



HAL
open science

Development of molecular analyzes by digital PCR for clinical practice: positioning, current applications and perspectives

Jérôme Alexandre Denis, Alexandre Perrier, Juliette Nectoux, Pierre-Jean Lamy, Anne-Sophie Alary, Nasrin Sarafan-Vasseur, Daniel Henaff, Benoit Busser, Romain Appay, Pascal Pedini, et al.

► To cite this version:

Jérôme Alexandre Denis, Alexandre Perrier, Juliette Nectoux, Pierre-Jean Lamy, Anne-Sophie Alary, et al.. Development of molecular analyzes by digital PCR for clinical practice: positioning, current applications and perspectives. *Annales de Biologie Clinique*, 2019, 77 (6), pp.619-637. 10.1684/abc.2019.1502 . inserm-02992696

HAL Id: inserm-02992696

<https://inserm.hal.science/inserm-02992696v1>

Submitted on 10 Nov 2020

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.

Développement des analyses moléculaires par PCR digitale pour la pratique clinique : positionnement, applications actuelles et perspectives

Development of molecular analyzes by digital PCR for clinical practice: positioning, current applications and perspectives

Jérôme Alexandre Denis^{1,a}

Alexandre Perrier²

Juliette Nectoux^{2,a}

Pierre-Jean Lamy^{3,a}

Anne-Sophie Alary^{4,a}

Nasrin Sarafan-Vasseur^{5,a}

Daniel Henaff⁶

Benoit Busser^{7,a}

Romain Appay⁸

Pascal Pedini^{9,10}

Pauline Romanet¹¹

Valerie Taly^{12,a}

Frederic Fina^{6,8,a}

¹ Sorbonne Université, Faculté de médecine, Institut universitaire en cancérologie ; Service de biochimie endocrinienne et oncologique, DMU Biogen, Hôpitaux universitaires Pitié-Salpêtrière-Charles Foix, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP Sorbonne Université ; Inserm UMR S_938, Centre de recherche de Saint-Antoine, Biologie et thérapeutiques du cancer, Paris, France <jerome.denis@aphp.fr>

² Service de génétique et biologie moléculaires, HUPC Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP, Paris, France

³ Institut d'analyse génomique-Imagénome, Labosud, Montpellier, France

⁴ Service d'hématologie biologique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, AP-HP, Paris, France

^a Pour le groupe de travail « PCR digitale » de la Société française de biologie clinique

Résumé. Cet article propose la seconde partie du travail sur la PCR digitale (PCRd) mené par le groupe de travail "PCRd" de la Société française de biologie clinique. La première partie du document reprend les avantages et les limites de la PCRd pour la recherche de différentes anomalies moléculaires telles que les mutations ponctuelles, les variants du nombre de copie, la méthylation de l'ADN, l'analyse de l'ARN ou encore une application plus innovante, la PCRd en cellule unique. Cette synthèse permet de proposer un positionnement de la PCRd par rapport aux autres technologies disponibles dans un laboratoire de biologie médicale. Dans une seconde partie, les principales applications actuelles de la PCRd seront abordées incluant l'oncologie des tumeurs solides et les biopsies liquides, l'oncohématologie et le suivi des traitements des hémopathies par greffe de cellules souches hématopoïétiques. Nous détaillerons également le diagnostic prénatal non invasif et le diagnostic de maladie génétique en mosaïque, en prenant l'exemple du syndrome de McCune-Albright. Ces différents exemples d'applications ont été rédigés conjointement par plusieurs spécialistes français du domaine qui ont mis en œuvre ces techniques dans leur laboratoire. En résumé, cet article offre une vision actualisée du positionnement de la PCRd par rapport à d'autres technologies existantes, afin de répondre au mieux aux attentes de la médecine de précision.

Mots clés : PCR digitale, oncologie, oncohématologie, biopsies liquides, ADN circulant tumoral, ADN circulant fœtal, syndrome de McCune-Albright

Abstract. This review is the second part of the workshop on digital PCR (dPCR) proposed by the working group of the French society of clinical biology. The first part of the paper discusses the advantages and limitations of dPCR for the search of different molecular abnormalities such as point mutations, copy number variants, DNA methylation, RNA analysis and a more innovative application, the single-cell dPCR. This synthesis makes it possible to propose a positioning of the dPCR compared to the other available technologies in a medical laboratory. In a second part, the main current applications of the dPCR will be addressed including the oncology of solid tumors and liquid biopsies, oncohematology and the follow-up of hemopathies treatments by hematopoietic stem cell transplantation. We will also detail non-invasive prenatal diagnosis and diagnosis of mosaic genetic disease, using the example of McCune-Albright syndrome. Several French specialists in the field who have implemented these

Correspondance : J.A. Denis
<jerome.denis@aphp.fr>

⁵ Université de Rouen Normandie ; Inserm U1245, IRON group, Centre for genomic and personalized medicine, Rouen, France

⁶ ID Solutions, Grabels, France

⁷ Unité de génétique moléculaire – maladies héréditaires et oncologie, CHU Grenoble Alpes, Grenoble, France ; Institute for advanced biosciences, UGA/Inserm U1209/CNRS UMR5309, Grenoble, France

⁸ Service d'anatomie pathologique et neuropathologie, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, AP-HM, Marseille, France

⁹ Laboratoire d'immunogénétique, EFS Provence-Alpes-Côte-d'Azur-Corse, Marseille, France

¹⁰ Aix Marseille Université, CNRS, EFS, ADES, Marseille, France

¹¹ Aix Marseille Université, APHM, Inserm, MMG, Laboratoire de biologie moléculaire, Hôpital de La Conception, Marseille, France

¹² Inserm UMR-S1147, CNRS SNC5014 ; Université Paris-Descartes, Equipe labellisée ligue nationale contre le cancer, Paris, France

techniques in their laboratory have written these different examples of applications jointly. In summary, this manuscript offers an up-to-date view of the positioning of dPCR in relation to other existing technologies in order to best meet the expectations of precision medicine.

Key words: *digital PCR, oncology, oncohematology, liquid biopsies, circulating tumoral DNA, circulating foetal DNA, McCune-Albright syndrome*

Article reçu le 26 juin 2019,
accepté le 25 novembre 2019

Cet article est la suite du travail de synthèse publié dans les annales de biologie clinique [1] mené par le groupe « PCR digitale » (PCRd) de la Société Française de Biologie Clinique. Après avoir traité des performances et des modalités pratiques de validation de méthode, ce manuscrit propose d'aborder le positionnement de la technologie par rapport aux autres méthodes disponibles dans un laboratoire de biologie moléculaire et de dresser un panorama des principales applications cliniques dans les domaines notamment de l'oncologie (y compris en oncohématologie) mais aussi pour le diagnostic prénatal non invasif et le diagnostic des maladies génétiques en mosaïque. Pour chaque partie, plusieurs spécialistes français apporteront leur expérience de la mise en pratique de ces technologies dans leur laboratoire et des points analytiques spécifiques à prendre en compte.

Avantages et limites de la PCRd par rapport aux autres technologies existantes

De manière générale, la PCRd présente l'avantage d'être très sensible, peu coûteuse et simple à mettre œuvre

(à condition de respecter un certain nombre de recommandations que nous avons détaillées dans notre article précédent [1]). De plus, le temps de manipulation est court (de l'ordre d'une journée incluant l'extraction d'ADN), ce qui permet d'envisager une réduction intéressante du temps de rendu des résultats, en particulier en comparaison avec le séquençage de nouvelle génération (NGS) dont le temps de rendu des résultats est d'au moins une semaine. Cette méthodologie est donc adaptée à l'urgence thérapeutique, par exemple si le résultat conditionne une indication ou une modification de la prise en charge thérapeutique. La PCRd permet également d'analyser des échantillons dont l'ADN est partiellement dégradé avec des performances généralement supérieures aux autres techniques [2]. Ceci permet d'éviter les re-biopsies, d'accéder à l'information plus rapidement et à moindre coût. La PCRd s'inscrit parfaitement dans une démarche complémentaire aux autres technologies qui permettent, quant à elles, d'obtenir des informations exhaustives comme le NGS, les puces d'hybridation génomique (CGH-array), les puces de polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP-array), les profils de méthylation sur puce et le séquençage de l'ARN (RNAseq) [3].

Détection d'évènements rares en milieu biologique complexe

La principale application de la PCRd consiste à détecter et quantifier des évènements rares, telles que des mutations ponctuelles ou encore des insertions/délétions dans un contexte de faibles quantités d'ADN et/ou lorsque la cible sauvage est en très large excès par rapport à la cible mutée. Cette technologie est en particulier adaptée à l'analyse des milieux biologiques complexes qui peuvent contenir des inhibiteurs de PCR. Le positionnement de la technique est lié à sa très grande sensibilité qui est généralement de l'ordre de 0,01 %-0,1 %. Ainsi, elle reste encore aujourd'hui, à une concentration et pour une prise d'essai identique, supérieure aux autres techniques telles que la PCR quantitative en temps réel (PCRq) qui a une sensibilité de l'ordre de 1-10 % et ce même après optimisation par exemple avec le système CAST (*Competitive allele specific TaqMan*). De même, elle reste généralement plus sensible que les méthodes de NGS, alors même que des progrès indiscutables ont été réalisés notamment concernant la réduction du bruit de fond permettant d'atteindre des sensibilités inférieures à 1 % (par exemple : *Tagged-amplicon deep sequencing* (TAM-SeqTM), ou *Safe-Sequencing System* (Safe-seq) [4]). De plus, il s'agit de la seule technique permettant une quantification absolue de l'ADN, ce qui en fait la méthode étalon de titration des solutions d'ADN [5]).

Toutefois, le principal inconvénient de cette technique concerne le faible niveau de multiplexage. Il s'agit en effet d'une méthode ciblée permettant d'analyser de manière simultanée quelques cibles (généralement de 3 à 5 au maximum afin d'éviter une trop grande complexité dans l'analyse des données). Néanmoins, il faut noter que différentes stratégies de multiplexage en PCRd ont été développées ces dernières années (*figure 1*). En pratique, comme nous le discuterons dans les chapitres suivants et en particulier en oncologie, la recherche ou le suivi d'une combinaison appropriée de quelques cibles est souvent suffisant pour répondre rapidement à une indication clinique avec une sensibilité optimale.

Stratégiquement, la PCRd permet la recherche ultrasensible d'altérations moléculaires fréquentes (*hotspots*) dans un contexte clinique donné, qui pourront ensuite être complétées en seconde intention, par des méthodes plus exhaustives mais moins sensibles si cela se révélait utile pour une décision clinique et l'accès à des médicaments innovants. De même, dans le cas où la question clinique requiert l'identification d'anomalies variables (maladie génique ou par exemple dans des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *BRCA1*), une stratégie permettant le séquençage de panels de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de gènes peut être nécessaire.

Analyse de la variation du nombre de copies

La variation du nombre de copies (CNV) de certaines séquences nucléotidiques > 1 kb désigne une forme particulière de polymorphisme du génome probablement aussi fréquent que les polymorphismes d'un seul nucléotide. Environ 5-10 % d'un génome normal pourrait être concerné [6]. Cette variation est le plus souvent causée par des duplications en tandem et des délétions locales suite à un mécanisme d'enjambement inégal. Généralement, le nombre de copies est compris entre 3-30 copies, mais peut atteindre des centaines de copies, avec parfois des formes extra-chromosomiques circulaires (eccDNA) [7]. Ces polymorphismes ou altérations sont plus fréquents dans les régions inter-géniques mais peuvent également concerner tout ou une partie d'un gène, voire plusieurs centaines de gènes [6]. Les CNV peuvent être alors neutres, de signification indéterminée ou parfois avoir une conséquence phénotypique délétère en augmentant la susceptibilité à certains cancers et/ou en favorisant les mécanismes métastatiques [7]. En plus du cancer, les CNV peuvent également être impliqués dans des maladies neurologiques et auto-immunes ou peuvent être associés à une réponse médicamenteuse variable.

