



HAL
open science

Aspect pré analytique et intérêt clinique de la détection d'ADN tumoral circulant par PCR digitale en oncologie digestive

David Sefrioui

► To cite this version:

David Sefrioui. Aspect pré analytique et intérêt clinique de la détection d'ADN tumoral circulant par PCR digitale en oncologie digestive. Sciences agricoles. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMR075 . tel-01716414

HAL Id: tel-01716414

<https://theses.hal.science/tel-01716414>

Submitted on 23 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Aspect préanalytique et intérêt clinique de la détection d'ADN tumoral circulant par PCR digitale en oncologie digestive

**Présentée et soutenue par
David SEFRIOUI**

Thèse soutenue publiquement le (date de soutenance) devant le jury composé de		
Mr Frédéric DI FIORE	PUPH, Hépatogastroentérologie, Université de Rouen, Normandie	Directeur de thèse
Me Nasrin SARAFAN-VASSEUR	Ingénieur de Recherche, Université de Rouen, Normandie	CoDirecteur de thèse
Me Astrid LIEVRE	PUPH, Hépatogastroentérologie, Université de Rennes	Rapporteur
Mr Alain THIERRY	Directeur de Recherche 2, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Université de Montpellier	Rapporteur
Mr Pierre MICHEL	PUPH, Hépatogastroentérologie, Université de Rouen, Normandie	Président du Jury
Mr Pierre LAURENT-PUIG	PUPH, Hépatogastroentérologie, Université Paris Descartes	Membre du Jury

**Thèse dirigée par Frédéric DI FIORE et Nasrin SARAFAN-VASSEUR, Unité
INSERM 1245_Equipe 3 (Groupe IRON)**



Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Institut national
de la santé et de la recherche médicale

A Monsieur le Professeur Frédéric Di Fiore,

Tu me fais l'honneur et le plaisir d'encadrer ce travail de thèse. Tu étais là depuis les tous premiers travaux de recherche ainsi qu'à chaque étape de mon parcours professionnel. Tu as été à l'initiative de l'équipe équipe de **R**echerche en **ON**cologie (IRON) et as su te montrer patient et persévérant pour fédérer ce groupe de travail qui a permis la réalisation de nombreux projets de recherche. Je te remercie de m'aider et me guider dans ce difficile parcours hospitalo-universitaire ainsi que de me soutenir lors des périodes de découragement. Ton pragmatisme est une de tes principales qualités et m'a beaucoup aidé et inspiré durant ce post-internat.

A Madame le Docteur Nasrin Sarafan-Vasseur,

Tu me fais l'honneur et le plaisir de coencadrer ce travail de thèse. Tu as su me transmettre depuis l'initiation du master 2 et jusqu'à maintenant, ton goût pour la recherche et la rigueur scientifique. Je prends un réel plaisir à travailler avec toi et venir au laboratoire. Ton enthousiasme et ta bienveillance sont un vrai bonheur à partager pour ceux qui t'entourent. J'espère avoir l'occasion de poursuivre le plus longtemps possible nos travaux collaboratifs.

A Madame le Proesseur Astrid Lièvre,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteuse de cette thèse. Vos connaissances dans le domaine translationnel en oncologie permettront un jugement critique de grande valeur pour ce travail. En effet, nombre de publications actuelles sur l'ADN circulant s'inscrivent dans la continuité de vos travaux originels sur l'identification tissulaire des mutations *KRAS* comme facteur prédictif de résistance aux traitements anti-EGFR dans le cancer colorectal métastatique. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Alain Thierry,

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Vos travaux engagés sur l'ADN circulant depuis presque 10 ans se traduisent par un nombre important de publications au sein des plus prestigieuses revues. Vous encadrez une équipe de renommée nationale mais également internationale sur ce sujet. Votre présence au sein de ce jury était donc très importante à mes yeux. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect pour avoir accepté de juger ce travail.

A Monsieur le Professeur Michel,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Il s'agit en ce sens de la deuxième fois après la présidence du jury de ma thèse de médecine. Je m'aperçois que les mots que j'ai pour vous ont peu changé durant ces 5 années de post-internat et j'y vois là une certaine forme de constance dans votre engagement et vos valeurs. La quiétude que vous affichez la majorité du temps malgré vos responsabilités ou sollicitations toujours plus nombreuses est une autre valeur à laquelle j'accorde beaucoup d'estime et que j'ai pu appréhender ces dernières années. Je reste toujours sensible à la confiance que vous m'accordez et espère par ce travail avoir été à la hauteur de celle-ci.

A Monsieur le Professeur Pierre Laurent-Puig,

Vous me faites l'honneur d'être membre de ce jury de thèse. Vos travaux sur le domaine de la recherche translationnelle en oncologie digestive sont incontournables et font référence sur le plan international. Vous encadrez une équipe renommée sur les thèmes abordés au sein de ce travail et vos connaissances sur le sujet seront précieuses pour juger cette thèse. Soyez assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A mes parents,

Pour votre soutien indéfectible et votre disponibilité sur lesquels je peux toujours m'appuyer. Pour les valeurs, le sens des responsabilités et la force morale que vous incarnez et qui ont particulièrement été mis à l'épreuve ces dernières années. Les modèles sont souvent nécessaires pour avancer et je ne peux trouver de meilleurs exemples que dans le vôtre. Soyez assurés de mon amour et de mon dévouement.

A ma sœur, pour le courage d'avoir changé d'orientation et de te battre en ce sens. Je suis fier de toi.

Aux autres membres de ma famille et notamment mes grands-parents.

A mes amis que je ne vois pas assez, Romain, Damien, Guillaume, Alex, Julien, Richard, Nico, Mathieu et Fabien.

A mes anciens colocs, PP, Julien ainsi que leur conjointe. A tous ces bons repas passés et à venir. A Edouard bien sûr, il y aurait un manque certain si tu n'étais pas là.

Aux professeurs Ducrotte, Savoye, Lerebours et Tuech comme modèles et pour leur engagement.

A mes cochefs actuels ou passés pour l'entraide, les échanges constructifs et les bons moments passés ensemble.

Aux internes du service et en particulier Sabrina pour notre complicité et tes encouragements innombrables qui m'ont bien aidé.

Aux membres du service d'Hépatogastroentérologie (infirmières, aides-soignantes, ASH, cadres, attachés de recherche (Patricia comme modèle d'enthousiasme et d'investissement), psychologues, diététiciennes et secrétaires) ainsi que de Chirurgie Digestive et de l'URSP avec qui je prends beaucoup de plaisir à travailler. Merci pour votre attachement au service public et votre dévouement auprès des patients.

Aux membres du service d'Anatomopathologie avec en particulier, France, Emmanuel, Marianne, Aude et le Professeur Jean-Christophe Sabourin pour leur aide dans l'avancement des projets de recherche.

Aux membres (actuels ou passés) de l'équipe INSERM U1245 avec en particulier le Professeur Thierry Frébourg, Jean-Baptiste, Richard, Pauline, Omar, Julien. Comment ne pas citer Ludivine, bien évidemment sans qui tout ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour ton investissement, ta disponibilité et ta gentillesse.

- Table des matières -

Abréviations	1
- Résumé -	2
- Abstract -	3
Problématique.....	4
Introduction	5
I. Acides nucléiques circulants	5
A. Historique.....	5
B. Physiopathologie.....	6
1. Origine de l'ADN circulant	6
2. Mécanismes de libération de l'ADN circulant	7
a) Libération directe	7
b) Libération indirecte sous forme d'exosome	9
3. Caractéristiques structurales de l'ADN circulant.....	11
a) Structure nucléosomique	11
b) Différentiel de taille selon l'origine néoplasique ou non néoplasique	12
4. Clairance de l'ADN circulant.....	14
5. Fonctionnalité de l'ADN circulant	14
C. Champs d'application clinique	15
1. Diagnostic prénatal	15
a) Premières applications : détermination du sexe foetal.....	16
b) Aneuploïdie fœtale	18
c) Maladies monogéniques	20
2. Transplantation d'organe	22
3. Autres champs d'application.....	25
D. Considérations pré-analytiques	26
1. Type de prélèvement	27
2. Conditions de transport	28
3. Conditionnement	29
4. Conditions de stockage du plasma	30
5. Extraction de l'ADN	31
E. Considérations analytiques	32
1. Méthodes basées sur la détection d'altérations génétiques connues.....	33
a) PCR Digitale (dPCR).....	33
b) PCR spécifique d'allèle.....	38
2. Méthodes basées sur la détection d'altérations génétiques inconnues.....	41
a) Séquençage à haut débits	41
1) Séquençage non ciblé du génome	42
2) Séquençage ciblé du génome	43
b) Cold PCR	45
II. Applications cliniques en cancérologie	48
A. Dépistage	48
1. Généralités	48
2. Application au CCR	49
a) Dépistage classique	49
b) Dépistage alternatif par ADNtunc	50

B.	Diagnostic de la maladie résiduelle.....	52
1.	Surveillance conventionnelle	52
2.	Surveillance par l'ADNtunc.....	53
C.	Identification de mutations prédictives d'efficacité	54
1.	Détection tissulaire	55
a)	Généralités	55
b)	Hétérogénéité clonale	57
2.	Détection circulante	60
a)	Concordance tissu/plasma	60
b)	Identification plasmatique de mécanismes de résistance secondaire au traitement.....	62
D.	Evaluation de l'efficacité du traitement.....	63
a)	Evaluation standard.....	63
b)	Evaluation par l'ADNtunc	65

Objectifs des travaux de thèse..... 67

Méthodes et Résultats..... 68

I.	Détection d'ADNtunc par dPCR directement à partir du plasma (Travail n°1)	69
A.	Rationnel.....	69
B.	Méthodes.....	69
C.	Résultats.....	70
D.	Valorisation	70
II.	Apport de l'héparinase pour la détection et la quantification d'ADNtunc par dPCR à partir d'échantillons de plasma hépariné (Travail n°2)	75
A.	Rationnel.....	75
B.	Méthodes.....	75
C.	Résultats.....	76
D.	Valorisation	76
III.	Etude comparative de la détection d'ADNtunc par les méthodes de dPCR et E-ice-COLD-PCR (Travail n°3).....	82
A.	Rationnel.....	82
B.	Méthodes.....	82
C.	Résultats.....	83
D.	Valorisation	83
IV.	Intérêt diagnostique du CA19.9, de l'ADNtunc et des CTC chez les patients avec tumeur solide pancréatique (Travail n°4).....	88
A.	Rationnel.....	88
B.	Méthodes.....	88
C.	Résultats.....	89
D.	Valorisation	90
V.	Intérêt pronostique de la détection d'ADNc par dPCR chez les patients avec CCRm (Travail n°5) 100	
A.	Rationnel.....	100
B.	Méthodes.....	100
C.	Résultats.....	100
D.	Valorisation	101
VI.	Impact pronostique et prédictif de réponse au traitement de l'ADNc, de l'ACE, du CA19.9 et des CTC chez les patients traités par chimiothérapie pour un CCRm (résultats de l'étude prospective COCACOLON) (Travail n°6).	109
A.	Rationnel.....	109
B.	Méthodes.....	109
C.	Résultats.....	110

D. Valorisation	111
Discussion	138
I. Aspects préanalytiques et analytiques	138
II. Intérêts cliniques.....	143
Perspectives et conclusion.....	151
Bibliographie	153

Abréviations

ACE	Antigène carcino-embryonnaire
ADNc	ADN circulant
ADNfc	ADN foetal circulant
ADNtotc	ADN total circulant
ADNtumc	ADN tumoral circulant
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AP	Adénocarcinome pancréatique
ARMS	<i>Amplification refractory mutation system</i>
ASPCR	<i>Allele-specific PCR</i>
ASA	<i>Allele-specific amplification</i>
CA19.9	<i>Carbohydrate antigen 19.9</i>
CCRm	Cancer colorectal métastatique
Cold-PCR	<i>Coamplification at lower denaturation temperature PCR</i>
CPNPC	Cancer pulmonaire non à petites cellules
CSM	Cancer du sein métastatique
CTC	Cellule tumorale circulante
CtDNA	<i>Circulating tumor DNA</i>
DPCR	PCR digitale
DPN	Diagnostic prénatal
EEBP	Echoendoscopie biliopancréatique
E-ice-cold PCR	<i>Enhanced-ice-COLD-PCR</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FA	Fréquence allélique
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GIST	<i>GastroIntestinal Stromal Tumor</i>
LNA	<i>Locked nucleic acids</i>
MCRC	<i>Metastatic colorectal cancer</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
PAMSA	<i>PCR amplification of multiple specific alleles</i>
PASA	<i>PCR amplification of specific alleles</i>
PNA	<i>Peptide nucleic acids</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
SG	Survie globale
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SSP	Survie sans progression
TSP	Tumeur solide pancréatique

- Résumé -

L'ADN tumoral circulant (ADNtunc) est apparu depuis plusieurs années comme un biomarqueur prometteur susceptible d'apporter des informations permettant l'optimisation de la prise en charge du patient en oncologie. L'objectif de cette thèse était double et s'articule autour de deux axes : i) évaluer différentes conditions préanalytiques et analytiques (digitale PCR (dPCR) principalement) pour la détection de ce biomarqueur ii) évaluer l'intérêt clinique potentiel de ce biomarqueur en oncologie digestive. La première partie rapporte 3 travaux (3 articles originaux dont une collaboration nationale (équipe parisienne dirigée par J. Tost)). Dans le travail n°1, nous avons montré la faisabilité de détecter l'ADNtunc par dPCR directement à partir du plasma de 43 prélèvements de patients avec cancer colorectal métastatique (CCRm). Il n'y avait pas de différence significative pour le taux de détection des mutations *KRAS* circulantes entre les groupes avec et sans extraction d'ADN (93 % (40/43) *versus* 88 % (38/43), respectivement). Dans le travail n°2, nous avons mis au point une méthode basée sur l'apport d'héparinase pour la détection d'ADNtunc à partir de 194 prélèvements héparinés de patients suivis en oncologie. Ce traitement des échantillons par l'héparinase permettait l'analyse de l'ADNtunc pour 117/194 (60 %) patients avec inhibition préalable de la dPCR par l'héparine. Enfin, dans le travail n°3, nous avons comparé plusieurs plate-formes de détection d'ADNtunc et montré que la dPCR affichait des résultats de détection comparables sur le plan qualitatif et quantitatif avec une plateforme ultrasensible d'Enhanced-*ice*-COLD-PCR (E-*ice*-COLD-PCR) pour les échantillons avec une fréquence allélique d'ADNtunc $\geq 0,4$ %. La deuxième partie rapporte 3 travaux (3 articles originaux) sur l'intérêt clinique de la détection d'ADNtunc par dPCR en oncologie digestive. Nous avons ainsi montré que ce biomarqueur conférait un intérêt diagnostique (travail n°4), pronostique (travail n°4 à 6) et prédictif de la réponse aux traitements (travail n°6) chez les patients avec adénocarcinome pancréatique (AP) (travail n°4) et CCRm (travail n°5 à 6).

- Abstract -

For several years, circulating tumor DNA (ctDNA) has emerged as a promising biomarker providing relevant information to optimize patient care in oncology. The aim of this thesis was both: (i) to evaluate different preanalytical and analytical conditions (digital PCR (dPCR) mainly) for the detection of this biomarker; (ii) to evaluate the potential clinical interest of this biomarker in digestive oncology. The first part reports 3 works (3 original articles including a national collaboration (Parisian team led by J. Tost)). In work no. 1, we have shown the feasibility of ctDNA detection by dPCR directly from the plasma of 43 samples from patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). There was no significant difference in the detection rate of circulating *KRAS* mutations between groups with and without DNA extraction (93% (40/43) versus 88% (38/43), respectively). In work no. 2, we developed a method based on the heparinase addition for the ctDNA detection from 194 heparinized samples of patients followed in oncology. This treatment of samples by heparinase allowed the ctDNA analysis of 117/194 (60%) patients with prior inhibition of dPCR by heparin. Finally, in work no. 3, we compared several ctDNA detection platforms and showed that dPCR displayed qualitatively and quantitatively comparable detection results with an ultrasensitive platform of E-ice-COLD-PCR for the samples with ctDNA allelic fraction $\geq 0.4\%$. The second part reports 3 works (3 original articles) on the clinical interest of the ctDNA detection by dPCR in digestive oncology. We have thus shown that this biomarker had a diagnostic (work no. 4), prognostic (works no. 4 to 6) and predictive response to treatments (work no. 6) interest in patients with pancreatic adenocarcinoma (work no. 4) and mCRC (works no. 5 to 6).

Problématique

Depuis la description initiale d'acides nucléiques dans la circulation sanguine il y a presque 70 ans, plus de 16 000 articles ont été consacrés à ce sujet. Une meilleure compréhension de la physiopathologie de ce biomarqueur et l'avènement des progrès technologiques nécessaires à sa détection ont suscité un regain d'intérêt particulier pour cette thématique au cours des 15 dernières années. Le rationnel à l'utilisation de ce biomarqueur est en effet considérable puisque cette « biopsie liquide » permet d'étudier une large gamme d'altérations génétiques de façon non invasive. Les domaines d'application sont très larges et peuvent aller du diagnostic prénatal jusqu'à l'oncologie. Dans l'exemple particulier du cancer, cette biopsie liquide offre l'avantage sur son pendant tissulaire de pouvoir être répétée dans le temps et de représenter l'ensemble de l'hétérogénéité spatiale néoplasique. L'ADNtunc se positionne comme un candidat idéal qui pourrait être utilisé à chaque étape du parcours de soins en oncologie comme par exemple le dépistage, l'utilisation à visée diagnostique ou pronostique, la détection de mutation de résistance au traitement. Si plusieurs études ont montré la faisabilité de détecter l'ADNtunc pour illustrer ces différents concepts, de nombreux défis restent encore à relever pour pouvoir l'utiliser en pratique quotidienne. Parmi ces défis, il s'agira en premier lieu de résoudre les questions relatives aux problématiques préanalytiques et analytiques associées à la détection de ce biomarqueur. Il sera également nécessaire de réaliser des études interventionnelles montrant la pertinence de ce biomarqueur comme outil décisionnel dans la prise en charge oncologique des patients. Ce travail de thèse s'inscrit donc au sein de cette dynamique et intense recherche internationale centrée autour de l'analyse d'ADNtunc.

Introduction

I. Acides nucléiques circulants

A. Historique

La première description de la présence d'ADN dans la circulation sanguine remonte à 1948 avec la publication de Mandel et Metais (Mandel & Metais, 1948). Cette publication intervient seulement 4 ans après la démonstration que cette molécule constitue le support de l'information génétique (Avery *et al*, 1944). Durant les 20 années suivantes, plusieurs équipes dont celle réputée de Maurice Stroun et Philippe Anker, vont rapporter plusieurs travaux sur les greffes inter espèce (ex : *Capsicum baccatum* et *Capsicum annuum* ou *Solanum nigrum* et *Solanum melongena*) dans le domaine de la botanique (Liu, 2006). Ils vont mettre en évidence une transmission non mendélienne de certaines caractéristiques entre le greffon et le porte-greffe et établir le postulat que l'ADN circulant (ADNc) pourrait être le vecteur de cette transmission, sans pour autant que les moyens technologiques de l'époque ne puissent le confirmer. Il faudra donc attendre les années 1970 pour que cette voie de recherche soit reprise et que la présence d'acides nucléiques circulants puisse être mise en évidence dans diverses situations physiologiques (sujet sain (Kamm & Smith, 1972; Steinman, 1975), grossesse (Kamm & Smith, 1975)) ou pathologiques (lupus (Tan *et al*, 1966; Davis & Davis, 1973; Koffler *et al*, 1973; Raptis & Menard, 1980), polyarthrite rhumatoïde (Leon *et al*, 1977a), embolie pulmonaire (Barada *et al*, 1980)). La transposition à l'oncologie fut quant à elle initiée par Leon *et al.* en 1977 (Leon *et al*, 1977b). En effet, cet article fut le premier à mettre en évidence que la quantité d'acides nucléiques circulants des patients avec cancer était plus élevée que chez les sujets contrôles et que la concentration était proportionnellement

corrélée avec le stade néoplasique. Par ailleurs, les auteurs montraient que la concentration évoluait sous traitement (radiothérapie dans cette étude) et pouvait constituer un outil utile pour le suivi de la maladie. Jusqu'à la fin des années 1980, d'autres études seront également publiées dans ce domaine mais sans possibilité de caractérisation plus précise au niveau moléculaire (Stroun *et al*, 1987, 1989; Maebo, 1990). A partir des années 1990, l'avènement des progrès technologiques et l'identification d'altérations génétiques spécifiques vont contribuer à l'ensemble des applications cliniques utilisées aujourd'hui (détection d'ADNtmc (Tada *et al*, 1993; Vasioukhin *et al*, 1994; Chen *et al*, 1996; Nawroz *et al*, 1996), d'ADN fœtal circulant (ADNfc) chez la mère (Lo *et al*, 1997), ADN de donneur circulant chez le sujet transplanté (Lo *et al*, 1998b)).

B. Physiopathologie

1. Origine de l'ADN circulant

Dans l'exemple du cancer, l'ADNtmc issu des cellules néoplasiques ne représente qu'une fraction variable et souvent minoritaire de l'ensemble des fragments d'ADNc (aussi appelé ADN total circulant (ADNtotc)) (Crowley *et al*, 2013). En effet, l'autre fraction provient des cellules dites « saines » qui peuvent correspondre aux cellules hématopoïétiques, aux cellules de l'environnement péri-tumoral ou aux cellules en provenance de tissu sain non péri-tumoral (**Figure 1**).

Concernant la fraction non tumorale d'ADNc, Lui *et al*. suggéraient une libération principalement par les cellules sanguines (Lui *et al*, 2002, 2003). Les auteurs utilisaient en effet un modèle ingénieux de sujets avec transplantation de moelle osseuse par un donneur du sexe opposé (14 sujets masculins receveurs avec donneur féminin et 8 sujets féminins receveurs avec donneur masculin) (Lui *et al*, 2002). Ils incluaient également 14 témoins sans transplantation. Le gène *SRY*

(associé au chromosome Y) était utilisé pour quantifier et discriminer l'ADN d'origine masculine et le gène de la β -globin pour quantifier l'ADNtotc. La proportion d'ADNc associé au chromosome Y (cible = gène *SRY*) était plus importante pour les sujets receveurs de sexe féminin (médiane = 59,5 %) que pour les sujets receveurs de sexe masculin (médiane = 6,9 %) suggérant une origine principalement hématopoïétique de l'ADNc. La quantité d'ADNtotc ne différait pas entre les sujets transplantés et les témoins.

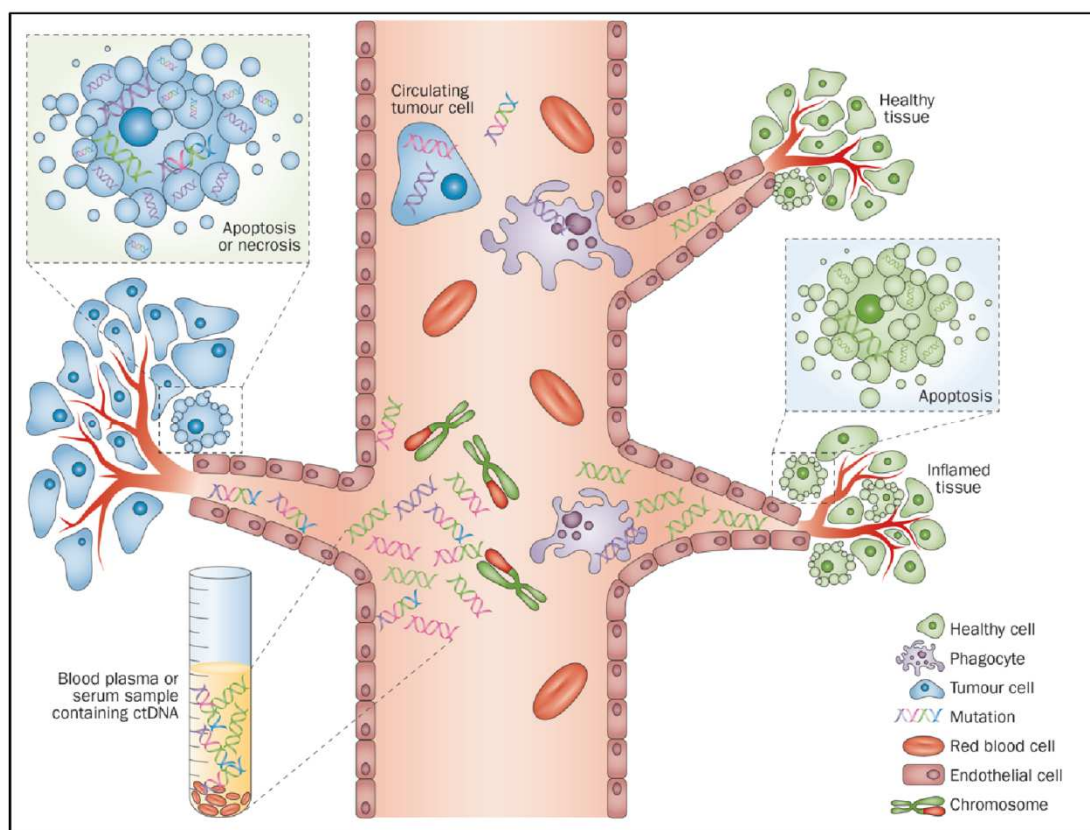


Figure 1. Origine de l'ADN dans la circulation sanguine (d'après Crowley et al. (Crowley et al, 2013)).

2. Mécanismes de libération de l'ADN circulant

a) Libération directe

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le relargage direct (c'est-à-dire extracellulaire) de l'ADN dans la circulation sanguine avec dans l'ordre croissant de contribution : la sécrétion cellulaire < la nécrose cellulaire < l'apoptose

cellulaire (Giacona *et al*, 1998; Stroun *et al*, 2001a, 2001b; Jahr *et al*, 2001; Chan *et al*, 2004; Thierry *et al*, 2010; Lo *et al*, 2010; Mouliere *et al*, 2011; Heitzer *et al*, 2013; Diaz & Bardelli, 2014; Mouliere *et al*, 2014) (**Figure 2**): La phagocytose des cellules nécrotiques ou apoptotiques par les macrophages puis la libération subséquente d'ADN dans le compartiment extracellulaire a également été décrite comme un mécanisme de libération d'ADNc (Choi *et al*, 2005; Diehl *et al*, 2005).

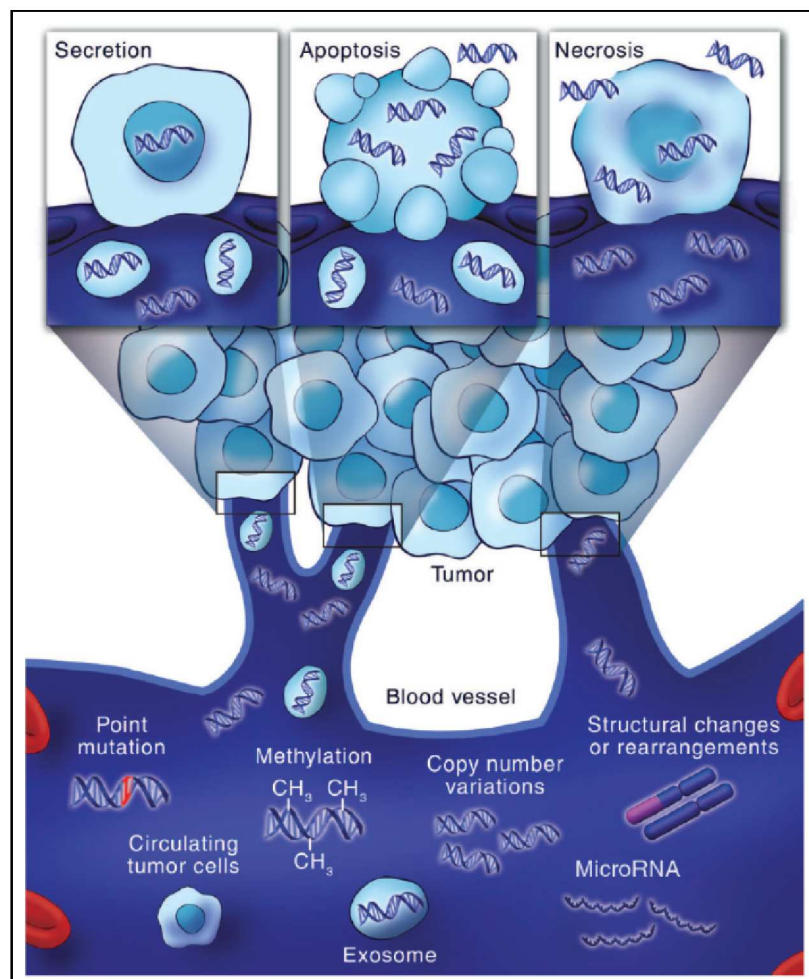


Figure 2. Mécanismes de libération cellulaire de l'ADN dans la circulation sanguine (d'après Diaz *et al*. (Diaz & Bardelli, 2014)).

Ces différents mécanismes ont été reconnus à partir de l'étude de la taille des fragments d'ADN libérés dans la circulation sanguine. En effet, durant l'apoptose, l'ADN est spécifiquement digéré par des enzymes (Caspase Activated DNase) en

fragments de longueur caractéristique (multiples de 180 paires de bases). Durant la nécrose cellulaire, le processus de dégradation de l'ADN est plus aléatoire avec des fragments de taille très variable pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaine de milliers de paires de bases. Giacomini *et al.* ont été parmi les premiers à la fin des années 1990, à suggérer ces mécanismes en étudiant le profil de taille des fragments d'ADN plasmatiques dans une série pilote de 6 sujets (3 témoins et 3 patients avec cancer du pancréas) (Giacomini *et al.*, 1998). Chez les témoins, la taille des fragments correspondait majoritairement à des multiples de 180 pb alors qu'elle apparaissait beaucoup plus aléatoire chez les patients avec cancer. Trois ans plus tard, Jahr *et al.* ont montré que l'apoptose constituait le mécanisme majoritaire de libération d'ADNc (Jahr *et al.*, 2001). Les auteurs étudiaient la taille de l'ADNc par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans une série hétérogène de 30 patients avec différents stades et types de cancer. La majorité des fragments d'ADN plasmatiques avait une taille courte (multiples de 180 pb) alors que la libération de fragments de plus grande taille (>10 000 pb) était possible mais minoritaire. Plus tard, Heitzer *et al.* ont confirmé ces données et montré par ailleurs qu'il pouvait exister un intérêt clinique à préciser le profil de taille des fragments d'ADNc apoptotiques. En effet, la détection de fragments d'ADNc plus long (di ou trinuéosomiques) était retrouvée de façon minoritaire mais semblait associée à un plus mauvais pronostic ainsi qu'une concentration d'ADNtotc et d'ADNtumc plus importante (Heitzer *et al.*, 2013).

b) Libération indirecte sous forme d'exosome

Les exosomes constituent un autre mécanisme de libération d'acides nucléiques dans la circulation sanguine (**Figure 2**). Il s'agit d'une entité décrite initialement en 1983 et qui correspond à des microvésicules extracellulaires de 40 à 150 nm de diamètre, libérées des cellules par exocytose (Harding *et al.*, 1983; Pan &

Johnstone, 1983). Ces vésicules au contenu hétérogène sont constituées de protéines et différents types d'acides nucléiques (ADN, ARNm, microARN). Le nombre d'exosome dans la circulation sanguine augmente en conditions pathologiques puisque leur nombre a été estimé autour de 2000 et 4000 trillions pour les individus sans et avec cancer, respectivement (Melo *et al*, 2014, 2015). En oncologie, les exosomes pourraient intervenir dans la carcinogénèse au niveau de différentes voies représentées sur la **Figure 3**. L'analyse du contenu en ADN des exosomes fait intervenir des méthodes d'extraction distinctes (étape d'ultracentrifugation par exemple) des méthodes habituellement utilisées pour l'extraction de l'ADN libre circulant (Li *et al*, 2017).

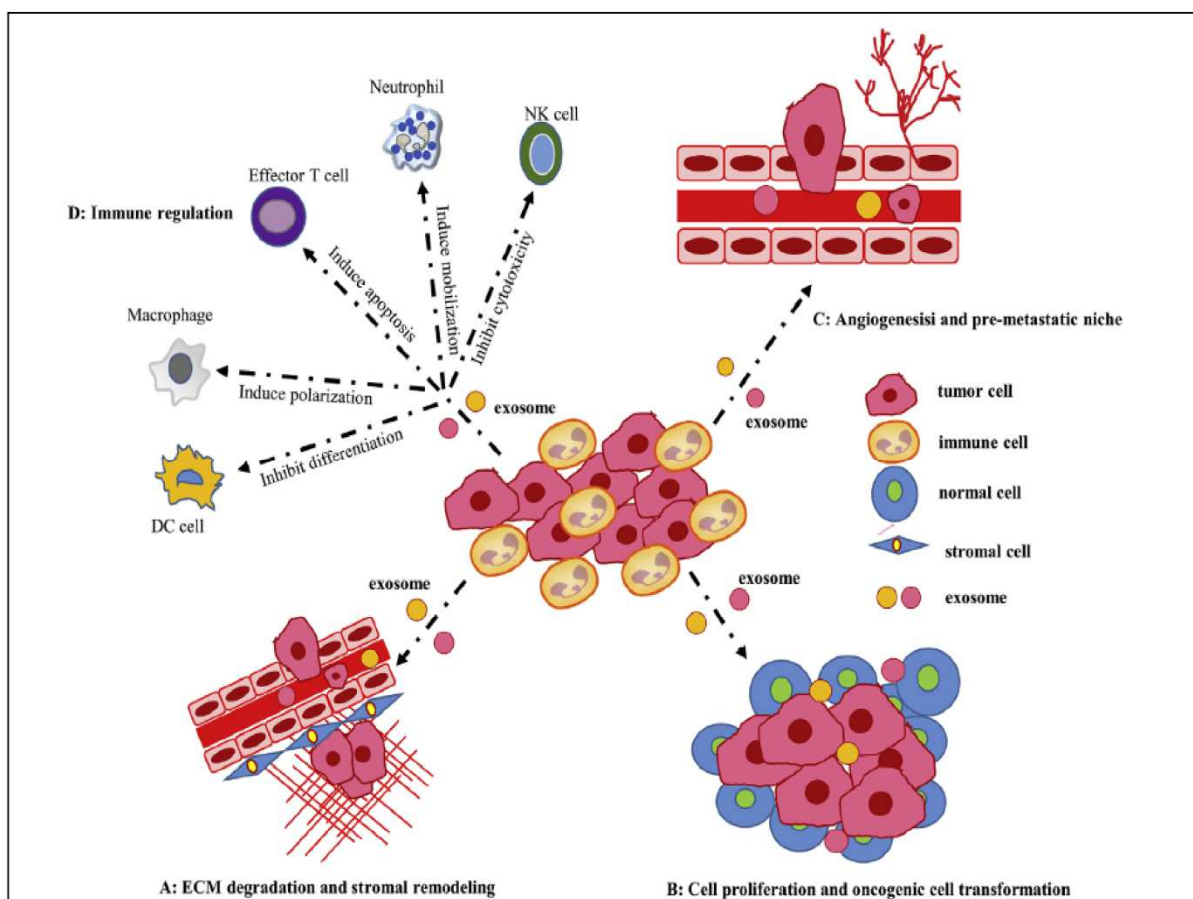


Figure 3. Rôles des exosomes dans la carcinogénèse (d'après Zhou *et al.* (Zhou *et al*, 2017)).

3. Caractéristiques structurales de l'ADN circulant

a) Structure nucléosomique

Parallèlement au fait que l'apoptose a été proposée comme mécanisme majoritaire de libération de l'ADNc, plusieurs travaux (notamment sur la maladie lupique) ont suggéré que l'ADNc pourrait ne pas circuler de façon libre mais associé au groupement originel de protéine (histone) sous forme de nucléosome circulant (Rumore & Steinman, 1990; Amoura *et al*, 1997). Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine et est constitué d'un cœur protéique composé par un octamère d'histone autour duquel s'enroule une spire d'ADN double brin d'une longueur de 146 paires de base (Luger, 2003). Les travaux menés en oncologie sur les nucléosomes circulants ont principalement été menés par l'équipe allemande de Stefan Holdenrieder (Holdenrieder *et al*, 2001, 2004, 2008). Ce dernier suggérant que les nucléosomes circulants constituent la source majoritaire d'ADNc. Il a ainsi montré que la mesure de la concentration des nucléosomes par la méthode ELISA était étroitement corrélée avec la concentration d'ADNc mesurée par une méthode classique de PCR quantitative (Holdenrieder *et al*, 2005). Récemment, Snyder *et al*. ont utilisé cette information pour retracer l'origine tissulaire de l'ADNc en se basant sur le différentiel de positionnement nucléosomique entre les cellules de différents types tissulaires (Snyder *et al*, 2016). En effet, l'organisation et la position des nucléosomes est un des mécanismes de régulation épigénétique modulant l'accès au complexe transcriptionnel. Plusieurs travaux ont montré que le positionnement des nucléosomes variait en fonction de différentes conditions tissulaires physiologiques ou pathologiques (Schones *et al*, 2008; Hu *et al*, 2011; Valouev *et al*, 2011; Gaffney *et al*, 2012). En s'appuyant sur ces différents travaux, Snyder *et al*. ont montré que la séquence des fragments d'ADNc est un témoin indirect de l'empreinte

nucléosomique et qu'elle peut secondairement informer sur l'origine tissulaire de la fraction d'ADNc majoritaire (**Figure 4**). Cette étude confirme que la source majoritaire d'ADNc chez les sujets sains était d'origine hématopoïétique et les auteurs ont pu retrouver l'origine du primitif chez 5 patients avec cancer au stade métastatique.

