



HAL
open science

Tumeurs solides et circulation sanguine : influence des composants sanguins dans le processus tumoral et optimisation de l'analyse des ADN tumoraux circulants

Claire Franczak

► To cite this version:

Claire Franczak. Tumeurs solides et circulation sanguine : influence des composants sanguins dans le processus tumoral et optimisation de l'analyse des ADN tumoraux circulants. Sciences pharmaceutiques. 2019. hal-03297946

HAL Id: hal-03297946

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297946>

Submitted on 23 Jul 2021

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2019

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE

du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES

de Biologie médicale

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 20 septembre 2019

par Claire FRAN CZAK

née le 30 août 1991 à Remiremont

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT

de DOCTEUR en PHARMACIE

**Tumeurs solides et circulation sanguine : influence des composants sanguins
dans le processus tumoral et optimisation de l'analyse des ADN tumoraux
circulants**

Membres du Jury

Président :	M. le Professeur JL. MERLIN	PU-PH, Institut de Cancérologie de Lorraine, Faculté de Pharmacie de Nancy
Juges :	M. le Docteur A. HARLÉ	MCU-PH, Institut de Cancérologie de Lorraine, Faculté de Pharmacie de Nancy, Directeur de thèse
	M. le Professeur JY. JOUZEAU	PU-PH, CHRU de Nancy, Faculté de Médecine de Nancy
	M. le Docteur J. PERRIN	MCU-PH, CHRU de Nancy, Faculté de Pharmacie de Nancy

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2018-2019

DOYEN

Raphaël DUVAL

Vice-Doyen

Julien PERRIN

Directrice des études

Marie SOCHA

Conseil de la Pédagogie

Présidente, Brigitte LEININGER-MULLER

Vice-Présidente, Alexandrine LAMBERT

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Présidente, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Présidente, Caroline GAUCHER

Chargés de Mission

Communication

Marie-Paule SAUDER

Innovation pédagogique

Alexandrine LAMBERT

Référente ADE

Virginie PICHON

Référent dotation sur projet (DSP)

Dominique DECOLIN

Responsabilités

Filière Officine

Caroline PERRIN-SARRADO

Filière Industrie

Julien GRAVOULET

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Pharma Plus ENSAIA

Xavier BELLANGER

Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Cellule de Formation Continue et Individuelle

Luc FERRARI

Commission d'agrément des maîtres de stage

François DUPUIS

ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

PROFESSEURS EMERITES

Chantal FINANCE

Jeffrey ATKINSON

Francine PAULUS

Max HENRY

Claude VIGNERON

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Monique ALBERT

Chantal FINANCE

Mariette BEAUD

Marie-Madeleine GALTEAU

François BONNEAUX

Thérèse GIRARD

Gérald CATAU

Michel JACQUE

Jean-Claude CHEVIN

Pierre LABRUDE

Jocelyne COLLOMB

Vincent LOPPINET

Bernard DANGIEN

Alain NICOLAS

Marie-Claude FUZELLIER

Janine SCHWARTZBROD

Françoise HINZELIN

Louis SCHWARTZBROD

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Francine PAULUS
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie, Biologie cellulaire
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Loïc REPEL	82	Biothérapie
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé

Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Reine EL OMAR	86	Physiologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Arnaud PALLOTTA ☒	86	Bioanalyse du médicament
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Julien GRAVOULET	86	Pharmacie clinique
Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN,

PU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service de Biopathologie – Institut de Cancérologie de Lorraine

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse. Pour l'accueil que j'ai reçu pendant mon internat, pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, votre disponibilité et vos encouragements. Veuillez recevoir l'expression de mon respect et de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Alexandre HARLÉ,

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service de Biopathologie – Institut de Cancérologie de Lorraine

Quand je t'ai interpellé un jour dans le hall de la fac pour te demander un stage recherche je n'imaginai pas tout ce que cela allait impliquer ! Merci de m'avoir donné goût à l'écriture et à la recherche. Merci pour le suivi de ce projet même à distance et pour ta relecture attentive. Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Julien PERRIN,

MCU-PH, Faculté de Pharmacie de Nancy, Service d'Hématologie Biologique – CHRU de Nancy

Pour l'aide précieuse que tu as apportée à ce projet et pour ta présence lors de mon internat. Pour ton écoute et tes conseils. Merci d'avoir si souvent transformé ton bureau en bureau des pleurs ou des réclamations. Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Jean-Yves JOUZEAU,

PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Service de Pharmacologie-Toxicologie – CHRU de Nancy

Vous me faites l'honneur de juger cette thèse et d'apporter vos connaissances à la critique de ce travail. Veuillez recevoir l'expression de mon profond respect.

A mes parents,

Pour votre soutien. Je vous dédie ce travail.

A ma maman,

Merci de m'avoir laissée partir si loin si jeune.

A mon papa,

Ma réputation de fille à papa n'étant plus à faire, merci d'avoir éclairé mes choix sans jamais les orienter.

A mes grands-parents,

Que vous soyez présents ou non aujourd'hui, vous serez toujours présents dans mes pensées.

Mention particulière à mes grands-mères :

A mamie Mélanie, pour tes avis tranchés sur la mode actuelle et tes conseils diététiques.

A mamie Odette, pour tes conseils déco et jardinage même si je ne les écoute pas !

A Amélie,

Diplômées la même année ! Champagne ! C'est aussi l'occasion pour moi de te féliciter pour ton parcours.

A Françoise,

Parce que c'est aussi grâce à toi tout ça. Merci de m'avoir permis de passer le concours dans des conditions optimales ! Merci au sauté de veau et aux petits pois-carottes. Parce qu'il n'y a pas meilleur accueil que celui de l'hôtel T.

A Anne,

A ma partenaire d'études à rallonge. A nos promenades entre filles, à nos mercredis d'étudiantes et à ta tarte aux pommes.

A Francis,

« Mais Claire si c'était facile tu ne le ferais pas ».

A Lilou (9 ans à l'époque),

« Maman, Claire elle fait ce que je veux faire ».

A Bernadette et Jean-Michel,

Pour votre intérêt porté à mon parcours et pour votre accueil chaleureux.

A Sylvain et Allan

Mes compères de M2, la QbD aurait été beaucoup moins marrante sans vous !

A mes co-internes

A ceux qui sont encore internes, à ceux qui ne le sont plus. Parce-que l'internat sans co-internes n'aurait pas vraiment de sens.

A Delphine et Charlotte,

A votre accueil pendant mon premier semestre et à nos conversations à rallonge qui ne sont pas prêtes d'être terminées.

Charlotte, merci pour ta bonne humeur et pour tes dilemmes improbables.

Delphine, merci pour ta gentillesse et pour tes conseils pleins de bon sens.

A Charlotte,

*Je pourrais écrire des pages sur notre internat, du coup je vais faire un petit résumé en #
#iman #moinsunpaquetdebonbons #levée de drapeau #teamboulet #auCPNauCPN
#tuluifaisunbisoustoutdesuite #excuseme*

A Manue,

Ravie d'avoir partagé la pièce des myélogrammes avec toi.

A Marion,

Tout ce que j'aurais à dire peut se résumer par « Marion t'es un génie ».

A Pierre,

Parce que c'est la base.

A Shanti,

Pour ton sourire et tes robes colorées.

A Benoit,

Pour ton art (abstrait) du compliment. PS : la bonne réponse est Leroy Merlin.

A Caroline,

A ma co-représentante. Ravie d'avoir pu participer avec toi à ces chers débats à l'ARS.

A toutes les équipes biologiques et techniques avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant mes différents stages

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHRU de Nancy

Mention spéciale aux techniciennes d'hémostase spécialisée qui ont gentiment commandé mes témoins.

Au Docteur Julien BROSEUS, merci d'avoir cru en moi dès le départ.

Aux biologistes d'astreinte de pharmacologie-toxicologie

Pour votre gentillesse et votre disponibilité même en plein milieu de la nuit.

A toute l'équipe de l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'ICL

Cette année d'internat à vos côtés aura toujours une place particulière pour moi.

Merci pour votre aide dans ce projet.

A Andréa . Plus que ravie d'avoir partagé le bureau avec toi (même si t'envoies des snaps étranges !)

A Aurélie, merci pour ton aide dans ce projet.

A Dédé (aussi connue sous le nom de la vraie Dolphine), ma meilleure co-interne d'onco de tout le semestre.

A Jess la pro du Fragment.

A Marie H et à sa recette de tarte aux poireaux.

A Marie P et à ses stories du vendredi soir.

A Marie R qui m'a appris qu'il suffisait de demander (même si c'est toujours de ma faute !).

A Charlotte (encore !), Gaël, Chloé et Jonas,

*A nos soirées, aux barbecues, aux sorties moto et aux débats sans queue ni tête des garçons. Mention spéciale à Jonas et à ses interventions toujours très pertinentes !
#oncomprendpas #onveutpassavoir #ilsfontbiencommeilsveulent #onditpas***

Aux Pharmaciennes sexy

Pour toutes ces belles années à la fac qui n'auraient pas été les mêmes sans vous. Votre soutien pendant le passage de l'internat a été essentiel.

A Amélie,

Pour ton écoute attentive, tes conseils avisés et nos midis au self. Je garde précieusement ton petit tableau.

A Audrey

En espérant qu'on se verra pendant de longues années et qu'on mangera encore des glaces sous le gougusse.

A Flo,

Quoi de plus important en TP qu'un bon binôme de TP !

A Lulu,

On ne saura malheureusement jamais si le serpent parlait fourchelangue.

A Vivi,

A ta bonne humeur et ton optimisme.

A Djem, Esther et Madeline,

Les exilées que j'aimerais voir plus souvent.

A Jules,

Pour m'avoir soutenue (et supportée !) pendant toutes ces années d'études. Pour ta présence rassurante et motivante. Parce que c'est le but. Je t'aime.

Table des matières

Liste des abréviations	3
Tableaux	4
Figures	5
1. INTRODUCTION	7
1.1. Éléments cellulaires présents dans la circulation sanguine dans un contexte tumoral	7
1.1.1. Cellules tumorales circulantes	7
1.1.2. Plaquettes éduquées par la tumeur	9
1.1.3. Neutrophils extracellular traps	11
1.2. Éléments non-cellulaires présents dans la circulation sanguine dans un contexte tumoral .	13
1.2.1. ADN libre circulant	13
1.2.2. Vésicules extracellulaires	24
1.3. Etude des éléments dérivés d'une tumeur par biopsie liquide	32
1.3.1. Les biopsies liquides : concept et intérêt	32
1.3.2. Contraintes préanalytiques et analytiques liées à la biopsie liquide	39
1.3.3. Piste d'optimisation : l'ADN lié aux cellules sanguines	41
1.3.4. Biopsie liquide et mélanome métastatique	42
2. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	43
3. MATERIEL ET METHODES	44
3.1. Echantillons sanguins	44
3.1.1. Sang total provenant de sujets sains	44
3.1.2. Sang total provenant de patients atteints d'un mélanome métastatique	44
3.2. Protocole de traitement des échantillons sanguins	45
3.2.1. Prise en charge des tubes de sang total	45
3.2.2. Prise en charge des culots globulaires	45
3.3. Extraction de l'ADN	47
3.4. Dosage de l'ADN extrait	47
3.5. Traitement statistique des résultats	48
3.6. Comparaison de deux gels pour la qualification des ADN	48
3.7. Recherche d'anomalies caractéristiques de l'ADN tumoral circulant	49

3.7.1.	Recherche de mutations du gène <i>BRAF</i> dans le plasma par une plateforme automatisée de PCR en temps réel.....	49
3.7.2.	Recherche de mutations du gène <i>BRAF</i> sur l'ADN extrait des plasmas et des surnageants témoins et tests par la technique de PCR digitale en émulsion	49
3.8.	Séparation des différents types de cellules sanguines et coloration de l'ADN	52
4.	RESULTATS.....	54
4.1.	Choix du gel pour la migration des fragments.....	54
4.2.	Profils et concentrations obtenus après extraction de l'ADN à partir des plasmas EDTA, citrate et héparine des sujets sains.....	56
4.3.	Profils et concentrations obtenus après extraction de l'ADN à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains	59
4.3.1.	Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur EDTA	59
4.3.2.	Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur citrate	60
4.3.3.	Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur héparine.....	60
4.3.4.	Comparaison des concentrations obtenues dans les culots témoins et tests en fonction de l'anticoagulant.....	61
4.4.	Essais de coloration pour la mise en évidence de l'ADN à la surface des cellules	63
4.5.	Profils et concentrations obtenus à partir des prélèvements des patients atteints d'un mélanome métastatique	65
4.5.1.	Comparaison des profils et des concentrations obtenus dans les plasmas et dans les surnageants des culots globulaires témoins et tests Streck des patients à J0	66
4.5.2.	Comparaison des profils et concentrations obtenus avec ou sans traitement par la solution de trypsine-EDTA dans les surnageants des culots globulaires EDTA et Streck.....	68
4.6.	Recherche de mutations sur les prélèvements des patients atteints d'un mélanome métastatique.....	71
5.	DISCUSSION ET CONCLUSION.....	73
	REFERENCES	77

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNlc	ADN libre circulant
ADNtc	ADN tumoral circulant
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ARN	Acide ribonucléique
ARNlc	ARN libre circulant
ARNm	ARN messenger
BEAMing	Beads-Emulsion-Amplification-Magnetics
biPAP	Bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization
CTCs	Cellules tumorales circulantes
csbDNA	Cell-surface-bound DNA – ADN lié aux cellules
ddPCR	Droplet digital PCR – PCR digitale en émulsion
FDA	Food and Drug Administration
EMT	Transition épithélio-mésenchymateuse
EpCAM	Epithelial cell adhesion molecule
IK	Inhibiteur de kinase
miARN	Micro ARN
MRD	Minimal residual disease – Maladie résiduelle
NETs	Neutrophils Extracellular Traps
NGS	Next-generation sequencing – séquençage haut débit
NK	Natural killer
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
PNN	Polynucléaires neutrophiles
TEPs	Tumour educated platelets = plaquettes éduquées par la tumeur
WT	Wild-type – sauvage

Table des tableaux

Tableau I : Résultats des principaux travaux ayant étudié la notion d'ADN lié aux cellules sanguines chez des patients atteints de différents cancers	22
Tableau II : Concentrations (en ng/μL) en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction à partir du plasma et des surnageants des culots globulaires témoins et tests des prélèvements sur tube EDTA, citrate et héparine de 5 sujets sains.....	63
Tableau III : Détail des prélèvements OPTIMEL utilisés pour ce projet.....	65
Tableau IV : Concentrations (en ng/μL) en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des surnageants des culots témoins et tests des tubes EDTA et Streck des patients OPTIMEL	70
Tableau V : Résultats de la recherche de mutations sur le gène <i>BRAF</i> par la technique Idylla® à partir des plasmas des patients OPTIMEL et par la technique de ddPCR à partir de l'ADN extrait des plasmas et des culots globulaires témoins et tests des patients OPTIMEL72	

Table des figures

Figure 1 : Caractéristiques cellulaires et moléculaires des CTCs	8
Figure 2 : Implication des plaquettes dans la croissance tumorale et le processus métastatique.....	10
Figure 3 : Modes de formation des Neutrophils Extracellular Traps.....	11
Figure 4 : Mécanismes des pathologies médiées par les Neutrophils Extracellular Traps	12
Figure 5 : Première identification des acides nucléiques extracellulaires	13
Figure 6 : Concentrations plasmatiques en ADN libre circulant chez des patients atteints d'un cancer non métastatique, d'un cancer métastatique et chez des sujets sains	14
Figure 7 : ADN tumoral circulant et cancer de stade avancé	16
Figure 8 : Origine de l'ADN libre circulant dans le sang des patients atteints d'un cancer	17
Figure 9 : Lien entre la taille des ADN libres circulants, leur tissu d'origine et les mécanismes de libération.....	17
Figure 10 : Eléments libérés par les cellules tumorales et anomalies génétiques détectables dans la circulation sanguine	18
Figure 11 : Concentrations en ADN libre circulant et en ADN lié aux cellules dans le sang de sujets sains et de patients atteints d'un cancer gastrique, du sein ou du poumon	23
Figure 12 : Représentation globale d'une vésicule extracellulaire.....	25
Figure 13 : Types de vésicules extracellulaires libérés par une cellule	26
Figure 14 : Formation des vésicules extracellulaires	26
Figure 15 : Rôle des exosomes comme messagers inter-cellulaires.....	27
Figure 16 : Rôle des exosomes issus des cellules tumorales dans la progression des cancers gastriques	29
Figure 17 : Fonctions régulées par les ARN non codants exosomaux.....	31
Figure 18 : Techniques d'enrichissement, de détection et de caractérisation des CTCs et des ADN tumoraux circulants.....	34
Figure 19 : Applications de l'analyse de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge d'une pathologie tumorale	35
Figure 20 : Intérêt de la biopsie liquide pour détecter l'hétérogénéité tumorale	37
Figure 21 : Principales méthodes de détection des anomalies génétiques de l'ADN tumoral circulant.....	41
Figure 22 : Protocole de prise en charge d'un tube de sang total pour l'étude de l'ADN circulant.....	45
Figure 23 : Protocole de traitement des culots globulaires.....	46
Figure 24 : Principe de la PCR digitale en émulsion	51
Figure 25 : Protocole de séparation des lignées cellulaires et coloration de l'ADN	53

Figure 26 : Profils obtenus avec le gel DNF-477 HS Small Fragment et avec le gel DNF-464 HS Large Fragment après extraction avec ou sans carrier RNA.....	55
Figure 27 : Profils obtenus avec le gel DNF-464 après extraction de l'ADN du plasma des 5 sujets sains	57
Figure 28 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues chez 5 sujets sains après extraction à partir du plasma prélevé sur un tube EDTA, citrate ou héparine.....	58
Figure 29 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube EDTA	59
Figure 30 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube citrate	60
Figure 31 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube héparine	61
Figure 32 : Comparaison des concentrations en ADN circulant obtenues sans (a) ou avec (b) traitement par la solution de trypsine-EDTA et comparaison des concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues sans (c) ou avec (d) traitement par la solution de trypsine-EDTA en fonction de l'anticoagulant utilisé chez 5 sujets sains	62
Figure 33 : Observation microscopique (x40) des leucocytes isolés sur un gradient de Ficoll® (a) et observation microscopique d'un frottis de globules rouges (b) après coloration au Hoechst.....	64
Figure 34 : Profils des prélèvements à J0 de 6 patients OPTIMEL	67
Figure 35 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues dans les plasmas et les surnageants des culots globulaires témoins et tests de 6 patients OPTIMEL prélevés sur tube Streck à J0	68
Figure 36 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests de 26 prélèvements sur tube EDTA	69
Figure 37 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests de 27 prélèvements sur tube Streck.....	69
Figure 38 : Représentation graphique des résultats de ddPCR pour un échantillon muté et pour un échantillon non muté	71

1. INTRODUCTION

1.1. Eléments cellulaires présents dans la circulation sanguine dans un contexte tumoral

1.1.1. Cellules tumorales circulantes

Les cellules tumorales circulantes (CTCs) ont été observées pour la première fois par Ashworth en 1869 dans une biopsie d'un patient atteint d'un cancer métastatique (Ashworth, 1869). Les CTCs correspondent à des cellules cancéreuses qui se détachent de la tumeur primaire ou d'une métastase et qui peuvent être présentes dans la circulation sanguine des patients atteints d'un cancer métastatique à une concentration comprise entre 1 et 10 CTCs/10 mL de sang (Alix-Panabières et Pantel, 2014). Les CTCs peuvent être des cellules apoptotiques ou des cellules viables mais seules ces dernières ont de nombreuses propriétés qui vont participer à la progression tumorale (**figure 1**). La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) correspond à un mécanisme moléculaire et cellulaire par lequel les cellules épithéliales perdent leurs caractéristiques de cellules différenciées pour acquérir des caractéristiques mésenchymateuses de mobilité et d'invasion. Dans un contexte tumoral, ce phénomène contribue à la progression et à l'hétérogénéité intra-tumorale (Polyak et Weinberg, 2009). Ce phénomène conduit, entre autres, à la résistance à l'anoïkis et à l'apoptose. L'anoïkis est une mort programmée induite par le détachement d'une cellule de sa matrice cellulaire. Ce phénomène permet d'éviter la progression cellulaire sans support et l'attachement à une matrice inappropriée. La résistance des CTCs à ce phénomène d'anoïkis participe à la dissémination et au processus métastatique. De plus, les CTCs ont des capacités d'invasion et d'intravasation qui vont leur permettre de pénétrer dans la circulation sanguine puis de disséminer dans des organes à distance (Alix-Panabières et Pantel, 2014).

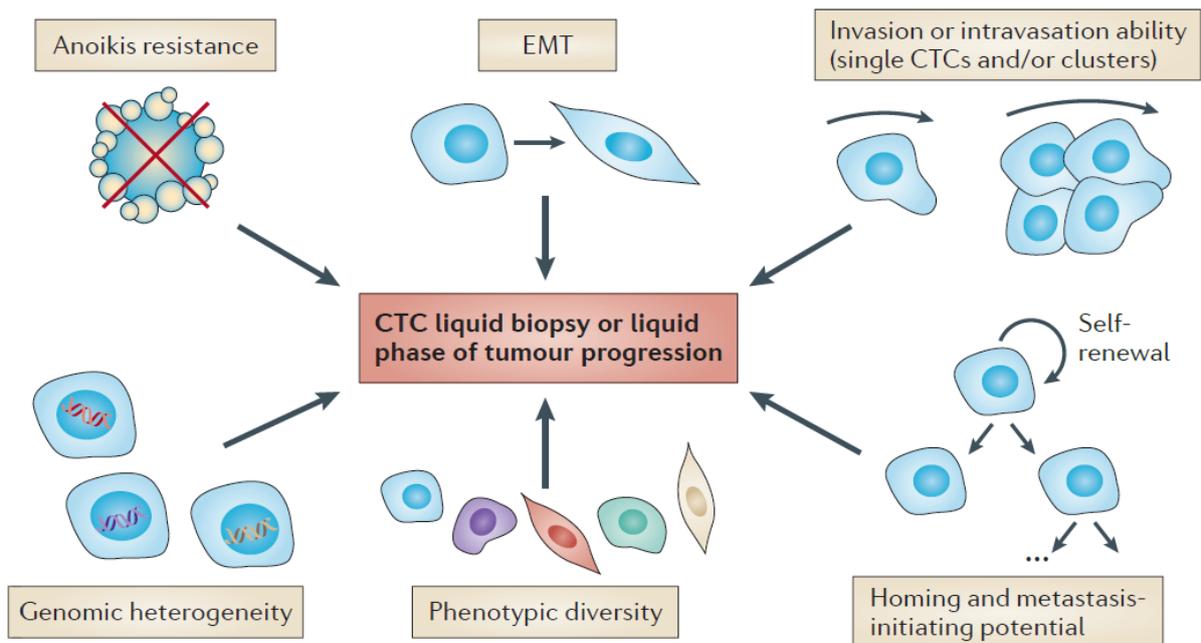


Figure 1 : Caractéristiques cellulaires et moléculaires des CTCs

Les CTCs sont résistantes à l'anoïkis. Cette propriété est liée au phénomène de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Les CTCs présentent aussi une hétérogénéité phénotypique liée à l'expression de protéines relatives à l'apoptose, à la prolifération, à l'invasion ou au chimiotactisme. Une certaine hétérogénéité génomique des CTCs a aussi été rapportée. De plus, les CTCs ont des capacités d'invasion ou d'intravasation individuelles ou en cluster. Toutes ces caractéristiques participent à la dissémination et au processus métastatique.

(D'après Alix-Panabières et Pantel, 2014)

La progression tumorale se fait ensuite par division des cellules tumorales. Cependant, une autre hypothèse suggérant la transformation des cellules normales par les cellules tumorales est aussi à envisager. Parmi les mécanismes de transformation des cellules saines en cellules tumorales, le mécanisme le plus fréquemment suggéré est la fusion spontanée entre la cellule hôte et une cellule cancéreuse. Trois mécanismes semblent impliqués dans cette fusion cellulaire : fusion suite à la phagocytose des cellules cancéreuses ou des corps apoptotiques par les macrophages associés à la tumeur ou d'autres phagocytes. Les macrophages pourraient aussi fusionner avec les cellules cancéreuses par leur capacité intrinsèque de fusion. Enfin, les cellules cancéreuses pourraient être prédisposées à la fusion par expression aberrante de récepteurs ou de ligands de fusion (García-Olmo DC *et al.*, 2012).

