

# Place des CTC et de l'ADN circulant dans la prise en charge du cancer du sein

## CTC and ctDNA in Breast Cancer Management

V. Allouchery · L. Augusto · F. Clatot

Reçu le 15 mai 2019 ; accepté le 15 juillet 2019  
© Lavoisier SAS 2019

**Résumé** Si la présence de cellules tumorales circulantes (CTC) et d'ADN tumoral circulant (ADNtc) est connue de longue date, seuls les progrès technologiques récents ont permis d'évaluer l'intérêt de cette approche dans le cancer du sein. La détection de CTC, tant pour les cancers du sein localisés que métastatiques, est un facteur de mauvais pronostic établi, mais qui ne permet pas de proposer de prise en charge spécifique. L'usage de l'ADNtc nécessite des validations prospectives, mais semble particulièrement prometteur pour la recherche de maladie résiduelle ou l'identification de clones tumoraux porteurs de mutations (*PI3KCA*, *ESR1*) permettant de prédire l'efficacité ou la résistance thérapeutique.

**Mots clés** Cancer du sein · Cellules tumorales circulantes · ADN circulant tumoral

**Abstract** It has been known for a long time that circulating tumor cells (CTC) as well as circulating tumor DNA (ctDNA) can be detected. However, only recent technical advances allowed evaluating the interest of CTC and ctDNA in breast cancer. In both early and metastatic breast cancers, CTC detection is a recognized factor for poor outcome. Nevertheless, CTC detection does not impact cancer management yet. The use of ctDNA in daily practice will require validation by prospective data. But ctDNA seems particularly promising both for residual disease evaluation and identification of

tumor clones harbouring mutations (*PI3KCA*, *ESR1*) and may predict efficacy or resistance to treatments.

**Keywords** Breast cancer · Circulating tumor cells · Circulating tumor DNA

## Introduction

Le cancer du sein est chez la femme le cancer le plus fréquent et la première cause de décès par cancer [1]. Il s'agit d'une pathologie hétérogène dont l'évolution clinique est sous-tendue par des modifications moléculaires elles-mêmes influencées par les traitements. L'usage de marqueurs non invasifs pour suivre, voire prédire, l'évolution du cancer ou adapter les thérapeutiques a fait l'objet de nombreux travaux au cours de la dernière décennie. La présence de cellules tumorales circulantes (CTC) libérées à partir de la tumeur primaire et/ou des sites métastatiques a été rapportée pour la première fois en 1869 [2]. Ces CTC sont classiquement présentes en faible quantité dans la circulation sanguine [3] (1 CTC/ml de sang) et leur durée de vie y est limitée [4] (demi-vie : 1–2,4 heures). L'ADN libre circulant (ADNlc) est pour sa part libéré par les cellules apoptotiques et nécrotiques (tumoraux ou non tumoraux) [4]. En cas de cancer, de l'ADN tumoral circulant (ADNtc), détectable grâce à sa taille modérée (150–200 paires de bases) et à des altérations génétiques spécifiques, peut également être identifié. L'objectif de cette revue est de discuter des intérêts potentiels et des limites de ces marqueurs aux différents stades évolutifs du cancer du sein.

## Cellules tumorales circulantes

### Concept biologique et méthodes de détection

Au cours du développement tumoral, certaines cellules cancéreuses peuvent se détacher des tumeurs solides et infiltrer

---

V. Allouchery (✉) · L. Augusto (✉) · F. Clatot (✉)  
Département d'oncologie médicale, centre Henri-Becquerel,  
F-76000 Rouen, France  
e-mail : violette.allouchery@chb.unicancer.fr,  
laetitia.augusto@chb.unicancer.fr, florian.clatot@chb.unicancer.fr

F. Clatot  
Inserm 1245, groupe IRON,  
Centre normand de médecine génomique,  
Normandie Université, UNIROUEN, CHU de Rouen,  
F-76000 Rouen, France

la circulation sanguine. Identifier, isoler et caractériser les CTC est aujourd'hui au cœur de nombreuses recherches, car elles représentent une source de matériel tumoral obtenu de manière non invasive. L'identification des CTC met à profit les différences entre les CTC des cellules sanguines normales, telles que leurs propriétés physiques (taille, densité) ou leurs propriétés biologiques (expression de protéines de surface). Les CTC étant très rares [3], une première étape d'enrichissement est nécessaire avant les étapes de détection et de caractérisation. Deux principales stratégies d'isolement de ces cellules existent actuellement : l'isolement par immunosélection positive ou négative (déplétion) et l'isolement de ces cellules en fonction de leur taille.

Les méthodes d'enrichissement par sélection positive reposent sur une immunoséparation à l'aide de billes magnétiques conjuguées à un anticorps dirigé contre des antigènes spécifiques des cellules tumorales. Les méthodes d'immunosélection négative reposent pour la plupart sur un système de déplétion des cellules non tumorales, porteuses d'antigènes spécifiques (tels que des marqueurs spécifiques des leucocytes).

Les méthodes reposant sur les caractéristiques physiques des CTC utilisent notamment un système de filtration séparant les cellules selon leur taille. En effet, la plupart des CTC sont plus volumineuses que les cellules hématopoïétiques normales. Après les étapes d'enrichissement et d'isolement, les CTC peuvent être comptées [5].

