

JOURNÉES DU  
**GFCO** 10<sup>e</sup> ÉDITION

Biomarqueurs et analyses moléculaires en oncologie

Avec la participation  
scientifique du



# SESSION VOTE :

## Recommandations GFCO pour la mise en place du testing ADNtc

Léa Payen, Lyon, et Alain Morel, Angers

Modération : Alexandre Harlé, Nancy

Avec la participation  
scientifique du



# LIENS D'INTÉRÊT

---

- **Alain Morel** : AstraZeneca, GSK, MSD
- **Léa Payen** : AstraZeneca, Sysmex-Inostics, Volition, Inovotion
- **Alexandre Harlé** : Alira Health, Amgen, AstraZeneca, Biocartis, Cypath, Decibio, Diaceutics, GSK, HederaDX, Incyte, Janssen, MSD, Nonacus, Pierre Fabre, QualWorld, Roche, SeqOne, Sophia Genetics



# Objectif de la session

---

- **Présenter les propositions ayant atteint un consensus lors de la première phase de vote électronique ( $\geq 80\%$  d'accord)**
- **Soumettre au vote du panel de représentants des plateformes les points de divergence, accompagnés des reformulations proposées**
- **Élaborer une version consensuelle des recommandations, destinée à une publication avec comité de lecture**



# Structure de la recommandation

## Phase pré-analytique

- Transport
- Préparation de l'échantillon
- Extraction d'ADN et contrôle qualité

## Phase analytique pour la technique NGS

- Préparation des bibliothèques
- Séquençage

## Phase post-analytique

- Bioinformatique
- Compte-rendu des résultats



# Légende : lorsque vous voyez le symboles...

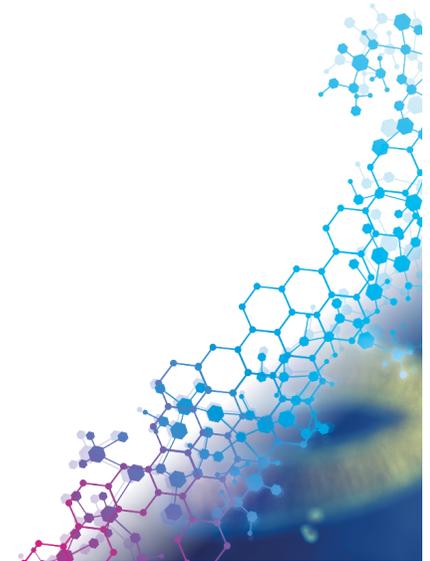
---



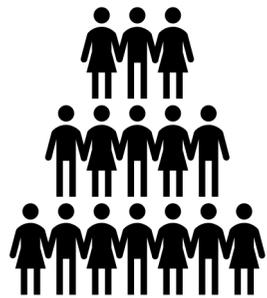
**Proposition avec consensus**



**Proposition nécessitant un vote**



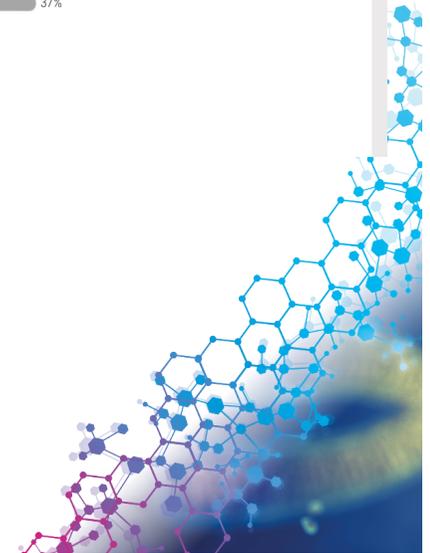
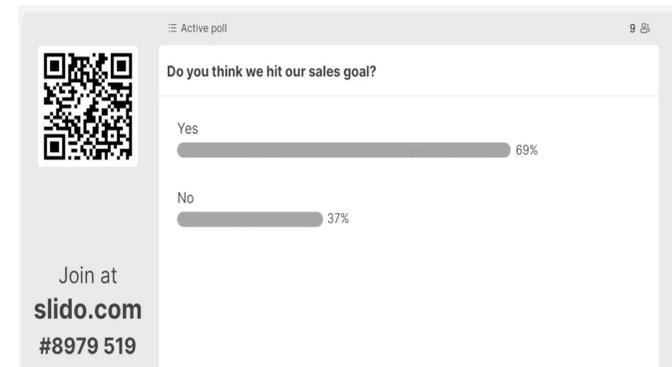
# Modalités de vote



