

INNOVATIONS EN ANATOMIE PATHOLOGIQUE QUE RETENIR DE 2016 ?

Au cours de ces dernières années, de nombreuses recherches ont abouti à la caractérisation de marqueurs moléculaires tumoraux en parallèle au développement de thérapies ciblées. Plus de 50% de celles-ci disposent d'un biomarqueur conditionnant leur prescription, rendant indispensable la réalisation de tests moléculaires. Les récents progrès technologiques nous permettent aujourd'hui l'analyse simultanée de gènes ou portions de gènes d'intérêt via le séquençage à haut débit (NGS). Depuis janvier 2016, le NGS est appliqué aux Cliniques universitaires Saint-Luc dans le cadre d'analyses en routine clinique qu'elles soient liées au diagnostic, au pronostic ou encore à la prédiction de la réponse thérapeutique.

Anne-France Dekairelle, Delphine Hoton**, Julie Lelotte**, Christine Galant**, Pascal Van Eeckhout**, Pamela Baldin**, Yves Guiot**, Louis Libbrecht**, Anne Jouret Mourin***

MOTS-CLÉS ► NGS, marqueurs tumoraux, thérapies ciblées

Next-Generation Sequencing (NGS):
a new molecular biology tool for the
patient's benefits

Over the last years, intense research has resulted in the characterization of tumor molecular markers, along with the development of targeted therapies. Over half of these therapies can only be prescribed after determination of the status of a biomarker, rendering it necessary to carry out molecular tests. Recent technological advances enable us to simultaneously analyze numerous genes or portions of genes of interest by means of next-generation sequencing (NGS).

Since January 2016, NGS has been applied in the Cliniques Universitaires Saint-Luc (CUSL) as part of clinical routine analyzes related to diagnosis, prognosis, or therapeutic response prediction. At present, the panel used at CUSL allows mutations in different exons of eight genes (BRAF, c-Kit, EGFR, IDH1, IDH2, KRas, NRas, and PDGFRA) to be identified, such as those involved in metastatic colorectal cancers, non-small-cell lung cancers, melanomas, gliomas, and gastro-intestinal stromal tumors. This method has become an excellent diagnostic and prognostic tool, which also enables oncologists to individually determine the best treatment modality for each patient, with better chances of therapeutic success while diminishing unnecessary treatments.

KEY WORDS

NGS, tumoral biomarkers, targeted therapies

SOMMAIRE

**LE NEXT GENERATION SEQUENCING (OU NGS) :
UN NOUVEL OUTIL DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
AU SERVICE DES PATIENTS**

AFFILIATIONS

- * Plateau de Biologie Moléculaire, Tour des laboratoires, Cliniques universitaires Saint-Luc, UCL, Bruxelles
- ** Service d'Anatomie Pathologique, Tour des laboratoires, Cliniques universitaires Saint-Luc, UCL, Bruxelles

CORRESPONDANCE

Pr Anne Jouret-Mourin,
Service d'Anatomie Pathologique
Cliniques universitaires Saint-Luc
Avenue Hippocrate 10
B-1200 Bruxelles

LE NEXT GENERATION SEQUENCING (OU NGS) : UN NOUVEL OUTIL DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE AU SERVICE DES PATIENTS

Depuis plusieurs années, les pathologistes ont acquis différents outils améliorant la compréhension et la caractérisation de certains cancers grâce à l'identification de marqueurs tumoraux réalisée notamment via l'immunohistochimie basée sur l'utilisation d'anticorps ou encore l'hybridation *in situ* qui permet de visualiser certains types d'anomalies génétiques.

Ce n'est qu'assez récemment que le pathologiste est devenu un acteur central grâce à son implication directe dans la prédiction à la réponse thérapeutique par l'observation des modifications moléculaires propres à certaines entités tumorales. En effet, la combinaison des progrès, tant en biologie moléculaire, permettant l'analyse simultanée de nombreux gènes impliqués dans la pathogenèse des cancers, qu'en traitement par thérapies ciblées visant beaucoup plus spécifiquement les tissus tumoraux, ont révolutionné la prise en charge des cancers en permettant une approche plus personnalisée du diagnostic, du pronostic et des traitements.