### Utilisation des CTC comme marqueur pronostique des cancers du sein localisés

En situation néoadjuvante, une large méta-analyse incluant 21 études et 2 156 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante (CTN) a analysé l'évolution du nombre de CTC au cours de la séquence thérapeutique. Selon les différents seuils considérés ( $\geq 1$  /  $\geq 2$  /  $\geq 5$  CTC), la présence de CTC était de 25/13/6 % à l'inclusion, de 17/6/3 % après le début de la CTN, de 15/5/1 % avant la chirurgie et de 11/4/1 % après la chirurgie ( $p < 0,0001$ ). La réponse anatomopathologique complète (PCR) était obtenue chez 24 % des patientes, mais n'était pas corrélée au nombre de CTC. En revanche, la détection de plus d'une CTC à l'inclusion était un facteur de mauvais pronostic en survie globale (SG), en survie sans métastase (SSM) et en survie sans récurrence (SSR) [ $p < 0,0001$ ]. Des résultats similaires étaient observés en utilisant d'autres seuils ( $\geq 2$  et  $\geq 5$  CTC) et/ou des points temporels plus tardifs (après le début de la CTN et avant la chirurgie) [6]. En situation adjuvante, la principale étude prospective multicentrique a été publiée en 2014 et s'est intéressée à la recherche de CTC chez 2 026 patientes présentant un cancer du sein localisé avant chimiothérapie adjuvante et chez 1 492 patientes après chimiothérapie. La présence de CTC a été détectée chez 21,5 % des patientes avant

la chimiothérapie et 22,1 % après la chimiothérapie. La présence de CTC avant comme après la chimiothérapie adjuvante s'avérait être associée à une diminution de la SSR ( $p < 0,0001$ ), de la SSM ( $p < 0,001$ ), de la survie spécifique ( $p = 0,008$ ) et de la SG ( $p = 0,0002$ ). L'analyse multivariée a permis de confirmer la valeur pronostique indépendante de la présence de CTC [7]. À noter cependant qu'une étude comparable portant sur 1 221 patientes n'a pas permis de confirmer ces résultats [8].

### Utilisation des CTC dans la prise en charge des cancers du sein avancés

La principale étude prospective multicentrique a inclus 468 patientes suivies pour un cancer du sein métastatique (CSM). À l'inclusion, 205 (42 %) patientes avaient un taux supérieur ou égal à 5 CTC/7,5 ml. Chez ces patientes, la SSP médiane était significativement diminuée à 4,8 versus 7,6 mois ( $p < 0,001$ ). De même, la SG médiane était de 18,01 mois en cas de CTC+, alors qu'elle était non atteinte en l'absence de CTC ( $p < 0,001$ ) [9]. Plus récemment une méta-analyse regroupant 24 études et 3 701 patientes suivies pour CSM a montré que la présence de plus de 5 CTC/7,5 ml était associée à une diminution de la SSR (RR = 0,64 ; IC 95 % = 0,56–0,73) et de la SG (RR = 0,69 ; IC 95 % = 0,64–0,75). Les auteurs ont également rapporté une détection de CTC de manière plus fréquente chez les patientes présentant une tumeur primaire HER2 amplifiée [10]. Par ailleurs, une autre étude menée par Reyal et al. a confirmé la valeur pronostique des CTC avant traitement, mais a également montré que la variation du taux de CTC (avant le début du traitement et avant le second cycle de chimiothérapie) était corrélée à la SSP et à la SG et représentait ainsi un indicateur précoce du bénéfice du traitement [11]. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par une méta-analyse d'études européennes sur environ 2 000 patientes [12]. Une fois établie la valeur pronostique du taux élevé de CTC, la question suivante fut de savoir s'il était possible de proposer une modification thérapeutique précoce pour les patientes conservant des CTC malgré une première ligne de chimiothérapie. Dans ce contexte, l'essai clinique SWOG 0500 a inclus 595 patientes suivies pour un CSM traité par chimiothérapie de première ligne. Une première détection des CTC était réalisée avant les premiers et seconds cycles de chimiothérapie. En cas de persistance de CTC après le premier cycle ( $n = 123$ ), une randomisation avait lieu entre poursuite de la chimiothérapie de première intention ou relais vers une seconde ligne. La SSP était alors respectivement de 3,5 et 4,6 mois ( $p = 0,64$ ), et la SG médiane de respectivement 10,7 et 12,5 mois ( $p = 0,98$ ). Ainsi, un changement précoce de traitement n'a pas permis de compenser la résistance précoce à une première ligne thérapeutique [13]. À la suite de ces résultats négatifs, l'essai

CIRCE qui visait à évaluer l'utilité d'une stratégie similaire en troisième ligne d'un CSM a été interrompu.

Un autre essai multicentrique [14] avait pour objectif d'évaluer l'intérêt médical et médico-économique de la prise en compte des CTC pour le choix du type de traitement de première ligne (hormonothérapie ou chimiothérapie) pour les patientes atteintes d'un CSM RH+. Un prélèvement sanguin était effectué pour déterminer le nombre de CTC avant le début du traitement de première ligne. Dans le bras standard, le choix du traitement était fondé sur les critères habituels et laissé à l'appréciation du médecin. Dans le bras expérimental, le taux de CTC était évalué et transmis au médecin, puis le choix du traitement (hormonothérapie versus chimiothérapie) était laissé à son appréciation. Les résultats non encore publiés pour l'heure, mais communiqués au San Antonio Breast Cancer Symposium de décembre 2018, ont montré que la SSP était significativement plus élevée pour les cas où le taux de CTC élevé a conduit le médecin à prescrire une chimiothérapie à la place d'une hormonothérapie [15].

Ainsi, le taux de CTC est un marqueur validé cliniquement : il constitue un marqueur pronostique indépendant chez les patientes atteintes de CSM. Néanmoins, l'absence de valeur prédictive objectivée suggère l'absence d'utilité clinique des CTC pour guider la stratégie thérapeutique.

### Intérêt des CTC au dépistage primaire et secondaire

Au-delà des études de grandes ampleurs menées pour évaluer l'intérêt des CTC pour des cancers invasifs identifiés, plusieurs travaux ont exploré le possible intérêt des CTC dans la détection précoce des cancers. Une étude observationnelle de 265 patients a rapporté de façon prospective la présence de CTC chez des patients asymptomatiques mais présentant des facteurs de risque de cancer (tabagisme, antécédents familiaux de cancer, contraception orale, hormonothérapie substitutive, âge supérieur à 50 ans chez les hommes). Au moins une CTC a été détectée chez 50 % des patients ( $n = 132/265$ ), permettant d'identifier des lésions cancéreuses précoces chez 20 % d'entre eux ( $n = 24$ ). Cependant, seules deux femmes présentaient un cancer du sein, la majorité étant des hommes porteurs de cancer de prostate [16].