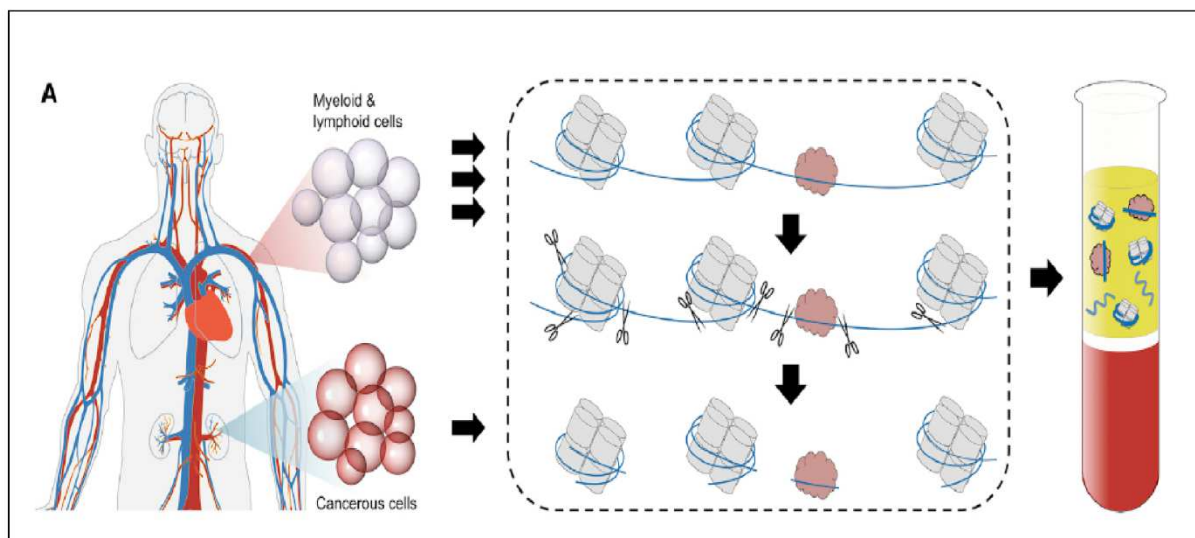


Figure 4. Caractérisation de l'ADNc selon l'occupation nucléosomique et des complexes transcriptionnels (d'après Snyder et al. (Snyder et al, 2016)).

b) Différentiel de taille selon l'origine néoplasique ou non néoplasique

Peu d'équipes se sont intéressées au profil différentiel de taille entre les fragments d'ADNc issu des cellules tumorales et ceux en provenance des cellules non tumorales. En effet, les résultats des principaux travaux décrits ci avant, concernent la fraction majoritaire d'ADNc sans préjuger de l'origine cellulaire des différentes fractions d'ADNc retrouvées. L'équipe de Vogelstein et al. avait déjà montré en 2005 que la fraction d'ADNtumorale variait de façon inversement proportionnelle avec la taille des amplicons utilisés pour la détection d'ADNtumorale (Diehl et al, 2005). Autrement dit, il y avait un enrichissement tumoral dans les

fragments d'ADN court (100 pb) suggérant une fragmentation plus importante de l'ADN en provenance des cellules tumorales. Cette augmentation de fragmentation de l'ADNc chez les patients avec cancer se traduit par un indice d'intégrité correspondant au rapport amplicon long/amplicon court pour une même région d'intérêt (plus le ratio est faible, plus la fragmentation est importante). Différentes équipes ont utilisé cet indice en oncologie en tant qu'outil diagnostique, pronostique (Umetani *et al*, 2006a; Ellinger *et al*, 2008) ou prédictif de réponse au traitement (Deligezer *et al*, 2008). Le manque de reproductibilité dans les résultats provient de plusieurs facteurs comme l'hétérogénéité des méthodes utilisés (cible de détection, taille des amplicons, absence de seuil validé), le type ou le stade du cancer et n'a pas permis jusqu'ici de positionner cet indice d'intégrité dans la prise en charge clinique des patients. L'équipe montpelliéraine de Thierry *et al*. a également travaillé sur la structure de l'ADNc. Elle a développé et approfondi ces concepts notamment sur le profil différentiel de taille entre l'ADNc d'origine tumorale (ADNt_{umc}) et non tumorale (Thierry *et al*, 2010; Mouliere *et al*, 2011; Mouliere & Rosenfeld, 2015). Ces chercheurs ont proposé un modèle ingénieux de modèle murin xenogreffé avec une lignée cellulaire humaine de cancer colorectal (CCR). En effet, il existe une différence de séquence pour l'ADN d'origine murine et humaine. C'est cette différence qui a été mise à contribution pour le design de couple d'amorces spécifiques permettant secondairement de discriminer l'ADN d'origine tumorale (humaine) *versus* non tumorale (murine). Les résultats de ces recherches montrent en premier lieu que la concentration d'ADNt_{umc} varie proportionnellement avec la taille tumorale. La deuxième constatation est un niveau de fragmentation supérieur pour les fragments d'ADN d'origine tumorale versus non tumorale. Enfin, cette équipe a montré que la taille optimale d'amplicon nécessaire à la détection de

l'ADN_{tumc} était comprise entre 60 et 100 pb et non \geq 100 pb comme cela avait auparavant été suggéré. D'autres équipes ont confirmé la valeur ajoutée de cette réduction de taille d'amplicon pour augmenter le taux de détection d'ADN tumoral ou foetal circulant (Sikora *et al*, 2010; Andersen *et al*, 2015).

4. Clairance de l'ADN circulant

Il existe peu de données sur cet aspect et les facteurs intervenant dans la clairance de l'ADN_c restent peu compris (Lo *et al*, 1999, 2000a; To *et al*, 2003; Yu *et al*, 2013). Plusieurs mécanismes ont été décrits comme la dégradation par les nucléases plasmatiques (Tamkovich *et al*, 2006; Cherepanova *et al*, 2008) et/ou l'épuration par différents organes comme le foie (Minchin *et al*, 2001) ou le rein (Chan *et al*, 2008; Yu *et al*, 2013). L'excrétion urinaire est le mécanisme qui a été le plus étudié mais la participation de cet organe dans la clairance semble minoritaire et inférieure à 20 % (Chan *et al*, 2008; Yu *et al*, 2013). Les études ayant évalué la clairance de l'ADN_c après exérèse d'une tumeur localisée (ADN_{tumc}) ou extraction de fœtus (ADN_{fc}) montre que celle-ci est rapide avec une demi-vie plasmatique comprise entre 16 min et deux heures (Lo *et al*, 1999; To *et al*, 2003; Yu *et al*, 2013).

5. Fonctionnalité de l'ADN circulant

De nombreux travaux ont montré que l'ADN extracellulaire n'était pas simplement le témoin d'une libération passive ou active mais pouvait également avoir un rôle de messenger dans la communication intercellulaire ou modifier l'expression ou le phénotype d'une cellule cible. Anker *et al*. ont ainsi montré la capacité in vitro de lymphocyte B naïf d'exposition à produire des anticorps contre le virus de l'herpès après avoir été exposé à l'ADN de lymphocytes T précédemment exposé (Anker *et al*, 1980). Une production similaire d'anticorps anti-herpétique était observée in vivo avec un modèle murin dans lequel l'ADN de lymphocyte T précédemment exposé

avait été injecté (Anker *et al*, 1984). De la même façon, l'ADN extrait de lignées cellulaires tumorales (SW 480) porteuses de la mutation *KRAS* à l'état homozygote est capable d'induire la transformation néoplasique de lignées cellulaires d'embryoblaste murin (NIH3T3) par simple adjonction au milieu de culture (Anker *et al*, 1994). Sur la base de ces travaux, une hypothèse selon laquelle l'ADNc pourrait être impliqué dans la survenue de métastases a été avancée à la fin des années 1990. L'équipe espagnole à l'origine de ce concept de « génométastases » a montré la capacité d'induire une transformation néoplasique de la lignée cellulaire NIH3T3 à partir du plasma de modèles murins avec xénogreffe tumorale (García-Olmo *et al*, 1999, 2000). Par la suite, la même équipe a observé des résultats similaires à partir du plasma de patients avec CCR soit concomitamment au diagnostic (avant résection de la tumeur primitive) (García-Olmo *et al*, 2010) soit à distance (après résection) chez des patients considérés en rémission mais dont l'évolution allait être marquée par une récurrence chez ceux dont le plasma était capable d'induire une transformation néoplasique des lignées cellulaires (García-Olmo *et al*, 2012).

C. Champs d'application clinique

1. *Diagnostic prénatal*

Le diagnostic prénatal (DPN) est l'ensemble des pratiques médicales ayant pour but de détecter *in utero* chez l'embryon ou le fœtus une affection grave (anomalie génétique ou malformation congénitale, par exemple) afin de donner aux futurs parents le choix d'interrompre ou non la grossesse et de permettre une meilleure prise en charge médicale de la pathologie si la grossesse est poursuivie.

Concernant les maladies génétiques, le DPN est à envisager dans deux situations: i) une situation prévisible avant le début de la grossesse dans une population dite « à haut risque » (couple à risque d'anomalies chromosomiques (antécédents familiaux

ou personnels), couple à risque pour une maladie génétique monofactorielle ou multifactorielle). Dans ce cas, le diagnostic du cas index doit être parfaitement identifié ii) une situation imprévisible avant le début de la grossesse. Durant celle-ci, apparaissent des signes biologiques (élévation des marqueurs sériques comme par exemple la sous unité β de *human chorionic gonadotropin* (β hCG) et l'alpha-foetoprotéine) ou échographiques d'appel évoquant la possibilité d'une maladie génétique responsable d'un handicap grave chez le fœtus. Dans ces circonstances, le DPN nécessite l'obtention de matériel génétique des cellules en provenance du fœtus. La procédure de référence consiste à obtenir ce matériel génétique de façon invasive (procédure de référence) par la réalisation d'un prélèvement de trophoblaste (ou de villosités choriales), d'un prélèvement de liquide amniotique (ou amniocentèse) ou d'un prélèvement de sang fœtal ou cordocentèse. L'alternative consiste en une option non invasive par la détection d'ADN fœtal dans le sang maternel. Depuis la fin des années 1990, de nombreux travaux ont été publiés sur la faisabilité de détecter l'ADNfc. Le rationnel provient du fait qu'une partie des cellules placentaires entrent en apoptose durant la grossesse et libèrent régulièrement de l'ADN foetal dans la circulation sanguine maternelle (**Figure 5**) (Bischoff *et al*, 2005; Tjoa *et al*, 2006; Alberry *et al*, 2007; Bodurtha & Strauss, 2012).

a) Premières applications : détermination du sexe foetal

La première application du DPN non invasif fut la détermination du sexe foetal à partir d'un échantillon de sang maternel. Cette détermination repose sur la détection de gènes d'intérêt associés au chromosome Y (comme par exemple le gène *SRY* (Lo *et al*, 1998a) ou le gène *TSPY* (Zimmermann *et al*, 2006)). La connaissance du sexe foetal est importante pour les maladies génétiques liées au

chromosome X (comme par exemple la Dystrophie musculaire de Duchenne, le Syndrome d'Alport, l'Adrénoleucodystrophie, l'Hémophilie majeure ou le retard mental lié à l'X comme le syndrome de l'X fragile) puisque les conséquences phénotypiques toucheront principalement les sujets de sexe masculin alors que les sujets de sexe féminin ne seront pas affectés (Finning & Chitty, 2008).

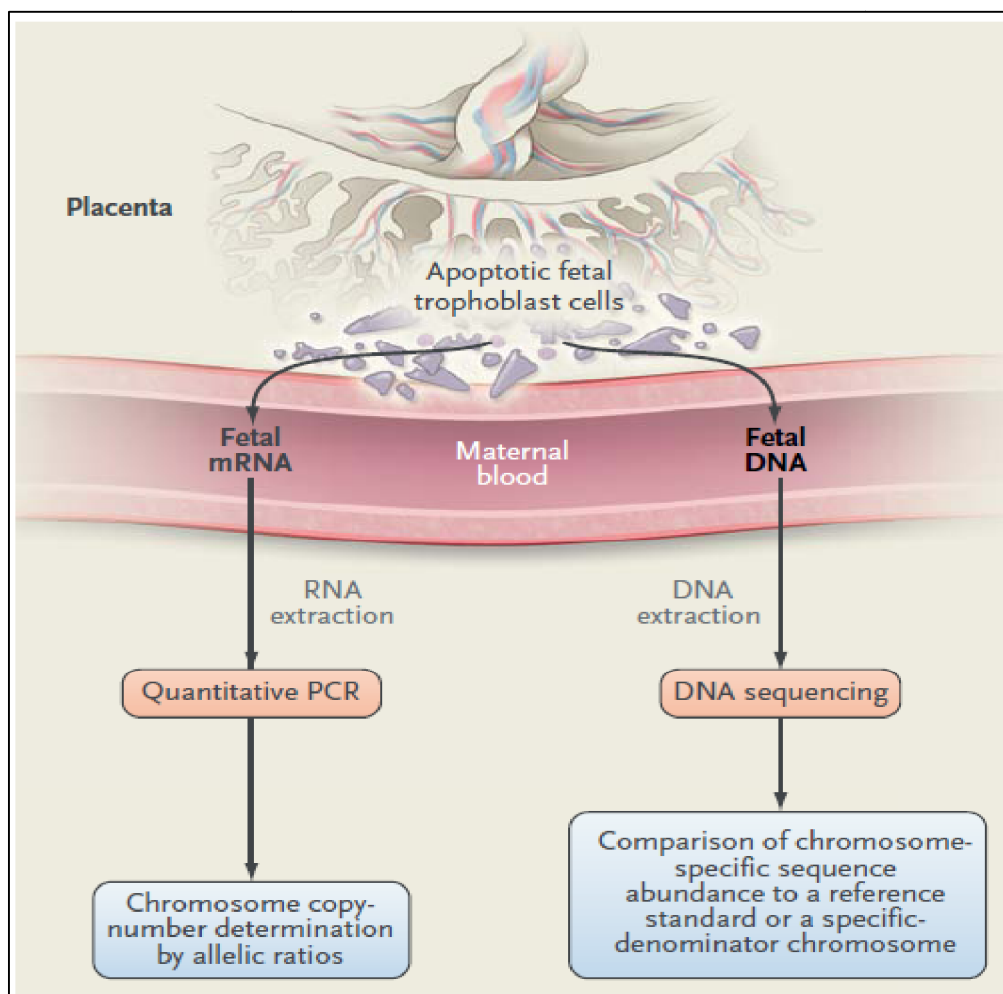


Figure 5. Diagnostic prénatal non invasif par l'utilisation des acides nucléiques circulants libérés par les cellules trophoblastiques apoptotiques (D'après Bodurtha et al. (Bodurtha & Strauss, 2012)).

Le premier travail sur la détermination du sexe fœtal à partir d'un prélèvement sanguin maternel date de 1997 avec la publication de Lo *et al.* (Lo *et al.*, 1997). Dans cette étude pilote, 43 femmes enceintes étaient incluses (30 fœtus de sexe masculin, 13 de sexe féminin) ainsi que 10 témoins. Une méthode de PCR conventionnelle était utilisée pour l'identification du gène d'intérêt sur le chromosome Y suivie d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose et révélation au bromure d'éthidium. La sensibilité était de 80 % (24/30) et la spécificité de 100 % (0/13 et 0/10) pour le diagnostic de sexe fœtal masculin. Récemment, une méta-analyse portant sur 57 études et 6541 fœtus a été publiée. Celle-ci rapporte une excellente performance diagnostique globale lorsque le diagnostic de sexe fœtal est réalisé à partir de 7 semaines d'aménorrhée (sensibilité de 95,4 % et spécificité de 98,1 %) (Devaney *et al.*, 2011).

b) Aneuploïdie fœtale

La détection d'aneuploïdie dont la trisomie 21 est le principal représentant, représente un défi technique supplémentaire en comparaison de la détermination du sexe fœtal. Il s'agit d'identifier ici une cible (ou plutôt un ratio de cible (chromosome d'intérêt/autre chromosome)) qui est commun au fœtus et à la mère à la différence de l'application précédente où la détection s'applique à une cible absente du patrimoine génétique maternel. Dans le cadre de la trisomie 21, un arrêté a fixé en 2009 les règles de bonne pratique du dépistage en précisant que celui-ci devait être systématiquement proposé à la femme enceinte lors de la consultation médicale. Ce dépistage réalisé entre 11 et 13 semaines d'aménorrhée combine le dosage de deux marqueurs protéiques sériques associé aux mesures échographiques de la clarté nucale et de la longueur cranio-caudale. Lorsque le risque déterminé par ce dépistage est supérieur ou égal à 1/250, il est proposé un

geste invasif pour l'établissement du caryotype fœtal. Selon l'agence de biomédecine, cette modalité de dépistage révèle chaque année 4 % de patientes à risque avec une valeur prédictive positive de ce test de 5 %. Cela représente en moyenne chaque année une détection de 1000 anomalies chromosomiques pour un total de 20 000 gestes invasifs réalisés. Depuis 2007, plusieurs études ont montré la faisabilité de porter le diagnostic de trisomie 21 à partir d'ADN fœtal plasmatique (Lo *et al*, 2007; Fan *et al*, 2008). De nombreuses techniques ont été décrites dans la littérature mais la méthode la plus utilisée actuellement est le séquençage à haut débit ou next-generation sequencing (NGS). Les travaux rapportés ces dernières années avec cette technologie affichent des résultats très prometteurs avec une sensibilité et une spécificité supérieure ou égale à 98% (Chiu *et al*, 2011; Porreco *et al*, 2014). L'utilisation de ces tests à grande échelle a néanmoins soulevé plusieurs limites comme le risque de faux-positifs (anomalies cytogénétiques maternelles tumorales, anomalies chromosomiques restreintes au placenta, anomalies chromosomiques portés par des jumeaux évanescents), ou la perte d'information induite par la seule recherche des aneuploïdies les plus fréquentes (trisomies 21, 13 et 18) occultant les autres anomalies chromosomiques mises en évidence sur le caryotype obtenu après réalisation d'un prélèvement invasif. Par ailleurs, si les résultats décrits ci avant ont été obtenus à partir de cohorte de patientes dites à haut risque (dépistage combiné $\geq 1/250$), plusieurs travaux récents montrent que ce dépistage sanguin réalisé chez l'ensemble des femmes enceintes affiche également des résultats prometteurs (Nicolaidis *et al*, 2012; Song *et al*, 2013; Gil *et al*, 2013; Bianchi *et al*, 2014). Le rationnel sous jacent est une sensibilité du test de dépistage combiné (marqueurs sériques + échographie) voisine de 85 %, autrement dit le risque de méconnaître une aneuploïdie fœtale correspond à 15 % en cas de test

combiné négatif. A titre d'exemple, Bianchi et *al.* ont ainsi réalisé une étude dont l'objectif principal était la comparaison du taux de faux positifs pour le diagnostic de trisomie 21 et trisomie 18 entre le dépistage standard (marqueurs sériques +/- échographie obstétricale) et le dépistage par ADNc (Bianchi *et al.*, 2014). Il s'agissait d'une étude multicentrique incluant 1914 femmes enceintes en population générale dans 21 centres à travers les Etats-Unis. Le dépistage par ADNc entraînait un taux de faux positif significativement plus faible que le dépistage classique (0,3 % versus 3,6 % pour la trisomie 21, $p < 0,001$ et 0,2 % versus 0,6 % pour la trisomie 18, $p = 0,03$). Les valeurs prédictives positives (VPP) du test expérimental versus le test de référence étaient de 45,5 % et 4,2 % pour la trisomie 21 et 40 % et 8,3 % pour la trisomie 18, respectivement. Le test expérimental diagnostiquait tous les cas de trisomie 21 ($n=5$) et trisomie 18 ($n=2$).

c) Maladies monogéniques

Dans la situation des maladies génétiques à transmission autosomique dominante, la détection de l'allèle muté transmis par le père rejoint la problématique de la détermination du sexe foetal. Au début des années 2000, plusieurs travaux ont ainsi rapporté la possibilité de réaliser un DPN de maladies monogéniques à transmission autosomique dominante telles que la dystrophie myotonique de Steinert (Amicucci *et al.*, 2000), la maladie de Huntington (González-González *et al.*, 2003) ou l'achondroplasie (Saito *et al.*, 2000). Dans la situation des maladies génétiques à transmission autosomique dominante transmises par la mère ou les maladies à transmission autosomique récessive, la détection de l'altération génétique comporte un pallier supplémentaire de complexité puisque le foetus et la mère partagent la même mutation. Lorsque la mère est porteuse de la mutation à l'état hétérozygote et que le foetus est porteur de l'allèle muté ou « sauvage » à l'état homozygote, il va

exister une sur ou sous-représentation respectivement de l'allèle muté dans la circulation sanguine maternelle. L'amélioration des méthodes analytiques utilisées pour la détection d'ADNfc (description dans la partie « considérations analytiques ») permet de mettre en évidence cette sur ou sous-représentation (le principe est illustré en **Figure 6**).

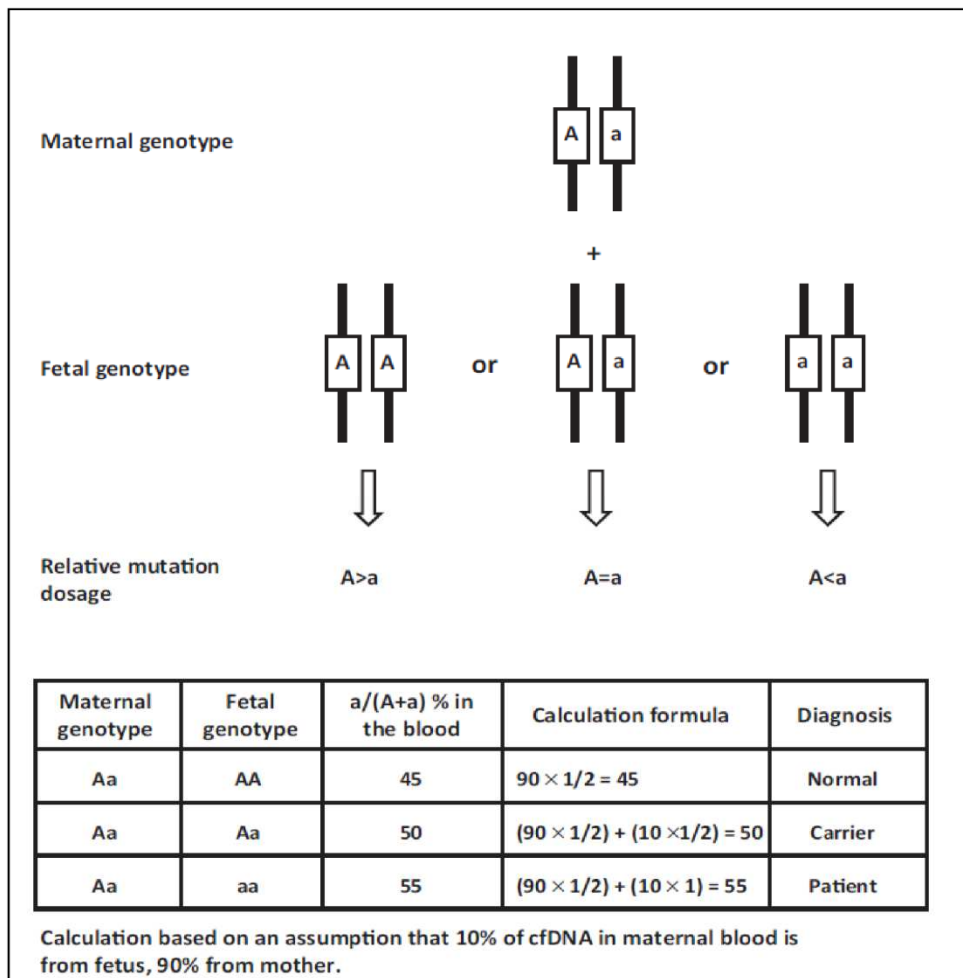


Figure 6. Diagnostic prénatal non invasif de maladies monogéniques à transmission autosomique récessive par dosage relatif de la fraction mutationnelle (D'après Liu et al. (Liu et al, 2016)).

A titre d'exemple, Barrett et al. ont utilisé une méthode de dPCR pour le DPN de drépanocytose, maladie à transmission autosomique récessive liée à une mutation du gène codant pour la chaîne bêta de l'hémoglobine (Barrett et al, 2012). Le dosage

allélique relatif observé de l'allèle muté était comparé au dosage allélique relatif attendu déterminé à partir de la fraction d'ADNfc. Le diagnostic était correctement établi pour 82 % (37/45) et 75 % (15/20) des fœtus de sexe masculin et féminin, respectivement, indépendamment de la fraction d'ADNfc. En cas de fraction d'ADNfc > 7 %, le diagnostic était correct dans 100 % des cas (25/25), indépendamment du sexe fœtal. Le DPN non invasif utilisant cette méthode a également été rapporté pour d'autres maladies à transmission autosomique récessive comme la β -thalassémie (Lun *et al*, 2008), l'hémophilie (Tsui *et al*, 2011) ou la mucoviscidose (Debrand *et al*, 2015).

2. Transplantation d'organe

Le rejet d'allogreffe constitue un problème majeur en transplantation d'organe solide puisqu'il peut conduire à une perte de fonction aiguë ou chronique du greffon. La surveillance de chaque patient transplanté est donc en partie axée sur le dépistage de cette complication afin d'adapter le traitement immunosuppresseur le plus précocement possible en prévention d'une destruction irréversible du greffon. La procédure de référence pour le diagnostic de cette complication repose sur une biopsie tissulaire avec analyse histologique du greffon. Il s'agit d'une procédure itérative, coûteuse et invasive. Plusieurs alternatives non invasives pour dépister cette complication ont été décrites comme le test d'expression génique AlloMap® dans la transplantation cardiaque (Horwitz *et al*, 2004; Deng *et al*, 2006; Pham *et al*, 2010) ou la détection d'ADNc du donneur dans l'urine ou le sang du receveur de façon plus générale (Lo *et al*, 1998b; Lui *et al*, 2002, 2003; Zhang *et al*, 1999; Gadi *et al*, 2006; García Moreira *et al*, 2009; Snyder *et al*, 2011; Beck *et al*, 2013; De Vlaminc *et al*, 2014, 2015; Zou *et al*, 2017; Schütz *et al*, 2017; Bloom *et al*, 2017). La première description en ce sens a été publiée en 1998 par l'équipe Hongkongaise

renommée de Lo et *al.* qui montrait la détection possible d'ADN de donneur de sexe masculin (séquence cible sur le chromosome Y) chez des patientes receveuses (sensibilité = 87 % (n=20/23); spécificité = 100 % (n=0/13)) (Lo et *al.*, 1998b). D'autres travaux ont par la suite montré sur de petites séries de patientes greffées rénales qu'il existait une corrélation entre le risque de rejet et l'augmentation de la concentration d'ADN spécifique du donneur (en utilisant toujours la même cible (région du chromosome Y) et la même population (donneur homme et receveuse)) tant au niveau sanguin (García Moreira et *al.*, 2009) qu'urinaire (Zhang et *al.*, 1999). Il s'agissait plus ici d'une preuve de concept puisque cette utilisation ne concernait seulement qu'une petite fraction des patients transplantés (donneur de sexe masculin et receveur de sexe féminin). En effet, l'utilité de cette stratégie dépend principalement de la capacité à concevoir un test qui soit capable de détecter les fragments d'ADN spécifiques du donneur sans préjuger du sexe d'origine. Gadi et *al.* se sont ainsi affranchis de cette contrainte en utilisant comme cible la présence de polymorphismes présents dans le système HLA du donneur préalablement identifiés avant la greffe (Gadi et *al.*, 2006). Une augmentation significative de l'ADNc du donneur était retrouvée en situation de rejet aigu. D'autres études récentes s'appuyant sur des techniques de séquençage à haut débit pour identifier les polymorphismes discriminant l'ADN du donneur et du receveur ont confirmé l'importance de ce biomarqueur pour prédire le rejet (**Figure 7**). De Vlaminck et *al.* montraient ainsi dans une série prospective récente de 65 patients transplantés cardiaques, qu'au seuil de 0,25 % (fréquence allélique (FA) de l'ADNc du donneur), la sensibilité et la spécificité de ce biomarqueur pour prédire le rejet était de 58 % et 92 % respectivement, en comparaison des biopsies endomyocardiques (De Vlaminck et *al.*, 2014).

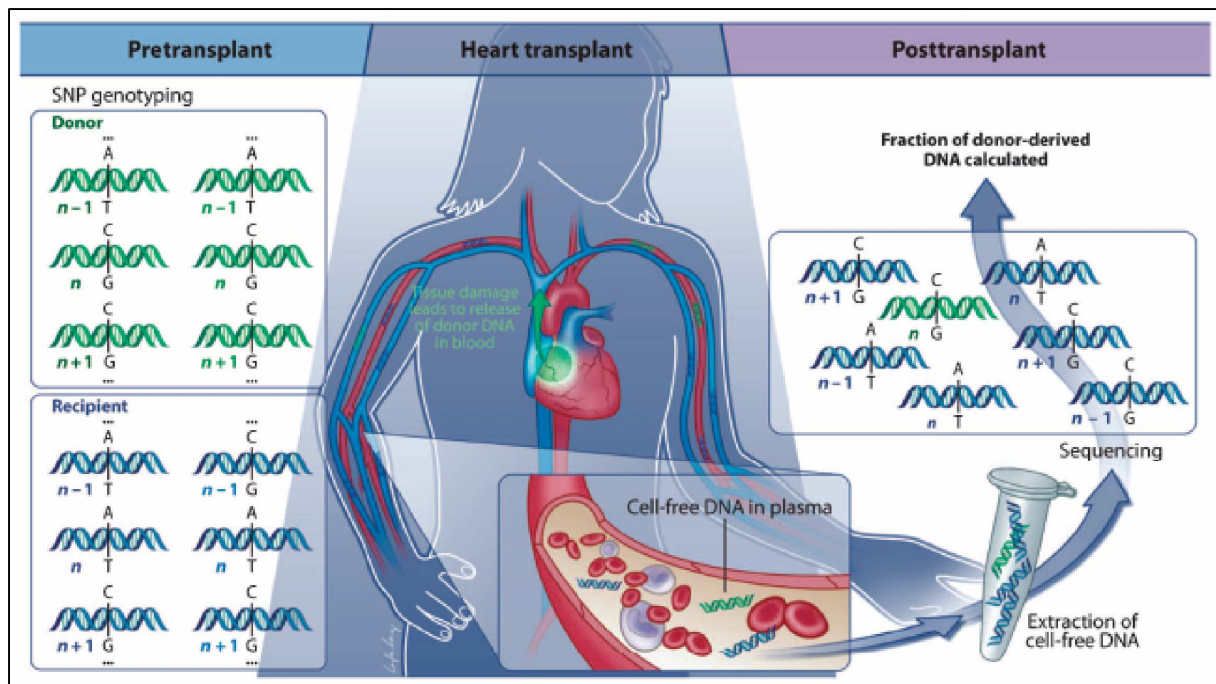


Figure 7. Diagnostic non invasif de rejet de transplant cardiaque à partir de l'ADN circulant du donneur et du génotypage préalable des polymorphismes (SNP) du donneur et du receveur (d'après De Vlaminck *et al.* (De Vlaminck *et al.*, 2014)).

L'interprétation de ces chiffres doit tenir compte de l'absence de « gold standard » pour le diagnostic de rejet puisqu'il a été montré que les biopsies endomyocardiques constituent un contrôle positif imparfait dans la mesure où il existe une variabilité intra et inter observateur dans la relecture histologique des biopsies et par ailleurs une hétérogénéité spatiale dans l'infiltrat inflammatoire permettant le diagnostic de rejet de l'organe transplanté (Crespo-Leiro *et al.*, 2012). Les autres avantages de cette biopsie liquide sont la possibilité d'anticiper le rejet jusqu'à plusieurs mois avant sa survenue de même que de discriminer le rejet d'une autre cause d'altération du greffon (infectieuse notamment) (De Vlaminck *et al.*, 2015, 2013). Les inconvénients à cette technologie de séquençage à haut débit sont la nécessité de disposer du matériel génétique du donneur et du receveur préalablement à l'analyse, le coût prohibitif, le délai de réponse entre le prélèvement et la fin de l'analyse, et enfin, la nécessité d'une plate forme de bioinformatique ne

permettant actuellement pas de la proposer dans une approche standard de surveillance. Dans cette perspective, Beck *et al.* proposaient l'utilisation de polymorphismes connus (single-nucleotide polymorphism (SNP)), identifiés par le projet Hapmap avec une FA minoritaire > 43 % (Beck *et al.*, 2013). Ils identifiaient une quarantaine de SNP pouvant être utilisés à cette fin et utilisaient la méthode de dPCR pour discriminer l'ADN du receveur de l'ADN du donneur avec un minimum de 2 SNP utilisés pour déterminer la FA moyenne circulante du donneur. Une série de 34 patients était constituée avec 17 sujets transplantés hépatiques, 9 transplantés rénaux et 8 transplantés cardiaques. La FA moyenne chez les sujets transplantés sans signe de rejet était de 3,5 %, 1,2 % et 0,9 % chez les sujets transplantés hépatiques, rénaux et cardiaques, respectivement. Parmi les deux patients pour lesquels un rejet était identifié, les FA de l'ADNc du donneur augmentaient significativement en dépassant systématiquement 50 %.

3. *Autres champs d'application*

L'analyse de l'ADNc pourrait également avoir un intérêt dans des champs d'application clinique très variés tels que les pathologies infectieuses (Buchan & Ledebor, 2014), neurologiques (Lam *et al.*, 2006; Beck *et al.*, 2010; Liggett *et al.*, 2010; O'Connell *et al.*, 2017), hépatogastroentérologiques (Bagul *et al.*, 2006; Gornik *et al.*, 2009, 2011; Karlas *et al.*, 2017), réanimatoires (Lo *et al.*, 2000b; Dwivedi *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2013; Gornik *et al.*, 2014) ou cardiovasculaires (Rainer *et al.*, 2006; Destouni *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2011; Cui *et al.*, 2013; Sudakov *et al.*, 2015, 2017). La reconnaissance d'une séquence génétique spécifique n'est ici pas indispensable pour ce type d'application. En effet, la quantification de l'ADNtotc semble constituer un biomarqueur pronostic intéressant capable de prédire la gravité d'une pathologie en comparaison des scores ou biomarqueurs utilisés

habituellement. Il ressort généralement des différentes études que plus la concentration d'ADNtotc est importante, plus la pathologie est sévère ou le pronostic péjoratif. Il a ainsi été montré que la quantité d'ADNtotc était étroitement corrélée à l'extension de la nécrose et à la sévérité de la pancréatite aiguë (Gornik *et al*, 2009, 2011). Le dosage d'ADNtotc apparaissait supérieur aux autres scores (Ranson, Apache II, dosage de CRP) pour prédire la sévérité de la pancréatite. Dans les pathologies cardiovasculaires ou de réanimation, la quantité d'ADNc serait un témoin direct du degré d'ischémie au même titre que le dosage de lactates ou de troponine pour les infarctus du myocarde (Rainer *et al*, 2006; Destouni *et al*, 2009; Jing *et al*, 2011; Cui *et al*, 2013; Sudakov *et al*, 2015, 2017).

D. Considérations pré-analytiques

Eu égard aux champs d'application décrits ci-avant, l'ADNc représente un biomarqueur prometteur. Néanmoins, son application en routine n'est pas encore établie (en dehors de certaines applications du DPN). Le retard à l'utilisation de ce biomarqueur en pratique quotidienne provient en partie de l'absence de standardisation des conditions préanalytiques. Les étapes qui précèdent l'analyse d'ADNc ont une influence majeure sur le résultat des analyses ultérieures et peuvent constituer une source de variabilité importante. L'objectif de cette partie est de dresser un état des lieux des connaissances disponibles sur ce sujet (une synthèse est proposée en **Figure 8**).

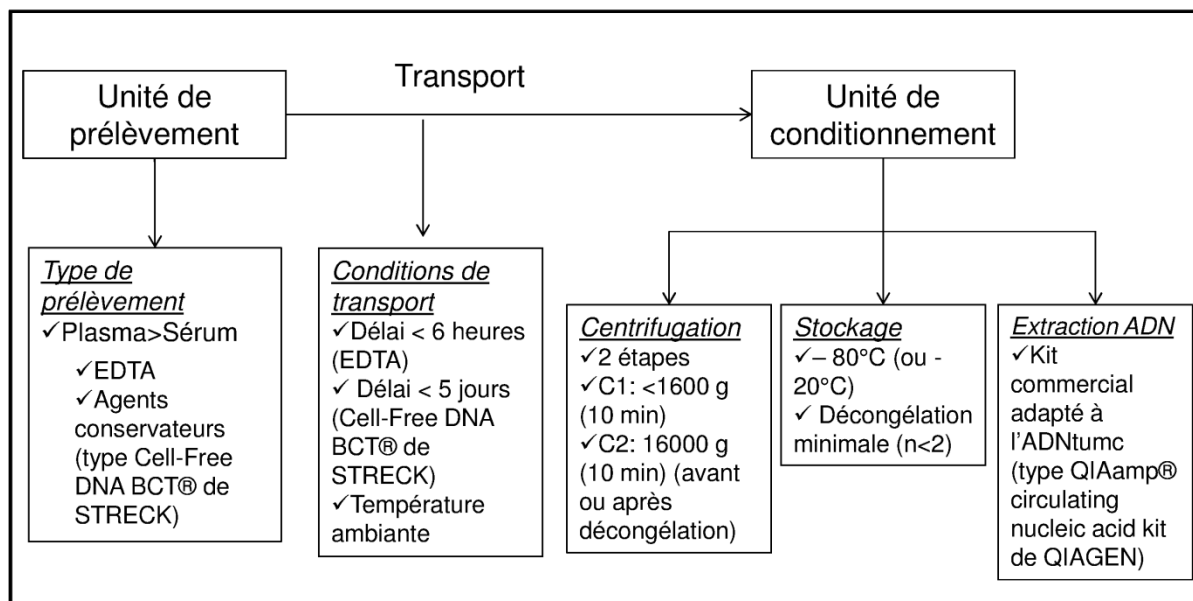


Figure 8. Recommandations préanalytiques actuelles pour l'analyse d'ADNtumorc.