Le séquençage des acides nucléiques, qui consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides pour un fragment d'ADN donné, est utilisé depuis des dizaines d'années. Avec l'avancée des nouvelles technologies, est apparue la première génération des appareils de séquençage à haut débit, couramment nommés NGS (*Next Generation Sequencing*). Ces automates permettent d'analyser des dizaines de milliers de séquences ADN en une seule fois. Dès lors, nous sommes devenus capables de rechercher un ensemble d'anomalies potentielles dans une multitude de gènes ou portions de gènes répartis dans tout le génome humain.

L'utilisation du NGS a entraîné une révolution dans le cadre de la gestion des prélèvements tissulaires et cellulaires pris en charge dans les laboratoires d'anatomie pathologique. Le point de départ de cette analyse est une extraction de l'ADN tumoral sélectionné à partir d'échantillons tissulaires ou cellulaires. Ensuite, les régions d'intérêts sont spécifiquement amplifiées et séquencées. Après les étapes d'évaluation morphologique et de diagnostic histologique, le pathologiste travaille en association étroite avec le plateau de biologie moléculaire où seront recherchées les différentes altérations moléculaires.

Plus de la moitié des thérapies ciblées disposent d'un biomarqueur conditionnant leur prescription dans une partie ou la totalité de leurs indications autorisées. La réalisation des tests moléculaires est donc indispensable pour permettre aux patients d'avoir un accès à ces traitements. Pour exemple, la recherche des mutations des gènes *KRAS* et *NRAS* dans le cancer colorectal métastatique, des mutations du gène *EGFR* dans les cancers du poumon non à petites cellules, et la mutation

du gène *BRAF* dans les mélanomes cutanés sont devenues incontournables à l'heure actuelle pour sélectionner un traitement approprié du patient. Ces thérapies ciblées sont relativement coûteuses, dépassant plusieurs milliers d'euros pour un mois de traitement. Elles font partie des spécialités remboursables, chapitre IV, autorisant leur remboursement uniquement si la présence ou l'absence d'une altération génétique a été confirmée par une analyse moléculaire réalisée dans un laboratoire accrédité (ISO15189). Les procédures adoptées par le laboratoire sont donc sous le contrôle d'une stricte standardisation nécessitant la réalisation régulière de contrôles qualité (internes et externes) et le respect des délais fixés pour ces analyses, comme décrit dans les guidelines belges (1,2).

NGS ET CANCER COLORECTAL MÉTASTATIQUE

Depuis de nombreuses années la recherche des mutations *RAS* est devenue incontournable pour un traitement optimal des patients atteints de cancer colorectal métastatique (mCRC). Il est maintenant bien établi dans la littérature que seuls les patients ayant une tumeur *RAS* non mutée bénéficient d'un traitement anti-EGFR. L'administration d'anti-EGFR avec la chimiothérapie augmente la survie sans progression (10.1 mois vs 7.8 mois / rapport de risque 0.72) ainsi que la survie globale.

Environ 50 % des cancers colorectaux présentent une mutation des gènes *RAS* entraînant une activation constitutive de la voie de signalisation EGFR induisant ainsi une transformation oncogénique. La majorité de ces mutations (> 90%) sont observées dans le gène *KRAS* au niveau des codons 12 et 13 situés dans l'exon 2. Différentes études, dont les travaux de Douillard *et al.* ont démontré que la recherche des mutations doit également être étendue aux exons 3 et 4 du gène *KRAS*, ainsi qu'à ces mêmes exons 2, 3 et 4 du gène *NRAS* pour tous les patients présentant un mCRC (3). Ces mutations sont en effet présentes à une fréquence de 4,3% et 6,7% respectivement dans les exons 3 et 4 du gène *KRAS*, et à une fréquence de 3,8%, 4,8% et 0,5% dans les exons 2, 3 et 4 du gène *NRAS*. Le screening de l'ensemble de ces mutations est donc requis avant de pouvoir initier une thérapie anti-EGFR chez les patients atteints d'un mCRC, ce de façon à pouvoir prédire la (non-) réponse au traitement.