En termes de dépistage secondaire, une étude prospective menée sur 353 patientes suivies dans le cadre d'un cancer du sein RH+ avait pour objectif de déterminer si la présence de CTC obtenues cinq ans après le diagnostic était associée à une rechute tardive de cancer du sein RH+. Les résultats objectivaient un taux de rechute par personne et par année de suivi de 21,4 % dans le groupe CTC+ versus 2 % dans le groupe CTC- (HR = 13,1 ; IC 95 % = 4,7–36,3). Ainsi, la détection de CTC cinq ans après le diagnostic de cancer du sein RH+ fournit des informations pronostiques indépendantes sur la survenue de récurrences tardives, traduisant l'intérêt de cette approche pour

stratifier le risque de rechute tardive et adapter la prise en charge diagnostique puis thérapeutique précoce [17].

## ADN tumoral circulant

### Concept biologique et méthodes de détection

Le plasma sanguin peut contenir une petite quantité d'ADNlc, à la concentration de quelques nanogrammes par millilitre [18,19]. Sa présence est physiologique, mais sa concentration augmente significativement lors des processus tumoraux, et une fraction de cet ADN libre est alors, au moins partiellement, d'origine tumorale : on parle d'ADNtc. La détection de l'ADNtc représente un véritable challenge puisque l'ADNtc est dilué dans l'ADNlc. En effet, les niveaux d'ADNtc mesurés par la fraction de variant allélique (proportion de copies d'ADN mutants sur le taux d'ADNlc total) varient profondément, de plus de 25 % à moins de 0,01 %. Cette large variation dépend aussi bien du type tumoral (fréquence élevée de détection d'ADNtc dans les cancers du côlon, de la vessie et de l'ovaire contre une détection très rare dans les tumeurs cérébrales de moins de 10 %) que du stade localisé ou métastatique [18,20].

Cette importante variation des niveaux d'ADNtc requiert des méthodes de haute précision, très sensibles, et qui se sont développées principalement depuis une dizaine d'années. Les méthodes classiques fondées sur la PCR en temps réel et la détection des mutations à l'aide de sondes (Taq-Man<sup>®</sup>) ou amorces spécifiques (technologie CastPCR<sup>™</sup>) ont des seuils de sensibilité de l'ordre de 0,1–1 % [21]. Ces technologies d'analyse globale sont simples à mettre en œuvre et compatibles sans optimisation technologique à l'analyse en routine des plasmas. Mais elles présentent des désavantages dans le cas de mélanges complexes. En effet, l'ADN issu de plasma est un mélange disproportionné entre de l'ADN issu de cellules normales et cancéreuses. Si l'ADN tumoral ne représente qu'une infime partie de cet ADN total libre circulant, alors il risque d'échapper à l'analyse. Le développement de techniques comme la PCR digitale (dPCR) [limite de détection théorique de 0,001–0,05 % d'ADN muté] [22] constitue une méthode idéale pour la détection de mutations récurrentes, telles que *PIK3CA* ou *ESR1*. Les avancées technologiques récentes pour le séquençage haut débit (NGS) ont permis d'importants gains de sensibilité (0,1 % environ), avec l'avantage de rechercher des mutations sur des dizaines de locus en parallèle, ce qui permet de proposer des panels d'analyse communs à plusieurs types de cancers différents [23].

À ce jour, les cinq techniques d'analyse d'ADNtc les plus utilisées sont la dPCR, le BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics), la SafeSeqs (Safe Sequencing system), l'IDES (Integrated Digital Error Suppression) et le

Duplex Sequencing [24]. Par ailleurs, l'ADNtc s'avère être de taille moindre que l'ADNlc. Une étude récente a mis à profit ce différentiel de taille en objectivant une amélioration notable de détection de l'ADNtc en sélectionnant des fragments de taille prédéfinie de 90 à 150 paires de bases [25].

Au-delà de méthodes de détection ultrasensibles applicables sur plasma, l'identification de l'ADNtc parmi l'ADNlc impose de connaître des altérations génomiques spécifiques du cancer. Or, le cancer du sein est une maladie hétérogène, au niveau moléculaire et clinique, traduisant l'absence d'anomalie génomique unique. Les principales altérations génomiques propres à chaque sous-type moléculaire et donc susceptibles d'être employées pour la recherche au niveau circulant sont précisées dans le tableau 1.

### ADNtc dans la prise en charge des cancers du sein localisés

#### Valeur pronostique de l'ADNtc dans les cancers du sein localisés

Le niveau de preuve des études portant sur l'ADN circulant est plus faible que pour les études fondées sur les CTC. Un taux élevé d'ADNlc a été associé à une SSP et à une SG

médiocres [26,27]. En revanche, la valeur pronostique de l'ADNtc au diagnostic est moins claire. En se fondant sur la recherche de mutations *PIK3CA*, Oshiro et al. ont montré que parmi les 110 patientes (35 % des patientes testées) présentant une mutation au diagnostic, une mutation circulante pouvait être retrouvée chez 25 patientes et qu'une quantité élevée d'ADNtc était associée à une SSP et à une SG plus faibles que pour les patientes ayant un taux faible d'ADNtc [28]. Mais le faible nombre de patientes concernées empêche toute conclusion définitive. Par ailleurs, Garcia-Murillas et al. n'ont pas trouvé de valeur pronostique de l'ADNtc au diagnostic parmi les 55 patientes évaluées en prospectif [29]. Plus récemment, la valeur pronostique de l'ADNtc au diagnostic a été renforcée chez des patientes prises en charge pour un cancer du sein localisé HER2+, avec une détection d'ADNtc à la *baseline*, avant toute thérapie anti-HER2 néoadjuvante, associée à un taux de PCR plus bas [30].

