

**EXPERTISE ET PRESTATIONS DE SERVICES
QUALITE DES LABORATOIRES**

COMITE DES EXPERTS *AD HOC*

**RAPPORT GLOBAL DEFINITIF
Next Generation Sequencing (NGS)**

Tumeurs solides

2021/1

Sciensano/EEQ NGS/8-FR

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

www.sciensano.be

COMITE DES EXPERTS AD HOC

Sciensano					
Secrétariat		TEL:	02/642.55.21	FAX:	02/642.56.45
Aline Antoniou	Coordinateur d'enquête	TEL:	02/642.55.27		
		e-mail:	Aline.Antoniou@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Coordinateur d'enquête remplaçant	TEL:	02/642.52.08		
		e-mail:	Vanessa.Ghislain@sciensano.be		
Experts	Institution				
Anne-France Dekairelle	UCL				
Koen Jacobs	AZ-St-Lucas Hospital Ghent				
Suzan Lambin	UZ Antwerp				
Brigitte Maes	Jessa Hospital Hasselt				
Sara Vander Borght	UZ Leuven				
Suzanne Vanhauw aert	UZ Ghent				
Pascal Vannuffel	IPG				
Stefanie Vermeire	AZ Sint-Jan Brugge				
Thomas Delcourt	Sciensano				
Nicolas Loucheu	Sciensano				
Aline Hébrant	Sciensano				
Els Van Valckenborgh	Sciensano				
Mohamed Rida Soumali	Sciensano				
Marc Van Den Bulcke	Sciensano				

Les versions provisoires de ce rapport ont été transmises aux experts les: 10/05/2021, 21/05/2021 et 26/05/2021.

Ce rapport a été discuté lors de la réunion du comité des experts *ad hoc* le : 28/05/2021.

Responsabilités :

Le comité d'experts *ad hoc* a été consulté pour avis au sujet du contenu du rapport global, de l'interprétation des résultats, des critères d'évaluation et de l'organisation des prochaines évaluations. La responsabilité du choix des échantillons utilisés et de la conception finale de l'enquête est portée par le service Qualité des laboratoires de Sciensano.

Autorisation de diffusion du rapport:

Par Aline Antoniou, coordinateur d'enquête de l'EEQ NGS, le 14/06/2021.

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:

https://www.wiv-isp.be/QML/activities/NGS/fr/rapports_annee.htm

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	5
1.1. Objectif de l'EEQ – tumeurs solides.....	5
1.2. Activité sous-traitée.....	5
1.3. Matériel.....	5
1.4. Demande	5
1.5. Critères d'évaluation	7
2. RESULTATS.....	8
2.1. Participation.....	8
2.2. Aperçu des méthodes	8
2.3. Aperçu des résultats	12
2.3.1. NGS-2021-1.....	12
2.3.2. NGS-2021-2.....	14
2.3.3. NGS-2021-3.....	16
2.3.4. Taux de réussite des participants	18
3. ANNEXE.....	19
3.1. Aperçu des conclusions cliniques.....	19
3.1.1. NGS-2021-1.....	19
3.1.2. NGS-2021-2.....	22
3.1.3. NGS-2021-3.....	25
3.2. Interprétation du rapport individuel	28

1. INTRODUCTION

L'organisation des EEQ fait partie du projet pilote national relatif à l'introduction de la technologie NGS dans notre système de soins de santé qui a débuté en janvier 2016. Toutes les informations relatives à l'étude pilote NGS sont détaillées dans le NGS Roadbook :

<https://www.compermed.be/docs/Roadbook%20PersMed%20NGS%20FR.pdf>

1.1. Objectif de l'EEQ – tumeurs solides

L'objectif de cette EEQ est d'établir l'état des lieux de la manière dont les variants somatiques dans les tumeurs solides sont détectés, sélectionnés et rapportés dans les protocoles cliniques.

1.2. Activité sous-traitée

Les échantillons d'ADN génomique ont été produits par la firme SeraCare et sont distribués par la firme Sopachem.

1.3. Matériel

Le matériel transmis lors de cette étude comprenait :

- 3 tubes contenant de l'ADN génomique (Volume: 10µl, Concentration: environ 50 ng/µl) provenant de 3 échantillons différents avec les références suivantes: NGS-2021-1, NGS-2021-2 et NGS-2021-3.

L'homogénéité et la stabilité des échantillons ont été validées par le fournisseur.

1.4. Demande

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

NGS-2021-1: Adénocarcinome pulmonaire

NGS-2021-2: Adénocarcinome colorectal

NGS-2021-3: Mélanome

Pour chaque échantillon, il avait été demandé de répondre tous les variants à rapporter dans le rapport clinique du patient, selon les procédures en vigueur dans le laboratoire, mais uniquement pour les régions incluses dans la convention NGS et selon les workflows du ComPerMed (ne pas rapporter les autres variants éventuellement identifiés):

<https://www.inami.fgov.be/fr/professionnels/etablissements->

[services/laboratoires/Pages/oncologie-remboursement-biologie-moleculaire-ngs.aspx](https://www.inami.fgov.be/fr/professionnels/etablissements-services/laboratoires/Pages/oncologie-remboursement-biologie-moleculaire-ngs.aspx)

<https://www.compermed.be/fr/workflows#/>

échantillon	Contexte clinique	gènes
NGS-2021-1	Adénocarcinome pulmonaire	BRAF (exon 15 (codon 600)) EGFR (exon 18, exon 19, exon 20, exon 21) KRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146)) MET exon 14 skipping HER2 (exon 20)
NGS-2021-2	Adénocarcinome colorectal	BRAF (exon 15 (codon 600)) KRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146)) NRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146))
NGS-2021-3	Mélanome	BRAF (exon 15 (codon 600)) KIT (exon 9, exon 11, exon 13, exon 17, exon 18) NRAS (exon 2 (codons 12,13), exon 3 (codons 59, 61), exon 4 (codons 117, 146))

Il avait été également demandé de se référer aux recommandations du ComPerMed et de MolecularDiagnostics.be sur l'interprétation des variants et le contenu des rapports cliniques NGS publiées sur le site de Belac :

<https://economie.fgov.be/sites/default/files/Files/Publications/files/Belac-FR/2-405NGS-FR.pdf>

Sur le site internet de réponses : <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20211>, il avait été demandé aux participants:

- De répondre au questionnaire concernant la méthode d'analyse.
- D'encoder les paramètres demandés pour chaque variant identifié et rapporté dans le rapport clinique:
 - Nom du gène et numéro NM associé (choix multiples)
 - Nomenclature de référence de la séquence ADN codante selon HGVSn : <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Nomenclature de référence de la séquence protéique selon HGVS_p : <http://varnomen.hgvs.org/>
 - Fréquence allélique
 - Classification biologique (choix multiple)
 - Classification clinique (choix multiple)
- De rédiger une conclusion générale pour chaque cas clinique sous forme d'un texte libre.

A l'aide du lien belnet envoyé aux participants, il avait été demandé de transmettre les données brutes (fichiers fastq, bam, bai et vcf) pour chaque échantillon, le(s) fichier(s) BED contenant les régions ciblées par le panel utilisé, les fichiers contenant les positions et les séquences des primers utilisés lors de la stratégie d'enrichissement (MANIFEST, BED,...).

1.5. Critères d'évaluation

Ce rapport contient les résultats des 20 laboratoires participants. Pour l'identification des variants, les critères d'évaluation sont basés sur le consensus des laboratoires avec un seuil fixé à 2/3 des participants.

De manière détaillée, les critères d'évaluation sont :

1/ L'identification de tous les variants rapportés par au moins 2/3 des participants, présents dans les 3 échantillons: consensus des variants à rapporter. Les valeurs médianes des fréquences alléliques rapportées par les laboratoires pour ces variants sont fournies à titre indicatif ainsi que les valeurs SD.

