



Groupe Francophone de Cytogénomique Oncologique

RECOMMANDATIONS
DU GFSCO

Usage de la biopsie liquide en oncologie en France

Version 1 - Validée le 01/12/2025

Recommandations du GFCO sur l'usage de la biopsie liquide en oncologie en France

Résumé

L'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) par biopsie liquide, constitue une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de cancer. Cette technique offre une méthode peu invasive pour détecter les altérations génétiques des tumeurs, facilitant un suivi personnalisé des patients.

Afin de standardiser son usage en France, le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique (GFCO) a établi des recommandations nationales. Ces recommandations, qui couvrent les phases pré-analytiques (collecte et conservation des échantillons), analytiques (préparation des librairies, utilisation d'identifiants moléculaires uniques et profondeur de séquençage) et post-analytiques (clarté des comptes-rendus), ont été établies selon la méthodologie DELPHI, un processus structuré visant à recueillir un consensus d'experts via des consultations anonymes et itératives. Ce cadre rigoureux favorise des accords collectifs solides sur des points critiques. Un questionnaire a été envoyé à 55 plateformes de biologie moléculaire en France, spécialistes de la biopsie liquide, avec 39 réponses obtenues, soit un taux de participation notable de 71 %.

Ces efforts visent à aligner les pratiques nationales sur les standards internationaux tout en tenant compte de la réalité du terrain les laboratoires. Ils doivent ainsi renforcer la fiabilité des analyses en favorisant pleinement l'intégration de la biopsie liquide dans la médecine de précision.

I. Intérêt de la « biopsie liquide » en France et en Europe

Les choix thérapeutiques en oncologie sont de plus en plus guidés par des approches basées sur des informations moléculaires. Dans ce contexte, l'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) par biopsie liquide, a ce potentiel de transformer la prise en charge des patients atteints de cancers solides. Cette approche innovante par sa capacité à détecter des altérations génétiques tumorales via une simple prise de sang ou une ponction de fluides biologiques, représente une avancée significative par rapport aux biopsies tissulaires traditionnelles, souvent invasives, lourdes à mettre en œuvre, et limitées pour l'évaluation de l'hétérogénéité tumorale (1). En Europe comme en France, cette technologie soulève à la fois des espoirs immenses et des défis technologiques complexes, nécessitant une validation rigoureuse.

Sur le plan clinique, la biopsie liquide permet d'obtenir des informations moléculaires sur l'évolution spatio-temporelle tumorale, favorisant ainsi une adaptation rapide des schémas thérapeutiques. Elle s'avère particulièrement utile pour les patients atteints de cancers, où elle peut mettre en évidence des altérations moléculaires essentielles pour guider les décisions thérapeutiques, comme l'introduction d'inhibiteurs de kinase spécifiques ou d'immunothérapies (2). Toutefois, bien que cette technologie présente de nombreux avantages, son adoption à grande échelle est conditionnée par la résolution de plusieurs points techniques, incluant ses limites dans la détection des fusions et réarrangements géniques et des modifications du nombre de copies, ainsi que l'apparition de faux positifs liés à des phénomènes biologiques tels que l'hématopoïèse clonale (CHIP) (3). Cette approche est désormais mature et doit être guidée par des recommandations professionnelles.

Face à ces enjeux, le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique (GFCO) s'est mobilisé pour structurer et normaliser l'usage de la biopsie liquide et a entrepris une démarche visant à établir des recommandations consensuelles destinées à encadrer le testing somatique de l'ADNtc. Pour y parvenir, le GFCO a interrogé les plateformes françaises de biologie moléculaire ayant une expertise reconnue dans ce domaine. Historiquement, le GFCO avait publié les premières recommandations sur la biopsie liquide pour donner suite à ses conférences annuelles favorisant les échanges entre les professionnels de la génétique tumorale (4).

L'objectif de ce projet est de couvrir toutes les étapes du processus, des phases pré-analytiques critiques – incluant les choix de tubes de prélèvement et les conditions de transport et stockage des échantillons – aux phases analytiques et post-analytiques, en mettant un accent particulier sur les capacités du séquençage de nouvelle génération (NGS) pour détecter les mutations avec un haut degré de sensibilité et de spécificité. Une session de discussion et de vote, organisée lors des Journées du GFCO 2024, a permis d'aboutir à un niveau de consensus robuste ($\geq 80\%$ d'accord) pour plusieurs points techniques clés. Ces recommandations, bien que centrées sur l'échelon national, s'appuient sur des principes universels susceptibles d'améliorer la qualité diagnostique et de standardiser les pratiques.

Cette démarche française s'inscrit dans le cadre les recommandations des sociétés savantes internationales, telles que l'European Society for Medical Oncology (ESMO). Les recommandations de l'ESMO soulignent notamment la rapidité avec laquelle les tests d'ADN tumoral circulant évoluent ainsi que la solidité croissante des preuves justifiant leur insertion dans la pratique clinique (2). Parmi les principes directeurs établis par l'ESMO, l'importance des procédures opératoires standardisées (SOPs) est particulièrement mise en avant, car elles garantissent la fiabilité des résultats rendus par le laboratoire. Il est également recommandé d'adopter une interprétation prudente des résultats, intégrant une communication claire avec les cliniciens sur la nature des variants détectés et leurs éventuelles origines germinales ou liées à CHIP. Enfin, l'ESMO identifie plusieurs applications prometteuses de l'ADNtc, notamment dans la prédiction des résistances aux traitements et la surveillance précoce des rechutes, tout en signalant qu'elles ne sont pas encore prêtes à être déployées en pratique clinique courante (2,5,6).

En France, le développement d'un cadre national adapté, promu par le GFCO, se distingue par sa volonté d'intégrer les réalités technologiques et organisationnelles locales tout en s'alignant sur les standards élevés définis par les organismes internationaux. Cette double approche garantit que la biopsie liquide pourra être utilisée de manière optimale pour répondre aux enjeux croissants dans la prise en charge des cancers. Le travail s'appuiera essentiellement sur l'indication diagnostique initiale ou en progression. Il ne traitera pas des applications émergentes telles que le dépistage précoce des cancers basé sur l'ADNtc ou le suivi thérapeutique qui nécessiteront des recommandations adaptées et qui ne sont pas encore pleinement intégrées dans la pratique.

II. Méthodologie et recueil des réponses

II.1. Constitution du groupe de travail

Un groupe de travail, composé de 8 biologistes et de 2 bio-informaticiens, a été constitué par le GFCO afin d'élaborer un questionnaire national. La liste détaillée du groupe de travail est présentée en annexe VIII.1.

II.2. Élaboration et transmission du questionnaire

La méthode choisie pour cette étude est celle du consensus DELPHI.

Paramètres de la méthode de consensus DELPHI (7).

Un questionnaire a été élaboré par les organisateurs et soumis aux plateformes impliquées. Chaque proposition faisait l'objet d'un accord ou désaccord exprimé par chaque participant. Les résultats ont ensuite été analysés et partagés avec l'ensemble du groupe afin d'aboutir à un consensus sur les recommandations formulées.

Dans notre étude, le questionnaire portait sur différents aspects du séquençage de l'ADN tumoral circulant *ou testing ADNtc*, depuis la phase pré-analytique jusqu'à la phase post-analytique. L'objectif était de recueillir l'avis des plateformes françaises et de dégager un consensus sur chaque élément de recommandation, ce consensus étant défini par un accord d'au moins 80% des participants. Pour recueillir ces avis, un questionnaire en ligne a été adressé à l'ensemble des plateformes françaises dont au moins une personne est membre du GFCO et qui réalise des analyses en biopsie liquide. Un délai de 3 semaines a permis de recueillir 39 réponses sur 55 laboratoires sollicités (taux de réponse de 71%).

Le questionnaire initial est présenté en annexe VIII.2 et la liste des répondants en annexe VIII.3.

II.3. Définition du consensus

Pour les points n'ayant pas initialement atteint ce seuil de consensus lors de la diffusion du questionnaire, un travail de reformulation (liste des reformulations en annexe VIII.4.) suivi d'une session de discussion et de vote ont été organisés lors des Journées du GFCO 2024 (13-14 décembre 2024, Paris, France). L'objectif de cette session était de permettre un échange entre les experts et de potentiellement aboutir à un consensus par un vote en direct.

Au moment du questionnaire initial, une personne par plateforme était désignée pour être représentante du laboratoire pour donner son vote en session des Journées du GFCO. Le jour de la session de vote, une seule personne par plateforme pouvait donc voter. Les votes ont été réalisés via l'application Slido. A la fin de la session de votes, les participants souhaitant faire partie du groupe de relecture ont indiqué leur nom et contact (liste des relecteurs de ce document présentée en annexe VIII.5.).

Les résultats présentés dans ce document sont donc issus de ce processus de consultations et de votes. Les recommandations établies feront l'objet d'une mise à jour et d'une revue nationale, en vue d'une publication ultérieure.

Les points donnant lieu à plus de 80% de votes concordants donnent lieu à des recommandations (médiane habituelle de consensus DELPHI : 75%) (7). Pour les points n'ayant pas atteint 80%, le groupe de travail considère que le niveau de preuve et d'adhésion n'est pas suffisant pour émettre une recommandation nationale claire.

L'organisation globale de l'écriture de ces recommandations est résumée dans la **Figure 1**.

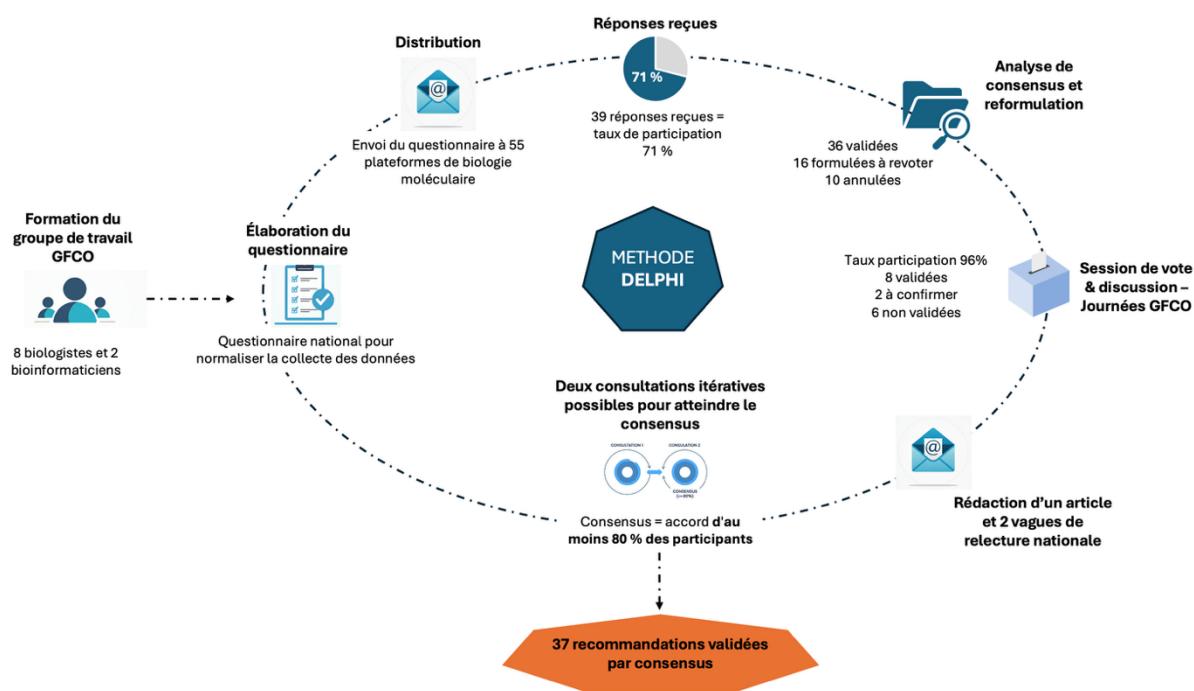


Figure 1 : Organisation globale pour l'écriture des recommandations. La méthode choisie pour cette étude est celle du consensus DELPHI, à partir d'un questionnaire national. Le questionnaire portait sur différents aspects du séquençage de l'ADN tumoral circulant ou testing ADNtc, depuis la phase pré-analytique jusqu'à la phase post-analytique.