1.1.2. Plaquettes éduquées par la tumeur

La libération des cellules tumorales dans la circulation sanguine mène à la formation de plaquettes éduquées par la tumeur (tumor-educated platelets (TEPs)).

Les mécanismes conduisant à la formation de ces TEPs peuvent être directs, *via* des récepteurs plaquettaires (sélectine P) ou indirects *via* des molécules de signalisation (Sol et Wurdinger, 2017). Les plaquettes peuvent alors libérer des molécules pro-angiogéniques et pro-tumorigéniques qui vont participer au processus tumoral (**figure 2**). Lors de leur passage dans la circulation sanguine, la majorité des cellules tumorales est rapidement éliminée. Néanmoins, plusieurs mécanismes de survie, impliquant notamment les plaquettes, permettent de protéger les CTCs. Les plaquettes protègent les CTCs de la mort induite par le TNF- α et ont la capacité de transférer le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I à la surface des CTCs, les rendant ainsi invisibles au regard des lymphocytes natural killer (NK) (Haemmerle *et al.*, 2018).

Les plaquettes participent aussi à l'adhésion et à l'extravasation des cellules tumorales, facilitant ainsi le processus métastatique (Sol et Wurdinger, 2017 ; Haemmerle *et al.*, 2018). L'angiogenèse tumorale résulte d'interactions entre les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement tumoral auxquelles les plaquettes vont participer. En effet, les plaquettes libèrent des facteurs contenus dans les granules alpha et denses (protéines, lipides, facteurs de croissance, cytokines, protéases) qui vont participer à l'angiogenèse et à la formation de niches métastatiques (Haemmerle *et al.*, 2018). L'importance des TEPs dans le processus tumoral est consolidée par des études sur des modèles murins et chez des patients atteints d'un cancer et qui ont évalué l'influence du taux de plaquettes sur la réponse à la chimiothérapie montrant que le taux de mauvaise réponse à la chimiothérapie était plus élevé quand les plaquettes étaient présentes à un taux élevé (Haemmerle *et al.*, 2018).

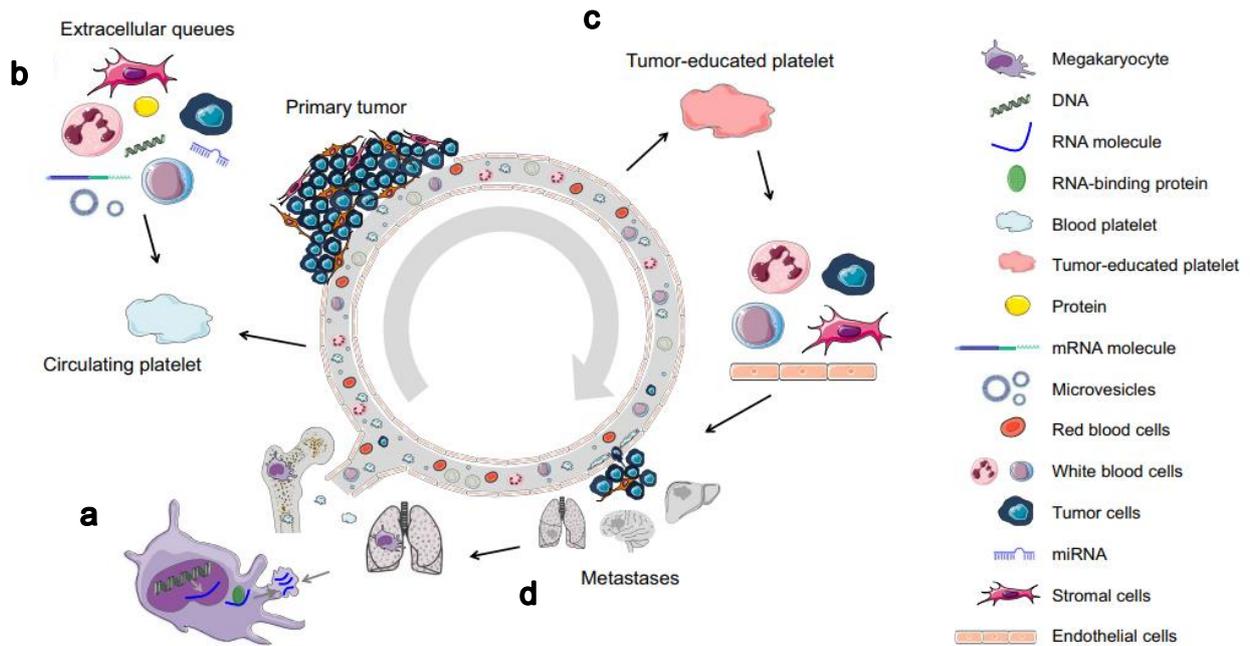


Figure 2 : Implication des plaquettes dans la croissance tumorale et le processus métastatique

a : A leur sortie de la moelle osseuse, les plaquettes contiennent plusieurs types d'ARN et de protéines.

b : Pendant toute leur durée de vie, les plaquettes interagissent avec les cellules immunitaires, les cellules tumorales et les cellules stromales. Ces interactions, directes ou indirectes modifient le contenu des plaquettes et leurs fonctions.

c : Ce processus conduit à la production des plaquettes éduquées par la tumeur qui peuvent alors influencer le processus métastatique en stimulant ou bloquant les cellules immunitaires, les cellules endothéliales, les cellules stromales et les cellules cancéreuses par contact direct ou par libération d'éléments extracellulaires.

d : Les métastases peuvent alors influencer les ARN et les protéines qui seront libérés dans les plaquettes par les mégacaryocytes.

(D'après Sol *et al.*, 2017)

1.1.3. Neutrophils extracellular traps

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) représentent 50 à 75% des leucocytes circulants. En réponse à une attaque par un micro-organisme ou à une inflammation aseptique, les PNN peuvent déclencher un processus appelé NETose. Il en résulte la libération, dans l'espace extracellulaire d'une structure « en filet » composée d'ADN décondensé issu du noyau, de protéines histones, de protéines granulaires et de protéines cytoplasmiques. Ces structures, capables de piéger les micro-organismes sont appelées Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Ce mécanisme peut se faire selon deux modalités : la première va conduire à la mort du PNN tandis que la seconde libérera des NETs tout en permettant la survie du PNN (**figure 3**) (Papayannopoulos, 2018 ; Duvvuri et Lood, 2019).

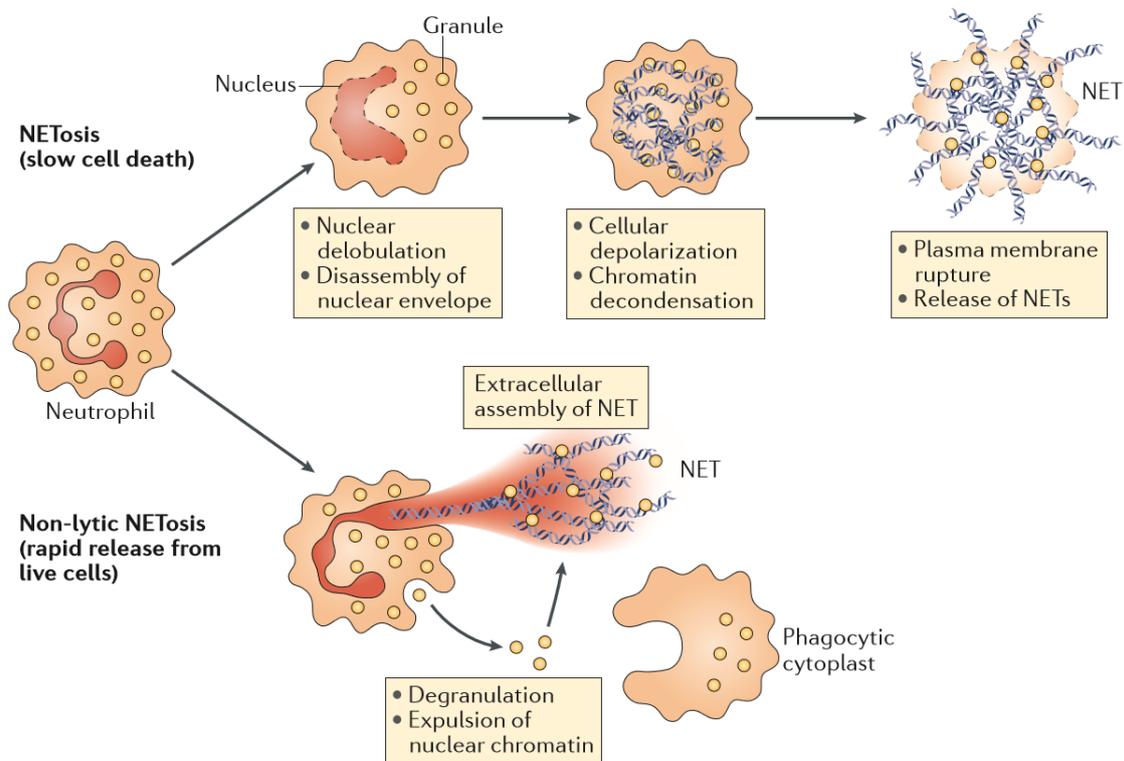


Figure 3 : Modes de formation des Neutrophils Extracellular Traps

Les NETs peuvent être produits *via* deux mécanismes différents. Le premier mécanisme, dit mort-cellulaire dépendant, débute par la délobulisation du noyau et par le désassemblage de l'enveloppe nucléaire. La cellule se dépolarise, la chromatine se décondense puis il y a rupture de la membrane plasmique. Cela induit la mort de la cellule et la libération des NETs. Le deuxième mécanisme est une forme non-lytique de NETose. Les filaments de chromatine ainsi que des granules protéiques sont libérés à l'extérieur du PNN. Le cytoplasme anucléé continue alors à phagocyter les microorganismes.

(D'après Papayannopoulos, 2018)

Au-delà de leur capacité à piéger les micro-organismes, des travaux ont été menés sur les NETs afin de décrire de nombreux états pathologiques dans lesquels ils seraient impliqués, notamment le processus tumoral (**figure 4**). Cools-Lartigue *et al.* ont mis en évidence, dans un modèle murin de sepsis sévère post-opératoire, la capacités des NETs à piéger les CTCs et à promouvoir leur adhésion sur des organes distants de la tumeur primitive contribuant ainsi à la formation de métastases (Cools-Lartigue *et al.*, 2013).

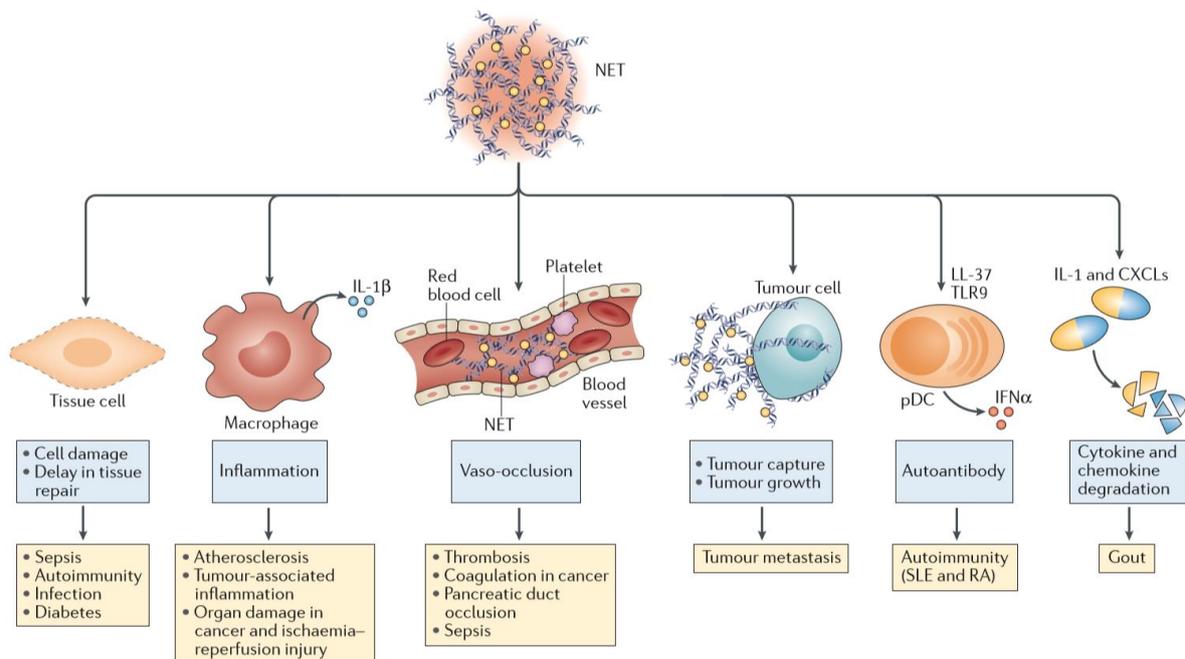


Figure 4 : Mécanismes des pathologies médiées par les Neutrophils Extracellular Traps

En fonction des conditions et *via* plusieurs mécanismes, les NETs sont impliqués dans plusieurs états pathologiques. Les NETs peuvent altérer directement les tissus, entraînant des situations d'infection, de sepsis, d'auto-immunité ou de diabète. L'inflammation, par l'intermédiaire des macrophages, entraîne des situations d'athérosclérose. La formation des NETs dans la circulation favorise la coagulation, la vaso-occlusion et la thrombose. Les NETs peuvent aussi capturer les CTCs et promouvoir la formation de métastases. Contrairement, une accumulation de NETs permet la dégradation des cytokines et des chemokines conduisant à la résolution de l'inflammation.

(D'après Papayannopoulos, 2018)

1.2. Eléments non-cellulaires présents dans la circulation sanguine dans un contexte tumoral

1.2.1. ADN libre circulant

1.2.1.1. Historique

La présence d'acides nucléiques libres circulants dans le plasma humain a été décrite pour la première fois en 1948 par Mandel et Métais. Le terme acide nucléique libre circulant regroupe les ADN libres circulants (ADNlc) et les ARN libres circulants (ARNlc) (**figure 5**) (Mandel et Métais, 1948).

Sujet	Sexe	Age	Affection	P phospho- protéine mg.	P ribonu- cléique mg.	P desoxyri- bonu- cléique mg.	P total acides nucléiques mg.
1	F	42	Normal	0	5,0	1,2	6,2
2	F	22	»	0	4,0	0,4	4,4
3	H	24	»	0	5,2	1,3	6,5
4	F	27	»	0	4,7	0,3	5,0
5	F	20	»	0	3,7	0,8	4,5
6	H	48	»	0	4,6	1,3	5,9
7	H	45	»	0	4,5	0,6	5,1
8	F	26	»	0	5,0	0,2	5,2
9	F	37	»	0	4,8	0,6	5,4
10	H	39	»	0	5,0	0,9	5,9
11	H	62	Insuffis. card.	0	3,8	0,7	4,5
12	H	62	»	0	3,8	0,45	4,25
13	H	42	»	0	5,1	0,9	6,0
14	F	33	Endocard. maligne	0	3,35	0,65	4,0
15	H	19	»	0	3,5	0,8	4,3
16	F	5	Goitre Basedow	0	5,6	0,4	6,0
17	H	48	Diabète	0	3,6	0,3	3,9
18	H	61	»	0	3,6	0,4	4,0
19	H	48	Cirrhose	0	3,5	0,4	3,9
20	F	52	Ictère	0	5,3	1,2	6,5
21	F	48	Goutte	0	3,6	0,4	4,0
22	H	48	»	0	3,5	1,0	4,5
23	H	33	Goutte	0	2,66	0,8	3,46
24	H	33	»	0	5,5	0,5	6,0
25	H	33	»	0	4,75	0,75	5,5
26	H	26	Néphrite	0	3,75	0,7	4,45
27	H	37	Tuberculose	0	3,5	0,45	3,95
28	F	23	Grossesse 7 ^e m.	0	7,65	1,35	9,0
29	H	»	»	0	7,25	1,00	8,25

BIOLOGIE. COMPTES RENDUS. — N° 3-4, 1948. T. CXLII.

Figure 5 : Première identification des acides nucléiques extracellulaires

(D'après Mandel et Métais, 1948)

Ces acides nucléiques libres ont d'abord été considérés comme de simples produits de dégradation libérés par les cellules au cours du processus d'apoptose ou de nécrose, ne suscitant donc que peu d'intérêt. C'est d'abord dans le domaine des maladies auto-immunes que l'ADNlc a été étudié. Tan *et al.* ont montré que la présence d'ADNlc dans le système circulatoire de patients atteints de lupus érythémateux disséminé entraînait l'apparition d'anticorps anti-ADN double-brin (Tan *et al.*, 1966). Dans le domaine du cancer, il aura fallu attendre les travaux de Leon *et al.* qui rapportent dans les années 70 une augmentation de la concentration en ADNlc dans la circulation des patients atteints de cancer (Leon *et al.*, 1977). Alors que la majorité des sujets sains présente des concentrations faibles en ADNlc,

le nombre de patients avec des concentrations élevées en ADNlc augmente en cas de cancer non métastatique et en proportion plus élevée en cas de cancer métastatique (**figure 6**). Les concentrations en ADNlc peuvent atteindre 1 000 à 1 500 ng/mL chez les patients atteints d'un cancer alors que les concentrations rapportées chez les sujets sains sont plutôt comprises entre 0 et 100 ng/mL (Thierry *et al.*, 2016 ; Domínguez-Vigil *et al.*, 2017). Avec cette découverte, l'ADNlc semblerait donc être un marqueur potentiel de pathologie tumorale. Néanmoins, la concentration en ADNlc peut augmenter dans des contextes non tumoraux très variés autres que les maladies auto-immunes tels que la grossesse (utilisation pour le diagnostic prénatal non invasif), un traumatisme, une pathologie cardiaque (Leon *et al.*, 1977 ; Thierry *et al.*, 2016). La seule mesure de la concentration en ADNlc ne peut donc pas être utilisée comme marqueur spécifique de cancer.

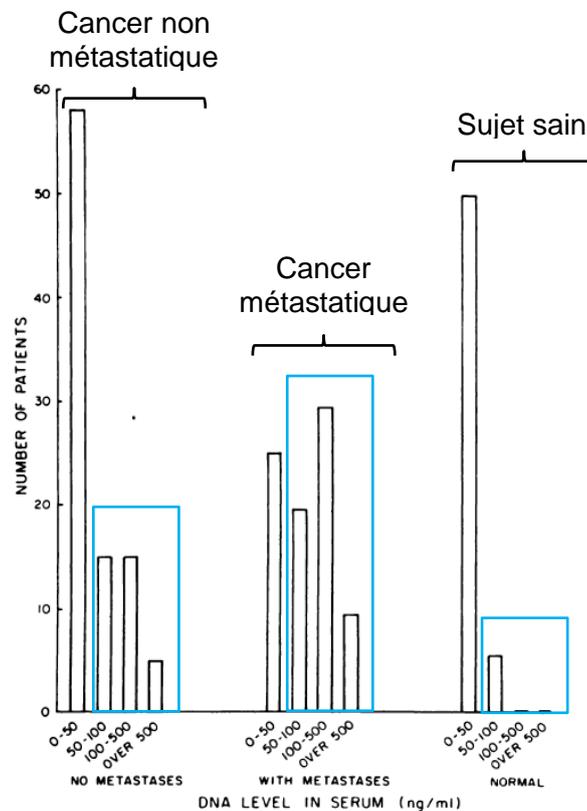


Figure 6 : Concentrations plasmatiques en ADN libre circulant chez des patients atteints d'un cancer non métastatique, d'un cancer métastatique et chez des sujets sains

La majorité des sujets sains (à droite) présente des concentrations faibles en ADN libre circulant. Le nombre de patients avec des concentrations élevées en ADN libre circulant augmente en cas de cancer non métastatique (à gauche) et dans une proportion plus grande en cas de cancer métastatique (au centre). (D'après Léon *et al.*, 1977)

1.2.1.2. Caractéristiques de l'ADN libre circulant présent chez les patients atteints d'un cancer solide

Chez les patients atteints d'un cancer solide, la concentration en ADNlc est donc plus élevée que chez les sujets sains. L'étude de cet ADN chez les patients atteints d'un cancer a permis de mettre en évidence des caractéristiques particulières qui diffèrent de celles de l'ADNlc des sujets sains. Stroun *et al.* ont qualifié cet ADN comme étant double brin avec des fragments de taille hétérogène (Stroun *et al.*, 1987 ; Stroun *et al.*, 1989). Après exposition à certaines substances cancérigènes ou à certains anticancéreux, la séparation des brins d'ADN (mesurée par l'augmentation de l'absorbance dans l'UV) se fait à une température plus faible que celle de l'ADN issu de sujets sains et suggère une diminution de la stabilité des brins d'ADN quand ils sont d'origine cancéreuse. En utilisant ces propriétés, Stroun *et al.* ont montré qu'une partie de l'ADNlc est d'origine cancéreuse (Stroun *et al.*, 1989). Dans les années 1990, la recherche par PCR de mutations dans le plasma de patients atteints de cancer a permis la mise en évidence de mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs ou sur des oncogènes. Des mutations du gène *KRAS* ont été mises en évidence chez des patients atteints d'un cancer du pancréas ou d'un cancer colorectal et des mutations du gène *NRAS* ont été détectées chez des patients atteints d'un syndrome myélodysplasique ou d'une leucémie myéloïde (Hibi *et al.*, 1998 ; Sorenson *et al.*, 1994 ; Vasioukhin *et al.*, 1994). D'autres aberrations telles que l'instabilité des ADN microsatellites ou des méthylations de l'ADN ont été mises en évidence sur l'ADNlc (Shaw JA *et al.*, 2000 ; Wang JY *et al.*, 2004 ; Fujiwara *et al.*, 2005). Cet ADNlc d'origine tumorale est appelé ADN tumoral circulant (ADNtc). En 2014, une étude menée par Bettegowda *et al.* chez des patients atteints de différents types de cancers de stade avancé a permis de mettre en évidence que le pourcentage de patients avec de l'ADNtc détectable varie en fonction du type de tumeur (**figure 7a**) et que la concentration en ADNtc varie non seulement en fonction du type de tumeur mais aussi entre les patients atteints d'un même type de tumeur (**figure 7b**) (Bettegowda *et al.*, 2014). Si la concentration en ADNlc n'est pas suffisante pour évaluer la présence d'un cancer, les caractéristiques particulières et tumeurs-spécifiques des ADNtc pourraient donc en faire un biomarqueur intéressant pour l'étude des cancers.

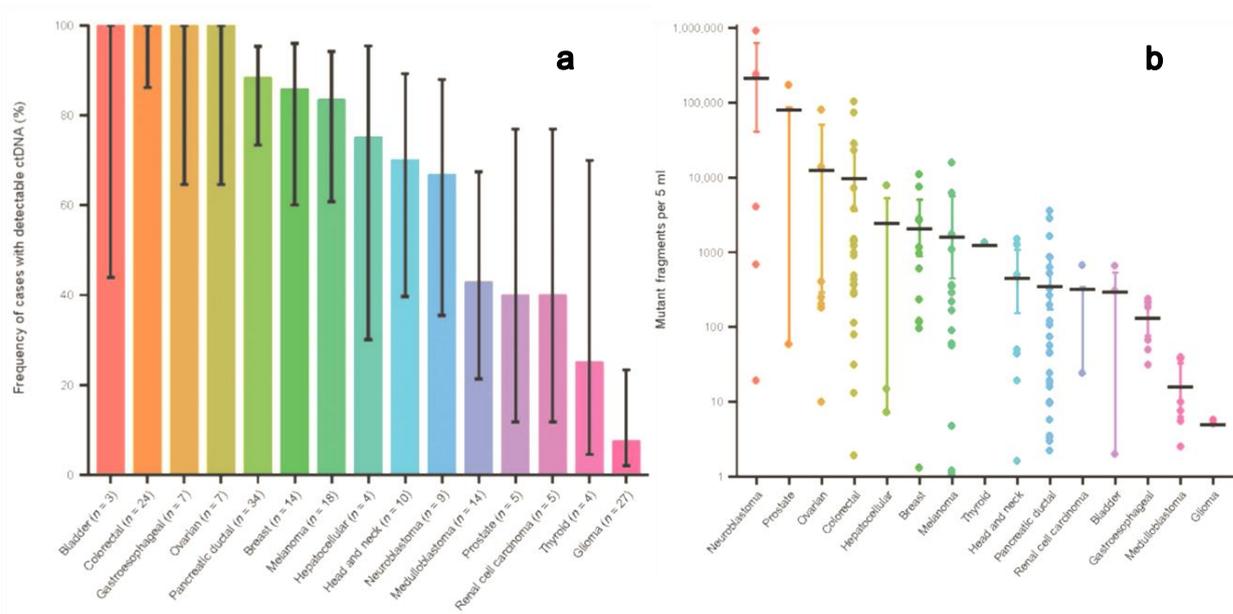


Figure 7 : ADN tumoral circulant et cancer de stade avancé

a : Le pourcentage de patients avec de l'ADNtc détectable varie en fonction du type de cancer.

b : Les concentrations en ADNtc varient en fonction du type de cancer mais aussi au sein d'une population atteinte d'un même type de cancer.