NGS & CANCERS PULMONAIRES NON À PETITES CELLULES

Le cancer pulmonaire est une des pathologies malignes les plus fréquemment diagnostiquées, et est la première cause de décès par cancer dans le monde. Ces dernières

années, nous observons une diminution d'incidence chez les hommes mais une augmentation chez les femmes, avec une augmentation des adénocarcinomes par rapport aux carcinomes épidermoïdes. De plus en plus d'adénocarcinomes apparaissent également chez des patients petits ou non-fumeurs (tabagisme passif, radon, agent toxiques environnementaux ou professionnels voire domestiques) (4).

La majorité des patients sont malheureusement diagnostiqués à des stades avancés, rendant la résection chirurgicale impossible. Différentes anomalies moléculaires sont décrites dans le cancer pulmonaire. Il est important de préciser que ces mutations sont considérées comme exclusives. *A priori* donc, une tumeur présentant une mutation dans un gène ne présentera pas de mutation dans les autres gènes ciblés (5).

Les altérations génétiques visées par les thérapies ciblées, et pour lesquelles la recherche est réalisée en routine par NGS, concernent principalement le gène *EGFR* et se retrouvent en particulier dans l'adénocarcinome du poumon sensible aux inhibiteurs de tyrosine kinases de l'EGFR (erlotinib, gefitinib et afatinib) (6). Cette sensibilité décrite par Lynch en 2004 permet d'obtenir d'excellentes réponses lorsque les patients présentent une mutation activatrice (7). Elles sont plus fréquentes chez les femmes, les patients non-fumeurs et les patients d'origine asiatique. Elles sont observées dans 10 % de la population caucasienne et dans plus de 20% de la population asiatique. Les délétions de l'exon 19 et la mutation ponctuelle de l'exon 21 L858R représentent plus de 80% des mutations activatrices sensibles à la médication par les inhibiteurs spécifiques. Ces mutations augmentent l'activité tyrosine kinase de l'EGFR entraînant une hyperactivation de différentes voies de signalisation.

Malheureusement, la majorité des tumeurs répondant à ces traitements développe par la suite des résistances, avec une durée médiane de progression de 9 mois. En cas de résistance au traitement, les récentes études ont démontré l'importance de rechercher dans les cellules tumorales en croissance la présence de nouvelles mutations de résistance (le type le plus fréquent étant la mutation T790M, dans l'exon 20 du gène *EGFR*). Dans ces cas, des traitements à base d'inhibiteurs de tyrosine kinase de seconde génération peuvent alors être utilisés de façon ciblée pour combattre la maladie (8).

Parallèlement aux mutations présentes dans le gène *EGFR*, des mutations des gènes *BRAF* et *KRAS* semblent également être corrélées aux adénocarcinomes du poumon. Concernant les mutations dans le gène *KRAS*, elles sont principalement situées dans l'exon 2 (codons 12 et 13 essentiellement) et sont généralement corrélées au tabagisme mais certaines mutations comme la G12D sont retrouvées plutôt chez le non-fumeur (2). Pour les mutations du gène *BRAF* dans le cancer pulmonaire, une distinction doit être faite entre la mutation V600E et les mutations non-V600E, ce qui permettra de sélectionner une thérapie anti-BRAF/anti-MEK *versus* l'immunothérapie.

Il est à noter que d'autres gènes sont décrits à l'heure actuelle dans l'étiopathogénie du cancer pulmonaire et que cette liste devra être complétée par des gènes pour lesquels on disposera également très bientôt de thérapies ciblées.

NGS & MÉLANOMES CUTANÉS

Le mélanome cutané est une tumeur rare, représentant seulement 1 % de tous les cancers. Bien que le mélanome ne compte que pour moins de 5% des cancers dermatologiques, il est responsable de 75% de la mortalité induite par un cancer de la peau. Son incidence a nettement augmenté entre les années 1970 et fin des années 1990 pour ensuite se stabiliser dans les années 2000. La survie à 5 ans a augmenté de 82% en 1975 à 92%, mais la mortalité globale reste malheureusement inchangée. (9)