1. Type de prélèvement

La première étape consiste à déterminer si l'analyse de l'ADNc doit être réalisée à partir d'un échantillon de plasma ou de sérum. Le plasma est le surnageant obtenu après centrifugation de sang complet. La coagulabilité du sang a été inhibée par adjonction d'un anticoagulant. Le sérum est obtenu à partir de sang complet après avoir laissé se faire le processus de coagulation. Schématiquement, le sérum possède la même composition que le plasma mais sans fibrinogène ni autre protéine de la coagulation. La réponse à cette question n'est plus débattue puisqu'il est reconnu que le plasma constitue la meilleure source pour l'analyse de l'ADNc (en particulier l'ADNtumorc) (El Messaoudi *et al*, 2013; Bronkhorst *et al*, 2015). De nombreux travaux comparant ces deux types d'échantillon ont montré que les concentrations d'ADN obtenues à partir du sérum étaient significativement supérieures à celles issues du plasma (Lee *et al*, 2001; Lui *et al*, 2002; Chan *et al*,

2005; Umetani *et al*, 2006b; Board *et al*, 2008). Cette différence proviendrait de la libération d'ADN par la lyse des cellules sanguines lors du processus de coagulation. Lorsque l'on étudie une cible d'intérêt (ADN_{tumc}, ADN_{fc} etc.) dont le taux est extrêmement variable, il est nécessaire de limiter au maximum les facteurs de dilution comme le relargage de l'ADN génomique par les cellules sanguines. Pour le plasma, le choix de l'EDTA comme anticoagulant est préférentiellement retenu puisqu'il a été montré que l'héparine constituait un inhibiteur de PCR (Beutler *et al*, 1990; Jung *et al*, 1997). Une étude a par ailleurs rapporté l'effet protecteur de l'EDTA sur l'ADN_c par l'intermédiaire d'un effet inhibiteur sur les nucléases plasmatiques (Barra *et al*, 2015). Récemment, un nouveau tube de prélèvement sanguin a été commercialisé par la société Streck (Cell-Free DNA BCT®). Il possède la particularité de contenir outre l'anticoagulant classique (EDTA), un réactif de conservation prévenant en théorie la libération d'ADN génomique des cellules sanguines. Plusieurs études ont montré que les résultats d'ADN_c étaient stables sans modification qualitative (intégrité) et quantitative (concentration) jusqu'à 14 jours après le prélèvement (Norton *et al*, 2013b, 2013a; Das *et al*, 2014; Kang *et al*, 2016; Henao Diaz *et al*, 2016; Mehrotra *et al*, 2017; Parpart-Li *et al*, 2017). Deux travaux récents sont venus remettre en cause ces données en montrant une plus grande variabilité de résultats entre les réplicats et un moindre taux de détection d'ADN_{tumc} lorsque le tube était conditionné au-delà de 5 jours notamment si les conditions spécifiques de température de conservation (entre 10 et 40 °C) n'étaient pas respectées (Distler *et al*, 2016; Medina Diaz *et al*, 2016).

2. Conditions de transport

La question du délai d'acheminement des échantillons entre le moment du prélèvement et le conditionnement est d'importance clinique majeure. En effet, ces 3

étapes (prélèvement, transport et conditionnement) font souvent intervenir des acteurs et des plates formes différentes (exemple : prélèvement dans l'unité de soins et conditionnement au laboratoire) avec une synchronisation de ces différents temps qui en pratique n'est pas toujours aisée à mettre en place. Il apparaît que jusqu'à 6 heures après le prélèvement, la concentration d'ADNc reste stable (Angert *et al*, 2003; Jung *et al*, 2003; Lam *et al*, 2004; Chan *et al*, 2005; Barrett *et al*, 2011). Au-delà de ce délai, celle-ci augmente de façon significative. Concernant la température de transport, l'ensemble des études montre de façon consensuelle que celle-ci (température ambiante ou à 4°C) n'influence pas significativement la concentration d'ADNc (Jung *et al*, 2003; Chan *et al*, 2005; Xue *et al*, 2009; Barrett *et al*, 2011).

3. Conditionnement

L'étape de conditionnement consiste à préparer l'échantillon de sang de façon à séparer le plasma des cellules sanguines pour obtenir une fraction plasmatique sans cellules résiduelles. Pour l'analyse d'ADNc, l'objectif est d'éviter une contamination par l'ADN des cellules sanguines. Ce conditionnement peut être réalisé par centrifugation +/- filtration. Chiu *et al*. ont étudié l'impact de différents protocoles de conditionnement des échantillons de sang chez des femmes enceintes pour obtenir un plasma sans cellules foetales résiduelles (Chiu *et al*, 2001). Ils ont montré qu'un protocole comportant deux étapes de centrifugation (1600 g pendant 10 minutes puis 16 000 g pendant 10 minutes) était aussi efficace qu'une étape de centrifugation suivie d'une filtration pour obtenir une fraction plasmatique libre de cellules résiduelles. Le protocole associé à une simple centrifugation était associé à la présence de cellules résiduelles dans le plasma. Par la suite, une autre étude est venue confirmer ces données en précisant que la réalisation de la 2^e étape de centrifugation pouvait indifféremment être réalisée avant ou après la congélation des

échantillons de plasma (Swinkels *et al*, 2003). La plupart des publications récentes dévolues à ce biomarqueur et deux revues récentes préconisent un protocole de double centrifugation avec une première étape à vitesse lente (1200-1600 g) et une deuxième à vitesse rapide (16000 g) (El Messaoudi *et al*, 2013; Bronkhorst *et al*, 2015).

4. Conditions de stockage du plasma

Si les études traitant de cet aspect sont hétérogènes en termes de conditions expérimentales (durée de conservation des échantillons, température de stockage notamment) (Lee *et al*, 2001; Jung *et al*, 2003; Chan *et al*, 2005; Sozzi *et al*, 2005; Holdenrieder *et al*, 2010; El Messaoudi *et al*, 2013), quelques instructions peuvent néanmoins être formulées. Il apparaît que la température de conservation (-20 ou -80 °C) du plasma après centrifugation n'impacte pas sur la concentration de l'ADN extrait ultérieurement. Par ailleurs, il est recommandé de ne pas décongeler le plasma à plus de deux reprises puisque cette procédure altère l'ADN à la fois sur le plan qualitatif et quantitatif. Il paraît donc nécessaire de réaliser plusieurs aliquots à partir d'un même échantillon de plasma en prévision de cette dégradation et dans la perspective de projets multiples sur une collection biologique. Concernant la durée de conservation, El Messaoudi *et al*. montraient que la concentration moyenne d'ADN ne variait significativement pas entre deux analyses de plasma extraits à 9 mois d'intervalle (El Messaoudi *et al*, 2013). Les critères d'évaluation utilisés dans ces études (concentration d'ADN total et/ou indice d'intégrité) constituent leur principale limite puisqu'ils ne permettent pas de juger de l'influence de ces conditions de stockage sur les résultats de détection d'une altération moléculaire spécifique.

5. Extraction de l'ADN

Cette étape est la dernière du parcours préanalytique de conditionnement des échantillons d'ADNc. Elle a fait l'objet de plusieurs études comparatives dans les années 2000 sans qu'une méthode commerciale ou académique ne puisse nettement se démarquer en termes d'efficacité d'extraction (Xue *et al*, 2009; Schmidt *et al*, 2005; Clausen *et al*, 2007; Legler *et al*, 2007; Kirsch *et al*, 2008; Fong *et al*, 2009; Fleischhacker *et al*, 2011; Repiská *et al*, 2013). Au début des années 2010, QIAGEN a commercialisé un kit (QIAamp circulating nucleic acid kit) adapté à l'analyse d'ADNc. Celui-ci a la particularité de conserver les fragments courts d'ADN qui étaient auparavant éliminés lors des étapes de « lavage » (Breitbach *et al*, 2014). Plusieurs travaux ont montré la supériorité de ce kit en termes d'efficacité d'extraction et pour sa capacité à améliorer la détection d'ADNtmc (Page *et al*, 2013; Devonshire *et al*, 2014; Mauger *et al*, 2015). Récemment, plusieurs autres kits commerciaux dédiés à l'analyse d'acides nucléiques circulants sont apparus sur le marché (PME free-circulating DNA Extraction Kit (Analytik Jena); Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega), EpiQuick Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit (EpiGentek); NEXTprep-Mag cfDNA Isolation Kit (SanBio)). Ils ont fait l'objet d'une analyse comparative récemment publiée qui portait sur 10 échantillons plasmatiques issus de 9 patients (7 avec cancer du pancréas et 2 avec lésion kystique bénigne) (Sorber *et al*, 2017). Ces kits étaient évalués en termes d'efficacité d'extraction et d'indice d'intégrité pour l'ADNtotc ainsi qu'en taux de détection et de quantification de FA pour l'ADNtmc (identification de mutations *KRAS* par dPCR). Les kits de Promega et de Qiagen affichaient des résultats comparables et nettement supérieurs aux autres kits pour l'ensemble de ces critères de jugement.

E. Considérations analytiques

L'essor grandissant que connaît l'analyse de l'ADNc est dû aux progrès technologiques qui ont été faits dans ce domaine ces dix dernières années. Le principe de la biopsie liquide est de pouvoir détecter des événements potentiellement rares comme la présence d'un fragment d'ADN tumoral parmi 10 000 fragments d'ADN non tumoral (soit une FA à 0,01 %). Dans cette partie, nous traiterons des principales technologies utilisées pour la détection d'ADNtumorales qui visent généralement deux approches selon la connaissance préalable ou non du statut mutationnel dans le tissu tumoral et nous illustrerons chaque approche par deux exemples. Les sensibilités des méthodes de détection abordées ici sont représentées en **Figure 9** alors que leurs avantages et inconvénients sont indiqués en **Tableau 1**.

Technique	Sensibilité	Application optimale
Séquençage Sanger	> 10 %	Tissu tumoral
Pyroséquençage	5-10 %	Tissu tumoral
NGS	2 %	Tissu tumoral
PCR quantitative	1 %	Tissu tumoral
PCR spécifique d'allèle COLD-PCR	0,1 à 0,01 %	Tissu tumoral, Biopsie liquide
Digitale PCR, NGS optimisé (type CAPP-Seq)	≤ 0,01 %	Biopsie liquide , Tissu tumoral

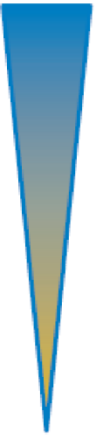


Figure 9. Sensibilité des méthodes de détection d'altérations génétiques et conditions d'applications (tissulaire, plasmatique) (modifiée d'après Diaz et *al.* (Diaz & Bardelli, 2014)).

CAPP-Seq, CAncer Personalized Profiling by deep Sequencing; COLD-PCR, Coamplification at lower denaturation temperature; NGS, Next-Generation Sequencing.

Méthodes de détection	Avantages	Inconvénients
PCR spécifique d'allèle (ex : Intplex)	Rapidité d'analyse, faible coût, sensibilité de détection	Nécessité de connaître préalablement la mutation à rechercher dans le locus d'intérêt, faible nombre de loci analysés
PCR digitale		
COLD-PCR	Rapidité d'analyse, faible coût, absence de nécessité de connaître préalablement la mutation à rechercher dans le locus d'intérêt	Sensibilité d'analyse intermédiaire, faible nombre de loci analysés
NGS optimisé (type CAPP-Seq)	Absence de nécessité de connaître préalablement la mutation à rechercher dans le locus d'intérêt, nombre de loci analysés en parallèle	Temps et coût d'analyse plus important, expertise bioinformatique requise

Tableau 1. Comparaison des méthodes de détection pour l'analyse d'ADNtumor (modifié d'après Siravegna *et al.* (Siravegna *et al.*, 2017)).

1. Méthodes basées sur la détection d'altérations génétiques connues

a) PCR Digitale (dPCR)

La dPCR ou PCR de 3^e génération consiste à partitionner un échantillon d'ADN en de multiples compartiments de façon à ce que chacun de ces compartiments ne contienne théoriquement qu'une molécule d'ADN cible unique. Cette compartimentation repose sur le principe de dilution limite de l'échantillon initial et chaque compartiment va recevoir en majorité 0 ou 1 molécule d'ADN et en minorité, 2 molécules ou plus. Ce concept a été ingénieusement proposé en 1992 par Sykes *et al.* qui ne bénéficiaient pas durant cette période, des avancées en termes de miniaturisation technologique telles qu'on les connaît aujourd'hui (Sykes *et*

al, 1992). Les auteurs montraient ainsi qu'il est possible de quantifier précisément le nombre de fragments d'ADN de départ en réalisant une dilution limite de l'échantillon et en utilisant la loi de Poisson. Cette loi régit la distribution statistique des fragments d'ADN au sein de différents compartiments et décrit la probabilité qu'un compartiment contienne i molécules d'ADN en fonction du nombre total de molécule d'ADN et du nombre total de compartiment. La formule est représentée ci-dessous :

$$p(i, \lambda) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^i}{i!}$$

Où :

- i correspond au nombre de molécules d'ADN au sein d'un compartiment
- λ correspond au nombre total de molécules d'ADN sur le nombre total de compartiment

Le format actuel des compartiments correspond soit à des puits (volume compris entre 750 à 850 pL pour les technologies QuantStudio™ 3D de Life Technologies et Biomark™ de Fluidigm), soit à des gouttelettes (5 pL, 500 pL et 1 nL pour les plateformes RainDrop™ de RainDance Technologies, Naica™ de Stilla Technologies et QX200™ de Bio-Rad, respectivement) (Perkins *et al*, 2017). Une réaction de PCR a lieu au sein de chaque compartiment selon la présence ou non d'une molécule d'ADN et chaque compartiment va être analysé de façon indépendante en point final le plus souvent, c'est-à-dire que chaque compartiment sera classé de façon binaire (0 ou 1) selon l'émission d'un signal de fluorescence suffisant, synonyme d'une réaction d'amplification elle-même synonyme de la présence d'au moins une molécule d'ADN (**Figure 10**).

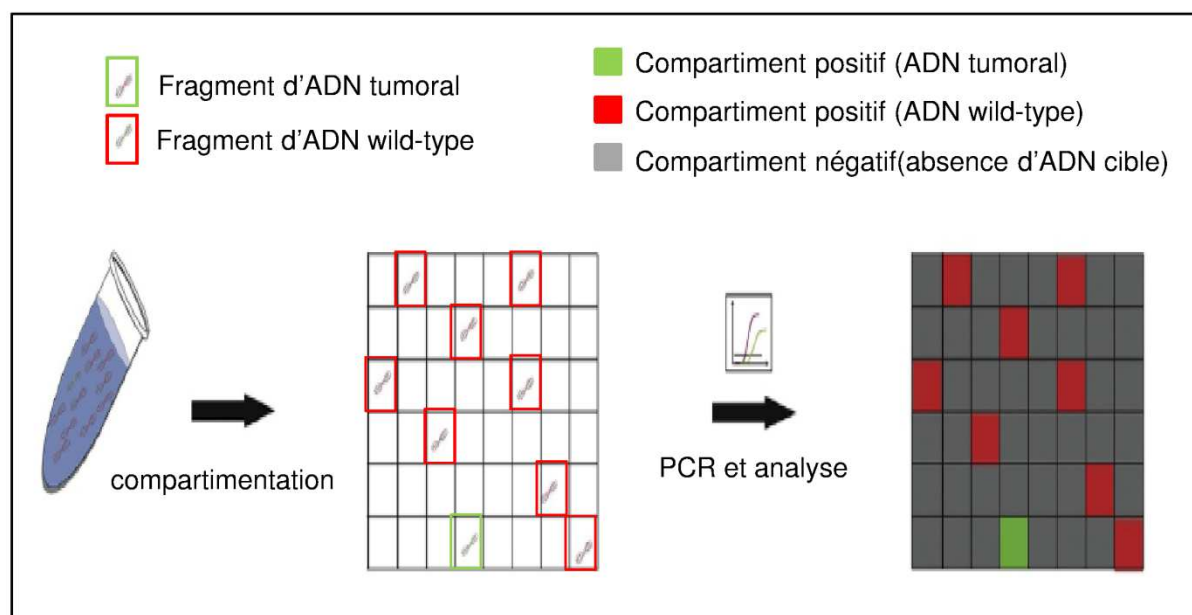


Figure 10. Principe de la dPCR (modifiée d'après Perkins et *al.* (Perkins et *al.*, 2017)).

La quantification du nombre de fragments d'ADN total correspond au « comptage » de l'ensemble des compartiments « positifs » qui permettent secondairement d'estimer la concentration d'ADN dans l'échantillon de départ en fonction des différentes dilutions et volumes utilisés. Cette quantification absolue ne nécessite pas contrairement à la PCR quantitative de réaliser en parallèle une gamme standard de calibration. Ce concept est par ailleurs tout à fait approprié pour la détection d'évènements rares et notamment d'allèles minoritaires. En effet, la mise en évidence d'un fragment d'ADN de faible FA est possible par l'utilisation d'une sonde TAQMAN de fluorescence différente de celle émise pour la détection de l'allèle majoritaire. L'analyse indépendante des compartiments permet de recueillir distinctement le signal de fluorescence émis par l'allèle minoritaire contrairement à la PCR quantitative où le signal de fluorescence émis par cet allèle minoritaire sera perdu dans l'ensemble des signaux émis par les fragments majoritaires du fait d'une

amplification de la totalité des allèles au sein d'un seul et même compartiment (Figure 11).

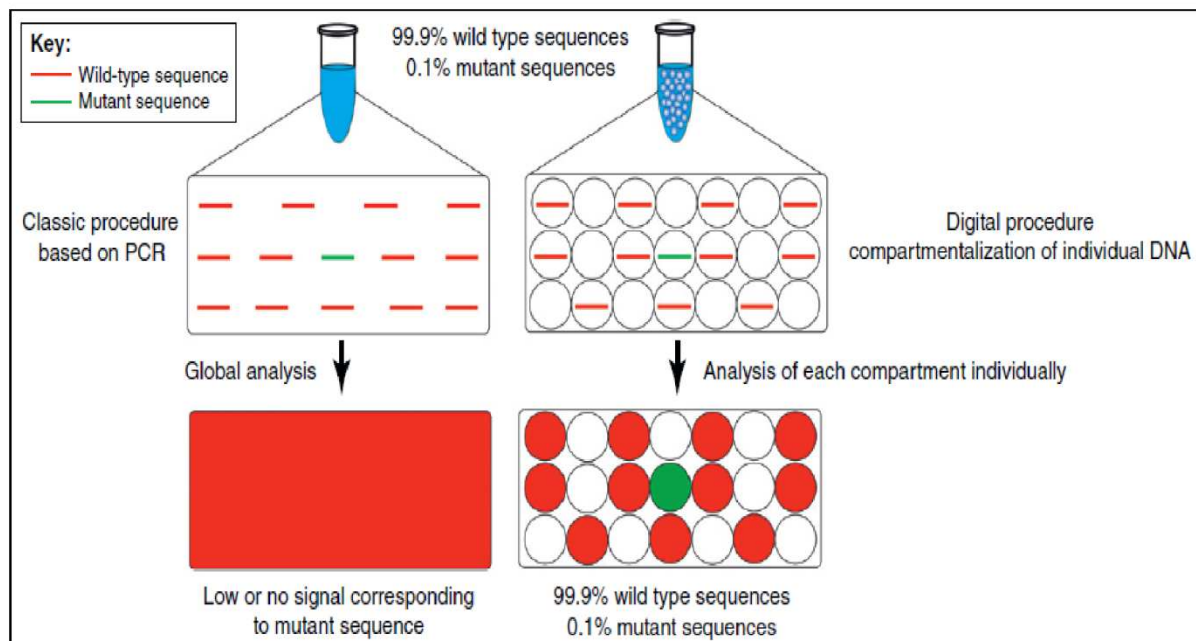


Figure 11. Comparaison d'une méthode classique de PCR quantitative avec une méthode de dPCR pour la détection de variants minoritaires (d'après Taly *et al.* (Taly *et al.*, 2012)).

L'autre avantage théorique de la dPCR repose sur le principe de dilution limite qui permet de pouvoir s'affranchir ou au moins de diminuer l'effet de substances inhibitrices présentes dans l'échantillon de départ (Hoshino & Inagaki, 2012; Dingle *et al.*, 2013; Nixon *et al.*, 2014). En dehors des prélèvements sanguins, cette technologie a permis ces dernières années la détection d'allèles minoritaires dans d'autres types de fluides biologiques tels que les selles (Diehl *et al.*, 2008b), la salive (Wang *et al.*, 2015; Uchiyama *et al.*, 2016), l'urine (Wang *et al.*, 2016b; Lee *et al.*, 2017a; Siravegna *et al.*, 2017) ou le liquide céphalorachidien (De Mattos-Arruda *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2015). La limite principale de la dPCR est l'analyse d'une mutation unique par test qui impose de connaître au préalable la mutation à analyser. Pour

s'affranchir de cette contrainte, Taly et *al.* ont proposé une méthode de multiplexage capable d'analyser dans le même temps plusieurs mutations dans la région hotspot d'intérêt (Taly et *al.*, 2013). L'automate utilisé dans ce travail étant capable de reconnaître deux types de fluorescence représentés graphiquement par deux axes (Figure 12). Les auteurs faisaient varier la concentration des différentes sondes spécifiques à chaque mutation mais associée au même fluorophore.

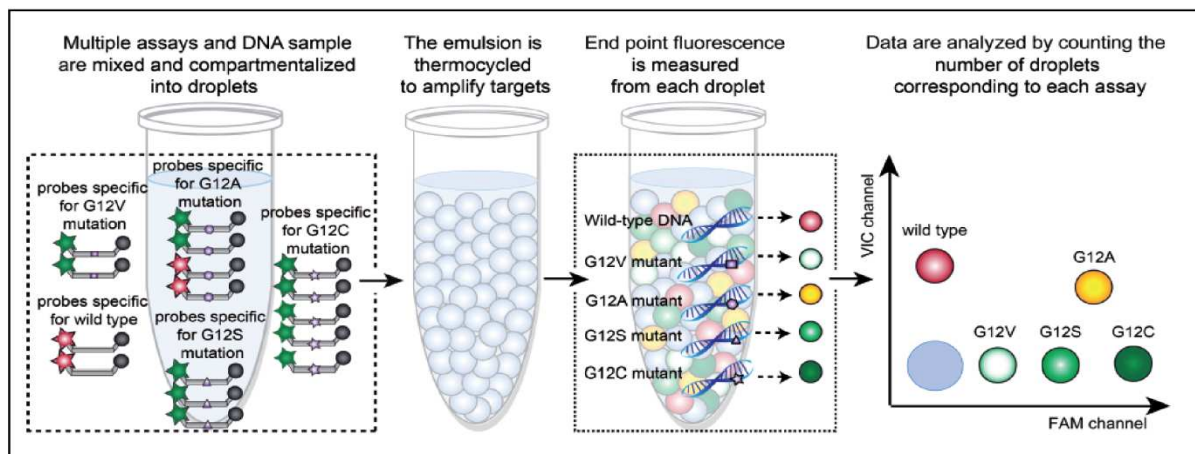


Figure 12. Principe de la méthode de multiplexage en dPCR pour la détection de plusieurs mutations *KRAS* situées dans une même région hotspot d'intérêt (d'après Taly et *al.* (Taly et *al.*, 2013)).

L'intensité de fluorescence étant proportionnelle à la concentration des différentes sondes, chaque compartiment va émettre une fluorescence d'intensité déterminée qui permet de délimiter secondairement un cluster et d'identifier la mutation d'intérêt. L'objectif de l'étude était d'évaluer ce test en comparaison d'une analyse en duplex pour la détection plasmatique de mutations *KRAS* chez 50 patients avec CCRm et statut mutationnel tissulaire identifié préalablement (mutation *KRAS*, n=19). Les taux de détection étaient de 74 % (14/19) et 84 % (16/19) pour les analyses multiplex et duplex avec des FA comprises entre 0,16 % et 43 % et 0,04 % et 45,78 % pour les échantillons positifs en multiplex et duplex, respectivement. Il existait une corrélation significative ($r^2=0,98$) pour la détermination de la FA entre les deux types d'analyse.

Lors de l'initiation de ce travail de thèse, l'intérêt de la méthode de dPCR pour la détection d'ADNtunc en oncologie digestive avait été peu étudié.

b) PCR spécifique d'allèle

La PCR spécifique d'allèle consiste à amplifier sélectivement un allèle minoritaire au sein d'un mélange d'allèles majoritaires et minoritaires. Le principe repose sur la modification de séquence d'une des amorces qui doit théoriquement venir s'hybrider à la séquence d'ADN qui contient le polymorphisme ou la mutation d'intérêt. Cette modification implique le changement d'un nucléotide de l'amorce le plus souvent en 3' qui va entraîner un mésappariement de ce nucléotide avec le nucléotide apparié de l'allèle majoritaire avec pour conséquence une hybridation sous optimale de l'amorce avec cet allèle et une inefficacité du processus de réplication. L'appariement correct de l'amorce modifiée avec l'allèle minoritaire induira ainsi une amplification sélective de l'allèle minoritaire. Différents acronymes ont été décrits dans la littérature pour rapporter ce principe comme ARMS (amplification refractory mutation system) (Newton *et al*, 1989), ASPCR (allele-specific PCR) (Wu *et al*, 1989), ASA (allele-specific amplification) (Okayama *et al*, 1989), PASA (PCR amplification of specific alleles) (Sommer *et al*, 1989) ou PAMSA (PCR amplification of multiple specific alleles) (Dutton & Sommer, 1991). La sensibilité et la spécificité de cette méthode peuvent par ailleurs être optimisées par l'utilisation concomitante d'oligonucléotides de synthèse de type peptide nucleic acids (PNAs) (Nielsen *et al*, 1991) and locked nucleic acids (LNAs) (Dominguez & Kolodney, 2005) qui vont venir s'hybrider de façon préférentielle et irréversible à la séquence d'ADN majoritaire et inhiber sélectivement son amplification. Un exemple de PCR spécifique d'allèle optimisée est rapporté dans la **Figure 13**. Le principe de cette méthode a initialement été décrit en 1989 par Newton *et al*. (Newton *et al*,

1989). L'objectif était de proposer une méthode simple de génotypage en alternative au séquençage pour le diagnostic de déficit en alpha1 antitrypsine. Les auteurs rapportaient qu'une modification en 3' de l'amorce d'hybridation à la séquence contenant la mutation entraînait un mésappariement nucléotidique vis à vis de l'allèle wild-type et l'absence d'amplification de la séquence correspondante. Cette méthode permettait le diagnostic d'homo ou d'hétérozygotie pour les allèles d'intérêt (allèles S ou Z pour cette pathologie). L'utilisation de cette méthode a secondairement été transposée à la détection d'ADNtumc. Plusieurs études ont ainsi rapporté la faisabilité de détection plasmatique par cette méthode des mutations *PIK3CA*, *KRAS* ou *EGFR* dans le cancer du sein, le CCR ou cancer pulmonaire non à petite cellule, respectivement (Board *et al*, 2010; Spindler *et al*, 2012; Nygaard *et al*, 2013; Thierry *et al*, 2014). Thierry *et al*. ont mis au point une optimisation de cette PCR spécifique d'allèle qu'ils ont breveté sous l'appellation de technologie Intplex® (Mouliere *et al*, 2014; Thierry *et al*, 2014) (**Figure 13**).

Le principe repose sur l'utilisation de 2 couples d'amorces amplifiant deux régions courtes (entre 60 et 100 pb) et proches (distance < 300 pb) d'ADN dont l'une contient la mutation d'intérêt. L'amplification préférentielle du fragment muté est réalisée par l'utilisation d'une sonde « bloqueuse » modifiée s'hybridant au fragment wild-type et d'une amorce à faible T_m s'hybridant spécifiquement avec la séquence d'ADN contenant la mutation. Cette méthode était utilisée pour détecter l'ADNtumc dans une série de 95 patients avec CCRm dont le statut mutationnel *KRAS/BRAF* était connu (wild-type, n=51 ; mutation *KRAS*, n=39 ; mutation *BRAF*, n=5) (Thierry *et al*, 2014). La sensibilité et la spécificité de la méthode étaient de 93 % (41/44) et 98 % (50/51) pour l'ensemble des mutations analysées avec une concordance globale de 96 % (91/95) entre les résultats de détection tissulaire et plasmatique. Deux

technologies Cobas® de Roche et Therascreen® de Qiagen utilisant cette méthode de PCR spécifique d'allèle sont actuellement commercialisées et ont été approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) et l'European Medicines Agency (EMA), respectivement pour la détection plasmatique des mutations *EGFR* dans le cancer pulmonaire métastatique suite aux résultats de concordance obtenue par ces méthodes pour la détermination du statut mutationnel *EGFR* entre les échantillons tissulaires et sanguins (Weber *et al*, 2014; Douillard *et al*, 2014a, 2014b).

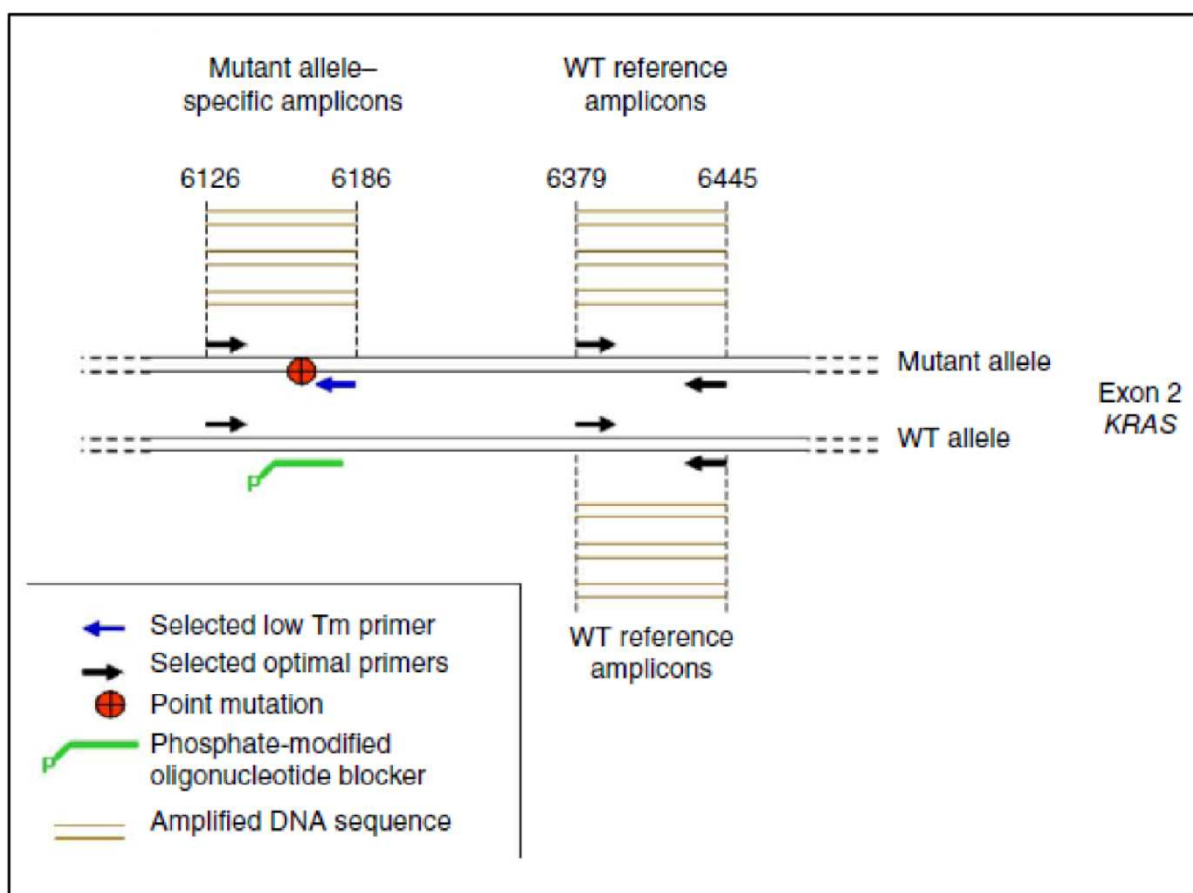


Figure 13. Schéma représentant la technologie brevetée Intplex® qui correspond à une méthode de PCR spécifique d'allèle optimisée pour la détection d'ADNtumc (d'après Thierry *et al*. (Thierry *et al*, 2014)).

2. Méthodes basées sur la détection d'altérations génétiques inconnues (absence de screening préalable)

a) Séquençage à haut débits

Le séquençage de nouvelle génération ou Next-Generation Sequencing (NGS) correspond à l'ensemble des méthodes de séquençage apparues à partir de 2005 qui sont caractérisées par l'utilisation d'approches massivement parallèles capables de séquencer des centaines de milliers voire des millions de fragments d'ADN simultanément. En comparaison des techniques traditionnelles de séquençage comme la méthode de Sanger, cette avancée a permis une diminution majeure des coûts et des délais de séquençage. A titre d'exemple, les résultats du séquençage complet du premier génome humain ont été publiés en 2004 et ce travail a nécessité plus de 12 ans de séquençage dans de nombreux laboratoires pour un coût estimé à 3 milliards de dollars d'investissement (Venter *et al*, 2001; International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Depuis l'avènement du NGS et les progrès subséquents réalisés à ce niveau, le coût de séquençage d'un génome a considérablement diminué (jusqu'à 1000 dollars) et de multiples projets d'envergure en génomique humaine ont vu le jour (lancement du projet 1000 génomes en 2008, ainsi que des projets 100 000 génomes britanniques et asiatiques en 2012 et 2016 respectivement). Le NGS comprends 4 étapes qui sont communes à toutes les plates-formes (Metzker, 2010; Goodwin *et al*, 2016): i) la préparation de la librairie ii) l'amplification clonale de l'ADN iii) l'étape de séquençage proprement dite iv) l'étape d'analyse bioinformatique. Le choix des régions d'ADN à séquencer est très large et peut s'étendre de quelques régions cibles (détection des mutations hotspots d'intérêt) à l'ensemble du génome. Plusieurs études ont montré la faisabilité de ces différentes stratégies d'exploration du génome pour l'analyse d'ADNc.

1) Séquençage non ciblé du génome

Cette modalité de séquençage permet de mettre en évidence théoriquement une large gamme d'altérations génétiques (mutations ponctuelles, réarrangements chromosomiques etc.) susceptibles de survenir au sein d'un génome d'intérêt (ADN foetal ou tumoral par exemple). Elle ne nécessite pas de connaître préalablement la mutation à rechercher et donc de recourir à une procédure invasive de biopsie tissulaire. Cette stratégie a été développée initialement pour le DPN d'aneuploïdie foetale (trisomie 21 principalement) (Chiu *et al*, 2008; Fan *et al*, 2008; Bianchi *et al*, 2012; Palomaki *et al*, 2012). Par la suite, Lo *et al*. ont rapporté pour la première fois en 2010 la faisabilité de séquençage d'un génome foetal complet dans la circulation maternelle avec une profondeur de 65X (Lo *et al*, 2010). Les auteurs montraient que l'ensemble du génome foetal était représenté à taux constant dans la circulation maternelle et réussissaient par ailleurs à porter le DPN non invasif de bêta-thalassémie (maladie à transmission autosomique récessive) à partir d'une méthode de dosage relatif haplotypique et la connaissance préalable des polymorphismes et haplotypes parentaux. Cette méthode a depuis été reprise pour le DPN d'autres maladies à transmission autosomique récessive comme l'hyperplasie congénitale des surrénales (Ma *et al*, 2014; New *et al*, 2014) ou l'amyotrophie spinale infantile (Parks *et al*, 2017). L'identification de mutations de novo (absentes par définition des patrimoines génétiques parentaux) est également une application qui a été rapportée en cas de séquençage complet de génome foetal plasmatique (Kitzman *et al*, 2012). Des stratégies similaires ont été utilisées dans le domaine de l'oncologie avec des champs d'application assez voisins de ceux du DPN comme la détermination d'une aneuploidie néoplasique (McBride *et al*, 2010; Leary *et al*, 2012; Chan *et al*, 2013) ou l'identification de mutations acquises sous traitement (Murtaza *et al*, 2013).

2) Séquençage ciblé du génome

Cette stratégie de séquençage complet du génome ne peut cependant être appliquée à tous les patients et semble actuellement plus du domaine de la recherche en raison du coût prohibitif, du poids de l'analyse bioinformatique et d'un seuil de détection non adapté aux faibles FA. Dans cette situation, plusieurs stratégies d'optimisation technologiques ont été mises en place pour améliorer la détection de variants minoritaires à une FA proche de 0,1 % ou en deçà (**Figure 14**). Cette optimisation relève de plusieurs aspects comme l'amélioration des méthodes d'analyse bioinformatique ((Pécuchet *et al*, 2016a, 2016b)), la capture de courts fragments d'ADN avec mutations récurrentes (Newman *et al*, 2014; Paweletz *et al*, 2016), le séquençage en duplex (c'est-à-dire le séquençage de chaque brin d'ADN des fragments d'ADN double brin) (Schmitt *et al*, 2012; Kennedy *et al*, 2014) ou l'optimisation du conditionnement des fragments d'ADN avant la préparation de la librairie (**Figure 14**). Différentes méthodes reprenant ces astuces ont été décrites pour l'analyse de l'ADNtunc comme les méthodes CAPP-seq (Newman *et al*, 2014, 2016), Safe-Seq (Kinde *et al*, 2011; Bettegowda *et al*, 2014) ou SiMSen-seq ((Ståhlberg *et al*, 2016, 2017)). A titre d'exemple, CAPP-Seq est une méthode d'analyse d'ADNtunc fondée sur la capture de courts fragments sélectionnés d'ADN. Cette capture est réalisée par des sondes oligonucléotidiques biotinylées qui ciblent des altérations génétiques retrouvées dans le cancer pulmonaire non à petites cellules (CPNPC) de type : i) drivers mutations ii) single nucleotide variants identifiés par whole exome sequencing iii) réarrangements chromosomiques impliquant *ALK*, *ROS1* et *RET*. Newman *et al*. ont montré dans une série de 13 patients avec CPNPC de stade I à IV que cette méthode permettait l'identification d'altérations génétiques jusqu'à une FA de 0,02 % (Newman *et al*, 2014).