Membres du  
panel



Accès aux  
sondages *via*  
le QRcode



# Phase pré-analytique

# Transport

---



**« Une mention indiquant de limiter (si possible) les prélèvements le vendredi doit apparaître sur les fiches de prescription. »**

**ETES-VOUS D'ACCORD AVEC LA PROPOSITION ALTERNATIVE CI-APRÈS :**

**« Pour les laboratoires ne pouvant pas prendre en charge les prélèvements le week-end, des tubes avec stabilisateurs doivent être utilisés pour les prélèvements du vendredi après-midi (y compris en interne). »**

**VOTEZ**

# Transport

---



**CONCERNANT LES CONDITIONS DE STOCKAGE, ETES-VOUS D'ACCORD :**

- 1. « Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître sur les fiches de prescription (en plus du manuel de prélèvement). »**
- 2. « Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître uniquement sur le manuel de transport. »**

**VOTEZ**

# Transport

---



**« Privilégier une prise en charge du prélèvement le plus rapidement possible y compris lorsque les notices de fournisseurs indiquent des temps supérieurs. »**

# Préparation de l'échantillon

---



« À réception du prélèvement sanguin, 2 centrifugations sont nécessaires : une première à 1600 *g* pendant 10 min, puis le plasma est centrifugé soit à 16000 *g* pendant 10 min, soit à 4800 *g* pendant 20 min. Centrifugations à température ambiante, sans frein ou frein minimal. »

**ETES-VOUS D'ACCORD AVEC LA PROPOSITION ALTERNATIVE CI-APRÈS :**

**« À réception du prélèvement sanguin, 2 centrifugations sont nécessaires avec la 2<sup>e</sup> centrifugation plus rapide que la 1<sup>re</sup> (ex: Etude comparative HCL en cours de rédaction). »**

**VOTEZ**

# Préparation de l'échantillon

---



« Les plasmas doivent être stockés à  $-80^{\circ}\text{C}$  à l'issue de la 1<sup>re</sup> centrifugation ou de la 2<sup>e</sup> centrifugation (tolérance pour un stockage intermédiaire de 96h à  $-20^{\circ}\text{C}$ ). »

**ETES-VOUS D'ACCORD POUR AJOUTER :**

**Eviter les congélations et décongélations successives des plasmas.**

**VOTEZ**

# Hématopoïèse Clonale

**Qu'est-ce que l'hématopoïèse clonale ?** Processus par lequel une seule cellule souche hématopoïétique acquiert une mutation et prolifère, entraînant une population de cellules sanguines dérivées de cette cellule.

## CHIP

(Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential)

Mutation dans les cellules souches hématopoïétiques sans signe de maladie hématologique.

### Caractéristiques :

- Présence de mutations somatiques détectables.
- Augmentation du risque de maladies cardiovasculaires et d'hémopathies malignes.
- Prévalence augmente avec l'âge.

## tCHIP

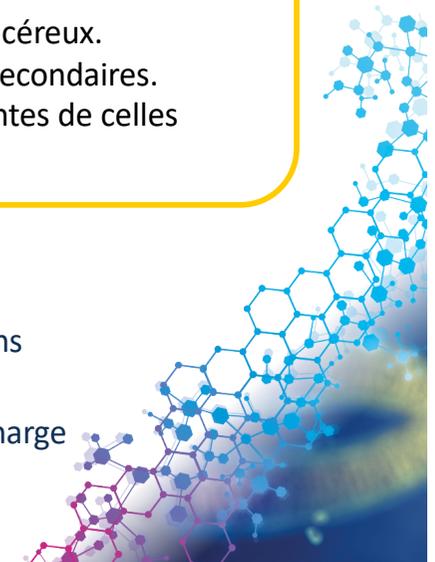
(Therapy-related Clonal Hematopoiesis)

Clonalité hématopoïétique liée à une thérapie antérieure, souvent la chimiothérapie ou la radiothérapie.

