est éligible à une thérapie ciblée/ prédictif pour une réponse aux inhibiteurs BRAF.	7 (35)
	Cette mutation du gène BRAF est récurrente dans les mélanomes et est éligible pour une thérapie ciblée aux inhibiteurs BRAF. Cette mutation est associée à une sensibilité à l'Imatinib (éventuellement en combinaison avec des inhibiteurs MEK).	1 (5)
	La présence d'une mutation BRAF indique une sensibilité à un traitement aux inhibiteurs BRAF en combinaison avec les inhibiteurs MEK.	7 (35)
	Des inhibiteurs BRAF tels que Encorafenib, Dabrafenib et Vemurafenib seuls ou en combinaison avec des inhibiteurs MEK1/2 sont conseillés pour le traitement des patients avec un mélanome BRAF V600 muté.	1 (5)
	insensible aux inhibiteurs BRAF	1* (5)
	Level I: increased sensitivity to BRAF TKIs Level II: increased sensitivity to MEK inhibitors	1(5)

Echantillon	Conclusions thérapeutiques encodées	Nombre de laboratoire (%)
F00301815	pas de bénéfice pour le patient d'un traitement avec une thérapie ciblée dirigée (p.ex. d'inhibiteur de BRAF)	1 (5)
	pas de mutations des gènes BRAF, KIT of RAS trouvées Pour les mélanomes sans mutation du gène BRAF, il y a une mauvaise réponse à la thérapie aux inhibiteurs BRAF	1 (5)
	pas d'indication à une réponse aux inhibiteurs BRAF/MEK	1 (5)
	Sensible aux inhibiteurs BRAF	1* (5)
	Suite à l'absence de mutations du gène BRAF, me patient ne réagira probablement pas au inhibiteurs BRAF.	1 (5)

*il s'agit du laboratoire ayant commis une erreur de recopiage.

3.2 Résultats par laboratoire

3.2.1 Cas F00316105

Lab	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score géotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class.Tier *
1	NGS-MiseqDX-Illumina Qiaseq AIT-Qiagen + PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	NM_004333.6 c.1788_1789delins AG p.(Val600Arg)	88	réussi	pathogénique	Tier IA	réussi
2	NGS- Genexus-Thermofischer Ion Ampliseq DNA custom-Thermofischer	NM_004333.5 c.1788_1789delins AG p.(Val600Arg)	86	réussi	pathogénique	Tier I	réussi
3	Pas de résultats renvoyés → échec						
4	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperCap custom-Roche	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	87	réussi	pathogène	Tier I	réussi
5	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperPlus-Roche	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	88	réussi	pathogène	Tier I	réussi
6	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq custom panel-Qiagen	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	88	réussi	pathogène	Tier I	réussi

Labo	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score géotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class.*
7	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq Custom DNA -Illumina	NM_004333.4 Val600Arg	87	réussi	pathogène	Tier I	réussi
8	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq Targeted custom panel-Qiagen	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)**	85	réussi	pathogène	Tier I	réussi
9	NGS-NextSeq500Dx-Illumina Twist custom design probes-Twist bioscience	p.(Val600Arg)	80.7	réussi	pathogène	Tier I	réussi
10	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq Focus-Illumina	NM_004333.5 c.1798.1799 delins AG p.(Val600Arg)	86	réussi	pathogène	Tier IA	réussi
11	NGS-Ion S5 ThermoFischer Oncomine Focus Assay ThermoFischer	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	89	réussi	pathogène	Tier I	réussi
12	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperCap custom-Roche	NM_004333.6 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	91	réussi	pathogène	Tier I	réussi
13	NGS-Nextseq500Dx-Illumina Qiseq Targeted DNA custom panel-Qiagen	NM_004333.4 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	81	réussi	pathogène	Tier I	réussi
14	NGS-Novaseq6000-Illumina In-house capture-based panel	NM_004333.4 c.1798_1799 delins AG p.(Val600Arg)	87	réussi	pathogène	Tier I	réussi
15	PCR-QX200-BioRad protocol home-made ciblant uniquement BRAF V600E	WT	NA	échec	NA	NA	NA

*Les laboratoires ayant une technique PCR ne sont pas évalués sur les classifications rendues.