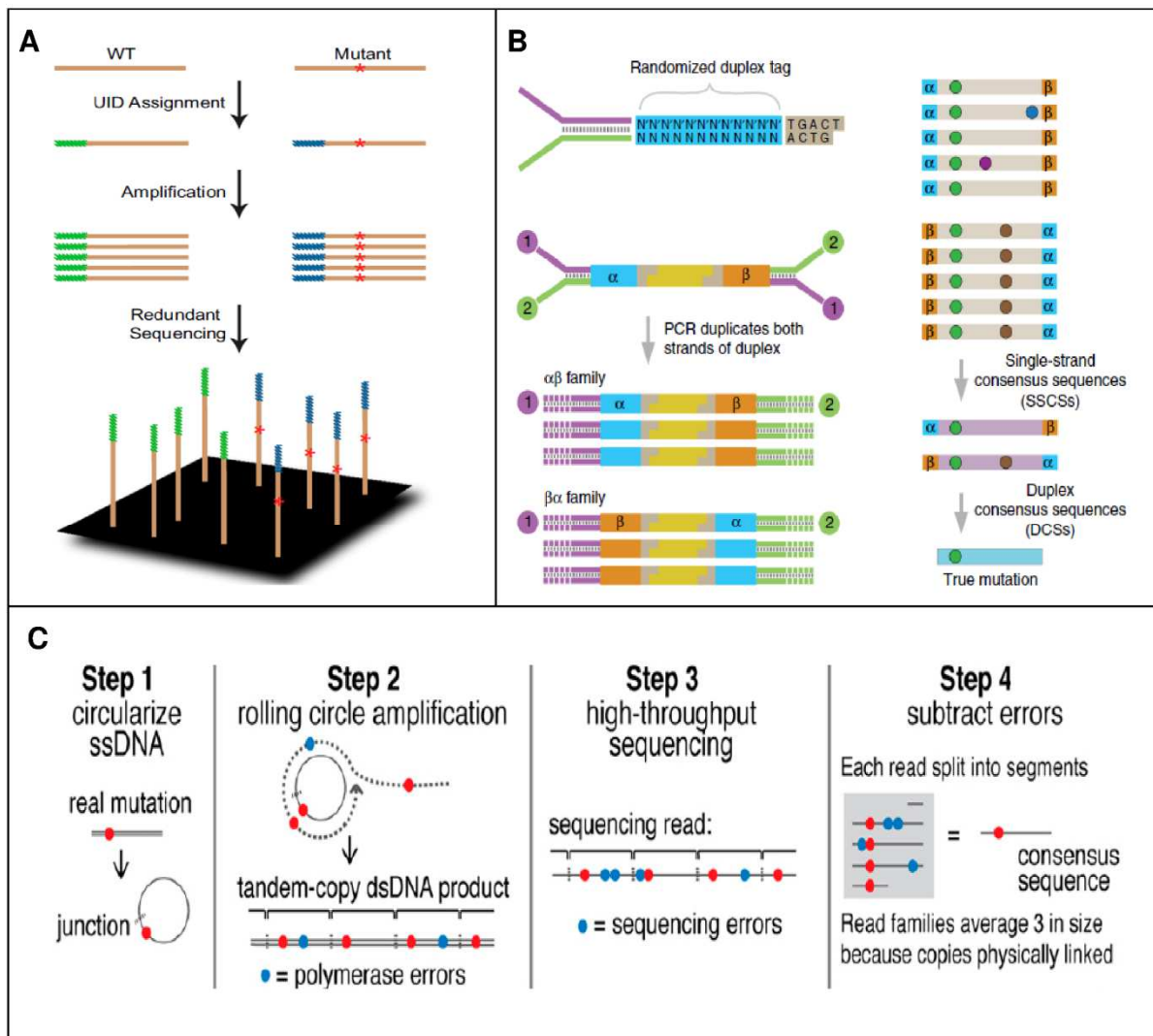


Figure 14. Exemples d'optimisations technologiques mises en place pour le séquençage à haut débit et la détection de variants rares tels que l'ADNtunc. A) Principe de la technologie Safe-SeqS reposant sur l'assignation d'un code barre moléculaire spécifique (unique identification DNA sequence (UID)) à chaque fragment d'ADN initial (d'après Kinde et al. (Kinde et al, 2011)) B) Principe de la méthode de séquençage en duplex où chaque fragment d'ADN est séquençé deux fois (brin sens et antisens) puis réparti en deux sous groupes $\alpha\beta$ ou $\beta\alpha$ selon le sens de séquençage de chaque brin. Une mutation est ainsi validée en cas de détection de cette mutation au sein des deux sous groupes (d'après Kennedy et al. (Kennedy et al, 2014)) C) Principe du séquençage d'ADN circulaire. Chaque fragment d'ADN initial est circularisé après l'étape de dénaturation. Une polymérase spécifique est ensuite utilisée pour l'amplification qui produit des fragments de séquence similaire liés en tandem. Une mutation est ainsi validée en cas de détection dans l'ensemble des fragments amplifiés (d'après Lou et al. (Lou et al, 2013)).

b) Cold PCR

La Cold-PCR (Coamplification at lower denaturation temperature PCR) est une adaptation de la méthode de PCR conventionnelle qui consiste à amplifier sélectivement les allèles minoritaires au sein d'un mélange d'allèles wild-type et mutés. Le principe est basé sur l'observation d'un différentiel de température de dénaturation entre les séquences d'ADN dites homoduplex (molécule d'ADN double brin pour laquelle la complémentarité des bases entre les brins est respectée) et celles dites hétéroduplex (molécule d'ADN double brin pour laquelle il existe un ou plusieurs mésappariements des bases entre les brins) (Mauger *et al*, 2017). Ce mésappariement va provoquer un changement faible (0,2 à 1,5 °C) mais prévisible de la température de fusion (T_m) (température à partir de laquelle la moitié de la quantité d'ADN double brin va se dissocier pour former des monobrins d'ADN) qui dépendra de la séquence d'ADN et de la position de ce mésappariement. La température provoquant la dénaturation sélective de l'hétéroduplex sans dénaturation de l'homoduplex est la température critique (T_c). L'identification ultérieure du variant minoritaire peut être réalisée par différentes méthodes telles que l'analyse de courbe de fusion à haute résolution (ou high-resolution melting (HRM)), le séquençage SANGER, le pyroséquencage, la dPCR ou le NGS (Mauger *et al*, 2017). Il existe 3 types de COLD-PCR (*full-COLD-PCR*, *fast-COLD-PCR* et *ice-COLD-PCR*) qui sont indiqués dans la **Figure 15** et qui reposent chacune sur le principe de dénaturation sélective des hétéroduplex à la T_c .

La méthode d'*ice-COLD-PCR* a été optimisée (enhanced-*ice-COLD-PCR* (E-*ice-COLD-PCR*) par Tost *et al*. permettant d'atteindre une sensibilité théorique de détection de 0,01 % en cas d'identification des mutations par pyroséquencage (How Kit *et al*, 2013; How-Kit *et al*, 2014; How-Kit & Tost, 2015). Le principe dans l'E-*ice-*

COLD-PCR est d'utiliser des nucléotides modifiés (locked nucleic acid (LNA)) dans la sonde « bloqueur » qui va venir s'apparier avec les fragments d'ADN wild-type. Cette modification augmente nettement la T_m et ainsi la stabilité de l'homoduplex LNA-ADN qui va permettre une dénaturation complète des séquences hétéroduplex ou mutantes homoduplex à la température critique T_c .

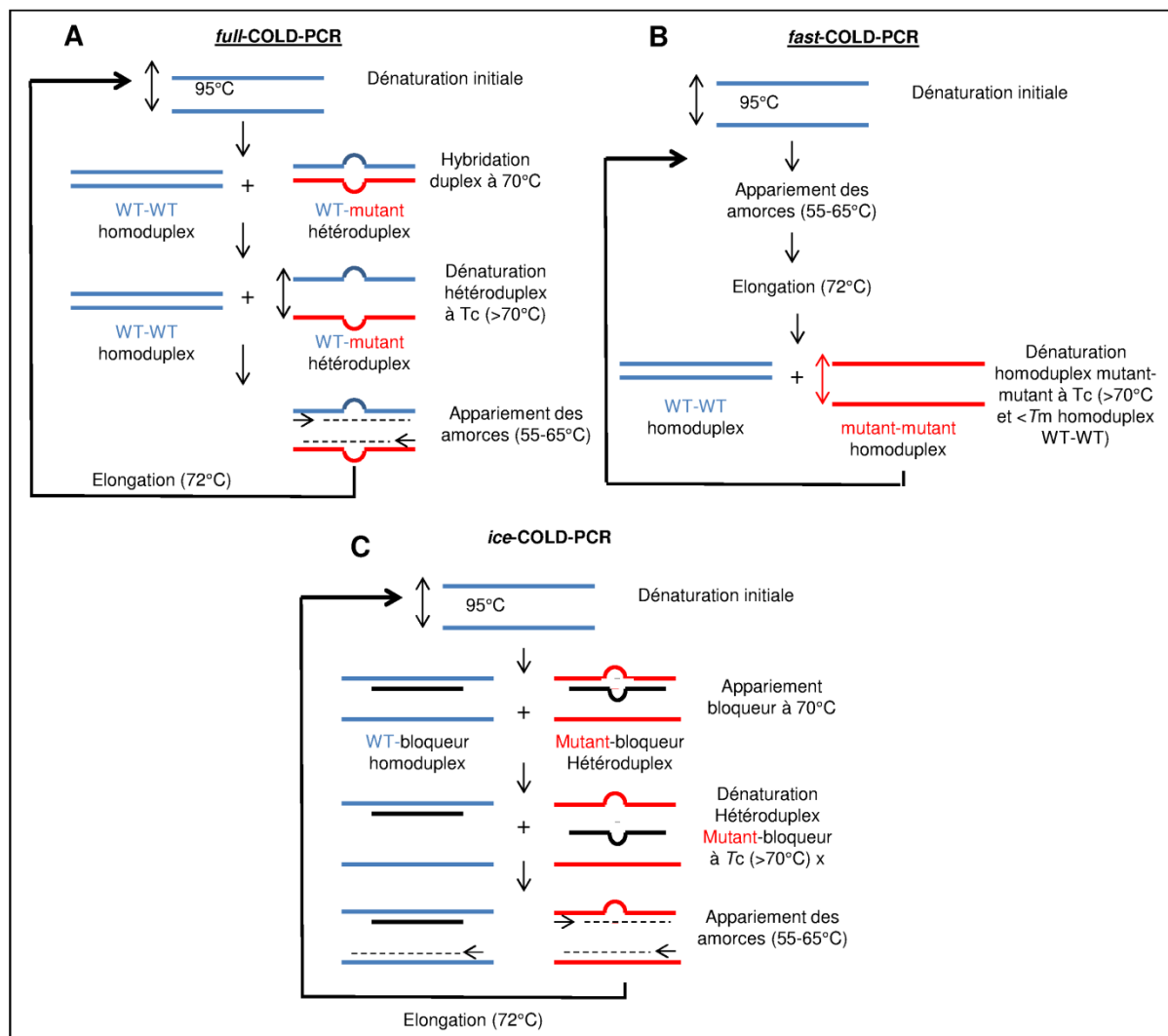


Figure 15. Principe des différentes approches de COLD-PCR pour l'enrichissement des fragments mutés A) Full-COLD-PCR B) Fast-COLD-PCR C) ice-COLD-PCR (D'après How-Kit (How-Kit & Tost, 2015)).

La même équipe a également rapporté la possibilité de multiplexer le nombre de cibles à analyser (*BRAF* (codon 600), *KRAS* (codons 12/13) et *NRAS* (codon 61)) avec une sensibilité de détection comprise entre 0,01 et 0,1 % selon la mutation analysée (Mauger *et al*, 2016). Cette sensibilité passait à 0,5 % lorsque la quantité initiale d'ADN diminuait à 2,5 ng (*versus* 25 ng précédemment) dans une perspective d'application à la biopsie liquide. En comparaison des méthodes d'analyse décrites dans les précédents chapitres, la COLD-PCR est de description beaucoup plus récente puisque la première publication date de 2008 (Li *et al*, 2008). De nombreux travaux ont ensuite été rapportés pour confirmer son intérêt dans une approche circulante de détection de variants minoritaires tant sur le plan du DPN (Du *et al*, 2010; Galbiati *et al*, 2011, 2014, 2016) qu'en oncologie (détection des mutations *BRAF*, *KRAS* et *EGFR* pour les patients avec mélanome (How-Kit *et al*, 2014), cancer du pancréas (Wu *et al*, 2014) et pulmonaire (Hashida *et al*, 2014), respectivement). Pour ce dernier champ d'application clinique, la COLD-PCR est apparue également pertinente dans une perspective d'utilisation pronostique (Murphy *et al*, 2013; Lewandowska *et al*, 2014) ou de monitoring du traitement de chimiothérapie (Hashida *et al*, 2014; Mourah *et al*, 2015; Lorillon *et al*, 2016). Le positionnement de cette technologie dans une perspective d'application à la biopsie liquide reste à clarifier du fait de son développement plus récent et d'un manque de confrontation avec les autres techniques analytiques comme la dPCR ou le NGS.

II. Applications cliniques en cancérologie

L'analyse de l'ADNtunc peut relever de quasiment toutes les situations dans le parcours de soins d'un patient en oncologie (**Figure 16**). L'objectif de cette partie est de dresser un état des lieux pour l'utilisation de ce biomarqueur dans quelques-une de ces applications en les illustrant par des exemples principalement centrés autour des cancers digestifs et du CCR en particulier.

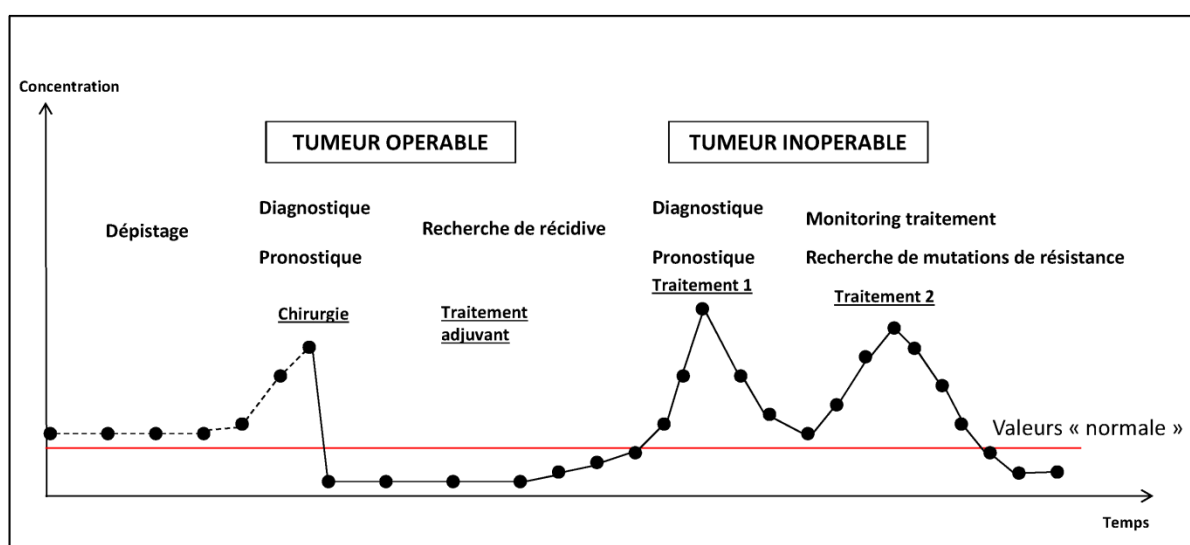


Figure 16. Applications cliniques possibles de l'ADNtunc en oncologie.

A. Dépistage

1. Généralités

Le dépistage consiste à détecter une lésion à un stade prénéoplasique ou néoplasique à un stade précoce chez des personnes en l'absence de symptômes ou de signes cliniques. Il diffère en ce sens du diagnostic précoce qui répond à une démarche de nature différente, engagée sur la présence de signes cliniques ou l'estimation d'un niveau élevé de risque individuel. Avec près de 385 000 nouveaux cas de cancer par an et 150 000 décès, le cancer représente la première cause de mortalité en France. Le dépistage constitue donc une des priorités de la lutte contre

le cancer en figurant au premier plan des différents Plans Cancer établis jusqu'à présent (objectif n°1 des 17 objectifs du Plan Cancer 2014-2019). Il peut être réalisé dans le cadre d'une organisation collective (« dépistage organisé ») ou de façon individuelle, à l'initiative du médecin traitant notamment (« dépistage opportuniste »).

2. Application au CCR

a) Dépistage classique

Le CCR fait partie avec le cancer du sein des deux cancers pour lesquels un dépistage organisé est actuellement disponible en France. Celui-ci est réalisé tous les deux ans pour les personnes de 50 à 74 ans (95 % des cancers après 50 ans). En l'absence de symptômes et/ou d'antécédents personnels ou familiaux particuliers, le niveau de risque est dit « moyen » dans cette tranche d'âge. On estime qu'en effet, la détection de ces cancers à un stade précoce permet la guérison dans 90 % des cas. Le CCR se situe au 3^e rang des cancers les plus fréquents avec près de 42 000 cas diagnostiqués chaque année en France. Il représente également la 3^e cause de mortalité par cancer en France avec 17 500 décès par an. Le test de dépistage organisé correspond à la recherche de sang occulte dans les selles. Cette recherche reposait initialement sur le test au gaïac ou Hemoccult II® (détectant l'hème de l'hémoglobine) et est actuellement remplacé par le test immunologique (anticorps ciblant la partie globine de l'hémoglobine) plus performant. Les études initiales employant le test au gaïac ont montré une réduction de 15 à 20 % de la mortalité par CCR dans la population dépistée (Hardcastle *et al*, 1996; Kronborg *et al*, 1996; Faivre *et al*, 2004). L'hemoccult II® affiche une sensibilité de 35 % et une spécificité de 98 % pour le diagnostic de CCR (Rosman & Korsten, 2010). La sensibilité de ce test pour le diagnostic d'adénome avancé (dysplasie de haut grade et/ou taille \geq 1cm et/ou contingent vilieux) est de 11 % (Imperiale *et al*, 2004).

Récemment, les pouvoirs publics ont mis en œuvre le remplacement par le test immunologique plus sensible (multiplication par 2,5 du taux de détection des CCR et par 4 le taux de détection des adénomes avancés au seuil de 150 ng hémoglobine/mL de tampon ou 30 µg hémoglobine/g de selles) (Faivre *et al*, 2012a). Le test immunologique est par ailleurs plus simple à réaliser (un seul prélèvement) et permet un taux de participation plus élevé (60 % versus 50 % pour le test au gaïac) (van Rossum *et al*, 2008; Hol *et al*, 2010). En cas de positivité du test (4 % des cas), une coloscopie sera secondairement réalisée. Un cancer est trouvé toutes les 12 coloscopies et un adénome avancé toutes les 3 coloscopies (Faivre *et al*, 2012b).

b) Dépistage alternatif par ADNtunc

De façon générale, la sensibilité de détection de l'ADNtunc augmente proportionnellement avec le stade de la maladie indépendamment du type tumoral. Bettegowda *et al.* ont étudié la capacité à détecter l'ADNtunc dans une série de 410 patients en fonction du stade et du type néoplasique. Ils utilisaient des méthodes de détection ultrasensibles (dPCR (BEAMing), NGS (Safe-SeqS)). Une détection d'ADNtunc était possible dans 47 %, 55 %, 69 % et 82 % des patients avec un cancer au stade I, II, III et IV, respectivement. Cette diminution de la capacité de détection à un stade précoce était peu influencé par le type tumoral puisque des résultats similaires étaient retrouvés dans les différents cancers étudiés (colorectal, pancréas, sein notamment). En 2005, Diehl *et al.* ont évalué la capacité à détecter l'ADNtunc à différents niveaux du processus de carcinogénèse colorectale (stade précancéreux à cancer invasif stade I à IV) (Diehl *et al*, 2005). Cette série comportait 33 patients pour lesquels une mutation ponctuelle du gène *APC* avait préalablement été identifiée dans la tumeur primitive et qui était secondairement recherchée dans le plasma par une méthode de dPCR. Une détection positive était retrouvée dans 63 %

(5/8), 63 % (5/8) et 100 % (6/6) avec une FA moyenne mesurée à 0,04 %, 0,94 % et 11,05 % pour les cancers de stade I, II et IV respectivement. La sensibilité diminuait à 9 % (1/11) pour les lésions adénomateuses avec une FA égale à 0,02 % pour le patient considéré comme positif avec un adénome de 5 cm. Les travaux ultérieurs portant sur le dépistage du CCR par l'ADNtumc ont utilisé comme cible de détection, l'hyperméthylation de la région promotrice du gène *SEPT9*. Ce gène est impliqué dans la carcinogénèse de nombreux cancers comme le CCR (Lofton-Day *et al*, 2008), le cancer du sein (Montagna *et al*, 2003; Connolly *et al*, 2011) ou de l'ovaire (Burrows *et al*, 2003; Scott *et al*, 2006). Cependant, l'hyperméthylation de la région promotrice de ce gène résultant en une sous expression de la protéine correspondante est un processus spécifique au CCR (Model *et al*, 2007). Plusieurs études rétrospectives cas témoins ont suggéré une performance intéressante de la détection plasmatique du gène *SEPT9* méthylé pour le dépistage du CCR avec une sensibilité et une spécificité rapportées comprises entre 52 et 72 % et 90 et 95 %, respectivement (Grützmann *et al*, 2008; Lofton-Day *et al*, 2008; deVos *et al*, 2009). Ce test sérique a ensuite été évalué dans une série prospective d'individus à risque moyen de développer un CCR (7941 sujets inclus dans l'étude). L'objectif principal était d'évaluer la performance de ce test pour le diagnostic de CCR en comparaison de la coloscopie qui était réalisée chez tous les sujets (Church *et al*, 2014). La sensibilité et la spécificité du test étaient de 48,2 et 91,5 %. La sensibilité pour le diagnostic d'adénome avancé était de 11 %. La performance de ce test est actuellement encore jugée insuffisante et les recommandations préconisent de poursuivre le dépistage par l'utilisation du test immunologique dans les selles.

B. Diagnostic de la maladie résiduelle

1. Surveillance conventionnelle

Le risque de récurrence après résection d'un CCR localisé est principalement influencé par le stade avec un risque évalué à 10 %, 30 % et 55 % pour les cancers de stade I, II et III, respectivement (Manfredi *et al*, 2006). La récurrence est principalement métastatique (80 %) et survient majoritairement dans les 3 années post-opératoires (Manfredi *et al*, 2006). Les essais randomisés comparant deux stratégies de surveillance (« minimale » *versus* « renforcée ») pour la détection de récurrence ont montré des résultats discordants en termes de survie globale (SG) (Kjeldsen *et al*, 1997; Schoemaker *et al*, 1998; Secco *et al*, 2002; Rodríguez-Moranta *et al*, 2006; Primrose *et al*, 2014). Une méta-analyse publiée en 2007 montre néanmoins une réduction du risque de mortalité d'environ 20 % en faveur d'une surveillance « renforcée » (Jeffery *et al*, 2007). Au vu du faible risque de récurrence endoluminale, il n'y a pas d'intérêt à réaliser une surveillance endoscopique annuelle *versus* une surveillance plus espacée (c'est-à-dire à 3 ans du diagnostic) (Rodríguez-Moranta *et al*, 2006). De la même façon, il n'existe pas de données probantes concernant l'intérêt d'un monitoring intensif de l'ACE et celui-ci ne peut être utilisé seul en raison principalement d'une insuffisance de sensibilité même à un seuil faible de détection (82% si seuil $\geq 2,5 \mu\text{g/L}$; 71% si $\geq 5 \mu\text{g/L}$) (Nicholson *et al*, 2015). Les recommandations françaises actuelles préconisent de réaliser pour les CCR de stade II et III opérés, une évaluation clinique tous les 3 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans associée à une imagerie abdominopelvienne (échographie ou scanner) tous les 3 à 6 mois pendant 3 ans puis tous les 6 mois pendant 2 ans et une imagerie thoracique (scanner ou radiographie) annuelle pendant 5 ans.

2. Surveillance par l'ADNtumc

L'équipe de Bert Vogelstein fut la première à évaluer l'intérêt du monitoring post opératoire de l'ADNtumc pour prédire le risque de récurrence (Diehl *et al*, 2008a). Un échantillon de plasma était recueilli avant et après chirurgie dans une série pilote de 18 patients dont 16 en situation métastatique résécable. L'ADNtumc était détecté par dPCR après identification tissulaire de la cible mutationnelle au sein de 4 gènes (*KRAS*, *APC*, *PIK3CA* et *TP53*). L'ADNtumc était identifié dans 100 % des cas en pré-opératoire. Une résection chirurgicale était réalisée dans 22 cas (1, 2 ou 3 interventions chez 15, 2 et 1 patients, respectivement). Au premier temps de prélèvement post opératoire (J1), le niveau médian de décroissance de l'ADNtumc était de 96,7 % en cas de résection complète (17 cas) versus non significatif en cas de résection incomplète (5 cas). Lors du deuxième temps de prélèvement post opératoire (entre 13 et 56 jours), un échantillon de plasma était disponible dans 20 cas. En cas de détection d'ADNtumc (80 % (16/20)), une récurrence ultérieure était confirmée dans 94 % (15/16) alors que l'absence de détection précoce post opératoire (T2) chez 4 patients était associée à une rémission complète prolongée. D'autres études sont venues confirmer ces données aussi bien sur le plan digestif (CCR en particulier (Reinert *et al*, 2015; Tie *et al*, 2016) qu'extradigestif (Garcia-Murillas *et al*, 2015; Pereira *et al*, 2015). Ainsi, Reinert *et al*. ont mesuré l'ADNtumc en pré et post opératoire au sein d'une série de 11 patients avec CCR de différents stades (I (n=1), II (n=5), III (n=2) et IV (n=3)) (Reinert *et al*, 2015). La cible mutationnelle correspondait à l'identification par NGS d'un variant structurel somatique tissulaire plus spécifique que les mutations ponctuelles hot-spot décrites ci-avant (Vogelstein *et al*, 2013). Après un suivi de 36 mois, 6 patients présentaient une récurrence tandis que 5 patients étaient toujours en rémission. La sensibilité et la

spécificité pour la détection de récurrence de l'ADNtumc prélevés à intervalles réguliers au cours du suivi était de 100 % (6/6) et 100 % (0/5), respectivement. Le temps moyen de détection avant la récurrence à l'imagerie était de 10 mois (extrêmes compris entre 2 et 15 mois). En comparaison, la sensibilité et la spécificité de l'ACE pour répondre au même objectif était de 67 % (4/6) et 100 % (0/5) respectivement. Le temps moyen de détection avant la récurrence à l'imagerie était de 3,5 mois. Tie et al. retrouvaient des constatations similaires en évaluant l'intérêt de l'ADNtumc pour prédire le risque de récurrence chez 230 patients opérés d'un cancer colique de stade II. L'ADNtumc était analysé par NGS (Safe-Seq) à partir de 4-10 semaines en post opératoire puis tous les 3 mois sur une période de 2 ans (Tie et al, 2016). L'ADNtumc et l'ACE étaient positifs dans 85 % (23/27) et 41 % (11/27) des cas lors du diagnostic de récurrence avec un temps médian de 167 et 61 jours avant le diagnostic radiologique. La présence d'ADNtumc en post opératoire permettait de prédire très significativement le risque de récurrence chez les patients avec et sans chimiothérapie adjuvante (HR=11 [IC 95 % ; 1,8-68] et HR=18 [IC 95 % ; 7,9-40]) et constituait la variable prédictive de la récurrence la plus forte en analyse multivariée (HRa=28 [IC 95 % ; 11-68]).

C. Identification de mutations prédictives d'efficacité

Dans la perspective d'une médecine personnalisée prenant en compte les spécificités moléculaires tumorales, la détection d'ADNtumc se positionne comme un outil prometteur permettant d'individualiser le choix d'une thérapie ciblée en identifiant des mutations prédictives de l'efficacité/résistance du traitement à l'initiation ou acquises durant la séquence thérapeutique.

1. Détection tissulaire

a) Généralités

L'avènement des thérapies ciblées offre un espoir supplémentaire dans le traitement des cancers mais complexifie le choix de la stratégie thérapeutique. Le coût important et la toxicité de ces molécules sont deux arguments supplémentaires pour favoriser l'identification de biomarqueurs prédictifs d'efficacité. La caractérisation de ces biomarqueurs pourrait s'apparenter à « un chimiogramme » de façon équivalente à l'antibiogramme d'une bactérie pour tester sa sensibilité aux antibiotiques. Le **Tableau 2** montre les principales altérations génétiques prédictives d'efficacité ou de résistance aux traitements qui sont actuellement recherchées en routine au sein des plateformes de génétique somatique des cancers. A titre d'exemple, les mutations activatrices des gènes *KRAS* et *NRAS* constituent un mécanisme clairement reconnu de résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR dans le CCRm (Lièvre *et al*, 2006; Di Fiore *et al*, 2007; Amado *et al*, 2008; Karapetis *et al*, 2008; Douillard *et al*, 2013). La recherche de ces altérations est actuellement réalisée au sein de l'ADN extrait du tissu tumoral et comporte plusieurs écueils. En premier lieu, l'obtention de ce matériel génétique repose sur la réalisation d'une procédure invasive de biopsie tissulaire avec un risque non négligeable de complications et des contraintes organisationnelles pouvant retarder de quelques semaines le parcours diagnostique. Par ailleurs, la cellularité tumorale des prélèvements est variable et peut affecter l'analyse subséquente du statut mutationnel (Hlinkova *et al*, 2013; da Cunha Santos & Saieg, 2015). Cela implique de renouveler la procédure invasive une deuxième fois et retarde par conséquent l'analyse du statut mutationnel et de ce fait, la possibilité d'introduction de la thérapie ciblée. La dernière limite repose sur le concept d'hétérogénéité clonale intratumorale.

Type de tumeurs	Biomarqueurs	Nombre de patients testés	Pourcentage de patients présentant une altération moléculaire	Thérapies ciblées associées
Cancer du sein	Amplification <i>HER2</i>	10279	20,5 %	Trastuzumab Pertuzumab Lapatinib
Cancer gastrique	Amplification <i>HER2</i>	777	26,7 %	Trastuzumab
CCR	Mutations <i>KRAS</i>	21726	44,3 %	Panitumumab Cetuximab
	Mutations <i>NRAS</i>	16757	6,7 %	
GIST	Mutations <i>KIT</i>	1088	65,3 %	Imatinib
	Mutations <i>PDGFRA</i>	1053	29,1 %	
Cancer pulmonaire	Mutations <i>EGFR</i>	26409	12,0 %	Gefitinib Erlotinib Afatinib Osimeritinib
	Translocation <i>ALK</i>	22667	2,8 %	Crizotinib Ceritinib
	Translocation <i>ROS1</i>	14268	1,3 %	Crizotinib
Mélanome	Mutations <i>BRAF</i>	5270	38,6 %	Vemurafenib Dabrafenib Cobimetinib Trametinib
Leucémie	Détection <i>BCR-ABL</i>	8324	17,5 %	Imatinib Dasatinib Nilotinib Bosutinib Ponatinib
	Mutations <i>ABL</i>	816	23,8 %	
Leucémie lymphoïde chronique	Mutations <i>TP53</i>	741	17,9 %	Idelalisib

Tableau 2. Biomarqueurs prédictifs de réponse ou de résistance à une thérapie ciblée et nombre de recherches réalisées par les plateformes de génétique moléculaires ou les laboratoires d'oncogénétique en 2015.

b) Hétérogénéité clonale

L'existence d'une hétérogénéité cellulaire intratumorale est connue depuis plus de 30 ans par les anatomopathologistes (Heppner & Miller, 1983). La démonstration que cette hétérogénéité cellulaire macroscopique est la traduction de sous population clonale au profil génétique et épigénétique différent est de description beaucoup plus récente (Greaves & Maley, 2012; Aparicio & Caldas, 2013; Jamal-Hanjani *et al*, 2015). Cette hétérogénéité se traduit par la possibilité d'un statut mutationnel distinct au sein des différents sites tumoraux d'un même individu (**Figure 17**). A titre d'exemple, Gerlinger *et al*. ont évalué cette hétérogénéité en analysant par NGS de 2 à 7 sites distincts par pièce de néphrectomie chez 4 patients affectés par un carcinome à cellule claire ainsi que deux sites métastatiques chez un de ces patients (Gerlinger *et al*, 2012). Les auteurs montraient que seules 31 à 37 % des mutations étaient communes à l'ensemble des sites tumoraux et que le profil d'expression ARN variait significativement selon le site tumoral où il était analysé classant le patient en bon ou mauvais pronostic d'après une signature d'expression génique qui avait été rapportée précédemment (Brannon *et al*, 2010). L'analyse mutationnelle des différents sites tumoraux permettait de construire un arbre phylogénétique représentant l'évolution clonale et sous clonale des mutations (**Figure 18A**) de façon tout à fait similaire à la théorie établie à la fin des années 1970 par Nowell *et al*. (**Figure 18B**) (Nowell, 1976). Cette hétérogénéité clonale intratumorale a été décrite dans de nombreux autres types tumoraux (cancer du poumon (de Bruin *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2014), du sein (Navin *et al*, 2011; Nik-Zainal *et al*, 2012; Shah *et al*, 2012), pancréatique (Campbell *et al*, 2010; Yachida *et al*, 2010), prostatique (Haffner *et al*, 2013; Carreira *et al*, 2014), CCR (Thirlwell *et al*, 2010)).

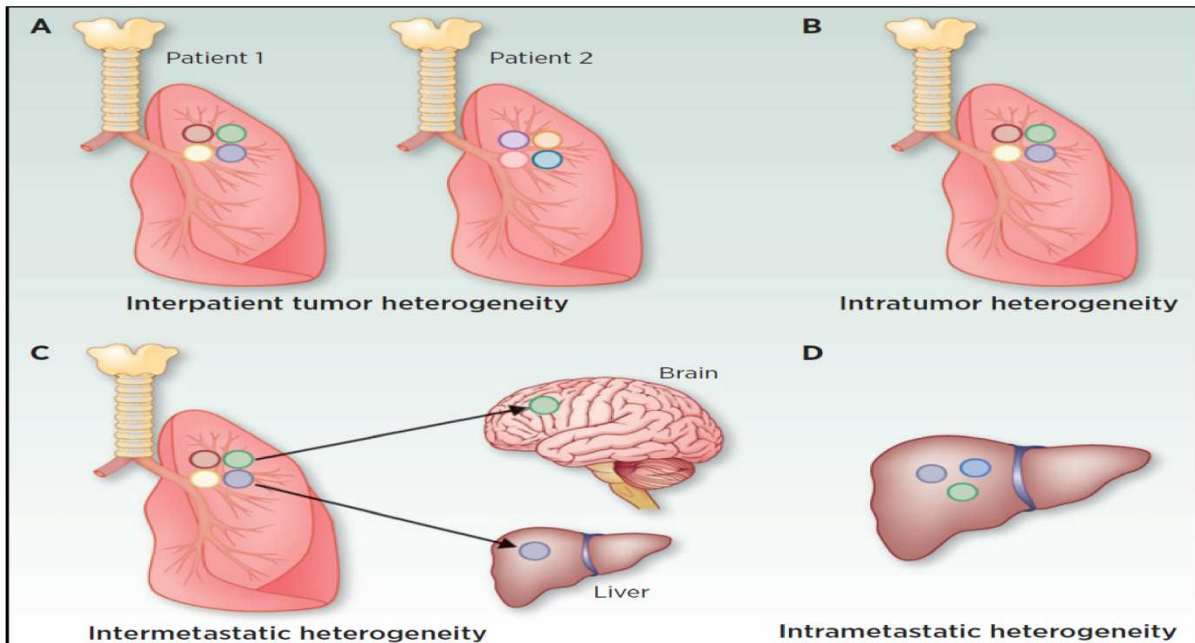


Figure 17. Différents types d'hétérogénéité tumorale A) Hétérogénéité tumorale interpatients B) Hétérogénéité clonale au sein de la tumeur primitive C) Hétérogénéité clonale entre les sites métastatiques D) Hétérogénéité clonale au sein d'une métastase (D'après Jamal-Hanjani (Jamal-Hanjani *et al*, 2015)).

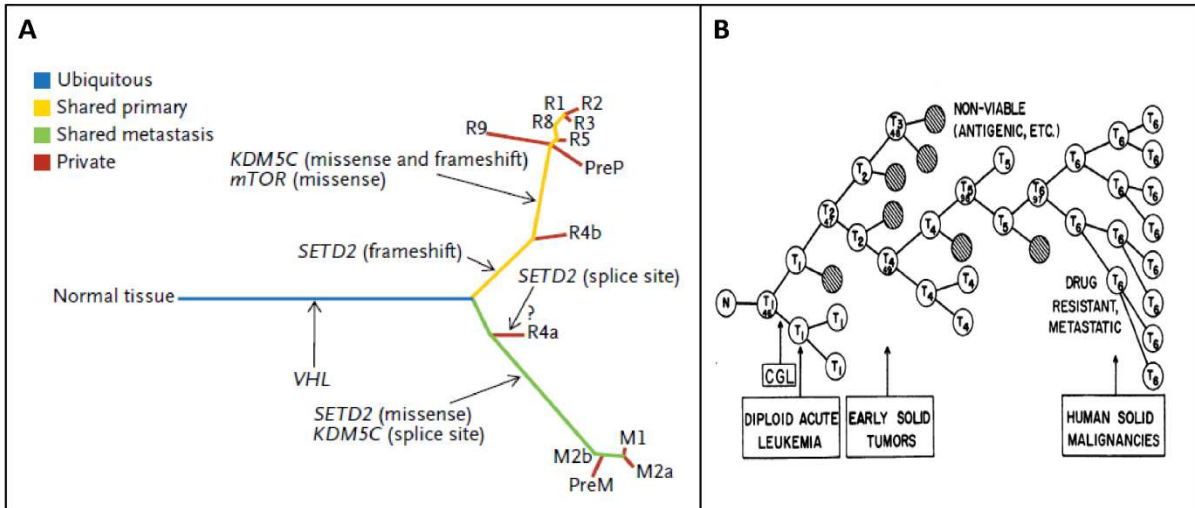


Figure 18. Représentation de l'hétérogénéité tumorale et de l'évolution clonale phylogénétique A) Patient affecté par un carcinome rénal à cellule clair métastatique avec séquençage d'exomes de différents sites tumoraux (Tumeur primitive, R1 à R9 et sites métastatiques, M1 à M2) montrant la répartition des mutations au sein de chaque site (D'après Gerlinger *et al.* (Gerlinger *et al*, 2012)). B) Modèle d'évolution clonale phylogénétique proposé par Nowell *et al.* à la fin des années 70. L'acquisition successive d'altérations génétiques va entraîner un désavantage (cercle hachuré) ou un avantage (cercle clair) sélectif à l'origine de la mort ou de l'expansion clonale correspondante, respectivement (D'après Nowell *et al.* (Nowell, 1976)).