III. Recommandations

Les recommandations suivantes ont obtenu un consensus supérieur ou égal à 80% lors du processus de consultation et de vote. Elles sont structurées selon les différentes phases du processus de testing de l'ADNtc.

III.1. Phase pré-analytique

III.1.1. Transport :

Phase pré-analytique	Recommandation	Consensus
Transport	1. Pour les laboratoires ne pouvant pas prendre en charge les échantillons sanguins le week-end ou en cas de prise en charge impossible dans les 3-4h après le prélèvement, des tubes avec stabilisateurs doivent être utilisés.	97.8%
	2. Privilégier une prise en charge du prélèvement le plus rapidement possible y compris lorsque les notices de fournisseurs indiquent des temps supérieurs.	97.1%
	3. Les conditions de prélèvement, stockage et transport fournis par le fournisseur doivent apparaître sur les fiches de prescription (en plus du manuel de prélèvement).	91.4%

Les résultats de ce questionnaire, qui ont conduit à un consensus supérieur ou égal à 80% sur les recommandations relatives à la phase pré-analytique du testing ADNtc, témoignent de la nécessité d'une standardisation des pratiques pour garantir la qualité et la fiabilité des analyses.

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 1. L'adoption quasi unanime de cette recommandation souligne l'enjeu majeur posé par la bonne conservation des échantillons lorsqu'ils ne peuvent pas être traités immédiatement. En effet, la stabilité du de l'ADNtc dans le plasma est l'un des facteurs déterminants pour la précision des résultats (5). Les tubes contenant des stabilisateurs d'acides nucléiques permettent de ralentir la dégradation de l'ADN libre circulant (cfDNA) et d'assurer des conditions optimales de conservation, même en cas de délais prolongés entre le prélèvement et l'analyse (8). Cette mesure garantit une bonne conservation de l'ADNtc, tout en offrant une réponse pratique aux contraintes logistiques des laboratoires.

Recommandation 2. La rapidité de la prise en charge des prélèvements constitue un critère essentiel pour préserver l'intégrité des échantillons et optimiser les analyses. Une telle recommandation met en avant l'importance des délais réduits, même si les notices des fabricants mentionnent une stabilité éventuelle plus longue. Les recommandations ESMO soulignent que les facteurs pré-analytiques, notamment les temps de stockage et de transport, peuvent avoir un impact direct sur la précision des résultats et la sensibilité des tests ADNtc (2). Encourager une prise en charge accélérée dépasse donc simplement les standards techniques et s'inscrit dans une volonté d'amélioration continue des pratiques nationales.

Recommandation 3. Cette recommandation met l'accent sur la sensibilisation des cliniciens et des prescripteurs aux bonnes pratiques en matière de transport des échantillons. En alignement avec les recommandations de l'ESMO (2), l'introduction de ces mentions sur les fiches de prescription représente une initiative en faveur de la traçabilité et de l'harmonisation entre les différents acteurs impliqués. Ces informations sont cruciales pour garantir la fiabilité des résultats notamment en réduisant les risques de faux négatifs, et réduire les risques de contamination ou de détérioration des échantillons.

III.1.2. Préparation de l'échantillon :

Phase pré-analytique	Recommandation	Consensus
Préparation de l'échantillon	4. À réception du prélèvement sanguin (au moins 2 tubes de 10mL), 2 centrifugations sont nécessaires avec une seconde centrifugation plus rapide que la première (par exemple 10 minutes à 1600g puis 10 minutes à 14,000g, la seconde centrifugation ne pouvant être inférieure à 3000g)	87.37%
	5. Le plasma (au minimum 4mL) peut être stocké à -80°C à l'issue de la seconde centrifugation (tolérance pour un stockage intermédiaire de 48h à -20°C)	85.7%
	6. Eviter les congélations et décongélations successives des plasmas.	97.83%
	7. Si une analyse d'hématopoïèse clonale est envisagée, un aliquote de sang total ou un culot cellulaire de la première centrifugation doit être conservé.	83.91%

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 4. La recommandation d'effectuer deux centrifugations, avec une seconde plus rapide que la première, répond à une exigence technique visant à minimiser la contamination par les débris cellulaires, les plaquettes, la fibrine et les leucocytes (5). Cette étape de double centrifugation, recommandée également par l'ESMO et l'International Liquid Biopsy Society (ILBS), permet de garantir une qualité optimale des échantillons avant l'analyse, réduisant les risques de faux positifs ou d'échec technique liés à des contaminations résiduelles (2,9).

Recommandation 5. Le consensus autour du stockage des plasmas à -80°C, avec une tolérance pour un stockage intermédiaire à -20°C pendant 48 heures, traduit une préoccupation majeure pour la conservation des échantillons. Il est bien établi dans la littérature que l'ADNtc est particulièrement vulnérable à la dégradation lorsqu'il est exposé à des variations de température ou insuffisamment réfrigéré (5). Ce protocole de stockage strict, bien qu'exigeant sur le plan organisationnel, est un élément clé pour préserver l'intégrité des acides nucléiques et maximiser la robustesse des résultats pré-analytiques.

Recommandation 6. La recommandation visant à éviter les cycles de congélation/décongélation successifs a recueilli un consensus quasi unanime. Cette exigence est fondée sur des données

expérimentales qui démontrent que ces variations thermiques peuvent fragmenter de manière irréversible les molécules d'ADN, compromettant ainsi la qualité et la sensibilité des tests sur ADNtc.

Recommandation 7. Cette recommandation illustre une approche préventive essentielle pour répondre aux ambiguïtés diagnostiques liées à l'hématopoïèse clonale (CHIP), dont la prévalence réelle est estimée à environ 5 % chez les individus de moins de 70 ans et augmente avec l'âge (3). Le gène *TP53* constitue un point critique, associé à un risque élevé de progression vers des néoplasmes myéloïdes liés aux traitements (3,10). Par ailleurs, Pascual et al. ont souligné que jusqu'à 10 % des patients pourraient être incorrectement diagnostiqués à cause de faux positifs issus de variants CHIP confondants (2). La conservation d'un échantillon de sang total ou d'un culot cellulaire permet des analyses complémentaires précises grâce à des outils avancés, renforçant la distinction entre les mutations tumorales et les altérations liées à la CHIP.

III.1.3. Extraction d'ADN et contrôle qualité :

Phase pré-analytique	Recommandation	Consensus
Extraction d'ADN et contrôle qualité	8. Une quantification de l'ADN extrait est recommandée avec un kit adapté à l'analyse de l'ADNtc.	91.2%
	9. Il est conseillé de procéder à une analyse de la taille de fragments afin d'estimer une potentielle contamination du prélèvement par de l'ADN génomique.	88.5%

Les recommandations validées concernant l'extraction d'ADN et le contrôle qualité dans le cadre du *testing* ADNtc illustrent l'importance accordée aux étapes critiques de validation technique avant l'analyse moléculaire. Elles établissent des standards pour garantir la fiabilité et l'intégrité des résultats.

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 8. La recommandation d'effectuer une quantification systématique de l'ADN extrait souligne l'importance d'évaluer la qualité et la quantité des acides nucléiques avant toute analyse. Une quantification inadéquate ou négligée pourrait conduire à des échecs expérimentaux ou des résultats inexploitables et par conséquent à des erreurs d'interprétation, dans un contexte clinique.

Recommandation 9. L'analyse de la taille des fragments d'ADN est essentielle pour détecter une contamination par de l'ADN génomique, souvent issu de la lyse cellulaire résiduelle, pouvant compromettre l'interprétation des données. Franczak 2019 rappelle que l'ADNtc a une taille caractéristique de 150 à 180 paires de bases due à son origine apoptotique, contrastant avec l'ADN génomique plus long lié à d'autres mécanismes de mort (lyse cellulaire) (11). En revanche, dans les autres liquides que le sang, l'ADNtc peut être de plus grande taille (12-14). De plus, avec l'essor du séquençage long read, l'identification de long cell-free DNA peut avoir un intérêt clinique. Pascual et al., mentionnent également que la détection des variants tumoraux est

particulièrement vulnérable aux interférences provenant de contaminants, susceptibles de produire des résultats faussement négatifs (2). Cette analyse constitue donc une vérification cruciale de l'intégrité et de la spécificité du matériel génétique isolé. L'intégration de cette recommandation dans les protocoles de laboratoire contribue à limiter les biais analytiques et à garantir une représentation authentique des altérations génomiques tumorales, élément clé pour adapter les traitements en oncologie.

III.2. Phase analytique pour la technique NGS

III.2.1. Préparation des librairies :

Phase analytique pour la technique NGS	Recommandation	Consensus
Préparation des librairies	10. Le protocole est à adapter entre FFPE et ADNtc.	97.1%
	11. L'utilisation d'UMI est recommandée quelle que soit la technologie (Capture ou Amplicon) choisie pour le séquençage de l'ADNtc.	100.0%
	12. 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.	97.2%
	13. 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.	91.9%
	14. Le choix de la taille du panel (footprint) est à fixer en fonction des capacités de l'instrument NGS disponible au laboratoire.	80.0%
	15. Si le laboratoire en a la possibilité, l'automatisation du workflow est conseillée afin d'optimiser l'identitovigilance des échantillons.	97.1%
	16. Une fragmentation n'est pas nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de plasma.	100.0%
	17. Une ligation des UMIs est préférée à une intégration par PCR.	95.2%

Les recommandations validées pour la phase analytique de la technique de séquençage de nouvelle génération (NGS) dans le cadre du *testing* ADNtc démontrent une attention particulière à la standardisation, la robustesse méthodologique et l'optimisation des workflows.

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 10. La nécessité d'adapter les protocoles en fonction du type d'échantillon, c'est-à-dire le FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) par rapport à l'ADNtc, souligne les différences biologiques et techniques entre ces matrices. L'ADNtc est généralement présent en très faible quantité et dans un état fragmenté (11), ce qui requiert des optimisations spécifiques des protocoles pour garantir une récupération et une amplification maximale. Cette recommandation reflète ainsi une compréhension approfondie des caractéristiques des échantillons et de leur impact sur les résultats analytiques.

Recommandation 11. L'intégration d'identifiants moléculaires uniques (UMIs) est unanimement reconnue comme essentielle, quelle que soit la technologie choisie (Capture ou Amplicon). Ces UMIs permettent d'améliorer la sensibilité/LOD (limit of detection) et de limiter les biais liés aux variations d'efficacités d'amplification ou d'erreurs de séquençage, des étapes critiques pour obtenir des séquences nucléotidiques fiables de l'ADNtc. Cette approche renforce la sensibilité et la spécificité des méthodes NGS (15). En garantissant la fiabilité des données, l'utilisation des UMIs s'impose comme une norme incontournable pour les laboratoires travaillant sur l'ADNtc.