### Caractéristiques :

- Survient après un traitement anticancéreux.
- Peut être précurseur de néoplasies secondaires.
- Porte souvent des mutations différentes de celles observées dans CHIP.

- **CHIP vs tCHIP** : Bien que similaires, la distinction est cruciale pour le suivi clinique et la gestion des risques.
- **Objectif** : Sensibiliser et informer sur les implications cliniques pour réduire le pourcentage de réponses "sans opinion" sur les sujets liés à CHIP.
- **Conclusion** : Une meilleure compréhension des différences entre CHIP et tCHIP peut améliorer la prise en charge des patients et orienter la recherche future.



# Préparation de l'échantillon

---



## ETES-VOUS D'ACCORD :

1. Si une analyse d'hématopoïèse clonale est envisagée, un aliquote de sang total ou un culot cellulaire de 1<sup>re</sup> centrifugation du plasma doit être conservé.
2. L'évaluation de l'hématopoïèse clonale pourrait permettre de fiabiliser le résultat.
3. Pour les gènes les plus connus, il est recommandé de mentionner dans le compte-rendu l'éventualité que les résultats puissent être liés à une CHIP.

**VOTEZ**

# Extraction d'ADN et contrôle qualité

---



- Les acides nucléiques déjà extraits à partir d'une biopsie liquide peuvent être conservés à -20°C.
- Les acides nucléiques déjà extraits à partir d'une biopsie liquide peuvent être conservés à -80°C.

**ETES-VOUS D'ACCORD AVEC LA PROPOSITION ALTERNATIVE CI-APRÈS :**

**« Le tampon TE doit être utilisé et les échantillons peuvent être conservés à 4°C jusqu'à 10 semaines ou à -20°C/-70°C au-delà de 10 semaines. »**

