

Mise au point

Analyse de l'ADN tumoral circulant : un nouveau concept en oncologie clinique

Analysis of circulating tumor DNA: a new concept in clinical oncology

Mourad NACHI , Ibtissem KIHHEL

Laboratoire de Recherche de Biochimie Médicale et de Biologie Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Oran1

Auteur correspondant: nachi.mourad@univ-oran1.dz soumis le 11/10/2021 ; accepté le 29/12/2021 ; publié le 26/12/2021

Citation: NACHI, M, et al.
Analyse de l'ADN tumoral circulant : un nouveau concept en oncologie clinique (2021) J Fac Med Or 5 (2):713-720.

DOI : <https://doi.org/10.51782/jfmo.v5i2.129>

MOTS CLÉS

Biopsie liquide, ADNtc, CB-NPC, CCR, Cancer du sein

Résumé

En cancérologie, les avancées scientifiques et technologiques ont permis depuis quelques années, l'émergence d'un nouveau concept qui tend à devenir un modèle en médecine, la médecine personnalisée, capable d'analyser les spécificités génomiques de chacun pour mieux répondre à ses besoins.

En effet, il est possible actuellement de détecter et de quantifier dans le sang(-biopsie liquide) sans acte invasif comparativement à la biopsie tissulaire, plusieurs bio marqueurs tels que les ADN tumoraux circulants (ADNtc), les cellules tumorales circulantes et les micro-ARN circulants, avec trois grandes applications potentielles:

le dépistage et le diagnostic précoce des cancers, l'estimation et le suivi quantitatif de la charge tumorale et la détection de mutations qui peuvent être éventuellement prédictives de la réponse ou d'une résistance au traitement.

Dans cet article, nous ferons le point sur la place de l'ADN tumoral circulant dans le diagnostic précoce, le suivi thérapeutique, le pronostic et la prédiction de la réponse aux traitements dans les cancers colorectaux(CCR), les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) et les cancers du sein.

KEY WORDS**Liquid biopsy, ctDNA, NS-CLC, CRC, Breast cancer****Abstract**

In recent years ,scientific and technological oncologie advances had allowed the emergence of a new concept which tend to become a new model in medicine; personalized medicine, capable to analyze the genomic specificities of each individual, to better meet their needs.

Indeed, it is currently possible to detect and quantify in blood «liquid biopsy» without invasive act compared to tissue biopsy, several biomarkers as circulating tumor DNA (ctDNA), circulating tumor cells and circulating micro-RNA, with three major potential applications:

early detection and diagnosis of cancers, estimation and quantitative monitoring of tumor burden; and the detection of mutations that may possibly be predictive of response or resistance to treatment.

In this article, we will focus on the role of circulating tumor DNA in the early diagnosis, therapeutic monitoring, prognosis and prediction of response to treatment in colorectal, non-small cell lung cancers (CRC, NSCLC) and breast cancer.

1.Introduction

En oncologie médicale, la recherche des mutations se fait habituellement à partir des prélèvements tumoraux (pièce opératoire, biopsie ou cyto-ponction) et nécessite l'implication de nombreux intervenants (cliniciens, pathologistes, biologiste moléculaires). Cette organisation est relativement complexe susceptible de retarder la prise en charge adéquate du patient. En plus, chez les patients en rechute, la recherche de bio marqueurs ne peut être réalisée que dans 10 à 30% des cas (bloc épuisé, nouvelle biopsie non réalisable, prélèvement disponible mais pauvre en cellules tumorales, mauvaise qualité de l'ADN...).