Recommandations 12 et 13. Bien qu'il existe un certain nombre de tests validés (16), la distinction claire entre la validation des panels non marqués CE-IVD ou IVDR et la vérification des panels marqués met en lumière une démarche rigoureuse visant à assurer la reproductibilité, la standardisation et la conformité des recherches moléculaires. Ces validations permettent de définir les limites des outils employés et de garantir que les tests fournissent des données exploitables en clinique. Elles sont réalisées en lien avec le guide technique édité par le COFRAC, le SH-GT04, lui-même aligné sur les standards internationaux (17).

Recommandation 14. Le choix de la taille du panel doit être adapté aux capacités des instruments NGS disponibles, soulignant l'importance de l'adéquation entre les ressources techniques et les ambitions analytiques. Bien que ce consensus soit légèrement inférieur aux autres recommandations, il reflète une prise en compte réaliste de l'hétérogénéité des infrastructures de laboratoire.

Recommandation 15. L'automatisation est recommandée afin d'optimiser l'identitovigilance et réduire les erreurs humaines. Cette mesure, bien que logistique, joue un rôle fondamental dans la gestion efficace d'échantillons.

Recommandation 16. L'absence de nécessité de fragmentation pour les acides nucléiques extraits du plasma dans le cadre de la préparation NGS par capture met en évidence l'efficacité de cette approche pour travailler avec des fragments naturellement courts, comme ceux de l'ADNtc (11).

Recommandation 17. Privilégier la ligation des UMIs plutôt que leur intégration par PCR permet de minimiser les biais d'amplification de PCR et séquençage short-read (9).

III.2.2. Séquençage :

Phase analytique pour la technique NGS	Recommandation	Consensus

Séquençage	18. La profondeur de séquençage doit être adaptée en fonction de la méthode et de la sensibilité attendue. La sensibilité optimale pour un <i>testing</i> ADNtc est d'au moins 0,5 % en fonction des conditions du test (au diagnostic ou lors d'une suspicion de rechute).	94.5%
	19. Il est conseillé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) par run.	90.22%
	20. 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.	91.2%
	21. Il est recommandé d'utiliser un témoin positif contenant des altérations de différents types (insertion, substitution, délétion...) sur différents <i>loci</i> représentatifs du panel de gènes utilisé.	94.5%
	22. 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.	100.0%
	23. Si les témoins positifs disponibles ne couvrent pas certaines altérations, il est possible de réaliser des échanges inter laboratoires.	93.9%
	24. Une analyse bio-informatique sur les variants polymorphiques permet d'évaluer la possible contamination à chaque run.	91.7%
	25. Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour le séquençage.	91.2%
	26. Il est indispensable d'utiliser des UMI dans la préparation des librairies pour un meilleur traitement bio-informatique des données.	97.0%
	27. Il est utile de voir figurer le taux de déduplication ou la couverture avant/après déduplication dans les données de sortie du pipeline bioinformatique.	96.3%

	28. 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, ...).	100.0%
	29. Il serait souhaitable d'avoir une recommandation concernant la profondeur minimale pour atteindre la LoD souhaitée.	87.9%

Les recommandations validées pour la phase analytique de séquençage dans le cadre du *testing* ADNtc illustrent un effort cohérent de standardisation et d'amélioration des pratiques pour garantir la fiabilité des analyses.

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 18. Pour la recherche de variants à haute résolution, l'ajustement de la profondeur de séquençage en fonction des besoins techniques et cliniques est essentiel pour atteindre une sensibilité optimale de 0,5 %, notamment lors du diagnostic ou en cas de suspicion de rechute. Cette recommandation vise à optimiser la performance diagnostique tout en tenant compte des variabilités techniques des équipements. La profondeur de couverture visée doit être de l'ordre de 1,000x en lectures uniques pour atteindre une sensibilité de 0.5%. En pratique, le rendement de la déduplication par UMI étant d'environ 10% dans des conditions optimales, il est essentiel de tenir compte de cette réduction lors du calcul de la profondeur à atteindre et donc viser une profondeur de couverture de l'ordre de 10,000x avant déduplication (**Figure 2**) (18).

Recommandation 19. L'analyse d'un témoin positif par run permet d'assurer un contrôle qualité systématique, et de minimiser les erreurs analytiques. En reproduisant les caractéristiques des acides nucléiques circulants, le contrôle interne améliore la représentativité des conditions réelles d'échantillon. Cette mesure est particulièrement pertinente dans le cadre du *testing* de l'ADNtc où l'intégrité des échantillons reste un point de vigilance critique.

Recommandations 20, 21, 22, et 24. Les recommandations relatives à l'utilisation de témoins positifs contenant des altérations de divers types et des fréquences proches de la limite de détection garantissent une évaluation réaliste des performances techniques des laboratoires. Elles permettent de valider les capacités des panels NGS à détecter non seulement des mutations récurrentes mais aussi des altérations moins fréquentes ou spécifiques.

Recommandations 23 et 25. La participation à une évaluation externe de la qualité (EEQ) est imposée par la norme ISO15189. En l'absence de programme d'EEQ adéquate, les laboratoires peuvent organiser un contrôle inter-laboratoire en échangeant des échantillons. L'EEQ doit être en adéquation avec le type de variant recherché par la technique du laboratoire.

Recommandations 26 et 27. L'utilisation des UMIs lors de la préparation des librairies est unanimement soutenue. Le taux de déduplication ou la couverture sont des éléments essentiels pour une bonne maîtrise de l'analyse.

Recommandations 28 et 29. La création d'un groupe de travail dédié en bio-informatique comprendra des laboratoires publics, privés et des sociétés savantes (telles que BioInfoDiag) et l'élaboration de recommandations sur la couverture minimale témoignent d'une démarche proactive pour harmoniser les outils, les stratégies d'analyse et les seuils méthodologiques

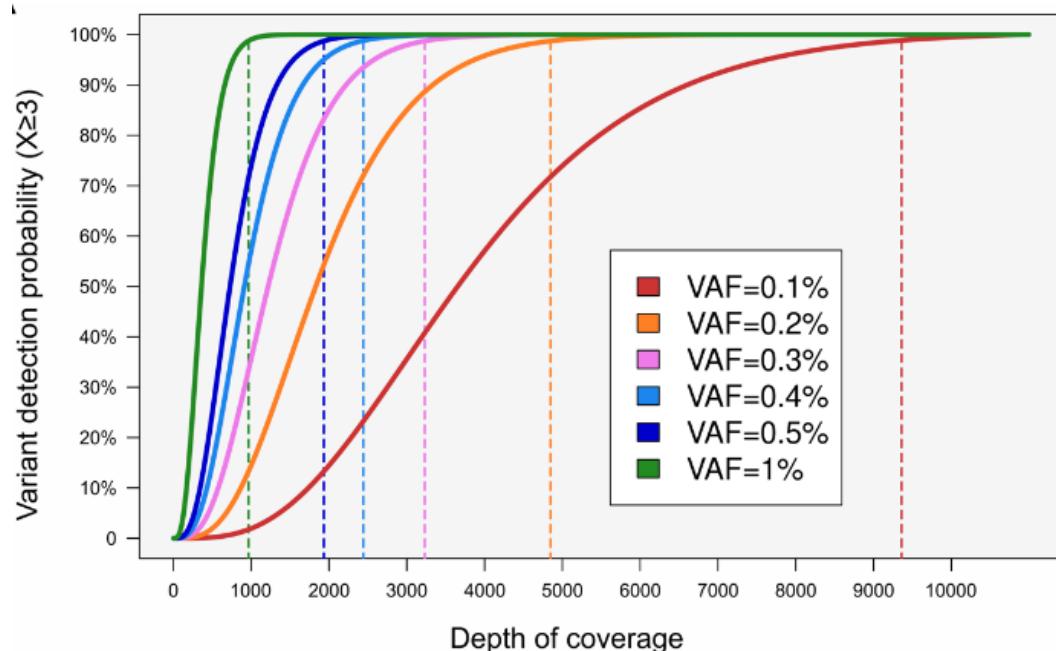


Figure 2. Impact de la profondeur de couverture (DoC) sur la probabilité de détection des variants en fonction de la fréquence des allèles variants (VAF) dans l'analyse de routine de l'ADNtc. Probabilité de détection d'une altération génétique soutenue par au moins trois lectures uniques, représentée en fonction de la DoC pour six VAF différentes allant de 0,1 % à 1 %. Les lignes verticales en pointillés indiquent la DoC nécessaire pour obtenir une probabilité de détection de 99 %. La profondeur est indiquée après déduplication (18).

III.3 Phase post-analytique

III.3.1. Bio-informatique :

Phase post-analytique	Recommandation	Consensus
Bioinformatique	30. Il est possible d'utiliser des fastq ("patients synthétiques" ou <i>in silico</i>) afin de valider le pipeline et réaliser les tests de non-régression.	82.8%
	31. 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, tout en respectant le cadre RGPD.	97.1%

	32. 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.	96.6%
	33. L'évaluation de l'hématopoïèse clonale pourrait permettre de fiabiliser le résultat.	100.0%

Les recommandations validées pour la phase analytique en bio-informatique dans le cadre du *testing* ADN tumoral circulant (ADNtc) témoignent d'une prise en compte avancée des défis liés à l'analyse et au traitement des données générées par le séquençage de nouvelle génération (NGS). Ces directives, élaborées par consensus, soulignent l'importance de la standardisation des méthodologies et des outils bio-informatiques pour garantir des résultats précis et fiables. Ces recommandations ne sont pas spécifiques à l'analyse de l'ADNtc, mais peuvent s'étendre également aux analyses tumorales tissulaires et constitutionnelles.

Analyse des recommandations validées

Recommandations 30 et 31. L'utilisation de fichiers fastq, patients synthétiques (*in silico*) ou issus de données produites par le laboratoire, pour valider les pipelines bio-informatiques démontre une approche rigoureuse de contrôle qualité. L'utilisation de fichiers fastq existants génère un avantage pratique clair pour les laboratoires, leur permettant d'effectuer des tests de non-régression sans avoir recours à l'analyse de nouveaux échantillons. Cette démarche garantit également une continuité méthodologique dans l'évaluation des performances, particulièrement pertinente lors de l'introduction de nouvelles versions de pipelines.

Recommandation 32. La recommandation d'utiliser toujours le même ensemble de fichiers fastq, sauf cas particulier, pour les tests de non-régression lors des mises à jour des pipelines bio-informatiques contribue à réduire la variance expérimentale. Cette uniformité fournit aux laboratoires un cadre standard de comparaison, conforme avec une logique de reproductibilité et de robustesse des analyses.

Recommandation 33. L'évaluation de l'hématopoïèse clonale (CHIP - Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential) est un outil essentiel pour fiabiliser les résultats. La méthode de référence consiste à séquencer de l'ADN extrait des leucocytes du même prélèvement. Pour des contraintes techniques, éthiques ou financière, une étude bibliographique reste possible notamment pour des gènes connus comme *TP53*, *DNMT3A*, *TPNMD*, *TET2*, *ASXL1* ou *PPM1D*.

