

**EXPERTISE, PRESTATIONS DE SERVICE ET RELATIONS CLIENTS**

**QUALITE DES LABORATOIRES**

**COMITE D'EXPERTS *AD HOC***

**BENCHMARKING TRIAL**

**RAPPORT GLOBAL DEFINITIF**  
**Next Generation Sequencing (NGS)**  
**2017/2**

**Sciensano/NGS benchmarking trial/2-FR**

Expertise, prestations de service et relations clients  
Qualité des laboratoires  
Rue J. Wytsman, 14  
1050 Bruxelles | Belgique

[www.sciensano.be](http://www.sciensano.be)

<b>COMITE D'EXPERTS AD HOC</b>
--------------------------------

<b>Sciensano</b>					
Carlier D.	Secrétariat	TEL:	02/642.55.21	FAX:	02/642.56.45
Aline Antoniou	Coordinateur d'enquête	TEL:	02/642.55.27		
		e-mail:	<a href="mailto:Aline.Antoniou@sciensano.be">Aline.Antoniou@sciensano.be</a>		
Vanessa Ghislain	Coordinateur d'enquête remplaçant	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	<a href="mailto:Vanessa.Ghislain@sciensano.be">Vanessa.Ghislain@sciensano.be</a>		
<b>Experts</b>	<b>Institution</b>				
Dr. Philippe Aftimos	Institut Jules Bordet	Tel:	+32 2 541 32 08	Fax:	+32 2 541 32 19
		e-mail:	<a href="mailto:philippe.aftimos@bordet.be">philippe.aftimos@bordet.be</a>		
Dr. Valérie Capraro	CHU-ULG	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:valerie.capraro@chu.ulg.ac.be">valerie.capraro@chu.ulg.ac.be</a>		
Dr. Els Dequeker	UZ Leuven	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:els.dequeker@uzleuven.be">els.dequeker@uzleuven.be</a>		
Dr. Nicky d'Haene	ULB-Erasme	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Nicky.D.Haene@erasme.ulb.ac.be">Nicky.D.Haene@erasme.ulb.ac.be</a>		
Dr. Helena Devos	AZ Sint-Jan	Tel:	050 45 96 55	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Helena.Devos@azsintjan.be">Helena.Devos@azsintjan.be</a>		
Dr. Guy Froyen	Jessa Ziekenhuis	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Guy.Froyen@jessazh.be">Guy.Froyen@jessazh.be</a>		
Dr. Jacobs Koen	AZ Sint-Lucas	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Koen.Jacobs@AZSTLUCAS.BE">Koen.Jacobs@AZSTLUCAS.BE</a>		
Dr. Frédéric Lambert	CHU-ULG	Tel:	+32 4 366 25 47	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:frederic.lambert@chu.ulg.ac.be">frederic.lambert@chu.ulg.ac.be</a>		
Dr. Suzan Lambin	UZA	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:suzan.lambin@uza.be">suzan.lambin@uza.be</a>		
Dr. Els Lierman	UZ Leuven	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:els.lierman@uzleuven.be">els.lierman@uzleuven.be</a>		
Dr. Friedel Nollet	AZ Sint-Jan	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Friedel.Nollet@azsintjan.be">Friedel.Nollet@azsintjan.be</a>		
Dr. Patrick Pauwels	UZA	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Patrick.Pauwels@uza.be">Patrick.Pauwels@uza.be</a>		
Dr. Roberto Salgado	GZA Ziekenhuis	Tel:		Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:roberto@salgado.be">roberto@salgado.be</a>		
Dr. Karl Vandepoele	UZ Gent	Tel:	+32 9 332 0553	Fax:	+32 9 332 4985
		e-mail:	<a href="mailto:Karl.Vandepoele@uzgent.be">Karl.Vandepoele@uzgent.be</a>		
Dr. Pascal Vannuffel	IPG	Tel:	071 44 71 32	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:pascal.vannuffel@ipg.be">pascal.vannuffel@ipg.be</a>		
Dr. Christine Weyn	UZA	Tel:	+32 3 821 59 57	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Christine.Weyn@uza.be">Christine.Weyn@uza.be</a>		
Aline Hébrant	Sciensano	Tel:	+32 2 642 57 32	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Aline.Hebrant@sciensano.be">Aline.Hebrant@sciensano.be</a>		
Els Van Valckenborgh	Sciensano	Tel:	+32 2 642 54 96	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Els.VanValckenborgh@sciensano.be">Els.VanValckenborgh@sciensano.be</a>		
Marc Van den Bulcke	Sciensano	Tel:	+32 2 642 57 60	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Marc.VandenBulcke@sciensano.be">Marc.VandenBulcke@sciensano.be</a>		

Philippe Van de Walle	Sciensano	Tel:	+32 2 642 52 00	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Philippe.VandeWalle@sciensano.be">Philippe.VandeWalle@sciensano.be</a>		
Wim Coucke	Sciensano	Tel:	+32 2 642 55 23	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Wim.Coucke@sciensano.be">Wim.Coucke@sciensano.be</a>		
Thomas Delcourt	Sciensano	Tel:	+32 2 642 55 99	Fax:	
		e-mail:	<a href="mailto:Thomas.Delcourt@sciensano.be">Thomas.Delcourt@sciensano.be</a>		

Une version provisoire de ce rapport a été transmise aux experts le :16/04/2018.  
Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité d'experts *ad hoc* le :14/05/2018.

**Autorisation de diffusion de rapport:** Par Aline Antoniou, coordinateur du Benchmarking trial NGS, le 14/06/2018.



Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:  
[https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/\\_fr/rapports\\_annee.htm](https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/_fr/rapports_annee.htm)

# TABLE DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
1.1. Objectif du Benchmarking trial NGS sur tumeurs hématologiques myéloïdes	5
1.2. Activité sous-traitée	5
1.3. Matériel	5
1.4. Demande	5
1.5. Formulaire de réponse	7
1.6. Critères de réussite	7
<b>2. RESULTATS</b>	<b>8</b>
2.1. Participation au Benchmarking trial NGS	8
2.2. Aperçu des méthodes	8
2.3. Aperçu des résultats	12
2.4. Aperçu des interprétations cliniques/biologiques	13
<b>3. DISCUSSION DES RESULTATS, COMMENTAIRES ET RECOMMANDATIONS</b>	<b>14</b>
3.1. Variants artificiels Horizon	14
3.2. Résultats non attendus pour les variants endogènes validés par ddPCR	14
3.3. Répétabilité des résultats	15
3.4. Uniformisation des rapports cliniques et de l'interprétation clinique/biologique	15
3.5. Références des régions génomiques évaluées	16
<b>4. ANNEXE</b>	<b>17</b>
4.1. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-005	17
4.1.1. Variants validés par ddPCR	17
4.1.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	21
4.1.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	24
4.2. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-006	26
4.2.1. Variants validés par ddPCR	26
4.2.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	29
4.2.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	31
4.3. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-007	32
4.3.1. Variants validés par ddPCR	32
4.3.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	34
4.3.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR	35
4.4. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-005	37
4.5. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-006	38
4.6. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-007	39
4.7. Interprétation du rapport individuel	40

## **1. INTRODUCTION**

En janvier 2016, le Centre du cancer de l'ISP a débuté la mise en œuvre du projet pilote national relatif à l'introduction de la technologie NGS dans notre système de soins de santé. Le projet, qui s'étale sur une période de 5 ans, vise à bien intégrer cette nouvelle technologie au sein de la pratique clinique à l'aide d'actions concrètes. En vue d'évaluer la qualité des résultats des tests, le Centre du cancer et le service Qualité des laboratoires de Sciensano ont organisé un benchmarking trial pour la détection des mutations dites « *actionables* » dans les tumeurs hématologiques myéloïdes par NGS ciblé.

Toutes les informations relatives à l'étude pilote NGS sont détaillées sur la plateforme NGS Roadbook : <https://e-cancer.wiv-isp.be/roadbook/>

### **1.1. Objectif du Benchmarking trial NGS sur tumeurs hématologiques myéloïdes**

L'objectif de ce Benchmarking trial est d'établir l'état des lieux de la manière dont les variants dans un échantillon tumoral sont détectés, sélectionnés et rapportés dans les protocoles cliniques. Cette étude se concentre uniquement sur l'évaluation des paramètres spécifiques aux tumeurs hématologiques myéloïdes.

### **1.2. Activité sous-traitée**

Les échantillons d'ADN génomique ont été produits par la firme Horizon et sont distribués par la firme Amplitech (France).

### **1.3. Matériel**

Le matériel transmis lors de cette étude comportait 3 tubes contenant de l'ADN génomique issu de mélanges de lignées cellulaires bien caractérisées (NGS-2017-005, 006, et 007).

Les profils mutationnels de ces 3 multiplex ont été choisis "à façon" pour les caractéristiques suivantes :

- Types de variants présents dans le multiplex
- Fréquence allélique du variant
- Nombre de variants par multiplex

Plusieurs variants dans différents gènes cliniquement relevant ont été choisis pour le design des échantillons pour :

- La leucémie aiguë myéloblastique LAM (échantillons NGS-2017-005)
- La néoplasie myéloproliférative (NMP) - (pré-fibrotique) myélofibrose primitive (échantillons NGS-2017-006)
- Les syndromes myélodysplasiques (SMD) (échantillons NGS-2017-007)

12 variants ont été validés par ddPCR. Les fréquences alléliques pour ces variants étaient comprises entre 3 et 50%.

L'homogénéité et la stabilité des échantillons sont garanties par Horizon.

### **1.4. Demande**

Il a été demandé de réaliser les analyses de NGS selon les procédures en vigueur au laboratoire. Il a été précisé que le traitement des échantillons devait être identique à celui des échantillons de patients.

Les échantillons devaient être analysés selon les procédures en vigueur au laboratoire pour les tumeurs suivantes :

NGS-2017-005: Leucémie aiguë myéloblastique (LAM)

NGS-2017-006: Néoplasie myéloproliférative (NMP) – (pré-fibrotique) myélofibrose primitive

NGS-2017-007: Syndromes myélodysplasiques (SMD)

Chaque échantillon multiplex devait être analysé trois fois par les laboratoires participants (*triplicates* de chaque multiplex). Les répétitions de chaque échantillon multiplex devaient être réalisées dans le même flux analytique. Cependant lors de la construction des librairies, ces répétitions devaient être considérées comme des échantillons distincts et donc identifiées par des barcodes différents et analysées de manière indépendante par les outils bio-informatiques.