L'analyse sur « biopsie liquide », pourrait constituer une alternative prometteuse et crédible permettant de pallier à ces limitations et de réduire les coûts et les délais d'identification des mutations. Son concept consiste à isoler de l'ADN relargué par la tumeur dans les systèmes fluides (sang périphérique, sécrétions, urine...) suite à l'apoptose de certaines cellules tumorales. Son intérêt est d'obtenir une information sur une tumeur solide à partir d'un prélèvement liquide et de détecter les mutations somatiques. Elle permet une meilleure appréciation de l'hétérogénéité de la maladie et un meilleur suivi des modifications moléculaires au cours du traitement qu'une biopsie tissulaire [1]. L'ADNtc est l'un des marqueurs moléculaires les plus promet-

teur. Physiologiquement, l'ADN libre circulant (ADNlc) ou ADN-circulant, pour circulating cell free DNA « cfcDNA », peut être présent dans le plasma sanguin à de petites quantités de l'ordre de quelques ng/ml (3-10 ng/ml), mais lors des processus tumoraux, sa concentration augmente significativement comportant au moins une fraction d'origine tumorale. L'ADNtc proviendrait donc des cellules tumorales apoptotiques ou nécrotiques de la tumeur primitive ou de la sécrétion active des cellules tumorales, et possède les caractéristiques spécifiques des tumeurs [2]. La détection de l'ADNtc pourrait ainsi intervenir dans le dépistage, le diagnostic, la décision thérapeutique et le suivi des patients atteints de cancer. Le profil de méthylation de l'ADNtc est également étudié afin de déterminer le tissu dont il est originaire, ainsi que sa taille et sa fragmentation [3]. Dans cette mise au point, nous traitons les applications récentes de l'ADNtc dans les CCR, CBNPC et mammaires. Une revue de la littérature actuelle évaluant l'ADNtc dans ce contexte, a été réalisée. La recherche documentaire a été effectuée conformément aux recommandations PRISMA [4] en incluant les mots-clés suivants: « Liquid biopsy », « ctDNA », « NSCLC », « CCR », « Breast cancer », et en respectant les étapes suivantes : (1) identification des références après interrogation des bases de données « PubMed » (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), et « Google scholar », (2) sélection des références basée sur la lecture du titre et du résumé après suppression des doublons, (3) sélection des articles éligibles après lecture du texte intégral, (4) inclusion des

études. Ces trois dernières étapes dépendent des critères d'inclusion et d'exclusion fixés au préalable. Les études devaient répondre aux critères d'inclusion prédéfinis suivants : (1) études cliniques portant sur l'ADNtc ; (2) études portant sur les CCR, les CBNPC et les cancers du sein. Les articles non exploitables et ceux traitants d'autres bio marqueurs (cellules tumorales circulantes, ADN circulant libre, micro ARNs, ADN mitochondrial), et autres cancers, ont été exclus.

Au total 45 articles ont été classés dans le logiciel « EndNote X » et inclus dans la synthèse qualitative.

1. Corrélation entre biopsie liquide et biopsie solide

L'usage des « biopsies liquides » comme alternative au prélèvement tissulaire a été validé avec une haute concordance pour la détection des mutations avant, pendant et après le traitement. Des mutations d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être identifiées à partir de l'ADNtc avec une spécificité de l'ordre de 100 % et une sensibilité qui varie en fonction du stade et l'agressivité de la maladie. En effet, plus la maladie évolue et devient agressive, plus la sensibilité de détection de l'ADNtc est élevée [5]. Dans une étude portant sur 106 patients atteints de cancer colorectal métastatique (CCRM), Thierry et al [6], ont montré que l'analyse de l'ADNtc permettait de détecter les mutations BRAF(V600E) avec une spécificité et une sensibilité de 100 %, et les mutations KRAS avec une spécificité et une sensibilité de 98 % et 92 %, respectivement et une concordance de 96 %. Des résultats similaires ont été retrouvés dans une large étude (n= 1033) ayant concerné des patients porteurs de cancer bronchique non à petites cellules (CPNPC) [7].