III.3.2. Compte-rendu des résultats :

Phase post-analytique	Recommandation	Consensus
	34. La fréquence allélique (VAF) doit apparaître dans les résultats du compte-rendu à titre indicatif.	93.88%

Compte-rendu des résultats	35. Si des altérations pathogéniques sont détectées dans un gène avec un impact familial potentiel, notamment lorsque la VAF est supérieure à 30 %, le compte rendu doit stipuler qu'une orientation vers une consultation d'oncogénétique peut être nécessaire en fonction du contexte clinique et familial.	93.3%
	36. Pour les gènes les plus connus, il est recommandé de mentionner dans le compte-rendu l'éventualité que les résultats puissent être liés à de la CHIP.	100.0%
	37. En l'absence d'altération détectée, et si la technique ne permet pas 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.	97.2%

Les recommandations validées concernant le compte-rendu des résultats dans le cadre du *testing ADNtc* mettent en avant des pratiques essentielles pour garantir une interprétation claire et appropriée des données générées. Ces directives permettent non seulement de structurer les résultats mais aussi d'anticiper les implications cliniques dans des contextes variés. Elles s'alignent parfaitement avec les recommandations émises par différentes sociétés savantes, comme l'ESMO (19) ou de l'European Liquid Biopsy Society (ELBS) (20).

Analyse des recommandations validées :

Recommandation 34. L'inclusion de la fréquence allélique (VAF) à titre indicatif dans les résultats du compte-rendu, vise à fournir aux cliniciens des données complémentaires nécessaires pour interpréter les résultats. La proportion d'ADN tumoral circulant détectée peut varier selon le stade de la maladie ou les limites techniques (21), rendant essentielle une présentation réfléchie et standardisée de ces informations. Le suivi longitudinal de la VAF permet d'évaluer l'évolution de la maladie et d'orienter potentiellement les choix thérapeutiques. À noter que ces recommandations concernent uniquement la biopsie liquide à visées diagnostique ou théranostique et ne s'appliquent pas à la mesure de la maladie résiduelle.

Recommandation 35. Une consultation en oncogénétique peut être nécessaire, en particulier lorsque des résultats génétiques soulèvent des interrogations sur des mutations de prédisposition au cancer. Cette consultation permet d'évaluer si des altérations telles que des mutations des gènes *BRCA1*, *BRCA2* ou *TP53* relèvent d'une transmission familiale ou d'une mutation spécifique de la tumeur (*de novo*). Elle contribue également à orienter des stratégies de dépistage et de prévention non seulement pour le patient, mais aussi pour ses proches à risque.

Recommandation 36. La recommandation de signaler, pour certains gènes, que les mutations détectées pourraient être liées à une hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP), marque un progrès significatif dans la gestion des faux positifs. Cette démarche garantit une meilleure interprétation des résultats en évitant des décisions cliniques inappropriées.

Recommandation 37. En cas d'absence d'altération détectée et d'incapacité technique à évaluer la fraction tumorale, inclure dans le compte-rendu une mention précisant que ce résultat ne préjuge pas de la présence ou de l'absence d'ADN tumorale circulant est une approche prudente et appropriée (19,20). Cette recommandation contribue à réduire le risque de faux négatifs tout en insistant sur l'intérêt d'une nouvelle analyse à distance en fonction du contexte clinique. Il y a un enjeu à avoir une information sur la fraction tumorale pour bien répondre à ces situations.

IV. Affirmations n'ayant pas abouti à un consensus

Les éléments identifiés dans le cadre du questionnaire concernant le *testing ADNtc*, et n'ayant pas atteint un consensus de 80%, soulèvent des questions pertinentes sur les pratiques, ressources et conditions spécifiques à plusieurs étapes critiques du processus. Ces sujets, bien qu'en cours de débat, reflètent une complexité méthodologique et organisationnelle. Leur analyse, mise en perspective avec les problématiques soulevées, permet d'exposer les enjeux et d'identifier des pistes d'amélioration, sans constituer des éléments opposables.

Parmi les principales causes de désaccord, on retrouve les divergences sur la nécessité d'utiliser des contrôles internes systématiques à chaque run ou pool de librairie, jugés souvent trop coûteux ou non indispensables en raison d'autres métriques de qualité disponibles. Ils peuvent être compensées par d'autres approches – non régression, suivi de polymorphismes... L'utilisation des UMLs ou de technologies spécifiques, bien que reconnues comme utiles, est parfois remise en question pour des raisons de faisabilité pratique ou de performance perçue des alternatives. Le stockage des extraits d'ADN à des températures spécifiques ou leur conservation à court terme soulève également des débats liés à la stabilité des échantillons. Par ailleurs, les approches analytiques, comme la quantification systématique de l'ADN extrait ou l'évaluation de la taille des fragments, font face à des réticences quant à la pertinence clinique ou aux contraintes organisationnelles. Enfin, des enjeux liés aux coûts, à la normalisation des méthodes et à la compatibilité des équipements avec les besoins cliniques soulignent les disparités entre les laboratoires et les attentes médicales. Ces désaccords reflètent l'importance d'une adaptation des recommandations aux capacités locales, tout en assurant une harmonisation des pratiques pour garantir des analyses fiables et pertinentes.

Phase pré-analytique - Transport :

Phase pré-analytique	Proposition	Consensus
Transport	NC-1. Les conditions de stockage et de transport fournies par le fournisseur doivent apparaître uniquement sur le manuel de transport.	42.9%
	NC-2. Une mention indiquant de limiter (si possible) les prélèvements le vendredi doit apparaître sur les fiches de prescription.	33.3%
	NC-3. Des tubes stabilisateurs d'ADN circulant (exemple : tube Streck) doivent être mis à disposition des centres prescripteurs.	72.8%

Les divergences observées sur les recommandations liées au transport (NC-1) et au prélèvement soulignent les contraintes pratiques et organisationnelles inhérentes aux laboratoires répartis sur différents sites et niveaux d'accessibilités. Par exemple, la faible adhésion à l'idée que les conditions de stockage et de transport apparaissent uniquement dans les manuels (42,86 %) traduit un besoin de visibilité accrue de ces informations, directement accessible aux intervenants ou simplement une liberté de faire apparaître cette information où le laboratoire le semble le plus approprié.

L'aspect logistique est également en jeu, notamment pour limiter les prélèvements le vendredi (NC-2, 33,3 %), ce qui est crucial pour assurer une gestion rapide avant dégradation des échantillons, l'organisation étant propre à chaque laboratoire. Concernant la proposition NC-3,

la proposition ne semble pas pertinente en raison de la variabilité des moyens et de l'organisation de chaque laboratoire.

Phase pré-analytique - Préparation et extraction de l'échantillon :

Phase pré-analytique	Proposition	Consensus
Préparation et extraction de l'échantillon	NC-4. A 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.	68.6%
	NC-5. Si possible, privilégier l'extraction d'ADN circulant de l'échantillon par billes magnétiques permettant d'envisager une automatisation contrairement à l'extraction par colonne.	78.8%
	NC-6. De l'eau nuclease free doit être utilisée comme contrôle d'extraction et doit suivre le même workflow que les échantillons.	68.8%

Les propositions relatives à la préparation des échantillons, telles que les étapes de centrifugation (NC-4) ou les méthodes d'extraction par billes magnétiques, reflètent des divergences d'opinion basées sur des limitations techniques ou l'accessibilité à certains équipements (78,8 % pour NC-5). L'automatisation peut réduire les erreurs humaines, mais le choix de la méthode doit s'adapter aux moyens du laboratoire. De même, le recours d'un contrôle négatif d'extraction n'a pas été jugé comme un apport suffisant pour établir une recommandation (NC-6).

Phase analytique pour la technique NGS - Séquençage et préparation des librairies :

Phase analytique	Proposition	Consensus
Technique NGS : Séquençage et préparation des librairies	NC-7. Une fragmentation est nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de fluides biologiques liquides divers (hors prélèvements sanguins).	66.7%
	NC-8. Lors de l'utilisation d'UMI, le nombre de reads (x) minimum à atteindre doit être supérieur à 10,000x avant déduplication/groupeement des UMI et supérieur à 800x après pour une sensibilité de l'ordre de 0.5%.	70.4%
	NC-9. Sans utilisation d'UMI, le nombre de reads (x) minimum à atteindre doit être supérieur à 10,000x avant déduplication et supérieur à 1,000x après pour une sensibilité de l'ordre de 1%.	73.7%
	NC-10. Il est recommandé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) pour chaque pool de librairie d'un run.	62.5%

	NC-11. Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin négatif à chaque run.	79.2%
--	---	-------

Les propositions concernant le séquençage et la préparation des librairies, comme la nécessité d'une fragmentation en condition de capture (66,7 %) pour les ADN extraits des fluides biologiques autres que le sang (NC-7) ne semble pas pertinent selon le panel interrogé.

Concernant l'utilisation d'UMI, une reformulation des propositions NC-8 et NC-9 a permis d'atteindre un consensus.

L'absence de consensus sur l'analyse d'un témoin positif pour chaque pool d'un run (NC-10, 62,5 %) indique la nécessité d'une réflexion sur le rapport coût-temps et gestion des risques. La norme ISO15189 impose une politique d'utilisation de contrôles internes de qualité, mais les modalités techniques et périodiques sont cependant à la discrétion du laboratoire. Il en est de même sur l'utilisation d'un témoin négatif (NC-11).

Phase post-analytique - Compte-rendu des résultats :

Phase post-analytique	Proposition	Consensus
Compte-rendu des résultats	NC-12. Le pourcentage de couverture des gènes doit apparaître dans le compte-rendu.	65.7%
	NC-13. Le passage d'une validation de méthode qualitative à une méthode quantitative est nécessaire pour pouvoir indiquer la fréquence allélique (VAF) dans les résultats du compte-rendu.	56.7%

Il existe une confusion fréquente entre les notions de couverture et de profondeur lorsque l'on parle de NGS. La couverture est le pourcentage de la séquence étudiée qui est réellement séquencée, tandis que la profondeur définit le nombre de molécules d'ADN lues. Ainsi, il est recommandé par différentes sociétés internationales comme l'ELBS (20) de faire figurer dans la méthode la couverture du panel, et dans les résultats la profondeur de la position du variant détecté. La proposition NC-12 n'a pas atteint de consensus même après reformulation. Il sera donc utile de reconsidérer cette question lors de la mise à jour de ces recommandations.

L'absence de consensus sur la proposition NC-13 démontre la difficulté rencontrée par les laboratoires pour la validation du NGS comme une méthode quantitative. En effet, la méthodologie décrite dans le SH-GTA-04 n'est pas adaptée au NGS et à ses coûts.

Recommandations sur la qualité :

Phase post-analytique	Proposition	Consensus
Qualité	NC-14. Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour l'extraction.	75.0%

Bien que les évaluations externes (EEQ) soient exigées par le COFRAC pour tous les examens afin de garantir la fiabilité et la standardisation des analyses, l'extraction d'ADN est considérée comme une étape pré-analytique, et non comme un examen ce qui explique l'absence de

consensus sur la proposition NC-14. Même si l'extraction n'est pas directement évaluée par les EEQ, une maîtrise de cette étape est essentielle pour garantir des analyses de qualité en aval.

V. Discussion

L'analyse de l'ADN tumoral circulant (ADNtc) est devenue un standard en biologie moléculaire des tumeurs, notamment grâce à sa nature peu invasive et son intérêt pour le suivi longitudinal des patients atteints de cancer. Les données collectées à partir du questionnaire GFCO soulignent un certain nombre de défis et de divergences dans les pratiques en France.

