

**RISQUES BIOLOGIQUES POUR LA SANTE
QUALITE DES LABORATOIRES**

EVALUATION EXTERNE DE LA QUALITE*

Biologie moléculaire

Examens de génétique

**Rapport de l'étude de stabilité des coupes FFPE utilisées
dans le cadre des enquêtes de biologie moléculaire**

2025

* AR 03/12/1999

* AR 05/12/2011

Sciensano/ Biologie moléculaire-Examens génétique- Etude de stabilité/13/FR

Risques biologiques pour la santé
Qualité des laboratoires
Rue Juliette Wytzman 14
1050 Bruxelles | Belgique

www.sciensano.be

COMITE D'EXPERTS

Sciensano					
Secrétariat		Tél:	02/642.55.21	Fax:	02/642.56.45
		E-mail	ql_secretariat@sciensano.be		
Joséphine Lantoine	Coordinateur	Tél:	02/642 53 94		
		E-mail:	Josephine.lantoine@sciensano.be		
Bernard China	Coordinateur remplaçant	Tél:	02/642 52 08		
		E-mail:	bernard.china@sciensano.be		
Vanessa Ghislain	Coordinateur remplaçant	Tél:	02/642 53 85		
		E-mail:	Vanessa.ghislain@sciensano.be		
Experts	Institution				
Ina Benoy	Rode Kruis				
Elke Boone	AZ Delta				
Barbara Depreter	AZ Delta				
Evelien Heylen	ZNA				
Marie Le Mercier	UZA				
Patrick Pauwels	UZA				
Freya Vaeyens	UZ Brussel				
Jacques Van Huysse	AZ Sint Jan Brugge				

Un draft de ce rapport a été transmis aux experts le 23/09/2025.

Les experts ont été invités à envoyer leurs remarques via e-mail.

Autorisation du rapport : par Joséphine Lantoine, coordinateur

Date de publication : 07/11/2025

Tous les rapports sont également consultables sur notre site web:
<https://www.sciensano.be/fr/qualite-des-laboratoires>

TABLE DES MATIERES

1	ECHANTILLON : GÉNÉRALITÉS	4
1.1	Echantillons EGFR	4
1.2	Echantillons HER2.....	4
2	ETUDE DE STABILITÉ : MÉTHODOLOGIE.....	4
2.1	EGFR	4
2.2	HER2.....	5
3	ETUDE DE STABILITÉ : RÉSULTATS	5
3.1	EGFR	5
3.2	HER2	6
4	CONCLUSIONS	6

1 Echantillon : Généralités

Les échantillons sont des coupes FFPE de 4 µm d'épaisseur provenant d'un adénocarcinome. Ils proviennent de la biobanque Discovery Life Science (3509 Elgin St, Suite 300 Houston, TX 77004-USA).

Les échantillons sont accompagnés des données cliniques relatives à chaque patient : âge, sexe, race, site de la tumeur, type de tumeur, données pathologiques, indications sur le traitement reçu par le patient (si disponible) et le statut mutationnel EGFR.

1.1 Echantillons EGFR

La présence d'une mutation du gène EGFR (p.G601Efs*104) situé dans le chromosome 7 avec une fréquence allélique de 1.1% était confirmée par la firme qui a réalisé une analyse NGS (panel Qiagen multimodal).

Cette mutation ne devait pas être rapportée par les participants utilisant une méthode NGS car elle est hors du scope de la convention (https://www.inami.fgov.be/SiteCollectionDocuments/convention_next_generation_sequencing_annexe_01.pdf). Ceux-ci devait rapporter l'échantillon comme étant Wild type.

Pour les laboratoires utilisant une technique de type PCR, le variant pouvait être rapporté sans que cela ne soit considéré comme fautif.

La présence d'une mutation BRAF V660E « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » était quant à elle confirmée par la firme avec une fréquence allélique de 8.2 %.

1.2 Echantillons HER2

Pour cette enquête, nous disposons de coupes FFPE provenant de deux cas cliniques différents :

Cas clinique F10007534 : Femme de 62 ans présentant un carcinome ductal invasif faiblement différencié de stade I-A et de grade G3 (TNM=T1c N1aMx). Le résultat de l'immunohistochimie pratiquée en amont est IHC 3+ (ER-positif et PR-positif).

