

PRACTICAL CASES

PRACTICAL ASPECTS

Dr Maria-Dolores Martin Martinez
IPG (Gosselies)

BRCA testing in prostate cancer at IPG: current workflows

Tumour BRCA testing at IPG	Germline BRCA testing at IPG
<p><u>PATHOLOGY department</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Processing different types of tissues (Biopsy/TURP/prostatectomy/metastasis) Microscopy analyses and reports <p>Mean time to result: 1 to 2 weeks (Pathology reports)</p> <ul style="list-style-type: none"> NGS Request after MOC (Oncologist/Urologist) Pathologist selecting NGS samples (Guidelines) <p>Mean time to select: 1-3 days to pre-select samples</p>	<p><u>GENETIC department</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Request after MOC (Oncologist/Urologist) Blood sample (patient at IPG/ sample collection)
<p><u>GENETIC department</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Scraping slides from selected tumour after selection from pathologist (new fresh slides: HE to select tumour/pathologist) NGS HRR somatic panel test: Archer custom panel (Archer = NGS amplicon based, specific and non-specific primer, allows small reads amplification even if DNA not very good quality) Focus on BRCA1/2 analysis (treatment approval/reimbursement testing) <p>Mean time to result: 3-4 weeks inside lab, more if outside lab (validation by geneticist can take time)</p>	<p><u>GENETIC department</u></p> <ul style="list-style-type: none"> NGS HRR germline panel test: Roche HyperCap EZ custom panel (Panel NGS capture based) 40 gene panel (hereditary risk/treatment) Needs follow-up: family genetic consultation <p>Mean time to analytical result: 6-8 weeks after blood sample receipt (validation by geneticist can take time)</p>

PROSTATE BRAC-Testing

SOMATIC NGS

(H:73 ans clinical mCRCP)

• Biopsie: non connu

• **PRELEVEMENT** : Tumeur, prélevé le 11/03/2021, reçu le 11/03/2021.

INDICATION

• Antécédent personnel de cancer de la prostate. Recherche de mutation somatique des gènes *BRCA1* et *BRCA2* en vue d'un traitement aux inhibiteurs de PARP.

ANALYSE DE L'ADN

• Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* ont été séquencés et analysés au départ de l'ADN extrait de la tumeur fixée et enrobée en paraffine (FFPE). La zone tumorale a été sélectionnée par un pathologiste et contient au moins 10% de cellules cancéreuses. Le séquençage a été effectué sur un séquenceur Illumina (Miniseq ou Nextseq) après amplification de l'ADN et préparation de bibliothèques avec le kit VariantPlex® HHR Kit for Illumina® de Archer DX. Les séquences des gènes *BRCA1* et *BRCA2* ont été analysées à l'aide du logiciel Archer DX, cette analyse permet la détection de variations ponctuelles (SNV).

• Limite de détection des variants : 10 % avec une profondeur minimale de 100x sur l'entièreté des exons codants.

• Séquences de référence utilisées : *BRCA1* : NM_007294.3, *BRCA2* : NM_000059.3

RESULTAT

• **Présence du variant pathogène c.3774_3775del p.(Ile1258Metfs*6) du gène BRCA2 identifié à une fraction allélique de 58%.**

• Ce variant avait été précédemment identifié chez votre patient au niveau germlinal (cf. 20GR012816).

CONCLUSION

• **Votre patient est porteur d'un variant pathogène du gène BRCA2.** Il remplit donc la condition génétique nécessaire permettant l'obtention du remboursement d'un traitement aux inhibiteurs de PARP.

• Veuillez noter que le variant identifié a également été retrouvé au niveau de l'ADN extrait depuis le prélèvement sanguin (cf. 20GR012816), confirmant un portage germlinal de celui-ci et signifiant que votre patient est porteur d'un syndrome de prédisposition héréditaire au cancer. Une prise en charge adaptée est recommandée de même qu'une consultation de conseil génétique.

PROSTATE BRAC-Testing

Germline NGS

(H:73 ans clinical mCRCP)

• **PRELEVEMENT** : Sang périphérique, prélevé le 08/10/2020, reçu le 12/10/2020. Votre référence : 0004444150. (

INDICATION

- Recherche de prédisposition héréditaire au cancer. Antécédent personnel de cancer de la prostate métastasé.
- Analyse réalisée en vue d'un traitement aux inhibiteurs de PARP (Olaparib).