Seules les régions définies lors des réunions du ComPerMed comme étant d'utilité clinique dans le contexte de l'oncologie hématologique devaient être rapportées par les laboratoires. Ces régions sont détaillées dans les listes ci-dessous :

**NGS-2017-005: Leucémie aiguë myéloblastique (LAM):**

Gènes :

*ASXL1 (exon 12)*

*CEBPA (tous les exons)*

*DNMT3A (exons 8-23)*

*FLT3 (exon 14, exon 15, exon 20-codon 835)*

*IDH1 (exon 4-hotspot)*

*IDH2 (exon 4-hotspot)*

*KIT (exon 8, exon 10, exon 17)*

*NPM1 (exon 11-codon 288)*

*RUNX1 (tous les exons)*

*TET2 (exon 3, exons 9-11)*

*TP53 (exons 3-9)*

*WT1 (exon 7, exon 9)*

**NGS-2017-006: Néoplasie myéloproliférative (NMP) – (prefibrotic) myélofibrose primitive:**

Gènes:

*JAK2 (exon 12-F537\_I546), exon 14-codon 617)*

*MPL (exon 10-codon 515)*

*CALR (exon 9)*

*ASXL1 (exons 12)*

*EZH2 (tous les exons)*

*TET2 (exon 3, exons 9-11)*

*IDH1 (exon 4-hotspot)*

*IDH2 (exon 4-hotspot)*

*SRSF2 (exon 1-codon 95)*

*SF3B1 (exon 14, exon 15)*

**NGS-2017-007: Syndromes myélodysplasiques (SMD):**

Gènes:

*SF3B1 (exon 14, exon 15)*

*TET2 (exon 3, exons 9-11)*

*SRSF2 (exon 1-codon 95)*

*ASXL1 (exon 12)*

*DNMT3A (exons 8-23)*

*RUNX1 (tous les exons)*

*U2AF1 (exon 2-codon 34, exon 6-codon 157)*

*TP53 (exons 3-9)*

*EZH2 (tous les exons)*

### **1.5. Formulaire de réponse**

Nous avons demandé, pour les 9 analyses de séquençage réalisées (*triplicates* des 3 échantillons multiplex), de transmettre l'ensemble des données brutes (fichiers fastq, bam et vcf) et de compléter un tableau Excel avec différents paramètres. Nous avons également demandé de transmettre un rapport clinique pour chaque échantillon multiplex (3 au total).

Nous avons également demandé de remplir un formulaire de réponse précisant certaines données techniques concernant la méthode et l'analyse bio-informatique utilisées durant cette étude.

### **1.6. Critères de réussite**

Les critères de réussite sont l'identification des 12 variants, validés par ddPCR, présents dans les 3 échantillons multiplex. Les valeurs médianes des fréquences alléliques rapportées par les laboratoires pour ces variants ont été fournies à titre indicatif ainsi que les valeurs SD. Les variants rapportés par les laboratoires et non validés par ddPCR sont également détaillés dans le rapport et sont transmis à titre indicatif.

## 2. RESULTATS

### 2.1. Participation au Benchmarking trial NGS

16 laboratoires belges se sont inscrits au Benchmarking trial sur tumeurs hématologiques myéloïdes. 15 laboratoires ont répondu dans les délais à l'étude et sont repris dans l'analyse des résultats. La participation était ouverte aux laboratoires médicaux belges qui réalisaient la détection des mutations sur tumeurs solides par la technique NGS, accrédités ISO 15189 pour cette technique ou en cours d'accréditation au moment de l'envoi des échantillons. Pour les laboratoires en cours d'accréditation, le dossier de validation ou le plan de validation était requis lors de l'inscription.

Tableaux 1a, 1b et 1c: Aperçu des participants

Région	N	Laboratoire	N
Région flamande	10	Anatomie pathologique	1
Région bruxelloise	3	Biologie Clinique	11
Région wallonne	2	Génétique humaine	3
Total	15	Total	15

Laboratoire	N
Accrédité	9
En cours d'accréditation au moment de l'inscription	6
Total	15

### 2.2. Aperçu des méthodes

Tableau 2: Plateformes utilisées par les participants

Marque	N	Plateforme	N
Illumina	14	MiSeq	12
		MiSeq DX	1
		HiSeq 1500	1
IonTorrent	1	PGM	1

Tableau 3: Références *flow cells* ou puces utilisées

Puce/ <i>flow cell</i>	N
Miseq v3	7
Miseq v2	5
Miseq micro v2	2
HiSeq Rapid v2	1
Ion 318 v2	1

Remarque : certains laboratoires utilisent dans leurs procédures plusieurs *flow cells*/puces.



Tableau 4: analyses *single/paired-end*

<b>Single/paired-end</b>	<b>N</b>
Single end	1 (Ion Torrent)
Paired-end	14 (Illumina)

Tableau 5: Longueur des *reads*

<b>Longueur (pb)</b>	<b>N</b>
125	1
150	7
200	1
230	1
250	4
225-275	1

Tableau 6: Référence des panels de gènes utilisés

<b>Panels de gènes utilisés</b>	<b>N</b>
TruSight Myeloid Sequencing panel (Illumina)	7
Human Myeloid Neoplasms panel (Qiagen)	1
AmpliSeq Oncomine Myeloid (Thermo Fisher)	1
xGen Acute Myeloid Leukemia Cancer Panel (IDT)	1
TruSeq Custom Amplicon Low input (Illumina)	1
Nextera XT Custom panel (Illumina)	1
Haloplex Custom panel (Agilent)	2
GeneRead Custom panel v2 (Qiagen)	1

Remarque : un laboratoire a développé plusieurs panels customisés pour différents types de tumeurs.

Tableau 7: Outils commerciaux et pipelines « *in-house* » utilisés

<b>Outils commerciaux/pipelines « <i>in-houses</i> »</b>	<b>N</b>
Sophia DDM (Sophia Genetics)	5
Variant Studio (Illumina)	4
SeqNext (JSI)	4
NextGene Software (Softgenetics)	1
Biomedical Genomics Workbench (Qiagen)	1
CLC Genomics Workbench (Qiagen)	1
QCI interpret (Qiagen)	1
Agilent SureCall (Agilent)	1
BWA+GATK+annovar (open source)	1
FastQC+BWA+Samtools+Picardtools+Genome Analysis Toolkit (open source)	1

Remarque : certains laboratoires utilisent dans leurs procédures plusieurs outils bio-informatiques.

Tableau 8: Catégories de variants somatiques détectées par les méthodes d'analyse NGS pour les tumeurs hématologiques myéloïdes

Catégories de variants somatiques	N
SNV	15
Indels (<50pb)	15
Indels (50pb-1kb)	2
CNV	0
Translocation	0
Autre : indels entre 50-150pb	2

Tableau 9: Limites de détection pour chaque catégorie de variant détecté

Limite de détection pour SNV : fréquence allélique (%)	Limite de détection pour SNV : profondeur de séquençage (X)	N
2	40	1
2.5	/	1
5	300	3
5	500	6
5	/	3
1-5	/	1
Limite de détection pour indels <50pb: fréquence allélique (%)	Limite de détection pour indels <50pb : profondeur de séquençage (X)	N
2	40	1
5	300	3
5	500	5
5	/	4
1-5	/	1
/	/	1
Limite de détection pour Indels (50pb-150pb): fréquence allélique (%)	Limite de détection pour Indels (50pb-150pb): profondeur de séquençage (X)	N
2	40	1
5	500	1
Limite de détection pour Indels (50pb-1kb): fréquence allélique (%)	Limite de détection pour Indels (50pb-1kb): profondeur de séquençage (X)	N
5	300	1
5	/	1

Remarque : certains laboratoires utilisent des limites de détections moins strictes pour les régions hotspots.

Tableau 10: Pour la recherche de variants somatiques sur tumeurs hématologiques myéloïdes réalisée en routine, séquencez-vous un échantillon normal du même patient en parallèle de l'échantillon tumoral ?

Séquençage échantillon normal	N
Oui	0
Non	15

Tableau 11: Types d'échantillons séquencés par les laboratoires pour la détection de variants somatiques dans les tumeurs hématologiques myéloïdes

Type d'échantillon	N
Prélèvement de moelle	15
Sang	14
Tissu congelé	4
Tissu paraffiné	1
Autres : Biopsies et liquides biologiques	1

Tableau 12: Quantités minimales d'ADN génomique requises par les laboratoires pour réaliser l'analyse NGS sur les tumeurs hématologiques myéloïdes

Quantité minimale d'ADN génomique	N
20ng	2
30ng	1
40ng	2
50ng	7
185ng	1
200ng	1
250ng	1
1000ng	1

Remarques: Un laboratoire répond des quantités minimales différentes en fonction du panel utilisé.

Tableau 13: Est-ce que les panels utilisés par les laboratoires couvrent l'ensemble des régions définies par le ComPerMed ?

Couverture complète	N
Oui	7
Non	8

Remarques: Les gènes qui ne sont pas couverts par l'ensemble des participants sont principalement les gènes CEBPA, EZH2 et DNMT3A.

### 2.3. Aperçu des résultats

Tableau 14: Résultats attendus et observés pour les variants validés par ddPCR

Echantillon	Gène	Mutation	Proportion de laboratoires ayant rapporté la mutation	Proportion de citations Z	Fréquence allélique médiane (%)	SD
NGS-2017-005	TP53	p.(Glu171*)	15/15	1/15	34.30	1.76
NGS-2017-005	KIT	p.(Asp816Val)	15/15	1/15	19.03	1.67
NGS-2017-005	IDH2	p.(Arg140Gln)	15/15	3/15	20.88	1.11
NGS-2017-005	IDH1	p.(Arg132Gly)	15/15	1/15	5.30	0.60
NGS-2017-005	FLT3	p.(Asp835Tyr)*	14/15	1/14	11.46	0.86
NGS-2017-006	JAK2	p.(Val617Phe)	15/15	2/15	21.00	0.87
NGS-2017-006	IDH2	p.(Arg172Ser)**	14/15	1/14	30.95	0.83
NGS-2017-006	IDH1	p.(Arg132Ser)**	14/15	1/14	11.05	1.12
NGS-2017-006	SF3B1	p.(Lys700Glu)*	12/15	2/12	10.65	1.24
NGS-2017-007	SF3B1	p.(Lys666Asn)*	15/15	2/15	24.76	2.63
NGS-2017-007	TP53	p.(Ala161Asp)**	14/15	2/14	47.45	2.73
NGS-2017-007	TP53	p.(Tyr220Cys)**	13/15	1/13	5.12	0.63

**8 Laboratoires ont réussi à identifier les 12 mutations d'intérêt, 6 en ont identifié 11 et 1 en a identifié 9.**  
\* Variants artificiels Horizon (voir point 3.1.)  
\*\* Variants endogènes non identifiés par certains laboratoires (voir point 3.2.)  
L'interprétation statistique est détaillée dans la partie interprétation du rapport individuel pages 40-41.