Plusieurs mutations somatiques dans des oncogènes ont été identifiées dans le mélanome : *BRAF*, *NRAS*, *c-KIT*, etc... Environ 40% des mélanomes présentent une mutation *BRAF* dont la principale est la mutation V600E (80-90%) (10). *BRAF* est une protéine kinase de type sérine/thréonine activant la voie de signalisation des MAP kinase (RAS-RAF-MEK-ERK). Les mutations *BRAF* (et *NRAS*) entraînent une activation continue de cette voie de signalisation, induisant la prolifération tumorale et la résistance à l'apoptose. Un des premiers inhibiteurs sélectifs des tumeurs « *BRAF* muté » (V600E ou V600K), sur le marché, a été le vemurafenib. Les résultats ont montré une réduction relative de 63% du risque de mortalité et de 74% pour le risque de progression tumorale (11).

À côté des mutations *BRAF*, environ 20% des mélanomes contiennent une mutation *NRAS* (80% dans le codon 61, 20% dans les codons 12 et 13). Les mutations présentes dans le gène *C-KIT* sont quant à elle plus rares. L'identification de ces mutations somatiques activatrices permet de sélectionner les patients métastatiques (stade IV) pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée par un inhibiteur *BRAF* ou *MEK* ou une association de ces 2 inhibiteurs. Aucun inhibiteur direct de *NRAS* n'est à ce jour disponible.

NGS & GLIOMES DIFFUS

Environ 70 à 80 % des gliomes diffus de grade intermédiaire (II et III) et des glioblastomes secondaires présentent une mutation dans les gènes *IDH1* (codon 132) ou *IDH2* (codon 172). La mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation R132H du gène *IDH1* (90% des cas), celle-ci pouvant être mise en évidence par immunohistochimie. Les mutations minoritaires d'*IDH1* et les mutations d'*IDH2* doivent, quant à elles, être mises en évidence par d'autres techniques, notamment par NGS. Ces mutations sont retrouvées tant dans les lésions astrocytaires qu'oligodendrogiales, suggérant que ces anomalies surviennent de façon précoce dans la tumorigénèse. De plus, elles s'observent plus

fréquemment chez les personnes jeunes (< 55 ans) mais ne sont qu'exceptionnellement retrouvées chez les personnes plus âgées ou les enfants. La recherche de ces mutations est à la fois une aide diagnostique et pronostique car elles sont souvent associées à une progression plus lente de la maladie et une amélioration de la survie globale des patients (12,13,14).

NGS ET GIST

Les tumeurs stromales digestives, ou tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), sont des tumeurs du tube digestif qui étaient très largement méconnues des médecins et du grand public jusqu'en 2000. Les GIST sont les tumeurs mésenchymateuses les plus fréquentes du tube digestif. Ce sont toutefois des tumeurs assez peu fréquentes en comparaison aux carcinomes, car leur incidence est évaluée à 15 nouveaux cas par million d'habitants par an (15).

La plupart des GIST présentent des mutations activatrices dans les gènes *KIT* et *PDGFRA*. Détecter ces mutations est important, la réponse au traitement varie en effet en fonction du statut mutationnel de la tumeur. *KIT* et *PDGFRA* sont des protéines réceptrices pour les facteurs de croissance, activées dans les tissus normaux quand la cellule en a besoin. Des mutations de *KIT* (exon 11 principalement, mais également dans les exons 9, 13 et 17) et *PDGFRA* conduisent à une activation indépendante de ces récepteurs et à une prolifération spontanée et non contrôlée des cellules (16,17). Ces dernières années, différentes mutations ont été détectées dans le gène *KIT* et sont observées dans ~80% des GISTs. Environ 8% des GISTs présentant un *KIT* normal montrent une mutation dans le gène *PDGFRA* (18,19).

EN PRATIQUE AUX CLINIQUES UNIVERSITAIRES SAINT-LUC

Aux Cliniques universitaires Saint-Luc (CUSL), le NGS est appliqué dans le cadre d'analyses en routine clinique qu'elles soient liées au diagnostic, au pronostic ou encore à la prédiction de la réponse thérapeutique depuis janvier 2016. Cette analyse qui est accréditée suivant la norme ISO15189, est réalisée selon la standardisation imposée par les guidelines belges (1,2), impliquant la réalisation régulière de contrôles qualité et le respect des délais de réalisation de l'analyse (10 jours ouvrables).