ANALYSE DE L'ADN

- Un panel de gènes impliqués dans les cancers héréditaires (en particulier du sein, de l'ovaire et du côlon) a été analysé avec un kit 'custom' de la société Roche (SeqCap EZ). Cette analyse basée sur une capture des gènes d'intérêt suivie d'un séquençage haut-débit (Illumina MiSeq ou NextSeq) permet de détecter les mutations ponctuelles et les réarrangements intragéniques de plus grande taille (délétion/duplication) des régions codantes. La liste exhaustive détaillant les gènes analysés est reprise ci-dessous*.
- Les mutations pathogènes en rapport avec le tableau clinique et dont le rôle est démontré ont été confirmées par séquençage de Sanger ou MLPA. Les autres variants éventuels sont conservés à des fins de recherche et seront réévalués ultérieurement.

RESULTAT

- **Hétérozygotie pour la mutation pathogène c.3774_3775del p.(Ile1258Metfs*6) du gène BRCA2 (variant de classe 5 - séquence de référence NM_000059.3).** Cette délétion de deux nucléotides entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon de terminaison prématuré.

CONCLUSION

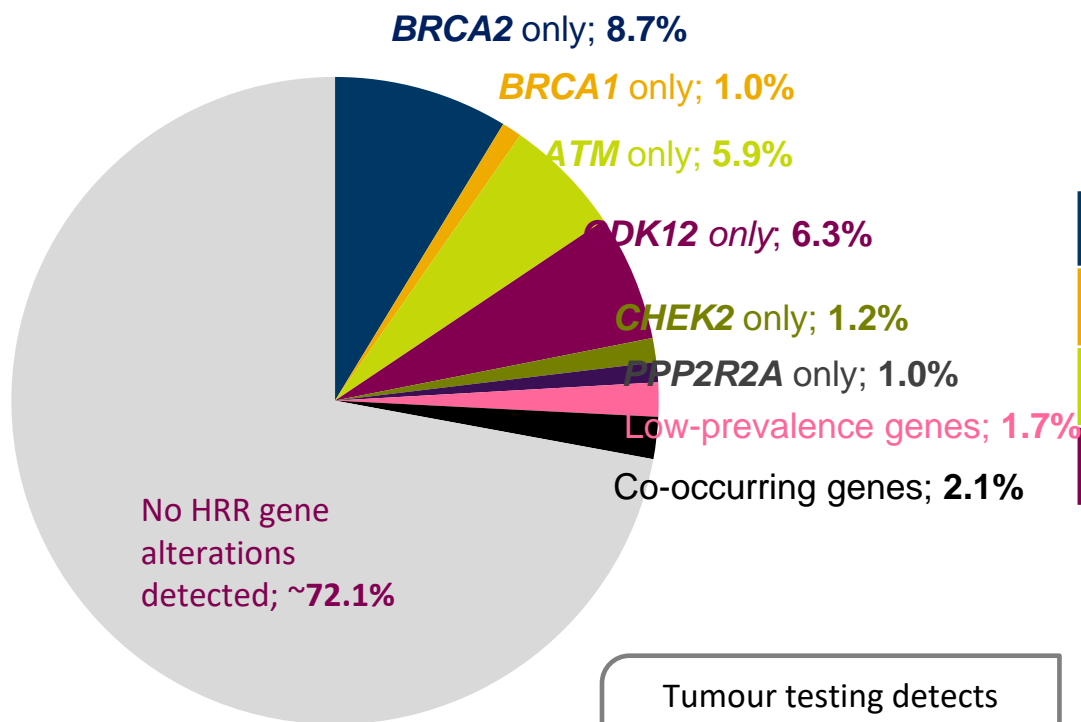
- Votre patient est porteur d'une prédisposition **héréditaire au cancer associée au gène BRCA2**. Ce résultat signifie qu'il remplit la condition génétique permettant l'obtention d'un remboursement d'un traitement aux inhibiteurs de PARP.
- La prédisposition héréditaire associée au gène BRCA2 se traduit par une majoration du risque de développer un cancer de la prostate et pour les femmes porteuses, un très haut risque de développer un cancer du sein et/ou de l'ovaire. C'est pourquoi une consultation de conseil génétique à la famille est indiquée.
- Un diagnostic présymptomatique peut être proposé (avec encadrement psychologique au préalable) aux apparentés à risque à partir de 18 ans. Par ailleurs, il serait utile de tester les membres de la famille ayant déjà présenté un cancer car ils courent un risque important de développer une autre tumeur s'ils sont porteurs de la mutation. Un suivi adapté pourrait leur être proposé.