2/ L'absence de signalement des variants rapportés par moins de 1/3 des participants, présents dans les 3 échantillons: consensus des variants à ne pas rapporter.

Remarques : Les variants rapportés entre 1/3 et 2/3 des laboratoires sont également détaillés dans les rapports et sont transmis à titre indicatif : pas de consensus. Un variant avec un consensus peut être non évalué si le groupe d'experts ne valide pas le consensus établi par les laboratoires pour ce variant.

Concernant les interprétations biologiques et cliniques, pour les variants du consensus des variants à rapporter, les réponses des laboratoires sont classées en "résultat attendu" (en vert), "acceptable" (en jaune), "non-recommandé mais acceptable" (en orange), "non-acceptable" (en rouge) ou "non-évalué" (en gris). Ces catégories sont définies par un groupe d'experts en comparant les résultats du consensus des laboratoires aux résultats obtenus à l'aide des guidelines belges.

Le contenu des conclusions générales rapportées par les laboratoires est classé par informations types reprises par au moins 2 laboratoires.

2. RESULTATS

2.1. Participation

20 laboratoires belges sont repris dans l'analyse des résultats.

Aperçu des participants

Région	N
Région flamande	13
Région bruxelloise	4
Région wallonne	3
Total	20

Laboratoire	N
Anatomie pathologique	11
Biologie Clinique	7
Génétique humaine	2
Total	20

2.2. Aperçu des méthodes

Q1. Quel génome de référence utilisez-vous pour l'analyse ?

Réponses	N
hg18	1
hg19/GRCh37	18
hg38/GRCh38	1

Q2. Quel séquenceur utilisez-vous pour les analyses NGS sur tumeurs solides (firme et plateforme)?

Réponses	N
Illumina - MiSeq	10
Illumina - NextSeq 550	4
Illumina - NextSeq 550Dx	1
Illumina - NovaSeq 6000	1
Qiagen - GeneReader	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion GeneStudio S5	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion PGM	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion S5	1

Q3. Quels panels de gènes sont utilisés pour les analyses NGS sur ADN sur tumeurs solides (nom des kits commerciaux et/ou custom) ?

Réponses	N
Custom panel, QIASeq, Qiagen	4
Custom panel, SeqCap EZ HyperCap, Roche	4
Custom panel, SeqCap, Roche	3
Custom panel, AmpliSeq, Illumina	3
Custom panel, Ion AmpliSeq, ThermoFisher	2
Custom panel, KAPA HyperCap, Roche	1
SureMASTR Tumor Hotspot, Agilent	2
Focus Ampliseq panel, Illumina	2
AmpliSeq Cancer Hotspot Panel V2, Illumina	1
GeneRead QIAact AIT DNA UMI panel, Qiagen	1
Oncomine focus assay, ThermoFisher	1

Q4. Quelle stratégie d'enrichissement est utilisée pour les analyses NGS sur ADN sur tumeurs solides?

Réponses	N
Amplicon-based	13
Probe-based	7

Q5. Votre(vos) méthode(s) de séquençage est-elle single ou paired-end ?

Réponses	N
Paired-end	18
Single-end	2

Q6. Quelle est la longueur des reads générés par votre méthode ?

Réponses	N
100	1
120	2
141	1
150	11
151	3
251	1
360	1

Q7. Quels outils bio-informatiques sont utilisés pour l'analyse des données ?

Réponses	N
Open source/in house development	7
CLC Genomics Workbench, Qiagen	3
Ion Reporter Software, ThermoFisher/Ion Torrent	3
Variant Studio Software, Illumina	3
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	2
SeqNext, JSI medical systems	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
MASTR Reporter, Multiplicom	1
NextGENe Software, SoftGenetics	1

Remarques : Les outils bio-informatiques en *open source* ont été utilisés selon les combinaisons suivantes: 1/BWA, GATK Unified Genotyper, Annovar, 2/bcbio, 3/ vardict, 4/Plugins ThermoFisher

Q8. Quelles catégories de variants somatiques sont détectées par votre méthode d'analyse NGS utilisée pour les tumeurs solides sur ADN? + limite de détection pour la profondeur de séquençage totale (X) et limite de détection pour la fréquence allélique du variant (VAF %)

Limite de détection pour SNV : fréquence allélique (%)	Limite de détection pour SNV : profondeur de séquençage (X)	N
2,5	1000	1
2,5	1250	1
3	300	1
3	400	1
4	500	1
4	1000	1
5	100	1
5	300	5
5	350	3
5	500	3
5	1000	1
Based on sequencing depth	100	1
Limite de détection pour indels : fréquence allélique (%)	Limite de détection pour indels : profondeur de séquençage (X)	N
2,5	1000	1
2,5	1250	1
3	150	1
3	300	1
3	400	1
4	500	1
4	1000	1
5	100	1
5	300	4
5	350	3
5	500	3
5	1000	1
Based on sequencing depth	100	1
Limite de détection pour CNV : fréquence allélique (%)	Limite de détection pour CNV : profondeur de séquençage (X)	N
/	300	3

Q9. Quels types d'échantillons sont séquençés par votre laboratoire pour la détection de variants somatiques?

Réponses	N
Tissu paraffiné	20
Liquide cytologique	7
Tissu frais	2
ADN tumoral circulant	2
Frottis	1

Q10. Pour la recherche de variants somatiques sur les tumeurs solides réalisée en routine sur ADN, séquencez-vous un échantillon normal du même patient en parallèle de l'échantillon tumoral?

Réponses	N
Non	19
Oui	1

Q11. Pour les tissus paraffinés, avant de procéder à l'analyse NGS, un pathologiste évalue-t-il le contenu tumoral du prélèvement sur une lame Hématoxyline-Eosine (HE)?

Réponses	N
Oui	20

Q12. Votre laboratoire enrichit-il la population de cellules tumorales avant l'analyse NGS ?

Réponses	N
Oui, dissection manuelle à l'aide d'une lame HE préalablement marquée par un pathologiste	16
Dans certains cas	2
Non, utilisation de l'entièreté du tissu pour l'analyse	2

Q13. Quel est le pourcentage de cellules néoplasiques minimal accepté dans le prélèvement pour pouvoir procéder à l'analyse NGS sur tumeurs solides ?

Réponses	N
>20%	1
>10%	16
>5%	3

Remarques : Certains laboratoires lancent également l'analyse NGS sous le seuil de cellules néoplasiques indiqué. En cas de résultat négatif, le résultat est rapporté sous réserve.

Q14. Quelle est la quantité minimum d'ADN génomique requise par votre laboratoire pour réaliser l'analyse NGS sur tumeurs solides?

Réponses	N
0-10ng	6
11-50ng	5
51-100ng	8
101-200ng	1

Q15. Quelle est la méthode utilisée pour la quantification de l'ADN ?

Réponses	N
Qubit	17
Quantus	2
NanoDrop	2
Quant-It Picogreen	1

Q16. Quelles sont les guidelines utilisées pour l'interprétation des variants somatiques?