La $CNV = \left(\frac{\text{valeur normale de } Q_{\text{séquence cible}}}{Q_{\text{séquence de référence}}} \right) \times \text{ploïdie}$, est de 2 chez l'*Homo sapiens*. Pour analyser ces anomalies, on distingue des approches ciblées telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), la PCRq et ses variantes comme le « *multiplex ligation-dependent probe amplification* » (MLPA), et les approches exhaustives telles que le CGH array, le SNP array ou le NGS. Dans le cas d'analyses de génétique constitutionnelle, ces outils sont généralement suffisants. Ils se révèlent toutefois nettement insuffisants dans le cas d'analyses de mosaïcismes ou en oncogénétique somatique où les difficultés liées à la dilution de l'information sont critiques (*cf chapitre suivant*). Une approche semi-quantitative est donc, dans la majorité des cas, suffisante (homogénéité cellulaire, CNV élevés...) pour faire le diagnostic d'une pathologie ou la classification en sous-groupes cliniques. Par contre, elles ne sont pas suffisamment précises pour définir des valeurs décisionnelles qui peuvent se révéler utiles pour la prescription d'un médicament. La PCRd est précieuse pour mettre en évidence des valeurs de CNV de 0 (délétion homozygote), 1 (délétion hétérozygote) ou 3 (duplication mono-allélique). Des études ont montré un très haut niveau de concordance entre la PCRd et le séquençage d'exome [8] ou le MLPA [9, 10]. Toutefois, un ADN de haute qualité est nécessaire, alors que la PCRd peut être réalisée à partir de faibles quantités d'ADN extrait de prélèvements inclus en paraffine et fixés au formol (FFPE). En effet,

l'ADN extrait de ce type d'échantillon est généralement de faible intégrité, présente des modifications chimiques et peut contenir des inhibiteurs enzymatiques utilisés en biologie moléculaire [11]. Dans ce contexte, la PCRd présente l'intérêt de partitionner les copies d'ADN et les inhibiteurs dans des volumes très faibles permettant de diminuer les interférences sur l'efficacité de la PCR dans un nombre limité de compartiments [12]. Pour ce type d'échantillons faiblement concentrés, les techniques de CGH *array* ne sont pas assez sensibles et reproductibles et les réactions enzymatiques de marquage sous l'influence des inhibiteurs. La littérature suggère une reproductibilité < 70 % et un taux d'échec important dans des expériences répétées entre plateformes SNP [13]. Les approches de type OncoscanTM (Thermo Fisher) limitent l'influence de la fixation sur la qualité des ADN grâce à une stratégie de copie et d'hybridation d'équivalent génome sur des sondes SNP [14]. Cette technique nécessite une quantité d'au moins 60 à 80 ng d'ADN double brin et la présence de *SNP* à haute fréquence d'hétérozygotie dans la région d'intérêt, avec pour conséquence certaines régions du génome moins couvertes. Dans le cas d'analyses ciblées par FISH, la région dupliquée doit être supérieure à 5 kb, la PCR permet l'analyse de régions < 5 kb et jusqu'à 2 nucléotides. *Fina et al.* montrent que la PCRd permet de mettre en évidence, à partir de faibles quantités d'ADN FFPE (< 1 ng) avec au minimum 25 % des cellules tumorales, des duplications mono-alléliques du domaine tyrosine kinase du gène *FGFR1* inférieures à 2 kb [15]. Dans une autre étude, la présence de duplications des exons des gènes *BRAF* et *KIAA1549* systématiquement impliquées dans les translocations *KIAA1549-BRAF*, est corrélée à la présence des transcrits de fusion détectés par RNAseq à partir de tissu congelé, avec une sensibilité et une spécificité de 100 % [16]. La PCRq n'est pas suffisamment précise pour mettre en évidence un $CNV = \left(\frac{Q_{séquence\ cible=1,15}}{Q_{séquence\ de\ référence=1,0}} \right) \times 2 = 2,25$. Cassinari *et al.* [17] proposent une approche simple et innovante d'étude des CNV pour 93 régions du génome, reposant sur l'utilisation de sondes d'hydrolyse universelles UPL.

Voici quelques recommandations : la portion de génome cible doit être mesurée en même temps que la séquence de référence afin de limiter les incertitudes liées à la multiplication des prises d'essais (*figure 2*). Le gène de référence doit être défini et validé pour chaque application, en particulier lorsque les remaniements géniques sont très nombreux et pathologie dépendants. Il est nécessaire de travailler avec un ADN fragmenté afin d'assurer une distribution aléatoire des cibles dans les chambres réactionnelles. Pour l'ADN de haut poids moléculaire, il est possible de digérer l'ADN par une ou plusieurs enzymes de restriction inopérantes sur

les amplicons. Les endonucléases vont séparer les copies de gènes en tandem, assurant ainsi une répartition aléatoire dans les nano-réacteurs, tout en réduisant la viscosité en augmentant l'accessibilité des matrices. Il est important de noter que Kline *et al.* [18] montrent que cette approche doit être parfaitement maîtrisée. L'intervalle de confiance à 95 % estimé par la loi de Poisson (CNV_{max} et CNV_{min}) de la valeur moyenne de CNV est important pour définir les seuils décisionnels. Cet intervalle de confiance est directement dépendant du nombre total d'événements et de la quantité d'ADN. Il est ainsi possible d'utiliser de très faibles concentrations d'ADN en augmentant le nombre de nano-réacteurs, par exemple en couplant plusieurs puits de PCRd. Il est possible de rendre une valeur de CNV > 2,25, équivalent à la duplication d'un allèle pour 25 % de cellules tumorales avec une quantité d'ADN < 1 ng/PCRd pour 30 000 chambres réactionnelles totales [15, 16]. Enfin, les produits cibles et de référence peuvent être identifiés par leur taille et quantifiés individuellement en utilisant l'EvaGreen[®], un intercalant non spécifique de l'ADN [19]. Un protocole détaillant la procédure à suivre pour ce type d'application est disponible dans la publication de Bell *et al.* [20].

Analyse de la méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique de l'ADN des mammifères, médiée par des méthyltransférases (DNMT) qui résulte de l'addition covalente d'un groupe méthyl sur le carbone 5 d'une cytosine. La méthylation aberrante de l'ADN est une altération épigénétique courante dans de nombreuses pathologies, en particulier dans les tumeurs malignes humaines, et peut se traduire soit par une hypométhylation globale du génome, soit par une hyperméthylation localisée sur les cytosines positionnées avant une guanine (îlots CpG) situées dans l'ADN intergénique et/ou des régions promotrices de certains gènes qui peuvent alors être réprimées [21]. L'ADN méthylé peut être distingué d'un ADN non méthylé par l'utilisation d'endonucléases sensibles à la méthylation [22]. Les difficultés liées à cette technique sont nombreuses. La principale étant l'impossibilité d'amplifier l'ADN par PCR sans perte du profil méthylé. La grande majorité des techniques d'analyse de méthylation nécessite donc une étape de modification de la séquence d'ADN. Le traitement au bisulfite de sodium permet de convertir la séquence cible d'ADN (correspondant à un gène ou un promoteur) en deux néoséquences. D'une part, une séquence dont les cytosines non méthylées ont été converties en uracile par désamination et, d'autre part, une séquence où les cytosines méthylées situées au niveau des CpG ne sont pas converties. Une des premières méthodes utilisées est appelée PCR

spécifique de méthylation (MSP) [23]. Il s'agit d'une méthode en point final. Les amplicons de PCR de la séquence méthylée et de la séquence non méthylée, sont révélés après électrophorèse et comparés à des contrôles méthylés et non méthylés. Le pyroséquençage est une autre technique de séquençage direct dans laquelle les nucléotides sont ajoutés séquentiellement. Si le nucléotide ajouté dans le milieu réactionnel correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse en libérant un pyrophosphate. Pour ces techniques d'amorçage spécifique, la détection différentielle des séquences nécessite de positionner les amorces sur des îlots CpG et d'amplifier, dans des tubes séparés, les néoséquences méthylées et non méthylées. Une autre approche utilisant des amorces spécifiques consiste à n'amplifier que la séquence méthylée. Dans ce cas, l'utilisation d'un gène de référence devient obligatoire. En 2000, la mise au point d'une PCR quantitative (TaqMan[®]) appelée MethyLight, basée sur la fluorescence pour mesurer la méthylation de l'ADN, a considérablement amélioré la capacité à détecter et à quantifier les allèles méthylés [24]. Elle combine les deux approches : la PCR est spécifique de la séquence méthylée du gène d'intérêt et, de plus, elle permet une approche quantitative grâce à l'utilisation d'amorces et d'une sonde à hydrolyse complémentaire au niveau des îlots CpG. Un gène de référence permet de normaliser les résultats grâce à des amorces et sondes, qui reconnaissent les deux séquences d'ADN, méthylée et non méthylée. La quantité d'ADN méthylé du gène cible est alors divisée par la quantité totale d'ADN spécifique du gène de référence. Les résultats sont exprimés en pourcentage en comparant les résultats normalisés à ceux d'un ADN de référence 100 % méthylé. En dépit de ses avantages par rapport au point final MSP, la technique MethyLight est sensible à la présence d'inhibiteurs et a une sensibilité limitée pour la détection d'allèles méthylés rares dans un fond d'allèles non méthylés, ce qui peut entraîner des résultats incohérents, en particulier pour la détection de faibles niveaux de méthylation. Une version par PCRd de cette technique MethyLight a été mise au point [25, 26]. Elle permet une détection et une quantification hautement sensibles [27, 28]. Il est également important de savoir que l'ADN génomique est soumis lorsqu'il est traité par du bisulfite à des conditions chimiques sévères, conduisant à un ADN dégradé. Comme nous l'avons expliqué, dans ces conditions, la PCRd possède des performances adaptées à ces problématiques d'intégrité de l'ADN et de présence d'inhibiteurs.

Analyse de l'ARN

En ajoutant une étape de transcription inverse, la PCRd peut également quantifier les niveaux d'expression d'ARN

avec pratiquement tous les avantages du partitionnement que nous avons déjà décrits pour l'ADN. Cette étape de transcription inverse peut être effectuée en présence d'oligo-dT et d'hexamères suivie, après compartimentalisation, d'une détection des ADN complémentaires en présence d'amorces et soit de sondes spécifiques soit d'un intercalant tel que l'EvaGreen[®]. A noter qu'il existe également des kits dédiés permettant la réalisation de transcription inverse suivie d'une amplification en une seule étape directement dans les chambres réactionnelles. De manière générale, la PCRq est parfaitement adaptée à la mesure ciblée des variations d'expression de gènes à condition que la quantité d'ARN et la variation d'expression mesurée ne soient pas trop faibles. La PCRd est, quant à elle, adaptée pour mesurer des variations de niveau d'expression d'un gène cible ≤ 2 fois, telles que les facteurs de transcriptions et permet d'étudier de faibles quantités d'ARN. Cette méthode est également utile pour les études de transcrits de fusion (ARN chimère codé par un gène de fusion ou par deux gènes différents par transépissage ultérieur), d'espèces alternatives (édition d'ARN, expression allélique) et de manière générale pour des cibles de faible abondance. Parmi les applications actuellement en plein essor, la détection des micro-ARN circulants (miARN), qui sont connus pour être des biomarqueurs du cancer, du dysfonctionnement du système endocrinien ainsi que d'une multitude d'autres pathologies, est particulièrement intéressante. Dans leur étude, Hindson *et al.* ont comparé la RT-PCRq avec la RT-PCRd sur le système Bio-Rad QX100 afin de détecter des miARN dans le sérum [29]. L'équipe a mesuré l'abondance du miR-141 à partir d'échantillons de sérum prélevés auprès de 20 patients atteints d'un cancer avancé de la prostate et de 20 hommes témoins du même âge. Les échantillons ont été analysés par les deux techniques en effectuant des réplicats de séries de dilutions individuelles préparées sur trois jours différents. Ils ont constaté que la RT-PCRd améliorerait de sept fois la reproductibilité quotidienne par rapport à la PCRq. En outre, les auteurs ont démontré que l'utilisation de la RT-PCRd permettait d'obtenir une meilleure discrimination par rapport à la PCRq entre les plasmas de patients atteints de cancer de la prostate avancé et les échantillons contrôles ($p = 0,0036$ vs $p = 0,1199$). Des études similaires ont validé des biomarqueurs de miARN plasmatiques dans différents cancers (*cf. revue* [30]). Il est important de noter que des niveaux d'expression trop importants vont saturer les chambres réactionnelles et qu'il est difficile de prévoir le niveau d'expression de l'ARN cible. De ce fait, la reverse transcription doit être réalisée à partir de faibles quantités d'ARN, et dans le cas d'une co-amplification, le gène de référence doit avoir un niveau d'expression très proche de celui de la cible afin qu'il ne sature pas les chambres réactionnelles au détriment de l'ARNm cible.