Ce concept d'hétérogénéité clonale permet de mieux appréhender les résistances survenant en cours de traitement par l'intermédiaire de sous clones minoritaires portant de façon intrinsèque une mutation de résistance. Les nouvelles méthodes ultrasensibles de détection permettent d'identifier ces sous clones qui passaient auparavant inaperçus par les technologies usuelles d'analyse. Laurent-Puig *et al.* ont ainsi étudié la prévalence de mutations tissulaire *KRAS* par dPCR chez les patients avec CCRm traités par anti-EGFR et dont le statut mutationnel tumoral avait initialement été identifié comme wild-type (Laurent-Puig *et al.*, 2015). Parmi les 136 patients dans cette situation, une mutation *KRAS* a pu être de nouveau identifiée chez 22 patients (16,2 %) dont 12 patients avec une FA entre 0,01 et 0,1 %, 5 patients entre 0,1 et 1 % et 5 patients > 1 %. Les auteurs introduisaient dans ce travail une notion nouvelle quantitative pour prédire la résistance au traitement puisque seules les mutations *KRAS* avec une FA supérieure au seuil de 1 % permettaient de prédire une progression précoce aux anti-EGFR. Il s'agit ici d'un concept totalement nouveau prenant en compte la quantité de clones de résistance puisque jusqu'alors la simple identification d'une mutation de résistance même à faible FA (entre 1 et 10 %) avait montré un impact en termes de résistance au traitement anti-EGFR (Tougeron *et al.*, 2013). De la même façon, la pression de sélection exercée par les thérapies ciblées permet de faire émerger certains clones minoritaires résistants à ce traitement. Ainsi, l'identification tissulaire de mutations *KRAS* qui était indétectable lors du diagnostic initial et qui sont retrouvées ultérieurement dans le tissu métastatique à progression est également un mécanisme qui a été rapporté pour expliquer la résistance acquise aux anti-EGFR (Misale *et al.*, 2012). Des mécanismes similaires de résistance ont été mis en évidence pour d'autres types tumoraux avec l'identification tissulaire à progression

de mutations *EGFR* (T790M) chez les patients traités par inhibiteur de tyrosine kinase pour un adénocarcinome pulmonaire métastatique (Kobayashi *et al*, 2005; Balak *et al*, 2006; Kosaka *et al*, 2006) ou de mutations *ESR1* en cas de traitement prolongé par anti-aromatase pour un cancer du sein métastatique hormonosensible (Li *et al*, 2013; Merenbakh-Lamin *et al*, 2013; Robinson *et al*, 2013; Toy *et al*, 2013; Jeselsohn *et al*, 2014).

Les données rapportées ci-dessus reflétant l'hétérogénéité clonale dans l'espace et dans le temps (hétérogénéité spatiotemporelle) montrent bien qu'il n'est pas envisageable dans une perspective future de personnalisation du traitement de recourir aux biopsies tissulaires de façon exhaustive ou itérative. La réalisation d'un prélèvement sanguin (« biopsie liquide ») pour répondre à cette finalité semble constituer en théorie une approche alternative prometteuse pour dresser la cartographie précise de cette hétérogénéité.

2. Détection circulante

a) Concordance tissu/plasma

En dehors des conditions préanalytiques et analytiques utilisées qui influencent fortement les résultats de détection, d'autres éléments tels que le stade tumoral ou l'hétérogénéité clonale doivent être pris en compte lorsqu'on compare les résultats de concordance entre la détection tissulaire et plasmatisque. Dans le cas du CCRm, les études les plus récentes ayant évalué cette problématique pour la détermination du statut *KRAS* montrent des résultats de concordance compris entre 90 % et 96 % (Thierry *et al*, 2014; Bettgowda *et al*, 2014; Tie *et al*, 2015; Vidal *et al*, 2017; Grasselli *et al*, 2017). Dans le cas du cancer pulmonaire localement avancé ou métastatique, une méta analyse reprenant les données de 27 études et près de 4000 patients a été publiée récemment (Qian *et al*, 2016). Celle-ci rapportait une sensibilité

de 60 % et une spécificité de 94 % pour la détection des mutations *EGFR* circulantes en comparaison des résultats tissulaires. Les cancers pulmonaires avec les mutations *EGFR* et les CCR avec les mutations *KRAS* et *BRAF* sont ainsi les cancers pour lesquels il existe le plus de données de comparaison tissu/plasma. Plusieurs arguments peuvent expliquer cette donnée comme l'incidence épidémiologique (1^{ère} et 4^e cause de décès par cancer dans le monde soit 1 589 900 et 693 900 décès, respectivement) (Torre *et al*, 2015), la sanction thérapeutique qui en résulte (thérapie ciblée validée en 1^{ère} ligne métastatique pour ces 2 types tumoraux selon le statut mutationnel du gène d'intérêt) et la fréquence des mutations hot spot pour ces deux cancers (mutations *EGFR* (principalement délétion de l'exon 19 et mutation ponctuelle L858R de l'exon 21) et mutations *KRAS* (principalement exon 2) retrouvées dans 25 à 30 % et 35 à 40 % des cancers pulmonaires et colorectaux, respectivement (Forbes *et al*, 2017). Pour le cancer pulmonaire, la difficulté d'obtention d'échantillon biopsique de qualité suffisante (cellularité tumorale) lors de l'endoscopie bronchique explique également pourquoi l'intégration de l'ADNtunc dans les outils diagnostiques de routine est la plus aboutie (Vanderlaan *et al*, 2014). L'EMA et la FDA ont ainsi autorisé l'analyse plasmatique des mutations *EGFR* en alternative à l'analyse tissulaire comme facteur décisionnel à la mise en route du traitement anti-EGFR. Depuis septembre 2014, cette possibilité a ainsi été ajoutée en complément du libellé de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour le gefitinib puis l'erlotinib et enfin, l'osimertinib en indiquant que « Si un échantillon de tissu tumoral n'est pas analysable, l'ADN tumoral circulant obtenu à partir d'un échantillon de sang (plasma) peut alors être utilisé avec un test validé ». Il s'agit ici d'une avancée considérable pour l'intégration de ce biomarqueur dans la pratique quotidienne.

b) Identification plasmatique de mécanismes de résistance secondaire au traitement

La mise en évidence de mutations acquise prédictives de résistance secondaire au traitement impose par définition de renouveler au moins une deuxième fois la procédure invasive d'obtention de matériel génétique. Les limites à ce nouveau prélèvement tissulaire sont ici plus nombreuses. Les données d'évolution clonale et d'hétérogénéité tumorale spatiotemporelle sont accentuées lors de la pression de sélection exercée par les thérapies ciblées (Uiz *et al*, 2016). Le premier risque est d'induire un biais de sélection dans la représentation des sous clones tumoraux et de méconnaître le mécanisme majoritaire (mutation de résistance) à l'origine de l'acquisition de cette résistance. Il s'agit d'un élément important à prendre en compte dans la situation où plusieurs thérapies ciblées pourraient être proposées dans le même temps à un patient ou que celui-ci serait affecté par plusieurs cancers. Par ailleurs, l'organisation de cette nouvelle biopsie (et les risques inhérents qui lui sont associés) peut être plus compliquée à mettre en œuvre dans la mesure où le site de progression tumorale est souvent plus difficile d'accès et quelquefois inaccessible à une « simple » endoscopie (la tumeur primitive à l'origine de l'analyse initiale du statut mutationnel a pu être enlevée durant la séquence de traitement). La détection circulante de ces mutations a été récemment rapportée par plusieurs études avec par exemple l'identification plasmatique à progression des mutations *ESR1* (Guttery *et al*, 2015; Sefrioui *et al*, 2015; Schiavon *et al*, 2015; Wang *et al*, 2016a) ou de la mutation T790M de l'*EGFR* (Kuang *et al*, 2009; Mack *et al*, 2009). Dans le cas du CCRm, ce concept a généré de nouvelles informations comme le fait que l'identification plasmatique de mutations de résistance précède en général de plusieurs mois la progression clinique, que la levée de la pression de sélection est associée à une diminution des clones de résistance aux

anti-EGFR et que dans cette situation, la reprise du traitement anti-EGFR peut de nouveau être efficace (Hata *et al*, 2013; Arena *et al*, 2015; Morelli *et al*, 2015; Siravegna *et al*, 2015). Si ces études rapportaient jusqu'à présent la faisabilité de détecter dans le plasma des mutations hot spots reconnues de résistance au traitement, Murtaza *et al*. sont allés plus loin en identifiant des mutations plasmatiques de novo acquises sous traitement (Murtaza *et al*, 2013). Les auteurs réalisaient un séquençage plasmatique d'exomes tumoraux à l'initiation et en cours de traitement à différents temps. L'étude était réalisée chez 6 patients affectés par un cancer du sein (n=2), du poumon (n=1) ou de l'ovaire (n=3) avec un suivi portant sur 1 à 2 ans. Cette étude permettait de mettre en évidence des mutations connues de résistance augmentant progressivement sous traitement telles que les mutations des gènes *MED1* (S1179X), *GAS6* (épissage) ou *EGFR* (T790M) mais également des mutations de signification indéterminée apparue sous traitement et non rapportées jusque là. Il s'agit ici d'une étude de faisabilité qui ne peut s'appliquer à la totalité des patients du fait notamment des conditions expérimentales nécessaires (échantillons de sang avec une FA importante du fait de la faible profondeur associée au séquençage d'exomes). Cette étude ouvre néanmoins la porte à de nouvelles voies de recherche en montrant la possibilité d'identifier de façon non invasive de nouveaux mécanismes de résistance au traitement.

D. Evaluation de l'efficacité du traitement

a) Evaluation standard

L'évaluation de l'efficacité du traitement carcinologique en oncologie digestive repose principalement sur l'imagerie notamment la tomodensitométrie et des critères d'évaluation standardisés dits « Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

(RECIST) » ont été mis en place à cet effet pour permettre une meilleure reproductibilité dans la prise en charge des patients (Therasse *et al*, 2000). Ces critères ont fait l'objet d'une actualisation en 2009 (version dite 1.1) et sont fondés sur la mesure de la plus grande dimension des lésions tumorales en considérant au maximum 5 lésions dont deux par organe (Eisenhauer *et al*, 2009). Avec ce système d'évaluation, une progression tumorale est définie par une augmentation d'au moins 20 % de la somme des plus grands diamètres des lésions cibles par rapport à la plus petite valeur observée de cette somme (NADIR) et/ou l'apparition non équivoque d'une nouvelle lésion tumorale. Dans le cas contraire, l'évaluation correspond à un contrôle tumoral reflétant soit une réponse objective soit une stabilité tumorale. Cette reconnaissance sans équivoque de la progression tumorale est importante en pratique pour le clinicien puisque c'est elle qui va le guider dans le changement de traitement carcinologique. Ce système unanimement utilisé comprend néanmoins plusieurs limites. En effet, il existe un manque de reproductibilité interobservateurs dans l'évaluation des lésions non cibles telles que la lymphangite carcinomateuse, l'infiltration épiploïque péritonéale ou les épanchements (Sharma *et al*, 2012). Par ailleurs, ce système d'information morphologique ne prend en compte que la taille totale des lésions et pas les remaniements structurels associés à la viabilité tumorale. Il a ainsi été montré que ces critères n'étaient pas adaptés à l'évaluation de nouvelles modalités thérapeutiques comme les thérapies ciblées antiangiogéniques ou certains types de tumeur solide comme les GastroIntestinal Stromal Tumor (GIST) où une augmentation paradoxale et transitoire du volume tumoral peut être observée et néanmoins associée à une réponse objective (Choi *et al*, 2007). Pour cette raison, de nouvelles modalités d'imagerie fonctionnelle sont à l'étude et évaluent la perfusion, le métabolisme ou la densité tumorale. Ces méthodes basées sur

l'échographie, la tomodensitométrie, l'IRM ou la tomographie par émissions de positron, semblent prometteuses et susceptibles d'apporter des informations complémentaires à l'imagerie morphologique traditionnelle selon RECIST 1.1. Elles ne relèvent cependant actuellement pas de la pratique quotidienne du fait d'un manque de standardisation et des traitements complexes de l'image qu'elles nécessitent.

b) Evaluation par l'ADNtunc

L'autre grand axe de recherche concernant l'évaluation de la réponse tumorale est représenté par l'étude des biomarqueurs circulants correspondant soit aux marqueurs tumoraux classiques comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) ou le carbohydrate antigen 19.9 (CA19.9) soit à des biomarqueurs de développement plus récent comme les cellules tumorales circulantes (CTC) ou l'ADNc. Plusieurs études ont étudié le niveau de variation de l'ADNtunc ou ADNtotc sous traitement et ont montré des résultats de concordance intéressants par rapport au résultat de l'évaluation par l'imagerie après 2 à 3 mois de traitement. Ce monitoring par l'ADNtunc a été rapporté pour plusieurs types de tumeur solide métastatique comme par exemple le mélanome (Shinozaki *et al*, 2007; Gray *et al*, 2015; Lee *et al*, 2017b), le cancer pulmonaire (Oxnard *et al*, 2014; Lee *et al*, 2016; Riediger *et al*, 2016; Guibert *et al*, 2017), le cancer du sein (Dawson *et al*, 2013; Takeshita *et al*, 2016; Visvanathan *et al*, 2017) ou le CCRm (Tie *et al*, 2015; Garlan *et al*, 2017; Herbst *et al*, 2017; Toledo *et al*, 2017; Vidal *et al*, 2017). A titre d'exemple, Tie *et al*. ont évalué l'intérêt d'un monitoring rapproché de l'ADNtunc (mesuré à l'initiation et immédiatement avant la deuxième cure (C2 ; 2 à 3 semaines)) pour prédire le résultat de l'évaluation scannographique réalisée à 8-10 semaines chez 53 patients traités en 1^{ère} ligne pour un CCRm (Tie *et al*, 2015). Une cible mutationnelle tissulaire était identifiée par NGS chez 52 (98 %) patients et celle-ci était retrouvée

dans le plasma de 48 (92 %) patients à l'initiation du traitement. Le niveau de variation d'ADNtunc était significativement corrélé au pourcentage de variation des diamètres tumoraux ($p=0,01$). Une diminution d'ADNtunc ≥ 10 fois la valeur initiale était identifiée par la courbe ROC comme le seuil le plus performant pour prédire la survenue d'une réponse objective radiologique à S8-10. Les valeurs prédictives positives et négatives de ce seuil étaient de 74 % et 65 %, respectivement. Cette méthode d'évaluation par l'ADNtunc semble par ailleurs réalisable quel que soit la modalité de traitement carcinologique (traitement systémique *versus* localisé (chimio ou radioembolisation par exemple); chimiothérapie *versus* radiothérapie, traitement cytotoxique conventionnel *versus* thérapie ciblée etc.) constituant ainsi une différence avec l'imagerie conventionnelle et les critères RECIST 1.1. A la différence des marqueurs tumoraux conventionnels, le monitoring par ADNtunc semble susceptible d'apporter une information plus précoce, sensible et spécifique. Ainsi, Dawson *et al.* ont évalué l'intérêt d'un monitoring par l'ADNtunc, les CTC et le marqueur tumoral conventionnel carbohydre antigen 15.3 (CA15.3) pour prédire le résultat de l'évaluation à 3 mois chez 30 patientes traitées pour un cancer du sein métastatique (Dawson *et al.*, 2013). A l'initiation du traitement, le CA15.3 était positif dans 78 % des cas alors qu'une détection de CTC et d'ADNtunc était retrouvée dans 87 % et 96 % des cas, respectivement. Le monitoring par ADNtunc apparaissait en outre comme le plus sensible et le plus précoce parmi les 3 marqueurs pour identifier la progression scannographique. Ces résultats préliminaires devront bien sûr être confirmés sur des séries indépendantes pour valider notamment les seuils préalablement identifiés.

Objectifs des travaux de thèse

L'ensemble des données rapportées dans l'introduction suggère que l'ADNtunc constitue un biomarqueur prometteur susceptible d'optimiser la prise en charge du patient en oncologie. L'objectif de cette thèse était double et s'articule autour de deux grandes parties : i) optimiser le développement préanalytique et analytique relatif à la détection d'ADNtunc ii) évaluer l'intérêt clinique de ce biomarqueur dans différentes situations d'oncologie digestive. Les travaux présentés ci-après ont été réalisés au sein de l'équipe de Recherche en **ON**cologie (équipe 3 de l'unité INSERM U1245) avec la collaboration de Me Ludivine Beaussire et sous l'encadrement du Dr Nasrin Vasseur.

Dans la première partie, nous souhaitons évaluer l'intérêt de la méthode de dPCR pour la détection d'ADNtunc :

1. directement à partir du plasma sans étape d'extraction (travail n°1)
2. à partir d'échantillons de plasma hépariné (travail n°2)
3. en comparaison de l'*E-ice*-COLD-PCR qui constitue une autre méthode ultrasensible de détection (travail n°3).

Dans la deuxième partie, nous souhaitons évaluer l'intérêt clinique de la détection d'ADNtunc par la méthode de dPCR :

4. sur le plan diagnostique au sein d'une série de patients avec découverte récente d'une tumeur solide pancréatique (travail n°4).
5. sur le plan pronostique au sein de séries de patients suivis pour CCRm ou AP (travaux n°4 à 6).
6. sur le plan prédictif de réponse au traitement au sein d'une série de patients avec CCRm traités par chimiothérapie (travail n°6).

Méthodes et Résultats

I. Détection d'ADNtunc par dPCR directement à partir du plasma (Travail n°1)

A. Rationnel

Parmi les conditions préanalytiques relatives à la détection d'ADNtunc, l'extraction d'ADN est la plus longue et la plus coûteuse des étapes. Celle-ci représente la moitié du coût total de détection au sein de notre unité de recherche. Depuis l'arrivée des technologies ultrasensibles de détection d'ADNtunc telles que la dPCR et dans une perspective d'utilisation à grande échelle de ce biomarqueur, la justification de cette étape nous semblait importante à reconsidérer. L'objectif était d'évaluer la faisabilité de détection d'ADNtunc directement à partir du plasma. Les résultats de détection d'ADNtunc étaient comparés sur les plans qualitatifs (taux de détection) et quantitatifs (détermination de FA) pour les échantillons avec et sans étape d'extraction au sein du même groupe de patient.

B. Méthodes

L'analyse d'ADNtunc était réalisée à partir de 43 échantillons de plasma prélevés à différents temps du suivi oncologique de 17 patients traités pour un CCRm et issus de la cohorte prospective Cocacolon (travail n° 6). Les patients étaient sélectionnés sur la base d'une mutation tissulaire identifiée préalablement et secondairement utilisée pour la détection d'ADNtunc (*KRAS* (n=13), *NRAS* (n=2) ou *BRAF* (n=2)). La détection était réalisée par une plateforme de dPCR (QuantStudio™ 3D Digital PCR System) à partir de 2,5 µL de plasma ou 4 ng d'ADN issus de l'éluat d'extraction.

C. Résultats

Nous avons montré sur le plan qualitatif que les taux de détection d'ADNtmc entre les deux sous groupes (« plasma » et « extraction ») étaient comparables (88 % (38/43) et 93 % (40/43), respectivement) avec un taux de concordance globale à 91 % (39/43). Sur le plan quantitatif, nous montrions que les FA moyennes entre les sous groupes n'étaient pas significativement différentes (16,9 % \pm 18,9 et 18,5 % \pm 18,9 pour les sous groupes « extraction » et « plasma », respectivement, $p=0,24$) avec une corrélation significative dans la détermination de la FA entre les deux sous groupes ($r^2=0,82$; $p<0,0001$).

D. Valorisation

Ce travail a été accepté sous forme de Short communication à *Clinical Biochemistry* (Impact Factor=2,43 (2016), rang C (SIGAPS, 2016) :

D. Sefrioui, L. Beaussire, A. Perdrix, F. Clatot, P. Michel, T. Frebourg, F. Di Fiore, N. Sarafan-Vasseur. Direct circulating tumor DNA detection from unpurified plasma using a digital PCR platform. *Clin Biochem* 2017; 50:963-966.

II. Apport de l'héparinase pour la détection et la quantification d'ADNtunc par dPCR à partir d'échantillons de plasma hépariné (Travail n°2)

A. Rationnel

En conditions préanalytiques optimales, l'analyse d'ADNtunc est préférentiellement réalisée sur plasma EDTA. De nombreuses biobanques de plasma utilisant des tubes héparinés ont cependant été constituées à l'occasion d'essais cliniques en oncologie. L'analyse d'ADNtunc au sein de ces collections est problématique en raison de l'inhibition de la réaction de PCR par l'héparine. Plusieurs études ont montré la possibilité d'amplifier les acides nucléiques de différents agents infectieux à partir d'échantillons de plasma hépariné et après apport d'héparinase. L'objectif de notre étude était de développer une méthode d'analyse d'ADNtunc basée sur l'addition d'héparinase aux échantillons de plasma hépariné.

B. Méthodes

L'étude était réalisée à partir de 194 échantillons de plasma hépariné collectés au sein de deux cohortes rétrospectives de patients avec : (1) AP (n=50) (2) cancer du sein métastatique (CSM) (n=144). L'ADNtunc était analysé par dPCR à partir des mutations *KRAS* et *ESR1* pour les patients avec AP et CSM, respectivement. Une étape de préamplification avec ou sans héparinase (H+ et H-, respectivement) précédait la réaction de dPCR. L'analyse d'ADNtunc était interprétable si le nombre de copies d'ADNtotc était > 200 copies/ μ L (mélange réactionnel) en dPCR après la préamplification. En l'absence d'héparinase, ce seuil discriminait les échantillons en deux groupes : i) inhibition de la PCR par l'héparine (< 200 copies/ μ L, groupe I+) ii) absence d'inhibition de la PCR par l'héparine (≥ 200 copies/ μ L, groupe I-).

C. Résultats

Une inhibition de la PCR (groupe I+) était trouvée pour 117/194 (60 %) patients, soit 26/50 (52 %) avec AP et 91/144 (63 %) patients avec CSM. L'addition d'héparinase améliorait l'efficacité de la PCR (≥ 200 copies/ μ L) pour tous ces échantillons. Ce traitement permettait de détecter l'ADNtunc chez 13/26 (50%) et 22/91 (24%) patients avec AP et CSM, respectivement. En l'absence d'inhibition de la PCR (groupe I-), l'addition d'héparinase ne modifiait pas les résultats d'analyse d'ADNtunc sur les plans qualitatifs et quantitatifs. En effet, les taux de détection d'ADNtunc étaient similaires chez les patients avec AP (17/24 (87%)) et CSM (18/53 (35%)) en conditions H+ et H-, respectivement. Par ailleurs, les FA d'ADNtunc étaient significativement corrélées (*KRAS*: $r^2 = 0.859$, $p < 0.0001$; *ESR1*: $r^2 = 0.886$, $p < 0.0001$). Ces résultats suggèrent que l'addition d'héparinase permet de lever l'inhibition de l'héparine sur la réaction de PCR et de détecter et quantifier précisément l'ADNtunc par dPCR dans les échantillons de plasma hépariné.

D. Valorisation

Ce travail a été présenté en congrès sous forme de communications affichées (10èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest 2017, European Society for Medical Oncology 2017), de communication orale (5th QPCR and digital PCR congress 2017) et a également été accepté sous forme d'article original pour *Clinica Chimica Acta* (Impact Factor=2,87 (2016), rang B (SIGAPS, 2016) :

D. Sefrioui, L. Beaussire, F. Clatot, J. Delacour, A. Perdrix, T. Frebourg, P. Michel, F. Di Fiore, N. Sarafan-Vasseur. Heparinase enables reliable quantification of circulating tumor DNA from heparinized plasma samples by droplet digital PCR. *Clin Chim Acta* 2017; 472:75-79.

III. Etude comparative de la détection d'ADNtunc par les méthodes de dPCR et E-ice-COLD-PCR (Travail n°3)

A. Rationnel

L'ADNtunc est présent en quantité variable dans la circulation sanguine. L'identification de ce biomarqueur nécessite l'utilisation de technologies ultrasensibles capables de détecter jusqu'à un fragment d'ADN tumoral parmi 10 000 fragments d'ADN wild-type (FA à 0,01 %). Plusieurs méthodes de détection ont été rapportées pour répondre à cet objectif comme par exemple la dPCR, la PCR spécifique d'allèle, la COLD PCR ou des méthodes optimisées de NGS. Peu d'études ont comparé directement la performance de ces méthodes pour la détection d'ADNtunc. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail était de comparer deux méthodes de détection ultrasensibles (dPCR et E-ice-COLD-PCR) sur les plans qualitatifs et quantitatifs pour la détection d'ADNtunc.

B. Méthodes

La détection d'ADNtunc était réalisée à partir de 29 patients traités par chimiothérapie pour un CCRm et issus de la cohorte prospective Cocacolon (travail n° 6). Le statut mutationnel tissulaire *KRAS* était préalablement déterminé par la méthode de SNaPshot® (statut *KRAS* muté, n=28 et statut *KRAS* wild-type, n=1). L'ADNc était extrait à partir d'un prélèvement de 1 à 2 mL de plasma EDTA et analysé en parallèle par dPCR et E-ice-COLD-PCR. L'analyse par dPCR était réalisée sur deux plate-formes (dPCR 1 (QuantStudio™ 3D Digital PCR System) et dPCR 2 (QX200™ Droplet Digital™ PCR System)) et basée sur la connaissance du statut mutationnel tissulaire *KRAS*. L'analyse par E-ice-COLD-PCR était réalisée en

aveugle de la connaissance du statut mutationnel tissulaire *KRAS* et des résultats de dPCR. La détermination du statut mutationnel circulant *KRAS* par E-*ice*-COLD-PCR était réalisée par pyroséquencage.

C. Résultats

Ce travail a permis de montrer que les méthodes de dPCR et E-*ice*-COLD-PCR affichent des résultats proches sur les plans qualitatifs et quantitatifs pour la détection d'ADNtunc. Aucune mutation circulante n'était identifiée chez le patient avec statut tissulaire *KRAS* wild-type. Pour les 28 patients avec une mutation tissulaire *KRAS*, les trois plates-formes affichaient des taux de détection voisins (24/28 (86 %), 22/28 (79 %) et 21/28 (75 %) pour la dPCR 1, la dPCR 2 et l'E-*ice*-COLD-PCR, respectivement). L'absence de détection d'ADNtunc pour 3 patients en E-*ice*-COLD-PCR correspondait à des échantillons de faible FA proche de la limite de détection en dPCR (0,15 à 0,45 %). Les déterminations de FA étaient également concordantes entre les 3 méthodes ($r^2=0,94$ entre dPCR 1 et E-*ice*-COLD-PCR ; $r^2=0,96$ entre dPCR 2 et E-*ice*-COLD-PCR ; $r^2=0,98$ entre dPCR 1 et dPCR 2).

D. Valorisation

Ce travail a été accepté sous forme d'article original pour *Clinica Chimica Acta* (Impact Factor=2,87 (2016), rang B (SIGAPS, 2016)) :

D. Sefrioui, F. Mauger, L. Leclere, L. Beaussire, F. Di Fiore, J.F. Deleuze, N. Sarafan-Vasseur, J. Tost. Comparison of the quantification of *KRAS* mutations by digital PCR and E-*ice*-COLD-PCR in circulating-cell-free DNA from metastatic colorectal cancer patients. *Clin Chim Acta* 2016; 465:1–4.

IV. Intérêt diagnostique du CA19.9, de l'ADNtunc et des CTC chez les patients avec tumeur solide pancréatique (Travail n°4)

A. Rationnel

L'AP représente la majorité des lésions malignes pancréatiques (90 %). Au moment du diagnostic, 80 % des AP sont inopérables en raison du caractère localement avancé ou métastatique et dans cette situation, la prise en charge initiale relève d'un traitement de chimiothérapie. Du fait des diagnostics différentiels possibles (autres tumeurs malignes (ex : tumeur endocrine, métastase de tumeur solide) ou lésion bénigne), l'obtention d'une preuve histologique avant la mise en route du traitement est indispensable. Celle-ci est habituellement obtenue par une échocytoscopie biliopancréatique (EEBP) avec cytoponction. Cet examen comporte de nombreuses limites telles que la nécessité d'une anesthésie générale, le caractère invasif avec un risque de complications entre 0 et 5 % des cas et une non contributivité pour 20 à 30 % des procédures. Notre équipe a précédemment montré que la détection de CTC était associée à une sensibilité de 55 % et une spécificité de 100 % pour le diagnostic d'AP chez les patients avec diagnostic récent de TSP (Iwanicki-Caron *et al*, 2013). Dans ce contexte, nous souhaitons évaluer l'intérêt d'une biopsie liquide analysant les CTC en combinaison à l'ADNtunc et au CA19.9 pour le diagnostic d'AP chez les patients avec TSP en alternative à l'EEBP avec cytoponction.

B. Methodes

Un total de 68 patients avec TSP a été inclus entre janvier 2011 et mars 2014. Un prélèvement de sang était réalisé systématiquement avant chaque EEBP et

comprenait un tube EDTA pour la recherche de CTC et un tube hépariné pour le dosage du CA19.9. L'analyse d'ADNtmc était réalisée à partir du reliquat de plasma hépariné utilisé pour le dosage de CA19.9. Nous utilisons une étape de préamplification avec addition d'héparinase pour optimiser la détection d'ADNtmc (travail n°2). Cette détection était réalisée par dPCR avec un kit multiplex analysant les 7 mutations *KRAS* suivantes: c.34G>A, c.34G>C, c.34G>T, c.35G>A, c.35G>C, c.35G>T et c.38G>A. Une analyse simplex était également réalisée pour tous les échantillons détectés positivement en analyse multiplex. La performance diagnostique de chaque biomarqueur de même que leur combinaison était comparée à celle de l'EEBP avec cytoponction.

C. Resultats

Les TSP correspondaient à 58 tumeurs malignes (52 AP et 6 autres lésions malignes) et 10 lésions bénignes (masse pseudotumorale de pancréatite chronique calcifiante principalement (n=9)). La sensibilité et la spécificité de l'ADNtmc pour le diagnostic d'AP étaient de 65 % et 75 %. Celles-ci apparaissaient moins performantes que le CA19.9 (79 % et 93 %), les CTC (67 % et 80 %) ou l'EEBP avec cytoponction (73 % et 88 %). La positivité d'au moins deux biomarqueurs sur trois était associée à une sensibilité de 78 % et une spécificité de 91 %, soit un rendement diagnostique légèrement supérieur à celui de l'EEBP. L'ADNtmc était le seul biomarqueur associé avec la SG et conférait une valeur pronostique péjorative en cas de détection positive chez les patients avec AP (5,2 mois *versus* 11 mois en l'absence de détection, p=0,01).

D. Valorisation

Ce travail a été présenté en congrès sous forme de communications affichées (European Society for Medical Oncology 2016, Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive 2017), de communications orales (United European Gastroenterology Week 2014, Carrefour Pathologie 2015) et a été accepté sous forme d'article original pour *British Journal of Cancer* (Impact Factor=6,18 (2016), rang B SIGAPS (2016)) :

D. Sefrioui, F. Blanchard, E. Toure, P. Basile, L. Beaussire, C. Dolfus, A. Perdrix, M. Paresy, M. Antonietti, I. Iwanicki-Caron, R. Alhameedi, S. Lecleire, A. Gangloff, L. Schwarz, F. Clatot, J.J. Tuech, T. Frébourg, F. Jardin, J.-C. Sabourin, N. Sarafan-Vasseur, P. Michel and F. Di Fiore. Diagnostic value of CA19.9, circulating tumour DNA and circulating tumour cells in patients with solid pancreatic tumours. *Br J Cancer* 2017; 117:1017-1025.

V. Intérêt pronostique de la détection d'ADNc par dPCR chez les patients avec CCRm (Travail n°5)

A. Rationnel

A l'initiation de ce travail de thèse, peu de travaux avaient étudié l'impact clinique de l'ADNc dans le CCRm. L'objectif de ce travail était double en évaluant d'une part, l'intérêt de la dPCR pour la détection et la quantification d'ADNc en comparaison de méthodes alternatives de fluorimétrie (ADNtotc) et de PCR spécifique d'allèle (ADNtumc) et d'autre part, l'intérêt pronostique de la détection d'ADNc chez les patients avec CCRm.

B. Méthodes

Un total de 34 patients a été inclus dans ce travail entre avril et juin 2013. Le prélèvement de sang (2 tubes EDTA de 4 mL) était réalisé à l'initiation (n=2) ou en cours de traitement de chimiothérapie (n=32). L'analyse d'ADNtotc était réalisée par dPCR (QuantStudio™ 3D Digital PCR System) et fluorimétrie après extraction plasmatique d'ADN. L'analyse d'ADNtumc était réalisée par dPCR et PCR spécifique d'allèle (castPCR™ Technology) à partir des mutations *KRAS* de l'exon 2. Les résultats d'analyse d'ADNc par dPCR étaient également confrontés aux données cliniques notamment de SG.

C. Résultats

Parmi les 34 patients inclus, l'analyse tissulaire du gène *KRAS* permettait d'identifier une mutation pour 16 patients (c.34G>T (n=1) ; c.35G>A (n=8) ; c.35G>C (n=3) ; c.35G>T (n=2) ; c.38G>A (n=2)) et l'absence de mutations pour 18 patients. Les taux de détection d'ADNtumc par dPCR et PCR spécifique d'allèle étaient de 11/16 (69%) et 9/16 (56%), respectivement. Une corrélation significative était

retrouvée entre les deux méthodes de dPCR et fluorimétrie pour la quantification d'ADNtotc ($r^2=0,91$; $p<0,001$) ainsi qu'entre les quantités d'ADNtotc et d'ADNtumc mesurées par dPCR ($r^2=0,8$; $p<0,001$). Enfin, nos résultats montraient un impact pronostic péjoratif de la détection d'ADNtotc et d'ADNtumc. En effet, la SG des patients était significativement et inversement corrélée à la quantité d'ADNtotc (4,8 mois (concentration > 70 ng/mL ($\geq 75^e$ percentile)) versus 8,2 mois (concentration entre 20 et 70 ng/mL (entre 50^e et 75^e percentile)) versus 11,3 mois (concentration entre 11 et 20 ng/mL (entre 25^e et 50^e percentile)) versus médiane non atteinte (concentration < 11ng/mL ($\leq 25^e$ percentile)); $p=0,024$). La SG était également significativement diminuée en présence d'ADNtumc (11,8 mois versus médiane non atteinte en l'absence d'ADNtumc, $p=0,04$).

D. Valorisation

Ce travail a été présenté en congrès sous forme de communication affichée (American Society of Clinical Oncology_Gastrointestinal 2014, Journées Francophones d'HépatogastroEntérologie et d'Oncologie Digestive 2014, European Society for Medical Oncology 2014) et accepté sous forme d'article original pour *Digestive and Liver Disease* (Impact Factor=3,06 (2016), rang C SIGAPS (2016)) :

D. Sefrioui, N. Sarafan-Vasseur, L. Beaussire, M. Baretta, A. Gangloff, F. Blanchard, F. Clatot, J.C. Sabourin, R. Sesboüé, T. Frebourg, P. Michel, F. Di Fiore. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2015; 47:884–890.

VI. Impact pronostique et prédictif de réponse au traitement de l'ADNc, de l'ACE, du CA19.9 et des CTC chez les patients traités par chimiothérapie pour un CCRm (résultats de l'étude prospective COCACOLON) (Travail n°6).

A. Rationnel

Plusieurs études ont montré que le monitoring individuel de l'ACE, du CA19.9 ou des CTC confère un intérêt pronostique et prédictif de la réponse au traitement chez les patients avec CCRm. Nous montrions ainsi que la pente de l'ACE au seuil de 0,05 est associé à une valeur prédictive négative de 95,3 % pour prédire la progression à la chimiothérapie dans une série de 122 patients traités pour un CCRm (Iwanicki-Caron *et al*, 2008). A l'initiation de cette étude, peu de travaux avaient été réalisés sur la détection d'ADNtmc dans le CCRm. Notre équipe a montré la faisabilité et l'impact pronostique potentiel de cette détection (Di Fiore *et al*, 2008 ; Lefebvre *et al*, 2010). L'objectif principal de l'étude Coca-Colon était de confirmer la valeur seuil de 0,05 de la pente de l'ACE pour prédire la progression à la chimiothérapie. Les objectifs secondaires étaient d'évaluer l'impact pronostique et prédictif de la réponse au traitement du CA19.9, des CTC et de l'ADNc.

B. Méthodes

Il s'agit d'une étude prospective ayant inclus 192 patients entre novembre 2010 et août 2014. L'étude incluait les patients avec CCRm, stade OMS 0-2, concentration d'ACE ≥ 5 ng/mL et/ou de CA19.9 ≥ 30 UI/mL, naïf de chimiothérapie ou à l'initiation d'une nouvelle ligne. Un échantillon de sang était prélevé avant chaque cure de chimiothérapie (C1 à C4) pour l'ACE et le CA19.9 et avant traitement (C1) puis à 6 semaines (C3 ou C4) pour l'ADNc et les CTC. L'ADNtotc était analysé

par fluorimétrie et l'ADNtunc par dPCR (QuantStudio™ 3D Digital PCR System). Les mutations cibles étaient préalablement identifiées au sein du tissu tumoral par la méthode de SnapShot®. Les CTC étaient analysées par étude cytomorphologique après une étape d'enrichissement basée sur la taille (méthode ScreenCell®). Le niveau médian prétraitement (avant C1) et la cinétique de chacun de ces biomarqueurs (seuil de 0,05 pour l'ACE et niveau médian pour le CA19.9, les CTC et l'ADNc) était confronté aux résultats de l'évaluation à 3 mois ainsi qu'aux données de survie sans progression (SSP) et de SG.

C. Résultats

L'objectif principal de cette étude est atteint puisque la cinétique de l'ACE au seuil $> 0,05$ était significativement associée à la progression à 3 mois (76 % versus 17 % en cas de pente $\leq 0,05$ ($p < 0,0001$, ORa =16.64)) avec une sensibilité et une spécificité pour prédire la progression de 46 % et 95 %, respectivement. La cinétique de l'ACE (seuil $> 0,05$) constituait un facteur indépendant péjoratif de SSP (HRa =3,47, $p < 0,0001$) et de SG (HRa =2,17, $p < 0,0015$). Un échantillon de plasma était disponible à C1 pour 172/192 (89,6 %) patients avec une concentration médiane d'ADNtotc de 24,4 ng/mL. Une mutation tissulaire de *KRAS*, *NRAS* ou *BRAF* était retrouvée pour 88 (51,2 %) de ces 172 patients. Le taux de détection d'ADNtunc était de 82/88 (93,2 %) avec un niveau médian de FA de 14,3 %. En analyse multivariée, les niveaux médians d'ADNtotc et d'ADNtunc à C1 constituaient des facteurs indépendants de progression à 3 mois (ORa=2,4, $p=0,01$ et ORa=3.15, $p=0,01$, respectivement), de SSP (HRa=1,87, $p=0,0002$ et HRa=1,78, $p=0,0124$, respectivement) et de SG (HRa=2,36, $p < 0,0001$ et HRa=2,17, $p=0,0022$, respectivement). Les cinétiques d'ADNtotc et d'ADNtunc constituaient également des facteurs indépendants de progression à 3 mois (ORa=3,6, $p=0,03$ et ORa=4,81,

p=0,0133) alors que seule la cinétique d'ADNtotc impactait significativement sur la SG (HRa=2,03, p=0,0066).