La stabilité des échantillons et le choix des consommables sont des points essentiels pour garantir la qualité des analyses. Comme mentionné dans les recommandations, l'utilisation de tubes EDTA ou de tubes spécifiques contenant des stabilisateurs (Streck, Roche) est discutée. L'utilisation d'une aiguille papillon est recommandée par l'ILBS pour réduire le stress mécanique sur les cellules sanguines lors du prélèvement, minimisant ainsi la contamination par l'ADN génomique, mais cela n'a pas été discuté dans cette première version des recommandations du GFCO (9). Après le prélèvement, le mélange du sang par inversion douce, 8 à 10 fois, est essentiel pour préserver l'intégrité de l'ADN circulant. Pour les tests génétiques standards, un volume de 10 mL de sang est suffisant, tandis que 20 mL sont nécessaires pour l'analyse de l'ADNtc (22). Afin d'éviter une majoration de l'hémolyse au moment du prélèvement, il est recommandé dans certains manuels infirmiers d'inclure un « tube de purge » avant le tube spécifique. Celui-ci permet aussi d'éliminer l'air résiduel dans la tubulure ou les éventuels contaminants provenant du dispositif de prélèvement, notamment en cas d'utilisation d'aiguilles à ailettes.

Les divergences sur les seuils de sensibilité, comme la détection des variants à 0,5% de VAF dans les recommandations, reflètent des différences notables selon les approches technologiques. Les retours des laboratoires mettent en avant des craintes concernant la fiabilité des résultats en cas de faible profondeur ou de la non utilisation d'UMIs. Un renouvellement des instruments de séquençage dans les laboratoires n'étant pas toujours possible pour des raisons financières ou d'organisation, un compromis entre profondeur et taille du panel est à établir pour chaque laboratoire.

Il est important de noter que la sensibilité des analyses NGS est limitée par la quantité d'ADN disponible dans l'échantillon (input). Sachant que 1 ng d'ADN génomique humain correspond à environ 300 équivalents génomes haploïdes, une couverture de 1000x après déduplication nécessiterait un minimum théorique de 3 ng d'ADN pour détecter un variant présent à 0,1% (23). Cette évaluation suppose une amplification uniforme, aucune perte de matériel pendant le traitement et la validation d'un variant sur la base d'une seule molécule mutée, des conditions expérimentalement vraisemblablement irréalistes. On pourrait donc estimer qu'en dessous de 5 ng d'ADN en input, il paraît peu raisonnable de rendre un variant en dessous de 0,5% de VAF dans des conditions expérimentales non tumour-informed. Il est important de noter que ces présentes recommandations ne sont pas adaptées à la mesure de la maladie résiduelle (MRD) où la VAF a un rôle essentiel dans le suivi de la maladie. La détection d'une VAF faible permet de détecter une maladie résiduelle ou une rechute de manière précoce, contribuant ainsi à des stratégies thérapeutiques adaptatives et à une prise en charge personnalisée améliorée, notamment la prise en charge adjuvante de la maladie comme par exemple dans les cancers colorectaux (24). Les approches techniques sont alors différentes des approches théranostiques ou diagnostiques classiques utilisées en situations avancées ou métastatiques. Le recours à des approches de type tumour-informed (25) ou agnostiques de très haute-sensibilité (26) étant alors indispensables, au même titre qu'une validation quantitative de la méthode et plus seulement qualitative.

Des incertitudes peuvent également subsister quant à l'interprétation de certains variants : L'identification de mutations d'intérêt à partir de l'ADNtc peut être biaisée par la présence d'hématopoïèse clonale (CHIP), menant à de faux positifs. Les recommandations de l'ESMO

suggèrent le couplage aux analyses de l'ADN des leucocytes afin d'éliminer une origine hématopoïétique clonale (2). L'analyse de l'ADN leucocytaire présente le second avantage d'affirmer ou d'infirmer l'origine constitutionnelle d'un variant, notamment en cas de prédisposition familiale aux cancers. Mais cette pratique, en plus d'être coûteuse pose un certain nombre de problèmes, notamment celui de l'obligation d'obtention d'un agrément de génétique constitutionnelle, ce qui n'est pas toujours le cas dans les laboratoires français, la génétique tumorale et l'oncogénétique étant souvent deux disciplines distinctes. De plus, la réalisation systématique d'une analyse constitutionnelle lors de l'analyse d'une biopsie liquide soulèverait un certain nombre de problèmes éthiques évidents, avec la signature obligatoire et systématique d'un consentement par le patient, alors qu'une simple information par un médecin compétent est nécessaire actuellement en génétique tumorale d'après la version de la loi de bioéthique en vigueur à l'heure où nous écrivons ces lignes.

Bien que quotidienne dans nos laboratoires, il est important de garder à l'esprit qu'à ce jour, l'utilisation de la biopsie liquide se limite aux situations cliniques validées, comme le choix de traitements ou la recherche de résistances aux inhibiteurs de kinase, ou encore pallier l'absence de tissu. Ces recommandations s'attachent donc uniquement aux indications validées cliniquement lors de leurs rédaction et ne sont pas adaptées à la mesure de la maladie résiduelle ou encore de la détection précoce de cancer.

VI. Conclusion

La biopsie liquide continue à se développer dans nos laboratoires. Cette première version des recommandations sur l'usage de la biopsie liquide du GFCO s'inscrit dans un développement collaboratif des bonnes pratiques dans les laboratoires Français. Ce développement qui se veut dynamique nécessitera des mises à jour régulières afin de s'adapter au mieux à ce domaine en pleine expansion.

VII. Références bibliographiques

1. Gilson P, Merlin JL, Harlé A. Deciphering Tumour Heterogeneity: From Tissue to Liquid Biopsy. *Cancers.* 8 mars 2022;14(6):1384.
2. Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curgliano G, De Mattos-Arruda L, Diehn M, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* août 2022;33(8):750-68.
3. Nguyen YTM, Fujisawa M, Ishikawa S, Sakata-Yanagimoto M. Clonal Hematopoiesis and Solid Cancers. *Cancer Sci.* août 2025;116(8):2055-63.
4. Lemoine A, Couraud S, Fina F, Lantuejoul S, Lamy PJ, Denis M, et al. Recommandations du GFCO pour l'utilisation diagnostique des analyses génétiques somatiques sur l'ADN tumoral circulant. *Innov Thérapeutiques En Oncol.* 1 sept 2016;2(5):225-32.
5. Franczak C, Filhine-Tresarieu P, Gilson P, Merlin JL, Au L, Harlé A. Technical considerations for circulating tumor DNA detection in oncology. *Expert Rev Mol Diagn.* févr 2019;19(2):121-35.
6. Gouda MA, Janku F, Wahida A, Buschhorn L, Schneeweiss A, Abdel Karim N, et al. Liquid Biopsy Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (LB-RECIST). *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* mars 2024;35(3):267-75.
7. Diamond IR, Grant RC, Feldman BM, Pencharz PB, Ling SC, Moore AM, et al. Defining consensus: a systematic review recommends methodologic criteria for reporting of Delphi studies. *J Clin Epidemiol.* avr 2014;67(4):401-9.
8. Risberg B, Tsui DWY, Biggs H, Ruiz-Valdepenas Martin de Almagro A, Dawson SJ, Hodgkin C, et al. Effects of Collection and Processing Procedures on Plasma Circulating Cell-Free DNA from Cancer Patients. *J Mol Diagn JMD.* nov 2018;20(6):883-92.
9. Fusco N, Venetis K, Pepe F, Shetty O, Farinas SC, Heeke S, et al. International society of liquid biopsy (ISLB) perspective on minimal requirements for ctDNA testing in solid tumors. *J Liq Biopsy.* juin 2025;8:100301.
10. Bernstein N, Spencer Chapman M, Nyamondo K, Chen Z, Williams N, Mitchell E, et al. Analysis of somatic mutations in whole blood from 200,618 individuals identifies pervasive positive selection and novel drivers of clonal hematopoiesis. *Nat Genet.* juin 2024;56(6):1147-55.
11. Sanchez C, Roch B, Mazard T, Blache P, Dache ZAA, Pastor B, et al. Circulating nuclear DNA structural features, origins, and complete size profile revealed by fragmentomics. *JCI Insight.* 8 avr 2021;6(7):e144561, 144561.
12. Choy LYL, Peng W, Jiang P, Cheng SH, Yu SCY, Shang H, et al. Single-Molecule Sequencing Enables Long Cell-Free DNA Detection and Direct Methylation Analysis for Cancer Patients. *Clin Chem.* 1 sept 2022;68(9):1151-63.
13. Pedini P, Graiet H, Laget L, Filosa L, Chatron J, Cherouat N, et al. Qualitative and quantitative comparison of cell-free DNA and cell-free fetal DNA isolation by four (semi-

-)automated extraction methods: impact in two clinical applications: chimerism quantification and noninvasive prenatal diagnosis. *J Transl Med.* 6 janv 2021;19(1):15.
14. Yu SCY, Choy LYL, Lo YMD. « Longing » for the Next Generation of Liquid Biopsy: The Diagnostic Potential of Long Cell-Free DNA in Oncology and Prenatal Testing. *Mol Diagn Ther.* sept 2023;27(5):563-71.
 15. Tébar-Martínez R, Martín-Arana J, Gimeno-Valiente F, Tarazona N, Rentero-Garrido P, Cervantes A. Strategies for improving detection of circulating tumor DNA using next generation sequencing. *Cancer Treat Rev.* sept 2023;119:102595.
 16. Febbo PG, Allo M, Alme EB, Cuyun Carter G, Dumanois R, Essig A, et al. Recommendations for the Equitable and Widespread Implementation of Liquid Biopsy for Cancer Care. *JCO Precis Oncol.* janv 2024;8:e2300382.
 17. Lockwood CM, Borsu L, Cankovic M, Earle JSL, Gocke CD, Hameed M, et al. Recommendations for Cell-Free DNA Assay Validations: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn JMD.* déc 2023;25(12):876-97.
 18. Cabello-Aguilar S, Vendrell JA, Solassol J. Real-World Technical Hurdles of ctDNA NGS Analysis: Lessons from Clinical Implementation. *Diseases.* oct 2025;13(10):312.
 19. Haar J van de, Roepman P, Andre F, Balmaña J, Castro E, Chakravarty D, et al. ESMO Recommendations on clinical reporting of genomic test results for solid cancers. *Ann Oncol.* 1 nov 2024;35(11):954-67.
 20. de Jager VD, Giacomini P, Fairley JA, Toledo RA, Patton SJ, Joosse SA, et al. Reporting of molecular test results from cell-free DNA analyses: expert consensus recommendations from the 2023 European Liquid Biopsy Society ctDNA Workshop. *EBioMedicine.* avr 2025;114:105636.
 21. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature.* 26 avr 2017;545(7655):446-51.
 22. Abbosh C, Birkbak NJ, Swanton C. Early stage NSCLC - challenges to implementing ctDNA-based screening and MRD detection. *Nat Rev Clin Oncol.* sept 2018;15(9):577-86.
 23. Piovesan A, Pelleri MC, Antonaros F, Strippoli P, Caracausi M, Vitale L. On the length, weight and GC content of the human genome. *BMC Res Notes.* 27 févr 2019;12(1):106.
 24. Tie J, Wang Y, Lo SN, Lahouel K, Cohen JD, Wong R, et al. Circulating tumor DNA analysis guiding adjuvant therapy in stage II colon cancer: 5-year outcomes of the randomized DYNAMIC trial. *Nat Med.* mai 2025;31(5):1509-18.
 25. Abidoye O, Ahn DH, Borad MJ, Wu C, Bekaii-Saab T, Chakrabarti S, et al. Circulating Tumor DNA Testing for Minimal Residual Disease and Its Application in Colorectal Cancer. *Cells.* 22 janv 2025;14(3):161.
 26. Martín-Arana J, Gimeno-Valiente F, Henriksen TV, García-Micó B, Martínez-Castedo B, Gambardella V, et al. Whole-exome tumor-agnostic ctDNA analysis enhances minimal

residual disease detection and reveals relapse mechanisms in localized colon cancer. *Nat Cancer.* juin 2025;6(6):1000-16.