Réponses	N
BELAC 2-405-NGS Rev2-2019	20
Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists, Li et al., JMD, 2017, 19(1), (PMID: 27993330)	17
ACMG-AMP: Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology, Richard et al., Genet Med, 2015, 17(5), (PMID: 25741868)	8
BELAC 2-405-NGS Rev0-2018	2
BELAC 2-405-NGS Rev 1-2019	2

2.3. Aperçu des résultats

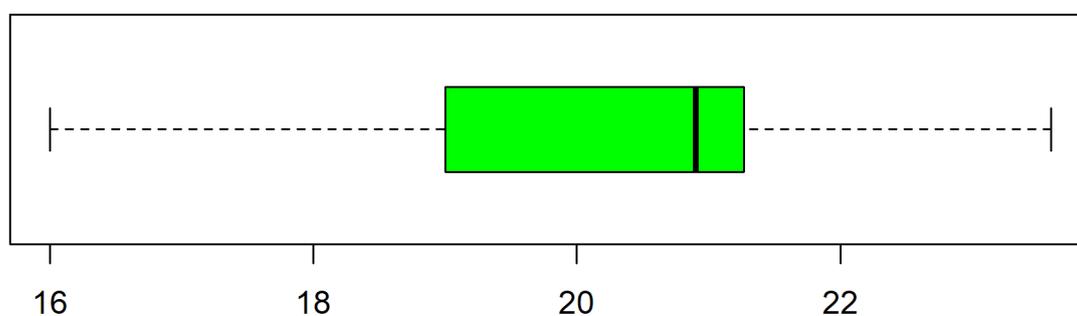
2.3.1. NGS-2021-1

type de la tumeur primaire et histologie adénocarcinome pulmonaire

Consensus des variants à rapporter

- [EGFR NM_005228.4: c.2573T>G; p.\(Leu858Arg\)](#)

EGFR NM_005228.4; c.2573T>G; p.(Leu858Arg)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
16	19	20.9	21.23	23.6	1.66

EGFR NM_005228.4 c.2573T>G p.(Leu858Arg) (Fréquence allélique médiane: 20.9 %)	
Identification du variant	N
Oui	20
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	20
Total	20
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	20
Total	20

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant EGFR NM_005228.4; c.2573T>G; p.(Leu858Arg). La nomenclature p.Leu858Arg, rapportée par 3 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Analyse des conclusions

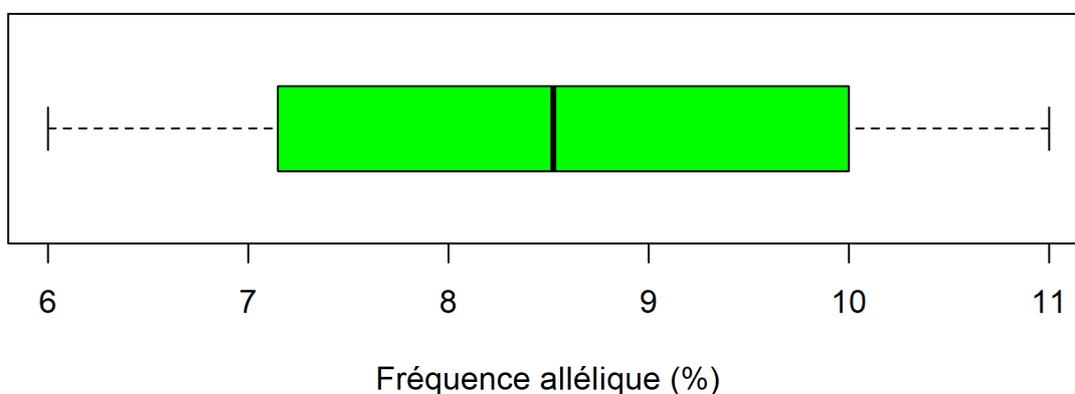
Informations types	Informations spécifiques au cas 1 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Traitement	Indication de sensibilité au traitement aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR liée à la présence du variant p.(Leu858Arg)	19
Informations sur les gènes testés	Variant détecté dans l'exon 21 du gène EGFR	8
	mutation activatrice EGFR p.(Leu858Arg)	5
	Aucun autre variant d'importance clinique détecté	8
	Aucun variant EGFR p.(Thr790M) détecté	4

type de la tumeur primaire et histologie	adénocarcinome colorectal
--	---------------------------

Consensus des variants à rapporter

- [BRAF NM_004333.5; c.1799_1800delinsAA; p.\(Val600Glu\)](#)

BRAF NM_004333.5; c.1799_1800delinsAA; p.(Val600Glu)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
6	7.22	8.53	10	11	2.06

BRAF NM_004333.5 c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu) (Fréquence allélique médiane: 8.525 %)	
Identification du variant	N
Oui	20
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	20
Total	20
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	20
Total	20

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant BRAF NM_004333.5; c.1799_1800delinsAA; p.(Val600Glu). Concernant les références DNA: un laboratoire a rapporté le variant c.1799_1800TG>AA à la place du variant c.1799_1800delinsAA. Cette nomenclature est incorrecte selon les guidelines HGVS: des changements impliquant deux nucléotides consécutifs ou plus doivent être décrits comme des délétions-insertions (delins) et non pas comme une double substitution. Un autre laboratoire a rapporté le variant comme une substitution unique avec comme référence c.1799T>A à la place de c.1799_1800delinsAA. Après analyse bio-informatique, la seconde substitution est bien présente dans le VCF du laboratoire concerné mais est décrite de manière indépendante de la première substitution alors qu'elle concerne les mêmes reads. Cette nomenclature est également incorrecte. Enfin, la nomenclature c.1799_1800delTGinsAA, rapportée par 2 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Cette description est plus longue, elle contient des informations redondantes et les chances de faire une erreur augmentent. Concernant les références protéiques: la nomenclature p.Val600Glu, rapportée par 2 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Analyse des conclusions

Informations types	Informations spécifiques au cas 2 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Traitement	Patient éligible à la thérapie combinée d'inhibiteurs BRAF - MEK-EGFR lié à la présence du variant BRAF - Indication de sensibilité à la thérapie combinée d'inhibiteurs BRAF - MEK-EGFR liée à la présence du variant BRAF	16
	Patient éligible aux traitements anti-EGFR en monothérapie lié à l'absence de variant dans les gènes RAS - Indication de sensibilité aux traitements anti-EGFR en monothérapie liée à l'absence de variant dans les gènes RAS	6
	Résistance ou réponse réduite aux traitements anti-EGFR en monothérapie liée à la présence du variant BRAF	5
	Résistance ou réponse réduite aux traitements anti-BRAF en monothérapie liée à la présence du variant BRAF	2
Pronostic-diagnostic	Variant de pronostic défavorable si mCRC avec stabilité microsatellitaire (MSS)	13
Informations sur les gènes testés	Variant détecté dans l'exon 15 du gène BRAF	4
	Aucune variant détecté dans les gènes KRAS et NRAS	5
	Aucun autre variant d'importance clinique détecté	4
Autres	Analyses complémentaires suggérées: statut MSI	5

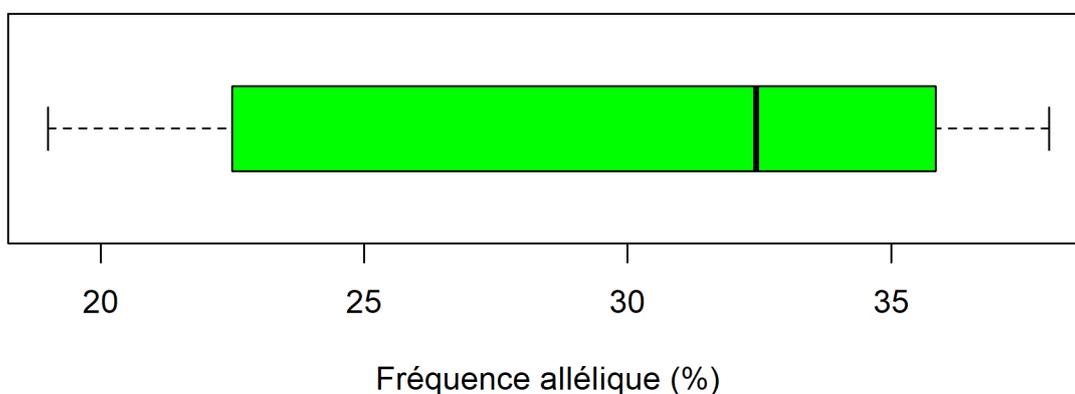
2.3.3. NGS-2021-3

type de la tumeur primaire et histologie mélanome

Consensus des variants à rapporter

- [KIT NM_000222.2; c.1669_1683del; p.\(Trp557_Glu561del\)](#)