Tableau 15: Résultats observés pour les variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

Echantillon	Gène	Mutation	Proportion de laboratoires ayant rapporté la mutation	Fréquence allélique médiane (%)	SD
NGS-2017-005	TET2	p.(Ser268*)	15/15	27.00	1.21
NGS-2017-005	TP53	p.(Ser215Gly)	14/15	46.34	1.90
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Leu764Tyrfs*8)	13/15	40.20	0.96
NGS-2017-005	RUNX1	p.(Pro49Leu)	10/15	13.00	1.04
NGS-2017-006	ASXL1	p.(Tyr591*)	13/15	10.10	0.74
NGS-2017-006	ASXL1	p.(Leu764Tyrfs*8)	13/15	68.00	2.74
NGS-2017-007	EZH2	p.(Cys539Arg)	11/15	21.19	0.69

Tableau 16: Résultats observés pour les variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

Echantillon	Gène	Mutation	Proportion de laboratoires ayant rapporté la mutation	Fréquence allélique médiane (%)	SD
NGS-2017-005	RUNX1	p.(Met267Ile)	9/15	12.30	2.20
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Gly646Trpfs*12)	6/15	8.00	0.56
NGS-2017-005	TET2	p.(Tyr867His)	5/15	51.10	0.83
NGS-2017-005	TET2	p.(Pro1723Ser)	4/15	48.81	3.77
NGS-2017-005	ASXL1	p.(Met1249Val)	4/15	7.79	0.84
NGS-2017-005	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	9.90	0.59
NGS-2017-005	TET2	p.(His1778Arg)	2/15	51.00	0.15
NGS-2017-005	TP53	p.(Pro72Arg)	1/15	98.50	0.00
NGS-2017-005	DNMT3A	p.(Arg729Trp)	1/15	2.80	0.00
NGS-2017-005	CEBPA	p.(His195_Pro196dup)	1/15	8.10	0.00
NGS-2017-006	TET2	p.(Tyr867His)	5/15	69.82	1.63
NGS-2017-006	TET2	p.(Pro1723Ser)	5/15	67.74	7.64
NGS-2017-006	TET2	p.(Leu1721Trp)	2/15	20.30	1.11
NGS-2017-006	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	37.25	22.28
NGS-2017-006	TET2	p.(His1778Arg)	2/15	39.45	21.83
NGS-2017-007	TET2	p.(Arg1261His)	8/15	26.70	1.06
NGS-2017-007	TET2	p.(Gln1084Pro)	5/15	41.10	1.16
NGS-2017-007	TET2	p.(Ile1762Val)	2/15	22.80	2.15
NGS-2017-007	TP53	p.(Pro72Arg)	1/15	53.70	0.00
NGS-2017-007	TET2	p.(Leu1721Trp)	1/15	3.15	0.00
NGS-2017-007	EZH2	p.(Asp146His)	1/15	7.80	0.00
NGS-2017-007	DNMT3A	p.(Arg729Trp)	1/15	2.80	0.00

Tableau 17: Taux de réussite des participants basé sur les 12 variants validés par ddPCR

Taux de réussite	N
12/12 (100%)	8
11/12 (91.67%)	6
9/12 (75.00%)	1

Taux de réussite moyen : 171/180 (95.00%)

#### 2.4. Aperçu des interprétations cliniques/biologiques

Les interprétations cliniques/biologiques sont reprises en annexe de ce rapport (pages 17 à 36). Ces données ont été extraites à partir des fichiers Excel de réponse pour la répétition 1 et peuvent être fragmentaires par rapport aux commentaires rapportés dans le rapport clinique. Afin de ne pas introduire d'erreurs de traduction, les interprétations cliniques/biologiques ont été conservées dans la langue utilisée par les laboratoires.

### 3. DISCUSSION DES RESULTATS, COMMENTAIRES ET RECOMMANDATIONS

#### 3.1. Variants artificiels Horizon

Trois variants évalués dans cette étude ont été insérés de manière artificielle dans les lignées cellulaires utilisées (cfr. tableau 14). Il s'agit des variants FLT3 p.(Asp835Tyr) (échantillon NGS-2017-005), SF3B1 p.(Lys700Glu) (échantillon NGS-2017-006) et SF3B1 p.(Lys666Asn) (échantillon NGS-2017-007). Ces variants ont été introduits avec une cassette d'insertion d'environ 2kb (cfr. schéma ci-dessous).



Nous avons analysé l'alignement des amorces utilisées par les laboratoires participants pour ces 3 variants. Pour 3 laboratoires, nous avons identifié une incompatibilité entre certains de ces variants artificiels et leurs méthodes d'analyse. Ces variants n'ont pas été évalués pour ces 3 laboratoires. En effet, pour les 3 laboratoires concernés, pour 2 variants (voir tableau 18), la cassette d'insertion est présente entre les amorces couvrant cette région et empêche son amplification.

Tableau 18: Incompatibilité des variants artificiels pour 3 laboratoires

Laboratoire	Variants artificiels incompatibles avec la méthode utilisée
Laboratoire 1	FLT3 p.(Asp835Tyr), échantillon NGS-2017-005
Laboratoire 2	SF3B1 p.(Lys700Glu), échantillon NGS-2017-006
Laboratoire 3	SF3B1 p.(Lys700Glu), échantillon NGS-2017-006

Tableau 19: Taux de réussite des participants recalculés

Taux de réussite	N
12/12 ou 11/11 (100%)	11
11/12 (91.67%)	3
9/12 (75.00%)	1

Taux de réussite moyen : 171/177 (96.61%)

#### 3.2. Résultats non attendus pour les variants endogènes validés par ddPCR

Pour l'échantillon NGS-2017-006, 3 résultats non attendus ont été observés (cfr. tableau 14):

- Un laboratoire n'a pas rapporté les variants IDH2 p.(Arg172Ser) et IDH1 p.(Arg132Ser) dont les fréquences alléliques médianes sont de 30,95% et de 11,05% respectivement. Nous avons pu mettre en évidence la présence de ces variants dans leurs données brutes. Cependant, ce laboratoire a rapporté à la place du variant IDH1 p.(Arg132Ser) le variant IDH1 p.(Arg132Gly). Pour ce laboratoire, nous suspectons un problème dans l'analyse bio-informatique de ces variants par leur méthode.
- Un laboratoire n'a pas identifié le variant SF3B1 p.(Lys700Glu) lié à une cassette d'insertion et dont la fréquence allélique médiane est de 10,65%. Pour ce laboratoire, Nous avons pu mettre en évidence la présence de ce variant dans leurs données brutes. Pour ce laboratoire, nous suspectons un problème dans l'analyse bio-informatique de ce variant par leur méthode.

Pour l'échantillon NGS-2017-007, 3 résultats non attendus ont été observés (cfr. tableau 14):

- Un laboratoire n'a pas rapporté le variant TP53 p.(Ala161Asp) dont la fréquence allélique médiane est de 47.45%. Nous avons pu mettre en évidence la présence de ce variant dans leurs données brutes. Durant l'étape d'interprétation biologique et/ou clinique du variant, le laboratoire nous a informé avoir classé ce variant dans la catégorie VUS (*Variant of Unknown Significance*), catégorie que ce laboratoire ne rapporte pas dans leurs rapports cliniques.
- 2 laboratoires n'ont pas rapportés le variant TP53 p.(Tyr220Cys) dont la fréquence allélique médiane est de 5.12%. Pour ces 2 laboratoires, la fréquence allélique de la mutation se trouve proche de leur seuil de détection fixé à 5%.

### 3.3. Répétabilité des résultats

- 2 laboratoires ont montré des problèmes de répétabilité dans la détection de certains variants validés par ddPCR.
- Un laboratoire a analysé l'échantillon NGS-2017-007 uniquement en double. Selon leurs critères, la troisième analyse n'a pas été contributive.

Tableau 20: Problèmes de répétabilité pour 2 laboratoires

Laboratoire	Variants avec problème de répétabilité	Nombre de répétitions où le variant a pu être identifié
Laboratoire 1	FLT3 p.(Asp835Tyr), échantillon NGS-2017-005	2/3
	KIT p.(Asp816Val), échantillon NGS-2017-005	1/3
	JAK2 p.(Val617Phe), échantillon NGS-2017-006	2/3
Laboratoire 2	JAK2 p.(Val617Phe), échantillon NGS-2017-006	2/3
	SF3B1 p.(Lys700Glu), échantillon NGS-2017-006	2/3
	TP53 p.(Tyr220Cys), échantillon NGS-2017-007	2/3

### 3.4. Standardisation des rapports cliniques et de l'interprétation clinique/biologique

Depuis février 2018, le ComPerMed a mis sur pied un groupe de travail afin de standardiser l'interprétation des variants et le contenu des rapports cliniques NGS. Ce projet répond à la demande des experts suite à la diversité des réponses observées lors des *benchmarking trials* organisés (voir Annexe 4.1, 4.2 et 4.3).

Ce groupe d'experts travaille plus particulièrement, sur la standardisation :

- 1) de l'annotation des variants
- 2) des références utilisées pour les régions testées
- 3) de la classification biologique des variants
- 4) de la classification clinique des variants
- 5) du rapport clinique

Les conclusions qui seront retenues seront publiées sous forme de recommandations.

Les règles de nomenclature utilisées dans ce rapport proviennent des recommandations HGVS (<http://varnomen.hgvs.org/>)

### 3.5. Références des régions génomiques évaluées

Le choix des régions à analyser durant ce *benchmarking trial* provient d'un groupe de travail du ComPerMed dédié à la définition des tests moléculaires à réaliser en (hémato -) oncologie. Ces discussions ont abouties à la rédaction d'un document reprenant les termes qui seront utilisés dans la future convention. Cependant, la liste des régions d'intérêt reprise dans ce document et dans les directives de cette étude n'avait pas été liée à des références génomiques claires. Durant ce *benchmarking trial*, en raison de cette imprécision, un laboratoire n'a pas rapporté certains variants dans le gène ASXL1 qui n'étaient pas localisés, selon leur référence, dans la région évaluée (exon 12). Ce point a été également discuté lors de la première réunion du groupe de travail 'standardisation de l'interprétation des variants et des rapports cliniques' et la décision d'indiquer les références génomiques (NM ou LRG) a été approuvée (cfr. 3.4). Il est donc dorénavant recommandé de toujours associer une référence univoque à une position/une région du génome.