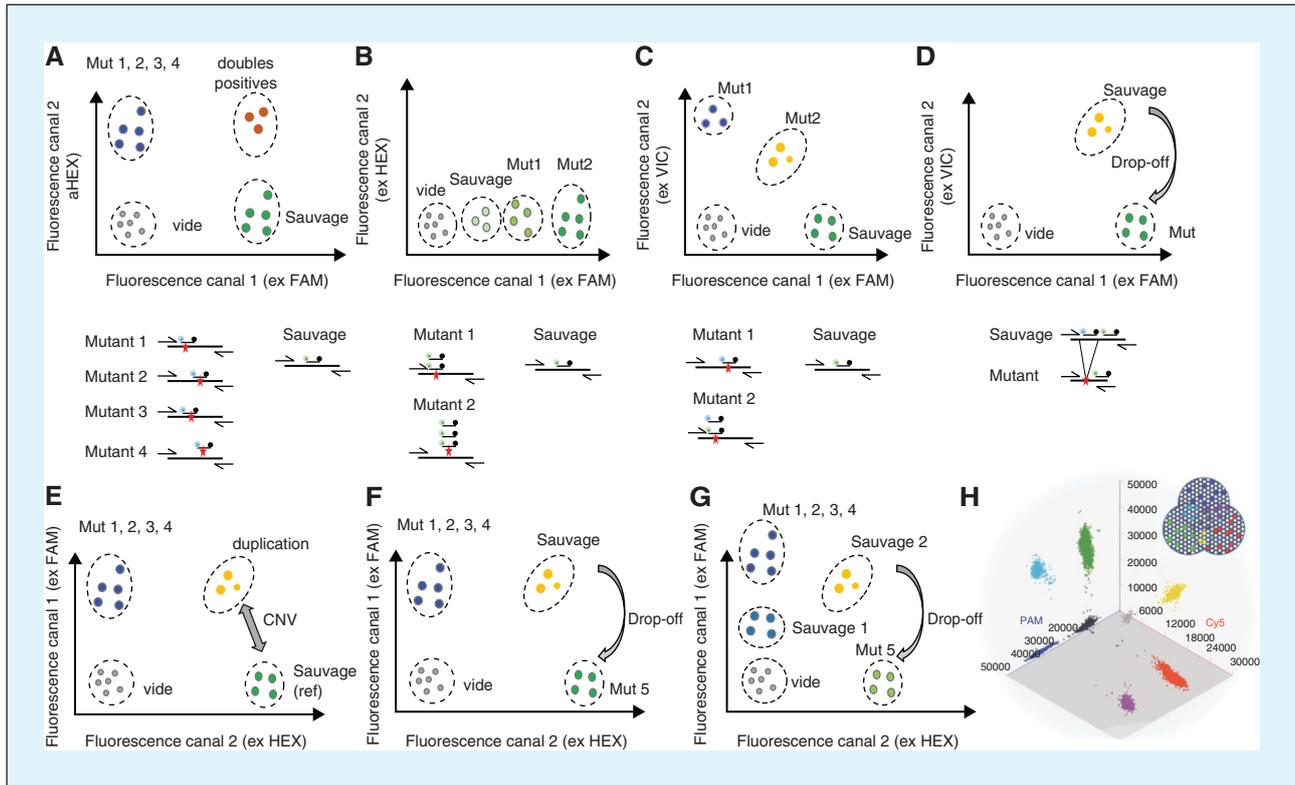


Figure 1. Approches de multiplexage en PCRd. Parmi les approches de multiplexage possible, la plus intuitive consiste à cibler tous les mutants d'intérêts par l'ajout de sondes d'une même couleur, chacune reconnaissant un variant différent. Ceci permettra de multiplexer aisément la recherche de mutation, avec la contrepartie de ne pas pouvoir identifier avec certitude le variant détecté (A). La deuxième approche, plus difficile à mettre en œuvre, consiste à faire varier la concentration des sondes fluorescentes pour un même canal de détection. Ceci afin de créer des clusters d'intensité de fluorescence différente sur un même axe (B). Dans ce cas précis, il est ainsi possible de reconnaître le variant détecté en se basant sur la valeur moyenne d'intensité de fluorescence du cluster. Cependant, la variabilité des échantillons en termes d'inhibitions, ou l'efficacité des différents systèmes de PCR peuvent engendrer des superpositions de clusters et ainsi fausser le rendu des résultats. Cette approche demande que la réaction soit robuste pour que les différences d'intensité de fluorescence dans chaque compartiment également appelé « pluies » (liées à une efficacité d'amplification variable lié ou non à des inhibiteurs de la réaction) ne viennent pas compromettre les analyses. Une troisième approche vise à mélanger les couleurs de fluorescences pour une même cible. En effet, un mélange de sonde fluorescente de fluorophore différent mais de séquence identique permettra de modifier la position des clusters en créant des positions à double/triple fluorescences, se plaçant ainsi en diagonale des canaux de lecture utilisés (C). De la même manière, si deux sondes de séquence et de fluorophore différents ciblant les mêmes amplicons sont utilisées, cela génèrera une population en diagonale (D). Cette dernière approche permet de détecter un grand nombre de variants se situant à la même position. La recherche des délétions de l'exon 19 de l'EGFR, par cette approche, est ainsi grandement simplifiée. Une sonde reconnaîtra une séquence non mutée de l'amplicon dans une couleur, tandis que l'autre reconnaîtra la séquence qui peut être détectée dans une autre couleur, ainsi en cas de délétion, une seule sonde se fixera, et le cluster ne sera plus en diagonal, mais sur un seul des axes de fluorescence. On parle ici de stratégie « drop-off ». Enfin, il est également possible de développer grâce à la compartimentalisation et la quantification absolue de la PCRd des stratégies combinant des recherches d'anomalies moléculaires de nature différente dans la même analyse (exemple mutation ponctuelle et variabilité du nombre de copies. Bien évidemment, les utilisations de toutes ces approches peuvent être combinées (E,F,G) et permettent de pouvoir s'adapter à chaque type d'anomalie recherchée augmentant ainsi les possibilités de multiplexage. Enfin, outre les approches de multiplexage basées sur les différences d'intensité de fluorescence, l'approche la plus intuitive consiste à augmenter le nombre de cibles évaluables en utilisant plus de deux canaux de fluorescence (H). Par conséquent, Stilla Technologies a mis au point le système Naica, un lecteur à trois couleurs et un lecteur 6 couleurs est en développement ; Fluidigm a mis au point le lecteur BioMark HD, avec jusqu'à cinq couleurs (UV), et Formulatrix ont lancé le système Constellation, qui permet de numériser des images en deux étapes avec la possibilité de changer les filtres en fonction des colorants fluorescents utilisés. Bien que cette stratégie permette d'augmenter le nombre de cibles ADN, l'ajout de canaux fluorescents supplémentaires augmente également les coûts et la complexité du système, ce qui nécessite une analyse logicielle dédiée afin de définir une matrice de compensation pour éviter le chevauchement spectral entre les différents canaux. La combinaison de la génération d'un grand nombre de gouttelettes afin de n'avoir qu'une copie par gouttelette, éliminant ainsi la possibilité de multiples signaux dans une gouttelette, avec un nombre accru de canaux de fluorescence, pourrait théoriquement permettre une augmentation de la capacité de multiplexage de PCRd.

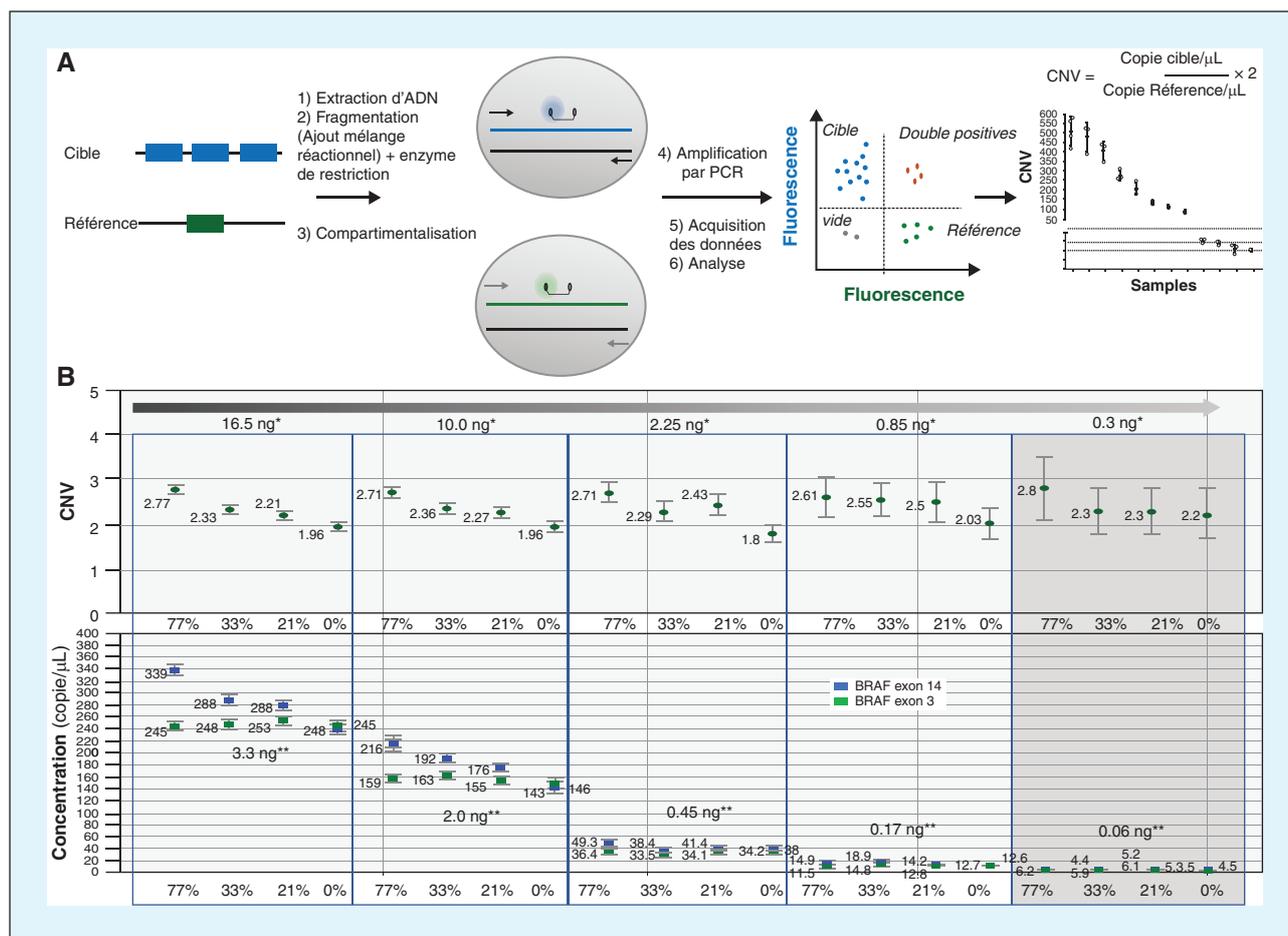


Figure 2. A. Analyse de la variation du nombre de copies par PCRd. La fragmentation de l'ADN est nécessaire dans le cas d'ADN de haute qualité, avant la compartimentalisation afin de séparer les copies de gènes en tandem, réduire la viscosité des échantillons et augmenter l'accessibilité des primers et sondes, elle peut se faire en ajoutant l'enzyme de restriction dans le mélange réactionnel (ou avant). L'étape de digestion est inutile dans le cas d'échantillons pour lesquels l'ADN est fragmenté, tels que tissus fixés et l'ADN circulant tumoral. Après compartimentalisation (ou génération de gouttelettes), une amplification par PCR est réalisée. Les compartiments positifs et négatifs sont comptés par l'instrument dans chaque canal de fluorescence ce qui permet grâce à la loi de Poisson de déterminer le nombre de copies par μL de la cible et de la séquence de référence. Le rapport multiplié par 2 (pour un génome diploïde de référence) donne le nombre de copies par génome de la cible. **B.** Exemple de caractérisation expérimentale des limites de détection par valeur de CNV, ici pour la duplication BRAF exon14/exon3 (11). Cette validation technique est nécessaire en particulier autour de la valeur seuil théorique de CNV = 2,5 (CNVmin 2.0; IC: 95 %, loi de Poisson) équivalent à 25 % de cellules altérées. Les premières valeurs CNV (2,77) pour le pool d'ADN dupliqué correspondent théoriquement à une dilution (46 %) dans l'ADN normal d'un échantillon homozygote avec CNV = 4,0 ; 36 % et 26 % ont été obtenus en mélangeant le pool d'ADN dupliqué et normal ; 0 % correspond au pool d'ADN normal. La flèche de gradient gris correspond à une dilution de chaque ADN dupliqué et normal (46 %, 36 %, 26 %, 0 %) à 12,5 ng, 10,0 ng, 2,25 ng, 0,85 ng et 0,3 ng d'ADN total dans le test (* = 5 μL d'ADN). **A.** Valeurs CNV pour chaque dilution d'échantillons dupliqués et normaux. Panel bas : concentrations exprimées en copies / μL de ddPCR™ (20 μL) pour BRAF exon 14 (bleu) et BRAF exon 3 (vert) pour chaque dilution d'échantillons dupliqués et normaux, ** correspond à la concentration d'ADN exprimée en ng/ μL d'échantillons d'ADN. La limite de détection est représentée schématiquement par le rectangle vertical gris, elle limite la valeur de 0,3 ng d'ADN total à laquelle les valeurs de CNV $\geq 2,25$; CNVmin $\geq 2,0$ (CI95% loi de Poisson) ne sont plus respectés. ** ng/ μL d'ADN.

PCRd en cellule unique

Une application innovante, dont le développement s'annonce prometteur, est l'utilisation de la PCRd en cellule unique. La caractérisation des acides nucléiques (ADN, ARNm, microARN) à l'échelle de la cellule est utile pour identifier la diversité génétique dans des populations de cellules polyclonales telles que des cellules tumorales ou

des populations bactériennes, mais aussi des changements dans l'expression de gènes qui peuvent être hétérogènes dans une population multicellulaire induite par une molécule active. Le partitionnement des cellules avant la PCR maintient la traçabilité des acides nucléiques à l'échelle monocellulaire pendant l'amplification. Par exemple, Zeng

et al. ont développé une analyse de l'ADN de cellules individuelles (*E. coli* muté/pathologique et sauvage) dans des gouttelettes, en utilisant une approche similaire à la BEAMing PCR [31]. De même, la RT-PCRd en cellule unique permet la quantification de l'ARN pour déterminer la variation temporelle d'une expression cellulaire à l'autre et d'une cellule à l'autre. La plupart des plateformes analytiques de PCRd peuvent encapsuler des cellules à l'échelle unique. La possibilité de pouvoir superposer la caractérisation phénotypique d'une cellule révélée par un anticorps couplé à un fluorochrome avec l'analyse moléculaire des cellules grâce à un test basé sur la PCRd serait idéale. L'ensemble des applications décrites dans les paragraphes précédents de cette revue ainsi que les principes de multiplexage peuvent s'appliquer à l'échelle de la cellule unique. La connaissance de la combinaison des mutations (architecture clonale) à l'échelle de la cellule unique pourrait avoir un intérêt tout particulier dans le cadre du développement des thérapies ciblées en prenant en compte le risque de sélectionner certains clones ou au contraire en permettant d'en éliminer d'autres. Certaines solutions sont actuellement en cours de développement (Guermouche, Taly *et al.*) et pourraient dans l'avenir permettre de répondre à des questions précises de manière économique par rapport à d'autres solutions basées sur le séquençage à haut débit (par exemple le *single-cell* RNAseq ou *dropSeq*). Le lecteur pourra se référer à la revue suivante [32].