**VOTEZ**

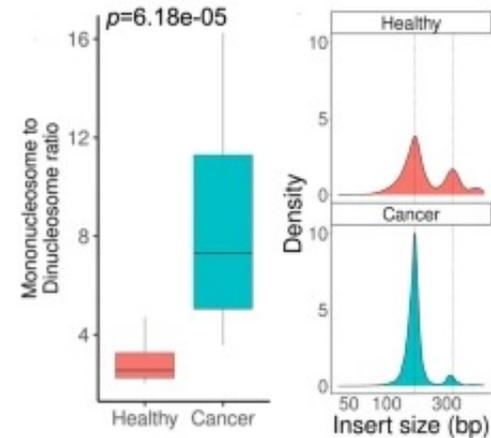
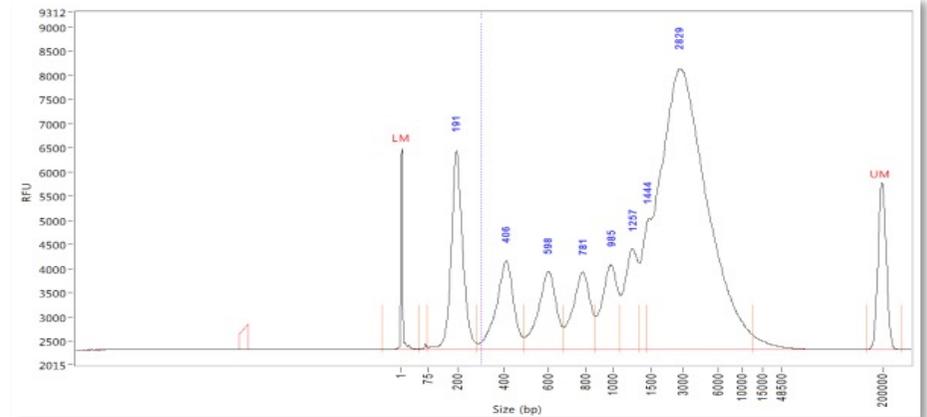
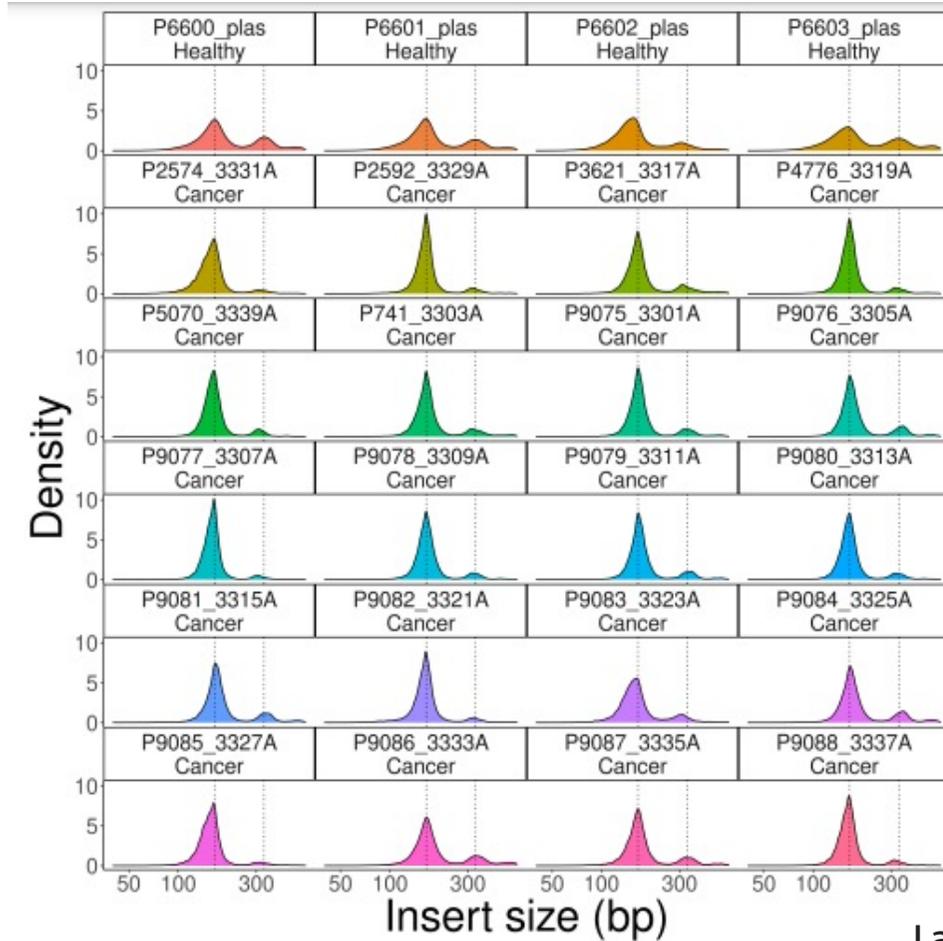
# Extraction d'ADN et contrôle qualité

---

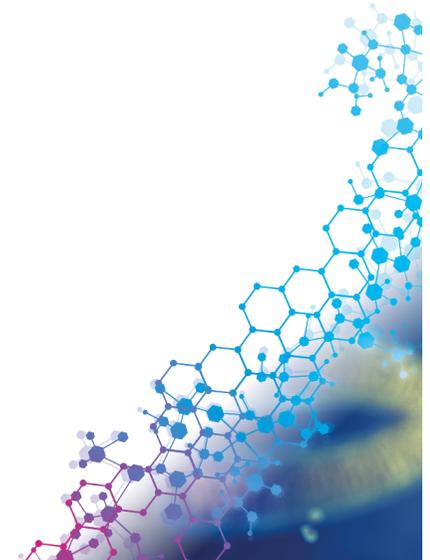


**« Une quantification de l'ADN extrait est recommandée après extraction. »**

# Pourquoi et comment analyser la taille des fragments ?



Lau, B.T. et al. *Genome Med* 15, 33 (2023)



## Extraction d'ADN et contrôle qualité

---



**ETES-VOUS D'ACCORD : « Il est recommandé de procéder à une analyse de la taille de fragments afin d'estimer une potentielle contamination du prélèvement par de l'ADN génomique. »**

**VOTEZ**

# Phase analytique pour la technique NGS

# Préparation des librairies

---



## Recommandé :

« Le protocole est à adapter entre FFPE et ADNtc. »