Actuellement, le panel utilisé aux CUSL permet d'identifier des mutations présentes dans différents exons de 8 gènes particulièrement impliqués en oncologie et pour lesquels l'impact de la présence d'une mutation a été clairement démontré au niveau thérapeutique et pronostique. Les 8 gènes repris dans le panel sont les gènes *BRaf*, *c-Kit*, *EGFR*, *IDH1*, *IDH2*, *KRas*, *NRas* et *PDGFRA*.

Durant l'année 2016, 532 analyses NGS ont été réalisées en routine clinique. La répartition des analyses correspondait à 188/532 (35%) liées aux cancers colorectaux, 184/532 (35%) au cancer pulmonaire, 100/532 (19%) aux mélanomes, 35

aux gliomes, 21 aux GIST et 4 à des cancers thyroïdiens. Le détail des résultats comparatifs est repris en Table 1.

Hormis pour le gène *EGFR* dans le cadre des cancers pulmonaires, tous ces pourcentages de mutations identifiées dans les différentes pathologies sont en concordance avec les données de la littérature (3,11,18-21). Concernant *EGFR*, la plupart des données de la littérature ne prennent en compte que certaines sous-catégories de carcinomes non à petites cellules (NSCLC). Nos analyses sont réalisées de façon plus globale sur l'ensemble des NSCLC. Ceci peut expliquer notre plus faible pourcentage observé : pourcentage en accord avec les données obtenues auprès d'autres centres d'analyses moléculaire que ce soit en Belgique ou aux Pays-Bas.

En conclusion, la technique de NGS, accréditée et réalisée en routine clinique depuis 2016 aux Cliniques universitaires Saint-Luc, permet de séquencer rapidement, simultanément, et pour un coût relativement raisonnable, plusieurs gènes d'intérêt. Cette méthode est devenue un excellent outil diagnostique et/ou pronostique permettant également de déterminer individuellement le meilleur traitement pour chaque patient, avec pour avantages de meilleures chances de succès thérapeutique et la diminution de traitements inutiles. Dans un avenir proche, nous allons étendre notre panel à d'autres recherches mutationnelles, permettant ainsi de couvrir de nouveaux gènes d'intérêt et ainsi cibler d'autres pathologies.

Tableau 1 : Prévalence des mutations identifiées en NGS par pathologie. Tableau comparatif des données des CUSL et de la littérature.

		CUSL	Littérature
Cancer Colo-rectal	n	188	
Métastatique	Non Contributif*	7	
	Absence de mutation	82 (45%)	~ 50%
	<i>KRas</i> muté	72 (40%)	
	codon 12	45 (25%)	31%
	codon 13	11 (6%)	9%
	codon 59-61	9 (5%)	
	codon 117-146	5 (3%)	5,3%***
	codons autres	2 (codons 14 et 22)	
	<i>NRAS</i> muté	8 (4%)	~ 4%
	codon 12	4	3.8%
	codon 61	4	4.8%
	<i>BRAF</i> muté (V600E)	17 (9%)	11,1 +/- 3,7%
	<i>IDH1</i>	1	
	Triple mutation**	1	
Cancer pulmonaire	n	184	
Non à Petites Cellules	Non Contributif*	6	
	Absence de mutation	102 (57%)	
	<i>EGFR</i> muté	11 (6%)	10-20% §
	délétion exon 19	6	
	+ T790M (exon 20)	2 £	
	V742I (exon 19)	1	
	insertion exon 20	1	
	L858R (exon 21)	3	
	<i>KRas</i> muté	53 (30%)	
	<i>BRAF</i> muté	6 (3%)	
	Autre (<i>IDH1</i> - <i>PDGFRA</i> - <i>NRAS</i>)	6	
Mélanomes	n	100	
	Non Contributif*	7	
	Absence de mutation	43 (46%)	~ 50%
	<i>BRAF</i> muté (V600E/K)	31 (33%)	~ 40%
	<i>NRAS</i> muté	14 (15%)	~ 10-20%
	Autre §	5	
Gliomes	n	35	
	Non Contributif*	3	
	Absence de mutation	23 (72%)	
	<i>IDH1</i> muté (codon 132)	6	
	<i>IDH1</i> muté (codon 172)	1	
	Autre (<i>BRAF</i> - <i>EGFR</i>)	2	
GIST	n	21	
	Non Contributif*	1	
	Absence de mutation	1	
	<i>c-KIT</i> muté (exon 11)	17 (85%)	~ 80%
	<i>PDGFRA</i> muté (exon 18)	2 (10%)	~ 10%