**Les résultats sont sous-réserve suite à la qualité suboptimale de l'échantillon.

Labo	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score géotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class. *
16**	PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	NO après vérification des données brutes : BRAF V600M/V600R/V600K détectée	NA	échec	NA	NA	NA
17	PCR-Idylla-Biocartis Idylla NRAS-BRAF mutation Test Biocartis	BRAF Val600Lys/ BRAF Val600Arg***	NA	réussi	pathogénique	Tier I	NA
18	PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	V600K/V600R/V600M ***	NA	réussi	NA	NA	NA
19	PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg BRAF Val600Met***	NA	réussi	pathogénique	NA	NA
20	PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg BRAF Val600Met	NA	réussi	NA	NA	NA
21	PCR-Idylla-Biocartis Idylla NRAS-BRAF mutation Test-Biocartis	BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg***	NA	réussi	pathogène	Classe I	NA

*Les laboratoires ayant une technique PCR ne sont pas évalués sur les classifications rendues.

**Veuillez noter que ce laboratoire nous a envoyé les rapports cliniques émis suite à l'analyse des échantillons EEQ et celui-ci a bien retrouvé le groupe de mutation Val600K/Val600M/Val600R dans cet échantillon et a donc commis une erreur de recopiage.

***La méthode ne permet pas d'identifier individuellement ces variant

3.2.1 Cas F00301815

Lab	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score géotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class. *
1	NGS-MiseqDX-Illumina Qiaseq AIT-Qiagen + PCR-Idylla-Biocartis Idylla BRAF mutation Test-Biocartis	Aucune	NA	réussi	NA	NA	NA
2	NGS- Genexus-Thermofischer Ion Ampliseq DNA custom-Thermofischer	Aucune	NA	réussi	NA	NA	NA
3	Pas de résultats renvoyés → échec						
4	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperCap custom-Roche	Quantité d'ADN insuffisante	NA	NA	NA	NA	NA
5	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperPlus-Roche	Quantité d'ADN insuffisante	NA	NA	NA	NA	NA
6	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq custom panel-Qiagen	Quantité d'ADN insuffisante pour une analyse fiable	NA	NA	NA	NA	NA

Labo	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score géotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class.*
7	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq Custom DNA -Illumina	Non concluant	NA	NA	NA	NA	NA
8	NGS-Miseq-Illumina Qiaseq Targeted custom panel-Qiagen	Aucune**	NA	réussi	NA	NA	NA
9	NGS-NextSeq500Dx-Illumina Twist custom design probes-Twist bioscience	Aucune	NA	réussi	NA	NA	NA
10	NGS-Miseq-Illumina Ampliseq Focus-Illumina	Aucune	NA	réussi	NA	NA	NA
11	NGS-Ion S5 ThermoFischer Oncomine Focus Assay ThermoFischer	Aucune**	NA	réussi	NA	NA	NA
12	NGS-Novaseq6000-Illumina Kappa HyperCap custom-Roche	Échantillon non interprétable	NA	NA	NA	NA	NA
13	NGS-Nextseq500Dx-Illumina Qiseq Targeted DNA custom panel-Qiagen	Wild Type**	NA	NA	NA	NA	NA
14	NGS-Novaseq6000-Illumina In-house capture-based panel	Aucune	NA	réussi	NA	NA	NA
15	PCR-QX200-BioRad protocol home-made ciblant uniquement BRAF V600E	WT**	NA	réussi	NA	NA	NA

*Les laboratoires ayant une technique PCR ne sont pas évalués sur les classifications rendues.

**Les résultats sont sous-réserve suite à la qualité suboptimale de l'échantillon.

Labo	Méthodes utilisées	Mutation détectée	Fréquence allélique (%)	Score génotypage	Classification biologique	Classification clinique	Score class. *
16**	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla BRAF	BRAF Val600Lys BRAF Val600Arg BRAF Val600Glu Après vérification des données brutes : Wild Type	NA	échec	Pathogénique	NA
17	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla NRAS-BRAF	Pas de variant	NA	réussi	NA	NA
18	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla BRAF	Aucune	NA	réussi	NA	NA
19	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla BRAF	Aucune	NA	réussi	Non pathogénique	NA
20	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla BRAF	WT	NA	réussi	NA	NA
21	PCR-Idylla-Biocartis mutation Test-Biocartis	Idylla NRAS- BRAF	négatif	NA	réussi	NA	NA