Principales applications cliniques de la PCRd

La PCRd se développe dans de nombreux domaines de la biologie médicale notamment pour le développement des tests moléculaires dits « non-invasifs » et en particulier dans deux domaines principaux, les biopsies liquides en oncologie et le diagnostic prénatal non-invasif. Enfin, un exemple de diagnostic d'une maladie génétique en mosaïque, le syndrome de McCune Albright sera présenté afin d'illustrer l'étendue des applications possibles dans ces situations de faibles fréquences alléliques de la cible d'intérêt.

Applications en oncologie des tumeurs solides

L'une des principales applications actuelles de la PCRd concerne l'oncologie. Le cancer est un processus pathologique dans lequel s'accumulent des mutations somatiques. Certaines d'entre elles, dites mutations « *drivers* » par opposition aux mutations « *passengers* » sont fréquemment présentes en nombre limité (en moyenne de 2 à 8 mutations par tumeur) et cela concerne des gènes codant des acteurs majeurs de voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral [33]. Ces mutations confèrent un avantage sélectif aux cellules tumorales : 1) soit en

termes de prolifération par gain de fonction de certains oncogènes entraînant une activation constitutive de protéines telles que le récepteur de l'EGF (*EGFR*), des gènes codant les petites protéines G telles que les gènes de la famille *RAS* (*HRAS/KRAS* et *NRAS*) ou encore dans des gènes codant des kinases à activité sérine/thréonine kinase (par exemple *BRAF*) : 2) soit en termes de survie par perte de fonction de certains suppresseurs de tumeurs tels que *TP53*, *PTEN* ou *APC*. La grande majorité de ces mutations sont des mutations ponctuelles (~95 %), c'est-à-dire touchant un seul nucléotide (SNV : *single nucleotide variant*). Il existe également d'autres mutations telles que des insertions/délétions et des amplifications [34]. La recherche de ces mutations présente de nombreuses applications déjà utilisées en routine clinique ou en phase de le devenir. Afin d'illustrer la diversité des altérations moléculaires retrouvées dans les échantillons biologiques, nous présentons dans le *tableau 1* quelques exemples de cibles moléculaires d'intérêt clinique qui peuvent être détectées relativement facilement par PCRd dans les cancers solides les plus fréquents (poumon [35-42], côlon [43-47], mélanome malin [48-54], sein [55-61], prostate [62-70]).

Applications pour le diagnostic

En ce qui concerne le diagnostic, les indications sont encore limitées. Toutefois, dans les cancers neurologiques et dans certains cancers rares, la présence de certaines mutations peut orienter le clinicien ou être évocatrice d'un sous-type néoplasique.

Concernant les tumeurs du système nerveux central, depuis la révision de la classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016, la caractérisation moléculaire est devenue incontournable afin d'affirmer le diagnostic [71]. Cela concerne notamment la recherche de mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* et du promoteur de *TERT* (*TERTp*) avec 2 hotspots en -146C>T (C250T) ou c.-124C>T (C228T) dans les gliomes de haut grade de l'adulte [71, 72], de mutations de l'histone *H3F3A* caractéristiques des gliomes diffus pédiatriques de la ligne médiane [71] ou encore des altérations des gènes *BRAF*, *FGFR1* ou *PI3KCA* classiquement rencontrées dans les tumeurs gliales ou glioneuronales pédiatriques [73, 74]. Cette caractérisation se heurte cependant à plusieurs limitations compte tenu de la topographie tumorale. En effet, l'accès à la tumeur reste une problématique majeure en neuro-oncologie avec des prélèvements transmis qui sont parfois de très petite taille ou en périphérie tumorale, voire même une biopsie refusée. Dans ce contexte, la PCRd grâce à sa très grande sensibilité et les possibilités de multiplexages qu'elle propose, permet alors la mise en évidence d'altérations à partir d'une très faible quantité de matériel tumoral. De plus, des approches recherchant directement ces altérations moléculaires dans

Tableau 1. Principales applications de la PCRd pour la détection d'altérations moléculaires d'intérêt clinique dans différents cancers solides.

Pathologie	Dg	P	R	Cibles (fréquence)	Applications	Référence
Cancer poumon non à petites cellules localement avancé ou métastatique	x			<i>EGFR</i> (10-35 %) : L858R (45 %) et délétions exon 19 (45 %)	Choix du traitement par ITK (erlotinib, afatinib, gefitinib)	[35, 36]
			x	<i>EGFR</i> : T790M (~60 %)	Résistance acquise au ITK (erlotinib, afatinib, gefitinib) sensibilité à l'osimertinib	[37, 38]
			x	<i>EGFR</i> : C797S (~40 %)	Résistance à l'osimertinib	[38]
		x		<i>ALK</i> fusion (3-7 %) <i>ROS1</i> fusion (~1 %)	Choix traitement crizotinib (ceritinib, alectinib, brigatinib)	[39, 40]
		x	x	<i>MET</i> amplification (2-4 %)	Choix traitement par inhibiteur de <i>MET</i> (essai clinique) et résistance acquise aux ITK de l' <i>EGFR</i> (5-20 %)	[41]
			x	<i>ALK</i> G1202R et L1196M	Résistance au crizotinib (20-30 %) et au TKI (50-70 %) (ceritinib, celectinib, brigatinib)	[42]
Cancer du côlon métastatique	x	x	<i>KRAS/NRAS</i> <i>KRAS</i> (~47 %) dont principalement G12D (~13 %), G12V (~10 %), G13D (~8 %) et <i>NRAS</i> (~4 %)	Résistance primaire aux anti- <i>EGFR</i> (cetuximab et panitumumab)	[43, 44]	
		x		Résistance acquise au cetuximab ou panitumumab	[46, 47]	
	x	x	Méthylation <i>WIF1/NPY</i>	Détection de l'ADN circulant tumoral	[45]	
Mélanome malin	x		<i>BRAF</i> (36,5 %) dont V600E (~23 %)	Choix du traitement vemurafenib	[48-54]	
Cancer du sein	x		<i>HER2</i> (amplification, surexpression, mutations)	Voir : mycancergenome.org	[55-57]	
		x	<i>ESR1</i> principalement E380Q, Y537C/S/N et D538G	Résistance aux inhibiteurs d'aromatase	[58, 59]	
	x	x	<i>PIK3CA</i> principalement E542K, E545K et H1047R	Résistance aux inhibiteurs <i>PIK3CA</i> Indication de l'ajout de l'alpelisib au fluvestrant chez les patientes porteuses d'une mutation <i>PIK3CA</i>	[55, 56]	
		x		Résistance aux inhibiteurs <i>PIK3CA</i>	[60] [61]	
Cancer de la prostate métastatique	x		<i>AR</i> : T878A et L702H + gain nombre de copies	Résistance primaire aux traitements anti-androgénique (enzalutamide ou abiratérone)	[62-64]	
		x	<i>AR</i> : variant d'épissage <i>AR-V7</i> (recherche sur cellules tumorales circulantes) ou vésicules extracellulaire (y compris dans l'urine)	Résistance secondaire aux traitements anti-androgénique (enzalutamide ou abiratérone)	[65-67, 70]	
		x	<i>HRR</i> (gènes de réparation de l'ADN)	Réponse aux inhibiteurs de <i>PARP</i>	[68, 69]	
Tumeurs du système nerveux central	x		<i>IDH1</i> (~40 %), <i>IDH2</i> (~3 %)	Classification cIMPACT-NOW des gliomes	[71]	
	x		<i>TERT</i> (promoteur) : C228T et C250T	Gliome diffu astrocytaire	[72]	
	x		<i>KIAA1549-BRAF</i> fusion	Astrocytomes pilocytiques	[73]	
	x		<i>FGFR1</i> duplication	Tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques	[74]	
	x		<i>BRAF</i> V600E	gangliogliomes et xanthoastrocytome pléomorphe	en développement	
	x		<i>H3K27M</i>	gliome diffus de la ligne médiane	en développement	
	x		<i>FGFR1</i>	glioneurales papillaires ou à rosette	en développement	
Cancer agressif de la thyroïde	x		<i>BRAF</i> V600E + <i>TERT</i> (promoteur) : C228T et C250T	escalade/désescalade thérapeutique	[77-78]	

Dg : diagnostic ; P : pronostic ; T : théranostique (choix du traitement) ; MR : maladie résiduelle ; R : résistance au traitement ; ITK : inhibiteur de tyrosine kinase. L'actualisation régulière de ces données peut être trouvée sur le site <https://www.mycancergenome.org>.

le LCR pourraient aussi être explorées, en particulier dans les cas où la biopsie est récusée.

Enfin, afin d'illustrer la grande flexibilité offerte par la PCRd permettant de disposer d'une plateforme pour la mise au point « à la carte » de moyens diagnostiques performants et économiques de mutations rares d'intérêt clinique, nous citons également un autre exemple de mise au point dans le cadre d'un cancer rare : le cancer hépatocellulaire fibrolamellaire (CHCf). Il s'agit d'une tumeur qui représente moins de 1 % des cancers hépatiques touchant les adolescents et les jeunes adultes sans antécédents de maladie primaire hépatique ou de cirrhose. Le séquençage d'ARN par RNA-seq sur le tissu tumoral de ces patients a permis de caractériser un transcrite de fusion spécifique, provenant des réarrangements chromosomiques entre l'exon 1 du gène *DNAJB1* et l'exon 2 du gène *PRKACA* [75]. Ce transcrite de fusion est actuellement recherché en diagnostic par la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur le tissu tumoral. La quantification relative de ce transcrite est réalisée, en recherche, par la technique de RT-PCRq (technique peu sensible, nécessitant une quantité importante d'ARN) [76]. Dans ce contexte, la mise au point d'un test en PCRd a permis une quantification sensible (à partir de 1 ng d'ARN), absolue (quantité d'ARN analysés (ng)/nombre de copies d'ARN obtenues $R^2 = 0,997$) et spécifique (présence du transcrite à la fois dans le tissu tumoral primitif et la métastase et non pas dans le tissu sain adjacent).

Applications pour l'évaluation pronostique

Certaines mutations ont une valeur pronostique, c'est-à-dire que leur détection permet de prédire *a priori* (avant traitement) la gravité de la maladie, ce qui peut permettre au praticien d'ajuster la stratégie thérapeutique soit par désescalade de la prise en charge en cas de pronostic favorable ou au contraire en intensifiant les traitements le cas échéant. A titre d'exemple, dans le cadre du cancer de la thyroïde papillaire, un cancer généralement de bon pronostic, l'association de la mutation *BRAF c.1799T>A* (p.Val600Glu) et des mutations de *TERTp* a un effet synergique (et non simplement additif) sur le mauvais pronostic tumoral avec un risque accru de récurrence, de caractère réfractaire au traitement par l'iode radioactif et de décès [77, 78].

Applications pour le choix de thérapies innovantes (valeur théranostique)

D'autres mutations ont une valeur théranostique, c'est-à-dire que leur identification permet de choisir une stratégie thérapeutique ciblée sur les bases d'un rationnel moléculaire. Cette dernière application est en plein développement. Ces tests moléculaires théranostiques également appelés « tests compagnons » accompagnent la prescription des thérapies ciblées. Quelques exemples (non exhaustifs) d'altérations moléculaires *hotspots* facilement détectables

par PCRd sont donnés dans le *tableau 1*. Dans le cadre du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) localement avancé ou métastatique [35, 36, 41, 42], l'une des principales applications actuelles concerne la recherche dans le gène codant le récepteur de l'EGF (*EGFR*) de certaines mutations dont la détection conditionne la prescription d'inhibiteur de tyrosine kinase (ITK). Notons, en revanche, que certaines anomalies moléculaires telles que les réarrangements *ALK* ou *ROS-1* qui sont pourtant essentielles à la sélection des patients atteints de CPNPC aptes à recevoir des thérapies ciblées (par exemple, le crizotinib) sont difficiles à mettre au point en PCRd car ces fusions impliquent plusieurs gènes et différentes jonctions d'exons. Le défi consisterait donc à mettre au point un test unique permettant de détecter ces mutations dans toutes les combinaisons de fusions, y compris le ou les partenaires de fusions inconnus ou non identifiés. Malgré cela, plusieurs publications ont rapporté la mise au point de test de PCRd pour la détection des fusions les plus fréquentes de *ALK* comme par exemple la translocation *EML4-ALK* avec une limite de détection de 0,25 % [39, 40]. Parmi les autres exemples d'applications de la PCRd dans le choix de thérapies innovantes, citons une situation un peu différente dans le cancer du côlon métastatique [43, 44]. Dans ce cas, la détection de mutations activatrices dans les gènes *KRAS* ou *NRAS* contre indique l'utilisation de traitements ciblés anti-EGFR (cetuximab et panitumumab). Par ailleurs, dans le mélanome malin, la détection de la mutation c.1799T>C (p.Val600Glu) dans le gène *BRAF* oriente vers la prescription d'inhibiteur de BRAF [48-54]. Enfin, plus récemment, dans le cancer du sein métastatique hormono-dépendant (HR+/HER2-), l'étude SOLAR-1 confirme le bénéfice de l'ajout de l'alpelisib, un inhibiteur sélectif de l'isoforme α de la PIK3 (phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate kinase) chez les patientes porteuses de mutations dans le gène *PIK3CA* (3 hotspots majeures représentent ~80 % des mutations activatrices) qui sont donc facilement détectables en PCRd grâce à des kits dédiés déjà commercialisés [60]. La recherche de ces mutations pourrait donc devenir prochainement un nouveau marqueur théranostique dans ce type de cancer.