* Quantité ou qualité de l'ADN insuffisante

** *IDH1* p.R132C / *KRas* p.G13D / *KRas* p.Q22K

*** % observé pour les exons 3 et 4 de *KRAS*

§ : Discordance par rapport à la littérature : cfr discussion

£ : patients présentant une résistance au traitement

§ : 2 mutation dans *EGFR*, 2 mutation dans *KRAS*, une dans *IDH1*

RÉFÉRENCES

1. Jouret-Mourin A, Cuvelier C, Demetter P, et al. RAS-testing in colorectal cancer: Belgian guidelines. *Belgian Journal of Medical Oncology* 2015; 9 : 183-190.
2. Pauwels P, Rimmelink M, Hoton D, et al. Pathological diagnosis and molecular testing in non-small cell lung cancer: Belgian guidelines. *Belgian Journal of Medical Oncology* 2016 ; 10 : 123-131.
3. Douillard JY, Oliner KS, Siena S et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2013 ; 369 : 1023-1034.
4. Morgensztern D, Campo M J, Dahlberg SE, et al. Molecularly Targeted therapies in non-small cell lung cancer. Annual update 2014. *J Thorac Oncol* 2015; 10 : S1-S63.
5. Li T, Kung H-J, Mack P, et al. Genotyping and Genomic Profiling of Non Small-Cell Lung Cancer: Implications for current and Future therapies. *J Clin Oncol* 2013 ; 31 : 1039- 1049.
6. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans A-M, et al., Diagnostic procedures for non-small- cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *BMJ* 2015 ; 0 : 1-8.
7. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2129-2139.
8. Sequist LV, Waltman BA, Santagata DD et al. Genotypic and Histological Evolution of Lung Cancers Acquiring Resistance to EGFR Inhibitors. *Science Translational Medicine* 2011; 3 : 75ra26.
9. Berrios-Colon E, Williams S. Melanoma Review: Background and Treatment. *US Pharm* 2012 ; 37 : HS-4-HS-7.
10. Solit DB, Rosen N. Resistance to BRAF inhibition in melanomas. *N Engl J Med* 2011; 364 : 772-4.
11. Ascierto P A, Kirkwood J M , Grob JJ , et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J Translational Medicine* 2012; 10 : 85
12. Appin CL, Brat DJ. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *Mol Aspects Med* 2015 Nov;45:87-96.
13. Louis DN, Ohgaki H, von Deimling A et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC (2016).
14. Yan H, Parsons W, Bigner DD et al. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360 : 765-773.
15. Nilsson B, Bummig P, Meis-Kindblom JM, et al. Gastrointestinal stromal tumors: The incidence, prevalence, clinical course and prognostication in the pre-imatinib mesylate era. *Cancer* 2005; 103 : 821-829.
16. Heinrich MC, Corless CL, Duensing A et al. PDGFRA Activating Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science* 2003; 299 : 708-710.
17. Subramanian S, West RB, Corless CL et al. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) with KIT and PDGFRA mutations have distinct gene expression profiles. *Oncogene* 2004; 23 : 7780-7790.
18. Nishida T, Hirota S. Biological and clinical review of stromal tumors in the gastrointestinal tract. *Histol Histopathol* 2000; 15: 1293-301.
19. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130 : 1466-78.
20. Boleij, Tack, Taylor et al. RAS testing practices and RAS mutation prevalence among patients with metastatic colorectal cancer: results from a Europe-wide. *BMC Cancer* 2016; 16 : 825.
21. Kim SY, Hahn HJ, Lee YW. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol.*2015;72:1036-1046.