

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

COMITE DES EXPERTS *AD HOC*

BENCHMARKING TRIAL

RAPPORT GLOBAL
Next Generation Sequencing (NGS)

Tumeurs solides

2020/1

Sciensano/NGS benchmarking trial/6-FR

Expertise et prestations de service
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				
Elke Boone	AZ Delta Hospital Roeselare				
Guy Froyen	Jessa Hospital Hasselt				
Koen Jacobs	AZ-St-Lucas Hospital Ghent				
Suzan Lambin	UZ Antwerp				
Marie Le Mercier	UZ Antwerp				
Friedel Nollet	AZ Sint-Jan Brugge				
Karl Vandepoele	UZ Ghent				
Sara Vander Borght	UZ Leuven				
Joni Van Der Meulen	UZ Ghent				
Thomas Delcourt	Sciensano				
Aline Hébrant	Sciensano				
Mohamed Rida Soumali	Sciensano				
Marc Van Den Bulcke	Sciensano				
Philippe Van de Walle	Sciensano				
Els Van Valckenborgh	Sciensano				

Une version provisoire de ce rapport a été transmise aux experts les : 27/05/2020, 11/06/2020 et 22/06/2020.

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 du Benchmarking trial NGS, le 14/07/2020.

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 du Benchmarking trial NGS – tumeurs solides	5
1.2. Activité sous-traitée	5
1.3. Matériel	5
1.4. Demande	5
1.5. Critères d'évaluation	6
2. RESULTATS	7
2.1. Participation au Benchmarking trial NGS	7
2.2. Aperçu des méthodes	7
2.3. Aperçu des résultats	10
2.3.1. NGS-2020-1	10
2.3.2. NGS-2020-2	12
2.3.3. NGS-2020-3	14
2.3.4. Taux de réussite des participants	17
3. ANNEXE	18
3.1. Aperçu des conclusions cliniques	18
3.1.1. NGS-2020-1	18
3.1.2. NGS-2020-2	21
3.1.3. NGS-2020-3	23
3.2. Interprétation du rapport individuel	25

1. INTRODUCTION

L'organisation des benchmarking trials 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. Ce 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. Toutes les informations relatives à l'étude pilote NGS sont détaillées dans le NGS Roadbook :

https://www.compermed.be/sites/compermed.be/files/2018-05/Roadbook_PersMed_NGS_FR.pdf

Depuis février 2018, le ComPerMed et MolecularDiagnostics.be ont 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 premiers benchmarking trials réalisés en 2017.

Ce groupe travaille plus particulièrement sur la standardisation :

- de la nomenclature des variants
- de la classification biologique des variants
- de la classification clinique des variants
- du contenu du rapport clinique

Les conclusions retenues ont été publiées sur le site du Belac :

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

Suite à l'analyse des résultats des « benchmarking trials – case studies » réalisés en 2019, une révision des guidelines belges pour l'interprétation des variants est prévue pour 2020.

1.1. Objectif du Benchmarking trial NGS – tumeurs solides

L'objectif de ce Benchmarking trial 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 tumoraux ont été fournis par l'Institut Jules Bordet, Bruxelles.

1.3. Matériel

Le matériel transmis lors de cette étude comprenait :

- 2 tubes contenant de l'ADN génomique (Volume: 9µl, Concentration: environ 50 ng/µl) provenant de 2 échantillons différents avec les références suivantes: NGS-2020-1 et NGS-2020-2.
- 3 coupes FFPE coupées à 4µm provenant d'un troisième échantillon (3 lames sériées) avec la référence suivante: NGS-2020-3-numéro de la coupe sériée.

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

1.4. Demande

L'évaluation a été réalisée sur l'analyse de 3 tumeurs différentes provenant de la routine. Pour chaque cas clinique, un contexte clinique avait été transmis aux participants.

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

<https://www.inami.fgov.be/fr/professionnels/etablissements-services/laboratoires/Pages/oncologie-remboursement-biologie-moleculaire-ngs.aspx>
<https://www.compermed.be/fr/activites/workflows#/>

échantillon	tumeur	gènes
NGS-2020-1	Mélanome	BRAF, KIT, NRAS
NGS-2020-2	Adénocarcinome colorectal	KRAS, NRAS, BRAF
NGS-2020-3	GIST	KIT, PDGFRA

Pour l'échantillon NGS-2020-3, l'une des lames transmises devait être utilisée pour réaliser une coloration Hématoxyline-Eosine et pour estimer le contenu tumoral.

Sur le site internet de réponses : <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20201>, 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
 - Fréquence allélique
 - Classification biologique (choix multiple)
 - Classification clinique (choix multiple)
- De transmettre, pour l'échantillon NGS-2020-3, le pourcentage de cellules néoplasiques de la zone analysée ainsi que les numéros des coupes reçues.
- De rédiger une conclusion générale pour chaque cas clinique sous forme d'un texte libre.

1.5. Critères d'évaluation

Ce rapport contient les résultats des 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, dans chacun des 3 échantillons: consensus des variants à rapporter. Les valeurs médianes des fréquences alléliques rapportées par les laboratoires pour ces variants ont été fournies à titre indicatif ainsi que les valeurs SD.

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

Concernant les interprétations biologiques et cliniques, pour les variants du consensus des variants à rapporter, les réponses des laboratoires ont été classées en « résultat attendu » (en vert), « non-recommandé mais acceptable » (en orange) et « non-acceptable » (en rouge). Ces catégories ont été 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 a été classé par informations types reprises par au moins 2 laboratoires.

2. RESULTATS

2.1. Participation au Benchmarking trial NGS

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

Aperçu des participants

Région	N
Région flamande	12
Région bruxelloise	4
Région wallonne	3
Total	19

Laboratoire	N
Anatomie pathologique	9
Biologie Clinique	7
Génétique humaine	3
Total	19

2.2. Aperçu des méthodes

Q1. Génome de référence utilisé pour l'analyse

Réponses	N
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	11
Illumina - NextSeq 550	2
Illumina - NovaSeq 6000	2
Qiagen - GeneReader	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion GeneStudio S5	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion S5	1
ThermoFisher/Ion Torrent - Ion PGM	1

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

Réponses	N
Archer FusionPlex CTL panel (Illumina)	1
Truseq Amplicon Cancer panel (Illumina)	1
TruSight Oncology 500 (Illumina)	1
Focus Ampliseq panel (Illumina)	1
Colon and Lung panel, Oncomine Solid Tumor (ThermoFisher)	1
Oncomine focus assay (ThermoFisher)	1
GeneRead QIAact AIT DNA UMI panel (Qiagen)	1
SureMASTR Tumor Hotspot (Agilent)	2
Custom panel (SeqCap, Roche)	5
Custom panel (QIASeq, Qiagen)	4
Custom Ampliseq panel (Illumina)	2
Custom panel CP-Alphav3	1
Custom panel (not specified)	1

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

Réponses	N
Amplicon-based	14
Hybridization-based	5

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

Réponses	N
Paired-end	15
Single-end	4

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

Réponses	N
75	1
100	1
110	1
113	1
141	1
150	10
151	1
251	1
300	1
360	1

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

Réponses	N
Open source /in-house development	7
SeqNext, JSI medical systems	4
QCI Interpret-Somatic Cancer, Qiagen	3
CLC Genomics Workbench, Qiagen	3
Variant Studio Software, Illumina	2
Sophia DDM, Sophia Genetics	2
Ion Reporter Software, ThermoFisher/Ion Torrent	2
HGMD database	1
Ingenuity Variant Analysis, Qiagen	1
Biomedical Genomics Workbench, Qiagen	1
MASTR Reporter, Multiplicom	1
NextGENe Software, SoftGenetics	1
TruSight Oncology 500 app Software, Illumina	1