Applications pour le suivi de la réponse thérapeutique (valeur prédictive)

Enfin, certaines mutations ont une valeur prédictive de la réponse thérapeutique (mutation de sensibilité et résistance). Quelques exemples (non exhaustifs) sont donnés dans le *tableau 1* dans le cadre du cancer du poumon non à petites cellules localement avancé ou métastatique [37, 38, 42], dans le cancer du sein [58-61] ou encore dans le cancer de la prostate métastatique [62-64]. Comme nous l'avons mentionné dans notre premier article [1], la PCRd peut être utilisée pour rechercher

ces mutations dans les tissus (notamment si la fréquence allélique est faible ou que l'ADN est dégradé) mais avec certaines difficultés qui sont propres à cette technologie (par exemple la présence de gouttelettes de fluorescence intermédiaire, un phénomène appelé « pluie » en particulier lorsque la PCRd est réalisée à partir d'ADN extrait en *FFPE*). C'est pourquoi il s'agit surtout d'une méthode adaptée à l'analyse des biopsies liquides et en particulier de l'ADN tumoral circulant pour le suivi des patients au cours de la progression tumorale.

Biopsies liquides

Les biopsies liquides (BL) regroupent des biomarqueurs circulants de nature différente dont : 1) l'ADN circulant total et tumoral, 2) les cellules tumorales circulantes (CTC), 3) les exosomes et 4) les microARN circulants. Ils peuvent être détectés chez les patients atteints de cancer dans la circulation sanguine et éventuellement dans d'autres fluides tels que le liquide céphalo-rachidien, les urines, voire la salive ou même les larmes. Ces BL permettent d'obtenir « en temps réel » des informations cellulaires et moléculaires (acides nucléiques, protéines) sur la tumeur même si celle-ci n'est pas biopsiable. Ces analyses sont actuellement en plein essor et constituent un enjeu médical et industriel majeur dans le domaine de l'oncologie. Cet engouement est dû aux nombreux avantages qu'elles représentent. En particulier, elles sont peu invasives comparées aux biopsies tissulaires, sont en théorie accessibles quelle que soit la tumeur (profonde, petite, multiple...) et peuvent être *a priori* réalisées quel que soit l'état clinique du patient. Elles représentent donc une méthode alternative aux biopsies solides, en particulier quand ces dernières ne sont pas réalisables ou non interprétables soit dans environ 15 à 20 % des cas tous cancers confondus. De plus, l'analyse d'ADN circulant extrait à partir du plasma ou de l'ARNm extraits de CTC (exemple du variant 7 du récepteur aux androgènes (AR-V7) dans la prédiction des résistances aux traitements antihormonaux dans le cancer de la prostate métastatique [70]) apporte une information complémentaire totalement nouvelle. Elle permet de prendre en compte l'hétérogénéité tumorale en intégrant les altérations moléculaires de différentes tumeurs ou métastases sans se limiter à l'analyse du tissu le plus facilement accessible. Il s'agit d'une information parfaitement complémentaire qui permet de prendre un certain recul et de considérer la pathologie à l'échelle du corps. En effet, le système sanguin est un « système fermé » dont la variation des constituants donne une information en temps réel de l'équilibre biologique d'un individu. Cet intérêt est renforcé par la demi-vie de l'ADN circulant qui est courte (de l'ordre de 15 min à 2 heures), ce qui pourrait refléter l'équilibre global et l'évolution des altérations moléculaires des différents organes au cours de la progression tumorale et en cours de traitement. Ceci ouvre la perspective

de pouvoir adapter les stratégies thérapeutiques « en temps réel » ou du moins plus rapidement que sur la base des cinétiques de marqueurs tumoraux classiques ou de l'imagerie. Dans ce contexte, la PCRd présente de nombreux avantages en comparaison avec les autres techniques d'analyse grâce : 1) à sa sensibilité et sa capacité à pouvoir analyser de très faibles concentrations et leurs variations avec une très grande confiance, 2) au fait que la limite de détection (LoD) soit égale à la limite de quantification (LoQ) et que par conséquent le moindre événement validé soit quantifiable, 3) au fait que la normalisation de la mesure d'altération soit intégrée à chaque analyse par la co-amplification d'un ADN de référence (ADN sauvage, exon/gène de référence...), 4) au fait que dans le cas d'échantillons non mutés, il soit possible d'estimer la sensibilité maximale atteinte par analyse (SenMax) par un simple calcul, à partir de la concentration des copies d'ADN sauvage [ADNwt], du nombre total de gouttelettes (N), du volume des gouttelettes (Vd) et de la LoD de chaque multiplex :

$$SenMax (\%) = \frac{-\ln \left(\frac{N-LoD}{N} \right)}{[ADNwt] \times Vd} \times 100$$

En d'autres termes, si le résultat est rendu négatif, on peut indiquer la fraction allélique minimale qu'il était possible de détecter le jour de l'analyse compte tenu des paramètres au moment de la mesure. La PCRd est la seule technologie permettant d'accéder à cette information. Toutefois, elle n'est actuellement pas utilisée en routine, la décision clinique de traiter ou non un patient est toujours basée sur un critère qualitatif voire semi-quantitatif par NGS. La définition d'une valeur seuil décisionnel de l'administration d'un traitement est un champ d'étude prometteur mais encore inexploré par des études cliniques. La réactivité est un autre des avantages des biopsies liquides, elle permet de réduire le coût et le temps de rendu des résultats en raccourcissant le circuit de traitement des prélèvements, ce qui peut se révéler décisif dans la prise en charge des patients. Dans ce contexte, le facteur limitant de la PCRd reste sa capacité encore limitée à rechercher plusieurs altérations dans la même analyse, d'où la nécessité de développer un test pour chaque altération ainsi que de connaître laquelle doit être recherchée dans un contexte donné. Pour cette unique raison, elle reste encore en concurrence avec d'autres technologies telles que le séquençage de nouvelle génération qui peuvent rechercher de nombreuses cibles dans la même analyse, même si ces technologies restent semi-quantitatives et nécessitent des quantités d'ADN plus importantes. Le développement de tests multiplexés et l'arrivée de plateformes de PCRd à 6 couleurs (annoncée par la société Stilla technologies) pourraient permettre dans le futur un criblage rapide d'un plus grand nombre d'anomalies récurrentes et lever ainsi les limites actuelles.

Principales applications en oncohématologie

Les applications de la PCRd sont multiples en oncohématologie, en tant qu'outil pour le diagnostic/pronostic, mais c'est surtout sur le versant du suivi de la maladie résiduelle qu'elles sont en plein essor, ainsi que dans le suivi des greffes de cellules souches hématopoïétiques. Comme pour la plupart des tumeurs « solides », de nombreuses anomalies moléculaires ont été identifiées dans les diverses pathologies d'oncohématologie. Ces anomalies moléculaires affectent différentes fonctions cellulaires (épissage de l'ADN, méthylation de l'ADN, modification de la chromatine, régulation de la transcription et différentes voies de signalisation dont la régulation de la protéine TP53). Elles peuvent être recherchées dans les cellules mononuclées (CMN) sanguines et/ou médullaires qui sont des matrices de choix. Mais peu à peu à l'instar des tumeurs solides, les approches par biopsie liquide commencent à faire leur apparition.

Applications pour le diagnostic

Dans le cadre du diagnostic, de nombreuses mutations causales peuvent être retrouvées sur un ou plusieurs gènes. La PCRd n'est possible que dans les maladies associées à des anomalies connues (ou *hotspot*) comme c'est le cas, par exemple, avec le transcrite de fusion *BCR-ABL* dans la leucémie myéloïde chronique [79]. Le *tableau 2* reprend les principales applications de la PCRd au diagnostic [79-87]. A noter que si la plupart des mutations se recherchent sur sang ou moelle osseuse, la recherche de mutations dans d'autres biofluides semble une voie d'avenir, notamment pour la recherche de la mutation *MYD88 c.794T>C* (p.Leu265Pro) dans le liquide céphalo-

rachidien des patients atteints de lymphomes cérébraux primitifs. Hiemcke-Jiwa *et al.* ont montré que cette mutation est détectable dans 85 % des cas sur biopsie liquide, ce qui pourrait permettre de proposer une méthode alternative à la biopsie cérébrale [86].

Applications pour le suivi et la maladie résiduelle (MRD)

Le suivi de la maladie résiduelle (MRD) est un enjeu majeur après traitement afin d'évaluer la réponse et de détecter le plus précocement possible une éventuelle rechute. Certaines anomalies moléculaires peuvent être utilisées en tant que marqueur de la MRD. C'est le cas par exemple de *NPM1* dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) [89, 90]. Ce suivi nécessite une technologie sensible capable de déceler de très petits clones. La PCR quantitative reste à l'heure actuelle la technique de référence mais le NGS et la PCRd ont fait leur apparition depuis quelques années. Les principales cibles pouvant actuellement être recherchées par PCRd dans le cadre du suivi sont résumées dans le *tableau 2* [88-97]. L'amélioration des technologies et l'accumulation de données permettra vraisemblablement à la PCRd de se développer à plus grande échelle dans cette utilisation [88].

Applications pour le suivi des greffes de cellules souches hématopoïétiques

Dans certaines hémopathies, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques représente un traitement curatif établi pour divers troubles hématologiques malins et non malins. Le remplacement de l'hématopoïèse du receveur par celle du donneur est la clé du succès de la greffe. C'est pourquoi la détection et la quantification du chimérisme donneur/receveur sont importantes dans la

Tableau 2. Principales applications de la PCRd en oncohématologie.

Pathologie	Anomalie	Diagnostic (D) Suivi (S)	Référence
LMC	<i>BCR-ABL</i> (fusion)	D + S	[79]
SMP <i>BCR-ABL</i> négatif	<i>JAK2V617F</i>	D + S	[80-82]
	<i>CALR</i> del52pb <i>CALR</i> ins 5pb	D + S	[83]
Mastocytose	<i>c-KIT</i> D816V	D	[84]
Maladie de Waldenström	<i>MYD88</i> L265P	D	[85]
Lymphomes cérébraux primitifs	<i>MYD88</i> L265P	D	[86]
Leucémie à tricholeucocytes	<i>BRAF</i> V600E	D + S	[87]
LAM	<i>NPM1</i>	S	[88-90]
LAM promyélocytaire	<i>PML-RARα</i> (fusion)	S	[91]
LAM	<i>IDH1/2</i>	S	[93, 94]
LAM Core Binfing Factor	<i>c-KIT</i> D816V	S	[92]
Myélome multiple et lymphome du manteau	IGH	S	[95]
Leucémie aiguë lymphoblastique	IGH/TCR	S	[96]
Lymphome folliculaire	IGH/BCL2	S	[97]
Chimérisme après allogreffe de CSH	AMELY/SRY (Ch. Y) ABCD1 (Chr. X)	S	[98-104]

phase de prise de greffe mais aussi dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle. Aujourd'hui, il existe deux techniques complémentaires permettant la quantification du chimérisme donneur/receveur en routine dans les laboratoires d'analyses médicales : une première basée sur l'analyse de taille des microsatellites (STR) par séquençage et l'autre par la quantification de marqueurs polymorphiques (types insertions/délétions) par PCRq [98]. Cependant, leur utilisation est principalement limitée par leur gamme d'analyse (STR : 30 % - 80 %, PCRq : 0,1 %-30 %) [99, 100], ce qui impose au laboratoire de maîtriser deux techniques et notamment la technique de STR dont l'utilisation est aussi limitée par son manque de sensibilité (5 %). Ajoutons que le nombre de greffes de CSH dans le cadre des hémoglobinopathies augmente. Ces greffes dont le protocole de myéloablation n'est pas aussi drastique que celui précédant les greffes de CSH dans le cadre d'hémopathie, entraînent un chimérisme mixte (40 – 80 % donneur). Or, comme évoqué précédemment, la PCRq qui est utilisée en routine pour pallier le manque de sensibilité de la STR n'est plus fiable dans cette gamme de mesure. Une technique unique alliant sensibilité et quantification absolue comme la PCRd serait donc très intéressante. Des équipes ont étudié les performances analytiques de la quantification du chimérisme par PCRd [99-104] en utilisant en général des sondes/amorces ciblant une région du chromosome Y, soit le gène AMELY soit le gène SRY. Dès 2013, George *et al.* [100] montrent une linéarité de quantification du chimérisme par PCRd (sonde AMELY), avec un coefficient de corrélation de $r^2 = 0,9999$ pour un intervalle de mesure de 0,10 % à 50 %. Grâce à sa très grande sensibilité, Santurtun *et al.* concluent au net avantage de la PCRd quand il existe un doute sur un chimérisme mixte [102] et observent une forte corrélation entre la quantification du chimérisme par PCRd (sonde SRY) et par STR. Ceci est confirmé par Stahl *et al.* [99] qui trouvent également une excellente corrélation entre la technique PCRd (sonde SRY) et la STR ($R > 0,98$) associée à une sensibilité $< 0,1$ %. Plus tard en 2017, Waterhouse *et al.* [101] montrent une linéarité de mesure de quantification du chimérisme sur un intervalle de 0 % à 50 % avec une sonde liée à l'Y (SRY) ($R^2 = 0,9946$) et une sonde liée à l'X (ABCD1) ($r^2 = 0,9416$), une corrélation entre la technique de PCRd avec la technique de STR ($r^2 = 0,920$) et établissent une sensibilité à 0,01 %. Les deux études les plus récentes (2018) [103, 104] confirment les conclusions des études antérieures en montrant une bonne linéarité et sensibilité et une forte corrélation de la PCRd avec les techniques de STR et de FISH. Les auteurs concluent à la détection et la quantification du chimérisme par PCRd, une méthode unique, simple et peu coûteuse pour le suivi des patients greffés de CSH. Waterhouse *et al.* proposent, quant à eux, de coupler la recherche du chimérisme à un marqueur de MRD lorsqu'il existe, en utilisant une plateforme de PCRd, permettant