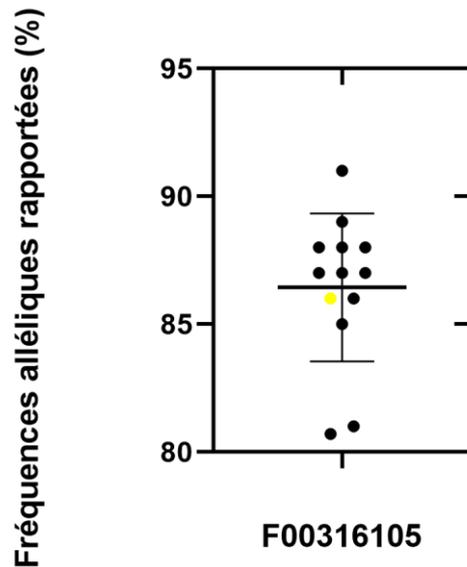
*Les laboratoires ayant une technique PCR ne sont pas évalués sur les classifications rendues.

*Veuillez noter que ce laboratoire nous a envoyé les rapports cliniques émis suite à l'analyse des échantillons EEQ et celui-ci a bien détecté cet échantillon comme Wild-Type et n'a pas retrouvé de mutation BRAFV600 dans celui-ci.

3.3 Distribution des fréquences alléliques

Ci-dessous le graphique montrant la distribution des fréquences alléliques encodées par les laboratoires pour la mutation BRAF V600R. Le point en jaune correspond à la fréquence allélique donnée par le fournisseur pour cet échantillon.

Distribution des fréquences alléliques rapportées pour la détection de la mutation BRAF V600R



Deux laboratoires ayant utilisé une technique NGS ont rapporté une fréquence allélique beaucoup plus faible que la moyenne des fréquences alléliques rapportées par les laboratoires. 1 laboratoire a quant à lui rapporté une fréquence allélique plus haute que la moyenne.

3.4 Commentaires

- Un laboratoire a commis une erreur de recopiage lors du remplissage du formulaire de réponse. Celui-ci nous a contacté quant à son échec suite à la publication de son rapport individuel et nous a envoyé les rapports cliniques relatifs à l'analyse des échantillons EEQ. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une erreur analytique, nous ne pouvons modifier son score et une NC doit être introduite dans son système.
- Un autre laboratoire n'a quant à lui pas détecté la présence de la mutation V600R dans l'échantillon correspondant. Il s'avère que celui-ci a utilisé une méthode in-house ciblant uniquement la mutation BRAF V600E. Ce laboratoire a donc commis une faute en effectuant une analyse qui n'était pas en corrélation avec le test demandé (recherche de la présence de mutations BRAF V600).