2. Place de l'ADNtc en oncologie clinique

2.1. Dépistage et diagnostic moléculaire précoce des cancers

Le dépistage et le diagnostic précoce des cancers permettent en théorie d'augmenter le taux de guérison et de réduire le nombre des décès par cancer. L'ADNtc s'avère prometteur en tant que bio marqueur précoce. Dans une récente étude ayant concerné 1005 patients, des chercheurs australo-américains ont mis au point un test sanguin non invasif, appelé Cancer SEEK capable d'identifier huit types de cancers localisés différents (ovaire, foie, estomac, pancréas, œsophage, côlon et rectum, poumon ou sein). Les auteurs ont évalué huit bio marqueurs protéiques circulants combinés, à la recherche de mutations dans l'ADNtc. Le Cancer SEEK a permis de détecter un cancer avec une sensibilité de 69 à 98 % (selon le type de cancer) et une spécificité de 99 %, et permettait de prédire la localisation tumorale dans 83% des cas [8]. Plusieurs panels, ciblant différentes régions promotrices hyperméthylées de certains gènes, identifiés comme spécifiques du CCR ont été testés pour discriminer les patients atteints des patients sains [3]. A titre d'exemple, la détection dans le plasma du gène méthylé de la Septine 9, une protéine de la famille des protéines liant le GTP (GTP-binding protein), à un taux significativement plus élevé, chez les patients atteints de CCR, par rapport à celui observé chez les

chez les individus sains, en fait un bio marqueur potentiel de ce cancer [9]. Les patients atteints de CBNPC ont également un niveau d'ADNtc significativement plus élevé que les individus sains. Cependant, son intérêt dans le cadre du diagnostic précoce et du dépistage, en particulier chez les sujets gros fumeurs, reste à ce jour, un sujet de débat.

Dans le cancer du sein qui, représente la principale cause de décès chez les femmes dans le monde, le taux de survie à 5 ans est de 99% pour les patientes diagnostiquées, à un stade précoce, dans les formes localisées sans atteinte ganglionnaire, contre 27% pour celles avec atteinte métastatique [10]. L'intérêt de l'analyse de l'ADNtc serait donc, de dépister les anomalies oncogénétiques liées au cancer du sein bien avant qu'il soit détectable par mammographie, car à ce stade le cancer est potentiellement curable. Cependant, la détection de l'ADNtc dans les stades précoces est difficile car la fraction ADNtc représente moins de 0,1 % contre 10 %, et ~1 % respectivement, chez les patientes atteintes de tumeurs avancées ou métastatiques, et celles avec cancer avancé non métastatique.

La détection de l'ADNtc dans les stades précoces du cancer nécessite donc des technologies ultra-sensibles, telles que, le séquençage de nouvelle génération (NGS, en Anglais Next Generation Sequencing) et la PCR numérique en gouttelettes (ddPCR, en Anglais droplet digital PCR). Cette dernière est actuellement le gold-standard pour l'évaluation de l'ADNtc en raison de son excellente sensibilité et de sa simplicité [11].

L'analyse du profil de méthylation peut constituer une solution dans certaines situations. En effet, dans une étude ayant concerné 53 patientes atteintes d'un cancer du sein localisé, Moss et al [12], ont identifié trois régions génomiques qui sont uniquement et largement non méthylées (krt19, znf296) ou largement méthylées (lmx1b), sur les sites CpG (séquence de base est CG : cytosine-phosphate-guanine), amplifiés dans les cellules épithéliales du sein et dont l'augmentation de leurs concentrations pourrait impliquer un processus pathologique, tel que, le cancer du sein. Ces locus peuvent servir de bio marqueurs potentiels spécifiques de l'épithélium mammaire et être utilisés dans la détection précoce du cancer du sein. Cependant, à ce jour, les applications diagnostiques et de dépistage sur ADNtc sont encore en plein essor. L'ADNtc est le plus souvent utilisé pour identifier et suivre les variantes génétiques de la maladie métastatique [13].

2.2. Suivi de la réponse thérapeutique études.

La cinétique de l'ADNtc, notamment, dans les six premiers mois de traitement, permet de prédire l'efficacité de la thérapeutique, et de déceler les patients « bons répondeurs » [14]. En effet, la décroissance précoce du taux de l'ADNtc, entre le premier et le second et/ou le troisième cycle de chimiothérapie, est bien corrélée à une meilleure réponse tumorale et une plus longue survie sans progression (SSP) et survie globale (SG) [15-17].

Dans l'étude PLACOLL, une diminution de plus de 80% de la concentration en ADNtc chez les patients atteints de CCR et traités par chimiothérapie en première intention, ou en deuxième ligne, entre la première et la deuxième ou troisième cure, permettait de prédire un meilleur taux de réponse, à la 6ème cure de chimiothérapie (taux de réponse 47,1% vs 0%; P=0,03), et une meilleure SSP (HR=0,13, IC95% [0,03-0,54], P=0,005) [16].