« L'utilisation d'UMI est recommandée quelle que soit la technologie (Capture ou Amplicon) choisie pour le séquençage de l'ADNtc. »

## Conseillé :

« Privilégier l'intégration des UMIs par ligation plutôt que par PCR. »

# Préparation des bibliothèques

---



**ETES-VOUS D'ACCORD : « Une fragmentation n'est pas nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de plasma. »**

**VOTEZ**

# Préparation des librairies

---



- Lors de la mise en place d'un panel maison ou commercial non marqué CE-IVD ou IVDR, une validation de méthode doit être réalisée comme définie dans le SH-GTA04 du COFRAC. Cette validation permet d'en connaître ses limites et ses performances.
- Lors de la mise en place d'un panel marqué CE-IVD ou IVDR, seule une vérification de méthode comme définie dans le SH-GTA 04 du COFRAC est nécessaire. Cette vérification permet de s'assurer de sa conformité avec les performances annoncées par le fournisseur.
- Le choix de la taille du panel (footprint) est à fixer en fonction des capacités de l'instrument NGS disponible au laboratoire.
- Si le laboratoire en a la possibilité, l'automatisation du workflow est conseillée afin d'optimiser l'identitovigilance des échantillons.

# Séquençage

---



## Conseillé :

« La profondeur de séquençage doit être adaptée en fonction de la méthode et de la sensibilité attendue. La sensibilité optimale pour un testing ADNtc est d'au moins 0,5 % en fonction des conditions du test (au diagnostic ou lors d'une suspicion de rechute). »

## **ETES-VOUS D'ACCORD POUR AJOUTER :**

« Lors de l'utilisation d'UMI, le nombre de reads (x) peut être de l'ordre de 10,000x avant déduplication/groupement des UMI et 800x après, pour une sensibilité de l'ordre de 0,5 %. »

# Séquençage

---



« Il est recommandé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) par run. »

**ETES-VOUS D'ACCORD AVEC LA PROPOSITION ALTERNATIVE CI-APRÈS :**

« Il est conseillé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) par run. »

**VOTEZ**

# Séquençage

---



- Le contrôle interne de qualité (témoin positif) doit autant que possible reproduire les caractéristiques des acides nucléiques circulants, notamment la taille des fragments entre 140 et 180 bp.
- Il est recommandé d'utiliser un témoin positif contenant des altérations de différents types (insertion, substitution, délétion...) sur différents loci représentatifs du panel de gènes utilisé.
- Il est recommandé d'utiliser un témoin positif dont les variants ont une fréquence allélique proche de la limite de détection de la technique utilisée par le laboratoire.
- Si les témoins positifs disponibles ne couvrent pas certaines altérations, il est possible de réaliser des échanges inter laboratoires.

# Séquençage

---



**ETES-VOUS D'ACCORD : « Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin négatif à chaque run. »**

**VOTEZ**

# Séquençage

---



- Dans l'intervalle, une analyse bioinformatique des similarités de polymorphismes permet d'évaluer la possible contamination à chaque run.
- Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour le séquençage.

# Phase post-analytique

- Pensez-vous indispensable d'utiliser des UMI dans la préparation des bibliothèques pour un meilleur traitement bioinformatique des données ?
- Pensez-vous utiliser une « whitelist » pour filtrer les variants ?
- Pensez-vous utile de voir figurer le taux de déduplication ou la couverture avant/après déduplication sur le rapport d'analyse du pipeline ?
- Pensez-vous que la création d'un groupe de travail d'une société savante en bioinformatique (BioInfoDiag) serait utile pour fournir des recommandations sur les outils à utiliser (déduplication par UMI, variant calling, ...) ?
- Est-ce que vous souhaitez avoir une recommandation concernant la couverture minimale pour atteindre la LoD souhaitée ?

[A revoir dans le cadre de recommandation sur la bioinformatique](#)

# Bioinformartique

---



- Il est possible d'utiliser des FASTQ ("patients synthétiques" ou *in silico*) afin de valider le pipeline et réaliser les tests de non-régression.
- Il est possible d'utiliser des FASTQ de patients déjà analysés par le laboratoire afin de valider le pipeline et réaliser les tests de non-régression.
- Sauf cas particulier, il est recommandé d'utiliser toujours le même set de FASTQ pour réaliser les tests de non-régression lors de la montée de version d'un pipeline.
- L'évaluation de l'hématopoïèse clonale pourrait permettre de fiabiliser le résultat.