#### 4. ANNEXE

##### 4.1. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-005

##### 4.1.1. Variants validés par ddPCR

LAB	Interprétation TP53 p.(Glu171*)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie.
3	Classe 4A
4	Het TP53 gen, dat gelegen is 17p13.1, is een gen dat codeert voor het p53 eiwit, een transcriptionele regulator waarbij cel cyclus arrest en apoptose geïnduceerd wordt in het geval van DNA schade. TP53 mutaties zijn één van de meest frequente genetische abnormaliteiten in kanker en bovendien een belangrijke prognostische merker voor AML, gezien het de therapie-gerelateerde AML/MDS subgroep identificeert. t-AML is een complicatie ten gevolge van cytotoxische chemo- en/of radiotherapie. T-AML/MDS is gekenmerkt door een hogere incidentie van TP53 mutaties, chromosoom 5 of 7 abnormaliteiten, complexe cytogenetica en chemoresistentie. Het betreft een tumor suppressor waarbij zowel frameshift, nonsense en missense mutaties van belang zijn. Wong T et al heeft aangetoond dat TP53 mutaties in t-AML/MDS frequent zijn maar dat ze reeds jaren vóór toediening van cytotoxische therapie reeds subclonaal aanwezig zijn, ten gevolge van bvb verhoogde mutatiefrequentie door oa. leeftijd. Tijdens behandeling wordt de TP53mut subkloon uitgeselecteerd met verhoogde proliferatie in de jaren nadien, met t-AML tot gevolg. Gekende driver mutaties in de novoAML zijn significant minder aanwezig in t-AML/MDS (bvb DNMT3A, NPM1, TET2). T-AML/MDS is aldus gekenmerkt door een specifiek mutatieprofiel. TP53 mutatiefrequentie varieert van 5-35% in t-AML/MDS en zijn geassocieerd met complexe cytogenetica en ongunstige prognose. Malcovati et al. toont een onafhankelijk effect op algemene overleving van TP53 mutaties in MDS (HR 6,00). Lindsley et al. classificeert TP53 mutatiepositieve patiënten als een aparte subgroep met minst gunstige algemene overleving. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014). TP53 mutaties zijn geassocieerd met complex en monosomaal karyotype en met excessieve blasten en thrombocytopenie. TP53 is gemuteerd in 20% van del(5q) patiënten.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in TP53 worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Stirewalt et al. Blood 2001;97:3589–3595. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Hou et al. Blood Cancer Journal (2015). TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in TP53 in AML zijn geassocieerd met een slechte prognose (Dohner et al., Blood 2017). Papaemmanuil (NEJM, 2016) suggereert dat AML met complex Karyotype en TP53 mutatie een aparte klasse is, met een slechte prognose. Echter dit is nog niet opgenomen in de WHO 2017.
15	Pathogeen

LAB	Interprétation KIT p.(Asp816Val)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	La mutation KIT est associée à une pronostic intermédiaire dans les LMA présentant un facteur pronostique favorable tel que t(8 ;21) ou inv(16).
3	Classe 1
4	KIT mutaties komen voornamelijk voor in CBF-AML, zijnde de subgroepen inv(16) en t(8;21). KIT behoort tot de klasse III RTK. Constitutieve receptor activatie (GOF) werd beschreven bij CBF-AML. Mutaties komen in CBF-AML voornamelijk voor in exons 8 en 17. Exon 17 mutaties voorspellen een significant slechtere prognose en verhoogd risico op herval (>6x tov van wt) in zowel volwassen als pediatrische t(8;21) AML. De prognostische impact van KIT mutaties bij inv(16) AML is niet eenduidig, doch Paschka et al. tonen aan dat de aanwezigheid van KIT mutaties eveneens een verhoogd risico op herval aangeeft bij inv(16) AML. KIT D816V mutatie is een kenmerkende mutatie bij mastocytose (in 95% van mastocytosen) die geassocieerd is met imatinib resistentie.
5	PATHOGENIC
6	coverage te laag
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Deze mutatie is geassocieerd met een intermediaire prognose in patiënten met AML met t(8;21), inv(16), of t(16;16) karyotype. In patiënten zonder KIT mutaties zijn t(8;21), inv(16), of t(16;16) geassocieerd met een gunstige prognose. Resistentie aan KIT inhibitors is beschreven bij KIT D816 mutaties. Ref. Paschka et al. J Clin Oncol 2006;24:3904–3911. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / KIT mutatie zijn beschreven in AML, in sommige studies werd een kortere overleving beschreven in AML met mutaties in KIT exon 17 (WHO 2017, Döhner et al, 2008).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation IDH2 p.(Arg140Gln)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Chez les patients avec un caryotype normal, les mutations IDH sont associées à un pronostic favorable.
3	Classe 1
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat αKG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 140 en in mindere mate op positie 172. Deze varianten leiden tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-19%). IDH2 mutaties zijn geassocieerd met hogere leeftijd en moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 mutaties. Fase III klinische studie (ECOG E1900 cohort) toont aan dat IDH2 R140 specifiek geassocieerd is met gunstig verloop in AML, zowel in volledige cohort als CN-intermediate risk cohort. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd in app. 2-5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge trombocyten telling, en mutaties in

LAB	Interprétation IDH2 p.(Arg140Gln)
	DNMT3A (p<0,001), ASXL1 (p=0,007), en SRSF2 (p<0,001). IDH2 is een predictieve factor voor ongunstige prognose bij patienten met een IPSS of FAB of WHO low-risk MDS. Dit is niet het geval bij high-risk MDS. Indicatief voor moleculair 'low risk' AML en gunstig klinisch verloop wanneer co-mutatie met NPM1. Verder geen eenduidige impact op prognose. In MDS predictief voor ongunstig klinisch verloop en snelle leukemische progressie bij 'low risk' MDS.
5	PATHOGENIC
6	gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH2 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. De prognostische betekenis van IDH2 mutaties is nog onduidelijk. In AML patiënten met een normaal karyotype en NPM1 mutatie, worden IDH2 mutaties geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH2 mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet duidelijk (WHO 2017). Er zijn Clinical trials voor AML patienten met IDH mutaties (clinicaltrial.gov).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation IDH1 p.(Arg132Gly)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Chez les patients avec un caryotype normal, les mutations IDH sont associées à un pronostic favorable.
3	Classe 1
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat $\alpha$ KG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 132. Deze variant leidt tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-16%). IDH1 R132 is geassocieerd met moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 en WT1 mutaties. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd met een frequentie van 5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge trombocyten telling, en mutaties in DNMT3A (p<0,001), ASXL1 (p=0,007), en SRSF2 (p<0,001).
5	PATHOGENIC
6	gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH1 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. De prognostische betekenis van IDH1 mutaties is onduidelijk. In AML patiënten met een normaal karyotype en NPM1 mutatie, worden IDH1 mutaties geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic /IDH1 mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet

<b>LAB</b>	<b>Interprétation IDH1 p.(Arg132Gly)</b>
	duidelijk (WHO 2017). Er zijn Clinical trials voor AML patienten met IDH mutaties (clinicaltrial.gov).
15	Pathogeen

<b>LAB</b>	<b>Interprétation FLT3 p.(Asp835Tyr)</b>
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	La mutation FLT3 D835Y est associée avec un pronostic plutôt défavorable dans les LMA à caryotype normal ne présentant pas de FLT3-ITD.
3	Classe 1
4	FLT3 behoort tot klasse III receptor tyrosine kinase familie en is structureel homoloog aan KIT en PDGFR receptors. FLT3 is betrokken bij celproliferatie, -overleving en -differentiatie van hematopoietische progenitor cellen. FLT3 somatische mutaties komen voor met een frequentie van 20% in AML en een aanrijking bij cytogenetisch normale AML (28-34%). De meest voorkomende variant is een ITD in exon 14/15 gevolgd door een puntmutatie in exon 20 (D835Y). Het betreft voornamelijk activerende mutaties. FLT3-ITD's zijn geassocieerd met een slechte prognose, welke zich maximaal manifesteert bij patienten met een hoge variant frequentie en ongeacht de leeftijd van de patiënt. Allo-HSCT kan worden beschouwd als een efficiënte therapeutische benadering bij primaire CR, doch contradictorische data. Ook intensivering van zowel inductie als post-remissie chemotherapie blijkt klinisch voordeel op te leveren bij de novo AML.
5	PATHOGENIC
6	prognose nog onduidelijk
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	De prognostische betekenis van FLT3 kinase domein puntmutaties is nog onduidelijk. FLT3 mutaties gecombineerd met t(8;21), inv(16) of t(16;16) worden geassocieerd met een gunstige prognose. Ref. Allen et al. Leukemia 27 (9), 2013. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia.
12	Pathogénique
14	Definitely pathogenic / Tyrosine kinase domain FLT3 (FLT3-TKD) mutaties zijn beschreven in AML, echter de betekenis hiervan is niet duidelijk (Döhner et al, 2008). Er zijn Clinical trials voor AML patienten met FLT3 mutaties (clinicaltrial.gov).
15	Pathogeen

#### 4.1.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	interprétation TET2 p.(Ser268*)
1	Deze variant: prognose niet gekend. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
3	Classe 3A
4	<p>Tet2 mutaties (meestal loss of function) waargenomen in verschillende myeloïde malignancies: 19% in MDS 4-13% in MPN 22-42% in CMML 12-16% in AML Mutueel exclusief met idh1/2. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014).</p> <p>AML: Negatief prognostisch effect voornamelijk in intermediate-risk AML, doch eerder trend. MDS: Tet2 mutaties reeds vaak geassocieerd met betere HMT (AZA/DEC) respons, doch niet eenduidig. Betere ORR op 5-azacytidine en/of decitabine indien subclones (&lt;10%VAF) als wildtype worden behandeld. Respons rates zijn het hoogst in de subgroep met TET2 mutante patienten zonder clonale ASXL1 mutatie.</p> <p>MDS/MPN (CMML): Tet2 gemuteerd in 50-60% bij CMML. In CMML, tet2 typisch een comutatie met SRSF2</p> <p>MPN: Tet2 mutaties komen in MPN vaak voor samen met Jak2 mutaties. De volgorde waarin JAK2 en TET2-mutaties worden verworven beïnvloedt de klinische kenmerken, de respons op gerichte therapieën, en de biologie en clonale evolutie bij MPN.</p> <p>A) jak2 first: vnl jak2/tet2 dubbel mutaties: grotere kans op PV itt ET, verhoogd risico op trombose en verhoogde gevoeligheid op ruxolitinib. Tet2 mutatie noodzakelijk voor stamcel/progenitor expansie, doch reeds megakaryocytose en erthrocytose, wat leidt tot vroege klinische presentatie. B) tet2 first: vnl tet2 single mutaties. Tet2 verandert transcriptioneel pad van jak2 V617F en verhindert jak2 mutatie van genen geassocieerd met proliferatie op te reguleren</p>
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TET2 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. TET2 mutaties bij AML met een normaal karyotype (CN-AML) worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Weissmann et al. Leukemia (2012) 26, 934 – 942. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.
12	Pathogénique probable
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / TET2 mutatie is beschreven in AML maar zonder duidelijk prognosis betekenis.
15	Pathogeen



LAB	Interprétation TP53 p.(Ser215Gly)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie.
3	Classe 1
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in TP53 worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Stirewalt et al. Blood 2001;97:3589–3595. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. Hou et al. Blood Cancer Journal (2015). TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution.
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in TP53 in AML zijn geassocieerd met een slechte prognose (Dohner et al., Blood 2017). Papaemmanuil (NEJM, 2016) suggereert dat AML met complex Karyotype en TP53 mutatie een aparte klasse is, met een slechte prognose. Echter dit is nog niet opgenomen in de WHO 2017.
15	Pathogeen