(D'après Bettegowda *et al.*, 2014)

1.2.1.3. Origine de l'ADNtc et mécanismes de libération

Chez un patient atteint d'un cancer, l'ADNtc provient à la fois des cellules non tumorales du patient, des cellules de l'environnement tumoral mais aussi des cellules tumorales elles-mêmes (**figure 8**). Les mécanismes de libération des ADNtc sont différents en fonction du tissu d'origine et conduisent à la libération de fragments de tailles différentes (**figure 9**). La totalité de l'ADNtc n'est donc pas d'origine tumorale et l'ADNtc peut représenter, en fonction du type de tumeur et du stade de la maladie, entre 0,003 et 95% de l'ADNtc total (Thierry *et al.*, 2016). La demi-vie de l'ADNtc dans le sang varie entre 15 minutes et plusieurs heures. Il est ensuite éliminé par le foie et les reins (Domínguez-Vigil *et al.*, 2017).

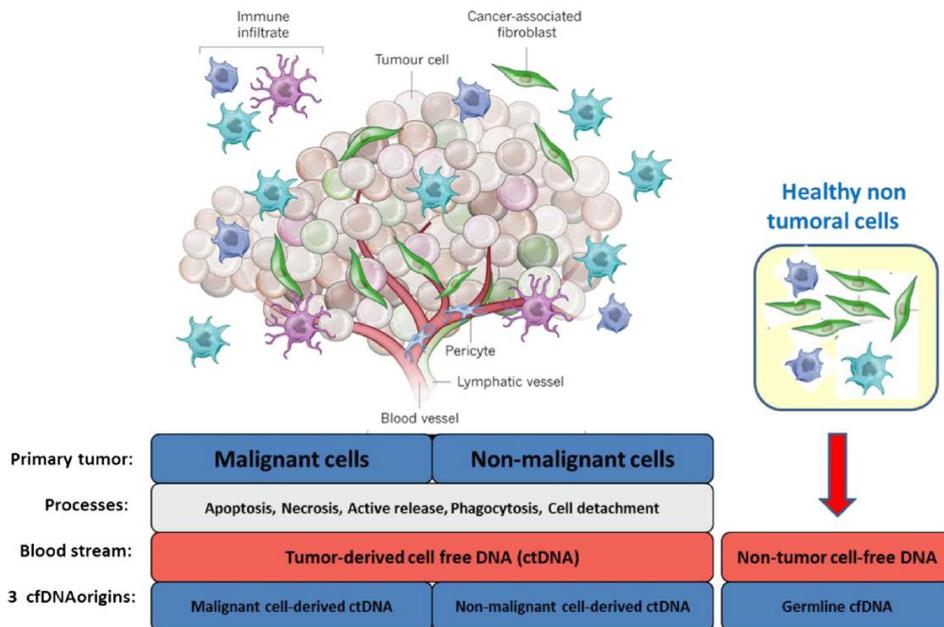


Figure 8 : Origine de l'ADN libre circulant dans le sang des patients atteints d'un cancer

L'ADN libre circulant provient à la fois des cellules non tumorales du patient, des cellules de l'environnement tumoral mais aussi des cellules tumorales elles-mêmes. Ce sont les cellules tumorales qui libèrent (par apoptose, nécrose ou sécrétion active) l'ADN tumoral circulant qui porte les caractéristiques de la tumeur.

(D'après Thierry *et al.*, 2016)

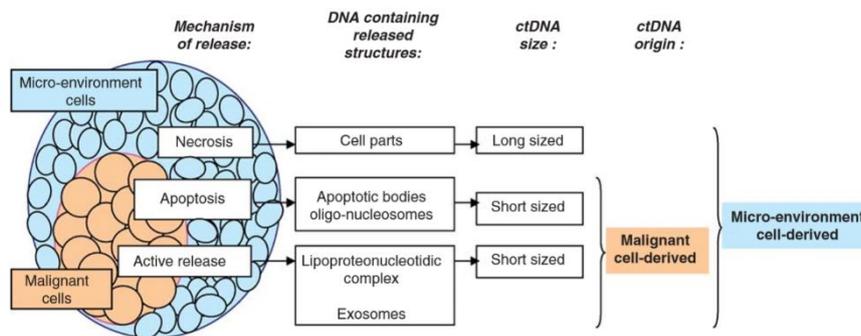


Figure 9 : Lien entre la taille des ADN libres circulants, leur tissu d'origine et les mécanismes de libération

Les fragments de moins de 200 paires de bases sont considérés comme des fragments de petite taille (short sized) et sont libérés par les cellules tumorales ainsi que par les cellules du microenvironnement tumoral. Les fragments de plus de 1 000 paires de bases, considérés comme ceux de grande taille (long sized) sont quant à eux libérés par les cellules du microenvironnement tumoral. (D'après Moulière et Thierry, 2012)

Plusieurs mécanismes permettent la libération d'ADN par les cellules conduisant à la présence de différentes entités détectables dans la circulation (**figure 10**).

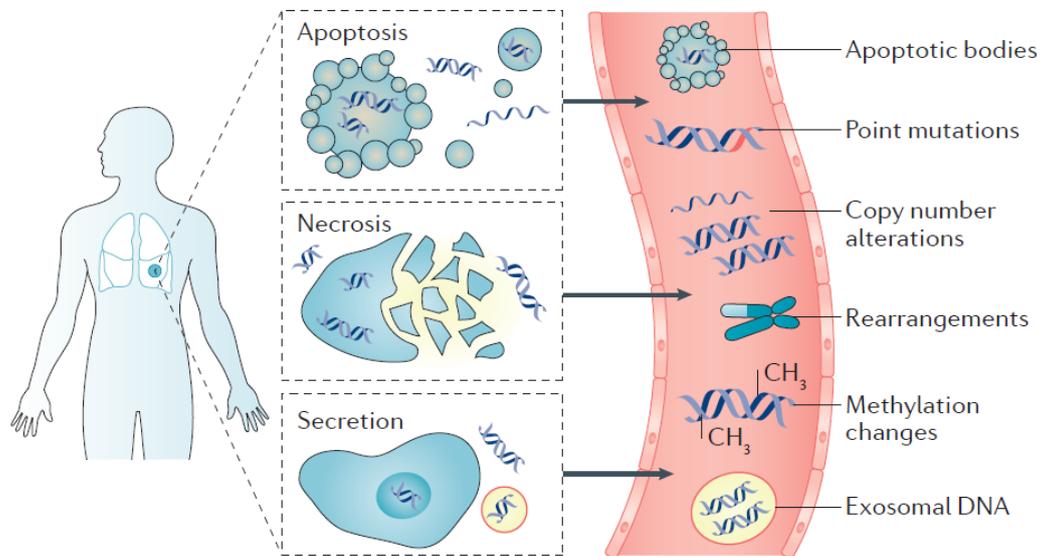


Figure 10 : Éléments libérés par les cellules tumorales et anomalies génétiques détectables dans la circulation sanguine

Suite aux phénomènes d'apoptose, de nécrose ou de sécrétion active, des éléments tels que des corps apoptotiques ou des anomalies telles que des mutations ponctuelles de l'ADN, des variations du nombre de copies, des réarrangements chromosomiques, des profils de méthylation particuliers ou encore des exosomes contenant de l'ADN sont détectables dans la circulation sanguine.

(D'après Wan *et al.*, 2017)

Apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée est un phénomène qui, en éliminant les cellules endommagées, participe à l'homéostasie cellulaire. L'apoptose est médiée par un ensemble d'enzymes, les caspases, qui sont activées *via* les récepteurs de mort (voie extrinsèque) ou par des stimuli intracellulaires comme le stress oxydatif ou les dommages causés à l'ADN (voie intrinsèque). S'ensuit une cascade protéolytique qui conduit à des changements morphologiques et biochimiques dans les cellules apoptotiques (contraction de la cellule et du noyau, fragmentation de l'ADN et redistribution des lipides). La fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes est un phénomène caractéristique de l'apoptose. Cela entraîne la libération d'ADN double brin de bas poids moléculaire, hautement fragmenté avec une taille de fragments située entre 150 et 200 paires de bases. Cette taille correspond à celle de l'ADN présent autour d'un nucléosome. La fragmentation peut aussi s'effectuer entre deux ou trois nucléosomes ce qui libérera des fragments de taille correspondant à un

multiple d'un tour de nucléosome (aspect caractéristique en barreaux d'échelle sur un gel d'électrophorèse) (Duvvuri et Lood, 2019). Une partie de l'ADNlc présente ces mêmes caractéristiques ce qui permet de conclure qu'une partie de l'ADNlc est de l'ADN issu de l'apoptose.

Il a aussi été montré que l'espacement entre les nucléosomes n'est pas homogène dans toutes les cellules et peut informer sur le tissu d'origine de l'ADNlc (Snyder *et al.*, 2016). De la même manière, la taille des fragments d'ADNlc varie en fonction de la présence ou de l'absence d'une tumeur et du type de tumeur (Moulière *et al.*, 2018).

Nécrose

La nécrose est une forme de mort cellulaire qui se déclenche en réponse à une attaque physique ou chimique. Il en résulte un gonflement de la cellule et une perte de l'intégrité de la membrane plasmique conduisant à la libération du contenu cellulaire. Lors de la nécrose, la digestion de la chromatine est non spécifique ce qui conduit à la libération de fragments de haut poids moléculaire (plusieurs centaines de paires de bases).

Parmi l'ADNlc, certains fragments ont un haut poids moléculaire ce qui permet d'ajouter le phénomène de nécrose aux mécanismes de libération de l'ADNlc (Duvvuri et Lood, 2019).

NETose

L'ADN libéré lors de la NETose étant double brin, il vient augmenter les concentrations en ADNlc total lors d'une NETose excessive ou d'un défaut de clairance.

Sécrétion active

Les cellules peuvent sécréter activement des vésicules extracellulaires qui contiennent de l'ADN. Les caractéristiques de cet ADN issu de la dégradation des différents types de vésicules extracellulaires seront développées dans la partie dédiée aux vésicules extracellulaires.

Libération par les CTCs

Les CTCs étant présentes dans la circulation sanguine, on pourrait logiquement penser que l'ADNlc serait issu des CTCs. Néanmoins, si on considère qu'une cellule diploïde humaine contient 6 pg d'ADN, il faudrait, pour atteindre les concentrations en ADNlc rapportées dans le plasma, 2 000 cellules / mL de plasma. Or, comme vu précédemment, les CTCs ne dépassent pas 1 à 10 cellules pour 10 mL. L'ADNlc est donc présent en quantité 100 et 1000 fois plus élevée que la quantité présente dans les CTCs (Thierry *et al.*, 2016).

1.2.1.4. Rôle de l'ADN libre circulant comme messenger inter-cellulaire

Suite à la mise en évidence de l'ADNlc, de nombreux travaux ont cherché à comprendre le rôle de cet ADNlc dans différents états pathologiques. Plusieurs études publiées entre 1975 et 1977 par Anker *et al.* ont mis en évidence la libération active et spontanée d'ADN nouvellement synthétisé par les lymphocytes, stimulés ou non (Anker *et al.*, 1975 ; Anker *et al.*, 1976 ; Anker *et al.*, 1977). De plus, en mettant en contact des lymphocytes B naïfs d'exposition au virus de l'herpès avec de l'ADN de lymphocytes T précédemment exposés, Anker *et al.* ont mis en évidence la capacité des lymphocytes B à produire des anticorps contre le virus de l'herpès (Anker *et al.*, 1980). Les conclusions de cette étude *in vitro* ont ensuite été observées *in vivo* sur un modèle murin avec la production d'anticorps contre le virus de l'herpès chez les souris dans lesquelles de l'ADN de lymphocytes T précédemment exposés avait été injecté (Anker *et al.*, 1984). Il a été montré plus tard que cet ADN est libéré dans une structure appelée virtosome et qui correspond à un complexe lipoprotéique contenant de l'ADN, de l'ARN et des ADN polymérase dépendantes de l'ADN et de l'ARN et qui joue le rôle de messenger inter-cellulaire (Thierry *et al.*, 2016).

1.2.1.5. ADN tumoral circulant et concept de génométastase

Le rôle de l'ADNtc dans le processus tumoral a aussi été étudié et mène au concept de « génométastase » qui repose sur l'idée que l'ADNtc pourrait conduire à la formation de métastases. Cette hypothèse a été émise dès 1965 par l'équipe de Bendich *et al.* en démontrant que l'injection d'ADN tumoral dans la circulation de souris était à l'origine du développement d'une tumeur (Bendich *et al.*, 1965). En 1994, Anker *et al.* ont montré que l'adjonction d'ADN extrait de la lignée cellulaire tumorale SW480 porteuse d'une mutation *KRAS* au milieu de culture d'une lignée cellulaire d'embryoblastes murins NIH3T3 induisait la transformation néoplasique de celle-ci (Anker *et al.*, 1994). Suivant ce même concept, l'équipe de García-Olmo D. a montré, au début des années 2000, que la mise en contact de plasma issu d'un modèle murin avec xénogreffe tumorale dans le milieu de culture de la lignée cellulaire NIH3T3 induisait une transformation néoplasique de cette dernière (García-Olmo D *et al.*, 1999 ; García-Olmo D *et al.*, 2000). La même équipe a ensuite observé des résultats similaires mais à partir du plasma de patients avec un cancer colorectal. En effet, l'injection de cellules NIH3T3 précédemment mises en contact avec du plasma de patients atteints d'un cancer colorectal induit la formation de carcinome indifférencié chez les souris NOD-SCID (García-Olmo DC *et al.*, 2010). Les ADNtc pourraient ainsi participer à la génométastase en transformant les cellules par transfection.

1.2.1.6. Concept d'ADN lié aux cellules sanguines

Une fois libéré par les cellules, l'ADNlc va être, dans la circulation sanguine, au contact des différents composants du sang, notamment des cellules sanguines.

On peut donc s'interroger sur les interactions entre les cellules sanguines et l'ADNlc. Une série de travaux a rapporté la présence d'ADN et d'ARN à la surface des cellules sanguines (Rykova *et al.*, 2012 ; Tamkovich et Laktionov, 2019) (**tableau I**). Une fraction de l'ADN circulant ne serait donc pas vraiment libre dans la circulation mais serait plutôt de l'ADN lié aux cellules ou cell-surface-bound DNA (csbDNA). Pour identifier les mécanismes de liaison de ces ADN, les cellules ont été traitées soit par une endoprotéase comme la trypsine soit par un chélateur d'ions, l'EDTA. L'ADN récupéré avec le premier traitement permet de suggérer des liaisons de type protéique (récepteur-ligand) et le second traitement suggère l'implication de liaisons aux phospholipides et à d'autres anions de la membrane plasmique par des ponts entre ions métalliques bivalents ou des interactions de faible affinité (Laktionov *et al.*, 2004). Pour évaluer l'implication de ces mécanismes de liaison, quantifier cet ADN lié aux cellules et étudier sur quelles cellules l'ADN se fixe préférentiellement, plusieurs travaux ont été menés chez des sujets sains et chez des patients atteints de plusieurs types de cancers (**tableau I**).

La méthode utilisée, équivalente pour chaque étude, consiste à séparer, à partir d'un tube de sang total, le plasma, les leucocytes et les érythrocytes. L'ADN est extrait du plasma puis dosé. Les leucocytes et les érythrocytes sont traités de deux manières. Une partie des cellules est lavée avec une solution de PBS-EDTA (afin de rompre les liaisons ioniques) et l'autre partie est incubée avec une solution de trypsine (afin de rompre les liaisons protéiques). L'ADN est ensuite extrait et dosé (Laktionov *et al.*, 2004). La première étude a inclus des sujets sains, des patients atteints d'un cancer du sein et des patients avec un fibroadénome. Alors que chez les sujets sains et chez les patients avec un fibroadénome, la majorité de l'ADN est adsorbée à la surface des cellules sanguines, la majorité de l'ADN circulant se trouve libre dans le plasma des patients atteints d'un cancer du sein (**figure 11**). En effet, on retrouve de l'ADN à la surface des cellules uniquement pour 20% des prélèvements issus des patients atteints d'un cancer du sein (Laktionov *et al.*, 2004). Une étude similaire effectuée chez des patients atteints d'un cancer gastrique a montré que la répartition entre l'ADN libre et l'ADN lié aux cellules était comparable à celle des sujets sains (**figure 11**) (Kolesnikova *et al.*, 2008). Il en est de même dans les cancers bronchiques non à petites cellules (Tamkovich *et al.*, 2008). Le même type d'étude, réalisé à partir de prélèvements issus de patients atteints d'un cancer de la prostate, montre qu'en moyenne 41% de l'ADN est libre dans la circulation alors que le reste est lié aux cellules (Bryzgunova *et al.*, 2015). Les résultats de ces études sont résumés dans le **tableau I**.

Certains de ces travaux ne se sont pas limités à la quantification de l'ADN lié aux cellules mais ont aussi cherché à le caractériser. Seule l'étude de Laktionov *et al.* a étudié la fragmentation de ces ADN, mettant en évidence des fragments de grande taille aux alentours de 20 000 paires de bases (Laktionov *et al.*, 2004). L'étude des profils de méthylation réalisés à partir de l'ADN lié aux cellules dans la même série de patients a montré la présence de promoteurs aberrants de méthylation qui n'avaient pas été détectés dans le plasma, suggérant ainsi la possibilité d'utiliser cet ADN lié aux cellules pour détecter des anomalies spécifiques aux cancers (Rykova *et al.*, 2004 ; Skvortsova *et al.*, 2006).

Tableau I : Résultats des principaux travaux ayant étudié la notion d'ADN lié aux cellules sanguines chez des patients atteints de différents cancers

(D'après Tamkovich et Laktionov, 2019)

		Concentration moyenne en ADN (ng/mL) (rang) n=effectif			
	Type de tumeur	Sujets sains		Patients	
		ADN libre circulant	ADN lié aux cellules	ADN libre circulant	ADN lié aux cellules
Laktionov <i>et al.</i> 2004	Sein	23,3 (0-74) n=10	1016 (0-2 030) n=10	284,8 (0-1 296) n=20	7,75* (0-90) n=20
Tamkovich <i>et al.</i> 2005	Colon	13 +/- 13 (0-26) n=26	283 (0-2 110) n=26	115* (0-297) n=10	504 (219-2 130) n=10
Tamkovich <i>et al.</i> 2008	Poumon	16 +/-7 n=15	1 021 +/- 377 n=15	13 +/- 7 n=42	86 +/-36* n=42
Kolesnikova <i>et al.</i> 2008	Gastrique	15 +/- 13 n=22	508 (45-1 530) n=22	205* (8-852) n=20	669 (74-1 464) n=20
Bryzgunova <i>et al.</i> 2015	Prostate	n=40 13%	n=40 87%	n=16 41%	n=16 59%

*différence significative entre les concentrations obtenues chez les sujets sains et chez les patients

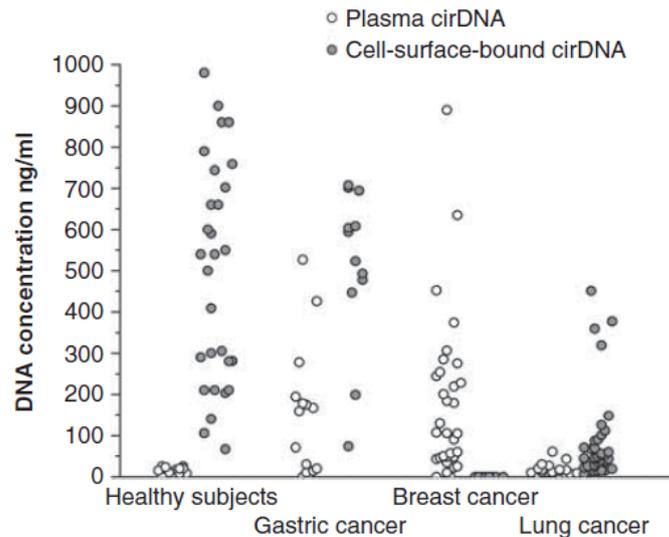


Figure 11 : Concentrations en ADN libre circulant et en ADN lié aux cellules dans le sang de sujets sains et de patients atteints d'un cancer gastrique, du sein ou du poumon

Chez les sujets sains, l'ADN est principalement lié aux cellules sanguines (cell-surface-bound cirDNA, cercles gris) alors que dans le sang des patients atteints d'un cancer du sein il est majoritairement sous forme libre (cirDNA, cercles blancs). Chez les patients atteints d'un cancer gastrique ou d'un cancer du poumon, l'ADN est reparti à la fois dans la circulation et sur les cellules sanguines.

(D'après Rykova *et al.*, 2012)

L'ensemble de ces études a permis de décrire plus précisément les mécanismes impliqués dans la liaison des ADN aux cellules sanguines et de définir 3 modalités de liaison.

Liaison non spécifique de l'ADN aux membranes cellulaires

Les ADN liés aux cellules interagissent d'abord de manière non spécifique avec les phospholipides membranaires *via* des ions métalliques bivalents, principalement Ca^{2+} et Mg^{2+} . Les protéines membranaires contenant de la lysine et de l'arginine ont aussi montré leur capacité à interagir avec les ADN de manière non spécifique (Tamkovich et Laktionov, 2019).

Liaison de l'ADN aux cellules sanguines *via* des protéines membranaires

Plusieurs protéines de liaison de l'ADN ont été identifiées sur les leucocytes. Ces récepteurs à l'ADN ont été mis en évidence sur 67% des lymphocytes et 98% des monocytes. Le gène *RC3H2* code pour une protéine de 130 kDa capable de lier l'ADN à la surface des cellules (Tamkovich et Laktionov, 2019). En revanche, les protéines de liaison de l'ADN à la surface des plaquettes et des globules rouges n'ont pas encore été identifiées.

Liaison de l'ADN *via* des récepteurs aux protéines associés aux acides nucléiques

Comme précédemment énoncé, l'ADNc est généralement enroulé autour des nucléosomes. De plus, certains complexes contiennent des protéines sériques ayant une haute affinité pour les ADN comme le lysozyme, la lactoferrine, la protéine C réactive, les immunoglobulines ou encore l'albumine. Ces différents complexes vont permettre des interactions ADN – cellule *via* des récepteurs tels que les récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines ou des récepteurs à l'albumine.

Un mécanisme de liaison *via* les protéines histones pourrait aussi contribuer à la liaison des ADN aux cellules (Tamkovich et Laktionov, 2019).

1.2.2. Vésicules extracellulaires

1.2.2.1. Définition

Les vésicules extracellulaires sont des vésicules membranaires composées de cytosol provenant de cellules sécrétrices et contenu dans une bicouche lipidique. Le terme « vésicule extracellulaire » est un terme générique qui regroupe un ensemble de vésicules, classées en fonction de leur taille et de leur origine (Colombo *et al.*, 2014). Les vésicules extracellulaires sont libérées par de nombreux types cellulaires, d'origine hématopoïétique ou non (Xie *et al.*, 2019). La composition exacte de chaque sous type de vésicules extracellulaires n'est pas connue mais les éléments suivants sont habituellement retrouvés : protéines, lipides, acides nucléiques (**figure 12**). Certaines protéines sont présentes dans la plupart des vésicules extracellulaires, indépendamment du type cellulaire alors que d'autres sont spécifiques du type cellulaire qui a sécrété les vésicules extracellulaires. Ces protéines sont habituellement issues de l'endosome, de la membrane plasmique ou du cytosol (Colombo *et al.*, 2014). Les rares études menées pour étudier la composition lipidique des vésicules extracellulaires ont montré un enrichissement de la membrane des vésicules extracellulaires en sphingomyéline, phosphatidylsérine et cholestérol par rapport à la membrane cellulaire (Colombo *et al.*, 2014). Les acides nucléiques présents dans les vésicules extracellulaires peuvent être des ARN messagers (ARNm) ou des ARN non codants comme des micro ARN (miARN).