#### ADNtc et suivi de la maladie résiduelle

L'intérêt de l'ADNtc dans la surveillance de la maladie résiduelle a été exploré de façon prospective par Garcia-Murillas et al. chez 55 patients traités par chimiothérapie néoadjuvante. Un séquençage par NGS de la biopsie tumorale

**Tableau 1** Caractéristiques cliniques et génomiques des différents sous-types (d'après The Cancer Genome Atlas Network [38])

| Sous-types           | Luminal A   | Luminal B   | Tumeurs basales  | HER2+  |
|----------------------|---|---|--|--|
| Voie TP53            | Mut TP53 (12 %) ; gain de MDM2 (14 %)   | Mut TP53 (32 %) ; gain de MDM2 (31 %)   | Mut TP53 (84 %) ; gain de MDM2 (14 %)  | Mut TP53 (75 %) ; gain de MDM2 (30 %)  |
| Voie PIK3CA/PTEN     | Mut PIK3CA (49 %) ; Mut/perte PTEN (13 %) ; perte INPP4B (9 %)                                    | Mut PIK3CA (32 %) ; Mut/perte PTEN (24 %) ; perte INPP4B (16 %)   | Mut PIK3CA (7 %) ; Mut/perte PTEN (35 %) ; perte INPP4B (30 %)   | Mut PIK3CA (42 %) ; Mut/perte PTEN (19 %) ; perte INPP4B (30 %)  |
| Voie RB1             | AMP cycline D1 (29 %) ; gain CDK4 (14 %) ; minime expression de CDKN2C, haute expression de RB1   | AMP cycline D1 (58 %) ; gain CDK4 (25 %)  | Mut/perte de RB1 (20 %) ; AMP cycline E1 (9 %) ; haute expression de CDKN2A ; minime expression de RB1           | AMP cycline D1 (38 %) ; gain CDK4 (24 %)   |
| Expression ARNm      | Taux de RE plus élevé, prolifération faible   | Taux de RE plus bas, prolifération forte  | Signature basale ; prolifération forte   | Signature d'AMP HER2 ; prolifération forte   |
| Nombre de copies     | La plupart diploïdes ; peu d'instabilité ; 1q, 8q, gain 8p11 ; 8p, perte 16q ; AMP 11q13.3 (24 %) | La plupart aneuploïdes ; surtout des AMP focales ; 1q, 8q, gain 8p11 ; 8p, perte 16q ; AMP 11q13.3 (51 %) ; AMP 8p11.23 (28%) | La plupart aneuploïdes ; fort taux d'instabilité génomique ; 1q, gain 10p ; 8p, perte 5q ; gain focal MYC (40 %) | La plupart aneuploïdes ; fort taux d'instabilité génomique ; 1q, gain 8q ; perte 8p ; AMP focale ERBB2 17q12 (71 %) ; TP53 (75 %) ; PIK3CA (42 %) ; PIK3R1 (8 %) |
| Mutations de l'ADN   | PIK3CA (49 %) ; TP53 (12 %) ; GATA3 (14 %) ; MAP3K1 (14 %)  | TP53 (32 %) ; PIK3CA (32 %) ; MAP3K1 (5 %)  | TP53 (84 %) ; PIK3CA (7 %)   | TP53 (75 %) ; PIK3CA (42 %) ; PIK3R1 (8 %)   |
| Méthylation de l'ADN | –   | Phénotype hyperméthylé  | Hypométhylation  | –  |

primaire ciblé sur 14 mutations activatrices d'oncogènes a identifié au moins une mutation d'intérêt dans 78 % des cas. Via une analyse spécifique par dPCR, la mutation correspondante a été retrouvée dans l'ADNtc dans 70 % des cas. Bien que la quantité d'ADNtc initiale ne soit pas corrélée à la SSP, la persistance d'une mutation détectable dans l'ADNtc deux à quatre semaines après la chirurgie était associée à un risque très élevé de rechute précoce : détection chez 12/15 des patientes qui ont rechuté, comparativement 1/28 des patientes n'ayant pas récidivé (HR = 25,1, IC 95 % = 4–130]). Cette détection a précédé la rechute clinique d'un délai médian de 7,9 mois [29]. Plus récemment, une étude prospective portant sur 49 patientes recrutées après chirurgie et thérapie adjuvante, avec échantillons plasmatiques collectés tous les six mois, a renforcé l'utilité de la recherche d'ADNtc pour détecter une rechute précoce dans le cancer du sein. En effet, l'ADNtc était détecté avant la rechute clinique ou radiologique chez 16 des 18 patientes ayant rechuté (sensibilité de 89 %), avec un délai médian de 8,9 mois. À noter une spécificité de 100 % puisque aucune des 31 patientes sans rechute n'avait d'ADNtc détecté [31].

Par ailleurs, Riva et al. ont montré que le séquençage par NGS de cancers du sein triple-négatifs permettait d'identifier des mutations *TP53* pour 87 % des patients, et qu'une mutation correspondante était retrouvée par dPCR dans l'ADNtc chez 75 % des patients évaluables. De plus, la persistance d'ADNtc détectable après le premier cycle de chimiothérapie était associée à des SSP et SG diminuées [32]. Les résultats de ces études suggèrent qu'une telle approche non invasive pourrait identifier les patientes présentant un risque de récurrence très élevé, permettant d'adapter la surveillance et les traitements.