ainsi d'évaluer la réponse moléculaire des patients ayant bénéficié d'une allogreffe de CSH [104]. Enfin, l'équipe de Waterhouse *et al.* [101] a étudié le caractère prédictif de la quantification du chimérisme par PCRd pour le diagnostic de rechute par rapport aux autres techniques. Ils ont étudié 32 patients faisant une rechute après allogreffe de CSH. Chez 15 de ces patients (48 %), l'augmentation du chimérisme receveur a été détectée plus précocement par PCRd que par STR. L'augmentation du chimérisme receveur avant le diagnostic de rechute a été mesurée à 65 jours avec la STR et à 155 jours avec la PCRd. Les auteurs concluent à un caractère prédictif de rechute après greffe de CSH par quantification du chimérisme receveur par PCRd, avec une différence moyenne de 90 jours entre la PCRd et la STR. En pratique, les applications de la PCRd dans ce contexte sont la détection de marqueurs informatifs pour le donneur et pour le receveur et le suivi quantitatif du chimérisme.

Diagnostic prénatal non invasif

La présence d'ADN libre circulant d'origine fœtale (*cell-free fetal DNA*, cffDNA) dans le sang maternel a été démontrée en 1997 par le Professeur Dennis Lo [105]. Cette équipe fut la première au monde à mettre en évidence la présence de séquences spécifiques du chromosome Y dans le plasma de femmes enceintes d'un fœtus de sexe masculin. Ces travaux préliminaires cruciaux ont permis le développement du diagnostic prénatal non invasif (DPNI) afin de rechercher par un simple prélèvement sanguin maternel certaines pathologies génétiques monogéniques sévères, des aneuploïdies et autres affections liées à la grossesse, éliminant ainsi le risque de perte fœtale due aux gestes invasifs [106]. Le principe du DPNI est basé sur la capacité d'une technologie à détecter de l'ADN libre circulant d'origine fœtale (cffDNA) parmi l'ADN libre circulant total présent dans le plasma maternel (*cell-free total DNA*, cftDNA). Cependant, cette détection constitue un véritable défi technique du fait des caractéristiques biologiques intrinsèques du cffDNA qui limitent la mise en œuvre de ces approches dans le diagnostic de routine. La problématique dans ces applications est très proche de celle que nous avons décrite pour l'ADN circulant tumoral. Tout d'abord, la quantité totale de cftDNA est faible et varie considérablement d'un individu à l'autre, représentant l'équivalent de 600 à 1 000 équivalent génome/mL de plasma [107]. Le cffDNA, libéré dans la circulation maternelle lors du renouvellement des cellules du syncytiotrophoblaste, est détectable dès la 5^e semaine d'aménorrhée (SA) et sa concentration augmente tout au long de la grossesse. La fraction de cffDNA représente cependant une faible proportion du cftDNA (~5-10 % vers la 10^e SA) et il se retrouve donc mélangé à un ADN maternel largement majoritaire jusqu'à 20 fois plus concentré. De même, le cffDNA et cftDNA circulent dans le

plasma maternel sous forme de fragments de courte taille d'environ 150 pb, ce qui entraîne des contraintes techniques pour le design des amplicons de PCR susceptibles d'amplifier ces matrices. Enfin, la moitié du génome fœtal est héritée de la mère et est donc identique à celle-ci. Par conséquent, des technologies sensibles, spécifiques et précises sont nécessaires afin d'étudier cette sous-population de cfDNA malgré la présence d'ADN maternel environnant. Dans ce contexte, la PCRd représente une méthode séduisante pour l'analyse des caractéristiques génétiques du fœtus et plusieurs tests ont été développés dans le cadre du DPNI. Les premières applications visaient à mettre en évidence des séquences absentes du génome maternel telles que des séquences du chromosome Y pour la détermination non invasive du sexe fœtal, notamment dans le contexte de maladie génétique liée à l'X [108] ou des exons spécifiques du gène RHD afin d'identifier le génotype RHD fœtal dans des situations à risque d'allo-immunisation fœto-maternelle [107-110]. Dans ce contexte, les performances diagnostiques de la PCRd reposent sur sa grande sensibilité et spécificité lors de la mise en évidence d'une cible rare au sein d'un mélange complexe [111]. Par la suite, des applications basées sur la détection qualitative des mutations absentes du génome maternel ont été développées. Celles-ci s'appuient sur la spécificité de la PCRd pour discriminer des séquences hautement similaires comme les allèles WT et mutés d'un même locus. Ainsi, le DPNI permet de rechercher des pathologies liées à des mutations sporadiques [112] ou des mutations héritées du père, comme dans la neurofibromatose [113]. La détection quantitative des allèles sauvages et mutés permet également d'envisager le DPNI de maladies monogéniques, même lorsque la mère porte la mutation causale comme dans la β -thalassémie [114], la drépanocytose [115], l'hémophilie [116] et l'achondroplasie [117]. Certaines de ces pathologies peuvent résulter d'un grand nombre de mutations différentes dans un même gène [118, 119]. Dans ce cas, la PCRd représente une plateforme permettant la mise au point d'analyses personnalisées spécifiques à chaque mutation et à chaque famille [120]. Cette solution a un intérêt économique dans la mesure où sa mise en œuvre peut être réalisée dans la plupart des laboratoires de biologie moléculaire. Cependant, la capacité de mener des expériences significatives et robustes nécessite une conception minutieuse du test et l'utilisation de contrôles adéquats. Enfin, les applications les plus récentes reposent sur le comptage moléculaire d'évènements également présents dans le génome maternel, et font appel aux qualités de la PCRd en termes de précision. Ainsi, des tests non invasifs de dépistage de la trisomie 21 fœtale peuvent être réalisés par PCRd en utilisant des amorces et sondes d'hydrolyse spécifiques du chromosome 21 et d'un autre chromosome servant de référence [121, 122]. Dans une étude récente de validation

sur des échantillons de plasma provenant de 213 femmes enceintes, il a été montré que la PCRd permettait de détecter une trisomie 21 même lorsque la teneur en ADN trisomique de l'échantillon était aussi faible que 5 % et permettait de différencier clairement les groupes trisomie 21 et euploïdie [123]. Le développement de tests de détection des aneuploïdies par PCRd est réalisable mais n'est pas utilisé en routine dans la mesure où il existe d'autres technologies plus onéreuses mais très fiables comme le séquençage massif parallèle qui consiste à aligner les séquences détectées sur le chromosome d'intérêt, par exemple le 21 afin d'identifier un déséquilibre.

Exemple d'applications dans le cadre du diagnostic de maladies génétiques en mosaïque : le syndrome de McCune-Albright

Comme pour l'oncogénétique somatique, la PCRd peut présenter un intérêt tout particulier pour la détection de maladies génétiques monogéniques en mosaïque. Nous donnons ici un exemple mis en œuvre à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille concernant le syndrome de McCune-Albright (SMA). Le SMA est une maladie génétique non héréditaire à révélation pédiatrique, caractérisée par des tâches café-au-lait, une dysplasie des os et des endocrinopathies multiples, dont la plus fréquente est une puberté précoce périphérique [124, 125]. Le SMA est dû à des mutations activatrices du gène *GNAS*, dont les plus fréquentes sont les mutations c.601C>T (p.Arg201Cys) et c.602G>A (p.Arg201His) [126]. Ces mutations surviennent en période post-zygotique, au cours du développement embryonnaire, aboutissant à la présence dans le corps de l'individu, d'une double population de cellules somatiques, certaines portant la mutation et d'autres non. En raison de ce mosaïcisme somatique, ces mutations sont souvent indétectables dans le sang par les techniques classiques de biologie moléculaire. En outre, les prélèvements biopsiques ne sont pas recommandés en dehors d'une indication chirurgicale. La PCRd permet de mettre en évidence des évènements mutationnels rares sur des prélèvements d'origines multiples : somatiques, sang total. Romanet *et al.* ont développé la recherche de ces 2 mutations les plus fréquentes de *GNAS* par PCRd pour le diagnostic moléculaire du SMA [127]. La phase de validation initiale a permis de s'assurer : 1) de l'excellente spécificité de la technique qui n'a montré aucun faux-positif, 2) de ses performances adéquates, en comparant les résultats obtenus pour une série d'échantillons par une technique de PCR nichées avec enrichissement de l'allèle muté par digestion enzymatique de l'allèle sauvage [128]. Les auteurs ont ensuite analysé une série de 17 patients avec une forme complète ou incomplète du syndrome. Cinq d'entre eux ont pu bénéficier également d'une analyse sur ADN

circulant. Une mutation de GNAS a été mise en évidence chez 7 des 12 patients ayant bénéficié d'une recherche sur ADN extrait du sang total et 4 des 5 patients ayant bénéficié d'une stratégie combinée sur ADN extrait du sang total et ADN circulant. En conclusion, la PCRd a présenté dans cette indication des performances analytiques et diagnostiques comparables à celles d'un séquençage NGS ultra-profond couplé à une méthode d'enrichissement par une méthode utilisant des acides nucléiques peptidiques (PNA) bloquant l'amplification de l'allèle sauvage, considéré comme la méthode la plus sensible mais également plus difficile à mettre en œuvre [129]. Cette première série offre ainsi des perspectives intéressantes, à la fois médicalement et économiquement, pour l'amélioration du diagnostic moléculaire non-invasif de cette maladie en mosaïque et ouvre des perspectives intéressantes pour l'ensemble des pathologies monogéniques en mosaïque.

Conclusion et perspectives

Comme nous l'avons présenté tout au long de cet article, la PCRd possède un certain nombre d'avantages qui la positionne en bonne place dans l'arsenal des techniques de biologie moléculaire utilisables en routine dans un laboratoire de biologie clinique. Elle permet une multitude d'applications dans la quasi-totalité des disciplines. Elle est tout particulièrement adaptée dans un contexte demandant une mesure quantitative d'une séquence nucléotidique (définissant une entité biologique exogène par exemple), d'une altération moléculaire dans un contexte où le bruit de fond est important (biopsie liquide, tumeurs, mosaïcisme) ou dans des milieux complexes en présence d'inhibiteurs. La mise en place de ce type de technologie dans un laboratoire (en particulier dans un milieu hospitalier) doit permettre de réfléchir au-delà des services et des disciplines dans le cadre du projet médical de l'établissement pour une utilisation mutualisée, ce qui devrait permettre à la fois de réduire le temps de rendu des résultats mais aussi d'optimiser les coûts. L'approche ciblée proposée par la PCRd permet également de repenser les stratégies de dépistage des altérations moléculaires en prenant en compte à la fois les fréquences de ces anomalies et le service médical rendu. Cette technologie de PCR de 3^e génération est encore récente. Par conséquent, son positionnement doit continuer à être affiné. De même, les validations de méthodes incluant les programmes d'évaluation externe de la qualité doivent se développer afin de répondre aux exigences des normes de qualité dans le cadre de l'accréditation. Quoi qu'il en soit, les performances de cette technique ainsi que sa flexibilité en font déjà un outil incontournable pour certaines applications soutenues par le développement des biopsies liquides et des tests compagnons en oncologie. Dans ce cadre, le potentiel de cette

technique est très important et prometteur. La possibilité de descendre en sensibilité parfois de plusieurs logs permet d'envisager des applications souvent considérées comme inaccessibles comme la détection précoce des cancers et des rechutes ou métastases qui sont des enjeux majeurs pour les politiques de santé publique. Les modalités de financements de ces tests devront également s'adapter à ces évolutions afin de tirer le meilleur parti de ces technologies accessibles à de nombreux laboratoires au bénéfice des patients et des progrès de la médecine de précision.

Liens d'intérêts : F. Fina est directeur scientifique pour ID solutions. D. Henaff est salarié d'ID solutions (R&D). V. Taly est co-fondatrice de Emulseo et consultante pour la société Raindance Technologies. Les autres auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêts en rapport avec cet article.