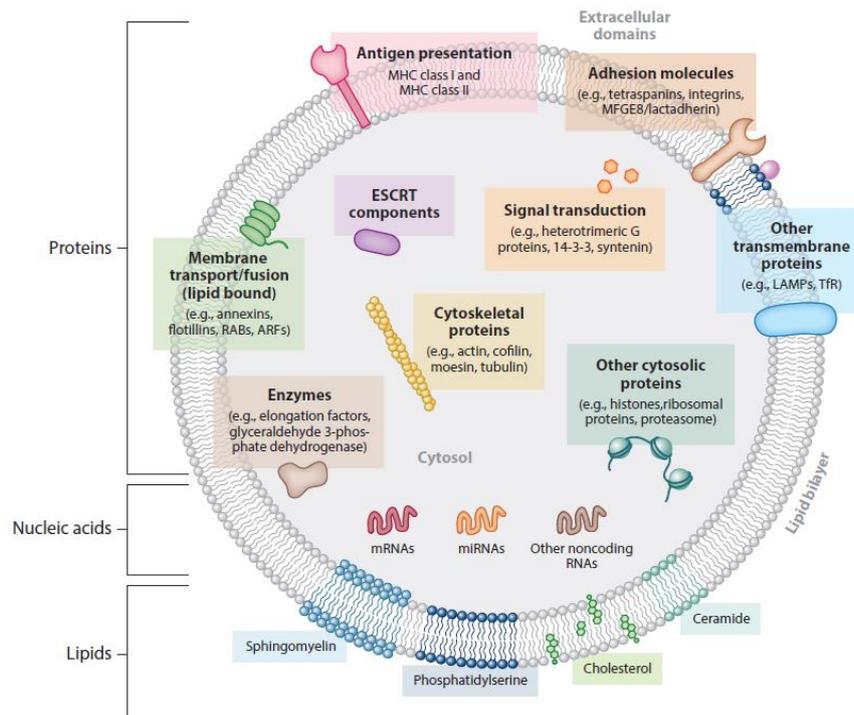


Figure 12 : Représentation globale d'une vésicule extracellulaire

La bicouche lipidique qui constitue la membrane des vésicules extracellulaires est composée de sphingomyéline, de phosphatidylsérine, de cholestérol ou encore de céramide.

Les acides nucléiques présents à l'intérieur des vésicules extracellulaires sont en majorité des ARNm, et des ARN non codants comme les miARN. Les protéines sont membranaires (protéines de transport), transmembranaires (molécules d'adhésion, complexe majeure d'histocompatibilité) ou cytosoliques (protéines ESCRT, enzymes, protéines du cytosquelette, signaux de transduction).

(D'après Colombo *et al.*, 2014)

Les vésicules extracellulaires peuvent être classées en trois grands types : exosomes, microvésicules (ou microparticules) et corps apoptotiques (**figure 13**). Décrits pour la première fois en 1983, les exosomes sont les plus petites vésicules extracellulaires et résultent de la fusion entre les corps multivésiculaires (dérivés des endosomes) et la membrane plasmique des cellules (**figure 14**). De taille comprise entre 30 et 100 nm, ils sont composés de protéines et de lipides et transportent principalement des ARNm et des miARN (Siravegna *et al.*, 2017). La présence d'ADN double brin fixé à l'extérieur de l'exosome mais aussi dans une moindre mesure présent à l'intérieur a été rapportée (Rykova *et al.*, 2012; Thierry *et al.*, 2016). Les corps multivésiculaires sont formés avec la participation d'un complexe protéique ESCRT, composé d'une trentaine de protéines (**figure 14**).

Les microvésicules résultent quant à elles du bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules en réponse à leur activation, à une blessure ou à l'apoptose et ont un diamètre compris entre 200 et 1000 nm (**figure 14**). Les microvésicules transportent de l'ADN et de l'ARN (Thierry *et al.*, 2016 ; Xie *et al.*, 2019).

Enfin, les corps apoptotiques sont formés pendant la dernière étape de la mort cellulaire programmée et transportent de l'ADN et de l'ARN. Ce sont les plus grosses vésicules extracellulaires avec une taille comprise entre 1 et 3 µm (Rykova *et al.*, 2012 ; Thierry *et al.*, 2016).

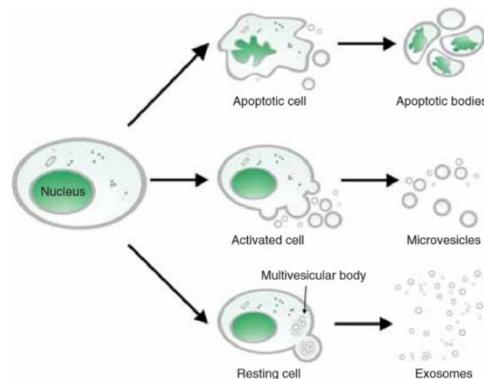


Figure 13 : Types de vésicules extracellulaires libérés par une cellule

Les corps apoptotiques sont formés lors de la dernière étape de mort cellulaire, les microvésicules sont issues du bourgeonnement de la membrane des cellules activées et les exosomes résultent de la fusion des corps multivésiculaires à l'intérieur de la cellule.

(D'après Rykova *et al.*, 2012)

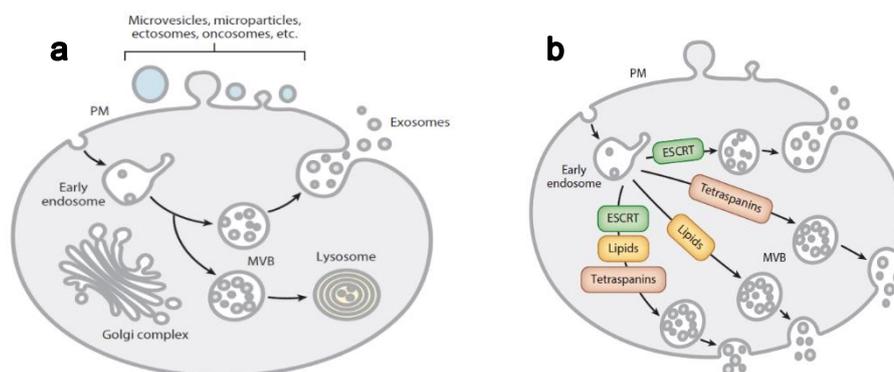


Figure 14 : Formation des vésicules extracellulaires

a : Les microvésicules sont issues du bourgeonnement de la membrane plasmique (PM) des cellules. Les exosomes sont quant à eux libérés suite à la fusion des corps multivésiculaires (MVB) avec la membrane plasmique.

b : Les exosomes sont libérés dans la circulation sanguine *via* différentes voies qui impliquent le complexe ESCRT, les tétraspanines, les lipides ou les trois combinés.

(D'après Colombo *et al.*, 2014)

1.2.2.2. Fonctions des vésicules extracellulaires : exemple des exosomes

Les exosomes sont classiquement composés d'une bicouche lipidique qui porte des protéines transmembranaires et qui contient des protéines cytosoliques, des lipides et des acides nucléiques. Les protéines contenues dans les exosomes sont majoritairement ubiquitaires et ne dépendent donc pas du type de cellules dont elles sont issues. C'est le cas des protéines RAS, ou encore des protéines du cytosquelette comme la tubuline (Fu *et al.* 2019). Initialement considérés comme des « poubelles » cellulaires, les exosomes sont maintenant reconnus comme un moyen important de communication cellulaire. En effet, ils véhiculent des molécules bioactives telles que des protéines, des ADN, des ARNm, des ARN circulaires ou des ARN non codants (ARN longs non codants, miARN). Dans un contexte non tumoral, les fonctions attribuées aux vésicules extracellulaires sont nombreuses. Par exemple, lors de la maturation des réticulocytes en érythrocytes, certaines molécules de surface (récepteurs à la transferrine par exemple) sont libérées de la membrane *via* les exosomes. Après internalisation dans les endosomes, les récepteurs, couplés aux corps multivésiculaires sont libérés dans la circulation sous forme d'exosomes lors de la fusion entre les corps multivésiculaires et la membrane plasmique (Colombo *et al.*, 2014). Les vésicules extracellulaires sont aussi impliquées dans la médiation de la réponse immunitaire, dans le processus de coagulation sanguine ou dans la liaison des bactéries (Colombo *et al.*, 2014). Pour induire des modifications dans la cellule réceptrice, les exosomes vont soit délivrer leur message à la surface des cellules (liaison à des protéines de surface) ou être internalisés (par fusion directe ou endocytose) et libérer leur contenu à l'intérieur de la cellule réceptrice (**figure 15**).

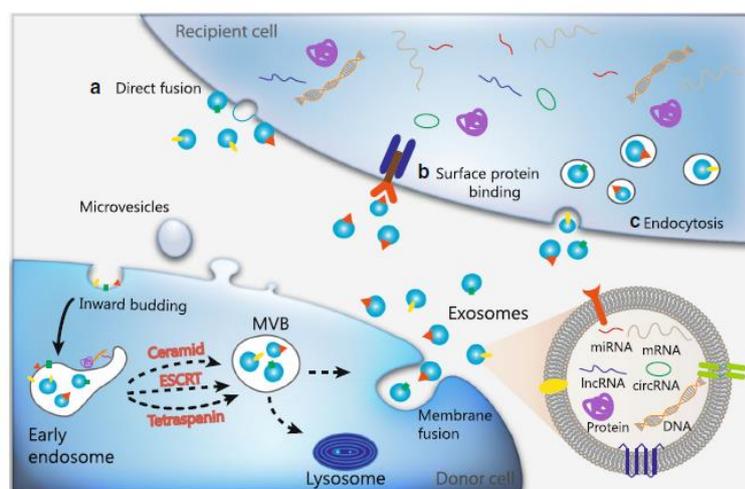


Figure 15 : Rôle des exosomes comme messagers inter-cellulaires

Les exosomes peuvent libérer leur contenu dans la cellule réceptrice par fusion directe (a), liaison aux protéines de surface (b) ou endocytose (c). (D'après Fu *et al.*, 2019)

1.2.2.3. Présence des vésicules extracellulaires dans un contexte tumoral

Les cellules tumorales sécrètent à la fois des exosomes et des microvésicules. La proportion entre les deux n'est pas encore clairement établie. De même, il n'a pas encore été montré que les cellules tumorales sécrètent plus de vésicules extracellulaires que les cellules non tumorales (Colombo *et al.*, 2014). Les fonctions attribuées aux vésicules extracellulaires d'origine tumorale sont nombreuses, leur permettant ainsi de participer aux processus de tumorigenèse, de métastase, d'angiogenèse, d'échappement immunitaire et de résistance au traitement (**figure 16**) (Fu *et al.*, 2019). Néanmoins, il a aussi été montré que les vésicules extracellulaires permettent le transfert des antigènes tumoraux aux cellules dendritiques et donc l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale. Les exosomes issus des cellules cancéreuses transportent des ARNm, des miARN ou des protéines qui peuvent moduler l'activité des cellules réceptrices en activant des oncogènes ou en inactivant des gènes suppresseurs de tumeur. Les exosomes sont aussi impliqués dans l'accélération de la progression tumorale en induisant la transformation maligne de cellules cibles et en régulant la migration des cellules tumorales. Les exosomes facilitent aussi l'angiogenèse par transfert de protéines (VEGF, FGF, IL-6, IL-8, angiopoïétine) et par stimulation des cellules vasculaires endothéliales *via* les miARN. Ils peuvent aussi contribuer à la formation des niches pré-métastatiques et à la promotion des métastases. Enfin, les vésicules extracellulaires contiennent des métalloprotéases qui peuvent aider à la migration des cellules tumorales à travers des tissus solides (Colombo *et al.*, 2014 ; Liu S *et al.*, 2018). La proportion de vésicules extracellulaires dans les organes à distance de la tumeur primaire est différente en fonction du type de cancer. Les travaux de Takahashi *et al.* rapportent que les vésicules extracellulaires dérivées d'un mélanome sont retrouvées majoritairement dans la rate, le foie, les poumons et la moelle osseuse alors que Rana *et al.* ont montré que les vésicules extracellulaires issues d'une tumeur du pancréas sont retrouvées préférentiellement dans le pancréas, les poumons et les reins (Takahashi *et al.*, 2013 ; Rana *et al.*, 2011).

Les microvésicules dérivées des plaquettes représentent un groupe de particules hétérogènes en taille (entre 50 et 1 000 nm) et en composition. Elles sont une source de facteur tissulaire qui participe à la coagulation. Une forte concentration en microvésicules d'origine plaquettaire est associée à une tumeur agressive, à un mauvais pronostic et à des métastases chez les patients atteints d'un cancer de la prostate. Dans les cancers gastriques, la concentration est significativement supérieure chez les patients atteints d'un cancer de stade IV par rapport aux patients atteints d'un cancer de stade inférieur. En plus des facteurs pro-coagulants, les microparticules dérivées des plaquettes libèrent des miARN

qui peuvent promouvoir ou inhiber la croissance tumorale. De plus, dans les cancers de l'ovaire, un changement du profil lipidique des microparticules a été observé. En effet, on observe une augmentation des lipides pro-coagulants et une diminution des lipides anticoagulants entraînant donc possiblement un fond d'hypercoagulabilité (Haemmerle *et al.*, 2018).

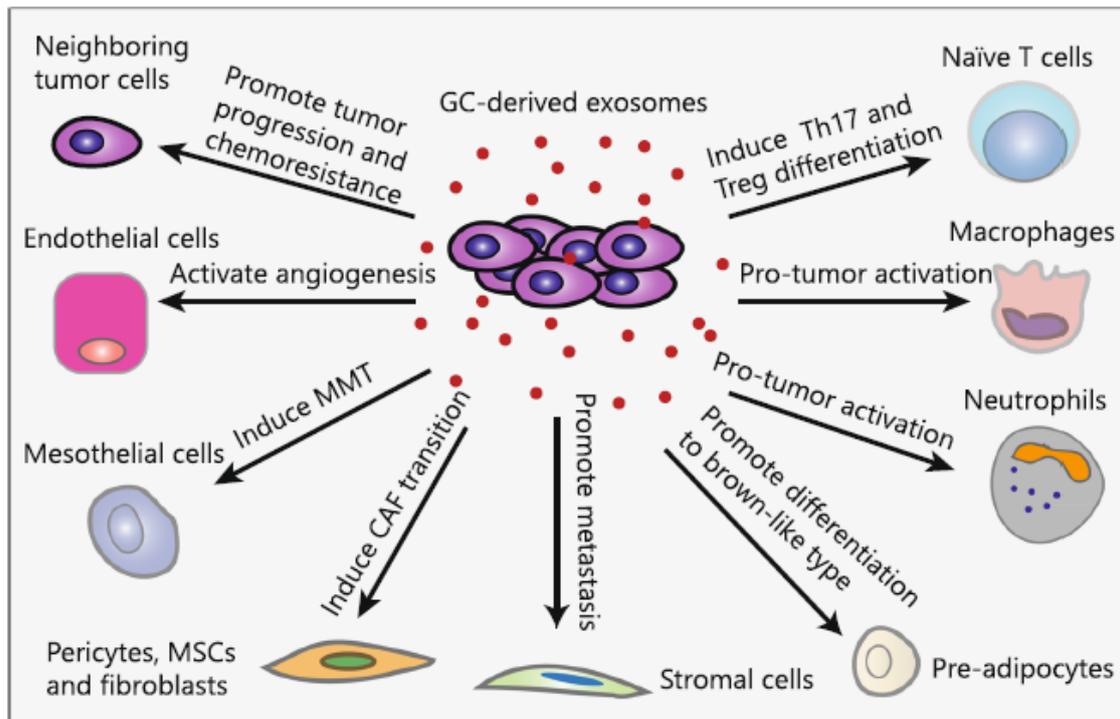


Figure 16 : Rôle des exosomes issus des cellules tumorales dans la progression des cancers gastriques

Les exosomes dérivés des cellules tumorales gastriques modulent l'immunité en activant le phénotype pro-tumoral des PNN et des macrophages et en induisant la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th17 et en lymphocytes T régulateurs. L'angiogenèse tumorale et la formation de métastases sont facilitées par les exosomes qui convertissent les péricytes, les fibroblastes et les cellules mésothéliales en myofibroblastes. Les cellules endothéliales peuvent être activées par les exosomes dérivés des cellules tumorales gastriques afin de supporter l'angiogenèse tumorale et de promouvoir l'adhésion entre les cellules mésothéliales et les cellules tumorales. Les exosomes créent aussi un microenvironnement favorable aux métastases hépatiques. Enfin, les exosomes favorisent la différenciation des adipocytes en sous-type brun.

(D'après Fu *et al.*, 2019)

1.2.2.4. Rôle des acides nucléiques issus des vésicules extracellulaires

ADN issus des vésicules extracellulaires

Des travaux visant à étudier le contenu des exosomes chez des sujets sains ont mis en évidence qu'après déplétion du sérum en exosomes, l'ADN amplifiable devenait absent, suggérant que la majorité de l'ADNlc serait en fait contenue dans les exosomes (Kahlert *et al.*, 2014). Une autre étude va dans le même sens en mettant en évidence que 93% de l'ADNlc serait contenu dans les exosomes et libéré lors de la dégradation de ceux-ci (Fernando *et al.*, 2017). Ces travaux rapportent néanmoins des résultats contradictoires sur la taille des fragments isolés. Alors que la première étude met en évidence de l'ADN de haut poids moléculaire composé de fragments de plus de 10 000 paires de bases, les fragments d'ADN mesurés dans la seconde étude sont majoritairement inférieurs à 200 paires de bases.

ARN non codants issus des vésicules extracellulaires : exemple du cancer gastrique

Une étude menée dans les cancers gastriques a mis en évidence l'implication des ADN non codants issus des vésicules extracellulaires dans différentes étapes du processus tumoral (**figure 17**). Certains miARN sont surexprimés dans les exosomes issus des cellules tumorales gastriques. En fonction du type de miARN contenu dans les exosomes, ceux-ci vont pouvoir être internalisés dans les cellules tumorales et promouvoir la migration et la prolifération cellulaire.

Les miARN sont aussi impliqués dans la résistance à la chimiothérapie. En effet, il a été montré que les miARN miR-155-5p issus des cellules tumorales résistantes au paclitaxel pouvaient être transférés *via* les exosomes aux cellules sensibles au paclitaxel et diminuer ainsi leur chimiosensibilité (Fu *et al.*, 2019).

Certains miARN sont aussi impliqués dans la promotion de l'angiogenèse. Les exosomes transportent aussi miR-27a et induisent la transformation des fibroblastes en fibroblastes associés au cancer qui, à leur tour, favorisent la prolifération, la mobilité et la formation de métastases par les cellules cancéreuses gastriques. Le transfert de miR-451 aux cellules T entraîne leur différenciation en T helper 17 par activation de la mTOR. De la même manière, les exosomes issus de cellules non tumorales peuvent transférer des miARN aux cellules cancéreuses. Par exemple, miR-21 issu des macrophages peut promouvoir la migration cellulaire, réduire l'apoptose, conférer une résistance au cisplatine, inhiber l'expression de PDCD4 et activer la voie PI3K/AKT par la régulation de PTEN (Wang JJ *et al.*, 2015 ; Zheng *et al.*, 2017). miR-221 issu des cellules souches mésenchymateuses facilite la prolifération et la migration cellulaire (Wang M *et al.*, 2014 ; Ma *et al.*, 2017).

La surexpression d'autres ARN non codants tels que LINC00152, mise en évidence dans le plasma de patients atteints d'un cancer gastrique, entraîne des propriétés de protection des exosomes contre la dégradation par les RNases. lncRNA ZFAS1 est présent en plus grande quantité dans les exosomes de patients avec un cancer gastrique et son transfert augmente la prolifération et la migration des cellules tumorales gastriques (Fu *et al.*, 2019).

Comme vu précédemment, la transition épithélio-mésenchymateuse a un rôle prédominant dans l'infiltration et la migration des cellules tumorales et leur échappement à l'apoptose. Les miARN sont présents en quantités plus importantes dans les exosomes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse et jouent un rôle dans la facilitation de l'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine et la formation de niches pré-métastatiques (Liu Y *et al.*, 2016 ; Xie *et al.*, 2019).

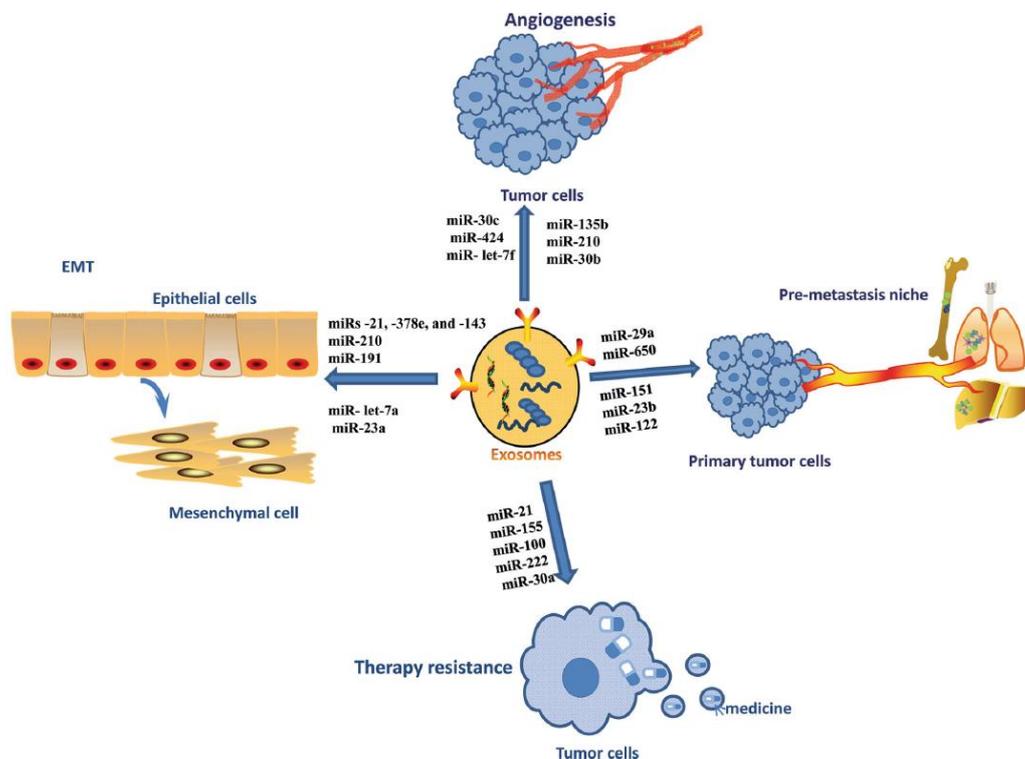


Figure 17 : Fonctions régulées par les ARN non codants exosomaux

Les ARN exosomaux non codants, particulièrement les miARN, peuvent réguler la progression tumorale *via* différents mécanismes comme la transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, l'angiogenèse, la formation de niches pré-métastatiques ou la résistance au traitement.