Remarques : Les outils bio-informatiques ont été utilisés en *open source* selon les combinaisons suivantes: 1/BWA, GATK UnifiedGenotyper, Annovar, 2/bcbio, 3/ Pindel, CNVkit , CNVpanelizer

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

	2	2.5	3	4	5	NA	Total
CNV (Copy number variants)	0	0	0	0	0	6	6
Indels	1	2	2	2	12	0	19
SNV (Single nucleotides variants)	1	2	2	2	12	0	19

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

Réponses	N
Tissu paraffiné	19
Liquide cytologique	7
Tissu frais	3
ADN tumoral circulant	2
Frottis	1
Tissu congelé	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	18
Dans certains cas, si suspicion de variant germlinal	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	19

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
Non, utilisation de l'entièreté du tissu pour l'analyse	2
Dans certains cas, à la demande du pathologiste	1

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
5%	1
10%	15
20%	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 méthode utilisée pour la quantification de l'ADN ?

Réponses	N
Qubit fluorometer	16
Quantus fluorometer	2
NanoDrop fluorospectrometer	1

Remarques : Un laboratoire indique ne pas quantifier l'ADN. Un autre laboratoire utilise 2 méthodes de quantification différentes (Qubit et Quantus).

Q15. Combinaisons des guidelines utilisées par les laboratoires

Guidelines\ Nombre de laboratoires	5	5	4	2	1	1	1	total
BELAC 2-405-NGS Rev 0-2018				X	X			3
BELAC 2-405-NGS Rev 1-2019				X		X		3
BELAC 2-405-NGS Rev 2-2019	X	X	X	X	X		X	18
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)		X	X	X	X		X	13
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)			X	X	X			7
Standardization of Somatic Variant Classifications in Solid and Haematological Tumours by a Two-Level Approach of Biological and Clinical Classes: An Initiative of the Belgian ComPerMed Expert Panel. Froyen et al. Cancers, 2019 (PMID: 31888289)							X	1

Remarques : Un laboratoire indique utiliser uniquement les guidelines BELAC 2-405-NGS Rev 1-2019 qui ne constituent cependant pas la version la plus récente de celles-ci. Nous vous recommandons d'utiliser préférentiellement la dernière version publiée de ces recommandations.

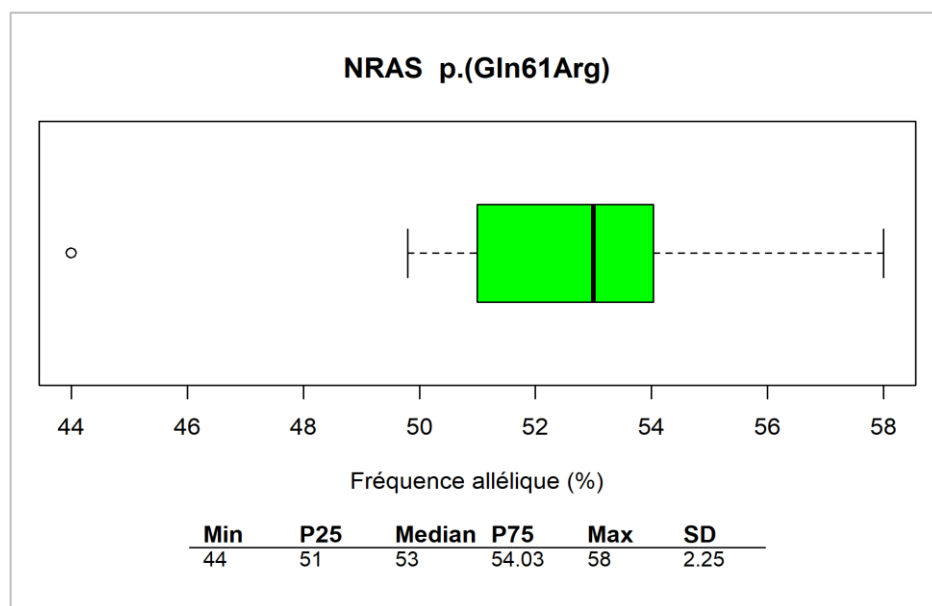
2.3. Aperçu des résultats

2.3.1. NGS-2020-1

genre	M
année de naissance	1963
type de la tumeur primaire et histologie	mélanome
Informations cliniques	récurrence
site anatomique de l'échantillon	peau
type d'échantillon	résection
conditionnement de l'échantillon	ADN génomique extrait de coupes FFPE
cellules néoplasiques (%)	80%

Consensus des variants à rapporter

NRAS NM_002524.4; c.182A>G; p.(Gln61Arg)



NRAS NM_002524.4 c.182A>G p.(Gln61Arg) (Fréquence allélique médiane: 53 %)	
Classification biologique	N
Pathogénique	18
Probablement pathogénique	1
Total	19
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	9
Tier II: Impact clinique potentiel	10
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant NRAS NM_002524.4; c.182A>G; p.(Gln61Arg). La nomenclature p.Gln61Arg, rapportée par 4 laboratoires, 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 v2". Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier II. La classification Tier I est non recommandée mais acceptable. La recherche des mutations NRAS est recommandée par les guidelines NCCN et ESMO. Cependant, il n'y a actuellement

aucun traitement approuvé par la FDA ou l'EMA associé à ce variant dans le mélanome, ni d'études bien étayées avec un consensus des experts dans le domaine.

Consensus des variants à ne pas rapporter

KIT NM_000222.2; c.1712del (M.i.), c.1700del; p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19

KIT NM_000222.2 c.1712del (M.i.), c.1700del p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19 (Fréquence allélique médiane: 1.59 %)	
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III: Impact clinique indéterminé	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant KIT NM_000222.2; c.1712del (M.i.), c.1700del; p.Ile571Lysfs*19 (M.i.), p.Ile567Lysfs*19. Selon le consensus des variants à ne pas rapporter, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées.