KIT NM_000222.2; c.1669_1683del; p.(Trp557_Glu561del)



Min	P25	Median	P75	Max	SD
19	22.75	32.44	35.82	38	9.69

KIT NM_000222.2 c.1669_1683del p.(Trp557_Glu561del) (Fréquence allélique médiane: 32.44 %)	
Identification du variant	N
Oui	20
Non	0
Classification biologique	N
Pathogénique	16
Probablement pathogénique	4
Total	20
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	11
Tier II: Impact clinique potentiel	9
Total	20

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant KIT NM_000222.2; c.1669_1683del; p.(Trp557_Glu561del). Concernant les références DNA: un laboratoire a rapporté le variant c.1667_1681del15 à la place du variant c.1669_1683del. Une séquence identique de 2 nucléotides, en début et juste après la délétion de 15 pb, permet d'aligner la délétion en position 1667. Cependant cette nomenclature est incorrecte selon les guidelines HGVS, en raison de la règle de description en 3' de la séquence de référence. De plus, comme pour un autre laboratoire qui a rapporté le variant avec la nomenclature c.1669_1683del15, ces nomenclatures sont également incorrectes selon HGVS puisque le nombre de nucléotides supprimés ne doit pas être inclus dans l'annotation. Un troisième laboratoire a rapporté le variant c.1671_1685del à la place du variant c.1669_1683del. Dans ce cas, il s'agit probablement d'une erreur de retranscription du variant sur notre site internet puisque la mutation est correctement identifiée dans les données brutes (VCF) du laboratoire concerné et que leur référence protéinique est correctement annotée. Enfin, la nomenclature c.1669_1683delTGAAGGTTGTTGAG, rapportée par 2 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Cette description est plus longue, elle contient des informations redondantes et les chances de faire une erreur augmentent. Concernant les références protéiques: la nomenclature p.Trp557_Glu561del, rapportée par un laboratoire, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. La nomenclature

p.(Trp557_Glu561delTrpLysValValGlu), rapportée par un laboratoire, comme pour les références DNA, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. La classification probablement pathogénique est considérée comme non-acceptable. Dans les guidelines belges, ce variant est présent dans le tableau "Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list". Les classifications Tier I et Tier II n'ont pas été évaluées par les experts en raison de l'absence de consensus des laboratoires pour ce variant.

Analyse des conclusions

Informations types	Informations spécifiques au cas 3 et reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Laboratoires
Traitement	Indication de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase liée à la présence du variant KIT	13
	Sensibilité incertaine aux inhibiteurs de tyrosine kinase liée à la présence du variant KIT (en cours d'étude)	3
	Indication de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase liée à la présence du variant KIT mais en deuxième ligne de traitement uniquement	2
	Absence d'indication pour le traitement aux inhibiteurs anti-BRAF liée à l'absence de variant BRAF	8
Pronostic-diagnostic	Présence de variants KIT plus fréquente dans les mélanomes acraux et muqueux - à mettre en corrélation avec l'histologie	5
Informations sur les gènes testés	Délétion détectée dans l'exon 11 du gène KIT	12
	mutation activatrice KIT p.(Trp557_Glu561del)	4
	Aucun variant détecté dans le gène BRAF	10
	Aucun autre variant d'importance clinique détecté	8

2.3.4. Taux de réussite des participants

Consensus des variants à rapporter

Taux de réussite basé sur le consensus des variants à rapporter	N
3/3 (100%)	20
Taux de réussite total: 60/60 (100%)	

Consensus des variants à ne pas rapporter

Aucun variant n'a été rapporté par moins d'un tiers des participants.

Classifications biologiques et cliniques

Taux de réussite des participants pour les classifications pour le consensus des variants à rapporter	N
Classifications biologiques	
3/3 (100%)	16
2/3 (66,67%)	4
Taux de réussite total - classifications biologiques : 56/60 (93,33%)	
Classifications cliniques *	
2/2 (100%)	20
Taux de réussite total - classifications cliniques : 40/40 (100%)	

* La classification clinique du variant KIT NM_000222.2 c.1669_1683del p.(Trp557_Glu561del) n'a pas été évaluée.

3. ANNEXE

3.1. Aperçu des conclusions cliniques

Ces données ont été extraites à partir des réponses faites sur le site internet <https://gml.wiv-isp.be/NGS/20211/>. Afin de ne pas introduire d'erreurs de traduction, les conclusions ont été conservées dans la langue utilisée par les laboratoires.

3.1.1. NGS-2021-1

<p>Bevindingen met een sterke klinische betekenis (Tier 1): In het onderzochte staal werd een activerende EGFR-mutatie in exon 21 teruggevonden met bewezen gevoeligheid aan bepaalde tyrosine kinase inhibitoren. De c.2369C>T:p.(Thr790Met) (T790M) mutatie werd niet teruggevonden.</p> <p>Er werden mutaties gevonden in het BRAF, KRAS, MET en ERBB2 gen.</p> <p>Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.</p> <p>Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.</p>
<p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Leu858Arg) (p.(L858R)) dans le gène EGFR.</p> <p>Ce variant (rs121434568 - COSM6224) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique avérée dans cette pathologie : sensibilité aux TKIs (FDA-approved) suivants : Afatinib, Dacomitinib, Erlotinib, Gefitinib, Osimertinib.</p> <p>REF : https://www.oncokb.org/gene/EGFR/L858R/Non-Small%20Cell%20Lung%20Cancer</p>
<p>Er werd een activerende mutatie aangetoond in EGFR (zie microscopie). De aanwezigheid van dit type mutatie in NSCLC betekent in het algemeen een verhoogde sensitiviteit aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.</p>
<p>EGFR mutatie positief (L858R). De aanwezigheid van een activerende mutatie is predictief voor respons op anti-EGFR TKI behandeling (Rosell R et al. 2012 Lancet Oncology & Siegelin MD et al. 2014 Lab Invest).</p>
<p>De mutatie c.2573T>G (p.(Leu858Arg)) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren.</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>
<p>Mutation activatrice détectée dans l'oncogène EGFR. Aucune autre mutation pathogénique n'a été détectée dans ce prélèvement.</p>
<p>De aanwezigheid van deze mutatie in exon 21 van het EGFR gen wordt in het algemeen geassocieerd met een goede respons op EGFR tyrosine kinase inhibitoren bij patiënten met een NSCLC.</p> <p>Bron: NCCN</p>
<p>De pathogene variant c.2573T>G p.(Leu858Arg) werd gevonden in het EGFR gen exon 21 dat wordt geassocieerd met een gevoeligheid voor EGFR eerste-, tweede- en derdelijns EGFR TKI's. (PMID: 27987585; PMID: 25589191; PMID: 31682542; PMID: 30659024; ESMO 2020; PMID: 29864379)</p> <p>Er is geen mutatie gedetecteerd in het EGFR gen codon 790.</p>

De mutatie c.2573T>G (p.(Leu858Arg)) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Aangezien er een driver mutatie werd aangetoond in dit staal, wordt GEEN bijkomend onderzoek met RNA sequencing uitgevoerd.

Conclusie:

De mutatie c.2573T>G, p.(Leu858Arg) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan doelgerichte behandeling BRAF/MEK inhibitoren kan niet worden aangetoond.

Er werd een pathogene mutatie in het EGFR gen geïdentificeerd: EGFR c.2573T>G p.(Leu858Arg). Deze missense mutatie in exon 21 van het EGFR gen resulteert in ligand-onafhankelijke activatie van EGFR en is een gekende driver mutatie voor niet-kleincellig longcarcinoom. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie resulteert in gevoeligheid voor behandeling met EGFR tyrosine kinase inhibitoren (PMID 15118073 en 15118125).