D. Valorisation

Ce travail a été présenté en congrès sous forme de communications affichées (Journées Francophones d'HépatogastroEntérologie et d'Oncologie Digestive 2013, European Society for Medical Oncology 2013, American Society of Clinical Oncology 2016, European Society for Medical Oncology 2016), de communication orale (9 èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest 2016) et a été soumis sous forme d'article original pour *Journal of Clinical Oncology* (Impact Factor=24 (2016), rang A SIGAPS (2016)) :

D. Sefrioui, L. Beaussire, A. Gillibert, E. Toure, F. Blanchard, C. Bazille, A. Perdrix, F. Ziegler, A. Gangloff, M. Hassine, C. Elie, A.L. Bignon, A. Parzy, P. Gomez, C. Thill, F. Clatot, J.C. Sabourin, T. Frebourg, J. Benichou, K. Bouhier-Leporrier, M.P. Gallais, N. Sarafan-Vasseur, P. Michel and F. Di Fiore. Clinical impact of a serial measurement of CEA, CA19.9, circulating DNA and circulating tumor cells in a cohort of patients treated for a metastatic colorectal cancer (Coca Colon Study). *J Clin Oncol* 2017, submitted

Discussion

I. Aspects préanalytiques et analytiques

La perspective d'une implémentation en pratique quotidienne de l'ADNtunc nécessite d'harmoniser les pratiques préanalytiques dévolues à ce biomarqueur. Plusieurs travaux se sont focalisés sur cet aspect et des recommandations ont été publiées pour le conditionnement préanalytique optimal de ces échantillons ((El Messaoudi *et al*, 2013; Bronkhorst *et al*, 2015). Quelques réserves doivent cependant être soulevées vis-à-vis de ces recommandations qui sont basées pour un certain nombre d'entre elles sur des études publiées au début des années 2000 et qui ne prennent pas nécessairement en compte les progrès technologiques réalisées durant les dix dernières années concernant l'analyse d'ADNtunc. L'autre élément à considérer concerne le type d'application clinique pour laquelle l'ADNtunc va être analysé puisque la nécessité de connaître précisément la FA de l'échantillon ne semble pas aussi importante selon qu'il s'agit d'un monitoring sous traitement ou d'un test diagnostique avant la mise en route d'une thérapie ciblée. En effet, cette dimension quantitative n'est actuellement pas requise dans l'exemple du CCRm avant la mise en route du traitement anti-EGFR. Dans cette situation, il est actuellement recommandé de déterminer le statut mutationnel *RAS* simplement sur le plan qualitatif. Fort de ces considérations, nous menions un travail pilote de détermination du statut plasmatique *RAS* et *BRAF* par une méthode de dPCR avec ou sans étape d'extraction plasmatique d'ADN dans une série de patients suivis pour un CCRm avec statut mutationnel *RAS* tissulaire connu. Nous montrions d'une part, un taux de détection d'ADNtunc assez proche de ceux publiés dans la littérature dans cette situation clinique (Thierry *et al*, 2014; Tie *et al*, 2015; Garlan *et al*, 2017; Vidal *et*

a/, 2017) et d'autre part, un taux de concordance élevé à 91 % (n=39/43) pour la détection d'ADNtunc entre les échantillons plasmatiques avec et sans extraction. Ce travail comporte plusieurs limites comme la connaissance du statut mutationnel préalablement à l'analyse d'ADNtunc et l'absence d'échantillons avec statut *RAS/BRAF* wild-type. Par ailleurs, la majorité des échantillons (n=29/43) présentait une FA > 0,5 % (après extraction) qui pourrait expliquer le taux de concordance élevé dans la détermination du statut mutationnel circulant. En effet, les 4 cas discordants étaient retrouvés systématiquement pour les échantillons avec une FA < 0,5 %. Enfin, une discordance importante était parfois retrouvée lors de la détermination de la FA entre les échantillons avec et sans extraction qui peut en partie être expliqué par le faible volume de plasma utilisé (2,5 µL) et la concentration variable d'ADNtotc. Ainsi, plus la concentration d'ADNtotc et la FA sont faibles, plus le risque de biais d'échantillonnage des fragments d'ADN muté est important. Il s'agit néanmoins de la première étude à montrer la faisabilité de détecter l'ADNtunc sur la base de mutations ponctuelles hotspots et directement à partir du plasma. Nos résultats suggèrent que cette approche est possible en cas d'utilisation d'une méthode ultrasensible de détection telle que la dPCR et particulièrement pour les échantillons avec une FA élevée (> 0,5 %). Au vu du rationnel qui sous-tend ce travail (coût d'analyse, délai de rendu de l'analyse), il semblerait intéressant de confirmer ces résultats prometteurs sur une série indépendante avec un plus large effectif et en considérant les limites décrites ci-avant notamment dans une perspective d'application diagnostique avant la mise en route du traitement anti-EGFR.

Le deuxième travail original présenté dans ce manuscrit consistait à proposer l'héparine comme alternative d'anticoagulant à l'EDTA pour la détection plasmatique

d'ADNtunc. Les résultats de notre étude montrent que l'ajout d'héparinase restaurait systématiquement l'efficacité de la PCR inhibée dans plus de la moitié des échantillons héparinés (117/194) et permettait la détection d'ADNtunc dans une proportion équivalente aux échantillons héparinés sans inhibition. De plus, nous retrouvons un taux de détection équivalent et une FA proche pour l'ADNtunc détecté à partir d'un sous groupe de patient (n=8) avec échantillons disponibles de plasma EDTA et hépariné avec ajout d'héparinase. Les taux de détection d'ADNtunc décrits dans notre étude pour les mutations *KRAS* et *ESR1* (62 % et 27,8 % respectivement) étaient par ailleurs assez proches des taux de détection rapportés dans la littérature à partir d'une typologie similaire de patients. Il s'agit de la première étude à montrer la faisabilité de détection d'ADNtunc à partir d'échantillons de plasma hépariné. Le protocole décrit dans ce travail et basé sur l'addition d'héparinase pourrait ainsi permettre l'utilisation des tubes héparinés collectés et conservés depuis de nombreuses années au sein des biobanques de plasma.

Un des problèmes récurrents qui se posent lors de la détection d'ADNtunc concerne la concentration initiale d'ADNc. En effet, cette concentration est souvent basse et constitue un élément limitant puisque la sensibilité d'une méthode d'analyse dépend en partie de la quantité de fragments d'ADN d'intérêt. Cette considération est particulièrement importante pour les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse qu'il s'agisse de détecter l'ADNtunc à partir d'un faible volume de plasma, directement sans étape d'extraction ou à partir d'un échantillon hépariné. Pour s'affranchir de cette limite, nous avons ainsi utilisé une méthode de préamplification qui consiste à augmenter la concentration d'ADN au niveau d'une région génomique d'intérêt qui va être analysé lors de la réaction de dPCR. Nous avons montré dans le travail n°4 (Supplementary Material) que cette étape de préamplification ne

retentissait pas sur les plans qualitatifs et quantitatifs pour la détermination de la FA. D'autres équipes ont également montré la faisabilité de cette approche et la possibilité de multiplexer les régions à préamplifier (Andersson *et al*, 2015; Castellanos-Rizaldos *et al*, 2015; Jackson *et al*, 2016). Jackson *et al*. montraient ainsi l'efficacité d'une étape de préamplification pour améliorer la quantité de matériel génétique de départ (Jackson *et al*, 2016). Ils utilisaient un nombre restreint de cycles multiplex (n=9) (*TP53* (R273C), *SMAD4* (R361G) et *KRAS* (G12S)) et une polymérase de haute fidélité pour optimiser la détection d'ADNtunc jusqu'à une FA de 0,01 %. Il s'agit ici d'une avancée importante qui permet d'augmenter la sensibilité de la méthode de détection, de réaliser des réplicats et offre la possibilité de détecter plusieurs mutations d'intérêt au sein d'un même échantillon.

En dehors des options proposées ci-dessus, les pratiques concernant les conditions préanalytiques tendent progressivement à s'harmoniser en situation prospective (**Figure 19**).

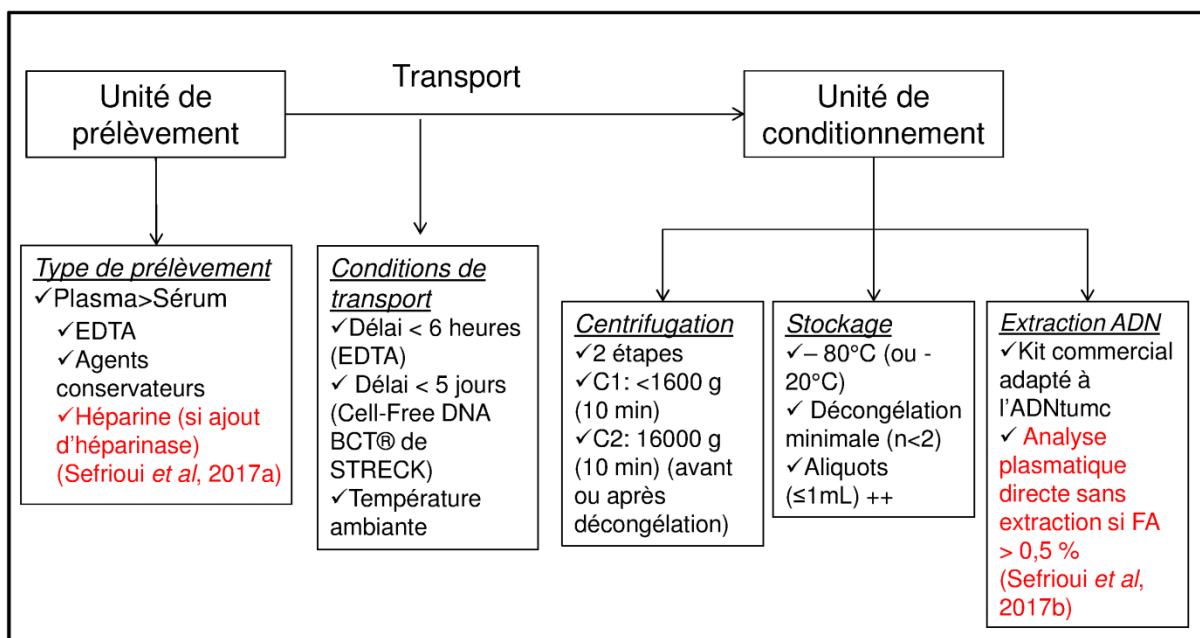


Figure 19. Recommandations préanalytiques actuelles pour l'analyse d'ADNtunc (les pratiques optionnelles issues de ce travail de thèse sont indiquées en rouge).

Il en va différemment des méthodes de détection d'ADNtumc puisque de nombreuses technologies ont été rapportées. Le choix d'une méthode va dépendre de nombreux critères parmi lesquels figurent principalement la connaissance préalable du statut mutationnel, la capacité de multiplexage, le coût et le délai de rendu des résultats. Les méthodes de dPCR et de NGS sont ainsi assez opposées en termes d'avantages et d'inconvénients et l'utilisation de l'une ou l'autre de ces méthodes ne semble pas dévolue aux mêmes types d'application. Pour la détection de mutations connues hotspot, plusieurs méthodes de sensibilité théoriquement équivalentes sont utilisées comme la dPCR, la *E-ice*-COLD-PCR ou la PCR spécifique d'allèle optimisée (technologie brevetée Intplex® par exemple). Au vu de ce marché fortement concurrentiel, nous souhaitons donc confronter les résultats de détection de nos deux plate-formes de dPCR avec la technologie émergente d'*E-ice*-COLD-PCR. Nous montrons dans le travail n°3, que les plates formes de dPCR et d'*E-ice*-COLD-PCR affichaient une concordance parfaite en termes de taux de détection, de détermination du statut mutationnel et de la FA pour les échantillons avec une FA > 0,4 % déterminée en dPCR. En dessous de ce seuil, la dPCR affichait une supériorité par rapport à l'*E-ice*-COLD-PCR. En effet, le taux de détection d'ADNtumc était de 3/9 (33 %) pour l'*E-ice*-COLD-PCR et pour ces 3 échantillons positifs, la concordance entre les réplicats était médiocre et ≤ 50 %. Les résultats de ce travail permettent donc de positionner la dPCR comme une méthode de détection plus sensible que l'*E-ice*-COLD-PCR. La méthode de dPCR nécessite cependant de connaître préalablement et précisément la mutation à rechercher. L'*E-ice*-COLD-PCR permet de son côté une détermination fiable du statut mutationnel *KRAS* circulant jusqu'à une FA proche de 0,4 % et en aveugle du résultat de l'analyse tissulaire. Cette méthode pourrait dans ce contexte s'inscrire dans une perspective

diagnostique plasmatique avant la mise en route du traitement anti-EGFR. Cette perspective semble d'autant plus réalisable qu'une étude récente de faisabilité a montré la possibilité d'une détection multiplex avec l'analyse dans le même temps d'autres gènes d'intérêt comme *BRAF* et *NRAS* sans perte de sensibilité de détection (Mauger *et al*, 2016).

II. Intérêts cliniques

Actuellement, la réalisation d'une biopsie tissulaire représente le plus souvent une étape incontournable du parcours initial de soins d'un patient en oncologie digestive. L'obtention d'une preuve histologique permet en effet d'orienter la prise en charge thérapeutique notamment dans le cas des tumeurs localement avancées ou métastatiques inaccessibles à une prise en charge chirurgicale première. Dans l'AP, cette situation représente la majorité des cas ($\geq 80\%$) et l'obtention du diagnostic repose sur la réalisation d'une EEBP avec cytoponction sous anesthésie générale. Les résultats de notre travail n°5 montrent que la biopsie liquide comprenant l'analyse combinée de 3 biomarqueurs (CA19.9, CTC et ADNtumc) constitue une alternative prometteuse avec une sensibilité et une spécificité équivalente à l'EEBP (78 % versus 73 % et 91 % versus 88 %) pour le diagnostic d'AP. En situation cholestastique (55 % des cas dans notre étude), la performance diagnostique de l'analyse combinée des 3 marqueurs était exactement superposable à celle de l'EEBP (sensibilité et spécificité de 78 % et 100 %, respectivement) et légèrement supérieure à celle du CA19.9 seul (74 % et 67 %) d'interprétation délicate dans cette situation. Le choix des mutations *KRAS* comme cible de détection pour l'ADNtumc était basée d'une part sur la fréquence importante de mutations hotspot au niveau de ce gène dans l'AP et d'autre part, la rareté de ce type de mutations dans les types tumoraux les plus fréquemment pourvoyeurs de métastases pancréatiques (DeWitt

et al, 2005; Sweeney *et al*, 2009). Les mutations *KRAS* sont par ailleurs rarement retrouvées au niveau des clones hématopoiétiques impliqués dans les formes précoces de myélodysplasies (à l'origine de potentiels faux positifs d'ADNtunc) (Genovese *et al*, 2014; Jaiswal *et al*, 2014; Xie *et al*, 2014). Nous retrouvons un taux de détection de 65 % pour l'ADNtunc chez les patients avec AP. Ce taux se situe dans la fourchette supérieure des taux de détection rapportés jusqu'à présent dans la littérature (**Tableau 3**). Cela peut en partie être expliqué par l'optimisation des conditions préanalytiques (étape de préamplification notamment), la méthode ultrasensible de détection utilisée (dPCR) et la typologie de patients inclus dans l'étude (naïfs de traitement carcinologique au moment du prélèvement, stade localement avancé/métastatique pour 75 % des patients). Dans la continuité de ce travail, une étude prospective est actuellement en cours pour confirmer sur une série indépendante la valeur diagnostique de la biopsie liquide en comparaison de l'EEBP avec cytoponction pour les patients se présentant avec une masse pancréatique tissulaire (NCT02072616). L'analyse à visée diagnostique de l'ADNtunc peut également trouver son intérêt dans d'autres situations oncologiques complexes comme la présence d'une récurrence en cas de multiples antécédents néoplasiques, d'une découverte de cancer métastatique avec plusieurs primitifs synchrones ou d'adénocarcinome de primitif indéterminé. Ainsi, Forshew *et al*. ont illustré ce concept en prenant le cas d'une patiente opérée simultanément de deux tumeurs primitives synchrones ovariennes et colorectales (Forshew *et al*, 2012). Une récurrence inopérable pelvienne de localisation difficile d'accès se présentait 5 ans plus tard et l'analyse comparative du profil mutationnel entre la biopsie liquide et les tissus tumoraux primitifs permettaient de trancher en faveur de l'origine ovarienne (mutation commune au niveau du gène *TP53* (p.R273H), absence des mutations circulantes

1 ^{er} Auteur, année de publication	Effectif	Méthode de détection	Cible mutationnelle	Stade tumoral	Taux de détection
(Allenson <i>et al</i> , 2017)	65	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	Localisé LA M+	15/33 (45,5 %) 4/13 (30,8 %) 11/19 (57,9 %)
(Del Re <i>et al</i> , 2017)	27	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	LA M+	1/4 (25 %) 18/23 (78,3 %)
(Cohen <i>et al</i> , 2017)	221	NGS (Safe-SeqS)	<i>KRAS</i>	Localisé (stade I et II)	66/221 (30 %)
(Cheng <i>et al</i> , 2017)	188	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	M+	136/188 (72,3 %)
(Pietrasz <i>et al</i> , 2017)	104	dPCR (Raindance)	<i>KRAS, TP53, SMAD4, NRAS, PIK3CA, STK11</i>	LA M+	6/36 (16,6 %) 44/68 (64,7 %)
(Brychta <i>et al</i> , 2016)	45	dPCR (Thermo Fisher Scientific)	<i>KRAS</i>	Localisé LA M+	11/38 (28,9 %) 1/6 (16,7 %) 1/1 (100%)
(Hadano <i>et al</i> , 2016)	105	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	Localisé	33/105 (31 %)
(Kinugasa <i>et al</i> , 2015)	75	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	Localisé (n=2) LA (n=5) M+ (n=68)	47/75 (62,6 %)
(Earl <i>et al</i> , 2015)	31	dPCR (Biorad)	<i>KRAS</i>	Localisé LA M+	3/10 (30 %) 1/8 (12,5 %) 4/13 (30,8 %)
(Takai <i>et al</i> , 2015)	259	dPCR (Raindance)	<i>KRAS</i>	Localisé LA M+	9/108 (8,3 %) 8/44 (18,2 %) 63/107 (58,9 %)
(Bettegowda <i>et al</i> , 2014)	155	dPCR (BEAMing) NGS (SafeSeqS)	<i>KRAS</i>	Localisé LA M+	59/116 (50,9 %) 0/5 (0 %) 30/34 (88,2 %)

Tableau 3. Taux de détection d'ADNtumc chez les patients avec AP

dPCR, PCR digitale ; NGS, Next-Generation Sequencing ; LA, localement avancé ; M+, métastatique

retrouvées au niveau tissulaire colorectal telles que *PIK3CA* (p.E545K), *KRAS* (p.G12V) ou *TP53* (p.R248W). En l'absence d'altération génétique connue, plusieurs travaux récents ont par ailleurs montré que l'analyse du profil de méthylation ou de l'empreinte nucléosomique de l'ADNc pouvait informer sur son origine tissulaire majoritaire et orienter ainsi fiablement sur l'origine du cancer primitif ((Lehmann-Werman *et al*, 2016; Snyder *et al*, 2016; Song *et al*, 2017). Ces données soulignent le rationnel majeur à l'utilisation de la biopsie liquide dans une stratégie diagnostique qui permettrait de simplifier et de raccourcir significativement la prise en charge des patients lors du diagnostic initial ou d'une récurrence éventuelle. Le deuxième aspect que nous avons étudié au sein des travaux n°4 à 6 est la valeur pronostique associée à la présence d'ADNc. Il ressort ainsi de nos études de façon systématique un impact pronostique péjoratif en présence d'ADNc que l'on analyse la concentration totale d'ADN ou sa fraction tumorale circulante. Nous avons montré dans le travail n°5 sur une série de 34 patients avec CCRm que la survie de ces patients était proportionnellement corrélée avec la concentration d'ADNtotc (temps médian de SG à 4,8 mois, 8,2 mois, 11,3 mois et non atteint pour les quartiles >75 % (70 ng/mL), 50-75 % (20-70 ng/mL), 25-50 % (11-20 ng/mL) et < 25 % (11 ng/mL) respectivement; $p=0,024$). Ce résultat a également été retrouvé dans le travail n°6 sur une même typologie de patients avec un effectif cependant plus large ($n=192$). A l'initiation du traitement, les niveaux médians d'ADNtotc (24,4 ng/mL) et d'ADNtumc (14,3 %) constituaient des facteurs indépendants de SSP ($HRa=1,87$, $p=0,0002$ et $HRa=1,78$, $p=0,0124$, respectivement) et de SG ($HRa=2,36$, $p<0,0001$ et $HRa=2,17$, $p=0,0022$, respectivement) et apparaissaient en ce sens plus discriminants que l'ACE, le CA19.9 ou les CTC. Ces données ont également été rapportées par plusieurs études récentes et les principaux résultats sont indiqués en **Tableau 4**.

1 ^{er} Auteur, année de publication	Effectif	Ligne CT	Méthode de détection	Biomarqueur, seuil	Médiane SG (mois)
(Vidal <i>et al</i> , 2017)	22	≥1	dPCR (BEAMing)	ADNtunc (<i>RAS</i>), ≥1%	43,6 vs 19,7, p=0,04
(Grasselli <i>et al</i> , 2017)	56	≥1	dPCR (BEAMing)	ADNtunc (<i>RAS</i>), ≥0,1%	27,8 vs 16,4
(Garlan <i>et al</i> , 2017)	82	≥1	dPCR (Raindance)	ADNtunc (<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>TP53</i> , <i>WIF1</i> , <i>NPY</i>), 0,1 et 10 ng/mL	33,4 vs 36,8 vs 6,8, p<10 ⁻⁴
(El Messaoudi <i>et al</i> , 2016)	97	≥1	qPCR	ADNtotc (<i>KRAS</i>), médiane (26 ng/mL)	28,5 vs 18,1, p=0,009
	43	≥1	PCR SA (Intplex)	ADNtunc (<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i>), médiane (3,1 ng/mL)	31,6 vs 11,3, p=0,009
(Tabernero <i>et al</i> , 2015)	115	≥2	dPCR (BEAMing)	ADNtunc (<i>RAS</i>), tertiles (NR)	6,2 vs 4,6 vs 2,7
	166	≥2	qPCR	ADNtotc (LINE-1), quartiles (NR)	6,4 vs 5,3 vs 4,4 vs 2,4
(Spindler <i>et al</i> , 2014b)	47	≥2	qPCR	ADNtotc (<i>gCYG</i>), médiane (13200 alleles/mL)	7,8 vs 4,7, p=0,02
(Spindler <i>et al</i> , 2014a)	86	2	qPCR	ADNtotc (<i>gCYG</i>), 7100 alleles/mL	13,8 vs 7,4, p<10 ⁻⁴
(Spindler <i>et al</i> , 2013)	55	≥2	PCR SA	ADNtunc (<i>KRAS</i>), médiane (NR)	9,3 vs 3,3, p<0,01
(Spindler <i>et al</i> , 2012)	35	3	PCR SA	ADNtunc (<i>KRAS</i>), quartiles (NR)	9,8 vs 4,7 vs 4,7 vs 2,1, p=0,0008
	86	3	qPCR	ADNtotc (<i>gCYG</i>) quartiles (NR)	14,5 vs 9,4 vs 5,9 vs 3,6, p<10 ⁻⁴

Tableau 4. Impact pronostique de l'ADNc (baseline) chez les patients avec CCRm.

ADNtotc, ADN total circulant, ADNtunc, ADN tumoral circulant, CT, chimiothérapie; dPCR, PCR digitale ; NR, non renseigné ; PCR SA, PCR spécifique d'allèle ; qPCR, PCR quantitative ; SG, survie globale

Une méta-analyse regroupant les résultats de plusieurs de ces études (notamment le travail n°5) a été publiée récemment et conforte le rôle pronostique défavorable associé à la concentration d'ADNtotc (Spindler *et al*, 2017). Un total de 10 cohortes correspondant à 1076 patients avec CCRm était inclus. Il n'y avait pas de différences significatives pour la concentration médiane d'ADNtotc entre les différentes études et la présence d'un niveau bas d'ADNtotc (inférieur à la médiane de chaque étude) était significativement associée à une meilleure SG (HR=2.39, IC 95% 2,03–2,82, $p<0,0001$). Dans le CCR localisé (stade II-III), nous finalisons actuellement une étude sur la valeur pronostique préopératoire de l'ADNc (NCT02556281, Programme Hospitalier de Recherche Clinique 2009/066/HP). Les inclusions sont actuellement terminées (n=293) et les résultats permettront d'évaluer la pertinence de ce biomarqueur dans cette indication (en comparaison des CTC prélevées concomitamment). Cette valeur pronostique de l'ADNc ne semble pas être une spécificité du CCR puisqu'elle a également été décrite dans de nombreux autres types tumoraux et notamment l'AP. Nous montrions ainsi dans le travail n°4 que la présence d'ADNtumc conférait une survie diminuée aux patients avec AP tous stades confondus (5,2 *versus* 11 mois ; $p=0,01$). L'hypothèse sous jacente est que l'ADNc serait le reflet de l'extension néoplasique et le témoin direct de l'agressivité tumorale dans la circulation sanguine. L'évolution de cette dernière entrainerait parallèlement un relargage des fragments d'ADN dans la circulation sanguine. Une méta-analyse a été récemment publiée et comprenait 39 études, 4052 patients avec 10 types de tumeurs solides différentes (Ocaña *et al*, 2016). Un impact pronostic péjoratif était là encore retrouvé en analyse multivariée à la fois pour l'ADNtotc (HRa=1,91, IC 95 % [1,59-2,29], $p<0,001$) et l'ADNtumc (HRa=2,70, IC 95% [2,02-3,61], $p<0,001$). Il n'y avait pas de différences d'impact pronostique entre les types

tumoraux tant pour l'ADNtotc que pour l'ADNtumc. La limite actuelle à l'évaluation pronostique prospective de l'ADNc comme outil décisionnel est l'absence de seuil quantitatif validé ainsi que le manque de standardisation des conditions pré-analytiques et analytiques utilisées.

Le troisième et dernier aspect clinique que nous avons étudié dans ce travail de thèse est le monitoring sous chimiothérapie de la maladie métastatique par l'ADNc. Nous avons étudié ainsi dans le travail n°6, le niveau de variation sous chimiothérapie de l'ADNtotc et ADNtumc en comparaison du niveau de variation d'autres biomarqueurs comme l'ACE, le CA19.9 et les CTC afin de prédire le résultat de l'évaluation scannographique à 3 mois selon les critères RECIST 1.1. Nous montrons qu'une variation entre S0 et S6 de la concentration d'ADNtotc (seuil > - 0,067) ou de sa fraction tumorale (seuil > - 0,73) constituait des facteurs indépendants de progression tumorale (ORa=3,6 ; IC95 %=1,17-11,12 et ORa=4,81 ; IC 95 %=1,39-16,69, respectivement). La cinétique de l'ACE au seuil > 0,05 apparaissait néanmoins encore supérieure aux niveaux de variation d'ADNc pour prédire la progression (OR=16,64 ; IC 95 %=5,89-47,03). D'autres études ont également montré que le niveau de variation d'ADNtumc chez les patients avec CCRm était prédictif du résultat de l'évaluation scannographique à 2-3 mois. Ainsi, Tie et *al.* montraient qu'une réponse objective à la chimiothérapie était plus fréquemment observée en cas de décroissance d'un facteur ≥ 10 de l'ADNtumc entre S0 et S2-3 (14/19 (74 %) versus 8/23 (35 %) en cas de décroissance <10, p=0,016) (Tie et *al.*, 2015). Dans ce travail, le niveau de variation entre S0 et S2-3 de l'ADNtumc apparaissait plus discriminant que celui de l'ACE pour prédire la réponse à la chimiothérapie (ROC AUC $_{\Delta\text{ADNtumc}}$ =0,73, p=0,004 versus ROC AUC $_{\Delta\text{ACE}}$ =0,52, p=0,83). Par la suite, Garlan et *al.* retrouvaient des résultats similaires dans une série

de 73 patients avec CCRm traités en 1^{ère} ou 2^e ligne de chimiothérapie. La présence d'une variation ≥ 80 % d'ADNtunc entre C0 et C1/C2 et/ou une concentration d'ADNtunc $\leq 0,1$ ng/mL à C1 ou C2 permettaient de prédire significativement la réponse objective à la chimiothérapie (41 % *versus* 0 % en l'absence de l'un de ces critères, $p < 0,001$) (Garlan *et al*, 2017). Nous participions à ce travail en procurant une série indépendante de validation (n=35) qui confirmait la pertinence de ce score composite pour discriminer les patients de « bons » et « mauvais » pronostics (SSP médiane de 6,5 *versus* 1,8 mois, $p < 0,05$ et SG médiane de 14,7 *versus* 6,9 mois, $p < 0,02$). L'étude du niveau de variation de l'ADNtunc semble donc constituer une piste intéressante pour le monitoring des patients sous chimiothérapie mais ouvre la voie à de nombreuses questions comme notamment le timing des prélèvements, le choix du seuil et celui du critère de jugement (évaluation de la réponse ou de la progression). L'intérêt de l'ADNtunc dans cette indication devra par ailleurs être évalué par rapport à celui de l'ACE utilisé depuis de nombreuses années en routine. Dans ce contexte, nous avons initié l'étude prospective multicentrique COCAMACS (NCT02872779) qui évalue l'intérêt de l'ADNtotc, de l'ADNtunc et de l'ACE chez les patients débutant une 1^{ère} ligne de chimiothérapie pour un CCRm. Chaque biomarqueur sera prélevé à S0, S2, S4 et S12 et leur résultat sera confronté au résultat de l'évaluation scannographique à 3 mois.

Perspectives et conclusion

La détection non invasive de mutations prédictives d'efficacité ou de résistance au traitement semble être l'application clinique la plus proche d'être utilisée en situation diagnostique de routine. La FDA et l'EMA ont déjà approuvé les tests diagnostiques Cobas® et Therascreen® pour la détection circulante plasmatique des mutations *EGFR* dans l'adenocarcinome pulmonaire. Cette mesure constitue le premier pas de l'implémentation en pratique quotidienne de ce biomarqueur. Dans le CCRm, de nombreuses études de faisabilité ont montré la concordance entre l'analyse tissulaire et plasmatique pour la détermination du statut mutationnel *RAS/BRAF*. L'étude française PANIRINOX (NCT02980510) évalue le taux de réponse complète des patients avec CCRm traités par bi ou trichimiothérapie + anti-EGFR et a franchi le pas de sélectionner les patients éligibles sur la base de leur statut mutationnel circulant *RAS/BRAF*.

Pour le diagnostic de maladie résiduelle, plusieurs études rétrospectives de faible effectif ont montré l'intérêt de monitorer l'ADNtunc en postopératoire pour le diagnostic fiable, sensible et précoce de récurrence après exérèse curative de CCR (Diehl *et al*, 2008a; Reinert *et al*, 2015; Tie *et al*, 2016; Schøler *et al*, 2017). Notre équipe a récemment obtenu le financement du PHRC ASPIK (étude PRODIGE 50, PHRC K15-090) qui évaluera l'intérêt de l'aspirine *versus* placebo en association au traitement adjuvant chez les patients opérés d'un cancer colique de stade III et II à haut risque comportant une mutation du gène *PIK3CA* (soit un screening de plus de 2000 patients pour inclure les 264 patients attendus dans l'étude). Nous avons déposé une demande de financement pour la réalisation de l'étude ancillaire CLASSIC qui consistera à évaluer pour les 1000 premiers patients screenés la valeur prédictive négative de l'absence de détection d'ADNtunc pour le diagnostic de

récidive. Ce monitoring par l'ADNtunc sera réalisé tous les 6 mois pendant 3 ans et confronté aux données du suivi standard postopératoire (ACE et imagerie).

Enfin, de nombreuses questions restent encore en suspens notamment dans la compréhension physiopathologique du relargage d'ADNc. En effet, l'explication exacte de ce relargage reste pour l'instant non résolue de même que la question d'un relargage différentiel entre les différents sites tumoraux (primitifs ou métastatiques). Concernant cette dernière question, plusieurs éléments de réponse pourront être apportés par l'étude autopsique de modèles humains (ou animaux) telle que proposée dans l'étude CASCADE (Cancer Tissue Collection After Death) qui permet l'accès aux tissus tumoraux de patients avec un cancer en phase terminale (Alsop *et al*, 2016). D'autres questions subsistent comme : existe-t-il un rythme circadien de libération d'ADNc et si oui, quels sont les facteurs physiologiques intervenant dans cette libération ? Comment évolue la cinétique de relargage d'ADNc après l'administration d'un traitement (chimiothérapie, radiothérapie) ? Par quels moyens ce relargage doit-il être appréhendé (ADNtunc, ADNtotc, intégrité) ?

En conclusion, l'ADNtunc se positionne comme un biomarqueur susceptible d'être utilisé à chaque étape du parcours de soins en oncologie. La conception de plusieurs études prospectives interventionnelles l'utilisant comme outil décisionnel de même que son intégration aux études ancillaires de nombreux essais thérapeutiques rendent compte de l'intérêt de la communauté scientifique à son égard. Plusieurs colloques spécifiques dédiés ont par ailleurs vu le jour dont le symposium international circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS). Ces études et manifestations scientifiques sont fondamentales pour améliorer les connaissances sur l'ADNtunc de même que pour avancer sur la standardisation des conditions préanalytiques et analytiques dévolues à ce biomarqueur.

Bibliographie

Alberly M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW (2007) Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* **27**: 415–418.

Allenson K, Castillo J, San Lucas FA, Scelo G, Kim DU, Bernard V, Davis G, Kumar T, Katz M, Overman MJ, Foretova L, Fabianova E, Holcatova I, Janout V, Meric-Bernstam F, Gascoyne P, Wistuba I, Varadhachary G, Brennan P, Hanash S, Li D, Maitra A, Alvarez H (2017) High prevalence of mutant KRAS in circulating exosome-derived DNA from early-stage pancreatic cancer patients. *Ann Oncol* **28**: 741–747.

Alsop K, Thorne H, Sandhu S, Hamilton A, Mintoff C, Christie E, Spruyt O, Williams S, McNally O, Mileskin L, Ananda S, Hallo J, Loi S, Scott C, Savas P, Devereux L, O'Brien P, Gunawardena S, Hampson C, Strachan K, Jaravaza RD, Francis V, Young G, Ranson D, Samaranyake R, Stevens D, Boyle S, Fedele C, Topp M, Ho G, Teo ZL, Taylor RA, Papargiris MM, Lawrence MG, Wang H, Risbridger GP, Haynes NM, Medon M, Johnstone RW, Vidacs E, Arnau GM, Vergara IA, Papenfuss AT, McArthur G, Waring P, Carvosso S, Angel C, Gyorki D, Solomon B, Mitchell G, Shanley S, Francis PA, Dawson S-J, Haffenden A, Tidball E, Volchek M, Pyman J, Madadin M, Leditschke J, Cordner S, Melbourne Melanoma Project, Australian Ovarian Cancer Study Group (AOCS), Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer (kConFab), Shackleton M, Bowtell DD (2016) A community-based model of rapid autopsy in end-stage cancer patients. *Nat Biotechnol* **34**: 1010–1014.

Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 1626–1634.

Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B (2000) Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* **46**: 301–302.

Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, Bach JF, Koutouzov S (1997) Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum* **40**: 2217–2225.

Andersen RF, Spindler K-LG, Brandslund I, Jakobsen A, Pallisgaard N (2015) Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. *Clin Chim Acta* **439**: 97–101.

Andersson D, Akrap N, Svec D, Godfrey TE, Kubista M, Landberg G, Ståhlberg A (2015) Properties of targeted preamplification in DNA and cDNA quantification. *Expert Rev Mol Diagn* **15**: 1085–1100.

Angert RM, LeShane ES, Lo YMD, Chan LYS, Delli-Bovi LC, Bianchi DW (2003) Fetal cell-free plasma DNA concentrations in maternal blood are stable 24 hours after collection: analysis of first- and third-trimester samples. *Clin Chem* **49**: 195–198.

Anker P, Jachertz D, Maurice PA, Stroun M (1984) Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochem Funct* **2**: 33–37.

Anker P, Jachertz D, Stroun M, Brögger R, Lederrey C, Henri J, Maurice PA (1980) The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J Immunogenet* **7**: 475–481.

Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M (1994) [Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]. *C R Acad Sci III, Sci Vie* **317**: 869–874.

Aparicio S, Caldas C (2013) The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. *N Engl J Med* **368**: 842–851.

Arena S, Bellosillo B, Siravegna G, Martínez A, Cañadas I, Lazzari L, Ferruz N, Russo M, Misale S, González I, Iglesias M, Gavilan E, Corti G, Hobor S, Crisafulli G, Salido M, Sánchez J, Dalmases A, Bellmunt J, De Fabritiis G, Rovira A, Di Nicolantonio F, Albanell J, Bardelli A, Montagut C (2015) Emergence of Multiple EGFR Extracellular Mutations during Cetuximab Treatment in Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **21**: 2157–2166.

Avery OT, Macleod CM, McCarty M (1944) STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES: INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med* **79**: 137–158.

Bagul A, Pushpakom S, Boylan J, Newman W, Siriwardena AK (2006) Quantitative analysis of plasma DNA in severe acute pancreatitis. *JOP* **7**: 602–607.

Balak MN, Gong Y, Riely GJ, Somwar R, Li AR, Zakowski MF, Chiang A, Yang G, Ouerfelli O, Kris MG, Ladanyi M, Miller VA, Pao W (2006) Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res* **12**: 6494–6501.

Barada FA, Suratt PM, Davis JS, Sipes JN, Castle CA, Taylor RP, Godfrey SM (1980) Free plasma DNA in patients with pulmonary embolism. *South Med J* **73**: 345–346, 350.

Barra GB, Santa Rita TH, Vasques J de A, Chianca CF, Nery LFA, Costa SSS (2015) EDTA-mediated inhibition of DNases protects circulating cell-free DNA from ex vivo degradation in blood samples. *Clin Biochem* **48**: 976–981.

Barrett AN, McDonnell TCR, Chan KCA, Chitty LS (2012) Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem* **58**: 1026–1032.

Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS (2011) Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS ONE* **6**: e25202.

Beck J, Bierau S, Balzer S, Andag R, Kanzow P, Schmitz J, Gaedcke J, Moerer O, Slotta JE, Walson P, Kollmar O, Oellerich M, Schütz E (2013) Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin Chem* **59**: 1732–1741.

Beck J, Urnovitz HB, Saresella M, Caputo D, Clerici M, Mitchell WM, Schütz E (2010) Serum DNA motifs predict disease and clinical status in multiple sclerosis. *J Mol Diagn* **12**: 312–319.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong S-M, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SKN, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih le-M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang T-L, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* **6**: 224ra24.

Beutler E, Gelbart T, Kuhl W (1990) Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques* **9**: 166.