Dans une cohorte de 40 patientes traitées par chimiothérapie néo-adjuvante pour un cancer du sein triple-négatif, Riva et al [18], ont constaté que celles ayant rechuté durant les vingt-quatre premiers mois de traitement, présentaient des cinétiques de décroissance plus lentes de l'ADNtc, que les patientes n'ayant pas rechuté. Il existe donc un intérêt potentiel de l'ADNtc, comme marqueur pronostique précoce, au cours de la chimiothérapie néo-adjuvante. De l'ADNtc peut également être détectable à un taux élevé, en fin de chimiothérapie adjuvante ou après la chirurgie, suggérant donc, l'existence d'une maladie résiduelle. Une étude anglaise a rapporté que la détection d'ADNtc, en postopératoire, était suivie dans les vingt-quatre premiers mois de suivi de rechutes métastatiques [19]. Dans une étude suédoise, Olsson et al [20], ont révélé que l'évolution métastatique pouvait être détectée précocement (médiane 11 mois), par l'analyse de l'ADNtc, avant le diagnostic clinique de récurrence métastatique. La détection de mutations activatrices de l'epithelial growth factor receptor (EGFR), dans l'ADNtc, a été démontrée chez des patients atteints de CBNPC. Une diminution de la fréquence allélique de la mutation activatrice de l'EGFR, a été observée, dès le 4ème jour de traitement avec un anti EGFR (Erlotinib), chez 95% des patients [21]. Cependant, certains patients échappent à cette efficacité et développent des résistances. L'émergence de clones cellulaires de résistance au traitement peut être décelée bien avant la progression tumorale morphologique. Il serait donc intéressant de faire le monitoring de l'ADNtc, afin de permettre l'adaptation des traitements en fonction de l'apparition des résistances.

En effet, la mise en évidence, avant la progression radiologique, d'événements moléculaires émergents, en particuliers, les mutations RAS (Rat sarcoma), dans le plasma des patients traités par anti-EGFR à été confirmée dans plusieurs études [15, 22,23].

La détection de la mutation T790M pourrait être utile dans le cadre de la prescription d'ITK-EGFR, de 3ème génération, avec un monitoring non invasif [24]. Des déterminants génomiques de réponse ou de résistance à l'immunothérapie ont également été identifiés. Les mutations KRAS confèrent, surtout en association avec les mutations de TP53, une plus grande sensibilité à l'immunothérapie. La mutation du gène PTEN (phosphatase and tensin homolog) et, à l'inverse, les mutations inactivatrices de STK11 (serine/threonine kinase 11), sont associées, à une résistance à l'immunothérapie [25, 26]. Dans une étude récente ayant porté sur 97 patients atteints d'un CBNPC de stade avancé (stade IIIB/IV), et débutant une immunothérapie en seconde ligne après un échec de la chimiothérapie, Guibert et al [26] ont

étudié la corrélation entre les variations précoces du taux d'ADNtc, et la réponse au traitement. Les patients dont la concentration plasmatique de l'ADNtc diminuait dans le premier mois avaient une bonne réponse à l'immunothérapie que ceux dont la concentration augmentait (médiane de SSP 10 vs 02 mois).

Dans le cancer du sein, plusieurs altérations génétiques se sont avérées significativement associées à une bonne efficacité du traitement (FRS2, MDM2, PRKCA, ERBB2, AKT1 E17K, BRCA 1/2), d'autre pourraient, à l'inverse, indiquer une potentielle résistance au traitement (CHD4, ATM, CDKN2A/2B/2C).

L'analyse de l'ADNtc permet également, la caractérisation de sous-clones ayant un rôle potentiel dans la résistance au traitement et l'évolution métastatique. Dans ce contexte, Abbosh et al [27], ont démontré la possibilité d'établir à partir de l'ADNtc dans les cancers du poumon localisés, des arbres phylogénétiques modélisant l'apparition et l'évolution des différents sous-clones qui peuvent conduire à la rechute.