(D'après Xie *et al.*, 2019)

1.3. Etude des éléments dérivés d'une tumeur par biopsie liquide

1.3.1. Les biopsies liquides : concept et intérêt

La biopsie liquide est définie par l'Institut National du Cancer Américain comme « un test réalisé sur un échantillon sanguin pour analyser les cellules circulantes issues d'une tumeur ou des fragments d'ADN libérés par la tumeur dans la circulation sanguine ». Il s'agit d'une alternative potentielle à la recherche d'anomalies directement sur une biopsie ou une pièce opératoire (biopsie dite « solide »). Dans certains cas, la recherche des caractéristiques génétiques d'une tumeur est requise pour la prise en charge du patient. Par exemple, dans un contexte de mélanome métastatique, la présence d'une mutation sur le codon 600 du gène *BRAF* est nécessaire pour la prescription des inhibiteurs de kinase (IK) anti-BRAF (vémurafénib et dabrafénib) (Sullivan *et al.*, 2018). Au contraire, chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique, la présence d'une mutation sur le gène *KRAS* ou sur le gène *NRAS* contre-indique la prescription des anticorps monoclonaux anti-EGFR (cétuximab, panitumumab) (Van Cutsem *et al.*, 2016). La recherche de ces altérations génétiques se fait habituellement sur une biopsie tissulaire. Cependant, le caractère invasif de la biopsie tissulaire rend parfois le prélèvement difficile à réaliser et le suivi de l'évolution tumorale par biopsies itératives n'est souvent pas possible.

L'augmentation récente du nombre de publications sur les biopsies liquides montre l'intérêt croissant pour cette potentielle nouvelle technique d'analyse du statut tumoral. Actuellement, plusieurs études cliniques prévoient dans leur protocole un ou plusieurs prélèvements sanguins. Son principal avantage est son caractère peu invasif permettant ainsi des prélèvements répétés. De plus, la facilité de prélèvement permet de réduire le délai de prise en charge. En effet, une biopsie tissulaire nécessite une prise en charge globale incluant une qualification du prélèvement par un anatomopathologiste alors que la biopsie liquide permet de s'abstenir de ces étapes préanalytiques.

1.3.1.1. Méthodes et intérêt de la recherche des CTCs

L'étude des CTCs repose sur 3 étapes successives : l'enrichissement, la détection et la caractérisation. Les techniques d'enrichissement reposent sur des principes biologiques ou physiques. La sélection positive consiste à utiliser des anticorps contre des marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux. La sélection négative consiste à retirer les leucocytes en utilisant des anticorps anti-CD45. L'enrichissement basé sur des méthodes physiques utilise les caractéristiques de taille, de déformabilité ou de charge des CTCs.

Une fois isolées, les CTCs peuvent être détectées par des techniques de cytométrie, de biologie moléculaire ou des tests fonctionnels. Les plateformes de cytométrie permettent d'identifier les CTCs par marquage membranaire ou intra-cytoplasmique avec des anticorps

épithéliaux, mésenchymateux, tissus-spécifiques ou avec des marqueurs associés à la tumeur. Les techniques de biologie moléculaire permettent l'identification des CTCs *via* des tests basés sur la détection de l'ARN.

Les tests fonctionnels utilisent l'activité biologique des CTCs viables. Les CTCs peuvent être caractérisées de manière plus précise *via* le niveau en ADN, en ARN ou en protéines et les propriétés fonctionnelles des CTCs peuvent être étudiées *in vivo* en formant des modèles de xénogreffe (**figure 18**) (Pantel et Alix-Panabières, 2019).

Les CTCs ont montré leur intérêt comme marqueur pronostique notamment dans le cancer du sein mais aussi dans les cancers de la prostate, du poumon et dans les cancers colorectaux (Alix-Panabières et Pantel, 2014). Des études cliniques sur la recherche de CTCs pour le suivi de la maladie résiduelle dans le cancer du sein ont montré que la présence de CTCs 2 ans après la chimiothérapie était prédictive d'une survie sans progression et d'une survie globale plus courtes (Pantel et Alix-Panabières, 2019). De même, dans les cancers colorectaux, la présence de CTCs 2 à 3 ans après la chirurgie prédit une mauvaise progression. Dans les cancers bronchiques non à petites cellules, la présence de CTCs après un cycle de chimiothérapie est de mauvais pronostic (Pantel et Alix-Panabières, 2019).

Un outil de recherche des CTCs, le CellSearch system (Menarini Silicon Biosystems, Castel Maggiore, Italie) est approuvé par la FDA pour les patients atteints d'un cancer métastatique du sein, de la prostate ou colorectal. Il sélectionne les cellules qui expriment des epithelial cell adhesion molecules (EpCAM) sans expression du CD45 (marqueur leucocytaire ubiquitaire). Malgré les résultats obtenus sur la prédiction de la progression, ce test n'a pas encore démontré d'utilité clinique et reste donc très peu utilisé (Heitzer *et al.*, 2019).

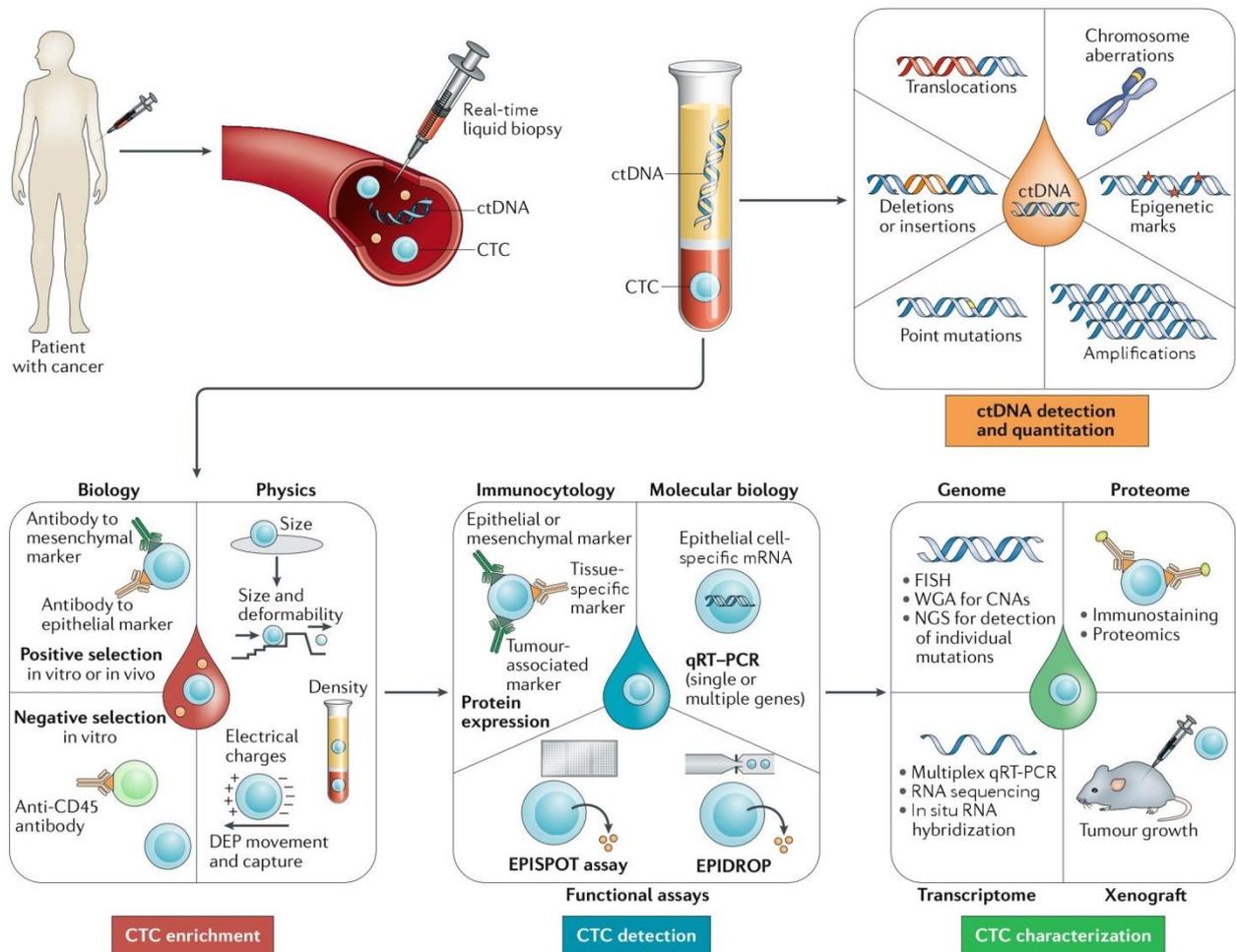


Figure 18 : Techniques d'enrichissement, de détection et de caractérisation des CTCs et des ADN tumoraux circulants

Il est possible d'isoler les CTCs et les ADNtc à partir d'un même prélèvement sanguin.

La quantification des ADNtc (en orange à droite) est basée sur l'identification de différentes aberrations génétiques ou épigénétiques spécifiques de la tumeur principalement par techniques de séquençage.

L'étude des CTCs est quant à elle réalisée en 3 étapes : enrichissement, détection et caractérisation.

L'enrichissement (en rouge à gauche) peut reposer sur des principes biologiques (sélection positive ou négative) ou physiques (densité, taille, charge).

Une fois isolées, les CTCs peuvent être détectées (en bleu au milieu) par des techniques de cytométrie, de biologie moléculaire ou par des tests fonctionnels.

Les CTCs peuvent aussi être caractérisées de manière plus précise (en vert à gauche) *via* le niveau en ADN, en ARN ou en protéines et les propriétés fonctionnelles des CTCs peuvent être étudiées *in vivo* en formant des modèles de xéno greffe.

CNAs, altérations du nombre de copies ; DEP, diélectrophorèse ; FISH, hybridation *in situ* en fluorescence ; NGS, séquençage haut-débit ; qRT-PCR, RT-PCR quantitative ; WGA, analyse du génome complet.

(D'après Pantel et Alix-Panabières, 2019)

1.3.1.2. Méthodes et intérêt de l'étude des exosomes d'origine tumorale

La connaissance des propriétés biophysiques et biochimiques des exosomes a permis de mettre au point des techniques d'isolement basées sur les principes de précipitation ou de microfluidique ou encore sur la densité des particules (ultracentrifugation), leur taille (ultrafiltration, chromatographie d'exclusion de taille) ou leur contenu en marqueurs protéiques spécifiques (CD63, CD9, CD81) (Siravegna *et al.*, 2017 ; Fu *et al.*, 2019). Néanmoins, l'étude des exosomes est encore au stade de recherche et n'est pas utilisée en pratique clinique.

1.3.1.3. Intérêt de la recherche de l'ADN tumoral circulant

Si la biopsie tissulaire reste pour le moment la référence pour diagnostiquer et orienter le traitement des cancers, la recherche d'ADNtc suscite de plus en plus d'intérêt. En effet, le caractère peu invasif de la biopsie liquide permettrait de rechercher la présence d'ADNtc à plusieurs étapes de la prise en charge d'un cancer (**figure 19**).

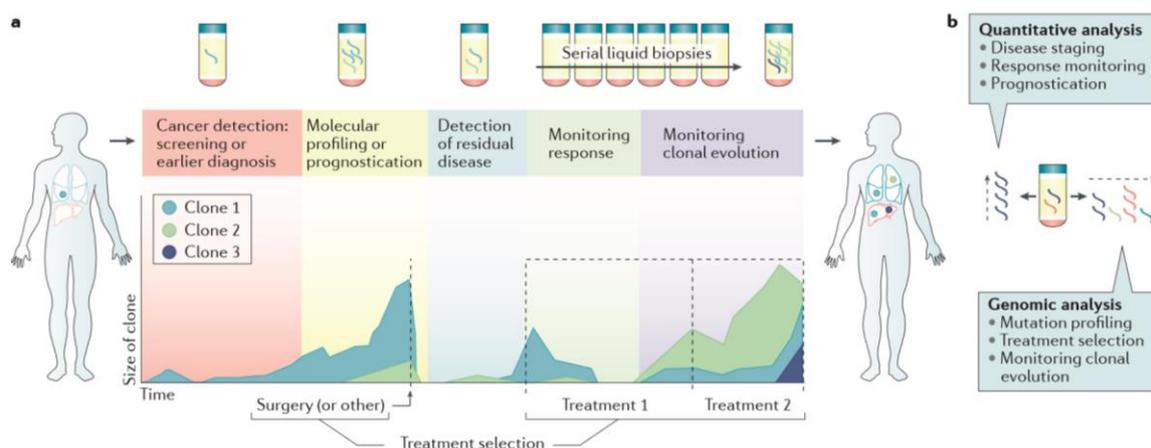


Figure 19 : Applications de l'analyse de l'ADN tumoral circulant dans la prise en charge d'une pathologie tumorale

a : L'analyse de l'ADN tumoral circulant présente un intérêt tout au long de la prise en charge d'une pathologie tumorale. D'abord comme moyen non invasif de dépistage ou de diagnostic précoce, ensuite pour définir les altérations génétiques de la tumeur. Après chirurgie, l'ADN tumoral circulant permettrait de suivre la maladie résiduelle. En cas de mise en place d'un traitement, le suivi de l'ADN tumoral circulant permet d'évaluer la réponse au traitement et enfin de suivre l'évolution clonale en cas d'échappement au traitement.

b : Le suivi quantitatif permet d'évaluer la réponse au traitement ou à la chirurgie. L'analyse génomique permet de définir le profil mutationnel de la tumeur, de choisir le traitement et de suivre l'évolution clonale. (D'après Wan *et al.*, 2017)

Dépistage

Le dépistage, selon l’OMS, consiste à « identifier de manière présomptive à l’aide de tests, d’examen ou d’autres techniques susceptibles d’une application rapide, les sujets atteints d’une maladie ou d’une anomalie passée jusque-là inaperçue. » Les tests de dépistage doivent permettre d’identifier les personnes apparemment en bonne santé mais qui sont probablement atteintes d’une maladie donnée et celles qui en sont probablement exemptes. Le dépistage n’a pas pour objectif de poser un diagnostic et les personnes pour lesquelles les résultats sont positifs ou douteux doivent être orientées vers leur médecin pour vérification du diagnostic et, si besoin est, pour la mise en place d’un traitement. Les techniques de dépistage sont destinées à être réalisées sur un grand nombre de personnes et doivent donc être, dans la mesure du possible, simples à réaliser. La facilité d’obtention d’un prélèvement sanguin s’accorderait donc avec les contraintes du dépistage. Cependant, les études menées jusqu’à présent ont montré que la recherche d’ADNtc dans un contexte de dépistage se heurte à un manque de sensibilité et de spécificité. Cela s’explique notamment par le fait que l’ADNtc est surtout détectable dans les cancers de stade avancé qui ont alors déjà des manifestations cliniques. Le caractère non invasif et la facilité de mise en place d’un tel test permettraient tout de même d’envisager la possibilité d’en faire un test d’orientation afin de proposer à certains patients des tests plus spécifiques (Franczak *et al.*, 2018).

Diagnostic précoce

Le diagnostic précoce s’applique à des patients qui présentent, par exemple, un test de dépistage positif ou des signes d’alerte. La comparaison des concentrations et de l’index d’intégrité de l’ADN obtenus chez des patients atteints d’un cancer de la prostate, d’une hypertrophie bénigne de la prostate et chez des sujets sains a mis en évidence la possibilité de discriminer les patients atteints d’un cancer de la prostate de ceux n’ayant pas de pathologie ou une pathologie bénigne, laissant ainsi la possibilité d’utiliser la concentration en ADNtc et l’index d’intégrité comme marqueur dans le diagnostic du cancer de la prostate (Khani *et al.*, 2019).

Diagnostic moléculaire

L’efficacité d’une thérapie ciblée est souvent dépendante de mutations sur les gènes qui codent pour la cible thérapeutique ou pour une protéine de signalisation située en dessous ou au-dessus de la cible. Dans certains cas, la présence ou l’absence de certaines mutations va permettre d’orienter le traitement (principe de théranostic).

La biopsie liquide permet de pallier la difficulté à obtenir un génotypage tumoral à partir d’un prélèvement tissulaire notamment chez les patients atteints d’un cancer bronchique non à

petites cellules de stade avancé ou métastatique. L'AMM des IK anti-EGFR de 1^{ère} et 2^{ème} génération (géfitinib, erlotinib et afatinib) précise qu'en absence d'un échantillon tumoral tissulaire analysable, la recherche des mutations activatrices du gène *EGFR* peut être réalisée à partir d'un prélèvement sanguin. Dans les autres types de cancers, l'utilisation de la biopsie liquide pour le diagnostic moléculaire fait l'objet de plusieurs études cliniques notamment dans les cancers colorectaux de stades avancés ou métastatiques mais cette application n'est pas encore validée (Bachet *et al.*, 2018).

L'ADNtc permet aussi de mettre en évidence l'hétérogénéité tumorale. En effet, au sein d'une même tumeur, toutes les cellules tumorales n'ont pas le même profil génétique. La tumeur primitive ainsi que les métastases sont composées de différents clones cellulaires aux caractéristiques différentes. Lors d'une biopsie tissulaire, il est possible d'isoler l'un de ces clones tout en négligeant ceux qui se trouvent en dehors de la zone de prélèvement (**figure 20**) (Dominguez-Vigil *et al.*, 2018). La biopsie liquide permettrait donc de détecter des mutations absentes de la pièce tumorale étudiée mais présentes sur une métastase ou sur une partie de la tumeur non biopsiée ce qui pourrait ainsi expliquer la résistance au traitement.

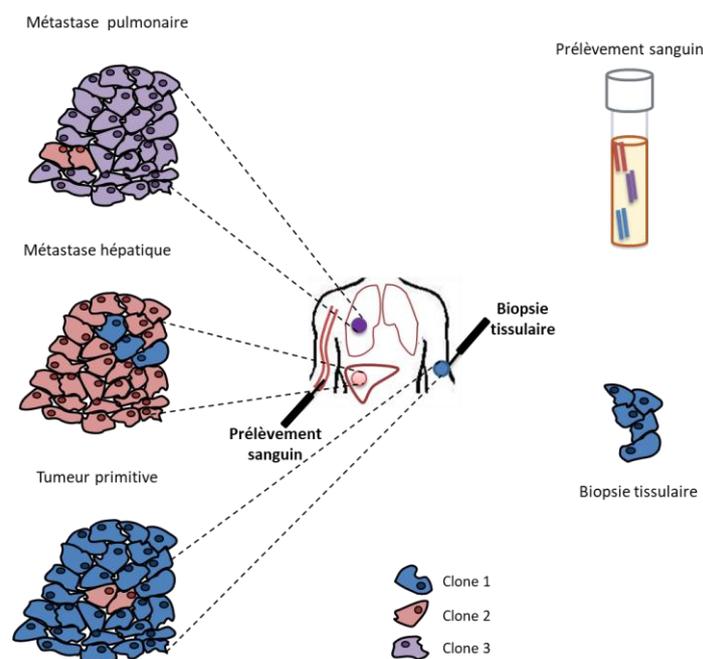


Figure 20 : Intérêt de la biopsie liquide pour détecter l'hétérogénéité tumorale

Sur cette figure, la tumeur primitive est composée des clones 1 et 2, la métastase hépatique des clones 1 et 2 et la métastase pulmonaire des clones 2 et 3. La biopsie tissulaire schématisée sur la figure n'a permis d'isoler qu'un seul clone et ne reflète donc ni l'hétérogénéité de la tumeur primitive, ni celle des métastases. Au contraire, un prélèvement sanguin permet de détecter de l'ADN tumoral circulant issu de tous les types de clones et sera donc le reflet de l'hétérogénéité tumorale. (Adapté de Franczak *et al.*, 2018)

Détection de la maladie résiduelle

La maladie résiduelle (MRD) est définie par la persistance de cellules malignes en dessous du seuil de détection par les techniques conventionnelles. Déjà couramment utilisée dans le suivi de certaines hémopathies malignes comme par exemple la leucémie myéloïde chronique, la détection de la MRD permettrait d'identifier les patients atteints d'une tumeur solide et qui ont un fort risque de rechute après le traitement de première ligne. Le développement de techniques ultrasensibles pour la détection de l'ADNtc permet de l'envisager comme marqueur de la MRD (Pantel et Alix-Panabières, 2019). Plusieurs études cliniques ont évalué l'intérêt de l'ADNtc dans le suivi de la MRD. Dans les cancers du sein, la liste des gènes recherchés était soit établie de manière personnalisée en fonction des caractéristiques de la tumeur du patient soit composée d'un large panel de gènes liés au cancer. Les résultats ont montré que l'ADNtc pouvait être détecté avant l'apparition des métastases, en faisant donc un marqueur potentiel de la MRD (Pantel et Alix-Panabières, 2019). Dans les cancers colorectaux, une étude a montré que le pourcentage de récurrence après 27 mois de suivi moyen était supérieur chez les patients qui avaient de l'ADNtc détectable (Pantel et Alix-Panabières, 2019). Les études disponibles dans les cancers bronchiques sont rares, néanmoins, une étude présente des résultats encourageants en montrant que la détection de mutations ponctuelles sur l'ADNtc est corrélée avec les preuves cliniques de rechute des cancers bronchiques non à petites cellules (Abbosh *et al.*, 2017).

Evaluation de la réponse au traitement et identification d'un clone résistant en cas de rechute

Dans la thérapie ciblée, la recherche de mutations sur l'ADNtc permet d'évaluer la réponse au traitement. Par exemple, dans les mélanomes métastatique, la disparition du clone muté V600E permet de suivre la réponse au traitement. Enfin, en cas de rechute, la biopsie liquide permettrait d'identifier le ou les clones responsables de la résistance (Wan *et al.*, 2017). Par exemple, en cas d'apparition d'une résistance aux IK de 1^{ère} ou de 2^{ème} génération chez les patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules et en vue de l'utilisation de l'osimertinib (IK de 3^{ème} génération), la recherche de la mutation T790M du gène *EGFR*, responsable d'environ 50% des cas de résistance au IK anti-EGFR de 1^{ère} et de 2^{ème} génération, peut être réalisée sans distinction sur un nouveau prélèvement tissulaire ou sur un prélèvement sanguin (Novello *et al.*, 2016).

1.3.2. Contraintes préanalytiques et analytiques liées à la biopsie liquide

L'ADNtc étant présent en faible quantité dans la circulation sanguine il est nécessaire de suivre un protocole préanalytique adapté afin de limiter la contamination des prélèvements par de l'ADN génomique fragmenté issu des cellules saines, cela afin d'augmenter la probabilité de détection des mutations somatiques c'est-à-dire celles présentes uniquement dans les cellules d'origine tumorale (à l'opposé des mutations dites constitutionnelles ou germinales). Plusieurs études ont été menées pour étudier l'influence de l'anticoagulant utilisé, celle du délai de traitement de l'échantillon, du protocole de centrifugation ou encore de la technique d'extraction (El Messaoudi *et al.*, 2013).

Lors du processus de coagulation, les leucocytes libèrent de l'ADN génomique fragmenté qui vient augmenter la quantité totale d'ADN dans le sérum. Il est donc recommandé de rechercher l'ADNtc sur du plasma plutôt que sur du sérum. Sur ce même principe et afin de réduire la contamination due à l'ADN des cellules saines deux types de tubes peuvent être utilisés. Les tubes EDTA, à condition de prendre en charge le prélèvement dans les 2 à 4 heures après la ponction, et les tubes avec conservateur (Streck, PAXgene, Norgen, Roche) qui stabilisent la membrane des cellules sanguines et qui permettent de différer la prise en charge du prélèvement jusqu'à 5 jours (Franczak *et al.*, 2019).

Concernant la centrifugation, il est actuellement recommandé d'effectuer une première centrifugation du sang total à faible vitesse puis une seconde centrifugation du plasma après décantation à grande vitesse. Le protocole de centrifugation influence aussi le pourcentage d'ADNtc récupéré par rapport à la totalité de l'ADNtc présent dans le prélèvement sanguin ainsi que sa pureté. En effet, la fraction contenant l'ADNtc peut contenir une quantité substantielle de contaminants comme par exemple un autre biomarqueur (CTCs, vésicules extracellulaires). Globalement, plus la vitesse de la seconde centrifugation est élevée plus on s'affranchit de la contamination par les vésicules extracellulaires. Par contre, cette vitesse de centrifugation élevée élimine une proportion non négligeable d'ADNtc. Il est donc nécessaire d'utiliser un protocole qui permet un équilibre maximal entre purification de l'ADN et maintien de sa concentration (Rikkert *et al.*, 2018). Après double centrifugation des prélèvements, le plasma peut être indifféremment congelé ou utilisé directement pour l'extraction. Les étapes de congélation / décongélation du plasma, si elles n'excèdent pas 2 fois, n'affectent pas la concentration en ADNtc (El Messaoudi *et al.*, 2013).