Bianchi DW, Parker RL, Wentworth J, Madankumar R, Saffer C, Das AF, Craig JA, Chudova DI, Devers PL, Jones KW, Oliver K, Rava RP, Sehnert AJ, CARE Study Group (2014) DNA sequencing versus standard prenatal aneuploidy screening. *N Engl J Med* **370**: 799–808.

Bianchi DW, Platt LD, Goldberg JD, Abuhamad AZ, Sehnert AJ, Rava RP, Maternal Blood IS Source to Accurately diagnose fetal aneuploidy (MELISSA) Study Group (2012) Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol* **119**: 890–901.

Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL (2005) Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* **11**: 59–67.

Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, Bunnapradist S, Langone AJ, Sood P, Matas AJ, Mehta S, Mannon RB, Sharfuddin A, Fischbach B, Narayanan M, Jordan SC, Cohen D, Weir MR, Hiller D, Prasad P, Woodward RN, Grskovic M, Sninsky JJ, Yee JP, Brennan DC, Circulating Donor-Derived Cell-Free DNA in Blood for Diagnosing Active Rejection in Kidney Transplant Recipients (DART) Study Investigators (2017) Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J Am Soc Nephrol* **28**: 2221–2232.

Board RE, Wardley AM, Dixon JM, Armstrong AC, Howell S, Renshaw L, Donald E, Greystoke A, Ranson M, Hughes A, Dive C (2010) Detection of PIK3CA mutations in circulating free DNA in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **120**: 461–467.

Board RE, Williams VS, Knight L, Shaw J, Greystoke A, Ranson M, Dive C, Blackhall FH, Hughes A (2008) Isolation and extraction of circulating tumor DNA from patients with small cell lung cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 98–107.

- Bodurtha J, Strauss JF (2012) Genomics and perinatal care. *N Engl J Med* **366**: 64–73.
- Brannon AR, Reddy A, Seiler M, Arreola A, Moore DT, Pruthi RS, Wallen EM, Nielsen ME, Liu H, Nathanson KL, Ljungberg B, Zhao H, Brooks JD, Ganesan S, Bhanot G, Rathmell WK (2010) Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes Cancer* **1**: 152–163.
- Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, Gori T, Ehlert T, Beiter T, Simon P (2014) Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS ONE* **9**: e87838.
- Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ (2015) Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin Chim Acta* **450**: 243–253.
- de Bruin EC, McGranahan N, Mitter R, Salm M, Wedge DC, Yates L, Jamal-Hanjani M, Shafi S, Murugaesu N, Rowan AJ, Grönroos E, Muhammad MA, Horswell S, Gerlinger M, Varela I, Jones D, Marshall J, Voet T, Van Loo P, Rasmussen DM, Rintoul RC, Janes SM, Lee S-M, Forster M, Ahmad T, Lawrence D, Falzon M, Capitanio A, Harkins TT, Lee CC, Tom W, Teefe E, Chen S-C, Begum S, Rabinowitz A, Phillimore B, Spencer-Dene B, Stamp G, Szallasi Z, Matthews N, Stewart A, Campbell P, Swanton C (2014) Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science* **346**: 251–256.
- Brychta N, Krahn T, von Ahsen O (2016) Detection of KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Digital PCR in Early Stages of Pancreatic Cancer. *Clin Chem* **62**: 1482–1491.
- Buchan BW, Ledebor NA (2014) Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* **27**: 783–822.
- Burrows JF, Chanduloy S, McIlhatton MA, Nagar H, Yeates K, Donaghy P, Price J, Godwin AK, Johnston PG, Russell SEH (2003) Altered expression of the septin gene, SEPT9, in ovarian neoplasia. *J Pathol* **201**: 581–588.
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, Morsberger LA, Latimer C, McLaren S, Lin M-L, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal SA, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Griffin CA, Burton J, Swerdlow H, Quail MA, Stratton MR, Iacobuzio-Donahue C, Futreal PA (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature* **467**: 1109–1113.
- Carreira S, Romanel A, Goodall J, Grist E, Ferraldeschi R, Miranda S, Prandi D, Lorente D, Frenel J-S, Pezaro C, Omlin A, Rodrigues DN, Flohr P, Tunariu N, S de Bono J, Demichelis F, Attard G (2014) Tumor clone dynamics in lethal prostate cancer. *Sci Transl Med* **6**: 254ra125.
- Castellanos-Rizaldos E, Paweletz C, Song C, Oxnard GR, Mamon H, Jänne PA, Makrigiorgos GM (2015) Enhanced ratio of signals enables digital mutation scanning for rare allele detection. *J Mol Diagn* **17**: 284–292.
- Chan KCA, Jiang P, Zheng YWL, Liao GJW, Sun H, Wong J, Siu SSN, Chan WC, Chan SL, Chan ATC, Lai PBS, Chiu RWK, Lo YMD (2013) Cancer Genome Scanning in Plasma: Detection of Tumor-Associated Copy Number Aberrations, Single-Nucleotide Variants,

and Tumoral Heterogeneity by Massively Parallel Sequencing. *Clinical Chemistry* **59**: 211–224.

Chan KCA, Leung SF, Yeung SW, Chan ATC, Lo YMD (2008) Quantitative analysis of the transrenal excretion of circulating EBV DNA in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **14**: 4809–4813.

Chan KCA, Yeung S-W, Lui W-B, Rainer TH, Lo YMD (2005) Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem* **51**: 781–784.

Chan KCA, Zhang J, Hui ABY, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo K-W, Huang DWS, Lo YMD (2004) Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* **50**: 88–92.

Chen XQ, Stroun M, Magnenat JL, Nicod LP, Kurt AM, Lyautey J, Lederrey C, Anker P (1996) Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients. *Nat Med* **2**: 1033–1035.

Cheng H, Liu C, Jiang J, Luo G, Lu Y, Jin K, Guo M, Zhang Z, Xu J, Liu L, Ni Q, Yu X (2017) Analysis of ctDNA to predict prognosis and monitor treatment responses in metastatic pancreatic cancer patients. *Int J Cancer* **140**: 2344–2350.

Cherepanova AV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP (2008) Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 218–221.

Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM (2001) Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem* **47**: 1607–1613.

Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, Lun FMF, Go ATJI, Lau ET, To WWK, Leung WC, Tang RYK, Au-Yeung SKC, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JMG, Minekawa R, Tang MHY, Wang J, Oudejans CBM, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YMD (2011) Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* **342**: c7401.

Chiu RWK, Chan KCA, Gao Y, Lau VYM, Zheng W, Leung TY, Foo CHF, Xie B, Tsui NBY, Lun FMF, Zee BCY, Lau TK, Cantor CR, Lo YMD (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 20458–20463.

Choi H, Charnsangavej C, Faria SC, Macapinlac HA, Burgess MA, Patel SR, Chen LL, Podoloff DA, Benjamin RS (2007) Correlation of computed tomography and positron emission tomography in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor treated at a single institution with imatinib mesylate: proposal of new computed tomography response criteria. *J Clin Oncol* **25**: 1753–1759.

Choi J-J, Reich CF, Pisetsky DS (2005) The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology* **115**: 55–62.

Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, Castaños-Vélez E, Blumenstein BA, Rösch T, Osborn N, Snover D, Day RW, Ransohoff DF, PRESEPT Clinical Study Steering Committee, Investigators and Study Team (2014) Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut* **63**: 317–325.

Clausen FB, Krog GR, Rieneck K, Dziegiel MH (2007) Improvement in fetal DNA extraction from maternal plasma. Evaluation of the NucliSens Magnetic Extraction system and the QIAamp DSP Virus Kit in comparison with the QIAamp DNA Blood Mini Kit. *Prenat Diagn* **27**: 6–10.

Cohen JD, Javed AA, Thoburn C, Wong F, Tie J, Gibbs P, Schmidt CM, Yip-Schneider MT, Allen PJ, Schattner M, Brand RE, Singhi AD, Petersen GM, Hong S-M, Kim SC, Falconi M, Doglioni C, Weiss MJ, Ahuja N, He J, Makary MA, Maitra A, Hanash SM, Dal Molin M, Wang Y, Li L, Ptak J, Dobbyn L, Schaefer J, Silliman N, Popoli M, Goggins MG, Hruban RH, Wolfgang CL, Klein AP, Tomasetti C, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Lennon AM (2017) Combined circulating tumor DNA and protein biomarker-based liquid biopsy for the earlier detection of pancreatic cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**: 10202–10207.

Connolly D, Yang Z, Castaldi M, Simmons N, Oktay MH, Coniglio S, Fazzari MJ, Verdier-Pinard P, Montagna C (2011) Septin 9 isoform expression, localization and epigenetic changes during human and mouse breast cancer progression. *Breast Cancer Res* **13**: R76.

Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, Mohacsi P, Schulz U, Boyle A, Ross HJ, Parameshwar J, Zakliczyński M, Fiocchi R, Stypmann J, Hoefer D, Lehmkuhl H, Deng MC, Leprince P, Berry G, Marboe CC, Stewart S, Tazelaar HD, Baron HM, Coleman I-C, Vanhaecke J (2012) Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation* **94**: 1172–1177.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A (2013) Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* **10**: 472–484.

Cui M, Fan M, Jing R, Wang H, Qin J, Sheng H, Wang Y, Wu X, Zhang L, Zhu J, Ju S (2013) Cell-Free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology* **124**: 76–84.

Da Cunha Santos G, Saieg MA (2015) Preanalytic parameters in epidermal growth factor receptor mutation testing for non-small cell lung carcinoma: A review of cytologic series. *Cancer Cytopathol* **123**: 633–643.

Das K, Fernando MR, Basiaga S, Wigginton SM, Williams T (2014) Effects of a novel cell stabilizing reagent on DNA amplification by PCR as compared to traditional stabilizing reagents. *Acta Histochem* **116**: 55–60.

Davis GL, Davis JS (1973) Detection of circulating DNA by counter immunoelectrophoresis (CIE). *Arthritis Rheum* **16**: 52–58.

Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, Dunning MJ, Gale D, Forsheew T, Mahler-Araujo B, Rajan S, Humphray S, Becq J, Halsall D, Wallis M, Bentley D,

Caldas C, Rosenfeld N (2013) Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **368**: 1199–1209.

De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martínez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, Arias A, Raventos C, Tang J, Guerini-Rocco E, Martínez-Sáez E, Lois S, Marín O, de la Cruz X, Piscuoglio S, Towers R, Vivancos A, Peg V, Ramon y Cajal S, Carles J, Rodon J, González-Cao M, Tabernero J, Felip E, Sahuquillo J, Berger MF, Cortes J, Reis-Filho JS, Seoane J (2015) Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nat Commun* **6**: 8839.

De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, Snyder TM, Cornfield DN, Nicolls MR, Weill D, Bernstein D, Valantine HA, Quake SR (2013) Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell* **155**: 1178–1187.

De Vlaminc I, Martin L, Kertesz M, Patel K, Kowarsky M, Strehl C, Cohen G, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, Nicolls MR, Cornfield D, Weill D, Valantine H, Khush KK, Quake SR (2015) Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 13336–13341.

De Vlaminc I, Valantine HA, Snyder TM, Strehl C, Cohen G, Luikart H, Neff NF, Okamoto J, Bernstein D, Weisshaar D, Quake SR, Khush KK (2014) Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* **6**: 241ra77.

Debrand E, Lykoudi A, Bradshaw E, Allen SK (2015) A Non-Invasive Droplet Digital PCR (ddPCR) Assay to Detect Paternal CFTR Mutations in the Cell-Free Fetal DNA (cffDNA) of Three Pregnancies at Risk of Cystic Fibrosis via Compound Heterozygosity. *PLoS ONE* **10**: e0142729.

Del Re M, Vivaldi C, Rofi E, Vasile E, Miccoli M, Caparello C, d'Arienzo PD, Fornaro L, Falcone A, Danesi R (2017) Early changes in plasma DNA levels of mutant KRAS as a sensitive marker of response to chemotherapy in pancreatic cancer. *Sci Rep* **7**: 7931.

Deligezer U, Eralp Y, Akisik EZ, Akisik EE, Saip P, Topuz E, Dalay N (2008) Effect of adjuvant chemotherapy on integrity of free serum DNA in patients with breast cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 175–179.

Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S, CARGO Investigators (2006) Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* **6**: 150–160.

Destouni A, Vrettou C, Antonatos D, Chouliaras G, Traeger-Synodinos J, Patsilnakos S, Kitsiou-Tzeli S, Tsigas D, Kanavakis E (2009) Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiol* **64**: 51–57.

Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW (2011) Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* **306**: 627–636.

Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, Huggett JF (2014) Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem* **406**: 6499–6512.

deVos T, Tetzner R, Model F, Weiss G, Schuster M, Distler J, Steiger KV, Grützmann R, Pilarsky C, Habermann JK, Fleshner PR, Oubre BM, Day R, Sledziewski AZ, Lofton-Day C (2009) Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clin Chem* **55**: 1337–1346.

DeWitt J, Jowell P, Leblanc J, McHenry L, McGreevy K, Cramer H, Volmar K, Sherman S, Gress F (2005) EUS-guided FNA of pancreatic metastases: a multicenter experience. *Gastrointest Endosc* **61**: 689–696.

Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, Bastit L, Killian A, Sesboüé R, Tuech JJ, Queuniet AM, Paillot B, Sabourin JC, Michot F, Michel P, Frebourg T (2007) Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer* **96**: 1166–1169.

Di Fiore F, Charbonnier F, Lefebure B, Laurent M, Le Pessot F, Michel P, Frebourg T (2008) Clinical interest of KRAS mutation detection in blood for anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* **99**: 551–552.

Diaz LA, Bardelli A (2014) Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* **32**: 579–586.

Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 16368–16373.

Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA Jr (2008a) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* **14**: 985–990.

Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW, Vogelstein B (2008b) Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* **135**: 489–498.

Dingle TC, Sedlak RH, Cook L, Jerome KR (2013) Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances. *Clin Chem* **59**: 1670–1672.

Distler J, Tetzner R, Weiss G, König T, Schlegel A, Bagrowski M (2016) Evaluation of Different Blood Collection Tubes and Blood Storage Conditions for the Preservation and Stability of Cell-Free Circulating DNA for the Analysis of the Methylated (m)SEPT9 Colorectal Cancer Screening Marker. *Adv Exp Med Biol* **924**: 175–178.

Dominguez PL, Kolodney MS (2005) Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens. *Oncogene* **24**: 6830–6834.

Douillard J-Y, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocákova I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wierzorek J, Sidhu R, Patterson SD (2013) Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med* **369**: 1023–1034.

Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, Walker J, Dearden S, Webster A, Milenkova T, McCormack R (2014a) Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol* **9**: 1345–1353.

Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, McCormack R, Webster A, Milenkova T (2014b) First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* **110**: 55–62.

Du J, Zou X, Pan Y, Li S-F, Lu G-X (2010) Non-invasive prenatal molecular detection of a fetal point mutation for congenital adrenal hyperplasia using co-amplification at lower denaturation temperature PCR. *Chin Med J* **123**: 3343–3346.

Dutton C, Sommer SS (1991) Simultaneous detection of multiple single-base alleles at a polymorphic site. *BioTechniques* **11**: 700–702.

Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw K-L, Weitz JI, Cook DJ, Fox-Robichaud AE, Liaw PC, Canadian Critical Care Translational Biology Group (2012) Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* **16**: R151.

Earl J, Garcia-Nieto S, Martinez-Avila JC, Montans J, Sanjuanbenito A, Rodríguez-Garrote M, Lisa E, Mendía E, Lobo E, Malats N, Carrato A, Guillen-Ponce C (2015) Circulating tumor cells (Ctc) and kras mutant circulating free Dna (cfDNA) detection in peripheral blood as biomarkers in patients diagnosed with exocrine pancreatic cancer. *BMC Cancer* **15**: 797.

Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J (2009) New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **45**: 228–247.

El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, Fiess C, Crapez E, Bibeau F, Theillet C, Mazard T, Pezet D, Mathonnet M, Ychou M, Thierry AR (2016) Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res* **22**: 3067–3077.

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta* **424**: 222–230.

Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, Müller SC, Ruecker A von (2008) Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity. *Cancer Lett* **264**: 274–280.

Faivre J, Dancourt V, Denis B, Dorval E, Piette C, Perrin P, Bidan JM, Jard C, Jung S, Levillain R, Viguier J, Bretagne JF (2012a) Comparison between a guaiac and three

immunochemical faecal occult blood tests in screening for colorectal cancer. *Eur J Cancer* **48**: 2969–2976.

Faivre J, Dancourt V, Lejeune C (2012b) Screening for colorectal cancer with immunochemical faecal occult blood tests. *Dig Liver Dis* **44**: 967–973.

Faivre J, Dancourt V, Lejeune C, Tazi MA, Lamour J, Gerard D, Dassonville F, Bonithon-Kopp C (2004) Reduction in colorectal cancer mortality by fecal occult blood screening in a French controlled study. *Gastroenterology* **126**: 1674–1680.

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR (2008) Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 16266–16271.

Finning KM, Chitty LS (2008) Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Semin Fetal Neonatal Med* **13**: 69–75.

Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DMI, Leszinski GS, Siegele B, Stötzer OJ, Nagel D, Holdenrieder S (2011) Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. *Clin Chim Acta* **412**: 2085–2088.

Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y (2009) Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clin Chem* **55**: 587–589.

Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole CG, Ward S, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok CY, Jia M, Jubb H, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell PJ (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res* **45**: D777–D783.

Forshef T, Murtaza M, Parkinson C, Gale D, Tsui DWY, Kaper F, Dawson S-J, Piskorz AM, Jimenez-Linan M, Bentley D, Hadfield J, May AP, Caldas C, Brenton JD, Rosenfeld N (2012) Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci Transl Med* **4**: 136ra68.

Gadi VK, Nelson JL, Boespflug ND, Guthrie KA, Kuhr CS (2006) Soluble donor DNA concentrations in recipient serum correlate with pancreas-kidney rejection. *Clin Chem* **52**: 379–382.

Gaffney DJ, McVicker G, Pai AA, Fondufe-Mittendorf YN, Lewellen N, Michelini K, Widom J, Gilad Y, Pritchard JK (2012) Controls of nucleosome positioning in the human genome. *PLoS Genet* **8**: e1003036.

Galbiati S, Brisci A, Lalatta F, Seia M, Makrigiorgos GM, Ferrari M, Cremonesi L (2011) Full COLD-PCR protocol for noninvasive prenatal diagnosis of genetic diseases. *Clin Chem* **57**: 136–138.

Galbiati S, Monguzzi A, Damin F, Soriani N, Passiu M, Castellani C, Natacci F, Curcio C, Seia M, Lalatta F, Chiari M, Ferrari M, Cremonesi L (2016) COLD-PCR and microarray: two independent highly sensitive approaches allowing the identification of fetal paternally inherited mutations in maternal plasma. *J Med Genet* **53**: 481–487.

Galbiati S, Stenirri S, Sbaiz L, Barberis M, Cremonesi L, Restagno G, Ferrari M (2014) Identification of an 18 bp deletion in the TWIST1 gene by CO-amplification at lower denaturation temperature-PCR (COLD-PCR) for non-invasive prenatal diagnosis of craniosynostosis: first case report. *Clin Chem Lab Med* **52**: 505–509.

García Moreira V, Prieto García B, Baltar Martín JM, Ortega Suárez F, Alvarez FV (2009) Cell-free DNA as a noninvasive acute rejection marker in renal transplantation. *Clin Chem* **55**: 1958–1966.

García-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, Cheang M, Osin P, Nerurkar A, Kozarewa I, Garrido JA, Dowsett M, Reis-Filho JS, Smith IE, Turner NC (2015) Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* **7**: 302ra133.

García-Olmo D, García-Olmo DC, Domínguez-Berzosa C, Guadalajara H, Vega L, García-Arranz M (2012) Oncogenic transformation induced by cell-free nucleic acids circulating in plasma (genometastasis) remains after the surgical resection of the primary tumor: a pilot study. *Expert Opin Biol Ther* **12 Suppl 1**: S61-68.

García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E (2000) Horizontal transfer of DNA and the 'genometastasis hypothesis'. *Blood* **95**: 724–725.

García-Olmo D, García-Olmo DC, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M (1999) Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol* **14**: 1159–1164.

García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, García-Olmo D (2010) Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res* **70**: 560–567.

Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, Michel P, Perkins G, Mulot C, Blons H, Taieb J, Di Fiore F, Taly V, Zaanani A (2017) Early Evaluation of Circulating Tumor DNA as Marker of Therapeutic Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Patients (PLACOL Study). *Clin Cancer Res* **23**: 5416–5425.

Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med* **371**: 2477–2487.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA, Swanton C (2012) Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* **366**: 883–892.

- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GD (1998) Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas* **17**: 89–97.
- Gil MM, Quezada MS, Bregant B, Ferraro M, Nicolaidis KH (2013) Implementation of maternal blood cell-free DNA testing in early screening for aneuploidies. *Ultrasound Obstet Gynecol* **42**: 34–40.
- González-González MC, Trujillo MJ, Rodríguez de Alba M, García-Hoyos M, Lorda-Sánchez I, Díaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C (2003) Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR. *Prenat Diagn* **23**: 232–234.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* **17**: 333–351.
- Gornik I, Wagner J, Gasparović V, Lauc G, Gornik O (2009) Free serum DNA is an early predictor of severity in acute pancreatitis. *Clin Biochem* **42**: 38–43.
- Gornik I, Wagner J, Gašparović V, Miličić D, Degoricija V, Skorić B, Gornik O, Lauc G (2014) Prognostic value of cell-free DNA in plasma of out-of-hospital cardiac arrest survivors at ICU admission and 24h post-admission. *Resuscitation* **85**: 233–237.
- Gornik O, Gornik I, Wagner J, Radić D, Lauc G (2011) Evaluation of cell-free DNA in plasma and serum as early predictors of severity in acute pancreatitis. *Pancreas* **40**: 787–788.
- Grasselli J, Elez E, Caratù G, Matito J, Santos C, Macarulla T, Vidal J, Garcia M, Viéitez JM, Paéz D, Falcó E, Lopez Lopez C, Aranda E, Jones F, Sikri V, Nuciforo P, Fasani R, Tabernero J, Montagut C, Azuara D, Dienstmann R, Salazar R, Vivancos A (2017) Concordance of blood- and tumor-based detection of RAS mutations to guide anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* **28**: 1294–1301.
- Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, Tembe V, Freeman J, Lee JHJ, Scolyer RA, Siew K, Lomma C, Cooper A, Khattak MA, Meniawy TM, Long GV, Carlino MS, Millward M, Ziman M (2015) Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* **6**: 42008–42018.
- Greaves M, Maley CC (2012) Clonal evolution in cancer. *Nature* **481**: 306–313.
- Grützmann R, Molnar B, Pilarsky C, Habermann JK, Schlag PM, Saeger HD, Miehle S, Stolz T, Model F, Roblick UJ, Bruch H-P, Koch R, Liebenberg V, Devos T, Song X, Day RH, Sledziewski AZ, Lofton-Day C (2008) Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay. *PLoS ONE* **3**: e3759.
- Guibert N, Mazieres J, Delaunay M, Casanova A, Farella M, Keller L, Favre G, Pradines A (2017) Monitoring of KRAS-mutated ctDNA to discriminate pseudo-progression from true progression during anti-PD-1 treatment of lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **8**: 38056–38060.

Guttery DS, Page K, Hills A, Woodley L, Marchese SD, Rghebi B, Hastings RK, Luo J, Pringle JH, Stebbing J, Coombes RC, Ali S, Shaw JA (2015) Noninvasive detection of activating estrogen receptor 1 (ESR1) mutations in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Clin Chem* **61**: 974–982.

Hadano N, Murakami Y, Uemura K, Hashimoto Y, Kondo N, Nakagawa N, Sueda T, Hiyama E (2016) Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *Br J Cancer* **115**: 59–65.

Haffner MC, Mosbrugger T, Esopi DM, Fedor H, Heaphy CM, Walker DA, Adejola N, Gürel M, Hicks J, Meeker AK, Halushka MK, Simons JW, Isaacs WB, De Marzo AM, Nelson WG, Yegnasubramanian S (2013) Tracking the clonal origin of lethal prostate cancer. *J Clin Invest* **123**: 4918–4922.

Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, James PD, Mangham CM (1996) Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* **348**: 1472–1477.

Harding C, Heuser J, Stahl P (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* **97**: 329–339.

Hashida S, Soh J, Toyooka S, Tanaka T, Furukawa M, Shien K, Yamamoto H, Asano H, Tsukuda K, Hagiwara K, Miyoshi S (2014) Presence of the minor EGFR T790M mutation is associated with drug-sensitive EGFR mutations in lung adenocarcinoma patients. *Oncol Rep* **32**: 145–152.

Hata A, Katakami N, Fujita S, Takatori K, Horai A, Kitajima N, Terashima K (2013) Panitumumab rechallenge in chemorefractory patients with metastatic colorectal cancer. *J Gastrointest Cancer* **44**: 456–459.

Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P, Lax S, Waldispuehl-Geigl J, Mauermann O, Mohan S, Pristauz G, Lackner C, Höfler G, Eisner F, Petru E, Sill H, Samonigg H, Pantel K, Riethdorf S, Bauernhofer T, Geigl JB, Speicher MR (2013) Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* **133**: 346–356.

Henao Diaz E, Yachnin J, Grönberg H, Lindberg J (2016) The In Vitro Stability of Circulating Tumour DNA. *PLoS ONE* **11**: e0168153.

Heppner GH, Miller BE (1983) Tumor heterogeneity: biological implications and therapeutic consequences. *Cancer Metastasis Rev* **2**: 5–23.

Herbst A, Vdovin N, Gacesa S, Philipp A, Nagel D, Holdt LM, Op den Winkel M, Heinemann V, Stieber P, Graeven U, Reinacher-Schick A, Arnold D, Ricard I, Mansmann U, Hegewisch-Becker S, Kolligs FT (2017) Methylated free-circulating HPP1 DNA is an early response marker in patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Cancer* **140**: 2134–2144.

Hlinkova K, Babal P, Berzinec P, Majer I, Mikle-Barathova Z, Piackova B, Ilencikova D (2013) Evaluation of 2-year experience with EGFR mutation analysis of small diagnostic samples. *Diagn Mol Pathol* **22**: 70–75.

Hol L, van Leerdam ME, van Ballegooijen M, van Vuuren AJ, van Dekken H, Reijerink JCIY, van der Toegt ACM, Habbema JDF, Kuipers EJ (2010) Screening for colorectal cancer: randomised trial comparing guaiac-based and immunochemical faecal occult blood testing and flexible sigmoidoscopy. *Gut* **59**: 62–68.

Holdenrieder S, Nagel D, Schalhorn A, Heinemann V, Wilkowski R, von Pawel J, Raith H, Feldmann K, Kremer AE, Müller S, Geiger S, Hamann GF, Seidel D, Stieber P (2008) Clinical relevance of circulating nucleosomes in cancer. *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 180–189.

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D (2001) Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer* **95**: 114–120.

Holdenrieder S, Stieber P, Chan LYS, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YMD (2005) Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem* **51**: 1544–1546.

Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D (2004) Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 5981–5987.

Holdenrieder S, Von Pawel J, Nagel D, Stieber P (2010) Long-term stability of circulating nucleosomes in serum. *Anticancer Res* **30**: 1613–1615.

Horwitz PA, Tsai EJ, Putt ME, Gilmore JM, Lepore JJ, Parmacek MS, Kao AC, Desai SS, Goldberg LR, Brozena SC, Jessup ML, Epstein JA, Cappola TP (2004) Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. *Circulation* **110**: 3815–3821.

Hoshino T, Inagaki F (2012) Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Syst Appl Microbiol* **35**: 390–395.

How Kit A, Mazaleyrat N, Daunay A, Nielsen HM, Terris B, Tost J (2013) Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification. *Hum Mutat* **34**: 1568–1580.

How-Kit A, Lebbé C, Bousard A, Daunay A, Mazaleyrat N, Daviaud C, Mourah S, Tost J (2014) Ultrasensitive detection and identification of BRAF V600 mutations in fresh frozen, FFPE, and plasma samples of melanoma patients by E-ice-COLD-PCR. *Anal Bioanal Chem* **406**: 5513–5520.

How-Kit A, Tost J (2015) Pyrosequencing®-Based Identification of Low-Frequency Mutations Enriched Through Enhanced-ice-COLD-PCR. *Methods Mol Biol* **1315**: 83–101.

Hu G, Schones DE, Cui K, Ybarra R, Northrup D, Tang Q, Gattinoni L, Restifo NP, Huang S, Zhao K (2011) Regulation of nucleosome landscape and transcription factor targeting at tissue-specific enhancers by BRG1. *Genome Res* **21**: 1650–1658.

Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME, Colorectal Cancer Study Group (2004) Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* **351**: 2704–2714.

International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**: 931–945.

Iwanicki-Caron I, Basile P, Toure E, Antonietti M, Lecleire S, Di Fiore A, Oden-Gangloff A, Blanchard F, Lemoine F, Di Fiore F, Sabourin JC, Michel P (2013) Usefulness of circulating tumor cell detection in pancreatic adenocarcinoma diagnosis. *Am J Gastroenterol* **108**: 152–155.

Iwanicki-Caron I, Di Fiore F, Roque I, Astruc E, Stetiu M, Duclos A, Tougeron D, Saillard S, Thureau S, Benichou J, Paillot B, Basuyau JP, Michel P (2008) Usefulness of the serum carcinoembryonic antigen kinetic for chemotherapy monitoring in patients with unresectable metastasis of colorectal cancer. *J Clin Oncol* **26**: 3681–3686.

Jackson JB, Choi DS, Luketich JD, Pennathur A, Ståhlberg A, Godfrey TE (2016) Multiplex Preamplification of Serum DNA to Facilitate Reliable Detection of Extremely Rare Cancer Mutations in Circulating DNA by Digital PCR. *J Mol Diagn* **18**: 235–243.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res* **61**: 1659–1665.

Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberger D, Altshuler D, Ebert BL (2014) Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med* **371**: 2488–2498.

Jamal-Hanjani M, Quezada SA, Larkin J, Swanton C (2015) Translational implications of tumor heterogeneity. *Clin Cancer Res* **21**: 1258–1266.

Jeffery M, Hickey BE, Hider PN (2007) Follow-up strategies for patients treated for non-metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* CD002200.

Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Perez-Fidalgo JA, Cristofanilli M, Gómez H, Arteaga CL, Giltnane J, Balko JM, Cronin MT, Jarosz M, Sun J, Hawryluk M, Lipson D, Otto G, Ross JS, Dvir A, Soussan-Gutman L, Wolf I, Rubinek T, Gilmore L, Schnitt S, Come SE, Pusztai L, Stephens P, Brown M, Miller VA (2014) Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* **20**: 1757–1767.

Jing R-R, Wang H-M, Cui M, Fang M-K, Qiu X-J, Wu X-H, Qi J, Wang Y-G, Zhang L-R, Zhu J-H, Ju S-Q (2011) A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: relevance to myocardial infarction screening. *Clin Biochem* **44**: 1074–1079.

Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K (2003) Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clin Chem* **49**: 1028–1029.

Jung R, Lübcke C, Wagener C, Neumaier M (1997) Reversal of RT-PCR inhibition observed in heparinized clinical specimens. *BioTechniques* **23**: 24, 26, 28.

Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, Zhang J, Weitz J, Chin L, Futreal A, Kalluri R (2014) Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem* **289**: 3869–3875.

Kamm RC, Smith AG (1972) Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* **18**: 519–522.

Kamm RC, Smith AG (1975) Plasma deoxyribonucleic acid concentrations of women in labor and umbilical cords. *Am J Obstet Gynecol* **121**: 29–31.

Kang Q, Henry NL, Paoletti C, Jiang H, Vats P, Chinnaiyan AM, Hayes DF, Merajver SD, Rae JM, Tewari M (2016) Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin Biochem* **49**: 1354–1360.

Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O’Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au H-J, Langer C, Moore MJ, Zalcborg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* **359**: 1757–1765.

Karlas T, Weise L, Kuhn S, Krenzien F, Mehdorn M, Petroff D, Linder N, Schaudinn A, Busse H, Keim V, Pratschke J, Wiegand J, Splith K, Schmelzle M (2017) Correlation of cell-free DNA plasma concentration with severity of non-alcoholic fatty liver disease. *J Transl Med* **15**: 106.

Kennedy SR, Schmitt MW, Fox EJ, Kohn BF, Salk JJ, Ahn EH, Prindle MJ, Kuong KJ, Shen J-C, Risques R-A, Loeb LA (2014) Detecting ultralow-frequency mutations by Duplex Sequencing. *Nat Protoc* **9**: 2586–2606.

Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B (2011) Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 9530–9535.

Kinugasa H, Nouse K, Miyahara K, Morimoto Y, Dohi C, Tsutsumi K, Kato H, Matsubara T, Okada H, Yamamoto K (2015) Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer* **121**: 2271–2280.

Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, Fleischhacker M (2008) An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids. *Ann N Y Acad Sci* **1137**: 135–139.

Kitzman JO, Snyder MW, Ventura M, Lewis AP, Qiu R, Simmons LE, Gammill HS, Rubens CE, Santillan DA, Murray JC, Tabor HK, Bamshad MJ, Eichler EE, Shendure J (2012) Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med* **4**: 137ra76.

Kjeldsen BJ, Kronborg O, Fenger C, Jørgensen OD (1997) A prospective randomized study of follow-up after radical surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* **84**: 666–669.

Kobayashi S, Boggon TJ, Dayaram T, Jänne PA, Kocher O, Meyerson M, Johnson BE, Eck MJ, Tenen DG, Halmos B (2005) EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**: 786–792.

Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG (1973) The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *J Clin Invest* **52**: 198–204.

Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, Yoshida K, Hida T, Tsuboi M, Tada H, Kuwano H, Mitsudomi T (2006) Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res* **12**: 5764–5769.

Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jørgensen OD, Søndergaard O (1996) Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* **348**: 1467–1471.

Kuang Y, Rogers A, Yeap BY, Wang L, Makrigiorgos M, Vetrang K, Thiede S, Distel RJ, Jänne PA (2009) Noninvasive detection of EGFR T790M in gefitinib or erlotinib resistant non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **15**: 2630–2636.

Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD (2004) EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clin Chem* **50**: 256–257.

Lam NY-L, Rainer TH, Wong LK-S, Lam W, Lo Y-MD (2006) Plasma DNA as a prognostic marker for stroke patients with negative neuroimaging within the first 24 h of symptom onset. *Resuscitation* **68**: 71–78.

Laurent-Puig P, Pekin D, Normand C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, Rowell R, Olson J, Srinivasan P, Le Corre D, Hor T, El Harrak Z, Li X, Link DR, Bouché O, Emile J-F, Landi B, Boige V, Hutchison JB, Taly V (2015) Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* **21**: 1087–1097.

Leary RJ, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten JD, Craig D, O’Shaughnessy J, Kinzler KW, Parmigiani G, Vogelstein B, Diaz LA, Velculescu VE (2012) Detection of Chromosomal Alterations in the Circulation of Cancer Patients with Whole-Genome Sequencing. *Sci Transl Med* **4**: 162ra154-162ra154.

Lee H, Park Y-M, We Y-M, Han DJ, Seo J-W, Moon H, Lee Y-H, Kim Y-G, Moon J-Y, Lee S-H, Lee J-K (2017a) Evaluation of Digital PCR as a Technique for Monitoring Acute Rejection in Kidney Transplantation. *Genomics Inform* **15**: 2–10.

Lee JH, Long GV, Boyd S, Lo S, Menzies AM, Tembe V, Guminski A, Jakrot V, Scolyer RA, Mann GJ, Kefford RF, Carlino MS, Rizos H (2017b) Circulating tumour DNA predicts response to anti-PD1 antibodies in metastatic melanoma. *Ann Oncol* **28**: 1130–1136.

Lee JY, Qing X, Xiumin W, Yali B, Chi S, Bak SH, Lee HY, Sun J-M, Lee S-H, Ahn JS, Cho EK, Kim D-W, Kim HR, Min YJ, Jung S-H, Park K, Mao M, Ahn M-J (2016) Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated

with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02). *Oncotarget* **7**: 6984–6993.

Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP (2001) Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion* **41**: 276–282.

Lefebure B, Charbonnier F, Di Fiore F, Tuech JJ, Le Pessot F, Michot F, Michel P, Frebourg T (2010) Prognostic value of circulating mutant DNA in unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* **251**: 275–280.

Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hultén MA, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot CE (2007) Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn* **27**: 824–829.

Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheim J, Vaknin-Dembinsky A, Rubertsson S, Nellgård B, Blennow K, Zetterberg H, Spalding K, Haller MJ, Wasserfall CH, Schatz DA, Greenbaum CJ, Dorrell C, Grompe M, Zick A, Hubert A, Maoz M, Fendrich V, Bartsch DK, Golan T, Ben Sasson SA, Zamir G, Razin A, Cedar H, Shapiro AMJ, Glaser B, Shemer R, Dor Y (2016) Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: E1826-1834.

Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA (1977a) Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* **4**: 139–143.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977b) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* **37**: 646–650.

Lewandowska MA, Furtak J, Szyłberg T, Roszkowski K, Windorbska W, Rytłewska J, Jóźwicki W (2014) An analysis of the prognostic value of IDH1 (isocitrate dehydrogenase 1) mutation in Polish glioma patients. *Mol Diagn Ther* **18**: 45–53.

Li J, Wang L, Mamon H, Kulke MH, Berbeco R, Makrigiorgos GM (2008) Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nat Med* **14**: 579–584.

Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z (2017) Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* **7**: 789–804.

Li S, Shen D, Shao J, Crowder R, Liu W, Prat A, He X, Liu S, Hoog J, Lu C, Ding L, Griffith OL, Miller C, Larson D, Fulton RS, Harrison M, Mooney T, McMichael JF, Luo J, Tao Y, Goncalves R, Schlosberg C, Hiken JF, Saied L, Sanchez C, Giuntoli T, Bumb C, Cooper C, Kitchens RT, Lin A, Phommaly C, Davies SR, Zhang J, Kavuri MS, McEachern D, Dong YY, Ma C, Pluard T, Naughton M, Bose R, Suresh R, McDowell R, Michel L, Aft R, Gillanders W, DeSchryver K, Wilson RK, Wang S, Mills GB, Gonzalez-Angulo A, Edwards JR, Maher C, Perou CM, Mardis ER, Ellis MJ (2013) Endocrine-therapy-resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. *Cell Rep* **4**: 1116–1130.