Références

1. Denis JA, Nectoux J, Lamy PJ, Rouillac Le Sciellour C, Guermouche H, Alary AS, *et al.* Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations. *Ann Biol Clin (Paris)* 2018 ; 76(5) : 505-23.
2. Didelot A, Kotsopoulos SK, Lupo A, Pekin D, Li X, Atochin I, *et al.* Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of DNA integrity in clinical samples. *Clin Chem* 2013 ; 59(5) : 815-23.
3. Denis JA, Guillerm E, Coulet F, Larsen AK, Lacorte JM. The role of BEAMing and Digital PCR for multiplexed analysis in molecular oncology in the era of next-generation sequencing. *Mol Diagn Ther* 2017 ; 21(6) : 587-600.
4. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 ; 108(23) : 9530-5.
5. Burke DG, Dong L, Bhat S, Forbes-Smith M, Fu S, Pinheiro L, *et al.* Digital polymerase chain reaction measured pUC19 marker as calibrant for HPLC measurement of DNA quantity. *Anal Chem* 2013 ; 85(3) : 1657-64.
6. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* 2015 ; 16(3) : 172-83.
7. Turner KM, Deshpande V, Beyter D, Koga T, Rusert J, Lee C, *et al.* Extrachromosomal oncogene amplification drives tumour evolution and genetic heterogeneity. *Nature* 2017 ; 543(7643) : 122-5.
8. Handsaker RE, Van Doren V, Berman JR, Genovese G, Kashin S, Boettger LM, *et al.* Large multiallelic copy number variations in humans. *Nat Genet* 2015 ; 47(3) : 296-303.
9. Cantsilieris S, Western PS, Baird PN, White SJ. Technical considerations for genotyping multi-allelic copy number variation (CNV), in regions of segmental duplication. *BMC Genomics* 2014 ; 15 : 329.
10. de Smith AJ, Walsh KM, Hansen HM, Endicott AA, Wiencke JK, Metayer C, *et al.* Somatic mutation allelic ratio test using dPCRd (SMART-dPCRd): an accurate method for assessment of preferential allelic imbalance in tumor DNA. *PLoS One* 2015 ; 10(11) : e0143343.
11. Williams C, Ponten F, Moberg C, Soderkvist P, Uhlen M, Ponten J, *et al.* A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999 ; 155(5) : 1467-71.

12. Nadauld L, Regan JF, Miotke L, Pai RK, Longacre TA, Kwok SS, *et al.* Quantitative and sensitive detection of cancer genome amplifications from formalin fixed paraffin embedded tumors with droplet digital PCR. *Transl Med (Sunnyvale)* 2012; 2(2): 1000107.
13. Marques FZ, Prestes PR, Pinheiro LB, Scurrah K, Emslie KR, Tomaszewski M, *et al.* Measurement of absolute copy number variation reveals association with essential hypertension. *BMC Med Genomics* 2014; 7: 44.
14. Hedayat AA, Linos K, Jung HS, Tafe LJ, Yan S, LeBlanc RE, *et al.* Evaluating melanocytic lesions with single nucleotide polymorphism (SNP) chromosomal microarray. *Exp Mol Pathol* 2017; 103(3): 279-87.
15. Fina F, Baretts D, Colin C, Bouvier C, Padovani L, Nanni-Metellus I, *et al.* Droplet digital PCR is a powerful technique to demonstrate frequent FGFR1 duplication in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Oncotarget* 2017; 8(2): 2104-13.
16. Appay R, Fina F, Macagno N, Padovani L, Colin C, Baretts D, *et al.* Duplications of KIAA1549 and BRAF screening by Droplet Digital PCR from formalin-fixed paraffin-embedded DNA is an accurate alternative for KIAA1549-BRAF fusion detection in pilocytic astrocytomas. *Mod Pathol* 2018; 31(10): 1490-501.
17. Cassinari K, Quenez O, Joly-Helas G, Beaussire L, Le Meur N, Castelain M, *et al.* A simple, universal, and cost-efficient digital PCR method for the targeted analysis of copy number variations. *Clin Chem* 2019; 65(9): 1153-60.
18. Kline MC, Romsos EL, Duewer DL. Evaluating digital PCR for the quantification of human genomic DNA: accessible amplifiable targets. *Anal Chem* 2016; 88(4): 2132-9.
19. Miotke L, Lau BT, Rumma RT, Ji HP. High sensitivity detection and quantitation of DNA copy number and single nucleotide variants with single color droplet digital PCR. *Anal Chem* 2014; 86(5): 2618-24.
20. Bell AD, Usher CL, McCarroll SA. Analyzing copy number variation with droplet digital PCR. *Methods Mol Biol* 2018; 1768: 143-60.
21. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2013; 14(3): 204-20.
22. Zuccotti M, Grant M, Monk M. Polymerase chain reaction for the detection of methylation of a specific CpG site in the G6pd gene of mouse embryos. *Methods Enzymol* 1993; 225: 557-67.
23. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(18): 9821-6.
24. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, *et al.* MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8): E32.
25. Yu M, Heinzerling TJ, Grady WM. DNA methylation analysis using droplet digital PCR. *Methods Mol Biol* 2018; 1768: 363-83.
26. Campan M, Weisenberger DJ, Trinh B, Laird PW. MethyLight and Digital MethyLight. *Methods Mol Biol* 2018; 1708: 497-513.
27. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, *et al.* MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(8): E32.
28. Garrigou S, Perkins G, Garlan F, Normand C, Didelot A, Le Corre D, *et al.* A study of hypermethylated circulating tumor DNA as a universal colorectal cancer biomarker. *Clin Chem* 2016; 62(8): 1129-39.
29. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, *et al.* Absolute quantification by droplet digital PCR *versus* analog real-time PCR. *Nat Methods* 2013; 10(10): 1003-5.
30. Ma J, Li N, Guarnera M, Jiang F. Quantification of plasma miRNAs by digital PCR for cancer diagnosis. *Biomark Insights* 2013; 8: 127-36.
31. Zeng Y, Novak R, Shuga J, Smith MT, Mathies RA. High-performance single cell genetic analysis using microfluidic emulsion generator arrays. *Anal Chem* 2010; 82(8): 3183-90.
32. Basu AS. Digital assays part II: digital protein and cell assays. *SLAS Technol* 2017; 22(4): 387-405.
33. Olmedillas-Lopez S, Garcia-Arranz M, Garcia-Olmo D. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology. *Mol Diagn Ther* 2017; 21(5): 493-510.
34. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr. LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339(6127): 1546-58.
35. Jovelet C, Madic J, Remon J, Honore A, Girard R, Rouleau E, *et al.* Crystal digital droplet PCR for detection and quantification of circulating EGFR sensitizing and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2017; 12(8): e0183319.
36. Zhu G, Ye X, Dong Z, Lu YC, Sun Y, Liu Y, *et al.* Highly sensitive droplet digital PCR method for detection of EGFR-activating mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Mol Diagn* 2015; 17(3): 265-72.
37. Madic J, Jovelet C, Lopez J, Andre B, Fatien J, Miran I, *et al.* EGFR C797S, EGFR T790M and EGFR sensitizing mutations in non-small cell lung cancer revealed by six-color crystal digital PCR. *Oncotarget* 2018; 9(100): 37393-406.
38. Thress KS, Paweletz CP, Felip E, Cho BC, Stetson D, Dougherty B, *et al.* Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. *Nat Med* 2015; 21(6): 560-2.
39. Wang Q, Yang X, He Y, Ma Q, Lin L, Fu P, *et al.* Droplet digital PCR for absolute quantification of EML4-ALK gene rearrangement in lung adenocarcinoma. *J Mol Diagn* 2015; 17(5): 515-20.
40. Lund HL, Hughesman CB, Fakhfakh K, McNeil K, Clemens S, Hocken K, *et al.* Initial diagnosis of ALK-positive non-small-cell lung cancer based on analysis of ALK status utilizing droplet digital PCR. *Anal Chem* 2016; 88(9): 4879-85.
41. Zhang Y, Tang ET, Du Z. Detection of MET gene copy number in cancer samples using the droplet digital PCR method. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146784.
42. Yoshida R, Sasaki T, Umekage Y, Tanno S, Ono Y, Ogata M, *et al.* Highly sensitive detection of ALK resistance mutations in plasma using droplet digital PCR. *BMC Cancer* 2018; 18(1): 1136.
43. Laurent-Puig P, Pekin D, Norm C, Kotsopoulos SK, Nizard P, Perez-Toralla K, *et al.* Clinical relevance of KRAS-mutated subclones detected with picodroplet digital PCR in advanced colorectal cancer treated with anti-EGFR therapy. *Clin Cancer Res* 2015; 21(5): 1087-97.
44. Bachet JB, Bouche O, Taieb J, Dubreuil O, Garcia ML, Meurisse A, *et al.* RAS mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGEORASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018; 29(5): 1211-9.

45. Garrigou S, Perkins G, Garlan F, Normand C, Didelot A, Le Corre D, *et al.* A study of hypermethylated circulating tumor DNA as a universal colorectal cancer biomarker. *Clin Chem* 2016; 62(8): 1129-39.
46. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, *et al.* Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532-6.
47. Vandeputte C, Kehagias P, El Housni H, Ameye L, Laes JF, Desmedt C, *et al.* Circulating tumor DNA in early response assessment and monitoring of advanced colorectal cancer treated with a multi-kinase inhibitor. *Oncotarget* 2018; 9(25): 17756-69.
48. Sanmamed MF, Fernandez-Landazuri S, Rodriguez C, Zarate R, Lozano MD, Zubiri L, *et al.* Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem* 2015; 61(1): 297-304.
49. Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, *et al.* Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep* 2015; 5: 11198.
50. Gray ES, Rizos H, Reid AL, Boyd SC, Pereira MR, Lo J, *et al.* Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget* 2015; 6(39): 42008-18.
51. Busser B, Lupo J, Sancey L, Mouret S, Faure P, Plumas J, *et al.* Plasma circulating tumor DNA levels for the monitoring of melanoma patients: landscape of available technologies and clinical applications. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 5986129.
52. Tsao SC, Weiss J, Hudson C, Christophi C, Cebon J, Behren A, *et al.* Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Sci Rep* 2015; 5: 11198.
53. Keller L, Guibert N, Casanova A, Brayer S, Farella M, Delaunay M, *et al.* Early circulating tumour DNA variations predict tumour response in melanoma patients treated with immunotherapy. *Acta Derm Venereol* 2019; 99(2): 206-10.
54. Charles J, Martel C, de Fraipont F, Leccia MT, Robert C, Busser B. Mechanisms of resistance to anti-BRAF treatments. *Ann Dermatol Venereol* 2014; 141(11): 671-81.
55. Gevensleben H, Garcia-Murillas I, Graeser MK, Schiavon G, Osin P, Parton M, *et al.* Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin Cancer Res* 2013; 19(12): 3276-84.
56. Belgrader P, Tanner SC, Regan JF, Koehler R, Hindson BJ, Brown AS. Droplet digital PCR measurement of HER2 copy number alteration in formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma tissue. *Clin Chem* 2013; 59(6): 991-4.
57. Heredia NJ, Belgrader P, Wang S, Koehler R, Regan J, Cosman AM, *et al.* Droplet digital PCR quantitation of HER2 expression in FFPE breast cancer samples. *Methods* 2013; 59(1): S20-3.
58. Reinert T, Goncalves R, Bines J. Implications of ESR1 mutations in hormone receptor-positive breast cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2018; 19(5): 24.
59. 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): 74448-59.
60. Andre F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, *et al.* Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019; 380(20): 1929-40.
61. Takeshita T, Yamamoto Y, Yamamoto-Ibusuki M, Tomiguchi M, Sueta A, Murakami K, *et al.* Clinical significance of plasma cell-free DNA mutations in PIK3CA, AKT1 and ESR1 gene according to treatment lines in ER-positive breast cancer. *Mol Cancer* 2018; 17(1): 67.
62. Gonzalez-Billalabeitia E, Conteduca V, Wetterskog D, Jayaram A, Attard G. Circulating tumor DNA in advanced prostate cancer: transitioning from discovery to a clinically implemented test. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2019; 22(2): 195-205.
63. Attard G, Antonarakis ES. Prostate cancer: AR aberrations and resistance to abiraterone or enzalutamide. *Nat Rev Urol* 2016; 13(12): 697-8.
64. Conteduca V, Wetterskog D, Sharabiani MTA, Grande E, Fernandez-Perez MP, Jayaram A, *et al.* Androgen receptor gene status in plasma DNA associates with worse outcome on enzalutamide or abiraterone for castration-resistant prostate cancer: a multi-institution correlative biomarker study. *Ann Oncol* 2017; 28(7): 1508-16.
65. Ma Y, Luk A, Young FP, Lynch D, Chua W, Balakrishnar B, *et al.* Droplet digital PCR based androgen receptor variant 7 (AR-V7) detection from prostate cancer patient blood biopsies. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8): E1264.
66. Tagawa ST, Antonarakis ES, Gjyzezi A, Galletti G, Kim S, Worroll D, *et al.* Expression of AR-V7 and ARv567es in circulating tumor cells correlates with outcomes to taxane therapy in men with metastatic prostate cancer treated in TAXYNERGY. *Clin Cancer Res* 2019; 25(6): 1880-8.
67. Woo HK, Park J, Ku JY, Lee CH, Sunkara V, Ha HK, *et al.* Urine-based liquid biopsy: non-invasive and sensitive AR-V7 detection in urinary EVs from patients with prostate cancer. *Lab Chip* 2018; 19(1): 87-97.
68. Ramakrishnan Geethakumari P, Schiewer MJ, Knudsen KE, Kelly WK. PARP inhibitors in prostate cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017; 18(6): 37.
69. Wu A, Attard G. Plasma DNA analysis in prostate cancer: opportunities for improving clinical management. *Clin Chem* 2019; 65(1): 100-7.
70. Ma Y, Luk A, Young FP, Lynch D, Chua W, Balakrishnar B, *et al.* Droplet digital PCR based androgen receptor variant 7 (AR-V7) detection from prostate cancer patient blood biopsies. *Int J Mol Sci* 2016; 17(8): E688.
71. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, *et al.* The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 2016; 131(6): 803-20.
72. Brat DJ, Aldape K, Colman H, *et al.* cIMPACT-NOW update 3: recommended diagnostic criteria for 'Diffuse astrocytic glioma, IDH-wildtype, with molecular features of glioblastoma, WHO grade IV'. *Acta Neuropathol* 2018; 136: 805-10.
73. Appay R, Fina F, Macagno N, Padovani L, Colin C, Baretts D, *et al.* Duplications of KIAA1549 and BRAF screening by Droplet digital PCR from formalin-fixed paraffin-embedded DNA is an accurate alternative for KIAA1549-BRAF fusion detection in pilocytic astrocytomas. *Mod Pathol* 2018; 31(10): 1490-501.
74. Fina F, Baretts D, Colin C, Bouvier C, Padovani L, Nanni-Metellus I, *et al.* Droplet digital PCR is a powerful technique to demonstrate frequent FGFR1 duplication in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Oncotarget* 2017; 8(2): 2104-13.
75. Honeyman JN, Simon EP, Robine N, Chiaroni-Clarke R, Darcy DG, Lim II, *et al.* Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chi-