LAB	Interprétation ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	Classe 1 ou VUS
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. Het betreft een tumor suppressor gen, waardoor voornamelijk LOF varianten van belang zijn. ASXL1 interageert met het polycomb-repressive complex (PRC) en promoot myeloïde transformatie door H3K27 tri-methylatie. Mutatiefrequenties zijn 14% in MDS, 11% AML, 45% CMML, 30% PMF en 4% PV/ET. ASXL1 mutaties zijn beschreven als 'secondary-type mutations', dewelke vroege genetische events zijn die leiden tot dysplasie en ineffektieve hematopoïese. Dit in tegenstelling tot de novo/pan-AML mutaties die voornamelijk verworven worden tijdens progressie van MDS naar AML en aldus latere genetische events zijn die myeloïde maturatie verhinderen en zo de stijging in blasten verklaren in (s)AML. Deze 'secondary-type' mutaties zijn geassocieerd met een ongunstig klinisch verloop. In ASXL1 zijn 70% frameshift mutaties en 30% puntmutaties. De klinische implicatie van frameshift mutaties is kortere tijd tot leukemische progressie. Wanneer enkel puntmutaties als cohort wordt getest, is er geen significante correlatie wat betreft tijd tot progressie naar AML. Bij frameshift en puntmutatie cohorts samen wordt enkel een trend gedetecteerd. Ook Malcovati et al. toont een ongunstig klinisch effect aan van ASXL1 mutaties in MDS op algemene overleving (HR 2,08). ASXL1 is een predictor voor ongunstige algemene overleving in zowel de volledige cohort als de intermediate-risk AML cohort. ASXL1 mutaties zijn exclusief met NPM1 in AML en geassocieerd met Runx1 mutaties.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie

LAB	Interprétation ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in ASXL1 worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref.: Chou et al. Blood 2010; 116 (20): 4086-94. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. Pratcorona et al. Haematologica 2012; 97(3):388-92. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML. Cazzola et al. Blood 122 (25), 2013. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutaties in ASXL1 zijn in AML geassocieerd met een lagere overleving (Dohner et al, Blood 2017; WHO 2017).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation RUNX1 p.(Pro49Leu)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
2	Les mutations RUNX1 sont associées avec l'âge, le genre (masculin) et les LMA secondaires à un SMD. Elles sont associées à des survies sans événement, survie sans rechute et une survie globale inférieures.
3	VUS
6	ongunstige prognose
7	waarschijnlijk pathogene mutatie
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function.
10	VUS
12	Signification inconnue
13	VUS
15	VUS

#### 4.1.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	Interprétation RUNX1 p.(Met267Ile)
1	Deze variant: VUS (variant of unknown significance). Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	SNP
6	ongunstige prognose
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function.
10	VUS
12	Signification inconnue
13	VUS
15	VUS

LAB	interprétation ASXL1 p.(Gly646Trpfs*12)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig, kan ook artefact zijn. Interpretatie staal: Varianten in de genen FLT3, IDH2, TP53, IDH1, ASXL1, RUNX1, KIT en TET2 passen bij de diagnose AML. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53, ASXL1 en RUNX1 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Döhner et al., Blood 2017. 129:1136-1152).
3	Classe 1* ou VUS
6	ongunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	Pathogeen

LAB	Interprétation TET2 p.(Tyr867His)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
8	4-likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable

LAB	Interprétation TET2 p.(Pro1723Ser)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS



LAB	Interprétation ASXL1 p.(Met1249Val)
6	ongunstige prognose
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
15	VUS

LAB	Interprétation TET2 p.(Ile1762Val)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose

LAB	Interprétation TET2 p.(His1778Arg)
2	Les mutations TET2 sont un marqueur pronostic défavorable dans les LMA avec un risque cytogénétique intermédiaire.
6	ongunstige prognose

LAB	Interprétation TP53 p.(Pro72Arg)
2	Les mutations TP53 sont retrouvées dans 60 à 80 % des LMA à caryotype complexe et sont fortement associées aux LMA induite par thérapie

LAB	Interprétation DNMT3A p.(Arg729Trp)
11	Mutaties in DNMT3A zijn recurrent bij acute myeloïde leukemie. Mutaties in het DNMT3A gen worden geassocieerd met een eerder ONGUNSTIGE prognose. DNMT3A mutaties in AML zouden predictief zijn voor verbeterde respons op een hogere dosis van anthracyclines. Ref. Patel et al. NEJM 366 (12), 2012. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in AML.

LAB	Interprétation CEBPA p.(His195_Pro196dup)
6	gekend polymorfisme

## 4.2. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-006

### 4.2.1. Variants validés par ddPCR

LAB	Interprétation JAK2 p.(Val617Phe)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	La mutation Jak2 est observée chez 95 % des patient PV et 50 % des patients ET et PMF
3	Classe 1
4	Jak2 V617F komt voor in 90-95% van de PV , 40-60% ET en PMF. De test detecteert eveneens exon 12 mutaties in JAK2, die in 5% van de JAK2V617F-negatieve PV gevallen voorkomt. JAK2, MPL en CalR mutaties komen voor in 90% van ET en PMF. In de 10% resterende triple negatieve kunnen mutaties in andere genen, waaronder ASXL1, TET2, DNMT3A, ... gedetecteerd worden. Dus in meer dan 90% van de MPN gevallen kan klonaliteit aangetoond worden. Mutatie-analyse biedt hierdoor de mogelijkheid tot differentiatie van reactieve condities ten opzichte van clonale myeloproliferatieve neoplasmen. Mutuele exclusiviteit met CalR/MPL mutaties. Naast MPN worden in de helft van RARS-T (en nog in enkele kleinere subsets van andere MDS en mengvormen) JAK2V617F mutaties gedetecteerd. In PMF is de aanwezigheid van IDH mutatie en JAK2 mutatie indicatief voor snelle leukemische transformatie, wat synergistisch effect van beide mutaties veronderstelt. Dergelijk ongunstig klinisch verloop werd ook reeds aangetoond voor enkel IDH mutaties in PMF. In MPN is een JAK2 mutatie meestal founder in tegenstelling tot MDS waar het eerder als een subkloon optreedt.
5	PATHOGENIC
6	Deze puntmutatie kan worden teruggevonden bij patiënten met Polycytemia Vera (Vacquez) (97%), essentiële trombocytose (57%) en idiopathische myelofibrose (50%) (Lancet 2005: 365; 1054-1061).
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	De aanwezigheid van een mutatie in JAK2 is aanwezig bij 50% van patiënten met primaire myelofibrose. Bij PMF zijn JAK2 (exon 14) mutaties geassocieerd met een minder gunstige prognose. Ref: Guglielmelli et al., 2014. Leukemia 28(9): 1804-1810. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / JAK2 mutatie is een majeur criterium in de diagnose van PMF / Pre-PMF (WHO 2017).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation IDH2 p.(Arg172Ser)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig oww aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	Normalement, les mutations IDH ne sont pas retrouvées chez les patients PV ou ET. Elles sont présentes chez 4 % des patients PMF et surtout chez le patients MPN en phase blastique (20 %).

LAB	Interprétation IDH2 p.(Arg172Ser)
3	Classe 4
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat αKG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 140 en in mindere mate op positie 172. Deze varianten leiden tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-19%). IDH2 mutaties zijn geassocieerd met hogere leeftijd en moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 mutaties. Fase III klinische studie (ECOG E1900 cohort) toont aan dat IDH2 R140 specifiek geassocieerd is met gunstig verloop in AML, zowel in volledige cohort als CN-intermediate risk cohort. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd in app. 2-5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge trombocyten telling, en mutaties in DNMT3A (p<0,001), ASXL1 (p=0,007), en SRSF2 (p<0,001). IDH2 is een predictieve factor voor ongunstige prognose bij patiënten met een IPSS of FAB of WHO low-risk MDS. Dit is niet het geval bij high-risk MDS. Indicatief voor moleculair 'low risk' AML en gunstig klinisch verloop wanneer co-mutatie met NPM1. Verder geen eenduidige impact op prognose. In MDS predictief voor ongunstig klinisch verloop en snelle leukemische progressie bij 'low risk' MDS.
5	PATHOGENIC
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH2 zijn gekend bij primaire myelofibrose. Mutaties in IDH bij PMF patiënten worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Tefferi et al., 2012. Leukemia 26(3):475-80. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. Vannucchi et al., 2013. Leukemia 27:1861-69. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH1 en IDH2 mutatie zijn beschreven in PMF en zijn geassocieerd met slechter prognose en hoger kans voor leukemische transformatie (Tefferi et al., Leukemia 2010; Yonal-Hindilerden et al., J Clin Res Med 2016)
15	Pathogeen

LAB	Interprétation IDH1 p.(Arg132Ser)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig owv aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
2	Normalement, les mutations IDH ne sont pas retrouvées chez les patients PV ou ET. Elles sont présentes chez 4 % des patients PMF et surtout chez le patients MPN en phase blastique (20 %).
3	Classe 4
4	Isocitraat dehydrogenasen komen cytosolisch (IDH1) of mitochondriaal (IDH2) voor waar ze de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat αKG katalyseren. Betrokken bij cellulaire bescherming tegen oxidatieve schade. Mutaties komen voornamelijk voor op positie 132. Deze variant leidt tot neomorfe enzymatische activiteit. Frequentie van 8% in ongeselecteerde AML. Associatie met CN-AML (10-16%). IDH1 R132 is geassocieerd met moleculair 'low-risk' AML (NPM1pos / FLT3-ITDneg). IDH mutaties zijn mutueel exclusief met TET2 en WT1 mutaties. Combinatie van NPM1 met IDH1 of 2 toonden een specifiek gunstig verloop, superieur tov CN-favorable. In MDS worden IDH mutaties gedetecteerd met een frequentie van 5%. IDH mutaties in MDS zijn geassocieerd met oudere leeftijd, hoge trombocyten telling, en mutaties in DNMT3A (p<0,001), ASXL1 (p=0,007), en SRSF2 (p<0,001).
5	PATHOGENIC