La stratégie de l'identification précoce de mutations de résistance aux traitements ciblés, grâce à l'ADNtc, pourrait ainsi, aider dans un avenir proche à proposer des traitements, selon les différents sous-clones tumoraux détectables, tout au long de la maladie métastatique.

2.3. Bio marqueur pronostique et prédictif

La détection et l'analyse de l'ADNtc semblent être de bons marqueurs pronostiques et prédictifs de l'évolution de la maladie. L'élévation progressive ou brutale de son taux permet de prédire une rechute et d'anticiper l'apparition de métastases qui ne seraient pas décelables par l'imagerie [28].

Pietrasz et al [29], ont montré que les patients avec un taux d'ADNtc inférieur à la médiane présentaient une SSP et SG significativement meilleures comparativement à ceux avec un taux supérieur, respectivement 5,7 vs 2,2 [p<0,001] et 12,2 vs 4,5 mois [p<0,001].

Dans le CCR, les mutations activatrices des gènes KRAS, présentes dans environ 55 % des cas, ont une valeur prédictive négative pour l'efficacité des traitements ciblant l'EGFR [30]. La présence de ces mutations constitue donc une contre-indication absolue pour la prescription de la thérapie ciblée anti-EGFR (anticorps monoclonaux anti-EGFR : cetuximab « Erbitux® » et panitumumab « Vectibix® ») [31,32].

La mutation BRAF (V600E) représente, un facteur de mauvais pronostic [32]. Il est également reconnu que la présence de mutations sur les exons 2, 3 et 4 de NRAS sur l'ADNtc, est un facteur prédictif de résistance aux traitements anti-EGFR. Bachet et al [33], ont rapporté que l'absence de métastases hépatiques avec un taux indétectable d'ADNtc, étaient les facteurs les plus associés au bon pronostic. L'ADNtc pourrait également être utile pour identifier les patients de mauvais pronostic et ainsi prédire précocement la rechute après chirurgie. En effet, les patients avec récurrence tumorale [15,34-36].

Dans une étude portant sur 95 patients opérés d'un CCR de stade III, et recevant une chimiothérapie adjuvante, Tie et al [37], ont confirmé que l'ADNtc était un marqueur pronostique permettant de définir un sous-ensemble de patients qui reste à haut risque de récurrence avant le début de la chimiothérapie adjuvante (HR = 3,7 ; $p = 0,0014$) et à la fin de celle-ci (HR = 7,1 ; $p < 0,001$). Les travaux de Garcia et al [19], ont également déterminé l'ADNtc comme un puissant facteur prédictif pour une rechute métastatique dans le cancer du sein (HR 25,1 ; IC, 4,08 à 130,5 ; $P < 0,0001$).

Dans le CBNPC, une corrélation entre la quantité de l'ADNtc et le pronostic, a été mise en évidence dans une étude ayant porté sur 218 patients atteints d'un CBNPC à un stade avancé [38]. En effet, Tisso et al [38], ont indiqué que les patients ayant des taux plus élevés au diagnostic, avaient un mauvais pronostic, avec une moins bonne SG, que ceux ayant un taux plus faible. L'usage de l'ADNtc comme outil d'évaluation pronostique et thérapeutique du cancer du poumon non adénocarcinomeux et non à petites cellules, a été validé par les sociétés savantes [39]. La valeur pronostique de l'ADNtc a été également décrite, dans le cancer du sein. L'identification précoce des résistances thérapeutiques et une modification rapide du traitement sont essentielles pour améliorer le pronostic. Les travaux de Dawson portés sur 20 patientes traitées par chimiothérapie pour un cancer du sein métastatique, ont montré que, dans plus de 50 % des cas, l'augmentation des concentrations d'ADNtc, était corrélée à une progression tumorale détectée en moyenne cinq mois avant la progression scannographique. De plus, le niveau de l'ADNtc plasmatique était plus prédictif de la progression de la maladie que les marqueurs tumoraux biochimiques traditionnels (cancer antigène 15-3 ou antigène carcinoembryonnaire) [40].