4. Méthodologies utilisées

Groupe PCR

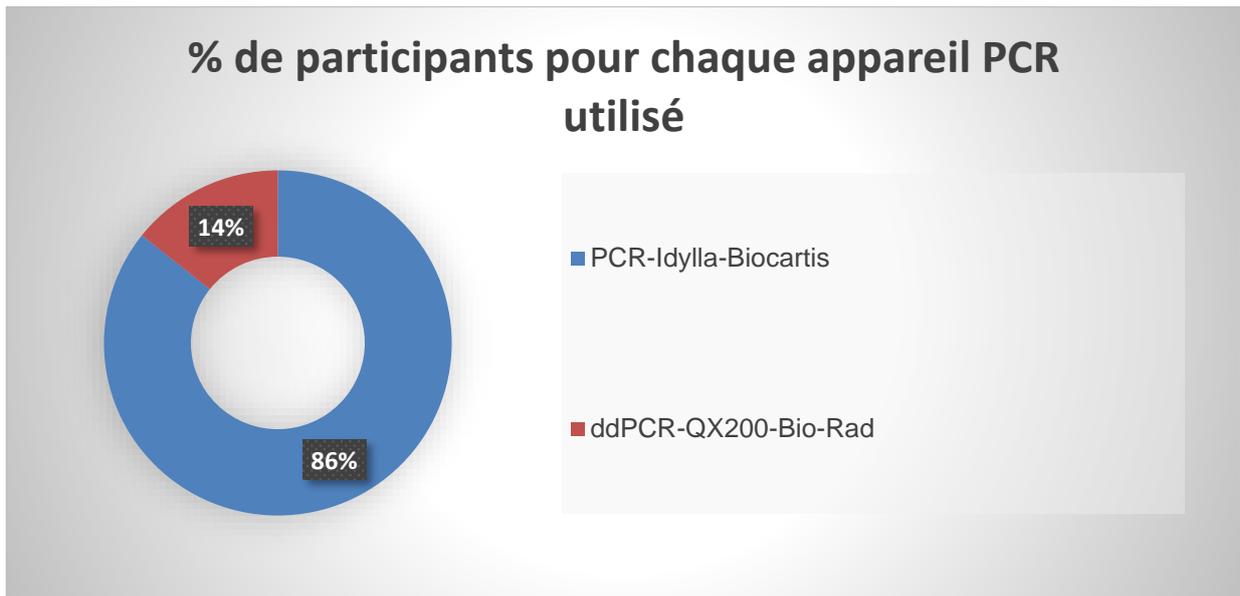


Chart 1 : Distribution des laboratoires par technique PCR pour la détection de mutations BRAFV600

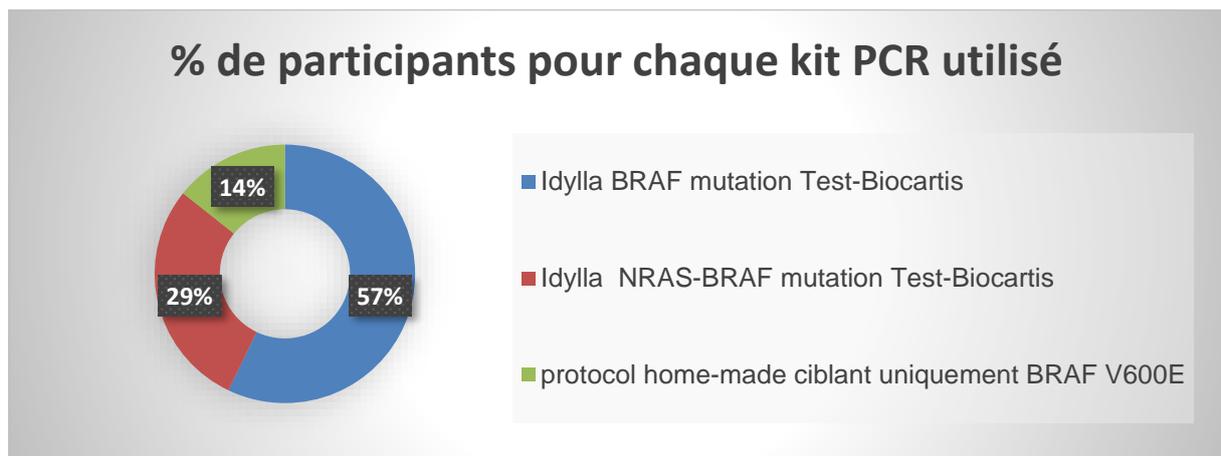


Chart 2 : Distribution des laboratoires par kit PCR utilisé pour la détection de mutations BRAFV600

Pour les utilisateurs de PCR, l'appareil le plus utilisé est l'« Idylla » de chez Biocardis et le kit « Idylla BRAF mutation test » de chez Biocardis également.