VIII. Annexes

VIII.1. Membres du groupe de travail

Juliette ALBUISSON, Biogliste, Centre Georges François Leclerc, Dijon.
Alexandre ATKINSON, Bio-informaticien, Centre François Baclesse, Caen.
Simon CABELLO AGUILAR, Bioinformaticien, CHU Montpellier.
Marie-Christine ETIENNE-GRIMALDI, Biogliste, Centre Antoine Lacassagne, Nice.
Nicolas GOARDON, Biogliste, Centre François Baclesse, Caen.
Alexandre HARLÉ, Biogliste, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-Lès-Nancy.
Alexandra LESPAGNOL, Biogliste, CHU Rennes.
Alain MOREL, Biogliste, Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers.
Léa PAYEN, Biogliste, Hospice Civil de Lyon.
Anne PRADINES, Ingénierie Biogliste, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse.

VIII.2. Questionnaire initial

Contexte

Le GFCO souhaite établir des recommandations concernant le *testing* somatique en biopsie liquide. Dans cette démarche, le GFCO souhaite consulter l'ensemble des plateformes de biologie moléculaire française ayant une expertise en biopsie liquide.

Pour cela, un groupe de travail composé de biologistes et bioinformaticiens a établi un questionnaire vous permettant de donner votre avis sur différents éléments de recommandation avec pour objectif de définir un consensus.

Pour les éléments n'ayant pas obtenu de consensus, une session de discussion avec vote sera dédiée aux prochaines Journées du GFCO afin de trouver un consensus.

Pour chaque réponse « Pas d'accord », demander « Pourquoi ? »

Le laboratoire

Dans quel laboratoire exercez-vous ?

Texte libre

Le laboratoire réalise-t-il des tests sur biopsie liquide ?

Oui Non

Combien d'analyse de biopsie liquide réalisez-vous approximativement dans l'année ?

Texte libre

Ces analyses somatiques sur biopsie liquide sont-elles réalisées :

- par technique NGS
- par technique ciblée
- les deux

Quels gènes analysez-vous en biopsie liquide ?

Texte libre

Quelle personne pourra représenter le laboratoire lors de la session de vote des Journées du GFCO le 13 décembre (15h-15h50) ?

Texte libre

Pour chacune des questions visant un consensus, des précisions concernant les raisons de non-accord étaient demandées (“Si vous avez choisi “Pas d'accord”, merci d'expliquer la raison pour laquelle vous n'êtes pas d'accord avec cette affirmation”).

Phase pré-analytique

Centre prescripteurs

Quels tubes utilisez-vous pour les prélèvements sanguins ?

Utilisez-vous ou recommandez-vous les mêmes tubes pour les prélèvements en interne et externes à votre établissement ?

Oui Non Je ne sais pas

Des tubes stabilisateurs d'ADN circulant (exemple : tube Streck) doivent être mis à disposition des centres prescripteurs.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le volume recommandé de sang à prélever est d'environ 18 mL soit 2 tubes stabilisateurs d'ADN circulant.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Un prélèvement sanguin sur tube EDTA (sans gel) reste possible à condition que le prélèvement soit acheminé et traité par le laboratoire dans les 3-4 heures au grand maximum suivant le prélèvement.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Pour les prélèvements sanguins, il est recommandé d'extraire les acides nucléiques à partir de plasma plutôt que de sérum.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Lors du diagnostic initial, un prélèvement sanguin à visée théranostique, en plus du diagnostic sur tissu, devrait être recommandé avant tout traitement.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

L'analyse moléculaire de l'ADNtc nécessite que le prélèvement soit réalisé à distance (au minimum 1 semaine) :

- | | | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| - d'un acte chirurgical : | <input type="checkbox"/> D'accord | <input type="checkbox"/> Pas d'accord | <input type="checkbox"/> Sans opinion |
| - d'une chimiothérapie : | <input type="checkbox"/> D'accord | <input type="checkbox"/> Pas d'accord | <input type="checkbox"/> Sans opinion |
| - d'une poussée inflammatoire : | <input type="checkbox"/> D'accord | <input type="checkbox"/> Pas d'accord | <input type="checkbox"/> Sans opinion |
| - d'un exercice physique intense : | <input type="checkbox"/> D'accord | <input type="checkbox"/> Pas d'accord | <input type="checkbox"/> Sans opinion |

Il existe des recommandations basées sur des preuves clinico-biologiques suffisantes pour rechercher une maladie résiduelle à partir de l'analyse moléculaire de l'ADNtc.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Il existe des recommandations basées sur des preuves suffisantes pour rechercher une résistance à certains traitements à partir de l'analyse moléculaire de l'ADNtc..

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Quelles informations minimales de la part du prescripteur vous semblent nécessaires pour la réalisation d'une analyse sur l'ADNtc ? (choix multiple)

- Motif de la prescription. Exemple : analyse de suivi (monitoring avec indication de(s) anomalie(s) à rechercher), suspicion de rechute, recherche de marqueurs pronostiques, recherche de marqueurs théranostiques ...
- Localisation du cancer primitif et stade (localisé/avancé/métastatique)
- Histologie principale (adénocarcinome épidermoïde, non-épidermoïde etc...)
- Nature et date du prélèvement
- Avis de la RCP
- Contact et compte-rendu d'anatomopathologie
- Historique des traitements et traitements en cours

Sur quels autres fluides biologiques que sanguin réalisez-vous des analyses moléculaires à partir d'ADNtc ? (choix multiple)

- Liquide pleural
- Liquide de lavage broncho-alvéolaire
- Liquide d'ascite
- LCR
- Urines
- Aucun

Si oui, préciser vos recommandations pré-analytiques par type de fluide analysé (tube/volume/transport/traitement et conservation ...): Texte libre

Transport

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

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître sur les fiches de prescription.

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

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

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

Préparation de l'échantillon

A 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.

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

Les plasmas doivent être stockés à -80°C à l'issue de la 1^{ère} centrifugation ou de la 2^{ème} centrifugation (tolérance pour un stockage intermédiaire de 48h à -20°C).

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

Si une analyse d'hématopoïèse clonale est envisagée, un aliquote de sang total ou un culot cellulaire de 1^{ère} centrifugation du plasma doit être conservé.

- D'accord
- Pas d'accord
- Sans opinion

Extraction d'ADN et contrôle qualité

Quel protocole entre la décongélation et l'extraction d'ADN ? Texte libre

Quelle technique d'extraction d'ADN circulant utilisez-vous ?

- Billes magnétiques, précisez la référence du kit :
- Colonnes, précisez la référence du kit :
- Autres, précisez :

Si possible, privilégier l'extraction d'ADN circulant de l'échantillon par billes magnétiques permettant d'envisager une automatisation contrairement à l'extraction par colonne.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

De l'eau nuclease free doit être utilisée comme contrôle d'extraction et doit suivre le même workflow que les échantillons.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si oui, combien de temps conservez-vous vos acides nucléiques à -20°C ? *Texte libre*

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si oui, combien de temps conservez-vous vos acides nucléiques à -80°C ? *Texte libre*

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Dans votre pratique de routine, réalisez-vous une évaluation de la fraction d'ADNtc ?

Oui Non Je ne sais pas

Si oui, par quelle approche ? *texte libre*

Phase analytique pour la technique NGS

Préparation des librairies

Lors de la mise en place du *testing* sur ADNtc, la technologie à privilégier (Capture/Amplicon) doit être celle maîtrisée par le laboratoire. Mais cela peut être l'opportunité pour les laboratoires utilisant l'Amplicon d'évoluer vers la Capture.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le protocole est à adapter entre FFPE et ADNtc.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Une fragmentation est nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de plasma.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Une fragmentation est nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de fluides biologiques liquides divers (hors prélèvements sanguins).

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le choix de la taille du panel (footprint) est à fixer en fonction des capacités de l'instrument NGS disponible au laboratoire.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le nombre de reads (X) minimum à atteindre doit être de $\geq \dots X$ avant déduplication et de $\geq \dots X$ après déduplication des UMIs.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si le laboratoire en a la possibilité, l'automatisation du workflow est conseillée afin d'optimiser l'identitovigilance des échantillons.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Séquençage

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).

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Quel contrôle qualité interne utilisez-vous et à quelle fréquence ? Texte libre

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

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Il est recommandé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) pour chaque pool de librairie d'un run.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si les témoins positifs disponibles ne couvrent pas certaines altérations, il est possible de réaliser des échanges inter laboratoires.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Il est recommandé d'utiliser un témoin négatif au moins une fois par an.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Dans l'intervalle, une analyse bioinformatique des similarités de polymorphismes permet d'évaluer la possible contamination à chaque run.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour l'extraction.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si oui, précisez lesquels : texte libre

Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour le séquençage.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Si oui, précisez lesquels : texte libre

Phase post-analytique

Bio-informatique

Pensez-vous indispensable d'utiliser des UMI dans la préparation des librairies ?

Oui Non Je ne sais pas

Pensez-vous utiliser une « whitelist » pour filtrer les variants ?

Oui Non Je ne sais pas

Pensez-vous utile de voir figurer le taux de déduplication ou la couverture avant/après déduplication sur le rapport d'analyse du pipeline ?

Oui Non Je ne sais pas

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, ...) ?

Oui Non Je ne sais pas

Quelle est la limite de détection (LoD) que vous comptez atteindre ?

1% 0,5% 0,1% Je ne sais pas

Est-ce que vous souhaitez avoir une recommandation concernant la couverture minimale pour atteindre la LoD souhaitée ?

Oui Non Je ne sais pas

Il est possible d'utiliser des FASTQ ("patients synthétiques" ou *in silico*) afin de valider le pipeline et réaliser les tests de non-régression.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

L'évaluation de l'hématopoïèse clonale pourrait permettre de fiabiliser le résultat. Mais en l'absence de données suffisantes et de techniques validées à ce jour, nous ne pouvons pas émettre de recommandations pour une utilisation en routine clinique.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Compte-rendu de résultats

La fréquence allélique (VAF) doit apparaître dans les résultats du compte-rendu (mais pas dans la conclusion).

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le passage d'une validation de méthode qualitative à une méthode quantitative est nécessaire pour pouvoir indiquer la fréquence allélique (VAF) dans les résultats du compte-rendu.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

Le pourcentage de couverture des gènes doit apparaître dans le compte-rendu.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

En l'absence d'altération détectée, 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.