Dans une récente méta-analyse ayant recensé 263 publications, les données de 8 études (3,0 %), portant sur 739 patients ont été analysées pour déterminer l'association de l'ADNtc avec la survie sans cancer ou sans récurrence (SSR), et la SSP dans le cancer du sein précoce, localisé et métastatique. La SSR était significativement plus faible chez les patients avec un taux plasmatique d'ADNtc élevé (HR, 4,44 ; IC à 95 %, 2,29-8,61 ; $P < 0,001$) [41].

L'ADNtc peut être le siège de plusieurs types mutations de résistance, tels que, les mutations activatrices du gène du récepteur aux œstrogènes (en anglais Estrogen Receptor 1) (ESR1), qui peuvent témoigner de l'existence de différents clones tumoraux correspondant, éventuellement à des métastases distinctes [42]. Il s'agit d'une mutation qui entraîne une activation constitutive du récepteur en l'absence de ligand, pouvant expliquer l'échappement tumoral aux stratégies de privation ostrogénique. Sa présence dans l'ADNtc est considérée comme un facteur indépendant de mauvais pronostic [43]. L'émergence des mutations ESR1 pendant le traitement par un inhibiteur de l'aromatase (IA), annonce une résistance au traitement. La prévalence des cancers du sein avancés exposés auparavant aux IA est élevée 25-40% [44-47].

Dans une série de 171 patients atteints de cancer du sein métastatique et ayant reçu un traitement de déprivation hormonale par IA, 36% des patientes présentant une mutation du gène ESR1, répondaient mal au traitement [48]. Dans l'essai thérapeutique BOLERO2 qui a inclus des patientes résistantes à l'hormonothérapie, 28% des patientes, avaient déjà une mutation du gène ESR1 détectable dans l'ADNtc à l'entrée dans l'étude [49]. Une étude prospective a montré un taux plus important estimé à 56,4 % avec une médiane d'apparition de 6,7 mois avant la progression clinique [50].

Conclusion

L'analyse de l'ADN tumoral circulant offre de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de cancers, notamment, avec le développement de techniques moléculaires très sensibles, telles que, la ddPCR, et le NGS.

Son caractère non-invasif est un atout majeur qui permet de réaliser des analyses sanguines, si besoin répétées dans le temps, ce qui pourrait être une bonne alternative à la biopsie solide. Cet avantage qu'offre l'ADNtc, permet de mieux refléter l'hétérogénéité intra tumorale, stratifier le risque de rechute et personnaliser le suivi des patients. La mise en place de cette analyse en routine serait donc, une avancée majeure en oncologie clinique.

Néanmoins, une standardisation des méthodes de détection et le respect des conditions pré-analytiques, selon les recommandations internationales s'avèrent nécessaires, afin de limiter la contamination par de l'ADN normal des cellules du sang périphérique et mettre en évidence, de manière optimale des altérations génétiques spécifiques de l'ADN.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