### Utilisation de l'ADN circulant dans la prise en charge des cancers du sein avancés

#### *Sous-type intrinsèque non spécifié*

La quantité d'ADNlc [33] ainsi que la quantité d'ADNtc ont été corrélées à la SG [34,35]. Au niveau thérapeutique, si de nombreuses molécules peuvent être efficaces en phase métastatique, la survenue d'une résistance primaire ou après quelques mois demeure inéluctable. L'intérêt clinique potentiel de l'ADNtc dans le cancer du sein avancé a été mis en évidence par Dawson et al. Dans cette étude, un séquençage a été effectué sur des biopsies tumorales de 52 patients métastatiques. Pour les 30 patients atteints d'altérations génomiques susceptibles d'être suivies dans le temps, des analyses itératives de plasma ont été réalisées. Outre l'évaluation de l'ADNtc, les comptes de CTC et les mesures de Ca15-3 ont été effectués au cours d'un suivi de deux ans. Si les variations des trois biomarqueurs étaient liées à la réponse au traitement objectivée sur le scanner d'évaluation, les taux

d'ADNtc présentaient la meilleure corrélation avec les changements de masse tumorale [35]. Au-delà des modifications génétiques, des modifications épigénétiques se produisent fréquemment dans les cellules tumorales. L'évaluation du niveau de méthylation de l'ADN peut également être réalisée dans l'ADNtc [36]. Récemment, la validation prospective de la valeur pronostique d'un indice de méthylation fondé sur six gènes a montré que les patients avec un faible indice de méthylation, après quatre semaines de traitement pour un CSM, avaient de meilleures SSP et de SG en comparaison aux patients avec un indice de méthylation élevé [37].

### *Cancer du sein amplifié HER2*

#### • Voie PI3K

La voie PIK3CA/AKT/mTOR est très fréquemment activée dans les cancers du sein localisés ou métastatiques [38,39] et particulièrement associée à la résistance aux hormonothérapies ou thérapies ciblées anti-HER2 [5,28]. Les données de l'essai BELLE-2 ont montré que la concordance entre détection de la mutation *PIK3CA* au niveau de la tumeur primaire et dans l'ADNtc était de 77 %. De plus, parmi les patients sans mutation *PIK3CA* dans le tissu tumoral primaire, 21 % avaient néanmoins une mutation circulante détectable au moment de l'analyse, probablement en raison de l'intervalle entre la biopsie initiale et l'analyse sanguine subséquente après plusieurs lignes de traitement [40]. Plusieurs analyses rétrospectives d'essais néoadjuvants [41,42] ou métastatiques [31] de cancers du sein HER2 amplifiés ont retrouvé une association entre activation de la voie PI3K (par perte de *PTEN* ou mutation de *PIK3CA*) et mauvaise réponse thérapeutique. Paradoxalement, ces résultats ne sont pas observés en situation adjuvante [43,44]. À noter que toutes ces analyses ont été effectuées à partir d'échantillons tumoraux mais pas dans l'ADNtc. Il semblerait particulièrement intéressant d'évaluer les valeurs pronostiques et prédictives des mutations circulantes *PIK3CA* pour les patientes avec amplification *HER2*.

#### • Thérapie ciblée anti-HER2

Compte tenu des discordances entre la tumeur primaire et les métastases dans l'expression/amplification d'HER2 [45,46], l'étude de ce marqueur au niveau des métastases est utile pour décider d'employer une thérapie ciblée. Néanmoins, de telles biopsies ne sont pas toujours réalisables, sous-tendant l'intérêt d'une détermination du nombre de copies amplifiées HER2 dans l'ADN circulant, avec des valeurs prédictives positives et négatives de 70 et 92 % respectivement [47].

L'intérêt potentiel de l'ADNtc pour détecter une résistance à un traitement ciblé anti-HER2 a été étudié dans

52 échantillons plasmatiques de 18 patients métastatiques HER2+. L'augmentation du nombre de copies circulantes d'*HER2* était associée à une franche progression de la maladie. Toutefois, ce résultat est à interpréter avec prudence étant donné le faible nombre de patients inclus et le manque de sensibilité de ce marqueur de résistance [48].

### **Cancers du sein RH+**

#### • Mutations *HER2*

Les thérapies ciblées anti-HER2 sont usuellement réservées aux patients présentant une tumeur avec amplification *HER2*. Cependant, certaines mutations *HER2* récurrentes ont été identifiées au sein de tumeurs *HER2* non amplifiées [49]. Une étude récente portant sur 12 905 patientes a révélé un taux de mutation de 2,7 % [50], avec une prévalence plus importante pour les carcinomes lobulaires (7,8 %) [51]. De façon intéressante, ces mutations activatrices sont détectables au niveau circulant dans 80 % des cas et semblent prédire une réponse au nératinib, inhibiteur pan-HER2 [51].

#### • Voie PI3K

Plusieurs études de grands essais cliniques (PALOMA-3, BOLERO-2) ont mis en évidence le manque de valeur pronostique ou prédictive de la mutation *PIK3CA* circulante [52,53]. En particulier, la présence d'une mutation circulante de *PIK3CA* n'était pas prédictive d'une meilleure réponse à un inhibiteur de mTOR (évérolimus) [53]. En revanche, dans l'analyse de l'essai BELLE-2, la présence d'une mutation *PIK3CA* circulante était prédictive d'une réponse à un inhibiteur de *PIK3CA* (le buparlisib), et ce, alors qu'une activation de la voie PI3K dans le tissu tumoral initial (par mutation *PIK3CA* ou perte d'expression de *PTEN*) n'était pas associée à la réponse au traitement [40]. Par ailleurs, les mutations circulantes de *PIK3CA* auraient, d'après une étude récente d'André et al., non encore publiée pour l'heure, une valeur prédictive de bonne réponse à l'alpelisib, moins toxique que le buparlisib. Enfin, la survenue de mutations circulantes *PIK3CA*, retrouvées comme des altérations fréquentes acquises dans les deux bras de traitement de l'essai PALOMA-3 (fulvestrant + palbociclib versus fulvestrant + placebo), suggère leur implication également dans la résistance au traitement combiné [54]. Ainsi, ces études fondées sur les données de grands essais randomisés suggèrent que les valeurs prédictives de la mutation circulante *PIK3CA* peuvent varier selon le médicament étudié.