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome pulmonaire, présence d'un variant pathogénique de l'exon 21 du gène EGFR NM_005228.5 c.2573T>G p.(Leu858Arg) d'impact clinique avéré (Tier Ia) et de fréquence allélique 19% avec la technique de séquençage NGS utilisée (Kit accrédité selon ISO15189 QIAct AIT UMI Qiagen) sans mutation de résistance associée. Les variants p.L858R, sans variant de résistance associé (comme dans le cas présent), sont prédictifs de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase de 1ère, deuxième et troisième génération ciblant la voie EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires de stades avancés. A noter l'absence de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans l'exon 15 du gène BRAF, exons (codons 12,13), exon 3 (codons 59,61) exon 4 (codon 117, 146) du gène KRAS, exon 20 du gène HER2 et pas de saut d'exon 14 dans le gène MET.

NB:

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead™ QIAct AIT UMI Qiagen GmbH.

Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques).

Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur.

Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x).

En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de fréquence allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé.

En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I., Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.

- Q25: 95,95% et 99,99% séquences couvertes à > 60x.

La mutation L858R du gène EGFR est associée à une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI) anti-EGFR. Mok TS et al., N Engl J Med 2010, 361 :947-57

Er werd een mutatie gedetecteerd in EGFR, de p.Leu858Arg mutatie. Longtumoren met deze mutatie zijn gevoelig aan anti-EGFR receptor tyrosine kinase inhibitoren.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Le variant Leu858Arg a été détecté dans l'exon 21 d'EGFR.

Impact clinique avéré* :

La mise en évidence d'une mutation somatique isolée de l'exon 21 du gène EGFR a été corrélée avec une réponse clinique (RR, PFS) au traitement par inhibiteurs des tyrosine kinases de première ou de seconde génération des patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules (Hirsch et al., JCO 2006; Kim et al., The Lancet 2008; Mok et al., NEJM 2009, Rosell et al., Lancet Oncol 2012; Sequist et al., J Clin Oncol 2013).

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

De mutatie c.2573T>G (p.Leu858Arg) in EGFR is geassocieerd met gevoeligheid aan EGFR tyrosine kinase inhibitoren. De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

(Technical remark: For MET ex14 skipping we always check this on RNA, which was not available here.)

Er werd een activerende EGFR mutatie type c.2573T>G; p.Leu858Arg (L858R) (NM_005228.4) gedetecteerd. Dit resultaat is voor longcarcinomen predictief voor een goede respons op anti-EGFR TKI.

Présence d'une mutation au niveau de l'exon 21 du gène EGFR conférant une sensibilité aux inhibiteurs de l'EGFR

Er werd een EGFR (NM_005228.4(EGFR):c.2573T>G (p.(Leu858Arg)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 21.

De aanwezigheid van deze variant in long adenocarcinoma heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een verhoogde respons op EGFR tyrosine kinase inhibitoren (1e, 2e en 3e generatie TKI) (NCCN guidelines NSCLC v3.2020).

Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen EGFR (exon 18, 19, 20, 21), BRAF (exon 15), KRAS (exon 2, 3 en 4), MET en HER2 (exon 20).

The presence of an EGFR c.2573T>G p.(Leu858Arg) (L858R) variant is generally associated with a good response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung adenocarcinoma (Lynch et al. NEJM 2004, Sequist et al. JCO 2008, Soria et al. NEJM 2018, NCCN guidelines non-small cell lung cancer version 4.2021).

3.1.2. NGS-2021-2

<p>Bevindingen met sterke klinische betekenis (Tier 1): In het onderzochte staal werden geen activerende RAS mutaties in exonen 2, 3 of 4 teruggevonden. Verschillende studies hebben aangetoond dat patiënten met wild type RAS tumoren baat kunnen hebben bij anti-EGFR therapie (Douillard et al., 2013). Er werd een activerende BRAF mutatie in exon 15 teruggevonden (V600E). Patiënten met de BRAF V600E mutatie kunnen baat hebben bij een behandeling met een combinatie van encorafenib (RAF-targeted inhibitor) en cetuximab (anti-EGFR antibody).</p> <p>Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.</p> <p>Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.</p>
<p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Val600Glu) (p.(V600E)) dans le gène BRAF.</p> <p>Ce variant (rs113488022 - COSM476) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique avérée dans cette pathologie : sensibilité à la combinaison (FDA-approved) suivante : encorafenib + cetuximab.</p> <p>REF : https://www.oncokb.org/gene/BRAF/V600E/Colorectal%20Cancer</p>
<p>Er werd geen KRAS of NRAS mutatie gedetecteerd. Er werd wel een mutatie aangetoond in BRAF (zie microscopie) In geval van gemetastaseerde ziekte is dit prognostisch een ongunstige factor. De afwezigheid van een mutatie in de RAS genen betekent dat de patiënt met mCRC in aanmerking komt voor therapie met anti-EGFR antistoffen. Sommige studies vermelden evenwel een verminderde respons van BRAF gemuteerde tumoren op anti-EGFR antistoffen. Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.</p>
<p>BRAF V600E mutatie positief. Het betreft een klasse 1 BRAF mutatie (cfr. Tabel 1 Dankner M. JCO Precision Oncology 2018). De RAF-inhibitoren dabrafenib en vemurafenib hebben minimale activiteit als monotherapie in BRAF V600-mutante colorectale tumoren (CRC). De combinatie van encorafenib + cetuximab + binimetinib, een RAF-inhibitor, een anti-EGFR antilichaam en een MEK-inhibitor respectievelijk, tonen in klinische studies veelbelovende resultaten in patiënten met BRAF V600E-mutante, RAS wildtype CRC (Corcoran RB et al. Cancer Discovery 2018). Verder is de aanwezigheid van de activerende BRAF (V600) mutatie in colorectale tumoren indicatief voor ongunstig klinisch verloop (Barras D Biomark et al., Cancer 2015).</p>
<p>De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.</p> <p>Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie. In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>
<p>/ No answer</p>
<p>De aanwezigheid van de mutatie c.1799_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) in exon 15 van het BRAF gen wordt in het algemeen geassocieerd met een ongunstige prognose. Er is ook evidentie voor een minder goede respons op anti-EGFR therapie in monotherapie. Ook BRAF inhibitie alleen heeft maar weinig effect door RAF-MEK-MA PK pathway gemedieerde en EGFR-gemedieerde resistentiemechanismen. Er is wel mogelijke respons op een combinatietherapie of triplet therapie bestaande uit BRAF inhibitie, anti-EGFR monoklonale antilichaam behandeling en therapieën die de volledige RAF-MEK-MA PK signaaltransductie onderdrukken.</p> <p>Bron: Nakayama I, Hirota T, Shinozaki E. Review: BRAF Mutation in Colorectal Cancers: From Prognostic Marker to Targetable Mutation. Cancers 2020,12, 3236. doi:10.3390/cancers12113236</p>
<p>De pathogene variant c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu) werd gevonden in het BRAF gen exon 15 dat wordt geassocieerd met respons op BRAF/EGFR gecombineerde inhibitoren (PMID 31566309; 29431699; NCCN 2.2021)</p>

De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.

Aanwezigheid van de hotspotmutatie c.1799_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) in BRAF. Bij microsatelliet stabiele (MSS) mCRC is de aanwezigheid van een BRAF hotspot mutatie p.(Val600Glu) geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Conclusie:

De afwezigheid van klinisch relevante mutaties in KRAS en NRAS is geassocieerd met gevoeligheid aan anti-EGFR therapieën.

Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie. In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren (Kopetz S et al. N Engl J Med. 2019)

Er werd een pathogene mutatie in het BRAF gen geïdentificeerd, BRAF c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu). Deze missense mutatie in het tyrosine kinase domein resulteert in een constitutief actief BRAF kinase dat als monomeer tot oncogene signalisatie leidt (klasse 1 BRAF mutatie) (PMID 33260892). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie is geassocieerd met een slechte prognose (PMID 24594804 en 27993800) en maakt een goede respons op behandeling met anti-EGFR monoklonale antilichamen, als monotherapie of in combinatie met chemotherapie, sterk onwaarschijnlijk, behalve wanneer de anti-EGFR monoklonale antilichamen toegediend worden in combinatie met een BRAF inhibitor zoals encorafenib (PMID 31566309; National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: colon cancer, version 2.2021).

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome colorectal, présence d'un variant pathogénique BRAF NM_004333.6 c.1799_1800delTGinsAA (p.Val600Glu) d'impact clinique avéré (Tier Ia) détecté avec une fréquence allélique de 7%.

Le variant BRAF V600E est prédictif dans les cancers rectocoliques métastasés d'une susceptibilité supérieure de l'association anti-BRAF (type encorafenib) et anti-EGFR (type cetuximab ou panitumumab) par rapport à un anti-EGFR seul (non recommandé). Une recherche d'instabilité des microsatellites et de méthylation du promoteur MLH1 sont recommandées. En cas de statut de microsatellites instable (MSI-High), une consultation en Génétique Humaine est recommandée afin d'identifier un syndrome de Lynch éventuel. En cas d'histoire familiale positive, une recherche de mutations dans le gène POLE est également à conseiller.

Les mutations BRAF sont considérées comme étant de pronostic défavorable (OS et Disease free survival) en l'absence d'instabilité microsatellitaire et fréquemment observées dans les adénomes festonnés. Pas de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans les exon 3 (codons 59,61), exon 4 (codon 117, 146) des gènes KRAS et NRAS. En cas de statut de microsatellites instable, des immunothérapies (anti-PD1/PDL1) sont à l'étude y compris en présence de variant BRAF V600E. Ce cas est à discuter en consultation multidisciplinaire oncologie (COM).

NB:

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead™ QIAAct AIT UMI Qiagen GmbH. Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques).

Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur. Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x). En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de couverture allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé. En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I., Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.

- Q25: 95,30% et 99,89% séquences couvertes à > 60x.

La mutation BRAF V600E est décrite dans environ 10% des cancers colorectaux. La présence de cette mutation est associée à un moins bon pronostic.
La FDA a récemment approuvé la combinaison d'encorafenib avec du cetuximab pour les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique avec mutation BRAF V600E.
Van Cutsem E et al., J Clin Oncol 2011, 29:2011-19

Er werd een mutatie gedetecteerd in BRAF, de p.Val600delinsGlu mutatie.
Recente studies tonen voor colorectale tumoren met een mutatie in BRAF codon 600 een langere overall survival en een hogere response rate bij gebruik van gecombineerde (triple) therapie van BRAF-, MEK-, en EGFR-kinase inhibitoren. (PMID 29431699 en PMID 31566309)

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed.

Une mutation de type V600E a été détectée dans BRAF.

Impact clinique avéré* :

Plusieurs études indiquent que la mutation V600E de BRAF a un impact négatif sur le traitement à base d'anticorps ciblant EGFR chez les patients atteints d'un cancer colorectal non muté pour KRAS ou NRAS (De Roock et al., Lancet Oncol 2011; Mao et al., Mol Biol Rep 2011; Tol et al., Eur J Cancer 2010).

La présence d'une mutation de BRAF est un argument en faveur d'une origine sporadique de cancer colorectal.

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse

https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Aanwezigheid van een BRAF p.(V600E) mutatie (c.1799_1800delinsAA (p.(Val600Glu))). In geval van een microsatelliet stabiel (MSS) mCRC is de aanwezigheid van deze BRAF hotspotmutatie geassocieerd met een ongunstige prognose. Te correleren met MSI status. Indien klinisch geïndiceerd, kan de patiënt in aanmerking komen voor behandeling met een combinatie van RAF- en EGFR-inhibitoren.

De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarssubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Er werd GEEN RAS mutatie gedetecteerd. De patiënt zou dus in aanmerking kunnen komen voor therapie met anti-EGFR moAb therapie.

Er werd w een BRAF mutatie type c.1799T>A; p.Val600Glu (V600E) (NM_004333.5) gedetecteerd. BRAF mutaties komen voor in +/- 10 % van de colorectale carcinomen (CRC). Het voorkomen van een BRAF mutatie in mCRC heeft een negatieve impact op de prognose. De combinatie van encorafenib (BRAF-inhibitor) + cetuximab (anti-EGFR moAb) +/- binimetinib (MEK-inhibitor) zou goede klinische responsen geven in BRAF V600E positieve CRC.

Présence de la mutation V600E au niveau du gène BRAF conférant une pronostique défavorable chez les patient présentant un adénocarcinome colorectal.

Er werd een BRAF (NM_004333.6(BRAF):c.1799_1800delinsAA (p.(Val600Glu)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 15.

De aanwezigheid van deze variant in colorectaal carcinoma heeft significant klinisch belang (tier I) en is geassocieerd met een verhoogde gevoeligheid aan de combinatie therapie bestaande uit encorafenib, cetuximab en binimetinib. (PMID: 31566309).

Er werd geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF (exon 15), KRAS (exon 2, 3 en 4) en NRAS (exon 2, 3 en 4).

The presence of a BRAF c.1799_1800delinsAA p.(Val600Glu) (V600E) variant is generally associated with an unfavorable prognosis, and possible response to a combination therapy of BRAF inhibition, anti-EGFR monoclonal antibody therapy and/or MEK inhibition in colorectal carcinoma. EMA recently approved the combination therapy of encorafenib with cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancers harbouring the BRAF V600E variant (Trullas et al. ESMO Open 2021, Chu et al. CCR 2020, NCCN guidelines colon cancer version 2.2021).