Références bibliographiques

1. Moati É, Taly V, Taieb J, Laurent-Puig P, Zaanan A. Rôle de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge des patients atteints d'un cancer colorectal. *Hépatogastro & Oncologie Digestive*. 2018;25(4):364-70.
2. Thierry A, El Messaoudi S, Gahan P, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and metastasis reviews*. 2016;35(3):347-76.
3. Thierry A, Tanos R. Liquid biopsy: a possible approach for cancer screening. *médecine/sciences*. 2018;34(10):824-32.
4. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., Altman, D. G., & Prisma Group. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS medicine*, 6(7), e1000097.
5. Castelli J, Cabel L, Bidard F-C, Duvergé L, Bachet J-B. ADN tumoral circulant: principes, applications actuelles en radiothérapie et développement futur. *Cancer/Radiothérapie*. 2018;22(6-7):653-9.
6. Thierry AR, Moulrière F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rollet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature medicine*. 2014;20(4):430-5.
7. Douillard J-Y, Ostoros G, Cobo M, Ciuleanu T, Cole R, McWalter G, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *Journal of Thoracic Oncology*. 2014;9(9):1345-53.
8. Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018;359(6378):926-30.
9. Church TR, Wandell M, Lofton-Day C, Mongin SJ, Burger M, Payne SR, et al. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*. 2014;63(2):317-25.
10. Siegel R, Miller KD and Jemal A (2020) Cancer statistics. *CA-Cancer J Clin*. 2020;70(1):7-30.
11. Alba-Bernal A, Lavado-Valenzuela R, Domínguez-Recio ME, Jiménez-Rodríguez B, Queipo-Ortuño MI, Alba E, et al. Challenges and achievements of liquid biopsy technologies employed in early breast cancer. *EBioMedicine*. 2020;62:103100.
12. Moss J, Zick A, Grinshpun A, Carmon E, Maoz M, Ochana B, et al. Circulating breast-derived DNA allows universal detection and monitoring of localized breast cancer. *Annals of Oncology*. 2020;31(3):395-403.
13. Croessmann S, Park BH. Circulating Tumor DNA in Early-Stage Breast Cancer: New Directions and Potential Clinical Applications. *Clinical Advances in Hematology & Oncology: H&O*. 2021;19(3):155-61.
14. Vallée A, Audigier-Valette C, Herbreteau G, Merrien J, Tessonnier L, Théoleyre S, et al. Rapid clearance of circulating tumor DNA during treatment with AZD9291 of a lung cancer patient presenting the resistance EGFR T790M mutation. *Lung Cancer*. 2016;91:73-4.
15. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science translational medicine*. 2016;8(346):346ra92-ra92.
16. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D, Siauve N, Didelot A, Sarafan-Vasseur N, et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clinical Cancer Research*. 2017;23(18):5416-25.
17. Morelli M, Overman M, Dasari A, Kazmi S, Mazard T, Vilar E, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of Oncology*. 2015;26(4):731-6.
18. Riva F, Bidard F-C, Houy A, Saliou A, Madic J, Rampanou A, et al. Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Clinical chemistry*. 2017;63(3):691-9.
19. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, Ng C, Hrebien S, Cutts RJ, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Science translational medicine*. 2015;7(302):302ra133-302ra133.
20. Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang MHE, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO molecular medicine*. 2015;7(8):1034-47.
21. Marchetti A, Palma JF, Felicioni L, De Pas TM, Chiari R, Del Grammasstro M, et al. Early prediction of response to tyrosine kinase inhibitors by quantification of EGFR mutations in plasma of NSCLC patients. *Journal of Thoracic Oncology*. 2015;10(10):1437-43.
22. Spindler KLG, Pallisgaard N, Andersen RF, Jakobsen A. Changes in mutational status during third-line treatment for metastatic colorectal cancer—Results of consecutive measurement of cell free DNA, KRAS and BRAF in the plasma. *International journal of cancer*. 2014;135(9):2215-22.
23. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nature medicine*. 2015;21(7):795-801.
24. Sequist LV, Goldman JW, Wakelee HA, Camidge DR, Yu HA, Varga A, et al. Efficacy of rociletinib (CO-1686) in plasma-genotyped T790M-positive non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts). *American Society of Clinical Oncology*; 2015.
25. Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, Hellmann MD, Awad MM, Gainor JF, et al. STK11/LKB1 mutations and PD-1 inhibitor resistance in KRAS-mutant lung adenocarcinoma. *Cancer discovery*. 2018;8(7):822-35.
26. Guibert N, Jones G, Beeler JF, Plagnol V, Morris C, Mourlanette J, et al. Targeted sequencing of plasma cell-free DNA to predict response to PD1 inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2019;137:1-6.
27. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017;545(7655):446-51.
28. Wechsler J. Les biopsies liquides: quel est leur apport en oncologie? *La Revue de Médecine Interne*. 2018;39(11):886-90.