• (*) Les transcrits canoniques des gènes suivants ont été utilisés (GRCh38) : APC, ATM, BAP1, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, GREM1, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6, MUTYH, NBN, NTHL1, PALB2, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, SCG5, SMAD4, STK11, TP53. L'entièreté des exons codants et des régions introniques de -14 à +6 sont séquencés à une profondeur minimale de 50 x.

• Résultats confidentiels. Ce compte-rendu ne doit pas être remis tel quel à la famille mais expliqué au cours d'une consultation de conseil génétique.

BRCA2 is the most common HRRm in prostate cancer and ~50% are derived from germline origin^{1–6}

Prevalence of **tumour** HRRm identified from screened mCRPC population in PROfound (N=2,792 patients successfully sequenced)²



Prevalence of **germline** HRRm in patients with early or advanced prostate cancer

HRRm	Prevalence range
BRCA2 ^{3,4}	3.5–5.3%
BRCA1 ^{3,5}	0.9–1.3%
ATM ^{4,6}	0.3–2.0%
PALB2 ^{3,5,6}	0.4–0.6%

Tumour testing detects both somatic and germline variants

Figure adapted from de Bono J et al. *Ann Oncol.* 2019²

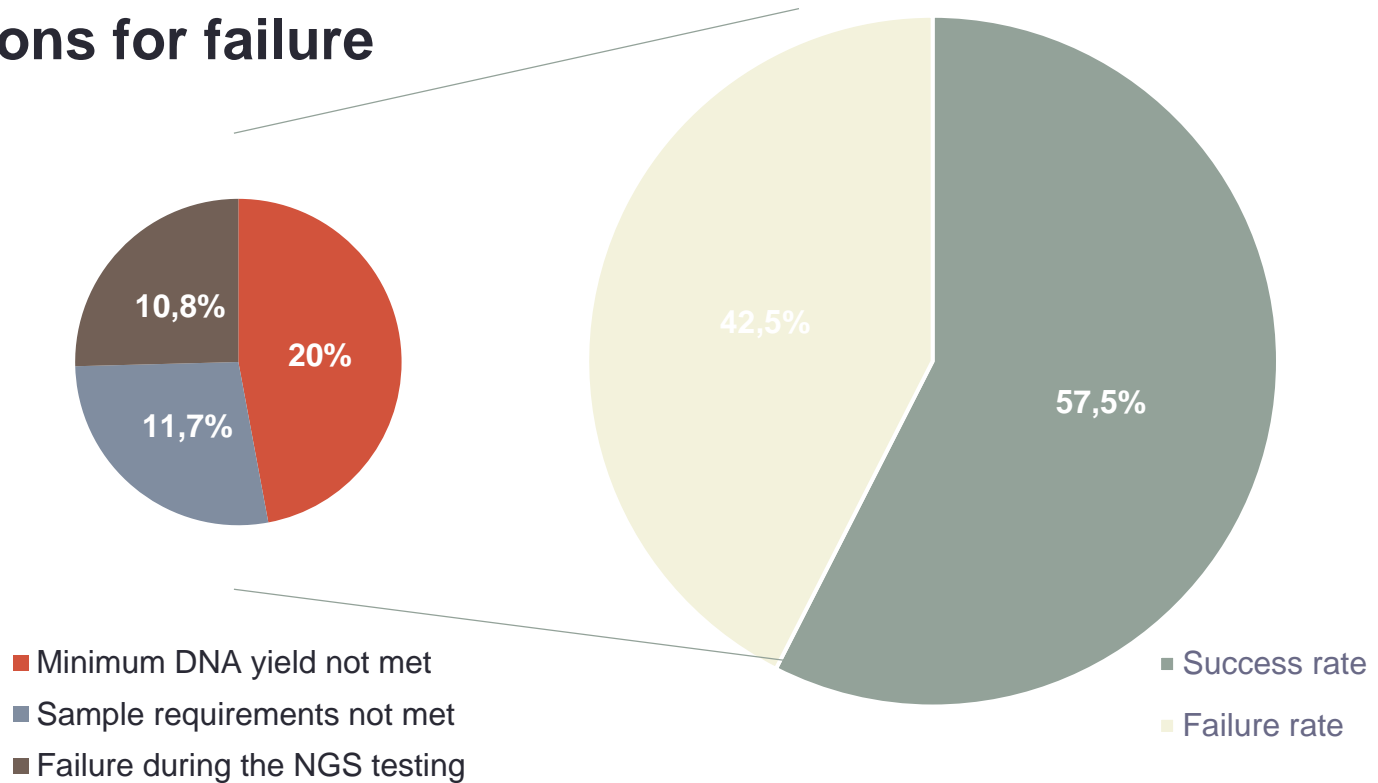
HRR=homologous recombination repair; HRRm=homologous recombination repair mutation; mCRPC=metastatic castration-resistant prostate cancer.