3.1.3. NGS-2021-3

<p>Bevindingen met een sterke klinische betekenis (Tier 1): In het onderzochte staal werd geen activerende BRAF-mutatie in codon 600 teruggevonden. Studies hebben aangetoond dat patiënten met wild-type BRAF p.Val600 tumoren geen baat zullen hebben bij een behandeling met een BRAF kinase inhibitor (BRIM studies: Chapman et al., 2011; Sosman et al., 2012). Er werd een vermoedelijk pathogene mutatie teruggevonden in exon 11 van het KIT gen. Patiënten met een gemetastaseerd melanoom met dit type mutatie kunnen baat hebben bij een behandeling met imatinib.</p> <p>Resultaten onder voorbehoud: tumorcelpercentage niet gekend, waardoor varianten met een lage VAF% mogelijk niet opgepikt worden.</p> <p>Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria, met uitzondering van exon 9, 11, 13, 17 en 18 van het KIT gen.</p>
<p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Trp557_Glu561del) (p.(W557_E561del) : délétion de 5 acides aminés dans l'exon 11) dans le gène KIT.</p> <p>Ce variant (COSM1330) est classé biologiquement comme pathogénique selon le principe de classification recommandé par Sciensano et Belac et est de signification clinique potentielle dans cette pathologie.</p> <p>REF : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986039/ https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2006.06.2984</p>
<p>Er werd geen pathogene mutatie aangetoond in BRAF. Dit betekent in het algemeen dat de patiënt niet gevoelig is aan BRAF V600 inhibitoren.</p> <p>Er werd een mutatie gedetecteerd in het KIT gen (zie resultaten). De aanwezigheid van dit type mutatie betekent in het algemeen een verhoogde sensitiviteit aan KIT tyrosine kinase inhibitoren.</p> <p>Er werden geen andere varianten met klinische relevantie gevonden.</p>
<p>KIT mutatie positief.</p> <p>KIT mutatie in maligne melanoom is onderwerp van klinische studies ikv behandeling met multikinase inhibitoren (Hodi FS et al. Imatinib for Melanomas Harboring Mutationally Activated or Amplified KIT Arising on Mucosal, Acral, and Chronically Sun-Damaged Skin. JCO 2013).</p> <p>Imatinib is de enige gepersonaliseerde behandeling voor KIT-gemuteerd melanoom vermeld in de NCCN richtlijnen. Doch, de effectiviteit van KIT-targeted therapie is sterk afhankelijk van de genomische positie van de mutatie (exon) en bovendien blijkt progressie snel op te treden en de effectiviteit van alternatieve inhibitoren (e.g. sunitinib, dasatinib, nilotinib) laag.</p> <p>(Carvaja RD et al. Another option in our KIT of effective therapies for advanced melanoma. JCO 2013) (Guo J et al. Efficacy and safety of nilotinib in patients with KIT-mutated metastatic or inoperable melanoma: final results from the global, single-arm, phase II TEAM trial. Ann Oncol. 2017)</p>
<p>Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren kan NIET worden aangetoond.</p> <p>Aanwezigheid van een pathogene mutatie in exon 11 van het KIT gen, c.1669_1683del (p.(Trp557_Glu561del)) (in-frame deletie). KIT mutaties zijn zeldzaam in melanomen, maar worden vaker gezien bij acrale of mucosale melanomen. Te correleren met histologie.</p> <p>De predictieve betekenis van KIT mutaties bij melanomen, onder meer voor behandeling met de tyrosine kinase inhibitor imatinib, wordt uitvoerig bestudeerd (Michielin et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol 2019;30(12):1884-1901).</p> <p>Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarssubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.</p>
<p>Mutation activatrice détectée dans l'oncogène KIT Aucune autre mutation pathogénique n'a été détectée dans ce prélèvement.</p>
<p>Door de aanwezigheid van een mutatie in KIT exon 11 heeft de patiënt hoogstwaarschijnlijk baat bij imatinib behandeling.</p> <p>Door de afwezigheid van een BRAF V600 mutatie, zal deze patiënt waarschijnlijk niet reageren op BRAF-targeted therapie.</p> <p>Bron: https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kit-exon-11-mutation/</p>

Binnen de grenzen van de methode, is er geen mutatie gevonden in exon 15 van het BRAF gen. Voor melanoma zonder BRAF mutatie is er een slechte respons voor BRAF-inhibitor therapie.
De pathogene variant c.1669_1683del p.(Trp557_Glu561del) werd gevonden in het KIT gen exon 11. Kit mutaties komen vooral voor bij acrale melanomen, mucosale melanomen en melanomen bij chronische zon expositie. Respons op behandeling met imatinib of nilotinib is beschreven en kan worden overwogen in 2de lijn (PMID: 31566661; 28327988; 23775962; 21642685).

De mutatie c.1669_1683del (p.(Trp557_Glu561del)) in KIT is geassocieerd met gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Conclusie:

De klinische betekenis van de mutatie c.1669_1683del, p.(Trp557_Glu561del) in het KIT gen is onvoldoende gekend, maar wordt uitvoerig bestudeerd, in tegenstelling tot GIST tumoren waar deze mutatie geassocieerd is met gekende gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib (Dumaz et al, 2015 Feb;25(1):88-90).

Er werd een pathogene mutatie in het KIT gen geïdentificeerd: KIT c.1669_1683del p.(Trp557_Glu561del). Deze in-frame deletie in exon 11 tast het juxtamembranair domein van het KIT eiwit aan en resulteert in constitutieve activatie van deze tyrosine kinase receptor. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid van deze mutatie kan resulteren in gevoeligheid voor behandeling met imatinib of andere KIT inhibitoren. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat een respons op KIT inhibitor therapie slechts in minder dan de helft van de gevallen van melanoom met een activerende KIT mutatie optreedt, zodat KIT inhibitoren niet de voorkeursbehandeling zijn maar voorbehouden blijven voor melanomen met een activerende KIT mutatie die niet in aanmerking komen voor of niet responsief zijn op andere therapieën (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 2.2021).

De afwezigheid van een BRAF Val600 mutatie impliceert dat bij deze patiënt een behandeling met een BRAF inhibitor niet zinvol is (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 2.2021).

Dans ce prélèvement de mélanome, présence d'un variant pathogénique KIT NM_000222.3 c.1669_1683delTGGGAAGGTTGTTGAG p.(Trp557_Glu561del) d'impact clinique avéré (Tier IA) et de fréquence allélique 28,42%. Le variant de l'exon 11 du gène KIT p.(W557_E561del) est prédictif d'une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase tels que l'imatinib en l'absence de mutation de résistance associée dans les mélanomes avancés non résecables. Des études cliniques de phase II faisant usage d'associations d'anti-MEK et d'imatinib sont en cours pour les stades III et IV de mélanome. Les mutations KIT sont décrites comme étant présentes dans 10-15% des mélanomes muqueux et acraux et considérés de pronostic plus favorable sous traitement par imatinib. Pas de variant pathogénique ou probablement pathogénique détecté dans les exon 3 (codons 59,61), exon 4 (codon 117, 146) du gène NRAS et de l'exon 15 (codon 600) du gène BRAF.

NB:

- Limite de détection:

Analyse réalisée à l'aide du kit GeneRead™ QIAAct AIT UMI Qiagen GmbH. Détection des mutations sur les régions codantes ciblées des 30 gènes (AKT1, ALK, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ESR1, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNA11, GNAQ, HRAS, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NOTCH1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, RAF1, SMAD4, STK11) en utilisant les méthodes d'enrichissement ciblé par PCR Multiplex suivi de séquençage sur GeneReader (Qiagen). Ce test (accrédité selon la norme ISO 15189) identifie avec une spécificité de 100% tous les variants présents au niveau des exons ciblés des 30 gènes (+ 20bp introniques).

Ces mutations ponctuelles sont détectées avec une limite de détection d'au moins 5% de fréquence allélique (équivalent à un contenu tumoral de 10%) pour une couverture UMI de 60X dans les conditions imposées par le fournisseur. Dans le cadre de tests somatiques, le statut mutationnel des cellules tumorales étant parfois hétérogène, un test négatif ne peut exclure avec certitude la présence d'une mutation (si la couverture des régions d'intérêt est < 95% pour UMI 60x). En effet, quand la quantité d'ADN à amplifier n'est pas suffisante et/ou la qualité suboptimale, certaines mutations peuvent ne pas être décelées. La couverture minimale acceptable UMI est de 30X pour certaines régions géniques difficiles. La présence ou l'absence d'une mutation est rapportée uniquement si l'analyse est contributive suivant les critères d'interprétation validés au laboratoire (>= 95% pour UMI 30x, contenu tumoral >=10%). A titre exceptionnel, des variants (délétions) de fréquence allélique >= à 3% peuvent être identifiés avec une couverture UMI de 30x avec le pipeline informatique validé. En dehors d'une confirmation sur un échantillon sanguin ou sur du tissu sain avec signature d'un consentement éclairé par le patient dans le cadre d'un conseil génétique, ce test n'est pas utilisé pour la recherche de mutation d'origine constitutionnelle mais peut utilement la précéder (Vergote I., Eur J.Cancer ; 69 (2016), pp127-134).

- Pas d'information reçue sur le pourcentage d'infiltration tumorale.

- Q25: 95,41% et 100% séquences couvertes à > 60x.

Les mutations du gène KIT sont décrites dans 2 à 8% des mélanomes, le plus fréquemment dans le mélanome acral et muqueux (10-20%). Ces mutations sont rapportées comme mutuellement exclusives avec les mutations des gènes BRAF et NRAS. De nombreuses études et essais cliniques ont montré que les mutations du gène KIT confèrent une sensibilité à l'imatinib, au sunitinib, au sorafenib et au nilotinib.