#### • Mutations *ESR1*

L'évaluation de la mutation *ESR1* circulante sera sans doute la première application de l'ADNtc en pratique clinique pour

la prise en charge du cancer du sein. Une revue en français dédiée à ces mutations a récemment été publiée [55]. Ces mutations sont quasi absentes des tumeurs primitives (< 2 %) et s'acquièrent lors de l'exposition aux antiaromatases (AA) [38,56]. Elles modifient la conformation du récepteur à l'estrogène entraînant son autoactivation [56–58]. Comme pour la plupart des mutations circulantes, il existe une bonne corrélation globale entre une détection sur une biopsie de métastase et sur des échantillons plasmatiques [59,60]. La détection de mutations *ESR1* circulantes en fin de traitement adjuvant par AA est nulle, mais est présente dans 6 % des cas à la rechute et dans 30 % des cas après progression sous AA, avec cinq mutations représentant 80 % des mutations circulantes observées (E380Q, D538G, Y537S/N/C) [33,61–64]. Deux études ont montré la valeur péjorative indépendante en SG d'une mutation *ESR1* circulante en phase métastatique [33,61]. La valeur prédictive a également été étudiée avec une survie sans progression nettement diminuée sous AA pour les patientes mutées *ESR1* [60,62]. De plus, l'intérêt d'une surveillance répétée de la mutation *ESR1* sous exposition aux AA en phase métastatique a été souligné avec une détection précédant de six mois la progression clinique, permettant de proposer une fenêtre pour un changement thérapeutique précoce [33,65]. Enfin, il est à noter que la valeur pronostique des mutations *ESR1* peut varier selon la mutation particulière considérée, la Y537S semblant particulièrement délétère [61,66], avec notamment une acquisition relativement fréquente de ce sous-type objectivée sous fulvestrant + palbociclib. [54]. La nécessité d'une détection précoce des mutations circulantes *ESR1* en phase métastatique sera précisée par les résultats de l'essai PADA-1, qui étudie le bénéfice d'un changement thérapeutique précoce du traitement par AA + palbociclib par l'association fulvestrant + palbociclib lors de la détection circulante d'une mutation *ESR1*. Par ailleurs, une première analyse subsidiaire menée par Bidard et al. montre une disparition des mutations *ESR1* détectées à la baseline dans 76% des cas après 1 mois d'exposition à l'association AA-palbociclib [67].

#### • Mutations *BRCA*

*BRCA1/2* sont impliqués dans la réparation des ruptures d'ADN à double brin par recombinaison homologue. Les mutations germinales *BRCA1/2* augmentent le risque de cancer du sein et sont les principaux facteurs de susceptibilité génétique du cancer du sein [68]. L'utilisation des inhibiteurs de PARP a permis d'améliorer la survie chez les patientes métastatiques *BRCA* mutés [69], même si une résistance se produit invariablement après quelques mois. Une analyse récente des patientes métastatiques *BRCA* mutés a révélé que des mutations restaurant la fonction *BRCA* peuvent être acquises au

cours des traitements PARP/platine et détectées dans l'ADN circulant de 2/5 patients résistants à ces traitements [70].

### Intérêt de l'ADNtc au dépistage et au diagnostic

La quantité d'ADNtc augmente chez les patientes présentant un cancer du sein comparativement à une maladie mammaire bénigne ou à des témoins sains [71], et est d'autant plus importante que le stade du cancer est avancé [72]. Une méta-analyse récente fondée sur 24 études de méthodologie hétérogène a rapporté une sensibilité de 0,7 et une spécificité de 0,87 pour l'utilisation de l'ADNtc comme outil de diagnostic, avec une augmentation de la sensibilité à 0,88 et de la spécificité à 0,98 en se limitant aux six études utilisant une évaluation quantitative et moderne de l'ADNtc [73]. Compte tenu du nombre limité de patientes inclus dans ces études, mais également du niveau de technicité et du coût de ces analyses, l'ADN circulant, tout comme les CTC, n'ont à ce jour pas leur place comme outil de dépistage.

### Limites à l'utilisation de l'ADNtc

Malgré son intérêt évident, plusieurs aspects peuvent limiter l'utilisation de l'ADNtc dans le cancer du sein. Tout d'abord, il n'existe pas de marqueur unique permettant d'identifier de l'ADNtc, et les cibles actuelles (mutations *PI3KCA*, *ESR1*, *TP53*) n'ont de sens que pour une partie des patientes (tumeur luminale, exposition aux AA et tumeurs triples négatives, respectivement). De plus, pour près de 20 % des patientes, de l'ADNtc n'est pas retrouvé dans les échantillons, y compris en situation métastatique [29,32,34,74]. Enfin, les études actuelles se fondent sur la présence ou l'absence de mutation pour classer les patients. En revanche, la valeur brute d'un taux mutationnel n'est pas comparable d'un patient à l'autre. De fait, aucune valeur seuil n'a pu être établie permettant d'affirmer qu'une patiente ne tirera plus bénéfice d'une thérapeutique lorsqu'une mutation de résistance est en cours d'émergence.

### Conclusion

Les CTC ont permis de mettre en évidence le potentiel intérêt d'une analyse circulante non invasive dans la prise en charge des cancers du sein. Malheureusement, si la valeur pronostique des CTC est importante, leur identification ne permet pas pour l'heure de proposer d'adaptation thérapeutique efficace.

L'ADN circulant est de développement plus récent, mais l'intérêt des mutations circulantes *PI3KCA* et *ESR1* semble important, même si leur utilité pour adapter les thérapeutiques et améliorer la survie des patientes devrait être démontrée de façon prospective.

**Liens d'intérêts :** Philippe Clatot déclare les liens d'intérêts suivant : financement versé à l'établissement par Astra Zeneca pour un projet de recherche. Participation à des boards Astra Zeneca, Lilly, Roche.