- Lièvre A, Bachet J-B, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile J-F, Côté J-F, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* **66**: 3992–3995.
- Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, Feng X, Reder A, Stefoski D, Balabanov R, Levenson V (2010) Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* **290**: 16–21.
- Liu L, Li K, Fu X, Chung C, Zhang K (2016) A Forward Look At Noninvasive Prenatal Testing. *Trends Mol Med* **22**: 958–968.
- Liu Y (2006) Historical and modern genetics of plant graft hybridization. *Adv Genet* **56**: 101–129.
- Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350**: 485–487.
- Lo YM, Leung SF, Chan LY, Chan AT, Lo KW, Johnson PJ, Huang DP (2000a) Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **60**: 2351–2355.
- Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA (2000b) Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clin Chem* **46**: 319–323.
- Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM (1998a) Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* **62**: 768–775.
- Lo YM, Tein MS, Pang CC, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM (1998b) Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* **351**: 1329–1330.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM (1999) Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* **64**: 218–224.
- Lo YMD, Chan KCA, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FMF, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RWK (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med* **2**: 61ra91.
- Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, Tsui NBY, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BCY, Cantor CR, Chiu RWK (2007) Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13116–13121.
- Lofton-Day C, Model F, Devos T, Tetzner R, Distler J, Schuster M, Song X, Lesche R, Liebenberg V, Ebert M, Molnar B, Grützmann R, Pilarsky C, Sledziewski A (2008) DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clin Chem* **54**: 414–423.

Lorillon G, Mourah S, Vercellino L, de Margerie-Mellon C, Pagès C, Goldwirt L, Lebbe C, Tost J, Tazi A (2016) Sustained response to salvage therapy for dabrafenib-resistant metastatic Langerhans cell sarcoma. *Ann Oncol* **27**: 2305–2307.

Lou DI, Hussmann JA, McBee RM, Acevedo A, Andino R, Press WH, Sawyer SL (2013) High-throughput DNA sequencing errors are reduced by orders of magnitude using circle sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 19872–19877.

Luger K (2003) Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev* **13**: 127–135.

Lui YYN, Chik K-W, Chiu RWK, Ho C-Y, Lam CWK, Lo YMD (2002) Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* **48**: 421–427.

Lui YYN, Woo K-S, Wang AYM, Yeung C-K, Li PKT, Chau E, Ruygrok P, Lo YMD (2003) Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clin Chem* **49**: 495–496.

Lun FMF, Tsui NBY, Chan KCA, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, Chow KCK, Lo WYW, Wanapirak C, Sanguansermisri T, Cantor CR, Chiu RWK, Lo YMD (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 19920–19925.

Ma D, Ge H, Li X, Jiang T, Chen F, Zhang Y, Hu P, Chen S, Zhang J, Ji X, Xu X, Jiang H, Chen M, Wang W, Xu Z (2014) Haplotype-based approach for noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma DNA sequencing. *Gene* **544**: 252–258.

Mack PC, Holland WS, Burich RA, Sangha R, Solis LJ, Li Y, Beckett LA, Lara PN, Davies AM, Gandara DR (2009) EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **4**: 1466–1472.

Maebo A (1990) [Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* **28**: 1085–1091.

Mandel P, Metais P (1948) [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil* **142**: 241–243.

Manfredi S, Bouvier AM, Lepage C, Hatem C, Dancourt V, Faivre J (2006) Incidence and patterns of recurrence after resection for cure of colonic cancer in a well defined population. *Br J Surg* **93**: 1115–1122.

Mauger F, Daunay A, Deleuze J-F, Tost J, How-Kit A (2016) Multiplexing of E-ice-COLD-PCR Assays for Mutation Detection and Identification. *Clin Chem* **62**: 1155–1158.

Mauger F, Dulary C, Daviaud C, Deleuze J-F, Tost J (2015) Comprehensive evaluation of methods to isolate, quantify, and characterize circulating cell-free DNA from small volumes of plasma. *Anal Bioanal Chem* **407**: 6873–6878.

Mauger F, How-Kit A, Tost J (2017) COLD-PCR Technologies in the Area of Personalized Medicine: Methodology and Applications. *Mol Diagn Ther* **21**: 269–283.

McBride DJ, Orpana AK, Sotiriou C, Joensuu H, Stephens PJ, Mudie LJ, Hämäläinen E, Stebbings LA, Andersson LC, Flanagan AM, Durbecq V, Ignatiadis M, Kallioniemi O, Heckman CA, Alitalo K, Edgren H, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ (2010) Use of cancer-specific genomic rearrangements to quantify disease burden in plasma from patients with solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **49**: 1062–1069.

Medina Diaz I, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F, Holtrup F (2016) Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS ONE* **11**: e0166354.

Mehrotra M, Singh RR, Chen W, Huang RSP, Almohammedsalim AA, Barkoh BA, Simien CM, Hernandez M, Behrens C, Patel KP, Routbort MJ, Broaddus RR, Medeiros LJ, Wistuba II, Kopetz S, Luthra R (2017) Study of Preanalytic and Analytic Variables for Clinical Next-Generation Sequencing of Circulating Cell-Free Nucleic Acid. *J Mol Diagn* **19**: 514–524.

Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, LeBleu VS, Mittendorf EA, Weitz J, Rahbari N, Reissfelder C, Pilarsky C, Fraga MF, Piwnica-Worms D, Kalluri R (2015) Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523**: 177–182.

Melo SA, Sugimoto H, O'Connell JT, Kato N, Villanueva A, Vidal A, Qiu L, Vitkin E, Perelman LT, Melo CA, Lucci A, Ivan C, Calin GA, Kalluri R (2014) Cancer exosomes perform cell-independent microRNA biogenesis and promote tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**: 707–721.

Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, Yelensky R, Brown M, Miller VA, Sarid D, Rizel S, Klein B, Rubinek T, Wolf I (2013) D538G mutation in estrogen receptor- α : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res* **73**: 6856–6864.

Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**: 31–46.

Minchin RF, Carpenter D, Orr RJ (2001) Polyinosinic acid and polycationic liposomes attenuate the hepatic clearance of circulating plasmid DNA. *J Pharmacol Exp Ther* **296**: 1006–1012.

Miranda ML, Macher HC, Muñoz-Hernández R, Vallejo-Vaz A, Moreno-Luna R, Villar J, Guerrero JM, Stiefel P (2013) Role of circulating cell-free DNA levels in patients with severe preeclampsia and HELLP syndrome. *Am J Hypertens* **26**: 1377–1380.

Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen C-T, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D, Bardelli A (2012) Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486**: 532–536.

Model F, Osborn N, Ahlquist D, Gruetzmänn R, Molnar B, Sipos F, Galamb O, Pilarsky C, Saeger H-D, Tulassay Z, Hale K, Mooney S, Lograsso J, Adorjan P, Lesche R, Dessauer A, Kleiber J, Porstmann B, Sledziewski A, Lofton-Day C (2007) Identification and validation

of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. *Mol Cancer Res* **5**: 153–163.

Montagna C, Lyu M-S, Hunter K, Lukes L, Lowther W, Reppert T, Hissong B, Weaver Z, Ried T (2003) The Septin 9 (MSF) gene is amplified and overexpressed in mouse mammary gland adenocarcinomas and human breast cancer cell lines. *Cancer Res* **63**: 2179–2187.

Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, Kazmi SMA, Mazard T, Vilar E, Morris VK, Lee MS, Herron D, Eng C, Morris J, Kee BK, Janku F, Deaton FL, Garrett C, Maru D, Diehl F, Angenendt P, Kopetz S (2015) Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* **26**: 731–736.

Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR (2014) Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Oncol* **8**: 927–941.

Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR (2011) High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS One* **6**: e23418.

Mouliere F, Rosenfeld N (2015) Circulating tumor-derived DNA is shorter than somatic DNA in plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 3178–3179.

Mourah S, Lorillon G, Meignin V, Vercellino L, de Margerie-Mellon C, Pages C, Goldwirt L, How-Kit A, Tost J, Lebbe C, Tazi A (2015) Dramatic transient improvement of metastatic BRAF(V600E)-mutated Langerhans cell sarcoma under treatment with dabrafenib. *Blood* **126**: 2649–2652.

Murphy DM, Bejar R, Stevenson K, Neuberg D, Shi Y, Cubrich C, Richardson K, Eastlake P, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Ebert BL, Mike Makrigrigios G (2013) NRAS mutations with low allele burden have independent prognostic significance for patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **27**: 2077–2081.

Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, Gale D, Forshew T, Piskorz AM, Parkinson C, Chin S-F, Kingsbury Z, Wong ASC, Marass F, Humphray S, Hadfield J, Bentley D, Chin TM, Brenton JD, Caldas C, Rosenfeld N (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* **497**: 108–112.

Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M (2011) Tumour evolution inferred by single-cell sequencing. *Nature* **472**: 90–94.

Nawroz H, Koch W, Anker P, Stroun M, Sidransky D (1996) Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. *Nat Med* **2**: 1035–1037.

New MI, Tong YK, Yuen T, Jiang P, Pina C, Chan KCA, Khattab A, Liao GJW, Yau M, Kim S-M, Chiu RWK, Sun L, Zaidi M, Lo YMD (2014) Noninvasive prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **99**: E1022-1030.

Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, Liu CL, Neal JW, Wakelee HA, Merritt RE, Shrager JB, Loo BW, Alizadeh AA, Diehn M (2014) An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* **20**: 548–554.

Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, Stehr H, Liu CL, Bratman SV, Say C, Zhou L, Carter JN, West RB, Sledge GW, Shrager JB, Loo BW, Neal JW, Wakelee HA, Diehn M, Alizadeh AA (2016) Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol* **34**: 547–555.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **17**: 2503–2516.

Nicholson BD, Shinkins B, Pathiraja I, Roberts NW, James TJ, Mallett S, Perera R, Primrose JN, Mant D (2015) Blood CEA levels for detecting recurrent colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **12**: CD011134.

Nicolaides KH, Syngelaki A, Ashoor G, Birdir C, Touzet G (2012) Noninvasive prenatal testing for fetal trisomies in a routinely screened first-trimester population. *Am J Obstet Gynecol* **207**: 374.e1-6.

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* **254**: 1497–1500.

Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, Alexandrov LB, Greenman CD, Lau KW, Raine K, Jones D, Marshall J, Ramakrishna M, Shlien A, Cooke SL, Hinton J, Menzies A, Stebbings LA, Leroy C, Jia M, Rance R, Mudie LJ, Gamble SJ, Stephens PJ, McLaren S, Tarpey PS, Papaemmanuil E, Davies HR, Varela I, McBride DJ, Bignell GR, Leung K, Butler AP, Teague JW, Martin S, Jönsson G, Mariani O, Boyault S, Miron P, Fatima A, Langerød A, Aparicio SAJR, Tutt A, Sieuwerts AM, Borg Å, Thomas G, Salomon AV, Richardson AL, Børresen-Dale A-L, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ, Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome Consortium (2012) The life history of 21 breast cancers. *Cell* **149**: 994–1007.

Nixon G, Garson JA, Grant P, Nastouli E, Foy CA, Huggett JF (2014) Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Anal Chem* **86**: 4387–4394.

Norton SE, Lechner JM, Williams T, Fernando MR (2013a) A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem* **46**: 1561–1565.

Norton SE, Luna KK, Lechner JM, Qin J, Fernando MR (2013b) A new blood collection device minimizes cellular DNA release during sample storage and shipping when compared to a standard device. *J Clin Lab Anal* **27**: 305–311.

Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23–28.

Nygaard AD, Garm Spindler K-L, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A (2013) The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **79**: 312–317.

Ocaña A, Díez-González L, García-Olmo DC, Templeton AJ, Vera-Badillo F, José Escribano M, Serrano-Heras G, Corrales-Sánchez V, Seruga B, Andrés-Pretel F, Pandiella A, Amir E (2016) Circulating DNA and Survival in Solid Tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **25**: 399–406.

O'Connell GC, Petrone AB, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, Chantler PD, Barr TL (2017) Circulating extracellular DNA levels are acutely elevated in ischaemic stroke and associated with innate immune system activation. *Brain Inj* 1–7.

Okayama H, Curiel DT, Brantly ML, Holmes MD, Crystal RG (1989) Rapid, nonradioactive detection of mutations in the human genome by allele-specific amplification. *J Lab Clin Med* **114**: 105–113.

Oxnard GR, Paweletz CP, Kuang Y, Mach SL, O'Connell A, Messineo MM, Luke JJ, Butaney M, Kirschmeier P, Jackman DM, Jänne PA (2014) Noninvasive detection of response and resistance in EGFR-mutant lung cancer using quantitative next-generation genotyping of cell-free plasma DNA. *Clin Cancer Res* **20**: 1698–1705.

Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, Pringle JH, Blighe K, Marchese SD, Hills A, Woodley L, Stebbing J, Coombes RC, Shaw JA (2013) Influence of plasma processing on recovery and analysis of circulating nucleic acids. *PLoS ONE* **8**: e77963.

Palomaki GE, Deciu C, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE, Neveux LM, Ehrich M, van den Boom D, Bombard AT, Grody WW, Nelson SF, Canick JA (2012) DNA sequencing of maternal plasma reliably identifies trisomy 18 and trisomy 13 as well as Down syndrome: an international collaborative study. *Genet Med* **14**: 296–305.

Pan BT, Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**: 967–978.

Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR (2015) Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. *Clin Chem* **61**: 514–522.

Parks M, Court S, Bowns B, Cleary S, Clokie S, Hewitt J, Williams D, Cole T, MacDonald F, Griffiths M, Allen S (2017) Non-invasive prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy by relative haplotype dosage. *Eur J Hum Genet* **25**: 416–422.

Parpart-Li S, Bartlett B, Popoli M, Adleff V, Tucker L, Steinberg R, Georgiadis A, Phallen J, Brahmer J, Azad N, Browner I, Laheru D, Velculescu VE, Sausen M, Diaz LA (2017) The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clin Cancer Res* **23**: 2471–2477.

Paweletz CP, Sacher AG, Raymond CK, Alden RS, O'Connell A, Mach SL, Kuang Y, Gandhi L, Kirschmeier P, English JM, Lim LP, Jänne PA, Oxnard GR (2016) Bias-Corrected Targeted Next-Generation Sequencing for Rapid, Multiplexed Detection of Actionable Alterations in Cell-Free DNA from Advanced Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **22**: 915–922.

Pécuchet N, Rozenholc Y, Zonta E, Pietraz D, Didelot A, Combe P, Gibault L, Bachet J-B, Taly V, Fabre E, Blons H, Laurent-Puig P (2016a) Analysis of Base-Position Error Rate of Next-Generation Sequencing to Detect Tumor Mutations in Circulating DNA. *Clin Chem* **62**: 1492–1503.

Pécuchet N, Zonta E, Didelot A, Combe P, Thibault C, Gibault L, Lours C, Rozenholc Y, Taly V, Laurent-Puig P, Blons H, Fabre E (2016b) Base-Position Error Rate Analysis of Next-Generation Sequencing Applied to Circulating Tumor DNA in Non-Small Cell Lung Cancer: A Prospective Study. *PLoS Med* **13**: e1002199.

Pereira E, Camacho-Vanegas O, Anand S, Sebra R, Catalina Camacho S, Garnar-Wortzel L, Nair N, Moshier E, Wooten M, Uzilov A, Chen R, Prasad-Hayes M, Zakashansky K, Beddoe AM, Schadt E, Dottino P, Martignetti JA (2015) Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS ONE* **10**: e0145754.

Perkins G, Lu H, Garlan F, Taly V (2017) Droplet-Based Digital PCR: Application in Cancer Research. *Adv Clin Chem* **79**: 43–91.

Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, Starling RC, Deng MC, Cappola TP, Kao A, Anderson AS, Cotts WG, Ewald GA, Baran DA, Bogaev RC, Elashoff B, Baron H, Yee J, Valantine HA, IMAGE Study Group (2010) Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* **362**: 1890–1900.

Pietrasz D, Pécuchet N, Garlan F, Didelot A, Dubreuil O, Doat S, Imbert-Bismut F, Karoui M, Vaillant J-C, Taly V, Laurent-Puig P, Bachet J-B (2017) Plasma Circulating Tumor DNA in Pancreatic Cancer Patients Is a Prognostic Marker. *Clin Cancer Res* **23**: 116–123.

Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Obstetrix Collaborative Research Network, Ehrich M, van den Boom D, Deciu C, Bombard A (2014) Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol* **211**: 365.e1-12.

Primrose JN, Perera R, Gray A, Rose P, Fuller A, Corkhill A, George S, Mant D, FACS Trial Investigators (2014) Effect of 3 to 5 years of scheduled CEA and CT follow-up to detect recurrence of colorectal cancer: the FACS randomized clinical trial. *JAMA* **311**: 263–270.

Qian X, Liu J, Sun Y, Wang M, Lei H, Luo G, Liu X, Xiong C, Liu D, Liu J, Tang Y (2016) Circulating cell-free DNA has a high degree of specificity to detect exon 19 deletions and the single-point substitution mutation L858R in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**: 29154–29165.

Rainer TH, Lam NYL, Man CY, Chiu RWK, Woo KS, Lo YMD (2006) Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. *Clin Chim Acta* **368**: 110–113.

Raptis L, Menard HA (1980) Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **66**: 1391–1399.

Reinert T, Schøler LV, Thomsen R, Tobiasen H, Vang S, Nordentoft I, Lamy P, Kannerup A-S, Mortensen FV, Stribolt K, Hamilton-Dutoit S, Nielsen HJ, Laurberg S, Pallisgaard N,

Pedersen JS, Ørntoft TF, Andersen CL (2016) Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut* **65**: 625-34.

Repiská G, Sedláčková T, Szemes T, Celec P, Minárik G (2013) Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma. *Clin Chem Lab Med* **51**: 1185–1189.

Riediger AL, Dietz S, Schirmer U, Meister M, Heinzmann-Groth I, Schneider M, Muley T, Thomas M, Sülthmann H (2016) Mutation analysis of circulating plasma DNA to determine response to EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy of lung adenocarcinoma patients. *Sci Rep* **6**: 33505.

Robinson DR, Wu Y-M, Vats P, Su F, Lonigro RJ, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Wang R, Ning Y, Hodges L, Gursky A, Siddiqui J, Tomlins SA, Roychowdhury S, Pienta KJ, Kim SY, Roberts JS, Rae JM, Van Poznak CH, Hayes DF, Chugh R, Kunju LP, Talpaz M, Schott AF, Chinnaiyan AM (2013) Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* **45**: 1446–1451.

Rodríguez-Moranta F, Saló J, Arcusa A, Boadas J, Piñol V, Bessa X, Batiste-Alentorn E, Lacy AM, Delgado S, Maurel J, Piqué JM, Castells A (2006) Postoperative surveillance in patients with colorectal cancer who have undergone curative resection: a prospective, multicenter, randomized, controlled trial. *J Clin Oncol* **24**: 386–393.

Rosman AS, Korsten MA (2010) Effect of verification bias on the sensitivity of fecal occult blood testing: a meta-analysis. *J Gen Intern Med* **25**: 1211–1221.

van Rossum LG, van Rijn AF, Laheij RJ, van Oijen MG, Fockens P, van Krieken HH, Verbeek AL, Jansen JB, Dekker E (2008) Random comparison of guaiac and immunochemical fecal occult blood tests for colorectal cancer in a screening population. *Gastroenterology* **135**: 82–90.

Rumore PM, Steinman CR (1990) Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest* **86**: 69–74.

Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T (2000) Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet* **356**: 1170.

Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, Fenwick K, Kozarewa I, Lopez-Knowles E, Ribas R, Nerurkar A, Osin P, Chandarlapaty S, Martin L-A, Dowsett M, Smith IE, Turner NC (2015) Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med* **7**: 313ra182.

Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M (2005) Improved method for isolating cell-free DNA. *Clin Chem* **51**: 1561–1563.

Schmitt MW, Kennedy SR, Salk JJ, Fox EJ, Hiatt JB, Loeb LA (2012) Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 14508–14513.

Schoemaker D, Black R, Giles L, Toouli J (1998) Yearly colonoscopy, liver CT, and chest radiography do not influence 5-year survival of colorectal cancer patients. *Gastroenterology* **114**: 7–14.

Schøler LV, Reinert T, Ørntoft M-BW, Kassentoft CG, Árnadóttir SS, Vang S, Nordentoft I, Knudsen M, Lamy P, Andreasen D, Mortensen FV, Knudsen AR, Stribolt K, Sivesgaard K, Mouritzen P, Nielsen HJ, Laurberg S, Ørntoft TF, Andersen CL (2017) Clinical Implications of Monitoring Circulating Tumor DNA in Patients with Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res* **23**: 5437–5445.

Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh T-Y, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K (2008) Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**: 887–898.

Schütz E, Fischer A, Beck J, Harden M, Koch M, Wuensch T, Stockmann M, Nashan B, Kollmar O, Matthaei J, Kanzow P, Walson PD, Brockmöller J, Oellerich M (2017) Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med* **14**: e1002286.

Scott M, McCluggage WG, Hillan KJ, Hall PA, Russell SEH (2006) Altered patterns of transcription of the septin gene, SEPT9, in ovarian tumorigenesis. *Int J Cancer* **118**: 1325–1329.

Secco GB, Fardelli R, Gianquinto D, Bonfante P, Baldi E, Ravera G, Derchi L, Ferraris R (2002) Efficacy and cost of risk-adapted follow-up in patients after colorectal cancer surgery: a prospective, randomized and controlled trial. *Eur J Surg Oncol* **28**: 418–423.

Sefrioui D, Perdrix A, Sarafan-Vasseur N, Dolfus C, Dujon A, Picquenot J-M, Delacour J, Cornic M, Bohers E, Leheurteur M, Rigal O, Tennevet I, They J-C, Alexandru C, Guillemet C, Moldovan C, Veyret C, Frebourg T, Di Fiore F, Clatot F (2015) Short report: Monitoring ESR1 mutations by circulating tumor DNA in aromatase inhibitor resistant metastatic breast cancer. *Int J Cancer* **137**: 2513–2519.

Sefrioui D, Beaussire L, Clatot F, Delacour J, Perdrix A, Frebourg T, Michel P, Di Fiore F, Sarafan-Vasseur N (2017a) Heparinase enables reliable quantification of circulating tumor DNA from heparinized plasma samples by droplet digital PCR. *Clin Chim Acta* **472**: 75–79.

Sefrioui D, Beaussire L, Perdrix A, Clatot F, Michel P, Frebourg T, Di Fiore F, Sarafan-Vasseur N (2017b) Direct circulating tumor DNA detection from unpurified plasma using a digital PCR platform. *Clin Biochem* **50**: 963–966.

Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, Turashvili G, Ding J, Tse K, Haffari G, Bashashati A, Prentice LM, Khattra J, Burleigh A, Yap D, Bernard V, McPherson A, Shumansky K, Crisan A, Giuliany R, Heravi-Moussavi A, Rosner J, Lai D, Birol I, Varhol R, Tam A, Dhalla N, Zeng T, Ma K, Chan SK, Griffith M, Moradian A, Cheng S-WG, Morin GB, Watson P, Gelmon K, Chia S, Chin S-F, Curtis C, Rueda OM, Pharoah PD, Damaraju S, Mackey J, Hoon K, Harkins T, Tadigotla V, Sigaroudinia M, Gascard P, Tlsty T, Costello JF, Meyer IM, Eaves CJ, Wasserman WW, Jones S, Huntsman D, Hirst M, Caldas C, Marra MA,

Aparicio S (2012) The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **486**: 395–399.

Sharma MR, Maitland ML, Ratain MJ (2012) RECIST: no longer the sharpest tool in the oncology clinical trials toolbox---point. *Cancer Res* **72**: 5145–5149.

Shinozaki M, O'Day SJ, Kitago M, Amersi F, Kuo C, Kim J, Wang H-J, Hoon DSB (2007) Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clin Cancer Res* **13**: 2068–2074.

Sikora A, Zimmermann BG, Rusterholz C, Birri D, Kolla V, Lapaire O, Hoesli I, Kiefer V, Jackson L, Hahn S (2010) Detection of increased amounts of cell-free fetal DNA with short PCR amplicons. *Clin Chem* **56**: 136–138.

Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, Ponzetti A, Cremolini C, Amatu A, Lauricella C, Lamba S, Hobor S, Avallone A, Valtorta E, Rospo G, Medico E, Motta V, Antoniotti C, Tatangelo F, Bellosillo B, Veronese S, Budillon A, Montagut C, Racca P, Marsoni S, Falcone A, Corcoran RB, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Siena S, Sartore-Bianchi A, Bardelli A (2015) Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med* **21**: 795–801.

Siravegna G, Sartore-Bianchi A, Mussolin B, Cassingena A, Amatu A, Novara L, Buscarino M, Corti G, Crisafulli G, Bartolini A, Tosi F, Erlander M, Di Nicolantonio F, Siena S, Bardelli A (2017) Tracking a CAD-ALK gene rearrangement in urine and blood of a colorectal cancer patient treated with an ALK inhibitor. *Ann Oncol* **28**: 1302–1308.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A (2017) Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **14**: 531–548.

Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J (2016) Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell* **164**: 57–68.

Snyder TM, Khush KK, Valantine HA, Quake SR (2011) Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 6229–6234.

Sommer SS, Cassady JD, Sobell JL, Bottema CD (1989) A novel method for detecting point mutations or polymorphisms and its application to population screening for carriers of phenylketonuria. *Mayo Clin Proc* **64**: 1361–1372.

Song C-X, Yin S, Ma L, Wheeler A, Chen Y, Zhang Y, Liu B, Xiong J, Zhang W, Hu J, Zhou Z, Dong B, Tian Z, Jeffrey SS, Chua M-S, So S, Li W, Wei Y, Diao J, Xie D, Quake SR (2017) 5-Hydroxymethylcytosine signatures in cell-free DNA provide information about tumor types and stages. *Cell Res* **27**: 1231–1242.

Song Y, Liu C, Qi H, Zhang Y, Bian X, Liu J (2013) Noninvasive prenatal testing of fetal aneuploidies by massively parallel sequencing in a prospective Chinese population. *Prenat Diagn* **33**: 700–706.

Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Roeyen G, Lardon F, Rolfo C, Pauwels P (2017) A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn* **19**: 162–168.

Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, Pastorino U (2005) Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst* **97**: 1848–1850.

Spindler K-LG, Appelt AL, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A (2014a) Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *Int J Cancer* **135**: 2984–2991.

Spindler K-LG, Boysen AK, Pallisgård N, Johansen JS, Tabernero J, Sørensen MM, Jensen BV, Hansen TF, Sefrioui D, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A (2017) Cell-Free DNA in Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Oncologist* **22**: 1049–1055.

Spindler K-LG, Pallisgaard N, Andersen RF, Ploen J, Jakobsen A (2014b) Gemcitabine and capecitabine for heavily pre-treated metastatic colorectal cancer patients--a phase II and translational research study. *Anticancer Res* **34**: 845–850.

Spindler K-LG, Pallisgaard N, Vogelius I, Jakobsen A (2012) Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clin Cancer Res* **18**: 1177–1185.

Spindler K-LG, Sorensen MM, Pallisgaard N, Andersen RF, Havelund BM, Ploen J, Lassen U, Jakobsen AKM (2013) Phase II trial of temsirolimus alone and in combination with irinotecan for KRAS mutant metastatic colorectal cancer: outcome and results of KRAS mutational analysis in plasma. *Acta Oncol* **52**: 963–970.

Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Egyud M, Filges S, Stein L, Godfrey TE (2017) Simple multiplexed PCR-based barcoding of DNA for ultrasensitive mutation detection by next-generation sequencing. *Nat Protoc* **12**: 664–682.

Ståhlberg A, Krzyzanowski PM, Jackson JB, Egyud M, Stein L, Godfrey TE (2016) Simple, multiplexed, PCR-based barcoding of DNA enables sensitive mutation detection in liquid biopsies using sequencing. *Nucleic Acids Res* **44**: e105.

Steinman CR (1975) Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest* **56**: 512–515.

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* **23**: 707–712.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* **46**: 318–322.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P (2001a) Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci* **945**: 258–264.

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P (2001b) About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin Chim Acta* **313**: 139–142.

Sudakov NP, Apartsin KA, Lepekhova SA, Nikiforov SB, Katyshev AI, Lifshits GI, Vybivantseva AV, Konstantinov YM (2017) The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome. *Eur J Med Res* **22**: 1.

Sudakov NP, Popkova TP, Katyshev AI, Goldberg OA, Nikiforov SB, Pushkarev BG, Klimenkov IV, Lepekhova SA, Apartsin KA, Nevinsky GA, Konstantinov YM (2015) Level of Blood Cell-Free Circulating Mitochondrial DNA as a Novel Biomarker of Acute Myocardial Ischemia. *Biochemistry Mosc* **80**: 1387–1392.

Sweeney AD, Wu M-F, Hilsenbeck SG, Brunicardi FC, Fisher WE (2009) Value of pancreatic resection for cancer metastatic to the pancreas. *J Surg Res* **156**: 189–198.

Swinkels DW, Wiegerinck E, Steegers EAP, de Kok JB (2003) Effects of blood-processing protocols on cell-free DNA quantification in plasma. *Clin Chem* **49**: 525–526.

Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* **13**: 444–449.

Tabernero J, Lenz H-J, Siena S, Sobrero A, Falcone A, Ychou M, Humblet Y, Bouché O, Mineur L, Barone C, Adenis A, Yoshino T, Goldberg RM, Sargent DJ, Wagner A, Laurent D, Teufel M, Jeffers M, Grothey A, Van Cutsem E (2015) Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol* **16**: 937–948.

Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ (1993) Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* **53**: 2472–2474.

Takai E, Totoki Y, Nakamura H, Morizane C, Nara S, Hama N, Suzuki M, Furukawa E, Kato M, Hayashi H, Kohno T, Ueno H, Shimada K, Okusaka T, Nakagama H, Shibata T, Yachida S (2015) Clinical utility of circulating tumor DNA for molecular assessment in pancreatic cancer. *Sci Rep* **5**: 18425.

Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Inao T, Sueta A, Fujiwara S, Omoto Y, Iwase H (2016) Clinical significance of monitoring ESR1 mutations in circulating cell-free DNA in estrogen receptor positive breast cancer patients. *Oncotarget* **7**: 32504–32518.

Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, Atochin I, Link DR, Griffiths AD, Pallier K, Blons H, Bouché O, Landi B, Hutchison JB, Laurent-Puig P (2013) Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* **59**: 1722–1731.

Taly V, Pekin D, El Abed A, Laurent-Puig P (2012) Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol Med* **18**: 405–416.

Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Laktionov PP (2006) Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 191–196.

- Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG (1966) Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* **45**: 1732–1740.
- Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S, Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D (2014) Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Res* **24**: 766–769.
- Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC, Gwyther SG (2000) New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* **92**: 205–216.
- Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, Gillet B, Gongora C, Dechelotte P, Robert B, Del Rio M, Lamy P-J, Bibeau F, Nouaille M, Lorient V, Jarrousse A-S, Molina F, Mathonnet M, Pezet D, Ychou M (2014) Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat Med* **20**: 430–435.
- Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F (2010) Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res* **38**: 6159–6175.
- Thirlwell C, Will OCC, Domingo E, Graham TA, McDonald SAC, Oukrif D, Jeffrey R, Gorman M, Rodriguez-Justo M, Chin-Aleong J, Clark SK, Novelli MR, Jankowski JA, Wright NA, Tomlinson IPM, Leedham SJ (2010) Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. *Gastroenterology* **138**: 1441–1454, 1454.e1-7.
- Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, Tacey M, Wong R, Singh M, Karapetis CS, Desai J, Tran B, Strausberg RL, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P (2015) Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* **26**: 1715–1722.
- Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, Silliman N, Tacey M, Wong H-L, Christie M, Kosmider S, Skinner I, Wong R, Steel M, Tran B, Desai J, Jones I, Haydon A, Hayes T, Price TJ, Strausberg RL, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Gibbs P (2016) Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* **8**: 346ra92.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ (2006) Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA. *Am J Pathol* **169**: 400–404.
- To EWH, Chan KCA, Leung S-F, Chan LYS, To K-F, Chan ATC, Johnson PJ, Lo YMD (2003) Rapid clearance of plasma Epstein-Barr virus DNA after surgical treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**: 3254–3259.

Toledo RA, Cubillo A, Vega E, Garralda E, Alvarez R, de la Varga LU, Pascual JR, Sánchez G, Sarno F, Prieto SH, Perea S, Lopéz-Casas PP, López-Ríos F, Hidalgo M (2017) Clinical validation of prospective liquid biopsy monitoring in patients with wild-type RAS metastatic colorectal cancer treated with FOLFIRI-cetuximab. *Oncotarget* **8**: 35289–35300.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**: 87–108.

Tougeron D, Lecomte T, Pagès JC, Villalva C, Collin C, Ferru A, Tourani JM, Silvain C, Levillain P, Karayan-Tapon L (2013) Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* **24**: 1267–1273.

Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, Li Z, Gala K, Fanning S, King TA, Hudis C, Chen D, Taran T, Hortobagyi G, Greene G, Berger M, Baselga J, Chandarlapaty S (2013) ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* **45**: 1439–1445.

Tsui NBY, Kadir RA, Chan KCA, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, Leung TY, Lau TK, Chiu RWK, Lo YMD (2011) Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* **117**: 3684–3691.

Uchiyama Y, Nakashima M, Watanabe S, Miyajima M, Taguri M, Miyatake S, Miyake N, Saitsu H, Mishima H, Kinoshita A, Arai H, Yoshiura K, Matsumoto N (2016) Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. *Sci Rep* **6**: 22985.

Ulz P, Belic J, Graf R, Auer M, Lafer I, Fischereder K, Webersinke G, Pummer K, Augustin H, Pichler M, Hoeffler G, Bauernhofer T, Geigl JB, Heitzer E, Speicher MR (2016) Whole-genome plasma sequencing reveals focal amplifications as a driving force in metastatic prostate cancer. *Nat Commun* **7**: 12008.

Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, Hoon DSB (2006a) Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol* **24**: 4270–4276.

Umetani N, Hiramatsu S, Hoon DSB (2006b) Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 299–307.

Valouev A, Johnson SM, Boyd SD, Smith CL, Fire AZ, Sidow A (2011) Determinants of nucleosome organization in primary human cells. *Nature* **474**: 516–520.

Vanderlaan PA, Yamaguchi N, Folch E, Boucher DH, Kent MS, Gangadharan SP, Majid A, Goldstein MA, Huberman MS, Kocher ON, Costa DB (2014) Success and failure rates of tumor genotyping techniques in routine pathological samples with non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* **84**: 39–44.

Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* **86**: 774–779.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigó R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304–1351.

Vidal J, Muinelo L, Dalmases A, Jones F, Edelstein D, Iglesias M, Orrillo M, Abalo A, Rodríguez C, Brozos E, Vidal Y, Candamio S, Vázquez F, Ruiz J, Guix M, Visa L, Sikri V, Albanell J, Bellosillo B, López R, Montagut C (2017) Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* **28**: 1325–1332.

Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, Lopez-Bujanda ZA, Jeter SC, Sokoll LJ, Garrett-Mayer E, Cope LM, Umbricht CB, Euhus DM, Forero A, Storniolo AM, Nanda R, Lin NU, Carey LA, Ingle JN, Sukumar S, Wolff AC (2017) Monitoring of Serum DNA Methylation as an Early Independent Marker of Response and Survival in Metastatic Breast Cancer: TBCRC 005 Prospective Biomarker Study. *J Clin Oncol* **35**: 751–758.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* **339**: 1546–1558.

Wang P, Bahreini A, Gyanchandani R, Lucas PC, Hartmaier RJ, Watters RJ, Jonnalagadda AR, Trejo Bittar HE, Berg A, Hamilton RL, Kurland BF, Weiss KR, Mathew A, Leone JP, Davidson NE, Nikiforova MN, Brufsky AM, Ambros TF, Stern AM, Puhalla SL, Lee AV, Oesterreich S (2016a) Sensitive Detection of Mono- and Polyclonal ESR1 Mutations in Primary Tumors, Metastatic Lesions, and Cell-Free DNA of Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **22**: 1130–1137.

Wang X, Meng Q, Wang C, Li F, Zhu Z, Liu S, Shi Y, Huang J, Chen S, Li C (2016b) Investigation of transrenal KRAS mutation in late stage NSCLC patients correlates to disease progression. *Biomarkers* 1–7.

Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, Bishop JA, Chung CH, Califano JA, Eisele DW, Fakhry C, Gourin CG, Ha PK, Kang H, Kiess A, Koch WM, Myers JN, Quon H, Richmon JD, Sidransky D, Tufano RP, Westra WH, Bettegowda C, Diaz LA, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Agrawal N (2015) Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Sci Transl Med* **7**: 293ra104.

Weber B, Meldgaard P, Hager H, Wu L, Wei W, Tsai J, Khalil A, Nexo E, Sorensen BS (2014) Detection of EGFR mutations in plasma and biopsies from non-small cell lung cancer patients by allele-specific PCR assays. *BMC Cancer* **14**: 294.

Wu DY, Ugozzoli L, Pal BK, Wallace RB (1989) Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2757–2760.

Wu J, Zhou Y, Zhang C-Y, Song B-B, Wang B-L, Pan B-S, Lou W-H, Guo W (2014) Co-amplification at lower denaturation-temperature PCR combined with unlabeled-probe high-resolution melting to detect KRAS codon 12 and 13 mutations in plasma-circulating DNA of pancreatic adenocarcinoma cases. *Asian Pac J Cancer Prev* **15**: 10647–10652.

Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dipersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L (2014) Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* **20**: 1472–1478.

Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ (2009) Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clin Chim Acta* **404**: 100–104.

Yachida S, Jones S, Bozic I, Antal T, Leary R, Fu B, Kamiyama M, Hruban RH, Eshleman JR, Nowak MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Iacobuzio-Donahue CA (2010) Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* **467**: 1114–1117.

Yu SCY, Lee SWY, Jiang P, Leung TY, Chan KCA, Chiu RWK, Lo YMD (2013) High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem* **59**: 1228–1237.

Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, Seth S, Chow C-W, Cao Y, Gumbs C, Gold KA, Kalhor N, Little L, Mahadeshwar H, Moran C, Protopopov A, Sun H, Tang J, Wu X, Ye Y, William WN, Lee JJ, Heymach JV, Hong WK, Swisher S, Wistuba II, Futreal PA (2014) Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science* **346**: 256–259.

Zhang J, Tong KL, Li PK, Chan AY, Yeung CK, Pang CC, Wong TY, Lee KC, Lo YM (1999) Presence of donor- and recipient-derived DNA in cell-free urine samples of renal transplantation recipients: urinary DNA chimerism. *Clin Chem* **45**: 1741–1746.

Zhou L, Lv T, Zhang Q, Zhu Q, Zhan P, Zhu S, Zhang J, Song Y (2017) The biology, function and clinical implications of exosomes in lung cancer. *Cancer Lett* **407**: 84–92.

Zimmermann BG, Holzgreve W, Avent N, Hahn S (2006) Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 347–349.

Zou J, Duffy B, Slade M, Young AL, Steward N, Hachem R, Mohanakumar T (2017) Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch. *Hum Immunol* **78**: 342–349.