Analyse des conclusions

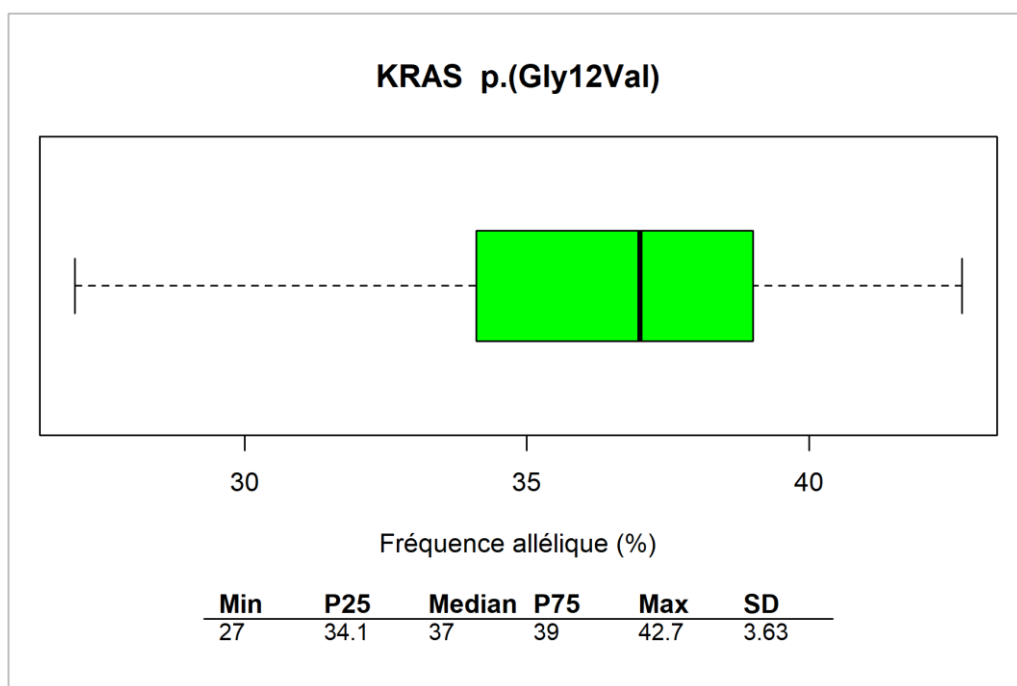
Informations types reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Informations spécifiques au cas 1	Laboratoires
Traitement	Absence d'indication pour le traitement aux inhibiteurs anti-BRAF liée à l'absence de variant BRAF	9
	Absence d'indication pour le traitement aux inhibiteurs de tyrosine kinase liée à l'absence du variant BRAF	3
	Résistance aux inhibiteurs anti-BRAF liée à la présence d'un variant NRAS	3
	Pas de traitement anti-NRAS connu	2
	(Potentielle) indication de sensibilité au traitement anti-MEK liée à la présence d'un variant NRAS (Binimétinib)	9
	Impact thérapeutique du traitement anti-MEK en cours d'étude clinique	6
Pronostic	Variant NRAS de pronostic défavorable	5
	Signification prédictive et pronostic du variant NRAS inconnu	3
Informations sur les gènes testés	Activation constitutive de la cascade de signaux NRAS	6

2.3.2. NGS-2020-2

genre	F
année de naissance	1947
type de la tumeur primaire et histologie	adénocarcinome colorectal
Informations cliniques	classification TNM (2017): pT3N2a
site anatomique de l'échantillon	colon
type d'échantillon	résection
conditionnement de l'échantillon	ADN génomique extrait de coupes FFPE
cellules néoplasiques (%)	70%

Consensus des variants à rapporter

KRAS NM_004985.4; c.35G>T; p.(Gly12Val)



KRAS NM_004985.4 c.35G>T p.(Gly12Val) (Fréquence allélique médiane: 37 %)	
Classification biologique	N
Pathogénique	13
Total	19
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	17
Tier II: Impact clinique potentiel	2
Total	19

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant KRAS NM_004985.4; c.35G>T; p.(Gly12Val). La nomenclature p.Gly12Val, rapportée par 3 laboratoires, n'est pas recommandée selon les guidelines HGVS. Seul un laboratoire a rapporté ce variant avec la référence cDNA c.35C>A, qui correspond au brin ADN non-codant. Les autres laboratoires ont rapporté ce variant sur le brin ADN complémentaire. Concernant les classifications biologiques, le résultat attendu pour ce variant est la classification pathogénique. Dans les guidelines belges, ce variant est présent dans le tableau "Consensus pathogenic variants (CPV) Solid / Myeloid list v2". Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I. La classification Tier II est considérée comme non-acceptable étant donné le niveau d'évidence très élevé de ce variant: la FDA et l'EMA approuvent les anti-EGFR uniquement chez les patients ne présentant pas de variant dans les exons 2, 3 et 4 du gène KRAS (Tier I, level A).

Consensus des variants à ne pas rapporter

KRAS NM_004985.4; c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA; p.His166Lys (M.i.), NA

KRAS NM_004985.4 c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA p.His166Lys (M.i.), NA (Fréquence allélique médiane: 1.49 %)	
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III: Impact clinique indéterminé	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant KRAS NM_004985.4; c.496_498delinsAAA (M.i.), c.*50_*52delinsAAA; p.His166Lys (M.i.), NA. Selon le consensus des variants à ne pas rapporter, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées.

Analyse des conclusions

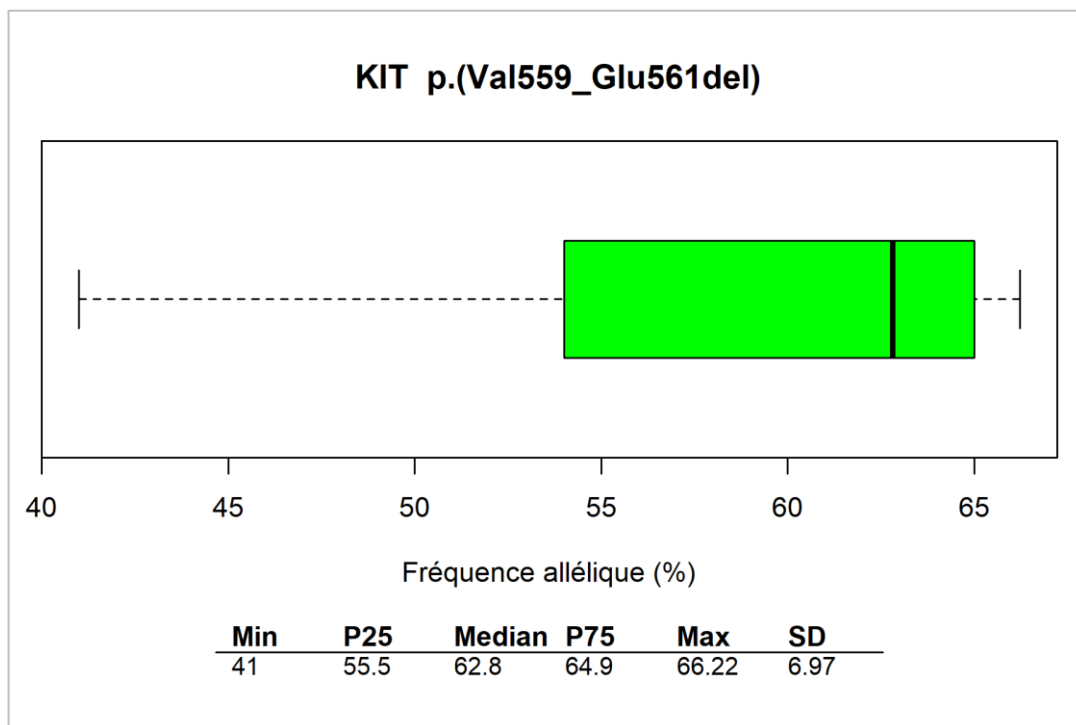
Informations types reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Informations spécifiques au cas 2	Laboratoires
Traitement	Résistance au traitement anti-EGFR liée à la présence d'un variant KRAS	12
	Dans les tumeurs colorectales métastatiques, résistance au traitement anti-EGFR liée à la présence d'un variant KRAS	5
Pronostic	Variant de pronostic défavorable	3
Informations sur les gènes testés	Activation constitutive de la cascade de signaux RAS	6

2.3.3. NGS-2020-3

genre	M
année de naissance	1948
type de la tumeur primaire et histologie	GIST
Informations cliniques	classification TNM (2017): pT4N0
site anatomique de l'échantillon	colon
type d'échantillon	résection
conditionnement de l'échantillon	coupes FFPE
cellules néoplasiques (%)	non communiqué

Consensus des variants à rapporter

KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del)



KIT NM_000222.2 c.1676_1684del p.(Val559_Glu561del) (Fréquence allélique médiane: 62.8%)	
Classification biologique	N
Pathogénique	13
Probablement pathogénique	5
Total	18
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	18
Total	18

Commentaires: Pour cet échantillon, le consensus établi est l'identification du variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del). Cette délétion de 9 nucléotides est flanquée en 5' et 3' d'une séquence répétée AGG. Concernant les références cDNA: La nomenclature c.1676_1684delTTGTTGAGG, rapportée par 3 laboratoires, est acceptée selon les guidelines HGVS. La nomenclature c.1673_1681delAGGTTGTTG, rapportée par 1 laboratoire, n'est pas recommandée par les guidelines HGVS, en raison de la règle de description en 3' de la séquence de référence. La nomenclature c.1676_1684del9, rapportée par 1 laboratoire, ne suit pas les recommandations HGVS et la nomenclature c.1675_1683del9, rapportée par 1 laboratoire, est incorrecte. Concernant les références protéiques: les nomenclatures p.(Val559_Glu561delValValGlu) et p.Val559_Glu561del, rapportées par 5 laboratoires, ne sont pas recommandées 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 v2". Concernant les classifications cliniques, le résultat attendu pour ce variant est la classification Tier I.