Beadling C et al., Clin Cancer Res 2008, 14:6821-6828

Hodi FS et al., J Clin Oncol 2013, 31:3182-3190

Lebbe C et al. J Clin Oncol 2014, 15 :suppl 9032

Minor DR et al. Clin Cancer Res 2012,18 :1457-1463

Er werd een vermoedelijk pathogene mutatie gedetecteerd in exon 11 van het KIT gen, de p.Trp557_Glu561del mutatie.

Klinische studies wijzen op een gevoeligheid aan KIT tyrosine kinase inhibitoren voor de behandeling van melanomen met activerende KIT mutaties (inclusief deze in codon 557). Zie PMID 23775962 en PMID 28843487.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPer Med.

Une mutation a été détectée dans KIT

Impact diagnostic :

2 à 8% des mélanomes sont porteurs d'une mutation de KIT, tous sous-types confondus. Les mélanomes acrolentigineux et muqueux sont mutés pour KIT dans 15 à 20% des cas. Les mutations de KIT sont plus rares dans les mélanomes de la peau exposée aux UV (2% environ), et non décrites dans les mélanomes de la peau non-exposée.

Impact clinique potentiel* :

Plusieurs études cliniques et case 'reports' rapportent une réponse de patients porteurs d'une mutation de l'exon 11 ou 13 de KIT à un traitement à base d'imatinib (Carvajal et al. JAMA 2011; Terheyden et al. J Invest Dermatol 2010), de sunitinib (Minor et al., Clin Cancer Res 2012) ou de sorafenib (Quintas-Cardama et al., Nar Clin Pract Oncol 2008).

Nous n'avons pas détecté d'autre mutation.

*Selon les guidelines de l'ACMG et AMP, voir Li et al., JMD Vol 19 No.1, 2017

La liste complète des gènes couverts est consultable à l'adresse

https://www.chuliege.be/jcms/c2_17345784/fr/genetique/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren kan NIET worden aangetoond.

De mutatie in KIT c.1669_1683del, p.(Trp557_Glu561del) is geassocieerd met gevoeligheid aan tyrosine kinase inhibitoren. Momenteel zijn er trials lopende met imatinib, dasatinib, nilotinib, en sunitinib. Voor Dasatinib werd recent een auto-resistentie mechanisme aangetoond.

Er worden geen andere varianten gedetecteerd in de gevraagde genen (met voldoende sequencingdata). De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

Er werd GEEN BRAF mutatie gedetecteerd. Dit resultaat is voor melanomen predictief voor een gebrek aan respons op BRAF-inhibitoren.

Er werd een KIT mutatie type c.1671_1685del; p.(Trp557_Glu561del) (NM_000222.2) gedetecteerd. Dit resultaat is in maligne melanoom predictief voor een goede respons op imatinib.

Une catégorie de patients atteints de mélanome et présentant une altération/activation du gène KIT (exon 11) répondent favorablement à l'imatinib mesylate ou à d'autres inhibiteurs de KIT

Er werd een KIT (NM_000222.2(KIT):c.1669_1683del (p.(Trp557_Glu561del)) pathogene in-frame deletie variant geïdentificeerd in exon 11.

De aanwezigheid van dit type variant in melanoma heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen een verhoogde sensitiviteit voor KIT inhibitoren zoals imatinib, nilotinib en sunitinib (PMID: 23775962, 21642685, 28327988, NCCN guidelines v1.2021 Melanoma: Cutaneous).

Er werden geen andere (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF (exon 15), NRAS (exon 2, 3 en 4) en KIT (exon 9, 11, 13, 17 en 18).

The presence of a KIT indel variant in exon 11 is in general associated with a good response to tyrosine kinase inhibitor therapy including imatinib and nilotinib in melanoma (Carvajal et al. JAMA 2011, Hodi et al. JCO 2013, Guo et al. JCO 2011, Guo et al. Ann Oncol 2017, NCCN guidelines cutaneous melanoma version 2.2021).

3.2. 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 et toutes méthodes confondues.

Les informations suivantes sont reprises:

- Votre résultat (R)
- 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 et toutes méthodes confondues.
- Le score Z:
la différence entre votre résultat et la médiane (exprimée en unités d'écart type):
 $Z = (R - MAF) / SD$
Votre résultat est cité si **$|Z| > 3$** .
- 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 (R) par rapport aux médianes (MAF).

Vous pouvez trouver plus de détails dans les 3 brochures qui sont disponibles sur notre site web à l'adresse suivante:

https://www.wiv-isp.be/QML/index_fr.htm

(Choisir « brochures » dans le menu proposé)

ou directement à l'adresse suivante:

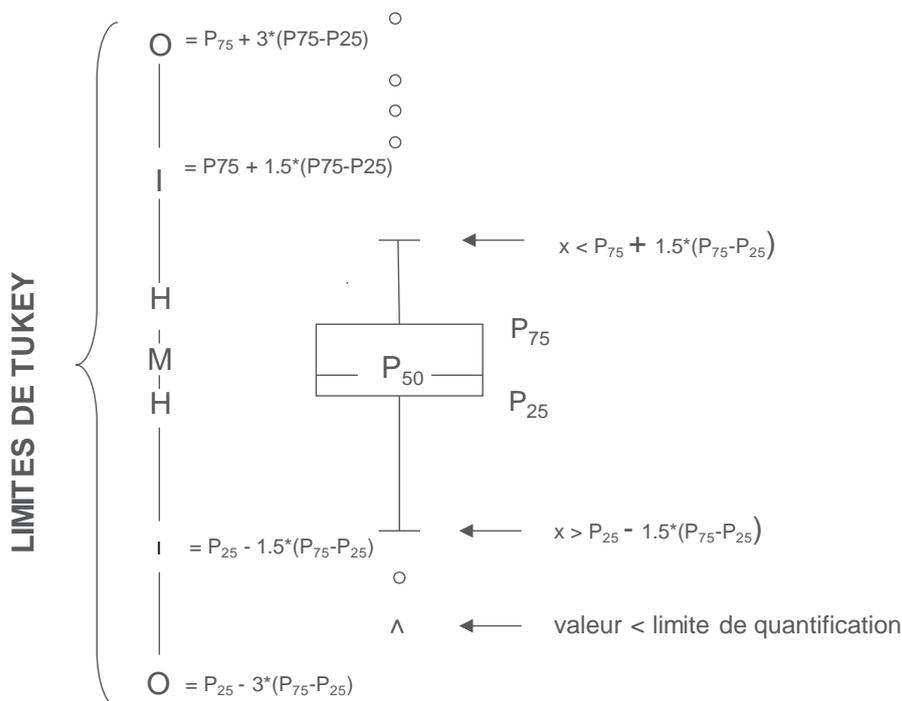
https://www.wiv-isp.be/QML/activities/external_quality/brochures/fr/brochures.htm

- 1) Brochure d'information sur les programmes d'évaluation externe de la qualité pour les laboratoires cliniques (Brochure d'information générale sur l'évaluation externe).
- 2) Brochure statistique (Procédure générale de calcul statistique mis au point par le professeur Albert).
- 3) Traitement des valeurs censurées (Procédure de calcul statistique appliquée aux valeurs censurées rédigée par le Professeur Albert).

Représentation graphique

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

- un rectangle qui va du percentile 25 (P_{25}) au percentile 75 (P_{75})
- une ligne centrale représente la médiane des résultats (P_{50})
- une ligne inférieure qui représente la plus petite valeur $x > P_{25} - 1.5 * (P_{75} - P_{25})$
- une ligne supérieure qui représente 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.



Limites correspondantes en cas de distribution normale

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2021.

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.