L'étape suivante, nécessaire pour la plupart des techniques de recherche de mutations consiste à extraire l'ADNc du plasma. Certains kits sont basés sur de l'extraction sur colonne alors que d'autres utilisent un procédé d'extraction sur billes magnétiques. Il en résulte une différence significative de concentrations en ADN et de taille des fragments préférentiellement isolés en fonction du principe utilisé et du kit utilisé (Diefenbach *et al.*, 2018).

L'ADNc pouvant représenter une très faible fraction de l'ADN libre circulant, il est nécessaire de savoir si de l'ADNc est bien présent dans le prélèvement. Pour se faire, certaines équipes utilisent des biomarqueurs de méthylation spécifiques du type de cancer étudié (Bachet *et al.*, 2018).

Afin de pouvoir détecter l'ADNc parmi le bruit de fond apporté par l'ADN libre circulant total, il est nécessaire d'utiliser des techniques de détection des mutations ayant une sensibilité élevée. Deux grandes approches sont disponibles : les techniques ciblées basées sur le principe de la PCR et qui permettent la détection d'une ou plusieurs mutations particulières sur un ou quelques gènes et les techniques non ciblées de séquençage haut débit qui permettent de séquencer l'intégralité d'un ou plusieurs exons pour un panel de gènes (pouvant aller d'une quinzaine de gènes au génome complet) (Franczak *et al.*, 2019). Ces différentes techniques ont des sensibilités différentes et nécessitent donc d'être choisies en fonction du stade de la maladie afin d'être compatibles avec la sensibilité nécessaire (**figure 21**).

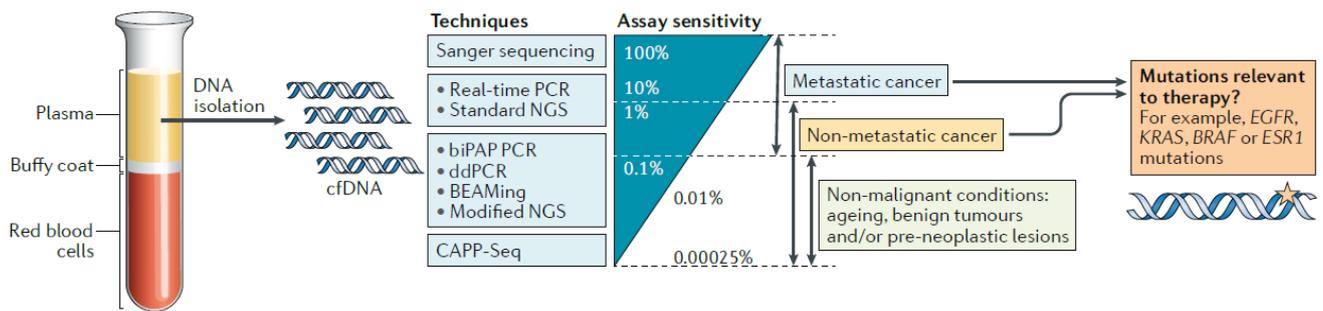


Figure 21 : Principales méthodes de détection des anomalies génétiques de l'ADN tumoral circulant

Ce schéma décrit la sensibilité des principales techniques utilisées pour l'étude de l'ADNtc. Dans les cancers métastatiques, les fréquences alléliques détectables sont élevées et nécessitent des techniques permettant de détecter des mutations entre 1% et 100%. En revanche, en cas de cancer non métastatique ou de lésions dites pré-cancéreuses, les fréquences alléliques sont plus faibles et nécessitent donc des techniques ultrasensibles.

BEAMing, beads-emulsion-amplification-magnetics, technique de PCR sur billes ; biPAP, bidirectional pyrophosphorolysis-activated polymerization ; ddPCR : PCR digitale en émulsion ; NGS, séquençage haut-débit.

(D'après Pantel et Alix-Panabières, 2019)

Les étapes comprises entre le prélèvement sanguin et le rendu des résultats sont donc nombreuses et nécessitent d'être contrôlées et optimisées afin d'obtenir une détection optimale des ADNtc.

1.3.3. Piste d'optimisation : l'ADN lié aux cellules sanguines

L'extraction de l'ADNtc se fait donc classiquement à partir du plasma, après élimination du culot globulaire. Les travaux qui décrivent la présence d'ADNtc à la surface des cellules sanguines laissent donc penser qu'en éliminant le culot globulaire, on éliminerait aussi une partie de l'ADNtc et donc potentiellement une partie de l'ADNtc.

Les études précédemment décrites ont consisté à traiter les échantillons sanguins avec une solution de trypsine ou de PBS-EDTA et à mesurer la concentration globale en ADN circulant. La taille des fragments d'ADN a été rarement évaluée. Si certaines études ont évalué les profils de méthylation de cet ADN, il n'y a pas eu de recherche de mutations ponctuelles spécifiques à certains types de cancers permettant d'affirmer que l'ADN fixé est de l'ADNtc. Enfin, ces études n'ont pas évalué l'utilisation en pratique de cet ADN lié aux cellules pour augmenter la quantité d'ADNtc analysable dans le contexte des biopsies liquides.

1.3.4. Biopsie liquide et mélanome métastatique

Avec 287 723 cas diagnostiqués en 2018, le mélanome cutané représente 1,6% des cancers détectés dans le monde et est responsable de 0,6% des décès liés au cancer (Bray *et al.*, 2018). Le pronostic des mélanomes dépend principalement du stade auquel la pathologie est découverte. Alors que le taux de survie globale est plutôt élevé pour les stades I et II, il diminue drastiquement en cas d'extension locorégionale ou métastatique. L'évaluation du statut mutationnel du gène *BRAF* permet d'orienter le traitement des patients atteints d'un mélanome métastatique et de prescrire un IK anti-BRAF (vémurafénib ou dabrafénib) en association avec un anti-MEK (cobimetinib ou trametinib) en présence d'une mutation sur le codon 600 (Sullivan *et al.*, 2018). La recherche de mutations sur le gène *BRAF* à des fins théranostiques ainsi que la recherche de mutations sur le gène *NRAS* à des fins pronostiques est habituellement réalisée sur une pièce opératoire ou une biopsie tumorale. Dans le champ du mélanome, l'ADNtc a montré son intérêt pour prédire la réponse à la thérapie ciblée, évaluer la réponse au traitement par l'évaluation de la charge tumorale, suivre l'évolution clonale et l'émergence de résistance à la thérapie ciblée (Calapre *et al.*, 2017). Néanmoins, son utilisation en pratique courante n'est pas encore validée et se heurte aux obstacles préanalytiques et analytiques communs aux biopsies liquides dans les contextes tumoraux. Des améliorations dans la prise en charge du prélèvement sont donc nécessaires et une des pistes d'optimisation serait la prise en compte de l'ADN lié aux cellules sanguines. Actuellement, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude publiée sur la répartition ADN libre circulant / ADN lié aux cellules sanguines chez les patients atteints d'un mélanome.

2. OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

Ce projet consiste à évaluer la pertinence de l'utilisation de l'ADN lié aux cellules sanguines pour augmenter la quantité d'ADN tumoral circulant disponible afin d'optimiser la recherche de mutations du gène *BRAF* chez des patients atteints d'un mélanome métastatique. Le protocole sera mis au point sur des prélèvements sanguins issus de sujets sains puis appliqué à des prélèvements issus de patients atteints d'un mélanome métastatique.

Premièrement, nous chercherons à isoler l'ADN présent à la surface des éléments figurés du sang chez des sujets sains et chez des patients atteints d'un mélanome métastatique.

Nous quantifierons et qualifierons ensuite cet ADN afin d'évaluer la taille des fragments et de définir la proportion de fragments de petite taille pouvant correspondre à de l'ADN circulant et celle des fragments de grande taille pouvant correspondre à de l'ADN génomique fragmenté issu des cellules saines.

La troisième étape sera la mise en évidence de l'ADN à la surface des éléments figurés du sang par microscopie à fluorescence.

Enfin, nous évaluerons si le traitement du culot globulaire permettrait d'augmenter la quantité d'ADN tumoral circulant disponible pour les tests de biologie moléculaire.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. Echantillons sanguins

3.1.1. Sang total provenant de sujets sains

Afin de mettre au point notre protocole et d'évaluer l'influence de l'anticoagulant utilisé sur la quantité d'ADN circulant extraite, nous avons travaillé sur du sang total issu de 5 sujets sains, donateurs de sang bénévoles à l'Etablissement Français du Sang et ayant été informés de l'utilisation de leur don à des fins de recherche. Afin d'évaluer l'influence des anticoagulants sur les interactions ADN-cellule, le sang est prélevé sur 3 anticoagulants différents : l'EDTA, anticoagulant calcium dépendant irréversible ; le citrate, anticoagulant calcium dépendant réversible et l'héparine de lithium, anticoagulant calcium indépendant. Pour chaque sujet sain, un tube de 5 mL EDTA BD Vacutainer® (BD, Franklin Lake, Etats-Unis), un tube de 5 mL citrate BD Vacutainer® (BD) et un tube héparine de lithium BD Vacutainer® (BD) ont été prélevés.

La technique de coloration a également été mise au point à partir de prélèvements de donateurs de sang bénévoles à l'Etablissement Français du Sang. Les tubes prélevés sont des tubes EDTA BD Vacutainer® (BD) de 5 mL.

3.1.2. Sang total provenant de patients atteints d'un mélanome métastatique

Les échantillons sanguins proviennent de patients inclus dans l'étude OPTIMEL (NCT03416933). Cette étude multicentrique, coordonnée par l'Institut de Cancérologie de Lorraine, recrute des patients atteints d'un mélanome métastatique et dont le statut mutationnel du gène *BRAF*, obtenu sur biopsie tissulaire, est connu. Seuls les patients avec une mutation V600 du gène *BRAF* sont inclus. L'étude OPTIMEL consiste à étudier l'intérêt d'associer la recherche de l'ADN tumoral circulant au suivi thérapeutique pharmacologique des IK chez des patients atteints d'un mélanome métastatique et traités par l'association dabrafénib et tramétinib. Un prélèvement sanguin est réalisé chez ces patients à différents temps : avant la mise en place d'un traitement par IK (J0), puis à J15, J30, M3, M6, M9, M12 après la mise en place du traitement ou à progression. A chaque temps de prélèvement, un tube EDTA classique BD Vacutainer® (BD) de 10 mL et un tube Cell-free DNA BCT® (Streck, La Vista, Etats-Unis) de 10 mL contenant un stabilisateur de membrane sont prélevés simultanément. Pour faciliter la lecture, ce tube sera nommé tube Streck dans la suite du manuscrit.

3.2. Protocole de traitement des échantillons sanguins

3.2.1. Prise en charge des tubes de sang total

Le protocole de centrifugation du sang total suit le protocole optimal précédemment décrit (El Messaoudi *et al.*, 2013). Le même protocole sera réalisé pour les sujets sains (tube EDTA, citrate et hépariné) et pour les patients inclus dans l'étude OPTIMEL (tube EDTA et tube Streck) (**figure 22**).

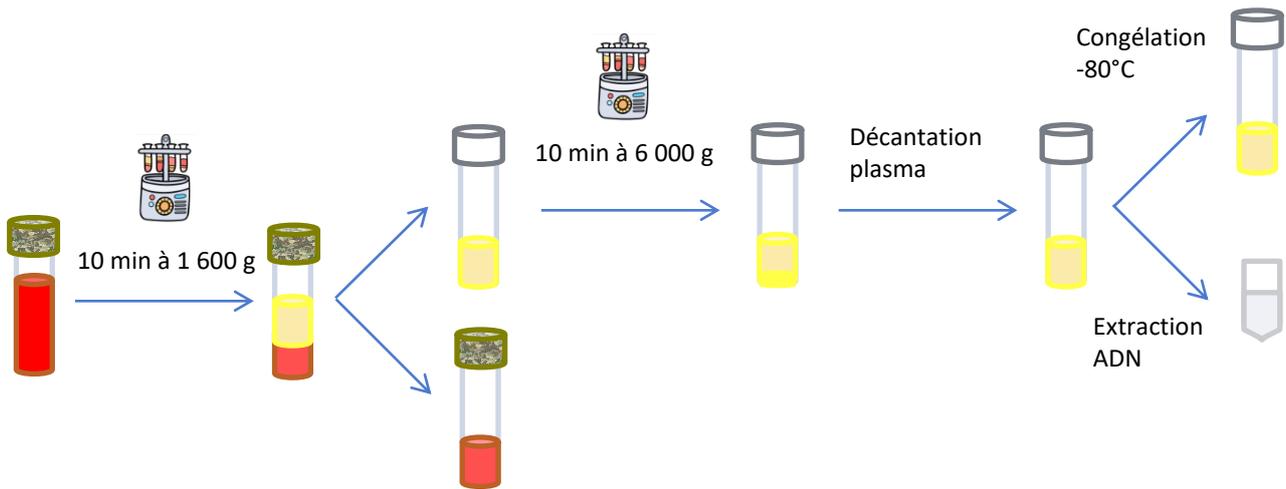


Figure 22 : Protocole de prise en charge d'un tube de sang total pour l'étude de l'ADN circulant

La figure représente le protocole à partir d'un tube Streck. Le même protocole sera réalisé pour le sang total prélevé sur EDTA, citrate ou héparine. Les tubes de sang total sont centrifugés 10 min à 1 600 g. Le plasma est alors décanté puis centrifugé une seconde fois 10 min à 6 000 g. Il est alors utilisé immédiatement pour l'extraction de l'ADN ou congelé à -80°C pour prise en charge ultérieure.

3.2.2. Prise en charge des culots globulaires

Les culots globulaires sont traités en parallèle et de la même manière, quel que soit l'anticoagulant utilisé, chez les sujets sains (tube EDTA, citrate et héparine de lithium) et chez les patients (tube EDTA et tube Streck). Une fois la centrifugation du tube de sang total effectuée et le plasma décanté, le culot globulaire est suspendu dans 2 mL de PBS (Pan-Biotech, Aidenbach, Allemagne). L'ajout de PBS permet de rendre le culot globulaire moins visqueux et plus facile à manipuler. Ce culot est alors réparti à volume égal dans deux tubes : un tube témoin et un tube test.

Trois millilitres de PBS sont ajoutés au tube témoin qui est ensuite homogénéisé et incubé 5 min à température ambiante. Le tube est ensuite centrifugé 10 min à 1 600 g puis le surnageant récupéré dans un cryotube.

Les études précédemment décrites utilisaient une solution de trypsine pour une partie du culot et une solution de PBS-EDTA pour l'autre partie du culot (Laktionov *et al.*, 2004). Sur le même principe, mais afin de rompre simultanément les liaisons protéiques et les liaisons ioniques qui lient l'ADN aux cellules, on utilise pour le tube test une solution combinée de trypsine-EDTA (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Après ajout de 3 mL de solution de trypsine-EDTA, le tube est homogénéisé, incubé 5 min à température ambiante puis centrifugé 10 min à 1 600 g. Le surnageant est ensuite récupéré dans un cryotube (**figure 23**).

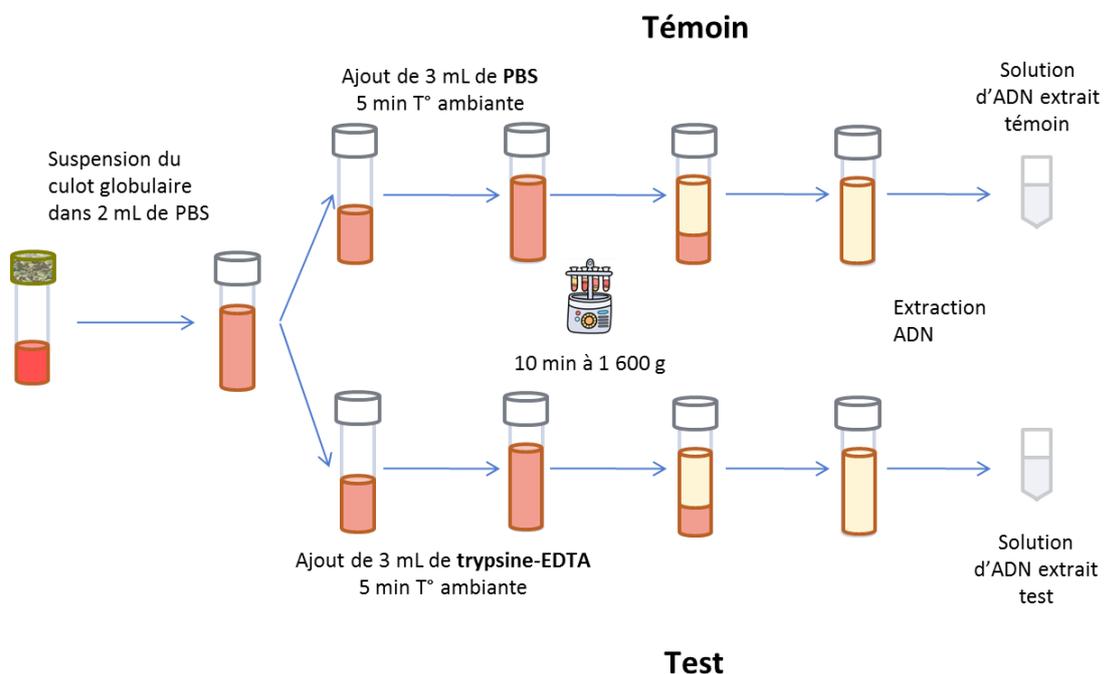


Figure 23 : Protocole de traitement des culots globulaires

La figure représente le protocole à partir d'un culot globulaire issu du tube Streck. Le même protocole sera réalisé pour les culots globulaires issus des tubes EDTA, citrate et héparine. Après ajout de 2 mL de PBS dans le tube contenant le culot globulaire, le contenu est réparti à volume égal dans deux tubes. Le premier tube dit « témoin » est incubé pendant 5 min avec 3 mL de PBS et le deuxième tube dit « test » est incubé pendant 5 minutes avec 3 mL d'une solution de trypsine-EDTA. Après incubation, les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 1 600 g. Le surnageant est ensuite récupéré pour en extraire l'ADN.

3.3. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir des plasmas et des surnageants des culots témoins et tests avec le kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon le protocole commercial. Il s'agit d'une extraction sur colonne en 4 étapes : lyse, liaison, lavage et élution.

Les acides nucléiques étant habituellement liés à des protéines plasmatiques ou enveloppés dans des vésicules, une étape de lyse est nécessaire pour libérer les acides nucléiques. Les échantillons sont incubés à haute température (60°C) en présence de protéinase K et d'un premier tampon pour permettre l'inactivation des DNases, des RNases et la libération complète des acides nucléiques liés aux protéines, aux lipides et aux vésicules. Un réactif présent dans le kit, le carrier RNA est ajouté au tampon de lyse afin d'augmenter le rendement d'extraction (Shaw KJ *et al.*, 2009).

Les échantillons sont ensuite incubés sur glace avec un second tampon qui permet d'obtenir des conditions optimales pour la liaison des acides nucléiques à la membrane de la colonne. Les lysats sont alors transférés dans des colonnes reliées à une pompe exerçant une pression de -800 mbar. C'est à cette étape que les acides nucléiques vont se fixer sur la membrane en silice de la colonne. Selon les données fournisseur, les colonnes peuvent retenir des acides nucléiques de petite taille jusqu'à 20 paires de bases.

Trois étapes de lavage (à l'aide de deux tampons successifs puis d'éthanol) permettent d'éliminer tous les contaminants résiduels et de garder uniquement les acides nucléiques sur la colonne.

La dernière étape consiste à éluer les acides nucléiques à l'aide de 40 µL de tampon d'élution. Les colonnes sont incubées 3 min à température ambiante puis centrifugées 1 min à 20 000 g afin d'éluer l'ADN. Le volume d'élution est repris puis redéposé sur la membrane. Suite à une nouvelle étape d'incubation de 3 min, une centrifugation 1 min à 20 000 g permet de récupérer l'ADN extrait dans un volume de 40 µL.

3.4. Dosage de l'ADN extrait

Le dosage de l'ADN extrait est réalisé à l'aide du fluoromètre Qubit® 3.0 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis) associé au kit Qubit® dsDNA HS Assay (ThermoFisher) qui permet de détecter des concentrations en ADN allant de 0,01 à 100 ng/µL. La fluorimétrie fait intervenir un fluorophore se liant spécifiquement à l'ADN double brin. Celui-ci émet un signal ayant une longueur d'onde de plus de 500 nm et d'intensité proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans l'échantillon. Le dosage est réalisé à partir d'1 µL de solution d'ADN extrait.

3.5. Traitement statistique des résultats

Les figures et les tests statistiques ont été réalisés avec les modules ggplot et ggpubr du logiciel R (R Core Team, 2019). Le calcul de la p-value est réalisé avec un test de Wilcoxon pour les boxplots qui comparent deux séries de données et avec un test ANOVA pour les comparaisons multiples (plus de 2 séries de données).

3.6. Comparaison de deux gels pour la qualification des ADN

La taille des fragments d'ADN est évaluée avec le Fragment Analyzer[®] (Agilent, Santa Clara, Californie, États-Unis). Cet instrument possède un réseau de 12 capillaires permettant la réalisation simultanée de 12 profils électrophorétiques. Au cours de l'électrophorèse, les fragments d'acides nucléiques de l'échantillon migrent en se couplant à l'agent intercalant qui se fixe entre les bases de l'ADN. Les fragments se séparent en fonction de leur taille et une fenêtre de détection, présente en fin de capillaire, permet d'exciter l'agent intercalant par une lumière continue. Il en résulte une émission de fluorescence détectée et mesurée par une caméra.

Le temps nécessaire aux fragments pour arriver à la fenêtre de détection est proportionnel à leur taille et l'intensité du signal d'émission indique la concentration des échantillons. Un calibrant appelé ladder permet d'étalonner l'appareil et des standards internes permettent d'évaluer la taille des fragments et leur concentration.

Le Fragment Analyzer[®] a une haute sensibilité et permet de détecter des concentrations en ADN jusqu'à 5 pg/ μ L. Il existe plusieurs gels permettant de détecter les fragments dans des fourchettes différentes. Le gel DNF-464 HS Large Fragment 50kb Analysis Kit (Agilent) permet de faire migrer des fragments de tailles comprises entre 0 et 20 000 paires de bases. Ce gel permet donc théoriquement de visualiser à la fois les petits fragments (aux alentours de 150 paires de bases) qui vont correspondre à de l'ADN circulant ainsi que des fragments de plus grande taille (aux alentours de 6 000 paires de bases) qui vont correspondre à de l'ADN génomique fragmenté issu de la dégradation des cellules saines. Le gel DNF-477 High Sensitivity Small Fragment Analysis Kit (Agilent) permet de faire migrer des fragments allant de 1 à 1 500 paires de bases.

Dans un premier temps, les profils des ADN extraits à partir des plasmas des sujets sains seront réalisés sur les deux types de gels afin de pouvoir les comparer. Le gel permettant la meilleure visualisation des fragments sera retenu pour la suite des expérimentations.

3.7. Recherche d'anomalies caractéristiques de l'ADN tumoral circulant

3.7.1. Recherche de mutations du gène *BRAF* dans le plasma par une plateforme automatisée de PCR en temps réel

La recherche de mutations sur le gène *BRAF* dans le plasma des patients inclus dans l'étude OPTIMEL est réalisée par une plateforme automatisée de PCR en temps réel. La plateforme Idylla[®] (Biocartis, Mechelen, Belgique) est basée sur un système de cartouches à usage unique qui contiennent tous les réactifs nécessaires à la PCR. Les cartouches utilisées sont des cartouches ctNRAS-BRAF conçues pour détecter 18 mutations situées sur le gène *NRAS* et 5 mutations situées sur le codon 600 du gène *BRAF* à partir d'1 mL de plasma. Un millilitre de plasma est inséré directement dans la cartouche à usage unique qui est ensuite scellée et insérée dans la console. L'ADN tumoral circulant présent dans le plasma est alors amplifié par PCR en temps réel. Un système de détection de fluorophore couplé à une analyse automatique des courbes de PCR par la console permet de déterminer la présence ou l'absence d'une mutation (Harlé *et al.*, 2016).