Consensus des variants à ne pas rapporter

KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del)

KIT NM_000222.2 c.1673_1681del p.(Lys558_Glu561del) (Fréquence allélique médiane: 51.6 %)	
Classification biologique	N
Pathogène	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier I: Impact clinique avéré	1
Total	1

Commentaires: Un laboratoire n'a pas identifié correctement le variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del) présent dans cet échantillon mais a rapporté le variant KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del). Il s'agit d'une erreur d'identification du variant au niveau de la référence protéique. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant correspondent aux classifications attendues pour le variant p.(Val559_Glu561del): pathogénique et Tier I.

KIT NM_000222.2; c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA

variant KIT NM_000222.2; c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA (Fréquence allélique médiane: 26.79 %)	
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III: Impact clinique indéterminé	1
Total	1

Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant KIT NM_000222.2; c.2361+72dup (M.i.), c.2349+72dup; NA. Selon le consensus des variants à ne pas rapporter, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées.

KIT NM_000222.2; c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA

KIT NM_000222.2; c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA (Fréquence allélique médiane: 14.29 %)	
Classification biologique	N
VUS	1
Total	1
Classification clinique	N
Tier III: Impact clinique indéterminé	1
Total	1

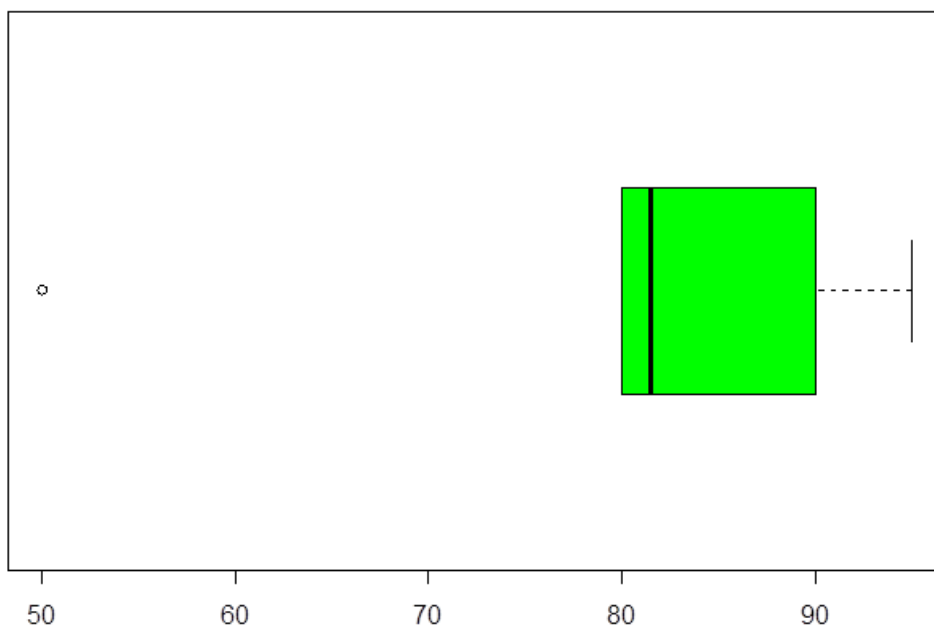
Commentaires: Dans cet échantillon, seul un laboratoire a identifié le variant KIT NM_000222.2; c.2361+71_2361+72dup (M.i.), c.2349+71_2349+72dup; NA. Selon le consensus des variants à ne pas rapporter, ce variant ne doit pas être signalé. Les classifications biologiques et cliniques pour ce variant ne sont pas évaluées.

Analyse des conclusions

Informations types reprises dans la conclusion générale par au moins 2 laboratoires	Informations spécifiques au cas 3	Laboratoires
Traitement	Indication de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase	17
	Réponse potentiellement réduite au traitement de deuxième ligne: sunitinib	2
Pronostic	Variant de pronostic défavorable	7
Informations sur les gènes testés	Délétion détectée dans l'exon 11 du gène KIT	15

Analyse du pourcentage de cellules tumorales sur les lames transmises

Le pourcentage de cellules tumorales transmis par les participants pour cet échantillon est compris entre 50 et 95% avec une moyenne située à 83%.



Min	P25	Median	P75	Max	SD
50	80	81.5	90	95	7.41

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%)	18
2/3 (66,67%)	1
Taux de réussite total: 56/57 (98,25%)	

Consensus des variants à ne pas rapporter

Cinq variants ont été rapportés par moins d'un tiers des participants.

- Pour l'échantillon NGS-2020-3, un laboratoire a rapporté le variant KIT NM_000222.2; c.1673_1681del; p.(Lys558_Glu561del) à la place du variant KIT NM_000222.2; c.1676_1684del; p.(Val559_Glu561del). La séquence d'ADNc au niveau du variant est correctement alignée dans les fichiers bam. Cependant, nous avons identifié une erreur dans la description du variant au niveau protéique.
- 4/5 variants du consensus à ne pas rapporter ont été rapportés par le même laboratoire.

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%)	14
2/3 (66,67%)	4
1/3 (33,33%)	1
Taux de réussite total - classifications biologiques : 51/57 (89,50%)	
Classifications cliniques **	
3/3 (100%)	17
2/3 (66,67%)	2
Taux de réussite total - classifications cliniques : 55/57 (96,49%)	

*Les classifications pour le variant à ne pas rapporter KIT p.(Lys558_Glu561del) sont comptabilisées dans les taux de réussite.

**Les résultats « non recommandés mais acceptables » sont considérés comme réussis.

3. ANNEXE

3.1. Aperçu des conclusions cliniques

Ces données ont été extraites à partir des réponses faites sur le site internet <https://qml.wiv-isp.be/NGS/20201/>. 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-2020-1