Groupe NGS

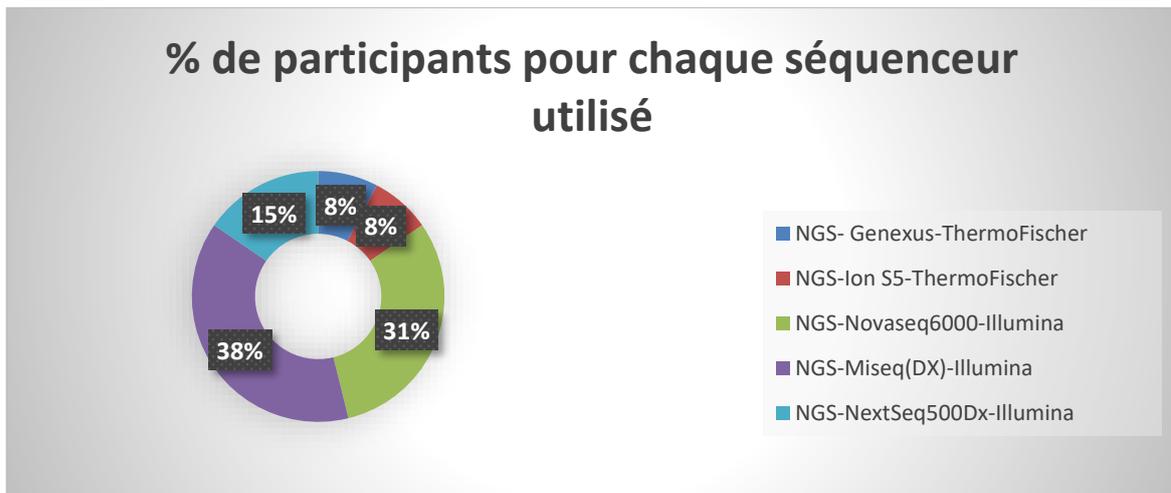


Chart 3 : Distribution des laboratoires par technique NGS pour la détection de mutations BRAFV600

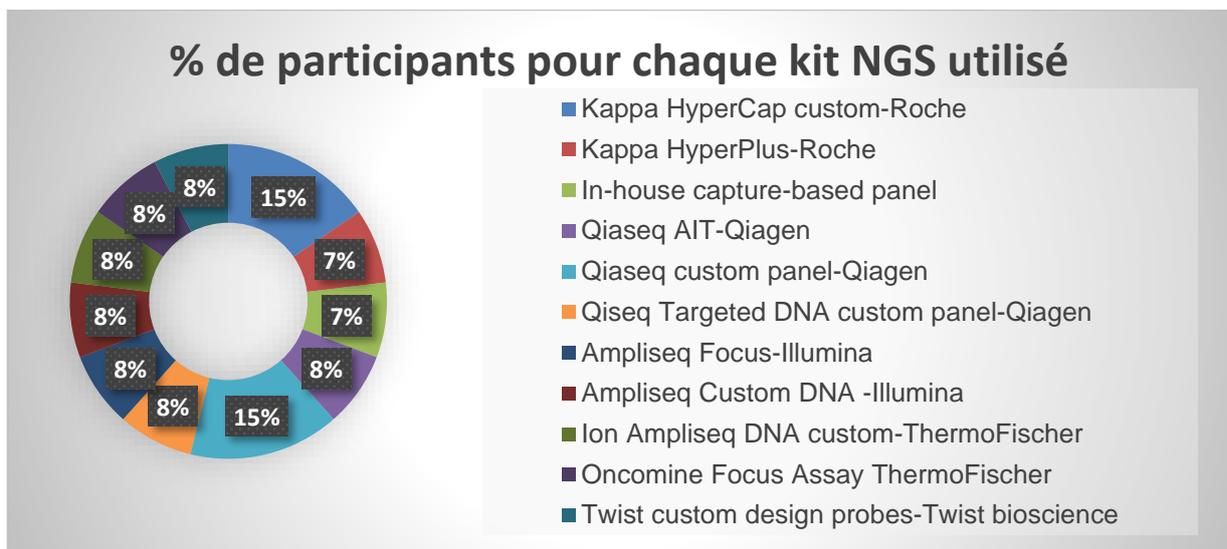


Chart 4 : Distribution des laboratoires par kit NGS utilisé pour la détection de mutations BRAFV600

Veillez noter qu'un laboratoire a introduit une méthode PCR en plus d'une méthode NGS.

Pour les utilisateurs de NGS, le séquenceur le plus utilisé est le « Miseq » de chez Illumina et les kits les plus utilisés sont le « Qiaseq custom panel » de chez Qiagen et le « Kappa HyperCap custom » de Roche.

5. Conclusions sur les performances des laboratoires

Les performances des laboratoires sont très satisfaisantes pour cette enquête. Seul deux laboratoires ont obtenu un score « échec ». L'un d'entre eux a commis une erreur de recopiage lors du remplissage du formulaire de réponse. L'autre laboratoire a quant à lui effectué une analyse qui était discordante avec le test demandé.

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2024.

Ce rapport ne peut pas être reproduit, publié ou distribué sans l'accord de Sciensano. Les résultats individuels des laboratoires sont confidentiels. Ils ne sont transmis par Sciensano ni à des tiers, ni aux membres de la Commission, des comités des experts ou du groupe de travail EEQ.

Biologie moléculaire-examens de génétiques-détection mutation BRAFV600, rapport global 2024/4
FORM 43/124/F V15