D'accord Pas d'accord Sans opinion

VIII.3. Liste détaillée des répondants

Nombre de plateformes répondantes : 39

Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand.
Laboratoire de Biologie Medicale Oncologique de l'IUCT-Oncopole, Toulouse.
Laboratoire de Cancérologie Biologique, CHU Poitiers
Hospices civils de Lyon
Laboratoire de Biologie des Tumeurs Solides - CHU de Montpellier
Centre Georges François Leclerc, Dijon
Laboratoire de Biochimie, CHU de Nantes
Oncogénétique des tumeurs solides, Hôpital Paul Brousse APHP
Gustave Roussy, Villejuif
CHU Dijon
CHU Limoges
Institut curie, Paris
Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, IHU RespirERA, Université Côte d'Azur,Nice
LBRM Génétique somatique, CHU de Nantes
CYPATH, Villeurbanne
MEDIPATH, Montpellier
Centre Léon Bérard, UF de biologie des tumeurs, Lyon
Biologie médicale - BIOGROUP
Centre Eugène Marquis, Nantes
Biochimie biologie moléculaire, CHU Lille
LBMMS, Hospices Civils de Lyon
Plateforme d'oncobiologie, CHU de Besançon
Institut de Cancérologie de l'Ouest, Angers
Institut Bergonié, Bordeaux
Laboratoire Cerba
CHU Bordeaux
Institut de Cancérologie de Lorraine, Nancy
Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHU Saint-Etienne
CHU Rennes
CHU Grenoble Alpes
Laboratoire de génétique oncologique, Centre Henri Becqeurel, Rouen
CHU Henri Mondor, Créteil
Groupement de Biologie Médicale GHT84, Avignon
Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP
Centre François Baclesse, Caen
Laboratoire Anatomie et Cytologie Pathologiques
Sevice d'oncobiologie- Biogenopole Timone, APHM, Marseille
Laboratoire de Biochimie, CHU de Reims
Génétique Somatique des Tumeurs Hopital Charles Nicolle, CHU Rouen

VIII.4. Questionnaire reformulé pour la session de vote

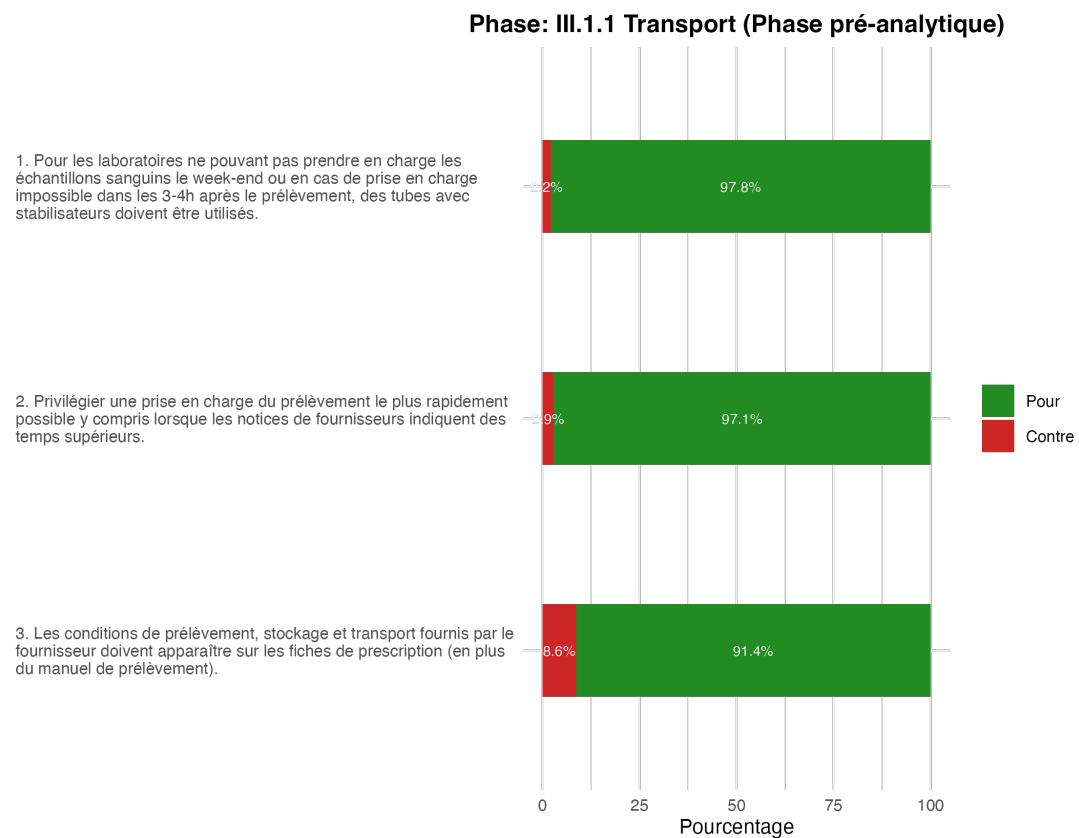
Recommandation initiale	Recommandation reformulée
Une mention indiquant de limiter (si possible) les prélèvements le vendredi doit apparaître sur les fiches de prescription.	Pour les laboratoires ne pouvant pas prendre en charge les prélèvements le week-end, des tubes avec stabilisateurs doivent être utilisés pour les prélèvements du vendredi après-midi (y compris en interne).
Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître sur les fiches de prescription.	Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître sur les fiches de prescription (en plus du manuel de prélèvement). Les conditions de stockage et de transport fournis par le fournisseur doivent apparaître uniquement sur le manuel de transport.
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.	À réception du prélèvement sanguin, 2 centrifugations sont nécessaires avec la 2e centrifugation plus rapide que la première (ex: Etude comparative HCL en cours de rédaction).
Les plasmas doivent être stockés à -80°C à l'issue de la première centrifugation ou de la 2e centrifugation (tolérance pour un stockage intermédiaire de 96h à -20°C).	Eviter les congélations et décongélations successives des plasmas.
Si une analyse d'hématopoïèse clonale est envisagée, un aliquote de sang total ou un culot cellulaire de 1ère centrifugation du plasma doit être conservé.	Si une analyse d'hématopoïèse clonale est envisagée, un aliquote de sang total ou un culot cellulaire de première centrifugation du plasma doit être conservé. L'évaluation de l'hématopoïèse clonale pourrait permettre de fiabiliser le résultat. 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.
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.	Le tampon TE ou l'eau nuclease free doivent être utilisés et les échantillons peuvent être conservés à 4°C jusqu'à 10 semaines ou à -20°C/-70°C au-delà de 10 semaines.
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.	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.

Une fragmentation n'est pas nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de plasma.	Une fragmentation n'est pas nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de plasma.
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).	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 %.
Il est <u>recommandé</u> d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) par run.	Il est <u>conseillé</u> d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) par run.
Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin négatif à chaque run.	Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin négatif à chaque run.
La fréquence allélique (VAF) doit apparaître dans les résultats du compte-rendu (mais pas dans la conclusion).	La fréquence allélique (VAF) doit apparaître dans les résultats du compte-rendu à titre indicatif (mais pas dans la conclusion).
Le pourcentage de couverture des gènes doit apparaître dans le compte-rendu.	Le pourcentage de couverture des panels doit apparaître dans la section méthode du compte-rendu.

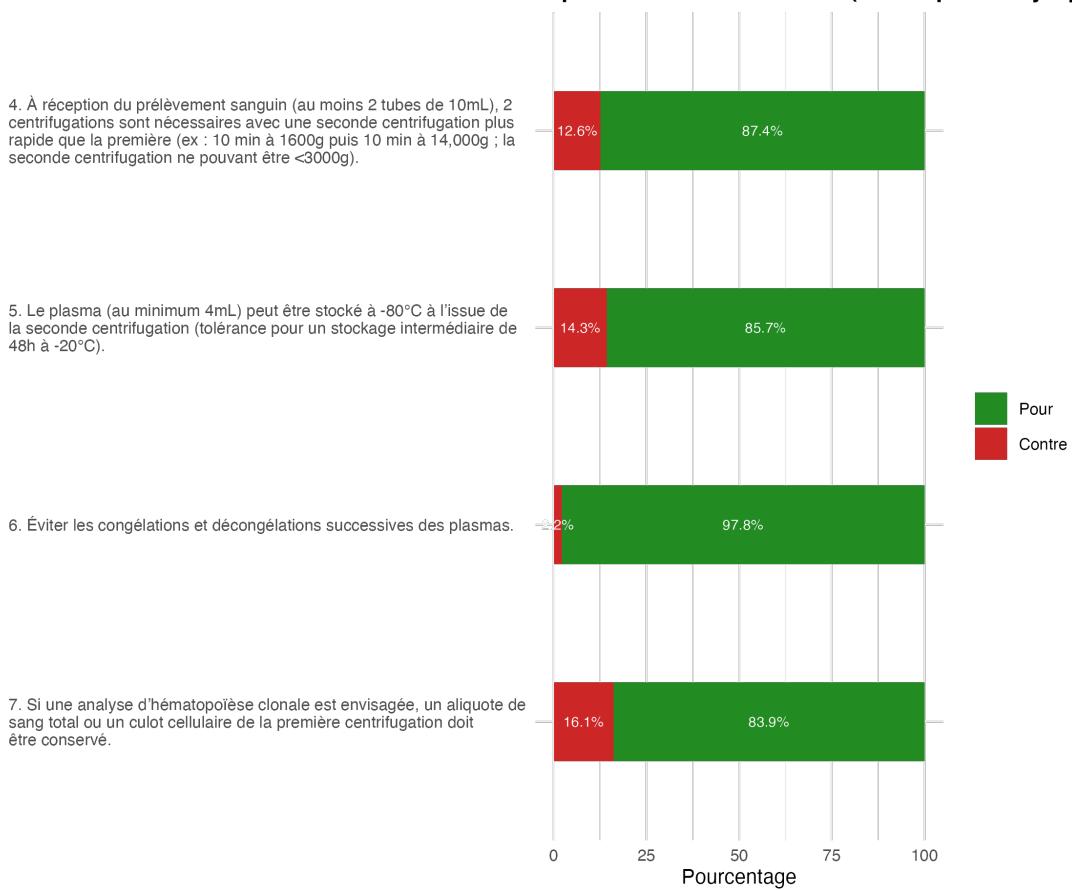
VIII.5. Liste des relecteurs

Nom	Prénom	Laboratoire	Email
Boidot	Romain	Centre Georges François Leclerc	Rboidot@cgfl.fr
Callens	Céline	Curie	Celine.callens@curie.fr
Caumont	Charline	CHU Bordeaux	charline.caumont@chu-bordeaux.fr
Chevalier	Louise-Marie	ICO Angers	louisemarie.chevalier@ico.unicancer.fr
Cotteret	Sophie	Centre Eugène Marquis	s.cotteret@rennes.unicancer.fr
Descarpentries	Clotilde	CHU Lille	Clotilde.descarpentries@chru-lille.fr
Dremaux	Julie	CHU Amiens	dremaux.julie@chu-amiens.fr
Galibert	Marie Dominique	CHU Rennes	marie-dominique.galibert-anne@univ-rennes1.fr
Hofman	Paul	CHU Nice	Hofman.p@chu-nice.fr
Karayan-Tapon	Lucie	CHU Poitiers	L.karayan-tapon@chu-poitiers.fr
Lamy	Aude	CHU Rouen	Aude.lamy@chu-rouen.fr
Lamy	Pierre-Jean	Inovie Montpellier	Pierre-jean.lamy@inovie.fr
Lehmann-Che	Jacqueline	Assistance Publique – Hôpitaux de Paris	Jacqueline.lehmann-che@aphp.fr
Lopez	Jonathan	CHU Lyon	jonathan.lopez@chu-lyon.fr
Oudart	Jean-Baptiste	CHU Reims	joudart@chu-reims.fr
Overs	Alexis	CHU Besançon	aovers@chu-besancon.fr
Pujals	Anais	CHU Henri Mondor	anais.pujals@aphp.fr
Rouleau	Etienne	Gustave Roussy	etienne.rouleau@gustaveroussy.fr
Soubeyran	Isabelle	Bergonié	i.soubeyran@bordeaux.unicancer.fr
Tachon	Gaelle	Centre Léon Bérard	Gaelle.tachon@lyon.unicancer.fr
Tallet	Anne	CHU Tours	anne.tallet@chu-tours.fr
Wissler	Marie-Pierre	Cypath Villeurbanne	mp.wissler@cypath.fr