<p>• NRAS [NM_002524.4: c.182A>G p.(Gln61Arg)] [VAF: 50.98%] [TIER 1]: Somatic mutations in NRAS have been found in approximately 13–25% of all malignant melanomas. The result of these mutations is constitutive activation of NRAS signaling pathways. NRAS mutations are found in all melanoma subtypes, but may be slightly more common in melanomas derived from chronic sun-damaged (CSD) skin. Currently, there are no direct anti-NRAS therapies available. NRAS Q61 mutations have been found in multiple myeloma, gastrointestinal stromal tumors, melanoma, and others. A melanoma patient harboring a mutation at this locus responded to treatment with the alkylating agent temozolomide (PMID: 21576590). However, in colorectal cancer patients, mutations at this locus have been shown to confer resistance to cetuximab. The prognostic impact of mutations at this locus is currently under study. VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. No variants in KIT and BRAF to be reported.</p>
<p>De aanwezigheid van NRAS mutatie p.(Gln61Arg) in deze patiënt is geassocieerd met een verhoogde respons op anti-MEK therapie en een slechtere prognose. Verder zijn er meerdere studies waarbij verhoogde resistentie tegen anti-BRAF therapie gemeld werd. Er werden geen mutaties gedetecteerd in BRAF en KIT.</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. Er werd wel een mutatie gedetecteerd in NRAS. Somatische mutaties in NRAS werden aangetoond in ~13-25% van alle maligne melanomen. Het resultaat van mutaties in codon 12, 13 of 61 is een constitutieve activatie van de NRAS signaalcascade. NRAS mutaties worden aangetroffen in alle melanoma subtypes, maar zijn iets meer voorkomend in melanomen ten gevolge van chronisch cumulatieve zonblootstelling. Op dit moment zijn geen geregistreerde anti-NRAS therapieën beschikbaar. NRAS mutaties zijn meestal mutually exclusive met BRAF mutaties.</p>
<p>Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren en de tyrosine kinase inhibitor imatinib kan NIET worden aangetoond.</p> <p>De predictieve/prognostische betekenis van de hotspotmutatie c.182A>G (p.(Gln61Arg)) in NRAS is op heden onvoldoende gekend maar wordt uitvoerig bestudeerd (Dummer et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol 2017).</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>Des études cliniques sont en cours pour démontrer l'impact thérapeutique des mutations NRAS dans les mélanomes.</p>
<p>Présence de cellules porteuses du variant p.(Gln61Arg) (p.(Q61R)) dans le gène NRAS. Ce variant (rs11554290) est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM584) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie. Binimetinib has evidence of efficacy in patients with NRAS Q61R in melanoma. Recommended for NRAS mutated tumors that have progressed after prior immune checkpoint inhibitor therapy (category 2B). https://www.mycancergenome.org/content/alteration/nras-q61r/ https://www.oncokb.org/gene/NRAS NCCN Clinical Practice Guidelines in oncology. Cutaneous melanoma. Version 1.2020.</p>
<p>Er werd een NRAS(NM_002524.4):c.182A>G (p.(Gln61Arg)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 3. De aanwezigheid van deze specifieke variant in melanoma heeft mogelijk klinisch belang (tier II) en geeft mogelijks een verhoogde sensitiviteit voor MEK inhibitor binimetinib (PMID: 24895460, 23414587 (fase II) en 28284557 (fase III)). Daarnaast is deze variant mogelijks ook geassocieerd met een slechtere prognose (PMID: 28860801). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen BRAF en KIT.</p>
<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.</p> <p>De pathogene variant c.182A>G p.(Gln61Arg) werd gevonden in het NRAS gen exon 3 dat wordt geassocieerd met een resistentie voor BRAF inhibitoren (PMID: 23569304) en met een waarschijnlijke gevoeligheid voor MEK-inhibitor (Binimetinib) (PMID: 28284557) ; Clinical trials met Selumetinib (PMID: 22105174; PMID: 23406027)</p>

Er werd een pathogene mutatie in het NRAS gen geïdentificeerd, NRAS c.182A>G (p.(Gln61Arg)). Dit is een recurrente mutatie in de context van melanoom, die tot activatie van oncogene signaalwegen leidt (PMID 28860801). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I). De aanwezigheid van deze mutatie kan resulteren in gevoeligheid voor behandeling met MEK1/2 kinase inhibitoren (PMID 28284557). Ook zou het voorkomen van een NRAS mutatie in melanoom geassocieerd zijn met een ongunstiger tumorbiologie en slechtere overleving (PMID 21615881 en 22180178). De afwezigheid van een BRAF Val600 mutatie en de afwezigheid van een KIT mutatie impliceert dat bij deze patiënt een behandeling met BRAF inhibitoren of KIT inhibitoren niet zinvol is (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: cutaneous melanoma, version 1.2020).

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 activerende NRAS mutatie in exon xx teruggevonden. Het is voorlopig nog onduidelijk in hoeverre dit een definitieve prognostische of predictieve waarde heeft.

Er werden geen mutaties gedetecteerd in het KIT gen.

Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.

In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 3 van het NRAS gen: c.182A>G (p.(Gln61Arg)) (VAF 49,8 %).

Tier I: Significant klinisch belang

Deze gekende driver mutatie in NRAS is bij melanomen geassocieerd met een ongunstige prognose. Een therapeutisch respons op MEK inhibitor therapie (zoals binimetinib) werd beschreven. Gezien de afwezigheid van een BRAF V600 mutatie, heeft deze patiënt waarschijnlijk geen baat BRAF-targeted therapie.

Bron:

<https://www.mycancergenome.org>

<https://ckb.jax.org>

PMID 21615881, PMID 22180178, PMID 30154648

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:

- NRAS pathogene variant

De aanwezigheid van een activerende NRAS variant wordt in het algemeen geassocieerd met een mogelijke respons op MEK inhibitor behandeling waaronder binimetinib in melanoom, maar kan daarnaast resistentie geven aan BRAF inhibitor behandeling (Dummer et al. Lancet Oncol 2017, Nazarian et al. Nature 2010).

Absence de mutation activatrice BRAF associées avec une augmentation de la sensibilité aux inhibiteurs BRAF.

Présence d'une mutation activatrice (Q61R) au niveau du gène NRAS.

Des études pré-cliniques suggèrent une association entre les mutations activatrices NRAS et une sensibilité aux inhibiteurs MEK.

Dans ce prélèvement de mélanome cutané, infiltré à 80% par des cellules néoplasiques, dont le stade, les caractéristiques moléculaires et l'historique thérapeutique n'ont pas été précisés, présence d'une mutation NRAS c.182A>G, p.Gln61Arg pathogénique et d'impact clinique avéré (Tier I) de fréquence allélique 53%. Absence de variant BRAF au codon V600 et KIT détectés avec la technique NGS utilisée. Les mutations NRAS, de pronostic défavorable, sont retrouvées dans 15% des mélanomes cutanés et sont décrites comme prédictives de résistance lorsqu'elles sont détectées dans le décours de bihérapies anti-BRAF /anti-MEK combinées de mélanomes métastatiques BRAF V600 positifs. A noter que ce variant NRAS a été détecté dans les naevi pigmentés géants en tant que mutation constitutionnelle en mosaïque et dans les mélanomes neurocutanés.

Possibilité d'inclusion de ce patient dans une étude clinique de phase I (KULeuven) combinant anti-MEK/ anti-CDK4 et CDK6 et un anti-ERK.

Présence d'un variant probablement pathogénique d'impact clinique indéterminé (Tier III) FBXW7 c.1652dupG, p.(Ile552Tyrfs*9) de fréquence allélique 31%.

Un variant ALK d'impact clinique indéterminé (VUS) c.121C>T p.Arg41Trp 51% est mentionné à titre d'information.

En fonction de la présentation clinique et de l'histoire familiale, ce cas doit être discuté en consultation multidisciplinaire oncologique et dans le cadre d'une consultation en génétique médicale éventuelle.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed. Une mutation pathogénique du type p.(Gln61Arg) (Q61R) a été détectée dans NRAS. 15 à 20% des mélanomes sont porteurs d'une mutation de NRAS. Impact clinique potentiel* : Deux études cliniques de Phase I (Adjei et al. JCO 2008) et de Phase II (Ascierto et al., Lancet Oncol 2013) ont montré une réponse partielle suite à un traitement à base d'inhibiteurs de MEK chez des patients atteints d'un mélanome muté pour le résidu 61 de NRAS. 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.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

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

Er werd wel een NRAS mutatie type Q61R gedetecteerd. Inhibitie van de RAS-gemedieerde signaal transductie pathways (RAF/MAPK en PI3K/AKT) is onderwerp van klinische trials (MEK-inhibitoren, PI3K-inhibitoren).