### Références

- Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, et al (2017) The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health. *Lancet Lond Engl* 389:847-60
- Ashworth TR (1869) A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J* 14:146
- Cabel L, Proudhon C, Gortais H, et al (2017) Circulating tumor cells: clinical validity and utility. *Int J Clin Oncol* 22:421-30
- Diaz LA, Bardelli A (2014) Liquid biopsies: genotyping-circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 32:579-86
- Chen L, Bode AM, Dong Z (2017) Circulating tumor cells: moving biological insights into detection. *Theranostics* 7:2606-19
- Bidard FC, Michiels S, Riethdorf S, et al (2018) Circulating tumor cells in breast cancer patients treated by neoadjuvant chemotherapy: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 110:560-7
- Rack B, Schindlbeck C, Jückstock J, et al (2014) Circulating tumor cells predict survival in early average-to-high risk breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 106
- Jueckstock J, Rack B, Friedl TWP, et al (2016) Detection of circulating tumor cells using manually performed immunocytochemistry (MICC) does not correlate with outcome in patients with early breast cancer — Results of the German SUCCESS-A-trial. *BMC Cancer* 16:401
- Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, et al (2013) The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137:503-10
- Lv Q, Gong L, Zhang T, et al (2016) Prognostic value of circulating tumor cells in metastatic breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *Clin Transl Oncol* 18:322-30
- Reyal F, Valet F, de Cremoux P, et al (2011) Circulating tumor cell detection and transcriptomic profiles in early breast cancer patients. *Ann Oncol* 22:1458-9
- Bidard FC, Peeters DJ, Fehm T, et al (2014) Clinical validity of circulating tumor cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 15:406-14
- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, et al (2014) Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol* 32:3483-9
- Medico-economic interest of taking into account circulating tumor cells (CTC) to determine the kind of first line treatment for metastatic. Hormone-receptors positive, breast cancers - Full text view - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2019 May 14]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01710605>
- Bidard FC, Jacot W, Dureau S, et al (2018) Clinical utility of circulating tumor cell count as a tool to choose between first line hormone therapy and chemotherapy for ER+ HER2- metastatic breast cancer: Results of the phase 3 STIC CTC trial [Internet]. [cited 2019 May 14]. Available from: [https://www.abstracts2view.com/sabcs/view.php?nu=SABCS18L\\_1097](https://www.abstracts2view.com/sabcs/view.php?nu=SABCS18L_1097)
- Ried K, Eng P, Sali A (2017) Screening for circulating tumour cells allows early detection of cancer and monitoring of treatment effectiveness: an observational study. *Asian Pac J Cancer Prev* 18:2275-85

17. Sparano J, O'Neill A, Alpaugh K, et al (2018) Association of circulating tumor cells with late recurrence of estrogen receptor-positive breast cancer: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Oncol* 4:1700–6
18. Diehl F, Li M, Dressman D, et al (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16368–73
19. Lecomte T, Berger A, Zinzindohoué F, et al (2002) Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *Int J Cancer* 100:542–8
20. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24–224ra24
21. Didelot A, Le Corre D, Luscan A, et al (2012) Competitive allele specific TaqMan PCR for KRAS, BRAF and EGFR mutation detection in clinical formalin fixed paraffin embedded samples. *Exp Mol Pathol* 92:275–80
22. Taly V, Pekin D, Abed AE, Laurent-Puig P (2012) Detecting biomarkers with microdroplet technology. *Trends Mol Med* 18:405–16
23. Phallen J, Sausen M, Adleff V, et al (2017) Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 9:eaan2415
24. Butler TM, Spellman PT, Gray J (2017) Circulating-tumor DNA as an early detection and diagnostic tool. *Curr Opin Genet Dev* 42:14–21
25. Moulriere F, Chandrananda D, Piskorz AM, et al (2018) Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med* 10(466):eaat4921
26. Fujita N, Nakayama T, Yamamoto N, et al (2012) Methylated DNA and total DNA in serum detected by one-step methylation-specific PCR is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. *Oncology* 83:273–82
27. Fujita N, Kagara N, Yamamoto N, et al (2014) Methylated DNA and high total DNA levels in the serum of patients with breast cancer following neoadjuvant chemotherapy are predictive of a poor prognosis. *Oncol Lett* 8:397–403
28. Oshiro C, Kagara N, Naoi Y, et al (2015) PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 150:299–307
29. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al (2015) Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med* 7:302ra133
30. Rothé F, Silva MJ, Venet D, et al (2019) Circulating Tumor DNA in HER2-Amplified Breast Cancer: A Translational Research Substudy of the NeoALTTO Phase III Trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 25:3581–8
31. Coombes RC, Page K, Salari R, et al (2019) Personalized Detection of Circulating Tumor DNA Antedates Breast Cancer Metastatic Recurrence. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 25:4255–63
32. Riva F, Bidard FC, Houy A, et al (2017) Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Clin Chem* 63:691–9
33. Clatot F, Perdrix A, Augusto L, et al (2016) Kinetics, prognostic and predictive values of ESR1 circulating mutations in metastatic breast cancer patients progressing on aromatase inhibitor. *Oncotarget* 7:74448–59
34. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6:224ra24
35. Dawson SJ, Rosenfeld N, Caldas C (2013) Circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 369:93–4
36. Schwarzenbach H, Pantel K (2015) Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR* 17:136
37. Visvanathan K, Fackler MS, Zhang Z, et al (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* 35:751–8
38. Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490:61–70
39. Arnedos M, Vicier C, Loi S, et al (2015) Precision medicine for metastatic breast cancer—limitations and solutions. *Nat Rev Clin Oncol* 12:693–704
40. Baselga J, Im SA, Iwata H, et al (2017) Buparlisib plus fulvestrant versus placebo plus fulvestrant in postmenopausal, hormone receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (BELLE-2): a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 18:904–16
41. Loibl S, von Minckwitz G, Schneeweiss A, et al (2014) PIK3CA mutations are associated with lower rates of pathologic complete response to anti-human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) therapy in primary HER2-overexpressing breast cancer. *J Clin Oncol* 32:3212–20
42. Majewski IJ, Nuciforo P, Mittempergher L, et al (2015) PIK3CA mutations are associated with decreased benefit to neoadjuvant human epidermal growth factor receptor 2-targeted therapies in breast cancer. *J Clin Oncol* 33:1334–9
43. Perez EA, Dueck AC, McCullough AE, et al (2013) Impact of PTEN protein expression on benefit from adjuvant trastuzumab in early-stage human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 trial. *J Clin Oncol* 31:2115–22
44. Pogue-Geile KL, Song N, Jeong JH, et al (2015) Intrinsic subtypes, PIK3CA mutation, and the degree of benefit from adjuvant trastuzumab in the NSABP B-31 trial. *J Clin Oncol* 33:1340–7
45. Amir E, Miller N, Geddie W, et al (2012) Prospective study evaluating the impact of tissue confirmation of metastatic disease in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 30:587–92
46. Thompson AM, Jordan LB, Quinlan P, et al (2010) Prospective comparison of switches in biomarker status between primary and recurrent breast cancer: the breast recurrence in tissues study (BRITS). *Breast Cancer Res BCR* 12:R92
47. Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK, et al (2013) Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin Cancer Res* 19:3276–84
48. Ma F, Zhu W, Guan Y, et al (2016) ctDNA dynamics: a novel indicator to track resistance in metastatic breast cancer treated with anti-HER2 therapy. *Oncotarget* 7:66020–31
49. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, et al (2013) Activating HER2 mutations in *HER2* gene amplification negative breast cancer. *Cancer Discov* 3:224–37
50. Petrelli F, Tomasello G, Barni S, et al (2017) Clinical and pathological characterization of HER2 mutations in human breast cancer: a systematic review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* 166:339–49
51. Ma CX, Bose R, Gao F, et al (2017) Neratinib efficacy and circulating tumor DNA detection of HER2 mutations in HER2 non-amplified metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 23:5687–95
52. Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, et al (2016) Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 17:425–39
53. Moynahan ME, Chen D, He W, et al (2017) Correlation between PIK3CA mutations in cell-free DNA and everolimus efficacy in HR(+), HER2(–) advanced breast cancer: results from BOLERO-2. *Br J Cancer* 116:726–30