3.7.2. Recherche de mutations du gène *BRAF* sur l'ADN extrait des plasmas et des surnageants témoins et tests par la technique de PCR digitale en émulsion

La technique de PCR digitale en émulsion ou droplet digital PCR (ddPCR) se base sur les principes de dilution limite, de PCR en point final et sur la loi de Poisson afin de permettre une quantification absolue de l'ADN. La technique de ddPCR intègre les 5 étapes suivantes : préparation des échantillons pour la PCR, production des gouttelettes, réalisation de la PCR, lecture des gouttelettes et analyse des résultats (**figure 24**) (Hindson *et al.*, 2011).

La première étape consiste à préparer une plaque 96 puits contenant les échantillons dans le mélange réactionnel. Entre 1 μ L et 10 μ L d'ADN sont utilisés dans chaque puits (un échantillon par puits). On ajoute à l'ADN 11 μ L de Supermix (BioRad, Hercules, Californie, États-Unis), 1 μ L de solution contenant les amorces et les sondes fluorescentes (BioRad) ainsi que de l'eau ppi pour atteindre un volume final de 22 μ L par puits. En plus des échantillons à tester, chaque plaque contient un blanc (10 μ L d'eau ppi à la place de l'échantillon d'ADN) et un témoin positif (témoin Oncospan (Amplitech, Compiègne, France) avec une mutation *BRAF* V600E à 10%). Dans le cadre de notre étude, le kit utilisé permet de rechercher la mutation V600E du gène *BRAF*.

Après préparation de la plaque, celle-ci est insérée dans l'automate « Automated Droplet Generator » (BioRad) qui génère automatiquement l'émulsion. Cette étape permet

de diviser le contenu de chaque puits en gouttelettes d'un volume de l'ordre du nanolitre. Environ 20 000 gouttelettes sont générées par puits.

L'étape de PCR est ensuite réalisée dans un thermocycleur C1000 Touch[®] Thermal Cycler (BioRad).

Après la PCR, la plaque est chargée dans le lecteur QX200 Droplet Reader (BioRad). Le lecteur isole chaque gouttelette et un détecteur deux couleurs permet de déterminer quelles gouttelettes contiennent les cibles et lesquelles ne les contiennent pas. Entre 15 000 et 18 000 gouttelettes sont lues par puits. Le fluorochrome FAM est associé à la sonde qui cible la mutation V600E alors que le fluorochrome HEX est associé à la sonde qui cible l'allèle sauvage ou wild-type (WT).

Enfin, les résultats sont analysés par le logiciel QuantaSoft (BioRad). La lecture avec le mode RED (rare events detection) permet de calculer le % de mutants détectés par rapport à la quantité d'ADN WT.

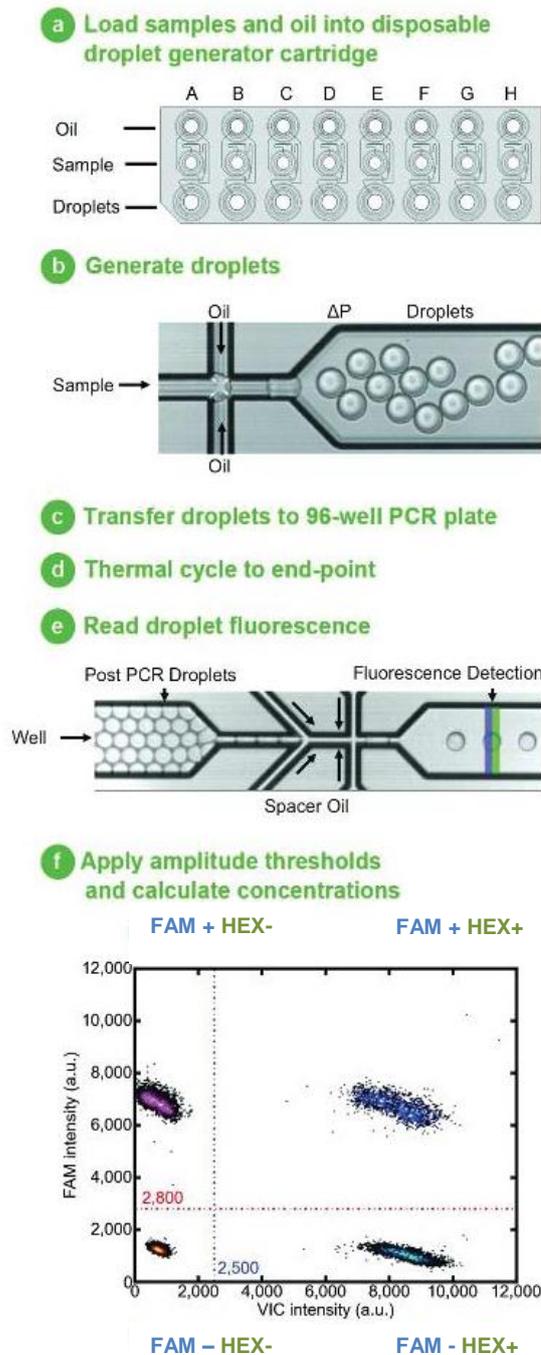


Figure 24 : Principe de la PCR digitale en émulsion

a : Les échantillons sont disposés avec le mix de PCR et les sondes dans une plaque 96 puits (un échantillon par puits).

b : L'échantillon et l'huile à émulsion sont mis en contact dans un générateur de gouttelettes.

c : Les gouttelettes générées sont récupérées dans une plaque 96 puits. Chaque gouttelette contient 0, 1 ou quelques fragments d'ADN.

d : Une PCR en point final est réalisée afin d'amplifier les fragments d'ADN présents dans chaque gouttelette. Une gouttelette réagit comme un mini-réacteur indépendant des autres.

e : Chaque gouttelette est lue une par une afin d'évaluer sa fluorescence.

f : L'analyse est ensuite effectuée par un logiciel. (D'après Hindson *et al.*, 2011)

3.8. Séparation des différents types de cellules sanguines et coloration de l'ADN

Afin d'évaluer à quels types de cellules l'ADN se fixe préférentiellement, les différents éléments figurés du sang sont séparés à partir de sang total prélevé sur EDTA. Les plaquettes sont obtenues par une méthode de centrifugation douce (10 min à 170 g) permettant d'obtenir du plasma riche en plaquettes. Les cellules mononucléées sont isolées après séparation sur coussin de Ficoll[®]. Afin de séparer les leucocytes des hématies sans les altérer, le tube de sang sera centrifugé à 820 g pendant 10 min. Après retrait de la couche de leucocytes, les hématies seront étalées en frottis mince sur une lame. Les frottis sont d'abord fixés à l'éthanol puis on ajoute par recouvrement 1 mL de colorant Hoechst 33342 10 μ M (ThermoFisher). Les lames sont incubées 30 min à 37°C puis rincées avec du PBS. Les frottis sont ensuite observés en microscopie à fluorescence (**figure 25**).

Le colorant Hoechst (longueur d'onde d'excitation maximale 346 nm, longueur d'onde d'émission 460 nm) colore spécifiquement l'ADN.

Afin d'évaluer la sensibilité du colorant Hoechst pour la détection de fragments d'ADN de petite taille, un témoin sera créé. Cinquante nanogrammes d'ADN circulant témoin (EGFR multiplex témoin Horizon, Amplitech) seront ajoutés à 2 mL de plasma commercial (S4180-500, Dutscher, Brumath, France). Dix microlitres de plasma seront alors déposés sur une lame (frottis et goutte) puis fixés à l'éthanol pour ensuite être colorés en suivant le même protocole que celui des frottis cellulaires.

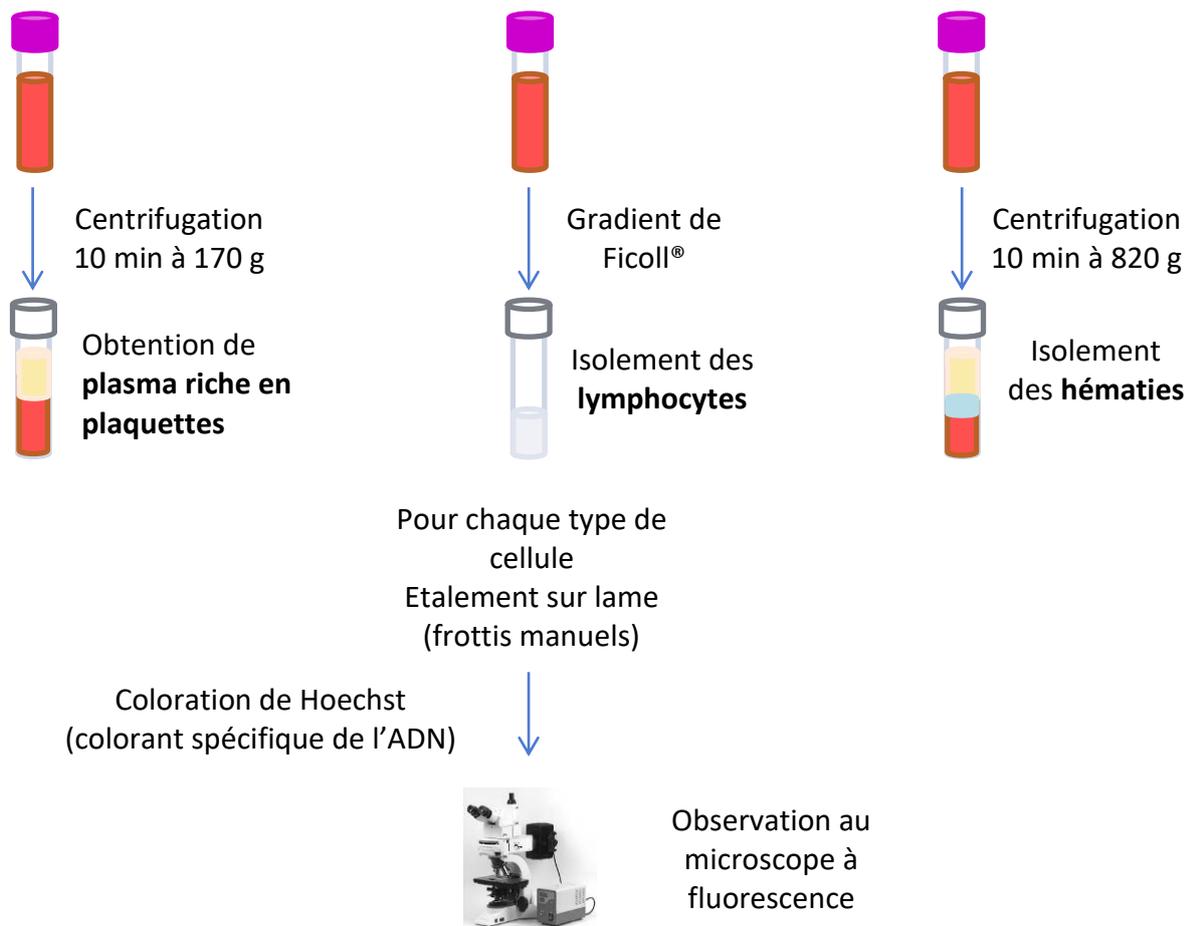


Figure 25 : Protocole de séparation des lignées cellulaires et coloration de l'ADN

Les plaquettes sont isolées après centrifugation douce du sang total, les lymphocytes sur coussin de Ficoll® et les hématies après un protocole de centrifugation permettant de retirer les cellules mononucléées sans altérer les hématies. Des frottis sont ensuite réalisés puis marqués par le colorant Hoechst pour mettre en évidence l'ADN présent à la surface des cellules.

4. RESULTATS

4.1. Choix du gel pour la migration des fragments

Le profil de fragmentation de l'ADN extrait du plasma issu du tube héparine du sujet sain 1 a été évalué avec deux gels. Le profil obtenu avec le gel DNF-477 HS Small Fragment (**figure 26a, courbe noire**) met en évidence un seul pic situé aux alentours de 150 paires de bases et qui correspond à de l'ADN libre circulant. Le profil obtenu avec le gel DNF-464 HS Large Fragment met en évidence trois pics (**figure 26b, courbe noire**). Un premier pic autour de 150 paires de bases et qui correspond à de l'ADN libre circulant. Il s'agit du même pic que celui observé avec le gel 477 mais on obtient une meilleure résolution avec le gel 464. Un second pic, situé aux alentours de 10 000 paires de bases correspond à de l'ADN génomique fragmenté et reflète la contamination de l'échantillon par de l'ADN issu des leucocytes présents dans le prélèvement. Il n'est pas visible sur le gel 477 car celui-ci détecte les fragments jusqu'à 1 500 paires de bases seulement. L'autre pic surnuméraire, situé autour de 355 paires de bases aurait par contre dû être détecté par le gel 477. Après des recherches bibliographiques, il apparaît que le carrier RNA, utilisé lors de la première étape d'extraction, peut interférer lors de la migration sur le gel 464, il en résulte un pic anormal qui est absent des profils réalisés avec le gel 477 (Pocernich *et al.*). Nous avons testé l'extraction sans carrier RNA sur le plasma hépariné du sujet sain 5. Le profil obtenu avec le gel 477 est inchangé, mettant toujours en évidence un petit pic d'ADN libre circulant de 150 paires de bases (**figure 26a, courbe bleue**). Le pic surnuméraire à 355 paires de bases est par contre absent du profil sur le gel 464 ce qui confirme bien l'interférence du carrier RNA (**figure 26b courbe bleue**). L'omission de ce réactif n'affectant pas significativement le rendement d'extraction, il a donc été décidé, pour les échantillons qui n'étaient pas encore extraits, de réaliser le protocole sans carrier RNA. Les profils ont ensuite été réalisés sur le gel DNF-464 HS Large Fragment pour sa meilleure résolution du pic d'ADN circulant et pour sa capacité à évaluer la contamination par de l'ADN génomique fragmenté.

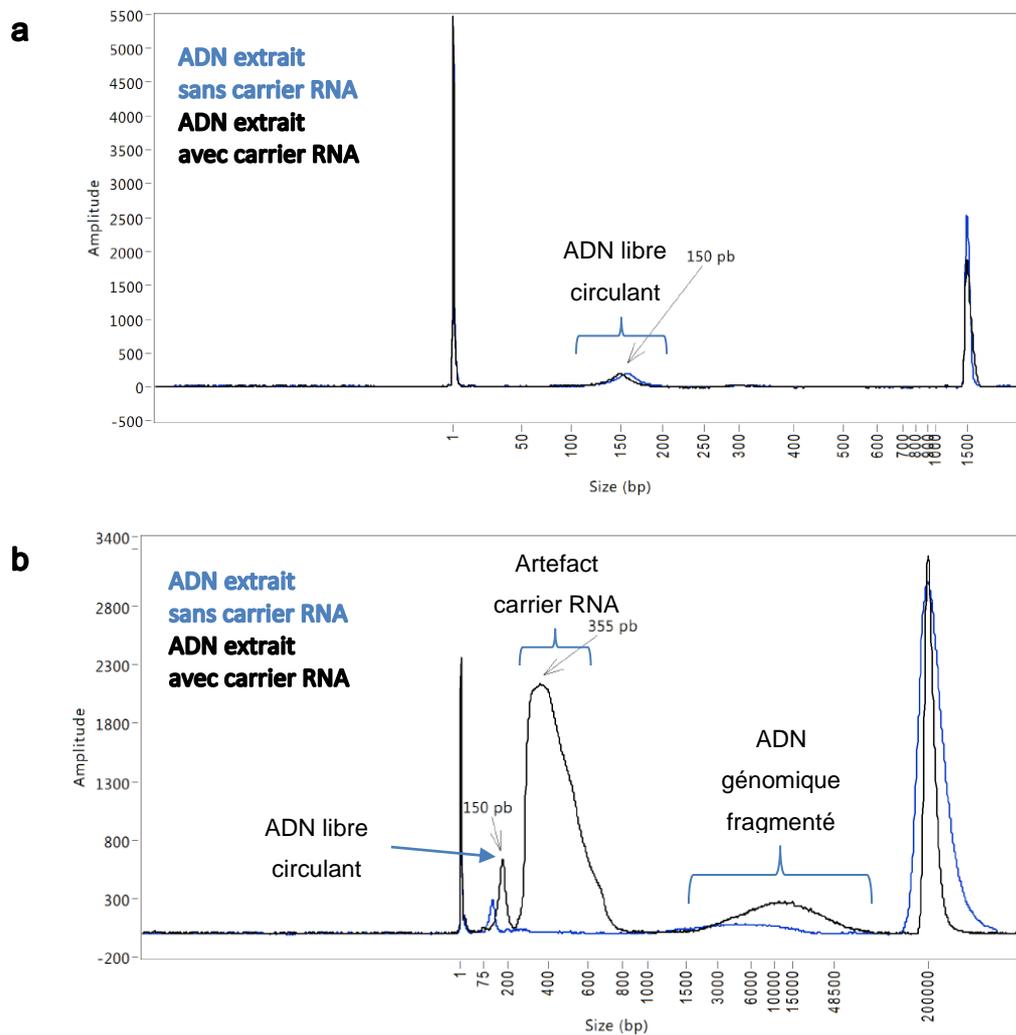


Figure 26 : Profils obtenus avec le gel DNF-477 HS Small Fragment et avec le gel DNF-464 HS Large Fragment après extraction avec ou sans carrier RNA

a : Avec le gel 477, un seul pic est détectable sans (courbe bleue) ou avec (courbe noire) carrier RNA.

b : Avec le gel 464, on observe un pic surnuméraire quand l'ADN est extrait sans carrier RNA (courbe bleue) et deux pics surnuméraires s'il est extrait avec le carrier RNA (courbe noire). Le pic situé aux alentours de 10 000 paires de bases correspond à de l'ADN génomique fragmenté. Le pic surnuméraire observé autour de 355 paires de bases, absent du profil avec le gel 477, correspond à une interférence entre le carrier RNA et le gel 464.

4.2. Profils et concentrations obtenus après extraction de l'ADN à partir des plasmas EDTA, citrate et héparine des sujets sains

L'ADN a été extrait à partir de 2 mL de plasma issus des prélèvements sur tube EDTA, citrate, et héparine de 5 sujets sains. Au total 15 extraits d'ADN ont été analysés. Les concentrations en ADN mesurées avec le fluorimètre Qubit[®] se situent entre 0,16 et 0,46 ng/μL pour les extraits issus des plasmas EDTA, entre 0,26 et 1,86 ng/μL pour les extraits issus des plasmas citrate et entre 0,53 et 4,66 ng/μL pour les extraits issus des plasmas héparine. Les profils de fragmentation de l'ADN ont été réalisés pour chacun des 15 extraits. Pour chaque sujet sain, les profils des ADN extraits de chaque type de tube ont été superposés, pour comparaison (**figure 27**). Pour chaque sujet sain, on observe un pic autour de 150 paires de bases correspondant à l'ADN libre circulant, et ce quel que soit le type d'anticoagulant utilisé. Néanmoins, l'amplitude de chaque pic, qui reflète la concentration en ADN, semble varier en fonction de l'anticoagulant utilisé.

Les profils obtenus après extraction de l'ADN du plasma prélevé sur héparine (**figure 27, courbes rouges**) mettent en évidence un pic supplémentaire autour de 10 000 paires de bases correspondant à de l'ADN génomique fragmenté chez tous les sujets sains. Une contamination similaire est observée à partir du plasma citrate du sujet sain 4 (**figure 27d, courbe bleue**).

Pour les échantillons 1 à 3, extraits avec du carrier RNA, on observe un troisième pic correspondant à l'artefact du carrier RNA (**figure 27a, b et c**).

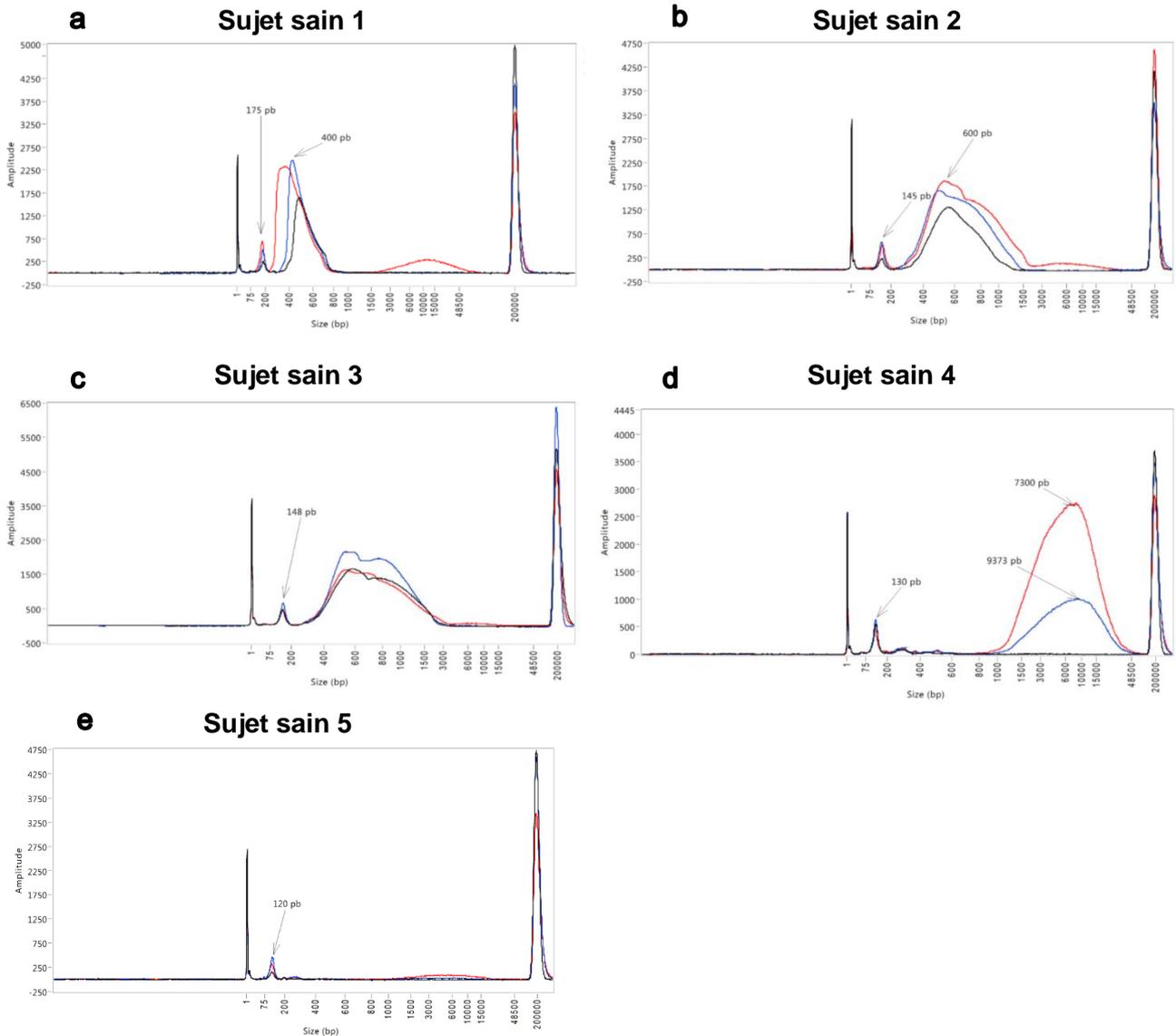


Figure 27 : Profils obtenus avec le gel DNF-464 après extraction de l'ADN du plasma des 5 sujets sains

Cette figure représente les profils obtenus après extraction de l'ADN du plasma prélevé sur EDTA (courbes noires), citrate (courbes bleues) et héparine (courbes rouges) pour chaque sujet sain. On observe, quel que soit l'anticoagulant utilisé, la présence d'ADN libre circulant (pic autour de 150 paires de bases) et ce pour tous les sujets sains. L'amplitude du pic, qui reflète la concentration en ADN, semble différer en fonction de l'anticoagulant utilisé.

Un second pic (entre 3 000 et 15 000 paires de bases), correspondant à de l'ADN génomique fragmenté, est présent uniquement dans le plasma issu du tube héparine des sujets sains 1, 2, 4 et 5 et dans le plasma issu du tube citrate du sujet sain 4.

Un pic supplémentaire aux alentours de 300 paires de bases, décrit précédemment comme étant un artefact lié à l'utilisation du carrier RNA, est observé sur les profils des sujets sains 1 à 3.