## Compte-rendu des résultats

---



**ETES-VOUS D'ACCORD : « La fréquence allélique (VAF) doit apparaitre dans les résultats du compte-rendu à titre indicatif (mais pas dans la conclusion). »**

**VOTEZ**

REVIEW

## How to read a next-generation sequencing report—what oncologists need to know

S. Schmid<sup>1,2\*</sup>, W. Jochum<sup>3</sup>, B. Padberg<sup>3</sup>, I. Demmer<sup>3</sup>, K. D. Mertz<sup>4</sup>, M. Joerger<sup>1</sup>, C. Britschgi<sup>5</sup>, M. S. Matter<sup>6</sup>, S. I. Rothschild<sup>7</sup> & A. Omlin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Medical Oncology and Hematology, Cantonal Hospital St. Gallen, St. Gallen; <sup>2</sup>Inselspital Berne, University of Berne, Bern; <sup>3</sup>Institute of Pathology, Cantonal Hospital St. Gallen, St. Gallen; <sup>4</sup>Institute of Pathology, Cantonal Hospital Baselland, Liestal; <sup>5</sup>Department of Medical Oncology and Hematology, University Hospital Zürich, Zürich; <sup>6</sup>Institute of Pathology, University Hospital of Basel, University of Basel, Basel; <sup>7</sup>Department of Medical Oncology and Comprehensive Cancer Center, University Hospital Basel, Basel, Switzerland



Available online 29 September 2022

The report should include in detail what has actually been tested. Optionally also negative results, in particular if they have been requested, can be reported in a disease-specific manner (e.g. *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* status for colorectal cancer). Methodologic details should be provided in a separate section and include description of the test, sequencing instrument, assay performance characteristics (including limit of detection and minimal depth of sequencing coverage), critical quality metrics for the assay run and analysis pipeline. The report should also include the sequencing coverage cut-off for the NGS assay used. All genes and/or hot spots not meeting the minimal required

sequencing coverage criteria should be declared in the report.

Several classification systems have been developed to value the clinical significance (actionability) of genomic alterations.<sup>11,24,28</sup> The classification recommended by major clinical and pathological associations in the USA uses a four-tiered system and classifies variants according to their clinical impact integrating FDA approval for specific therapy.<sup>24</sup> According to the ESMO-recommended ESCAT guidelines, all detected genetic alterations should ideally be classified into:

Schmid S. *et al.* *ESMO Open*. 2022 Oct;7(5):100570.



familiar with it. For variants, the genomic coordinates, genome build and transcript reference sequence (e.g. NM\_004333.4) should be provided. Allele fraction (VAF) along with tumor cell content should also be included in the report. This allows the results to be tested for plausibility and may give some indication of a possible germline mutation. According to recent recommendations, gene fusions



# Compte-rendu des résultats

---



« Le pourcentage de couverture des gènes doit apparaitre dans le compte-rendu. »

**ETES-VOUS D'ACCORD AVEC LA PROPOSITION ALTÉRANTIVE CI-APRÈS :**

« Le pourcentage de couverture des panels doit apparaitre dans la section méthode du compte-rendu. »

**VOTEZ**

# Compte-rendu des résultats

---



- Pour les gènes ayant un impact familial, lorsque la VAF est  $>30\%$  et selon l'âge et historique de la maladie, une orientation vers une consultation d'oncogénétique est nécessaire.
- Pour les gènes les plus connus, il est recommandé de mentionner dans le compte-rendu l'éventualité que les résultats puissent être liés à une CHIP.
- En l'absence d'altération détectée, et si la technique ne permet d'évaluer la fraction tumorale, il est recommandé d'ajouter dans la conclusion du compte-rendu qu'un résultat négatif ne préjuge pas de la présence ou de l'absence d'ADN tumoral circulant dans le prélèvement.

# MERCI DE VOTRE ATTENTION

Avec la participation  
scientifique du