Een mutatie predictief voor gevoeligheid aan BRAF-inhibitoren en de tyrosine kinase inhibitor imatinib kan NIET worden aangetoond.

Mutaties in NRAS codon 61 zijn recurrent in melanomen. De predictieve/prognostische betekenis van de hotspotmutatie c.182A>G (p.(Gln61Arg)) in NRAS is op heden onvoldoende gekend maar wordt uitvoerig bestudeerd (Dummer et al., 2017 Lancet Oncol, doi: 10.1016/S1470-2045(17)30180-8).

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst.

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

3.1.2. NGS-2020-2

• KRAS [NM_004985.4: c.35G>T p.(Gly12Val)] [VAF: 39.6%] [TIER 1]

KRAS is a gene that encodes one of the several proteins in the epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway that is important in the development and progression of cancer. KRAS can harbor oncogenic mutations that yield a constitutively active protein. Such mutations are found in approximately 30% to 50% of metastatic colorectal tumors and are common in other tumor types. Mutations in the KRAS gene may indicate poor prognosis and poor drug response with therapies targeted to EGFR. The absence of a KRAS mutation predicts a greater likelihood of response to EGFR-targeted therapies and improved survival with such treatment. The relevant KRAS mutation is in one of five codons (12, 13, 61, 117 or 146). The presence of KRAS mutations in codon 12, 13 or 61 is associated with a high likelihood of resistance to therapies targeting EGFR. In addition, mutations at codons 117 and 146 may also be associated with reduced response to EGFR-targeted therapies. Results should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical findings. Drug resistance: Panitumumab Cetuximab.

No variants in NRAS and BRAF to be reported.

There is also a pathogenic heterozygous TP53 variant. However if only the genes KRAS, NRAS, and BRAF should be looked at, not sure if you should report this.

• TP53 [NM_000546.5:c.818G>A p.(Arg273His)] [VAF: 54.59%] [PATHOGENIC]

VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. Germline pathogenic variants leading to the diagnosis of a hereditary cancer syndrome that has an established guideline for clinical surveillance are here reported with recommendation of cancer genetic counseling.

In gemetastaseerde setting is de aanwezigheid van mutatie p.(Gly12Val) geassocieerd met resistentie tegen anti-EGFR therapie. Er werden verder geen mutaties gedetecteerd in NRAS en BRAF.

Er werd een mutatie in KRAS aangetoond. De aanwezigheid van deze mutatie in mCRC betekent in het algemeen resistentie aan anti-EGFR antistoffen.

De aanwezigheid van de klinisch relevante mutatie c.35G>T (p.(Gly12Val)) in KRAS is geassocieerd met resistentie aan anti-EGFR therapieën.

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.

Interprétations cliniques : Dans les adénocarcinomes colo-rectaux, la présence de mutations dans le gène KRAS est associée à une diminution de la sensibilité aux thérapies anti EGFR. Référence: College of American Pathologists (CAP, Biomarker testing for Carcinoma of the Colon and Rectum, décembre 2014).

Présence de cellules porteuses du variant p.(Gly12Val) (p.(G12V)) dans le gène KRAS.

Ce variant (rs121913529) est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM520) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie.

According to NCCN, mutations in KRAS have been associated with reduced responsiveness to EGFR TKI therapy (afatinib, dacomitinib, erlotinib, gefitinib, osimertinib) and also to cetuximab and panitumumab.

<https://www.mycancergenome.org/content/alteration/kras-g12v/>

<https://www.oncokb.org/gene/KRAS>

Er werd een KRAS(NM_004985.4):c.35G>T (p.(Gly12Val)) pathogene missense variant geïdentificeerd in exon 2.

De aanwezigheid van deze variant in colorectaal adenocarcinoom heeft significant klinisch belang (tier I) en geeft in het algemeen resistentie tegen EGFR monoclonale antilichamen (NCCN guidelines colon cancer v2.2020 en PMID: 26438111). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in de genen NRAS en BRAF.

De pathogene variant c.35G>T p.(Gly12Val) werd gevonden in het KRAS gen exon 2 dat wordt geassocieerd met een resistentie voor EGFR-TKI's en anti-EGFR antibodies. (PMID: 18946061; PMID: 20619739; PMID: 18316791; PMID: 20921465; PMID: 24024839)

Er werd een pathogene mutatie in het KRAS gen geïdentificeerd, KRAS c.35G>T (p.(Gly12Val)). Dit is een recurrenente mutatie in colorectaal carcinoom, die tot een constitutief actief KRAS eiwit leidt. Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): de aanwezigheid ervan resulteert in resistentie tegen behandeling met anti-EGFR monoklonale antilichamen (PMID 18202412 en 24024839; National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clinical practice guidelines in oncology: colon cancer, version 2.2020).

In het onderzochte staal werd een activerende KRAS mutatie in exon 2 teruggevonden. Verschillende studies hebben aangetoond dat patiënten met tumoren met activerende mutaties in exonen 2, 3 en 4 van KRAS of NRAS geen baat zullen hebben bij anti-EGFR therapie (Douillard et al., 2013). Er werden geen mutaties gedetecteerd in het BRAF of NRAS gen.

Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.

In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 2 van het KRAS gen: c.35G>T (p.(Gly12Val)) (VAF 34,2%). Tier I: Significant klinisch belang Deze activerende mutatie in KRAS wordt geassocieerd met een slechte respons op anti-EGFR therapie (zoals panitumumab en cetuximab). Voorts zijn KRAS mutaties bij colorectale carcinomen gecorreleerd met een ongunstige prognose. Bron: <https://www.mycancergenome.org> PMID 30854087, PMID 26347132, PMID 26275951

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:
- KRAS pathogene variant

De aanwezigheid van een activerende variant in KRAS wordt in het algemeen geassocieerd met een slechte respons op anti-EGFR monoklonale antilichaam behandeling in gemetastaseerde colorectale tumoren (Douillard et al. NEJM 2013).

Une mutation activatrice (G12V) au niveau du gène KRAS a été détectée chez ce patient.
La réponse de ce patient a une thérapie ciblée d'anticorps monoclonaux contre EGFR est peu probable.

Il n'y a pas de traitements approuvés par la FDA pour les patients avec un cancer du colon avec une mutation activant RAS. Cependant, des données cliniques préliminaires suggèrent que les cancers mutés KRAS peuvent être sensible aux inhibiteurs ciblant MEK ou ERK.

Dans ce prélèvement d'adénocarcinome colorectal pT3N2a infiltré par 70% de cellules tumorales et dont l'historique thérapeutique, les caractéristiques moléculaires n'ont pas été précisées, présence d'un variant pathogénique KRAS c.35G>T, p.Gly12Val d'impact clinique potentiel (Tier II) pour les CCR stades III et détecté avec une fréquence allélique de 39%. Les mutations "RAS" sont considérées comme étant de mauvais pronostic dans les CCR stades III mais sans consensus absolu. Aucun variant pathogénique BRAF ou NRAS n'a été observé avec la technique NGS utilisée. Le statut MSI doit être également évalué en fonction de l'histoire clinique et familiale car le pronostic sera modifié en fonction du résultat MSI-H.