1. Lang SH, et al. *Int J Oncol.* 2019;55(3):597–616. 2. de Bono J, et al. *Ann Oncol.* 2019;30(suppl_5):v325-v355 (abst 847PD) associated poster; 3. Pritchard CC, et al. *N Engl J Med.* 2016;375:433–453; 4. Na R, et al. *Eur Urol.* 2017;71:740–747; 5. Nicolosi P, et al. *JAMA Oncol.* 2019;5:523-528; 6. Annala M, et al. *Eur Urol.* 2017;72:34–42

A failed result was reported in 2,066 (42.5%) of the 4,858 unique samples¹ **PROfound Study**

Success and failure rates of all unique samples

Reasons for failure





Flow chart of the processing stage at which samples failed and the proportion failing at each stage¹



- **11.7%** (569/4858) of samples failed to meet pathology requirements
- **22.7%** (972/4289) of samples that passed pathology review failed to meet DNA input requirements
- **4.0%** (133/317) of samples that met the DNA input requirements failed to meet quality check requirement for library construction/hybrid capture
- **11.7%** (373/3184) of samples that completed hybrid capture failed to meet sequencing/computational analysis quality check requirements
- **0.4%** (19/4858) of samples submitted failed for other exceptional reasons (e.g. laboratory error)

1. Hussain M, et al. *Clin Cancer Res* 2022 [Online ahead of print]

Almost a third of tissue samples fail in mCRPC¹

Test failures are primarily due to:

Insufficient tumour content for genomic analysis¹

Limited amounts of tumour tissue collected for diagnostic biopsy¹

Suboptimal DNA quality/yield due to DNA degradation during storage¹

Non-pooling of biopsies and **non-use of surgical resection specimens**²

Exhaustion of archival diagnostic material during the histological diagnosis¹

Opportunities exist to optimise sample collection and processing

1. Collection and handling of biopsy samples¹

Key recommendations for collection of biopsy samples

- **Diagnostic pathologist** identifies suitable sample
- **Adhere to pathology protocols** to prevent archived blocks becoming unusable for future use
- **Germline testing** of blood samples or **liquid biopsy** with ctDNA analysis can be used when no suitable sample is available
- **Consider re-biopsy** only if all other approaches fail

Key recommendations for handling biopsy specimens

- **Collect FFPE blocks** and **clearly label** to avoid tissue exhaustion and enable easy retrieval
- **Ensure pathologist awareness** of potential future use of specimens so **minimal amount is used for histopathology** (including immunohistochemistry)
- **Retain material from biopsies** containing a significant amount of confirmed tumour material
- **Embed multiple core needle biopsies in one FFPE block** rather than pooling slides from different blocks to provide a DNA sample
- **Consider DNA extraction from tissue samples at time of diagnosis**

1. Consider the following factors when selecting the optimal sample type

1. Tumour size/collection methods¹

- **Surgical specimens** may provide large amount of material, but a small tumour area or low tumour cellularity may not provide sufficient DNA
- **Biopsy samples** can provide good quality DNA as processing/fixation steps can be carefully controlled
- **Pooling of multiple cores** from one biopsy may increase DNA yield

2. Age of sample¹

- **Freshly collected tumour tissue** may contain better quality DNA, but may be less practical in clinical settings
- **DNA extracted from FFPE samples may be subject to degradation** and chemical modification over time
- **~50% of samples archived for up to >10 years provided successful test results** when fixation and storage conditions were optimised²