LAB	Interprétation IDH1 p.(Arg132Ser)
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class I: This variant is established as clinically actionable (druggable/predictive/prognostic and/or with diagnostic/classification implications) in the disease primary site & histology in which it has been identified
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in IDH1 zijn gekend bij primaire myelofibrose. Mutaties in IDH bij PMF patiënten worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref. Tefferi et al., 2012. Leukemia 26(3):475-80. IDH mutations in primary myelofibrosis predict leukemic transformation and shortened survival: clinical evidence for leukemogenic collaboration with JAK2V617F. Vannucchi et al., 2013. Leukemia 27:1861-69. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.
12	Pathogénique
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / IDH1 en IDH2 mutatie zijn beschreven in PMF en zijn geassocieerd met slechter prognose en hoger kans voor leukemische transformatie (Tefferi et al., Leukemia 2010; Yonal-Hindilerden et al., J Clin Res Med 2016).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation SF3B1 p.(Lys700Glu)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig o.w.v. aantal mutaties Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1
4	SF3B1 is een component van het RNA splicing complex samen met SRSF2, U2AF1 en ZRSR2. Volgens Papaemmanuil et al. kan er een chronologisch mutatieprofiel afgeleid worden waarbij mutaties in spliceosomale componenten als founder worden waargenomen. SF3B1 mutaties zijn gain-of-function mutation met dus voornamelijk missense mutaties. Malcovati et al. tonen aan dat SF3B1 mutaties voorkomen in >90% van RARS. Bovendien blijkt dat SF3B1 mutatiepositieve MDS een 'distinct subset' vormt binnen MDS met een homogeen geno- en fenotype en gunstig klinisch verloop, ongeacht de klinische classificatie (WHO). Omgekeerd, MDS met ringsideroblasten maar afwezig voor SF3B1 mutatie (voornamelijk RCMD), vormt een aparte cluster met andere MDS subtypes en een significant slechtere prognose. Mutaties van het spliceosoom complex zijn mutueel exclusief. SF3B1 K700E hotspot mutatie strikt geassocieerd met ringsideroblasten.
6	mutatie vaak geassocieerd met MDS/MPN-RS-T
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	5-Definitely pathogenic
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in SF3B1 zijn recurrent in myelofibrose. De betekenis van deze mutaties in PMF patiënten is nog onduidelijk. Mutaties in SF3B1 in PMF patiënten worden als secundaire mutaties beschouwd. Ref. Lasho et al., 2012. Leukemia 26: 1135-1137. SF3B1 mutations in primary myelofibrosis: clinical, histopathology and genetic correlates among 155 patients.
12	Pathogénique probable
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic /SF3B1 mutatie is beschreven in PMF maar zonder duidelijk prognose betekenis.
15	Pathogeen

#### 4.2.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	Interprétation ASXL1 p.(Tyr591*)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1*
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. Het betreft een tumor suppressor gen, waardoor voornamelijk LOF varianten van belang zijn. ASXL1 interageert met het polycomb-repressive complex (PRC) en promoot myeloïde transformatie door H3K27 tri-methylatie. Mutatiefrequenties zijn 14% in MDS, 11% AML, 45% CMML, 30% PMF en 4% PV/ET. ASXL1 mutaties zijn beschreven als 'secondary-type mutations', dewelke vroege genetische events zijn die leiden tot dysplasie en ineffektieve hematopoïese. Dit in tegenstelling tot de novo/pan-AML mutaties die voornamelijk verworven worden tijdens progressie van MDS naar AML en aldus latere genetische events zijn die myeloïde maturatie verhinderen en zo de stijging in blasten verklaren in (s)AML. Deze 'secondary-type' mutaties zijn geassocieerd met een ongunstig klinisch verloop. In ASXL1 zijn 70% frameshift mutaties en 30% puntmutaties. De klinische implicatie van frameshift mutaties is kortere tijd tot leukemische progressie. Wanneer enkel puntmutaties als cohort wordt getest, is er geen significante correlatie wat betreft tijd tot progressie naar AML. Bij frameshift en puntmutatie cohorts samen wordt enkel een trend gedetecteerd. Ook Malcovati et al. toont een ongunstig klinisch effect aan van ASXL1 mutaties in MDS op algemene overleving (HR 2,08). ASXL1 is een predictor voor ongunstige algemene overleving in zowel de volledige cohort als de intermediate-risk AML cohort. ASXL1 mutaties zijn exclusief met NPM1 in AML en geassocieerd met Runx1 mutaties.
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent in primaire myelofibrose. De aanwezigheid van een mutatie in het ASXL1 gen bij CALR-mutatie negatieve patiënten wordt geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose in PMF patiënten. Ref. Lundberg et al., 2014. Blood 123(14): 2220-8. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / mutatie in ASXL1 in PMF is geassocieerd met een lagere overleving (Vannucchi et al., Leukemia 2013 ; Yonal-Hindilerden et al., J Blood Med 2015).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen JAK2 (driver mutatie), IDH2, IDH1, SF3B1 en ASXL1 passen bij de diagnose MPN type myelofibrose. De aanwezigheid van varianten in JAK2 (als driver mutatie) is meer ongunstig dan CALR of MPL. Varianten in het gen ASXL1 en de aanwezigheid van meer dan 2 varianten wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Shammo and Stein, 2016 ASH Educ. Program: 552-560).
3	Classe 1
4	idem variant 2

LAB	Interprétation ASXL1 p.(Leu764Tyrfs*8)
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIa: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: A. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant LIKELY DOES modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in ASXL1 zijn recurrent in primaire myelofibrose. De aanwezigheid van een mutatie in het ASXL1 gen bij CALR-mutatie negatieve patiënten wordt geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose in PMF patiënten. Ref. Lundberg et al., 2014. Blood 123(14): 2220-8. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Tefferi et al., 2014. Leukemia 28(7):1494-500. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Likely Pathogenic / Mutatie in ASXL1 in PMF is geassocieerd met een lagere overleving (Vannucchi et al., Leukemia 2013 ; Yonal-Hindilerden et al., J Blood Med 2015).
15	Pathogeen



#### 4.2.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	Interprétation TET2 p.(Tyr867His)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable

LAB	Interprétation TET2 p.(Pro1723Ser)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Signification inconnue

LAB	Interprétation TET2 p.(Leu1721Trp)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

LAB	Interprétation TET2 p.(Ile1762Val)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

LAB	Interprétation TET2 p.(His1778Arg)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	mutatie is geassocieerd met MPN; niet prognostisch

### 4.3. Interprétations cliniques/biologiques: échantillon NGS-2017-007

#### 4.3.1. Variants validés par ddPCR

LAB	Interprétation SF3B1 p.(Lys666Asn)
1	Deze variant: prognostisch gunstig. Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations SF3B1 sont associées avec une survie globale favorable et un risque plus faible de transformation en LMA.
3	Classe 1
4	SF3B1 is een component van het RNA splicing complex samen met SRSF2, U2AF1 en ZRSR2. Volgens Papaemmanuil et al. kan er een chronologisch mutatieprofiel afgeleid worden waarbij mutaties in spliceosomale componenten als founder worden waargenomen. SF3B1 mutaties zijn gain-of-function mutation met dus voornamelijk missense mutaties. Malcovati et al. tonen aan dat SF3B1 mutaties voorkomen in >90% van RARS. Bovendien blijkt dat SF3B1 mutatiepositieve MDS een 'distinct subset' vormt binnen MDS met een homogeen geno- en fenotype en gunstig klinisch verloop, ongeacht de klinische classificatie (WHO). Omgekeerd, MDS met ringsideroblasten maar afwezig voor SF3B1 mutatie (voornamelijk RCMD), vormt een aparte cluster met andere MDS subtypes en een significant slechtere prognose. Mutaties van het spliceosoom complex zijn mutueel exclusief. Strikt geassocieerd met RS fenotype (RARS, RARS-T, RCMD-RS). Geassocieerd met lagere hemoglobine niveau's, verhoogde WBC en thrombocyten, en geassocieerd met DNMT3A co-mutatie.
5	PATHOGENIC
6	mutatie vaak geassocieerd met MDS/MPN-RS-T, gunstige prognose
7	pathogeen, gekende hotspot mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Pathogeen, gekende hotspot mutatie
11	Mutaties in SF3B1 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Een mutatie in SF3B1 (exon 14) komt voor bij ongeveer 15-30% van de patiënten met MDS (associatie met de aanwezigheid van ring sideroblasten) (volgens WHO 2016: "MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)") en wordt geassocieerd met een GUNSTIGE prognose. Ref. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes.
12	Signification inconnue
13	Pathogene variant
14	Definitely pathogenic / Mutaties in SF3B1 komen frequent voor in MDS en zijn geassocieerd met de aanwezigheid van ring sideroblasten (MDS-RS) en met een goede prognose (Arber Blood 2016; WHO 2017). Belangrijk, mutaties in SF3B1 zijn ook beschreven als CHIP ("clonal hematopoiesis of indeterminate potential") en de aanwezigheid van deze mutatie alleen is niet voldoende voor de diagnose van MDS (Arber et al Blood, 2016; WHO 2017).
15	Pathogeen

LAB	Interprétation TP53 p.(Ala161Asp)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles



LAB	Interprétation TP53 p.(Ala161Asp)
	sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA
3	Classe 3A
4	idem variant 3
5	PRES PATHOGENIC
6	ongunstige prognose
7	pathogene mutatie
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in de genen TP53 en DNMT3A worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. De aanwezigheid van een mutatie in het TP53 gen in combinatie met een 5q- wordt in MDS geassocieerd met agressieve ziekte en een verminderde respons op lenalidomide. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.
12	Signification inconnue
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	Pathogeen

LAB	Interprétation TP53 p.(Tyr220Cys)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA
3	Classe 1
4	Het TP53 gen, dat gelegen is 17p13.1, is een gen dat codeert voor het p53 eiwit, een transcriptionele regulator waarbij cel cyclus arrest en apoptose geïnduceerd wordt in het geval van DNA schade. TP53 mutaties zijn één van de meest frequente genetische abnormaliteiten in kanker en bovendien een belangrijke prognostische merker voor AML, gezien het de therapie-gerelateerde AML/MDS subgroep identificeert. t-AML is een complicatie ten gevolge van van cytotoxische chemo- en/of radiotherapie. T-AML/MDS is gekenmerkt door een hogere incidentie van TP53 mutaties, chromosoom 5 of 7 abnormaliteiten, complexe cytogenetica en chemoresistentie. Het betreft een tumor suppressor waarbij zowel frameshift, nonsense en missense mutaties van belang zijn. Wong T et al heeft aangetoond dat TP53 mutaties in t-AML/MDS frequent zijn maar dat ze reeds jaren vóór toediening van cytotoxische therapie reeds subclonaal aanwezig zijn, ten gevolge van bvb verhoogde mutatiefrequentie door oa. leeftijd. Tijdens behandeling wordt de TP53mut subkloon uitgeselecteerd met verhoogde proliferatie in de jaren nadien, met t-AML tot gevolg. Gekende driver mutaties in de novoAML zijn significant minder aanwezig in t-AML/MDS (bvb DNMT3A, NPM1, TET2). T-AML/MDS is aldus gekenmerkt door een specifiek mutatieprofiel. TP53 mutatiefrequentie varieert van 5-35% in t-AML/MDS en zijn geassocieerd met complexe cytogenetica en ongunstige prognose. Malcovati et al.toont een onafhankelijk effect op algemene overleving van TP53 mutaties in MDS (HR 6,00). Lindsley et al. classificeert TP53 mutatiepositieve patiënten als een aparte subgroep met minst gunstige algemene overleving. Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014). TP53 mutaties zijn geassocieerd met complex en monosomaal karyotype en met excessieve blasten en thrombocytopenie. TP53 is gemuteerd in 20% van del(5q) patiënten.
5	PRES PATHOGENIC