Présence également d'un variant pathogénique PIK3CA c.1633G>A, p.Glu545Lys de fréquence allélique 44% dont l'impact clinique est encore indéterminé (III) en tant que cible thérapeutique anti-mTOR dans les cancers colorectaux et pouvant servir de critères d'inclusion dans des études cliniques faisant usage d'acétylsalicylique.

Un variant NOTCH1 c.4598A>G p.Asp1533Gly de fréquence allélique de 40% d'impact clinique indéterminé (VUS) est mentionné à titre d'information.

Remarque: étant donné que le statut métastatique du patient n'est pas connu et s'il s'avère finalement stade IV dans le bilan d'extension, alors ce variant KRAS G12V est de pronostic défavorable et prédictif de résistance aux traitements par anti-EGFR dans les cancers colorectaux métastasés. Le statut MSI est dès lors indispensable à connaître étant donné que lorsque ces mutations sont associées à un statut de déficience dans les gènes de réparation (MSI-High) une réponse durable thérapeutique avec des checkpoint inhibiteurs peut être obtenue.

En fonction de la présentation clinique et de l'histoire familiale, ce cas doit être discuté en consultation multidisciplinaire oncologique et dans le cadre d'une consultation en génétique médicale éventuelle.

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

Une mutation pathogénique du type p.(Gly12Val) (G12V) a été détectée dans KRAS.

Impact clinique avéré* :

La présence de mutations acquises de l'oncogène KRAS a été corrélée avec l'absence de réponse aux inhibiteurs du récepteur à l'EGF (EGFR), dont le panitumumab (Vectibix®) et le cétuximab (Erbix®), chez les patients atteints de cancer colorectal (CCR) métastatique (Lièvre A et al, 2006 ; Tejpar S et al, 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.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Er werd een KRAS mutatie type G12V gedetecteerd. Dit resultaat is voor colorectale carcinomen predictief voor een gebrek aan respons op anti-EGFR therapie.

Een BRAF V600E mutatie, welke prognostisch ongunstig is in colorectale carcinomen, werd evenmin gedetecteerd.

De aanwezigheid van de klinisch relevante hotspot mutatie c.35G>T (p.(Gly12Val)) in KRAS is geassocieerd met resistentie aan anti-EGFR therapieën. Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst. De methode is enkel geoptimaliseerd om SNV's (basepaarsubstituties) en kleine inserties en deleties (indels) te detecteren.

3.1.3. NGS-2020-3

<ul style="list-style-type: none">• KIT [NM_000222.2: c.1676_1684del p.(Val559_Glu561del)] [VAF: 66.22%] [TIER 1] KIT mutations occur in approximately 80% of patients with gastrointestinal stromal tumors. The major region of KIT mutation in GIST is within exon 11, occurring in about 65% of patients. KIT exon 11 mutations are activating mutations and are typically sensitive to treatment with Imatinib (PMIDs: 26040420, 23127174, 19164557). VAF is suggestive of a germline variant. Therefore, it is recommended to check the presence of this variant in a blood sample. No variants in PDGFRA to be reported.• PDGFRA-related fusion variations cannot be detected by this method.
De aanwezigheid van de cKIT deletie p.(Val559_Glu561del) in deze patiënt is geassocieerd met verhoogde progressie-vrije overleving bij tyrosine kinase inhibitoren. Verder is de mutatie geassocieerd met een verminderde prognose. Er werden verder geen mutaties gevonden in PDGFRA.
Er werd door de test een mutatie aangetoond in KIT: dit ondersteunt de diagnose van GIST. De aanwezigheid van dit type mutatie in het KIT gen in tumoraal weefsel betekent een verhoogde sensitiviteit aan tyrosine kinase inhibitoren.
De mutatie c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)) in KIT is recurrent in GIST en 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.
Dans les GISTs, la présence de mutations dans le gène KIT des exons 9,11, 13 et 17, confèrent une sensibilité aux inhibiteurs des tyrosine kinases (TKIs). De plus, les mutations dans l'exon 11 sont associées à une progression plus rapide et à une survie plus courte (valeur pronostique).Référence: College of American Pathologists (CAP, Biomarker testing for Gastrointestinal Stromal Tumor, février 2015).
Présence de cellules porteuses du variant p.(Val559_Glu561del) (p.(V559_E561del) : délétion de 3 acides aminés dans l'exon 11) dans le gène KIT. Ce variant est classé biologiquement comme pathogénique selon les recommandations de Sciensano (COSM1250) et est de signification clinique thérapeutique avérée dans cette pathologie. Sunitinib, imatinib, nilotinib, regorafenib, and sorafenib have evidence of efficacy in patients with KIT mutation in gastrointestinal stromal tumor. https://www.mycancergenome.org/content/disease/gastrointestinal-stromal-tumor/ https://www.oncokb.org/gene/KIT
Présence d'une délétion dans l'exon 11 du gène KIT
Er werd een KIT(NM_000222.2):c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)) vermoedelijk pathogene in frame deletie variant geïdentificeerd in exon 11. De aanwezigheid van dit type variant (exon 11 deletie) in GIST heeft mogelijk klinisch belang (tier II) en is mogelijk geassocieerd met een slechtere prognose (PMID: 27350754). De ESMO guidelines (2018) geven een significante correlatie weer met een verhoogde sensitiviteit voor imatinib (tier I). Een recente studie (PMID: 30792534) verfijnt deze behandeling al naargelang er resistentie varianten ontstaan in KIT met een verhoogde sensitiviteit voor regorafenib (indien imatinib-resistentie wegens extra variant in exon 17 of 18) of voor sunitinib (indien imatinib-resistentie wegens extra variant in exon 13 of 14). Er werden geen (vermoedelijk) pathogene varianten geïdentificeerd in het PDGFRA gen.
De vermoedelijk pathogene variant c.1676_1684del9 p.(Val559_Glu561del) werd gevonden in het KIT gen exon 11 en wordt geassocieerd met een gevoeligheid voor imatinib, Sunitinib en Regorafenib. (PMID: 28196207; PMID: 18955451; PMID: 18955451; PMID: 18235122; PMID: 17046465; PMID: 23177515). De PDGFRA, exon 18 variant c.2525A>T p.(Asp842Val) kon niet worden aangetoond.
Er werd een pathogene mutatie in het KIT gen geïdentificeerd, KIT c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del)). Mutaties in het KIT gen worden in ongeveer 80 % van de gastro-intestinale stromale tumoren gedetecteerd. Een in-frame deletie in exon 11, zoals bij deze patiënt, tast het juxtamembranair domein aan en resulteert in een constitutief actief KIT kinase (PMID 15897563). Deze mutatie heeft een significant klinisch belang (Tier I): gezien de aanwezigheid van deze mutatie kan gevoeligheid aan imatinib en andere KIT inhibitoren verwacht worden (PMID 15897563 en 29846513).
In het onderzochte staal werd een mutatie in exon 11 van het KIT gen teruggevonden. Studies hebben aangetoond dat patiënten met KIT exon 11 mutaties, in vergelijking met patiënten met KIT exon9 mutaties en met wild type KIT, een kortere ziektevrije en totale overleving hebben. Deze tumoren zijn echter het meest gevoelig aan behandeling met imatinib. Patiënten met exon 11 mutaties, hebben minder kans op respons op tweedelijns sunitinib (5% RR; Heinrich et al., 2008). Er werden geen mutaties gedetecteerd in het PDGFRA gen.Coverage van het staal voldoet aan de vooropgestelde criteria.

In het DNA geëxtraheerd uit de tumor van deze patiënt werd een pathogene mutatie gedetecteerd in exon 11 van het KIT gen: c.1676_1684del (p.(Val559_Glu561del) (VAF 64%).