Le résultat de l'analyse ISH effectuée par le laboratoire expert ayant effectué l'étude de stabilité est HER2-positif.

Cas clinique F30001318: Cas clinique F30001318: Femme de 60 ans présentant un carcinome invasif modérément différencié partiellement de type NST et partiellement micropapillaire.

Le stade de la tumeur est II-A et son grade G2 (TNM= T2N0(sn)M0). Une composante in situ (DCIS) est présente à hauteur de 15%. Le résultat de l'immunohistochimie pratiquée en amont est négatif. La tumeur est ER-positif et PR-positif.

Le résultat de l'analyse ISH effectuée par le laboratoire expert ayant effectué l'étude de stabilité est HER2-négatif.

2 Etude de stabilité : Méthodologie

2.1 EGFR

Une étude de stabilité a été réalisée par un membre du comité d'expert évaluant les EEQs de biologie moléculaire art.33bis/33ter afin de garantir la stabilité des coupes sur l'ensemble de la période de enquête et ce indépendamment de la température de stockage : température ambiante, 4 °C ou 30°C .

Une série de lames (2 consécutives) a été envoyée à un laboratoire expert entre la réception des échantillons et le début de l'enquête.

3 autres séries de lames ont été envoyées à Sciensano en même que les échantillons des laboratoires et ont été gardées à diverse température pendant toute la durée de l'enquête:

- i) Une première série a été gardée à température ambiante et ce afin de garantir la stabilité pour un envoi effectué à température ambiante.
- ii) Une second série a été gardée à 4°C; température recommandée par la firme pour le stockage des coupes notamment dans le cadre d'analyses de type IHC.
- iii) Une dernière série de lames a été gardée à 30°C, et ce afin de garantir la stabilité même lorsque la température durant l'envoi devait dépasser les 25°C.

Les trois séries de lames ont été gardées à leur température respectives durant 1 mois et ont ensuite été analysées par le même laboratoire expert ayant effectué l'analyse pré-envoi et ce avec sa méthodologie de type NGS.

Le laboratoire expert n'a pu maintenir à la température demandée la série devant être maintenue à 30 °C à la bonne température. Celui-ci l'a maintenue à température ambiante jusqu'à extraction de l'ADN.

Les résultats montrent que la température de conservation n'a eu aucun impact sur l'analyse NGS réalisée par le laboratoire expert. Ce laboratoire a identifié l'échantillon comme EGFR WT pour les 3 cas et a bien retrouvé la mutation BRAF « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » dans chaque cas.

2.2 HER2

Une étude de stabilité a été réalisée par un membre du comité d'expert évaluant les EEQs de biologie moléculaire art.33bis/33ter afin de garantir la stabilité des coupes sur l'ensemble de la période de enquête et ce indépendamment de la température de stockage : température ambiante, 4 °C ou 30°C .

Une série de lames (2 consécutives) pour chaque cas a été envoyée à un laboratoire expert entre la réception des échantillons et le début de l'enquête.

3 autres séries de lames uniquement pour les cas **HER2-positif** ont été envoyées à Sciensano en même que les échantillons des laboratoires et ont été gardées à diverse température pendant toute la durée de l'enquête:

- i) Une première série a été gardée à température ambiante et ce afin de garantir la stabilité pour un envoi effectué à température ambiante.
- ii) Une second série a été gardée à 4°C; température recommandée par la firme pour le stockage des coupes notamment dans le cadre d'analyses de type IHC.
- iii) Une dernière série de lames a été gardée à 30°C, et ce afin de garantir la stabilité même lorsque la température durant l'envoi devait dépasser les 25°C.

Les trois séries de lames ont été gardées à leur température respectives durant 1 mois et ont ensuite été analysées par le même laboratoire expert ayant effectué l'analyse pré-envoi et ce avec sa méthodologie de type ISH.