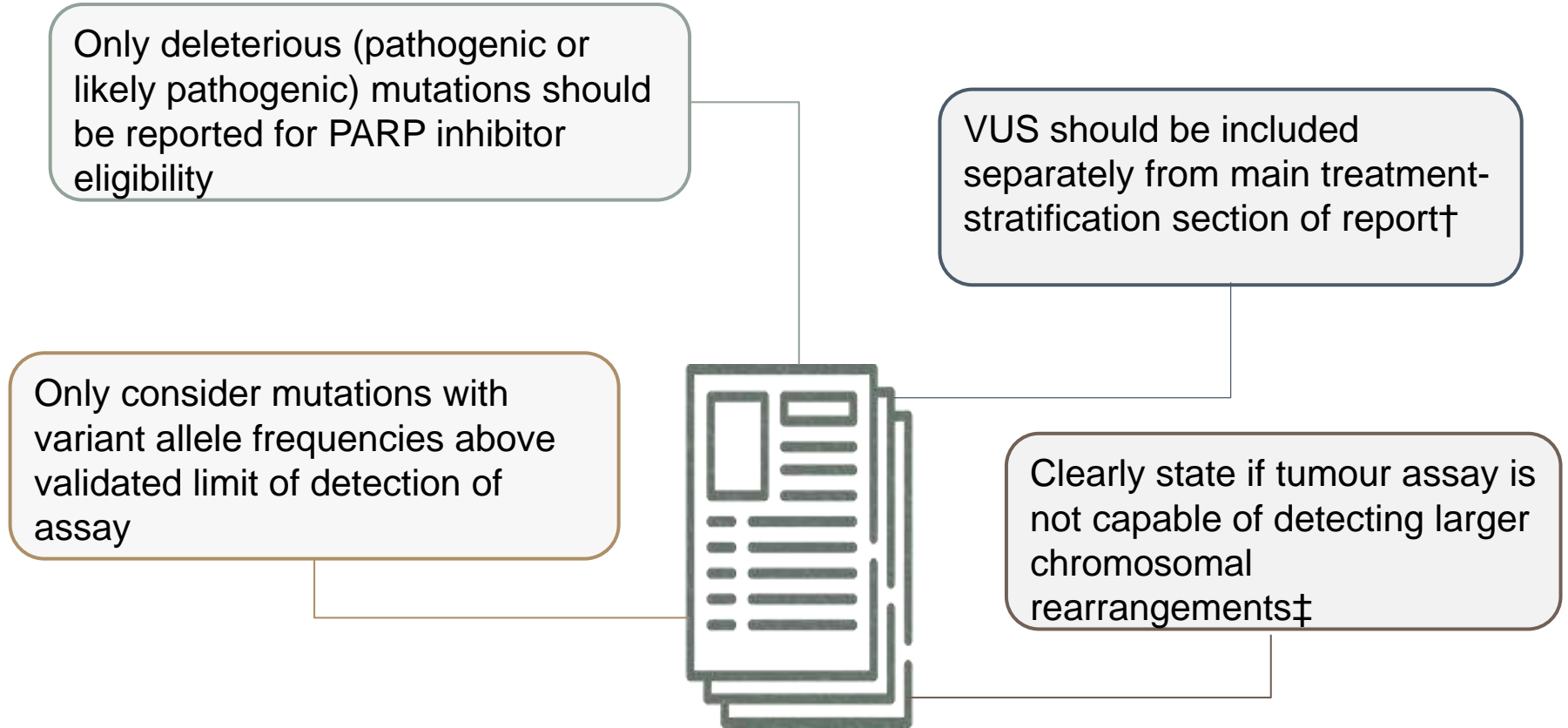
3. Organ site

- **Collection of metastatic sites such as osteoblastic bone lesions may present issues** such as bruising or bleeding, infection or fractures³
- **If bone biopsy required, the decalcifying agents should include either EDTA or formic acid** for processing to prevent reduction in quantity and quality of DNA and interference with NGS assay⁴

EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; FFPE, formalin fixed paraffin embedded; NGS, next generation sequencing.

1. Gonzalez D, Mateo J, Stenzinger A, et al. *J Pathol Clin Res.* 2021; 2. Hussain M, Mateo J, Sandhu S, et al. *J Clin Oncol.* 2020;38(6_Suppl):195; 3. Cancer Research UK. Available at: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/bone-cancer/getting-diagnosed/tests-diagnose/bone-biopsy> (Last accessed: March 2021); 4. Schrijver WAME, van der Groep P, Hoefnagel LDC, et al. *Mod Pathol.* 2016;29(12):1460-1470.

3. Reporting tumour HRR mutations for treatment eligibility¹



HRR, homologous recombination repair; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; VUS, variants of uncertain significance.