54. O'Leary B, Cutts RJ, Liu Y, et al (2018) The genetic landscape and clonal evolution of breast cancer resistance to palbociclib plus fulvestrant in the PALOMA-3 Trial. *Cancer Discov* 8:1390-403
55. Clatot F, Perdrix A, Sefrioui D, et al (2018) Clinical relevance of ESR1 circulating mutations detection in hormone receptor positive metastatic breast cancer. *Bull Cancer (Paris)* 105:46-54
56. Toy W, Shen Y, Won H, et al (2013) ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 45:1439-45
57. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, et al (2013) D538G mutation in estrogen receptor- $\alpha$ : a novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Cancer Res* 73:6856-64
58. Robinson DR, Wu YM, Vats P, et al (2013) Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 45:1446-51
59. Sefrioui D, Perdrix A, Sarafan-Vasseur N, et al (2015) Short report: monitoring ESR1 mutations by circulating tumor DNA in aromatase inhibitor resistant metastatic breast cancer. *Int J Cancer* 137:2513-9
60. Schiavon G, Hrebien S, Garcia-Murillas I, et al (2015) Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. *Sci Transl Med* 7:313ra182
61. Chandarlapaty S, Chen D, He W, et al (2016) Prevalence of ESR1 mutations in cell-free DNA and outcomes in metastatic breast cancer: a secondary analysis of the BOLERO-2 clinical trial. *JAMA Oncol* 2:1310-5
62. Fribbens C, O'Leary B, Kilburn L, et al (2016) Plasma ESR1 mutations and the treatment of estrogen receptor-positive advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 34:2961-8
63. Spoerke JM, Gendreau S, Walter K, et al (2016) Heterogeneity and clinical significance of ESR1 mutations in ER-positive metastatic breast cancer patients receiving fulvestrant. *Nat Commun* 7:11579
64. Allouchery V, Beaussire L, Perdrix A, et al (2018) Circulating ESR1 mutations at the end of aromatase inhibitor adjuvant treatment and after relapse in breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 20:40
65. Fribbens C, Garcia Murillas I, Beaney M, et al (2018) Tracking evolution of aromatase inhibitor resistance with circulating tumour DNA analysis in metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 29:145-53
66. Toy W, Weir H, Razavi P, et al (2017) Activating ESR1 mutations differentially affect the efficacy of ER antagonists. *Cancer Discov* 7:277-87
67. Abstract PD2-06: Circulating ESR1 mutation detection rate and early decrease under first line aromatase inhibitor and palbociclib in the PADA-1 trial (UCBG-GINECO) | Cancer Research [Internet]. [cited 2019 May 4]. Available from: [http://cancerres.aacr-journals.org/content/79/4\\_Supplement/PD2-06](http://cancerres.aacr-journals.org/content/79/4_Supplement/PD2-06)
68. Skol AD, Sasaki MM, Onel K (2016) The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past BRCA and towards clinical relevance. *Breast Cancer Res BCR* 18:99
69. Robson M, Im SA, Senkus E, et al (2017) Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med* 377:523-33
70. Weigelt B, Comino-Méndez I, de Bruijn I, et al (2017) Diverse BRCA1 and BRCA2 reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 23:6708-20
71. Huang ZH, Li LH, Hua D (2006) Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer Lett* 243:64-70
72. Tangvarasittichai O, Jaiwang W, Tangvarasittichai S (2015) The plasma DNA concentration as a potential breast cancer screening marker. *Indian J Clin Biochem* 30:55-8
73. Lin Z, Neiswender J, Fang B, et al (2017) Value of circulating cell-free DNA analysis as a diagnostic tool for breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 8:26625-36
74. Zhou Y, Wang C, Zhu H, et al (2016) Diagnostic accuracy of PIK3CA mutation detection by circulating free DNA in breast cancer: a meta-analysis of diagnostic test accuracy. *PloS One* 11:e0158143