- meric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Science* 2014; 343(6174): 1010-4.
76. Graham RP, Yeh MM, Lam-Himlin D, Roberts LR, Terracciano L, Cruise MW, *et al.* Molecular testing for the clinical diagnosis of fibrolamellar carcinoma. *Mod Pathol* 2018; 31(1): 141-9.
77. Liu R, Bishop J, Zhu G, Zhang T, Ladenson PW, Xing M. Mortality risk stratification by combining BRAF V600E and TERT promoter mutations in papillary thyroid cancer: genetic duet of BRAF and TERT promoter mutations in thyroid cancer mortality. *JAMA Oncol* 2017; 3(2): 202-8.
78. Yang X, Li J, Li X, Liang Z, Gao W, Liang J, *et al.* TERT promoter mutation predicts radioiodine-refractory character in distant metastatic differentiated thyroid cancer. *J Nucl Med* 2017; 58(2): 258-65.
79. Wang WJ, Zheng CF, Liu Z, Tan YH, Chen XH, Zhao BL, *et al.* Droplet digital PCR for BCR/ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: a high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *Eur J Haematol* 2018; 101(3): 291-6.
80. Fontanelli G, Barate C, Ciabatti E, Guerrini F, Grassi S, Del Re M, *et al.* Real-time PCR and droplet digital PCR: two techniques for detection of the JAK2(V617F) mutation in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(6): 766-73.
81. Nystrand CF, Ghanima W, Waage A, Jonassen CM. JAK2 V617F mutation can be reliably detected in serum using droplet digital PCR. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(2): 181-6.
82. Lee E, Lee KJ, Park H, Chung JY, Lee MN, Chang MH, *et al.* Clinical implications of quantitative JAK2 V617F analysis using droplet digital PCR in myeloproliferative neoplasms. *Ann Lab Med* 2018; 38(2): 147-54.
83. Anelli L, Zagaria A, Coccaro N, Tota G, Minervini A, Casieri P, *et al.* Droplet digital PCR assay for quantifying of CALR mutant allelic burden in myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol* 2016; 95(9): 1559-60.
84. Greiner G, Gurbisz M, Ratzinger F, Witzeneder N, Simonitsch-Klupp I, Mitterbauer-Hohendanner G, *et al.* Digital PCR: a sensitive and precise method for KIT D816V quantification in mastocytosis. *Clin Chem* 2018; 64(3): 547-55.
85. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I, Ferrante M, Jimenez C, Guerrini F, *et al.* Highly sensitive MYD88(L265P) mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in Waldenström macroglobulinemia. *Haematologica* 2018; 103(6): 1029-37.
86. Hiemcke-Jiwa LS, Leguit RJ, Snijders TJ, Bromberg JEC, Nierkens S, Jiwa NM, *et al.* MYD88 p.(L265P) detection on cell-free DNA in liquid biopsies of patients with primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol* 2019; 185(5): 974-7.
87. Guerrini F, Paolicchi M, Ghio F, Ciabatti E, Grassi S, Salehzadeh S, *et al.* The droplet digital PCR: a new valid molecular approach for the assessment of B-RAF V600E mutation in hairy cell leukemia. *Front Pharmacol* 2016; 7: 363.
88. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, *et al.* Digital PCR in myeloid malignancies: ready to replace quantitative PCR? *Int J Mol Sci* 2019; 20(9): E2249.
89. Bill M, Grimm J, Jentzsch M, Kloss L, Goldmann K, Schulz J, *et al.* Digital droplet PCR-based absolute quantification of pre-transplant NPM1 mutation burden predicts relapse in acute myeloid leukemia patients. *Ann Hematol* 2018; 97(10): 1757-65.
90. Mencia-Trinchant N, Hu Y, Alas MA, Ali F, Wouters BJ, Lee S, *et al.* Minimal residual disease monitoring of acute myeloid leukemia by massively multiplex digital PCR in patients with NPM1 mutations. *J Mol Diagn* 2017; 19(4): 537-48.
91. Albano F, Zagaria A, Anelli L, Coccaro N, Tota G, Brunetti C, *et al.* Absolute quantification of the pretreatment PML-RARA transcript defines the relapse risk in acute promyelocytic leukemia. *Oncotarget* 2015; 6(15): 13269-77.
92. Liu Z, Wang W, Zheng C, Tan Y, Chen X, Xu J, *et al.* Clinical significance of droplet digital PCR quantitative monitoring of KIT gene mutation levels in core binding factor leukemia. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(6): e124-6.
93. Brambati C, Galbiati S, Xue E, Toffalori C, Crucitti L, Greco R, *et al.* Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2016; 101(4): e157-61.
94. Petrova L, Vrbacky F, Lanska M, Zavrelova A, Zak P, Hrochova K. IDH1 and IDH2 mutations in patients with acute myeloid leukemia: Suitable targets for minimal residual disease monitoring? *Clin Biochem* 2018; 61: 34-9.
95. Drandi D, Kubiczekova-Besse L, Ferrero S, Dani N, Passera R, Mantovan B, *et al.* Minimal residual disease detection by droplet digital PCR in multiple myeloma, mantle cell lymphoma, and follicular lymphoma: a comparison with real-time PCR. *J Mol Diagn* 2015; 17(6): 652-60.
96. Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, De Novi LA, Ilari C, Apicella V, *et al.* Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016; 174(4): 541-9.
97. Cavalli M, De Novi LA, Della Starza I, Cappelli LV, Nunes V, Pulsoni A, *et al.* Comparative analysis between RQ-PCR and digital droplet PCR of BCL2/IGH gene rearrangement in the peripheral blood and bone marrow of early stage follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2017; 177(4): 588-96.
98. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, *et al.* Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002; 99(12): 4618-25.
99. Stahl T, Rothe C, Bohme MU, Kohl A, Kroger N, Fehse B. Digital PCR Panel for Sensitive Hematopoietic Chimerism Quantification after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Int J Mol Sci* 2016; 17(9): E1515.
100. George D, Czech J, John B, Yu M, Jennings LJ. Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism* 2013; 4(3): 102-8.
101. Waterhouse M, Pfeifer D, Follo M, Duyster J, Schafer H, Bertz H, *et al.* Early mixed hematopoietic chimerism detection by digital droplet PCR in patients undergoing gender-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(8): 1115-21.
102. Santurtun A, Riancho JA, Arozamena J, Lopez-Duarte M, Zarrabeitia MT. Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. *Int J Legal Med* 2017; 131(1): 67-72.
103. Okano T, Tsujita Y, Kanegane H, Mitsui-Sekinaka K, Tanita K, Miyamoto S, *et al.* Droplet digital PCR-based chimerism analysis for primary immunodeficiency diseases. *J Clin Immunol* 2018; 38(3): 300-6.
104. Waterhouse M, Pfeifer D, Duque-Afonso J, Follo M, Duyster J, Depner M, *et al.* Droplet digital PCR for the simultaneous analysis of

- minimal residual disease and hematopoietic chimerism after allogeneic cell transplantation. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(5): 641-7.
- 105.** Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997; 350(9076): 485-7.
- 106.** Tabor A, Alfirevic Z. Update on procedure-related risks for prenatal diagnosis techniques. *Fetal Diagn Ther* 2010; 27(1): 1-7.
- 107.** Barrett AN, Zimmermann BG, Wang D, Holloway A, Chitty LS. Implementing prenatal diagnosis based on cell-free fetal DNA: accurate identification of factors affecting fetal DNA yield. *PLoS One* 2011; 6(10): e25202.
- 108.** Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. Noninvasive fetal sex determination using cell-free fetal DNA: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2011; 306(6): 627-36.
- 109.** Rouillac-Le Sciellour C, Puillandre P, Gillot R, Baulard C, Metral S, Le Van Kim C, *et al.* Large-scale pre-diagnosis study of fetal RHD genotyping by PCR on plasma DNA from RhD-negative pregnant women. *Mol Diagn* 2004; 8(1): 23-31.
- 110.** Orhant L, Rondeau S, Vasson A, Anselem O, Goffinet F, Allach El Khattabi L, *et al.* Droplet digital PCR, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the determination of fetal RHD genotype. *Ann Biol Clin (Paris)* 2016; 74(3): 269-77.
- 111.** Nectoux J. Current, emerging, and future applications of digital PCR in non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Diagn Ther* 2018; 22(2): 139-48.
- 112.** Orhant L, Anselem O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburgrave N, *et al.* Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. *Prenat Diagn* 2016; 36(5): 397-406.
- 113.** Gruber A, Pacault M, El Khattabi LA, Vaucouleur N, Orhant L, Bienvenu T, *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of paternally inherited disorders from maternal plasma: detection of NF1 and CFTR mutations using droplet digital PCR. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(5): 728-38.
- 114.** Lun FM, Tsui NB, Chan KC, Leung TY, Lau TK, Charoenkwan P, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(50): 19920-5.
- 115.** Barrett AN, McDonnell TC, Chan KC, Chitty LS. Digital PCR analysis of maternal plasma for noninvasive detection of sickle cell anemia. *Clin Chem* 2012; 58(6): 1026-32.
- 116.** Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, *et al.* Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood* 2011; 117(13): 3684-91.
- 117.** Orhant L, Anselem O, Fradin M, Becker PH, Beugnet C, Deburgrave N, *et al.* Droplet digital PCR combined with minisequencing, a new approach to analyze fetal DNA from maternal blood: application to the non-invasive prenatal diagnosis of achondroplasia. *Prenat Diagn* 2016; 36(5): 397-406.
- 118.** De Boeck K, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV, Viviani L. The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014; 13(4): 403-9.
- 119.** Juan-Mateu J, Gonzalez-Quereda L, Rodriguez MJ, Baena M, Verdura E, Nascimento A, *et al.* DMD mutations in 576 dystrophinopathy families: a step forward in genotype-phenotype correlations. *PLoS One* 2015; 10(8): e0135189.
- 120.** Gruber A, Pacault M, El Khattabi LA, Vaucouleur N, Orhant L, Bienvenu T, *et al.* Non-invasive prenatal diagnosis of paternally inherited disorders from maternal plasma: detection of NF1 and CFTR mutations using droplet digital PCR. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(5): 728-38.
- 121.** Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, *et al.* Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(32): 13116-21.
- 122.** Fan HC, Blumenfeld YJ, El-Sayed YY, Chueh J, Quake SR. Microfluidic digital PCR enables rapid prenatal diagnosis of fetal aneuploidy. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(5): 543 e1-7.
- 123.** El Khattabi LA, Rouillac-Le Sciellour C, Le Tessier D, Luscan A, Coustier A, Porcher R, *et al.* Could digital PCR be an alternative as a non-invasive prenatal test for trisomy 21: a proof of concept study. *PLoS One* 2016; 11(5): e0155009.
- 124.** McCune DJ. Osteitis fibrosa cystica: the case of a nine-year-old girl who also exhibits precocious puberty, multiple pigmentation of the skin and hyperthyroidism. *Am J Dis Child* 1936; 52: 743-4.
- 125.** Albright F, Butler AM, Hampton AO, Smith P. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas, of pigmentation, and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females: report of 5 cases. *N Engl J Med* 1937; 216: 727-46.
- 126.** Schwindinger WF, Francomano CA, Levine MA. Identification of a mutation in the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase in McCune-Albright syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(11): 5152-6.
- 127.** Romanet P, Philibert P, Fina F, Cuny T, Roche C, Ouafik L, *et al.* Using digital droplet polymerase chain reaction to detect the mosaic GNAS mutations in whole blood DNA or circulating cell-free DNA in fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. *J Pediatr* 2019; 205: 281-85 e4.
- 128.** Candelieri GA, Roughley PJ, Glorieux FH. Polymerase chain reaction-based technique for the selective enrichment and analysis of mosaic arg201 mutations in G alpha s from patients with fibrous dysplasia of bone. *Bone* 1997; 21(2): 201-6.
- 129.** Narumi S, Matsuo K, Ishii T, Tanahashi Y, Hasegawa T. Quantitative and sensitive detection of GNAS mutations causing mccune-albright syndrome with next generation sequencing. *PLoS One* 2013; 8(3): e60525.