3 Etude de stabilité : Résultats

3.1 EGFR

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas eu d'impact de la température de stockage sur l'analyse NGS effectuée par le laboratoire expert. Celui-ci a bien mentionné l'échantillon comme EGFR WT dans les 3 cas et a retrouvé la mutation BRAF « NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu) » dans chacun des cas. Le laboratoire expert a utilisé une méthode de type NGS avec le séquenceur « Nextseq550 DX » de chez Illumina et un kit « Qiaseq DNA custom panel» de chez Qiagen.

La qualité de l'échantillon était bonne dans chaque cas :QC<0.04 (QC moyen=0.024) et a été mesurée avec une méthode de type qPCR et l'automate « ViiA7 » de chez ThermoFischer avec le kit « Quant-iT dsDNA HS » de chez Qiagen.

La quantité d'ADN extrait était en moyenne de 3ng/μl. Seule la quantité extraite à partir des lames restée à 30°C pendant 1 mois et conservée à température ambiante pendant 5 jours jusqu'à extraction est inférieure à 3 ng/μl. Celle-ci a été mesurée avec une méthode de fluorométrie avec comme automate le « Qubit 3.0 » de chez ThermoFischer et le kit « Qubit dsDNA HS » de chez ThermoFischer également.

Ci-dessous, le graphique représentant la concentration d'ADN extrait par la laboratoire expert pour chaque série de coupes en fonction de la température de stockage.

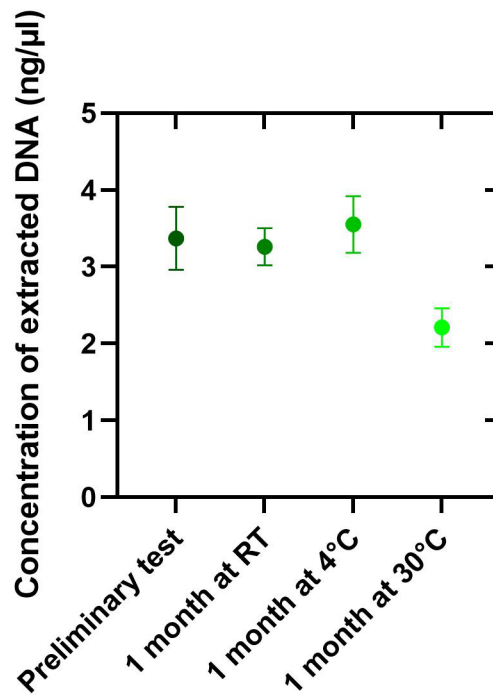


Figure 1 : Représentation de la médiane des concentration d'ADN extrait pour chaque séries de coupes ainsi que de l'écart interquartile.

3.2 HER2

Le laboratoire expert a utilisé une méthode automatique avec l'automate « BenchMark Ultra's » de chez Roche diagnostics et le kit « INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail » également de la firme Roche Diagnostics.

Les résultats indiquent qu'il n'y a pas eu d'impact de la température de stockage sur l'analyse ISH effectuée par le laboratoire expert. Celui-ci a bien mentionné l'échantillon F10007534 comme HER2-positif peu importe la température de stockage. Le ratio HER2/CEP17 était >4 pour les 3 séries de lames et des clusters de plus de 10 signaux HER2/cellules ont été rapportés pour les 3 séries de lames.

Le laboratoire expert a conclu que le test HER2 ISH est un test robuste qui n'est pas perturbé par la température de stockage des lames. En effet, plus de 90% des noyaux cellulaires affichaient des signaux facilement dénombrables peu importe la température de stockage.

4 Conclusions

Les études de stabilité conduites lors des enquêtes 2025/2 et 2025/3 et concernant la stabilité des coupes FFPE pour (i) une extraction d'ADN et une analyse moléculaire de type NGS et (ii) une analyse de type ISH ont montré qu'ils n'y avait pas eu un impact de la température de stockage (RT, 4°C, 30°C) ni de la

durée entre la réception des échantillons par Sciensano et la clôture de l'enquête (>1mois). En effet, la quantité et la qualité de d'ADN extrait pour l'analyse NGS ainsi que la robustesse des signaux HER2 dans le cadre de l'hybridation in situ n'ont pas été affectée de manière telle que les analyses n'auraient pu être conduites par les laboratoires experts.

FIN

© Sciensano, Bruxelles 2025

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.