LAB	Interprétation TP53 p.(Tyr220Cys)
8	5-Definitely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Pathogeen
11	Mutaties in TP53 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in de genen TP53 en DNMT3A worden over het algemeen geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. De aanwezigheid van een mutatie in het TP53 gen in combinatie met een 5q- wordt in MDS geassocieerd met agressieve ziekte en een verminderde respons op lenalidomide. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Arber et al., 2016. Blood 127(20):2391-2405. The 2016 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.
12	Pathogénique
13	Vermoedelijk pathogene variant
14	Definitely pathogenic / Mutaties in TP53 in MDS zijn geassocieerd met een slechte prognose (Al-Issa, K., et al, Blood 2016 ; WHO 2017).
15	Pathogeen

#### 4.3.2. Variants rapportés par au moins 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	Interprétation EZH2 p.(Cys539Arg)
1	Deze variant: prognostisch ongunstig Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
2	Les mutations EZH2 sont un marqueur pronostic associé avec une survie globale plus faible.
3	Classe 3A*
4	ASXL1 behoort samen met EZH2 tot de groep van 'chromatin modifiers'. In tegenstelling tot epitheliale maligniteiten, wordt EZH2 activiteit bij myeloïde maligniteiten gekenmerkt als zijnde een tumor suppressor. EZH2 mutatie-positiviteit in MDS is geassocieerd met cytogenetische abnormaliteiten in chromosoom 7. EZH2 mutaties komen voornamelijk voor bij IPSS 'low' of 'intermediate-1'. Significant geassocieerd met verminderde algemene overleving. Bewezen klinisch voordeel van intensifiëring van behandeling of gebruik van hypomethyleerende therapeutica, doch betreft het geen eenduidige genetische of epigenetische merker voor predictie van respons. EZH2 mutaties komen samen voor met Jak2V717F of ASXL1 in MPN en is een sterke indicator voor verminderde leukemie-vrije overleving en algemene overleving, in het bijzonder bij PMF. EZH2 mutaties zijn frequent in CMML en voorspellen een kortere algemene overleving dan verwacht op basis van klinische kenmerken in alle myeloïde neoplasmen. Geassocieerd met RCMD en RAEB.
6	ongunstige prognose
8	4-Likely pathogenic
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
11	Mutaties in EZH2 zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutaties in EZH2 worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref: Cazzola et al., 2013. Blood 122(25):4021-4034. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance.
12	Signification inconnue
15	VUS

### 4.3.3. Variants rapportés par moins de 2/3 des laboratoires et non-validés par ddPCR

LAB	interprétation TET2 p.(Arg1261His)
1	Deze variant: prognose niet gekend Interpretatie staal: Varianten in de genen TP53, SF3B1, EZH2 en TET2 passen bij de diagnose MDS. De aanwezigheid van varianten in de genen TP53 en EZH2 wordt geassocieerd met een ongunstige prognose (Ref: Arber et al., Blood 2016. 127(20):2391-2406; Kennedy and Ebert, J Clin Onc 2017. 35(9):968-974).
4	<p>TET2, gelegen op 4q24, Behoort samen met idh1/2, asxl1 en dnmt3a tot de klasse "epigenetic modifier". TET2 heeft dioxygenase enzymatische activiteit, afhankelijk van Fe(II) en <math>\alpha</math>KG. Het catalytisch domein is C-terminaal gelegen en medieert de conversie van een methylgroep op de 5'positie van cytosine (5mC) naar 5'hydroxymethyl cytosine (5hmC). Deze geoxideerde variant van 5mC heeft diverse transcriptionele effecten in het genomisch DNA. Muismodellen met genetische TET2 deletie resulteert in progressieve expansie van het hematopoietisch stamcel compartiment en de ontwikkeling van een proliferatieve myeloïede maligniteit, sterk gelijkend op CMML. Op zich, kan TET2 deletie geen AML veroorzaken.</p> <p>Tet2 mutaties (meestal loss of function) waargenomen in verschillende myeloïde malignancies 19% in MDS 4-13% in MPN 22-42% in CMML 12-16% in AML Mutueel exclusief met idh1/2 Bijna de helft van de MDS patiënten bezit een mutatie in TP53, DNMT3A of TET2 dewelke 64% van de sterftes vertegenwoordigt. 3-jaarsoverleving in de cohort negatief voor deze drie mutaties bedraagt 59%, versus 19% in de cohort met deze mutatie (Bejar R, JCO, 2014).</p> <p>AML: Negatief prognostisch effect voornamelijk in intermediate-risk AML, doch eerder trend. MDS: Tet2 mutaties reeds vaak geassocieerd met betere HMT (AZA/DEC) respons, doch niet eenduidig. Betere ORR op 5-azacytidine en/of decitabine indien subclones (&lt;10%VAF) als wildtype worden behandeld. Respons rates zijn het hoogst in de subgroep met TET2 mutante patienten zonder clonale ASXL1 mutatie.</p> <p>MDS/MPN (CMML): Tet2 gemuteerd in 50-60% bij CMML. In CMML, tet2 typisch een comutatie met SRSF2</p> <p>MPN: Tet2 mutaties komen in MPN vaak voor samen met Jak2 mutaties. De volgorde waarin JAK2 en TET2-mutaties worden verworven beïnvloedt de klinische kenmerken, de respons op gerichte therapieën, en de biologie en clonale evolutie bij MPN. A) jak2 first: vnl jak2/tet2 dubbel mutaties: grotere kans op PV itt ET, verhoogd risico op trombose en verhoogde gevoeligheid op ruxolitinib. Tet2 mutatie noodzakelijk voor stamcel/progenitor expansie, doch reeds megakaryocytose en erthrocytose, wat leidt tot vroege klinische presentatie. B) tet2 first: vnl tet2 single mutaties. Tet2 verandert transcriptioneel pad van jak2 V617F en verhindert jak2 mutatie van genen geassocieerd met proliferatie op te reguleren</p>
7	pathogene mutatie
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	Waarschijnlijk pathogeen
11	Mutaties in TET2 komen voor bij ongeveer 25% van de patiënten met MDS. Mutaties in TET2 zijn niet geassocieerd met slechtere overleving in MDS patiënten. Ref. Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Itzykson et al., 2011. Leukemia 25(7):1147-52. Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias
13	Vermoedelijk pathogene variant
15	VUS

LAB	interprétation TET2 p.(Gln1084Pro)
2	La présence de mutation TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
9	Variant Class IIIb: Variants of this gene in this primary site/histology are established as actionable; however, this specific sequence variant is not one of the recurrently reported variants (nor is it an established benign single-nucleotide polymorphism) in this gene. Functional prediction algorithms have been used to determine the predicted effect of the mutation on protein function: B. Functional prediction algorithms indicate that the identified variant MAY OR MAY NOT modify protein function
10	VUS
12	Pathogénique probable
15	VUS

LAB	interprétation TET2 p.(Ile1762Val)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).
6	vaak voorkomend in MDS, slechte prognose in combinatie met andere mutaties

LAB	interprétation TP53 p.(Pro72Arg)
2	Les mutations TP53 sont souvent associées avec un 5q-, corrélées à un mauvais pronostic (diminution de la survie globale) et à une plus mauvaise réponse aux agents hypométhylants. Elles sont aussi associées à un risque plus élevé de transformation en LMA

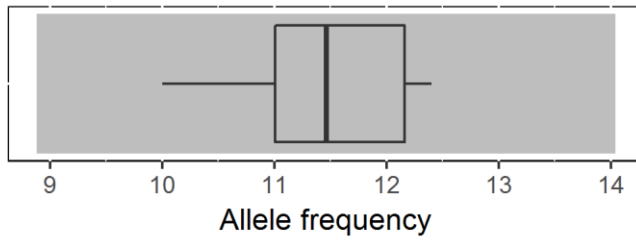
LAB	interprétation TET2 p.(Leu1721Trp)
2	La présence de mutations TET2 est associée à une survie supérieure dans les SMD (sauf en cas de transplantation hématopoïétique).

LAB	interprétation EZH2 p.(Asp146His)
6	onvoldoende coverage

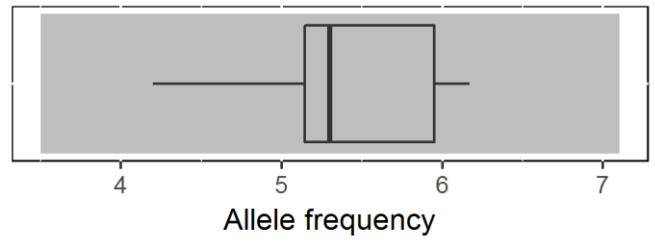
LAB	interprétation DNMT3A p.(Arg729Trp)
11	Mutaties in DNMT3A zijn recurrent in myelodysplastische syndromen. Mutatie in DNMT3A worden geassocieerd met een ONGUNSTIGE prognose. Ref: Bejar et al., 2014 Haematologica 99(6): 956-964. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. Mutaties in de genen DNMT3A en SF3B1 zijn recurrent bij MDS-RARS. De combinatie van een mutatie in het DNMT3A gen en het SF3B1 gen wordt geassocieerd met een EERDER GUNSTIGE PROGNOSE. Ref: Cazzola et al., 2013. Blood 122(25): 4021-4035

#### 4.4. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-005

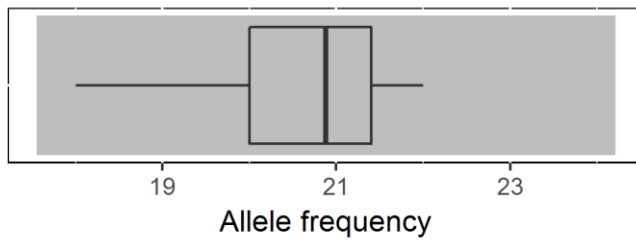
FLT3 p.(Asp835Tyr)



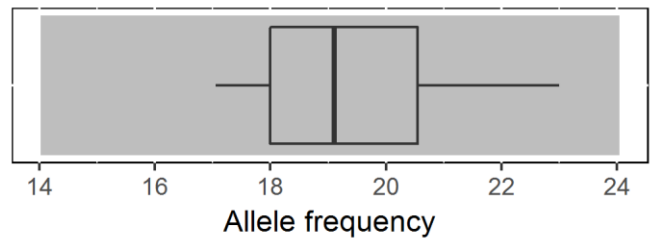
IDH1 p.(Arg132Gly)



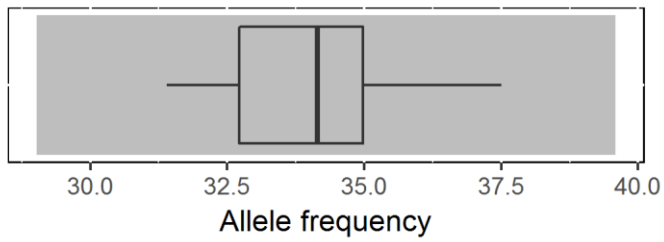
IDH2 p.(Arg140Gln)