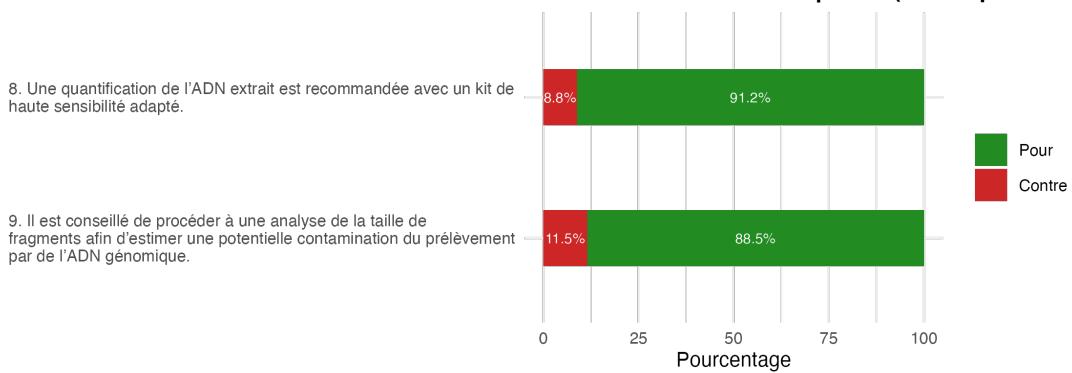
VIII.6. Liste des recommandations



Phase: III.1.2 Préparation de l'échantillon (Phase pré-analytique)



Phase: III.1.3 Extraction d'ADN et contrôle qualité (Phase pré-analytique)



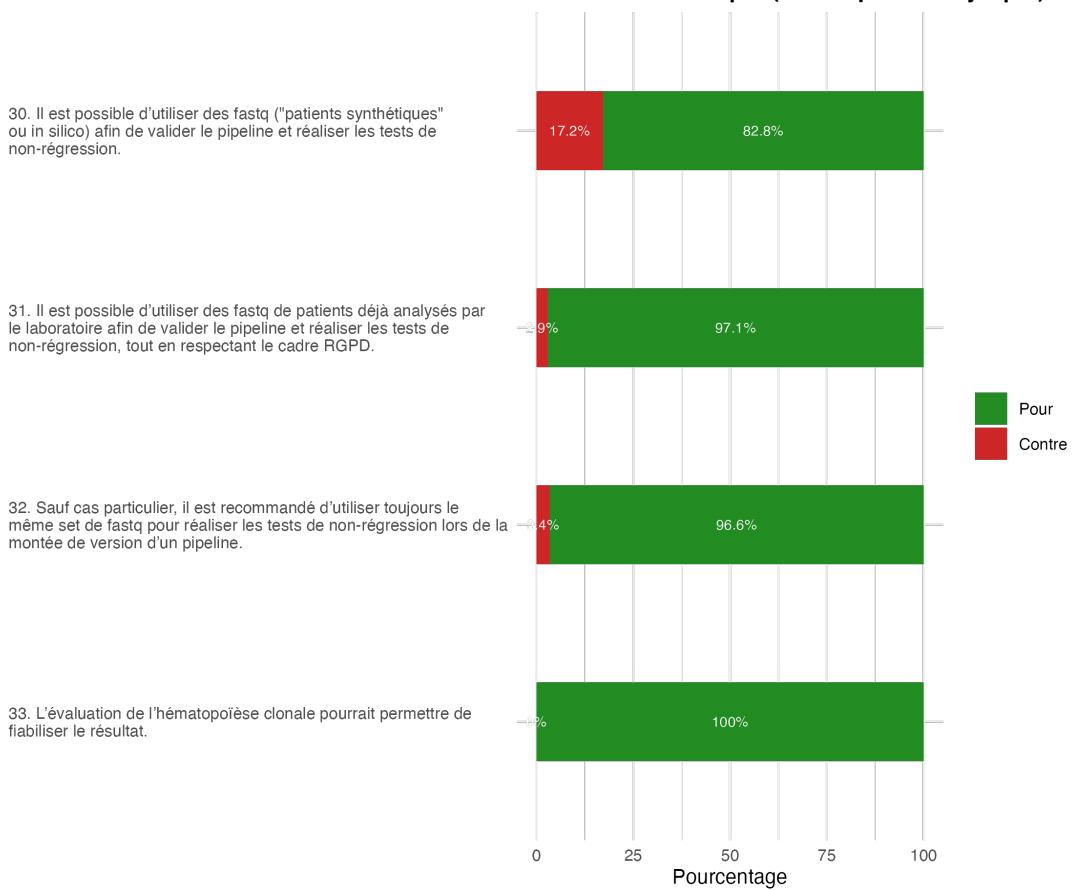
Phase: III.2.1 Préparation des librairies (Phase analytique – NC)



Phase: III.2.2 Séquençage (Phase analytique – NGS)



Phase: III.3.1 Bio-informatique (Phase post-analytique)

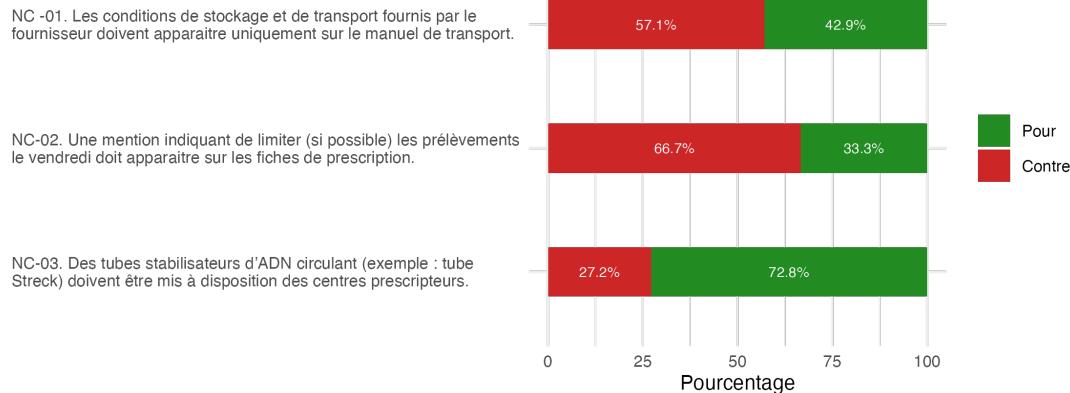


Phase: III.3.2. Compte-rendu des résultats

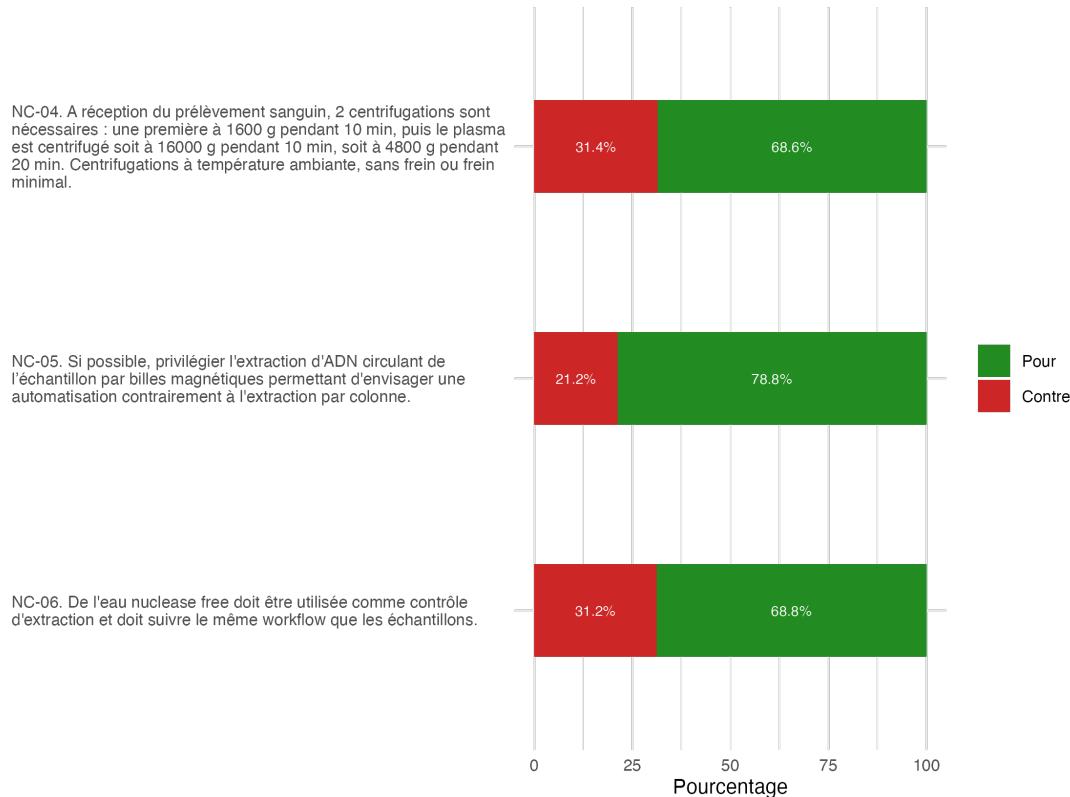


VIII.7. Liste des recommandations sans consensus

Phase: III.1.1 Transport (Phase pré-analytique)

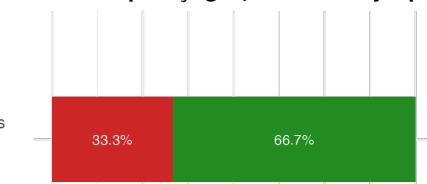


Phase: III.1.2 Préparation de l'échantillon (Phase pré-analytique)



Phase: III.2.2 Séquençage (Phase analytique – NGS)

NC-07. Une fragmentation est nécessaire en Capture pour les acides nucléiques extraits de fluides biologiques liquides divers (hors prélèvements sanguins).



NC-08. Lors de l'utilisation d'UMI, le nombre de reads (x) minimum à atteindre doit être supérieur à 10,000x avant déduplication/groupement des UMI et supérieur à 800x après pour une sensibilité de l'ordre de 0.5%.



NC-09. Sans utilisation d'UMI, le nombre de reads (x) minimum à atteindre doit être supérieur à 10,000x avant déduplication et supérieur à 1,000x après pour une sensibilité de l'ordre de 1%.



NC-10. Il est recommandé d'analyser systématiquement un contrôle qualité interne (témoin positif) pour chaque pool de librairie d'un run.



NC-11. Il n'est pas recommandé d'utiliser un témoin négatif à chaque run.



NC-12. Le pourcentage de couverture des gènes doit apparaître dans le compte-rendu.



NC-13. Le passage d'une validation de méthode qualitative à une méthode quantitative est nécessaire pour pouvoir indiquer la fréquence allélique (VAF) dans les résultats du compte-rendu.



NC-14. Il est recommandé de participer à des programmes d'évaluation externe de la qualité pour l'extraction.