29. Pietrasz D, Pécuchet N, Fabre E, Blons H, Chevalier L, Taly V, et al. Quel avenir pour l'ADN tumoral circulant? État des lieux et perspectives dans les cancers colorectaux, pulmonaires non à petites cellules et pancréatiques. *Bulletin du Cancer*. 2016;103(1):55-65.
30. Chibaudel B, Tournigand C, Bonnetain F, Richa H, Benetkiewicz M, André T, et al. Therapeutic strategy in unresectable metastatic colorectal cancer: an updated review. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2015;7(3):153-69.
31. Huang M-Y, Liu H-C, Yen L-C, Chang J-Y, Huang J-J, Wang J-Y, et al. Detection of activated KRAS from cancer patient peripheral blood using a weighted enzymatic chip array. *Journal of translational medicine*. 2014;12(1):1-9.
32. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken J, Aderka D, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 2016;27(8):1386-422.
33. Bachet J, Bouché O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia M, Meurisse A, et al. RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEO RASANC prospective multicenter study. *Annals of Oncology*. 2018;29(5):1211-9.
34. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*. 2008;14(9):985-90.
35. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, et al. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nature communications*. 2015;6(1):1-6.
36. Tie J, Cohen JD, Wang Y, Li L, Christie M, Simons K, et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut*. 2019;68(4):663-71.
37. Tie J, Cohen J, Wang Y, Lee M, Wong R, Kosmider S, et al. Serial circulating tumor DNA (ctDNA) analysis as a prognostic marker and a real-time indicator of adjuvant chemotherapy (CT) efficacy in stage III colon cancer (CC). *American Society of Clinical Oncology*; 2018.
38. Tissot C, Toffart A-C, Villar S, Souquet P-J, Merle P, Moro-Sibilot D, et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *European Respiratory Journal*. 2015;46(6):1773-80.
39. Kalemkerian GP, Narula N, Kennedy EB, Biermann WA, Donington J, Leigh NB, et al. Molecular testing guideline for the selection of patients with lung cancer for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: American Society of Clinical Oncology Endorsement of the College of American Pathologists/International Association for the Study of Lung Cancer/Association for Molecular Pathology Clinical Practice Guideline Update. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2018;36(9):911.
40. Dawson S-J, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(13):1199-209.
41. Cullinane C, Fleming C, O'Leary DP, Hassan F, Kelly L, O'Sullivan MJ, et al. Association of circulating tumor DNA with disease-free survival in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *JAMA network open*. 2020;3(11):e2026921-e.
42. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Beaney M, et al. Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer. 2016.
43. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, Cutts RJ, Pearson A, Tarazona N, et al. Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Science translational medicine*. 2015;7(313):313ra182-313ra182.
44. Allouchery V, Beaussire L, Perdrix A, Sefrioui D, Augusto L, Guillemet C, et al. Circulating ESR1 mutations at the end of aromatase inhibitor adjuvant treatment and after relapse in breast cancer patients. *Breast Cancer Research*. 2018;20(1):1-5.
45. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, Hrebien S, Huang X, Fenwick K, et al. The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbociclib plus fulvestrant in the PALOMA-3 trial. *Cancer discovery*. 2018;8(11):1390-403.
46. Paoletti C, Schiavon G, Dolce EM, Darga EP, Carr TH, Geradts J, et al. Circulating biomarkers and resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancers: correlative results from AZD9496 oral SERD Phase I trial. *Clinical Cancer Research*. 2018;24(23):5860-72.
47. Turner NC, Swift C, Kilburn L, Fribbens C, Beaney M, Garcia-Murillas I, et al. ESR1 Mutations and Overall Survival on Fulvestrant versus Exemestane in Advanced Hormone Receptor-Positive Breast Cancer: A Combined Analysis of the Phase III SoFEA and EFECT Trials. *Clinical Cancer Research*. 2020;26(19):5172-7.
48. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, Beaussire L, Delacour J, Calbrix C, et al. Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget*. 2016;7(46):74448.
49. Chandarlapaty S, Chen D, He W, Sung P, Samoila A, You D, et al. Prevalence of ESR1 mutations in cell-free DNA and outcomes in metastatic breast cancer: a secondary analysis of the BOLERO-2 clinical trial. *JAMA oncology*. 2016;2(10):1310-5.
50. Fribbens C, Murillas IG, Beaney M, Hrebien S, O'Leary B, Kilburn L, et al. Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Annals of Oncology*. 2018;29(1):145-53.