[†]Clearly state that no evidence is available suggesting a benefit for targeted therapies of these variants.

[‡]This will allow patients with strong family history to potentially be further investigated by germline testing.

1. Gonzalez D, Mateo J, Stenzinger A, et al. *J Pathol Clin Res*. 2021.

The ACMG/AMP categories can be divided into pathogenic, uncertain and not pathogenic¹⁻³

Pathogenic

- (i) Pathogenic
- (ii) Likely pathogenic

Clinically actionable

- Mutations prematurely terminate protein
- Strong linkage with family/hereditary history
- Strong evidence of protein dysfunction based on functional assay
- Available evidence indicates a strong likelihood, but not definitive proof, that the mutation is pathogenic or deleterious

Uncertain

- (iii) Variant of uncertain significance (VUS)

NOT clinically actionable; requires additional follow-up

- Clinical significance has not yet been determined
- Evidence for benign or pathogenic is contradictory

Not pathogenic

- (iv) Likely benign
- (v) Benign

No clinical action necessary

- Available evidence indicates that the variant is highly unlikely to contribute substantially to compromised protein function
- Variants not affecting protein function
- Evidence demonstrating absence of clinical significance

ACMG=American College of Medical Genetics; AMP=Association of Molecular Pathologists; VUS=variant of uncertain significance.

1. Gradishar W, et al. *Oncologist*. 2017;22(7):797-803. 2. Richards S, et al. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424. 3. Cheon JY, et al. *Genome Med*. 2014;6(12):121

ENDOMETRIAL CANCER p53 statuts

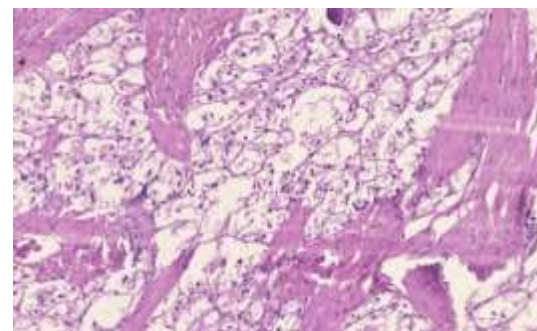
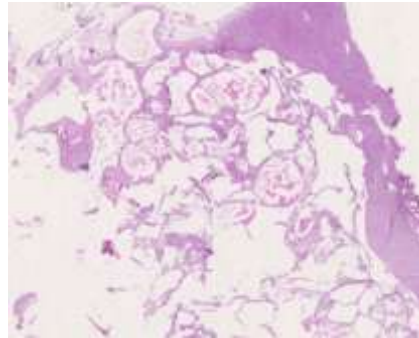
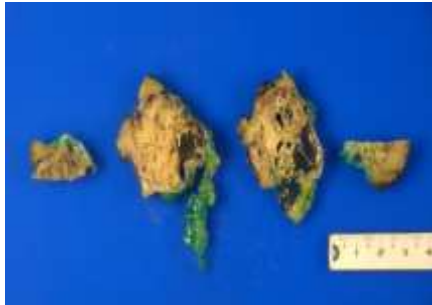
Biopsie F 60 ans	Adénocarcinome de l'endomètre endométriode (G2)	RO: 8/8 PO: 8/8 p53: wild type (revu et wild type avec quelques zones plus intenses) MSH6/2: expression préservée PMS2/MLH1: perte d'expression	Tumeur avec phénotype MSI-H c-à-d présence d'une INSTABILITE SIGNIFICATIVE de microsatellites. Déficience du système de réparation des mésappariements de l'ADN (defective MMR tumor) qui pourrait bénéficier de l'immunothérapie La présence d'une hyperméthylation du promoteur du gène MLH1 est évocatrice d'une déficience acquise du système de réparation des mésappariements de l'ADN (tumeur sporadique).	Variant pathogène du gène TP53 c.733G>A p.(Gly245Ser) à 37%
Biopsie F 57ans	Adénocarcinome de l'endomètre endométriode (G2)	RO: 7/8 RP: 0/8 p53: ~3% surexpression PTEN: négatif MMR: expression préservée PMS2, MLH1, MSH2/6	Tumeur avec phénotype microsatellites stables (MSS) c-à-d ABSENCE d'une instabilité de microsatellites significative. ABSENCE de facteur prédictif d'une réponse aux traitements par immunothérapie. Ce résultat ne plaide pas en faveur d'un syndrome de Lynch.	cVariant pathogène du gène TP53 655C>T p.(Pro219Ser) , à une fréquence allélique de <u>10%</u>
Biopsie F 76 ans	Adénocarcinome de haut grade de type séreux (G3)	RO + RP: expression très faible dans moins de 10% p53: absence totale (d'expression (pattern muté)) MMR: préservation de l'immunoréactivité	Tumeur avec phénotype microsatellites stables (MSS) c-à-d ABSENCE d'une instabilité de microsatellites significative. ABSENCE de facteur prédictif d'une réponse aux traitements par immunothérapie. Ce résultat ne plaide pas en faveur d'un syndrome de Lynch.	TP53 c.637C>T p.(Arg213*) à 85% et c.782+1G>T p.? À 86%