KIT p.(Asp816Val)

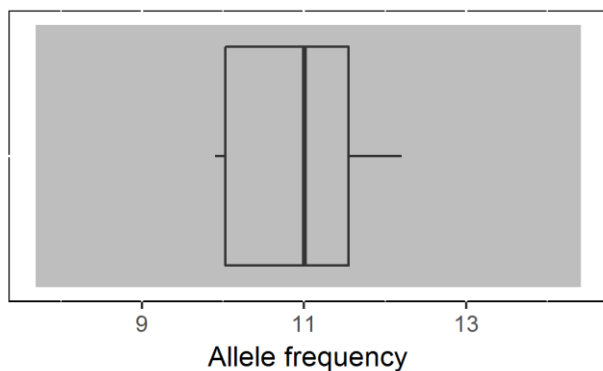


TP53 p.(Glu171\*)

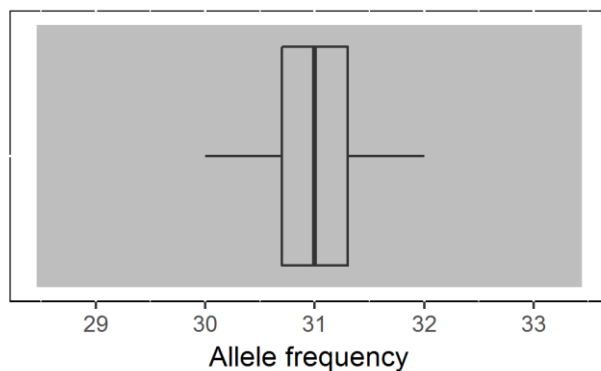


#### 4.5. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-006

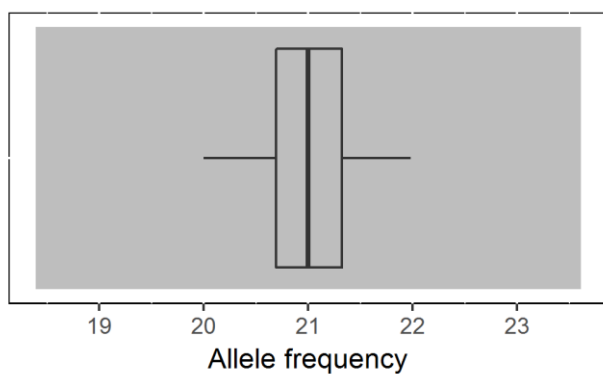
IDH1 p.(Arg132Ser)



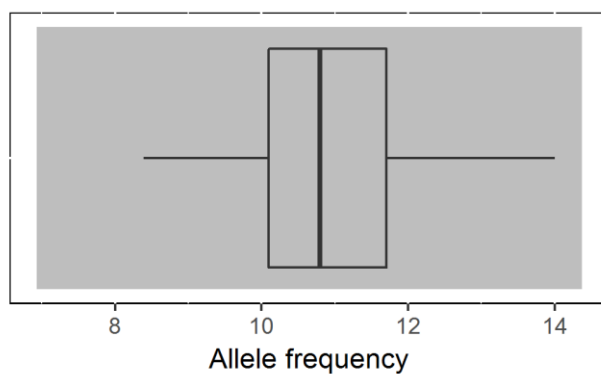
IDH2 p.(Arg172Ser)



JAK2 p.(Val617Phe)

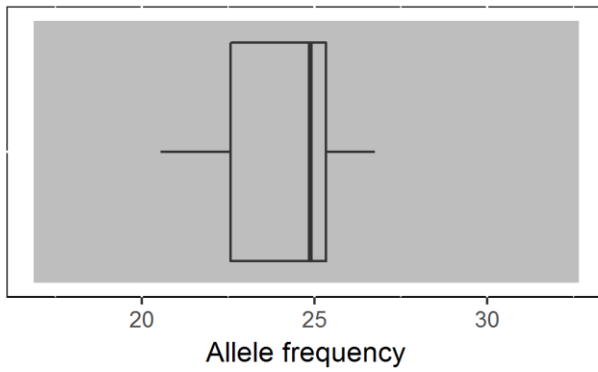


SF3B1 p.(Lys700Glu)

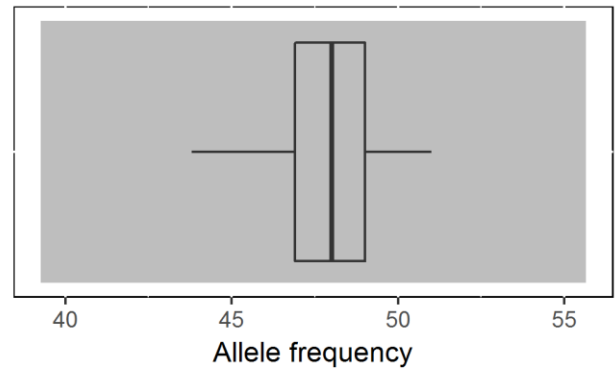


4.6. "Boîte à moustaches" pour les variants de l'échantillon NGS-2017-007

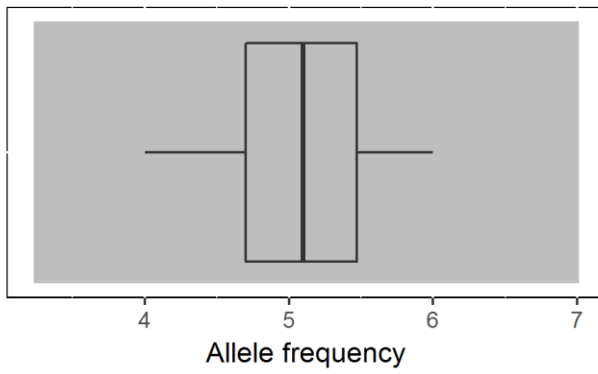
SF3B1 p.(Lys666Asn)



TP53 p.(Ala161Asp)



TP53 p.(Tyr220Cys)



#### 4.7. Interprétation du rapport individuel

En plus de ce rapport global, vous avez également reçu un rapport individuel. Ci-dessous vous trouverez des informations qui peuvent aider à interpréter ce rapport. La position de vos résultats quantitatifs est donnée en comparaison avec tous les résultats de tous les participants, toutes méthodes confondues.

Les informations suivantes sont reprises:

- Votre résultat (MRAF)
- La médiane (MAF):  
la valeur centrale des résultats fournis par tous les laboratoires, toutes méthodes confondues.
- L'écart-type global (SD):  
mesure de la dispersion des résultats fournis par tous les laboratoires, toutes méthodes confondues.
- Le score Z:  
la différence entre votre résultat et la médiane (exprimée en unités d'écart type):  
 **$Z = (MRAF - MAF) / SD$**   
Votre résultat est cité si  **$|ZI| > 3$** .
- L'interprétation graphique de la position de votre résultat (R) en comparaison avec tous les résultats de tous les participants, basée sur la méthode de Tukey, pour chaque paramètre et pour chaque échantillon analysé.

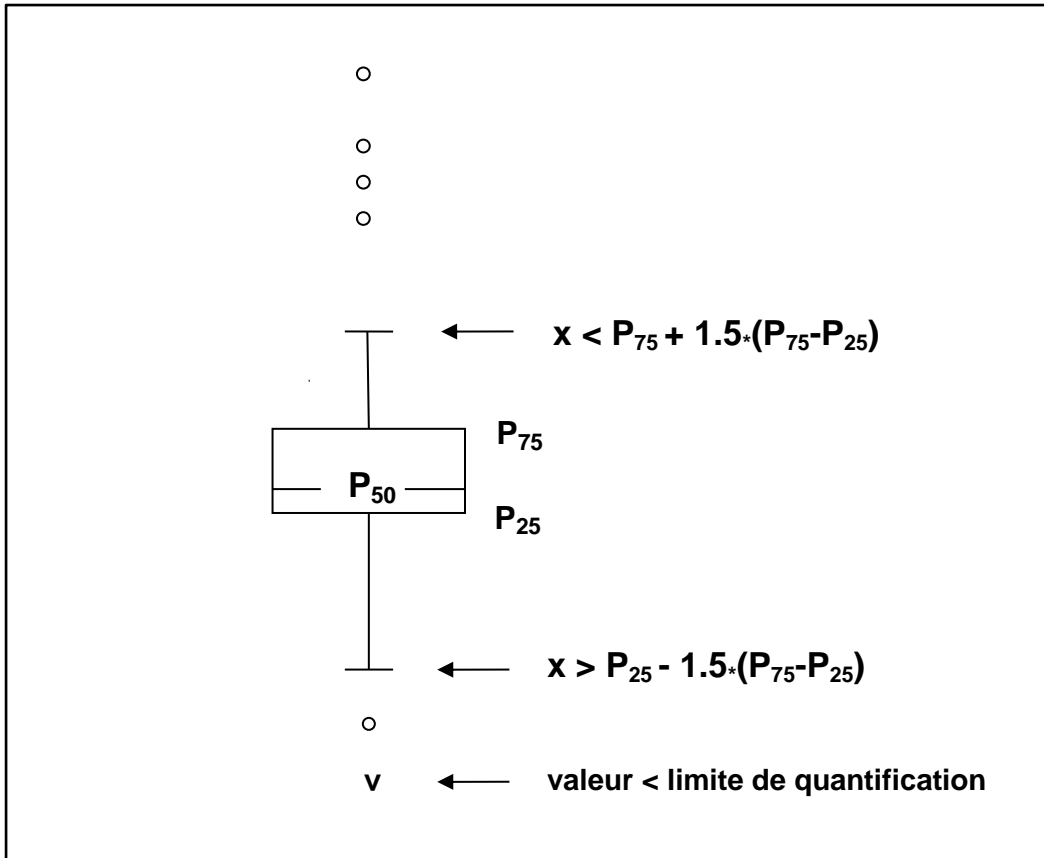
Ces paramètres vous donnent une indication approximative de la position de votre résultat (MRAF) par rapport aux médianes (MAF).

#### Représentation graphique

À côté des tableaux de résultats, une représentation graphique en "boîte à moustaches" est parfois ajoutée. Elle reprend les éléments suivants:

- un rectangle allant du percentile 25 ( $P_{25}$ ) au percentile 75 ( $P_{75}$ )
- une ligne centrale représentant la médiane des résultats ( $P_{50}$ )
- une ligne inférieure représentant la plus petite valeur  $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- une ligne supérieure représentant la plus grande valeur  $x < P_{75} + 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- tous les points en dehors de cet intervalle sont représentés par un rond.






---

**FIN**

---

© Sciensano, Bruxelles 2018.

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 d'experts ou du groupe de travail EEQ.