Tier I: Significant klinisch belang

Door de aanwezigheid van een mutatie in KIT exon 11 heeft de patiënt hoogstwaarschijnlijk baat bij een tyrosine kinase inhibitor (zoals imatinib). Voorts is een mutatie in exon 11 van het KIT gen gecorreleerd met een ongunstige prognose.

Bron:

<https://www.mycancergenome.org>

WHO classification of tumours, Digestive system tumours, 5th edition (2019)

PMID 28334365, PMID 26349547

NGS SeqCap solide tumor 69 genpanel:

- KIT exon 11 pathogene variant

De aanwezigheid van een KIT variant in exon 11 wordt in het algemeen geassocieerd met een goede respons op TKI behandeling waaronder imatinib bij GIST patiënten (mycancergenome, NCCN soft tissue sarcoma v2.2018).

Présence d'une délétion dans l'exon 11 du gène cKIT.

Les inhibiteurs KIT et PDGFRA tels que imatinib, sunitinib et regorafenib sont des traitements approuvés par la FDA pour les patients avec des tumeurs stromales gastrointestinales (GIST) avec des mutations dans l'exon 11 du gène cKIT.

La macrodissection n'a pu être effectuée sur ce prélèvement car nous n'avons reçu que 3 lames blanches. Il n'y a donc pas eu de coloration HE.

Dans ce prélèvement de tumeur gastro-intestinale stromale (GIST) infiltré à 90% de cellules tumorales, présence majoritaire d'un variant probablement pathogénique KIT d'impact clinique avéré (Tier I), c.1673_1681delAGGTTGTTG, p.Val559_Gly561del observé avec une fréquence allélique de 62% avec la technique NGS utilisée. Les mutations KIT de l'exon 11 sont prédictives de sensibilité au traitement par inhibiteur de tyrosine-kinase (Imatinib) en adjuvant après résection ou en palliatif dans les cas avancés de GIST (en l'absence de mutations de résistance PDGFRA ou KIT et en présence d'expression SDHB). A noter que ces mutations de l'exon 11 sont également considérées comme étant de pronostic défavorable.

Remarque: à noter la présence de variants minoritaires pathogéniques KIT de très faible fréquence allélique mais non décrits comme étant prédictifs de résistance associée. Cela traduit vraisemblablement l'hétérogénéité de la tumeur.

Nous avons recherché par séquençage à haut débit des mutations dans plusieurs régions d'intérêt selon les indications de la commission ComPerMed. Une délétion a été détectée dans l'exon 11 de KIT. L'exon 11 de KIT est muté dans environ 70% des GIST. Impact clinique avéré*: La présence de mutations acquises de l'exon 11 du gène c-KIT est associée à une survie globale et une survie sans rechute raccourcie par rapport aux patients sans mutation ou avec mutation de l'exon 9 de KIT. Toutefois, ces mutations sont associées à une sensibilité élevée à l'imatinib et la durée médiane de bénéfice clinique a été rapportée à 23 mois. Les mutations de l'exon 11 de c-KIT sont considérées comme représentant un facteur pronostic négatif, tout spécialement les délétions entreprenant les codons 557 et 558 du fait de l'intensité du signal prolifératif qu'elles induisent. De plus, les mutations de l'exon 11 sont moins susceptibles de répondre aux inhibiteurs de seconde génération tel que le sunitinib (voir Heinrich et al., 2008). Chez les patients présentant une mutation de l'exon 9 de KIT, il est recommandé de porter la dose d'imatinib à 800 mg (Corless, 2007). 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.chu.ulg.ac.be/jcms/c_9635594/fr/informations-pratiques-relatives-aux-analyses

Met Next Generation Sequencing werd een pathogene KIT exon 11 mutatie gedetecteerd. KIT mutaties komen voor in +/- 85 % van de GIST tumoren. Het voorkomen ervan in GIST is predictief voor een goede respons op imatinib (en andere TKI's). Patiënten met in het bijzonder KIT exon 11 mutaties vertonen de langste (progressie-vrije) overleving onder imatinib therapie.

De mutatie c.1673_1681del (p.(Lys558_Glu561del)) in KIT exon 11 is recurrent in GIST en is geassocieerd met gevoeligheid aan de tyrosine kinase inhibitor imatinib.

Er worden geen varianten gedetecteerd in de overige onderzochte genen, die zijn opgenomen in de NGS (Next Generation Sequencing) overeenkomst.

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

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 **IZI > 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

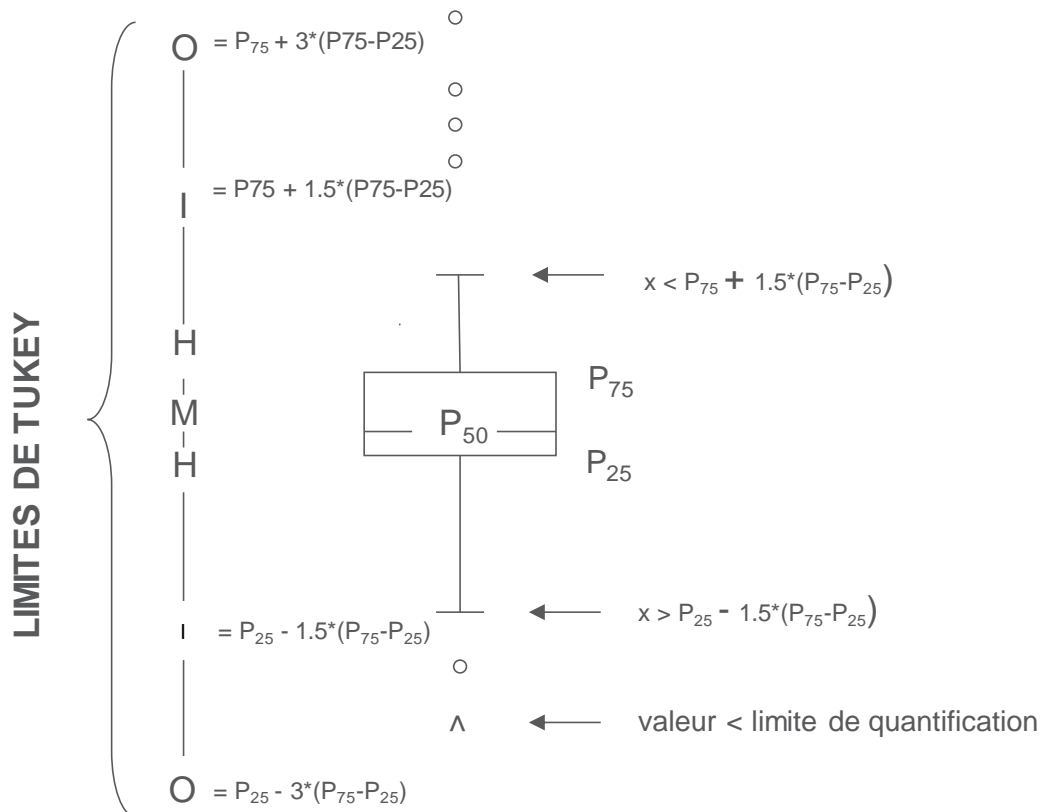
- 1) Brochure d'information sur les programmes d'évaluation externe de la qualité pour les laboratoires cliniques (Brochure d'information générale sur l'évaluation externe).
- 2) Brochure statistique (Procédure générale de calcul statistique mis au point par le professeur Albert).
- 3) Traitement des 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 2020.

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.