ENDOMETRIAL CANCER MMR status

Biopsie Femme 79 ans	Adénocarcinome de l'endomètre endométriode (G2)	RO: >90% RP : >90% P 53 nl (wild type) - MSH2 et HSMH : immuno-réactivité nucléaire préservée. - MLH1 : marquage en dots, aberrant. - PMS 2 : absence de marquage	MSS	Pas de mutation Pathogène POLE p53
Biopsie Femme 77 ans	Adénocarcinome de l'endomètre endométriode (G3) pT2 N1 L1	RO: >600% RP : >50% P 53 nl (wild type) PTEN: préservé - MSH2 et HSMH : immuno-réactivité nucléaire préservée. - MLH1 : marquage en dots, aberrant. - PMS 2 : absence de marquage	MSI-H hyperméthylation promoteur	Pas de mutation Pathogène POLE p53

BM for DIAGNOSTICS Purpose: RENAL TUMOR

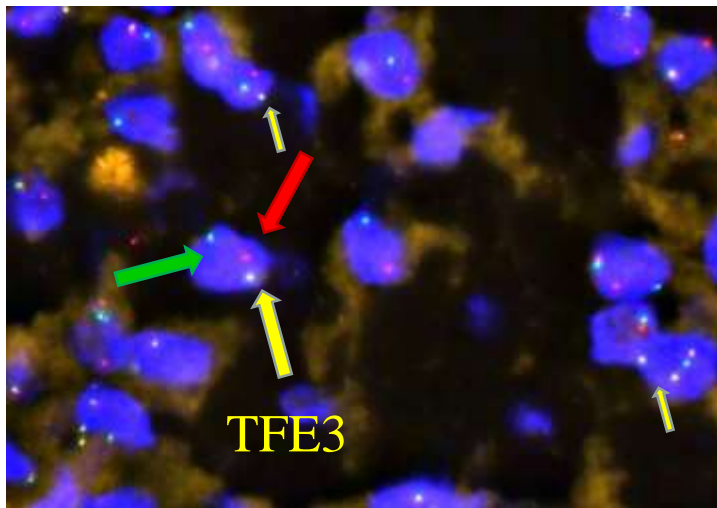
Homme 79 ans	Nephrectomie partielle	Tumeur 4,5 cm	MACROSCOPIE: Multikystique, petits et grand kystes	MICROSCOPIE : Paroi kystes :cellules claires (ISUP 1) Focal amas , vaisseaux dystrophiques Psammomas dans les septa	DD: RRC cellules claires Papillaire à cellules claire kystisé MLMC Low malignant potential	PAX 8: + CK7:0 CD117: cytoplasmique AMACR:100% CD10: 20% apical% CA IX: 0% VIMENTINE: + FH + EMA neg
-----------------	------------------------	------------------	---	---	--	--



MelanA +

BM for DIAGNOSTICS Purpose: RENAL TUMOR

- FISH :*Translocation* TFE3 gene Xp11.2 (90% cells)




- RNA-NGSsq : Fusions transcripts/proteins (8%)
- Translocation TFE3 RCC, low grade

BM for DIAGNOSTICS Purpose: RENAL TUMOR

Original research

Xp11 translocation renal cell carcinoma with morphological features mimicking multilocular cystic renal neoplasm of low malignant potential: a series of six cases with molecular analysis

Yankun Song,¹ Xiaoxue Yin,¹ Qiuyuan Xia,² Linmao Zheng,¹ Jin Yao,³ Hao Zeng,⁴ Ling Nie,¹ Jing Gong,¹ Qiao Zhou,¹ Ni Chen ¹