La concentration mesurée par le fluoromètre Qubit® représente donc la concentration totale en ADN extrait mais ne nous permet pas de distinguer l'ADN circulant de l'ADN génomique fragmenté qui correspond à de la contamination lors de la prise en charge du prélèvement. Nous avons donc quantifié, grâce au logiciel d'analyse des fragments, chacun des pics d'ADN circulant et d'ADN génomique fragmenté. Chez les 5 sujets sains étudiés, les concentrations en ADN circulant dans les prélèvements EDTA se situent entre 0,05 et 0,33 ng/μL sans ADN génomique fragmenté. Pour les prélèvements sur citrate, les concentrations se situent entre 0,10 et 0,41 ng/μL sans ADN génomique fragmenté sauf pour le sujet sain 4 (3,13 ng/μL). Pour les prélèvements sur héparine, l'ADN circulant est présent entre 0,13 et 0,26 ng/μL avec une contamination par de l'ADN génomique fragmenté allant de 0,06 à 8,60 ng/μL (**figure 28**). On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN libre circulant mesurées à partir des différents anticoagulants (**figure 28a**). En revanche, la différence est significative ($p=0,0075$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté dans les tubes EDTA et dans les tubes héparinés (**figure 28b**).

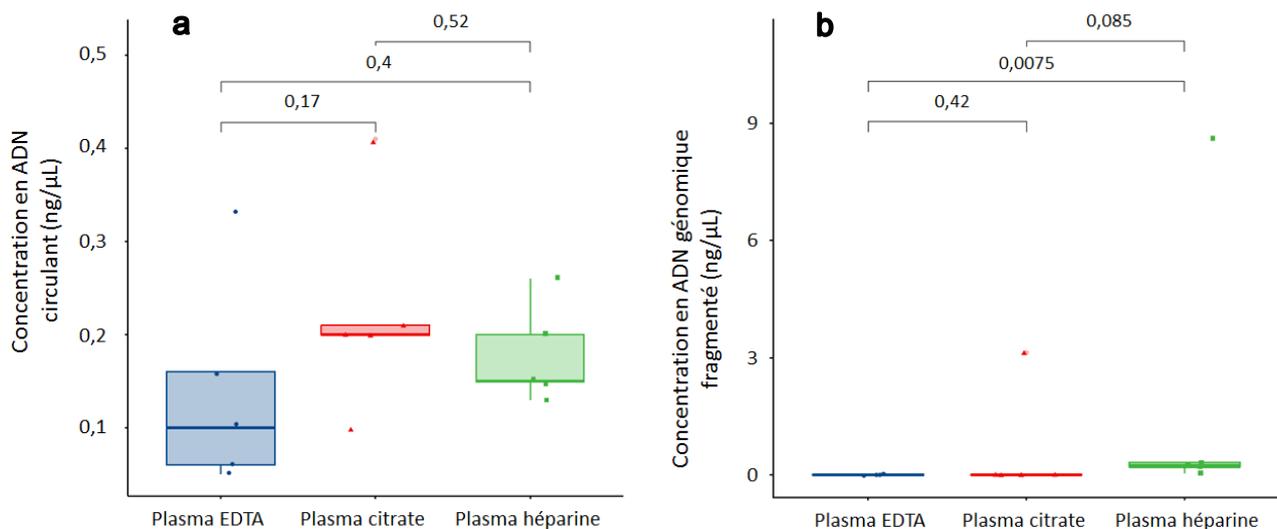


Figure 28 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues chez 5 sujets sains après extraction à partir du plasma prélevé sur un tube EDTA, citrate ou héparine

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues après extraction à partir des plasmas issus des 3 anticoagulants.

b : On observe une différence significative ($p=0,0075$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des plasmas EDTA et des plasmas héparine.

4.3. Profils et concentrations obtenus après extraction de l'ADN à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains

Le traitement des 15 culots globulaires des sujets sains a permis d'obtenir 30 échantillons d'ADN : 15 extraits d'ADN issus des surnageants témoins traités avec du PBS et 15 extraits d'ADN issus des surnageants tests traités avec la solution de trypsine-EDTA. Les profils obtenus après extraction de l'ADN des surnageants des culots globulaires sont comparables à ceux obtenus dans le plasma.

4.3.1. Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur EDTA

Les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des surnageants des culots EDTA sont comprises entre 0,03 et 0,10 ng/ μ L pour les tubes témoins et entre 0,01 et 0,18 ng/ μ L pour les tubes tests. Les concentrations en ADN génomique fragmenté sont quant à elles comprises entre 0,75 et 2,76 ng/ μ L pour les tubes témoins et entre 0,40 et 11,60 ng/ μ L pour les tubes tests. Les concentrations obtenues ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les tubes témoins et les tubes tests que ce soit pour l'ADN circulant (**figure 29a**) ou pour l'ADN génomique fragmenté (**figure 29b**).

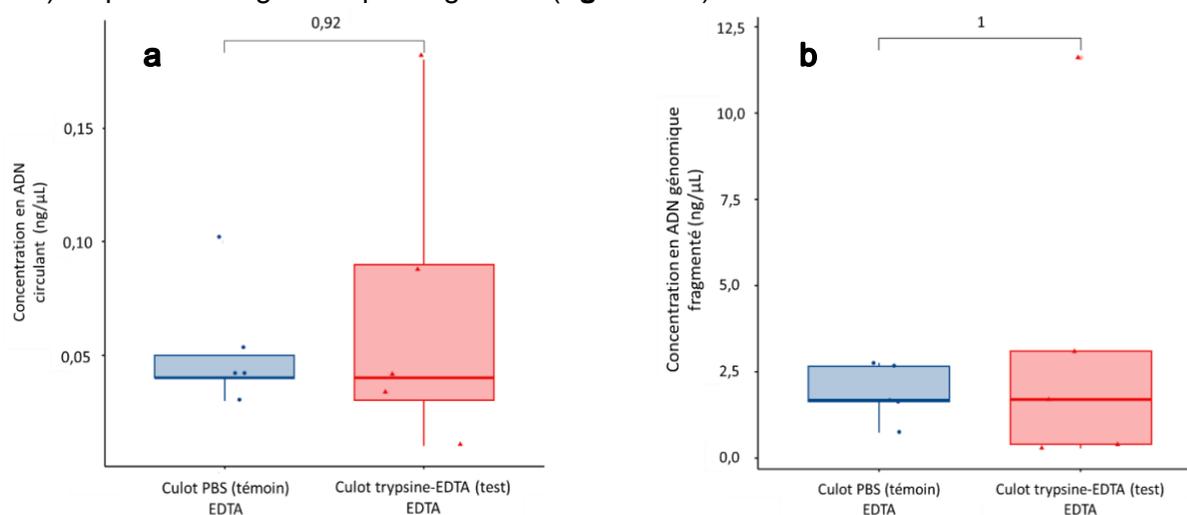


Figure 29 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube EDTA

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues après extraction des surnageants des culots EDTA témoins et tests.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des surnageants des culots EDTA témoins et tests.

4.3.2. Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur citrate

Les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des surnageants des culots citrate sont comprises entre 0,02 et 0,06 ng/μL pour les tubes témoins et entre 0 et 0,11 ng/μL pour les tubes tests. Les concentrations en ADN génomique fragmenté sont quant à elles comprises entre 0,09 et 3,86 ng/μL pour les tubes témoins et entre 0,12 et 3,85 ng/μL pour les tubes tests. Les concentrations obtenues ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les tubes témoins et les tubes tests que ce soit pour l'ADN circulant (**figure 30a**) ou pour l'ADN génomique fragmenté (**figure 30b**).

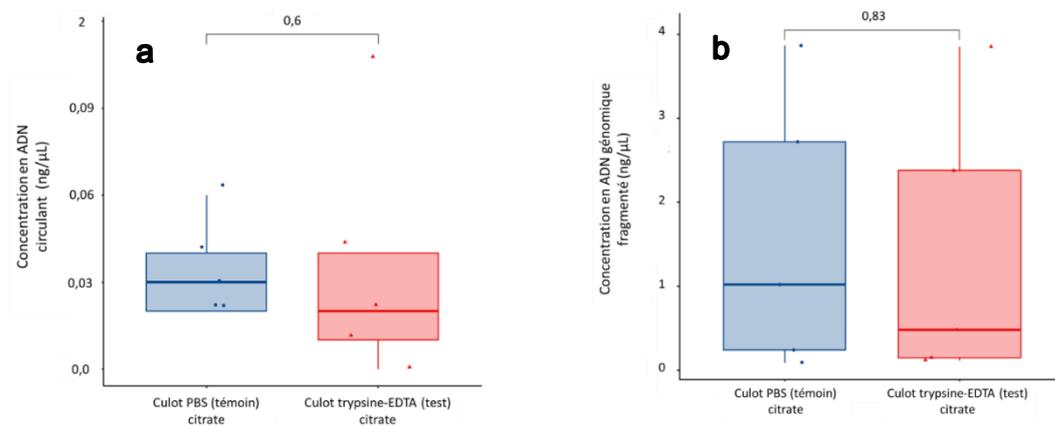


Figure 30 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube citrate

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues après extraction des surnageants des culots citrate témoins et tests.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des surnageants des culots citrate témoins et tests.

4.3.3. Concentrations obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests prélevés sur héparine

Les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des surnageants des culots héparine sont comprises entre 0 et 0,07 ng/μL pour les tubes témoins et entre 0,02 et 0,06 ng/μL pour les tubes tests. Les concentrations en ADN génomique fragmenté sont quant à elles comprises entre 0,32 et 1,82 ng/μL pour les tubes témoins et entre 0,13 et 1,41 ng/μL pour les tubes tests. Les concentrations obtenues ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) entre les tubes témoins et les tubes tests que ce soit pour l'ADN circulant (**figure 31a**) ou pour l'ADN génomique fragmenté (**figure 31b**).

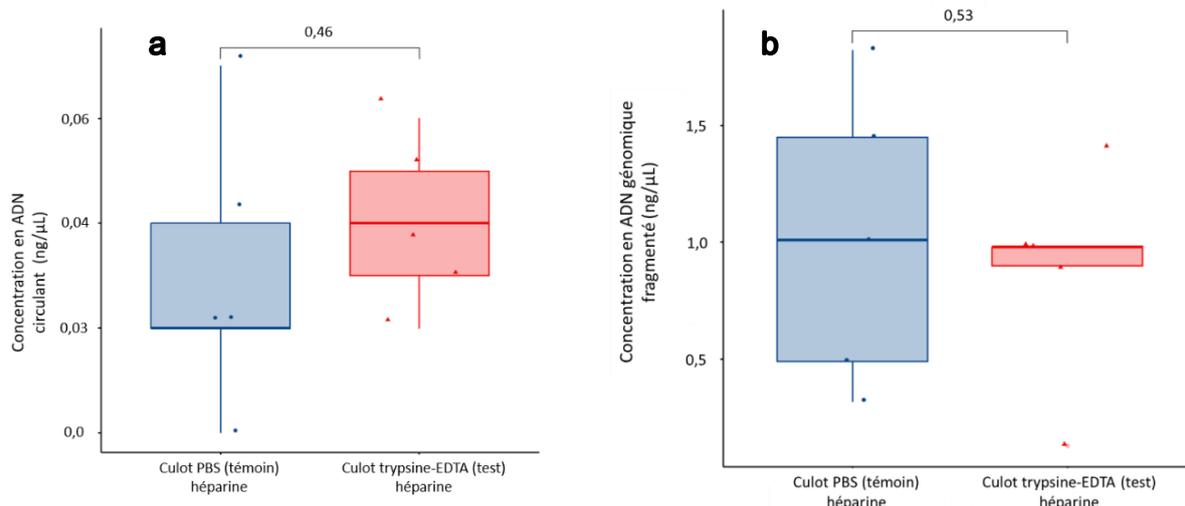


Figure 31 : Concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests des sujets sains prélevés sur tube héparine

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues après extraction des surnageants des culots héparine témoins et tests.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des surnageants des culots héparine témoins et tests.

4.3.4. Comparaison des concentrations obtenues dans les culots témoins et tests en fonction de l'anticoagulant

Les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des culots témoins prélevés sur les 3 anticoagulants ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) (**figure 32a**). Il en est de même pour les ADN circulants des culots tests ($p > 0,05$) (**figure 32b**) et pour les ADN génomiques fragmentés des culots témoins ($p > 0,05$) (**figure 32c**) et tests ($p > 0,05$) (**figure 32d**).

Le **tableau II** résume les concentrations obtenues pour chaque échantillon.

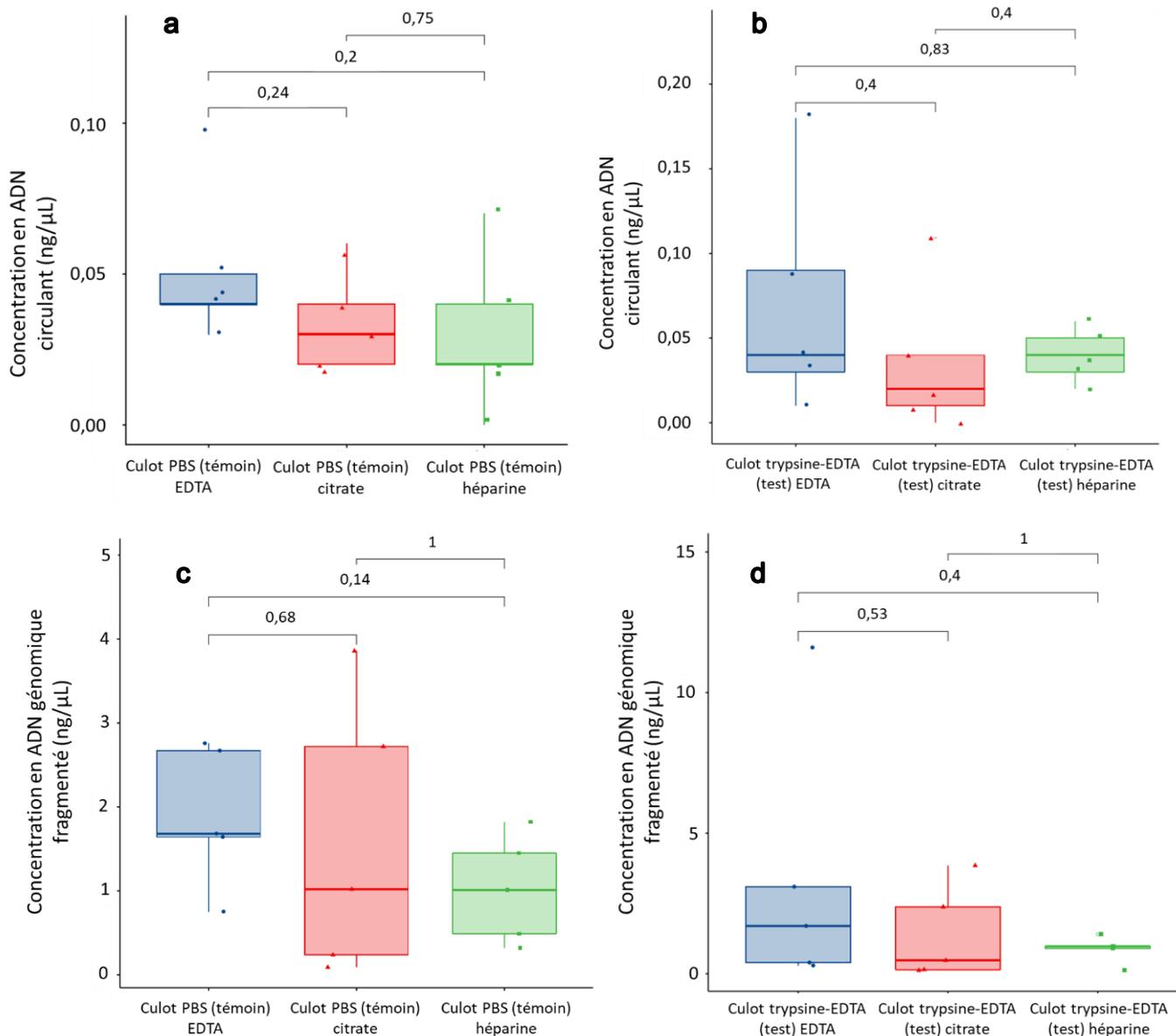


Figure 32 : Comparaison des concentrations en ADN circulant obtenues sans (a) ou avec (b) traitement par la solution de trypsin-EDTA et comparaison des concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues sans (c) ou avec (d) traitement par la solution de trypsin-EDTA en fonction de l'anticoagulant utilisé chez 5 sujets sains

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant extrait des surnageants des culots témoins quel que soit l'anticoagulant utilisé.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant extrait des surnageants des culots tests quel que soit l'anticoagulant utilisé.

c : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté extrait des surnageants des culots témoins quel que soit l'anticoagulant utilisé.

d : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté extrait des surnageants des culots tests quel que soit l'anticoagulant utilisé.

Tableau II : Concentrations (en ng/ μ L) en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction à partir du plasma et des surnageants des culots globulaires témoins et tests des prélèvements sur tube EDTA, citrate et héparine de 5 sujets sains

		EDTA		Citrate		Héparine	
		ADN circulant	ADN génomique fragmenté	ADN circulant	ADN génomique fragmenté	ADN circulant	ADN génomique fragmenté
Sujet sain 1	Plasma	0,05	0,00	0,10	0,00	0,13	0,32
	Culot témoin	0,04	1,68	0,02	0,24	0,02	0,32
	Culot test	0,04	1,70	0,01	0,15	0,02	0,98
Sujet sain 2	Plasma	0,10	0,00	0,20	0,00	0,20	0,20
	Culot témoin	0,04	0,75	0,02	0,09	0,07	1,45
	Culot test	0,03	0,29	0,04	0,12	0,06	0,98
Sujet sain 3	Plasma	0,16	0,00	0,20	0,00	0,15	0,06
	Culot témoin	0,10	2,76	0,04	1,02	0,02	0,49
	Culot test	0,09	3,10	0,11	2,38	0,04	0,90
Sujet sain 4	Plasma	0,33	0,00	0,41	3,13	0,26	8,60
	Culot témoin	0,05	1,64	0,06	3,86	0,04	1,82
	Culot test	0,18	11,60	0,02	0,48	0,05	0,13
Sujet sain 5	Plasma	0,06	0,00	0,21	0,00	0,15	0,25
	Culot témoin	0,03	2,67	0,03	2,72	0,00	1,01
	Culot test	0,01	0,40	0,00	3,85	0,03	1,41

4.4. Essais de coloration pour la mise en évidence de l'ADN à la surface des cellules

La coloration de Hoechst, effectuée sur des frottis témoins de plasma contenant de l'ADN mimant l'ADN tumoral circulant n'a pas permis de mettre en évidence ces fragments. La coloration effectuée sur les leucocytes après séparation sur gradient de Ficoll[®] permet de mettre en évidence l'ADN des noyaux des leucocytes (**figure 33a**). Néanmoins, la résolution est insuffisante pour pouvoir distinguer la présence d'ADN en dehors des noyaux des leucocytes.

Le deuxième test, effectué sur un frottis de globules rouges ne montre aucune fluorescence sur le tapis de globules rouges situé au fond du frottis. On observe néanmoins quelques noyaux fluorescents, correspondant à la contamination du culot de globules rouges par quelques leucocytes (**figure 33b**).

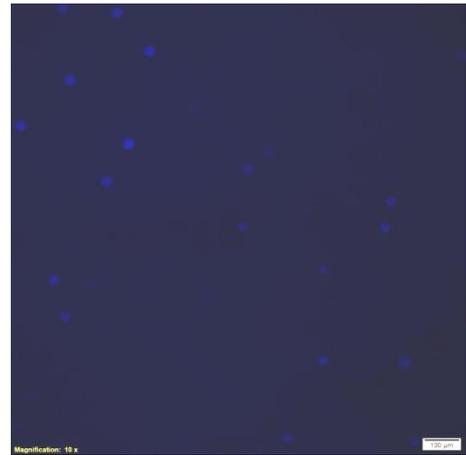
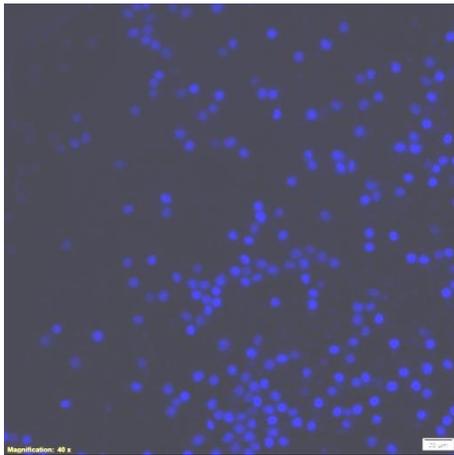


Figure 33 : Observation microscopique (x40) des leucocytes isolés sur un gradient de Ficoll® (a) et observation microscopique d'un frottis de globules rouges (b) après coloration au Hoechst

a : La coloration met en évidence les noyaux des leucocytes.

b : La coloration met en évidence la présence de quelques leucocytes.

4.5. Profils et concentrations obtenus à partir des prélèvements des patients atteints d'un mélanome métastatique

Les prélèvements de 8 patients inclus dans l'étude OPTIMEL ont été utilisés pour notre projet. Au total 26 culots globulaires issus de tubes EDTA, 6 plasmas issus de tubes Streck et 27 culots globulaires issus de tubes Streck ont été traités (**tableau III**).

Tableau III : Détail des prélèvements OPTIMEL utilisés pour ce projet

N° inclusion Optimel	Prélèvement	Culot EDTA	Plasma Streck	Culot Streck
01-001	J0	X	X	X
	J15	✓	X	✓
	J30	✓	X	✓
	M3	X	X	X
	M6	✓	X	✓
	M9	✓	X	✓
01-002	J0	X	X	X
	J15	✓	X	✓
	J30	✓	X	✓
	M3	X	X	X
	M6	✓	X	✓
01-003	J0	✓	✓	✓
	J15	✓	X	✓
	J30	X	X	X
	M3	✓	X	✓
	M6	✓	X	✓
	PROGRESSION	✓	X	✓
01-004	J0	✓	✓	✓
	J15	X	X	✓
	J30	X	X	X
	M3	✓	X	✓
01-005	J0	✓	✓	✓
	J15	✓	X	✓
	J30	✓	X	✓
	M3	✓	X	✓
01-006	J0	✓	✓	✓
	J15	✓	X	✓
	J30	✓	X	✓
	M3	✓	X	✓
01-007	J0	✓	✓	✓
	J15	✓	X	✓
	J30	✓	X	✓
02-008	J0	✓	✓	✓

4.5.1. Comparaison des profils et des concentrations obtenus dans les plasmas et dans les surnageants des culots globulaires témoins et tests Streck des patients à J0

Les profils de fragmentation des ADN extraits des plasmas Streck de 6 patients OPTIMEL prélevés à J0 ont été comparés avec ceux des ADN obtenus à partir des surnageants des culots globulaires Streck témoins et tests de ces mêmes patients.

La **figure 34** présente les profils obtenus pour les 6 patients à J0.

Les concentrations en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté ont été évaluées sur les profils. Les concentrations obtenues après extraction de l'ADN à partir de 3 mL de plasma Streck sont comprises entre 0,11 et 4,05 ng/μL d'ADN libre circulant, sans ADN génomique fragmenté. Les concentrations en ADN obtenues après extraction de 3 mL de surnageant des culots globulaires témoins, se situent entre 0,02 et 0,21 ng/μL pour l'ADN circulant et entre 0 et 16,53 ng/μL pour l'ADN génomique fragmenté. Les concentrations obtenues après extraction du surnageant des culots globulaires traités avec la solution de trypsine-EDTA se situent entre 0,04 et 0,23 ng/μL d'ADN libre circulant et entre 0 et 7,56 ng/μL d'ADN génomique fragmenté. On observe une différence significative entre les concentrations en ADN circulant dans le plasma et dans les surnageants des culots globulaires témoins ($p=0,013$) ainsi qu'entre les concentrations dans le plasma et dans les surnageants des culots globulaires tests ($p=0,013$). Il en est de même pour les concentrations en ADN génomique fragmenté ($p=0,0096$). En revanche, on n'observe pas de différence significative entre les concentrations obtenues dans les surnageants des culots tests et témoins et ce pour l'ADN circulant et pour l'ADN génomique fragmenté ($p > 0,05$) (**figure 35**).

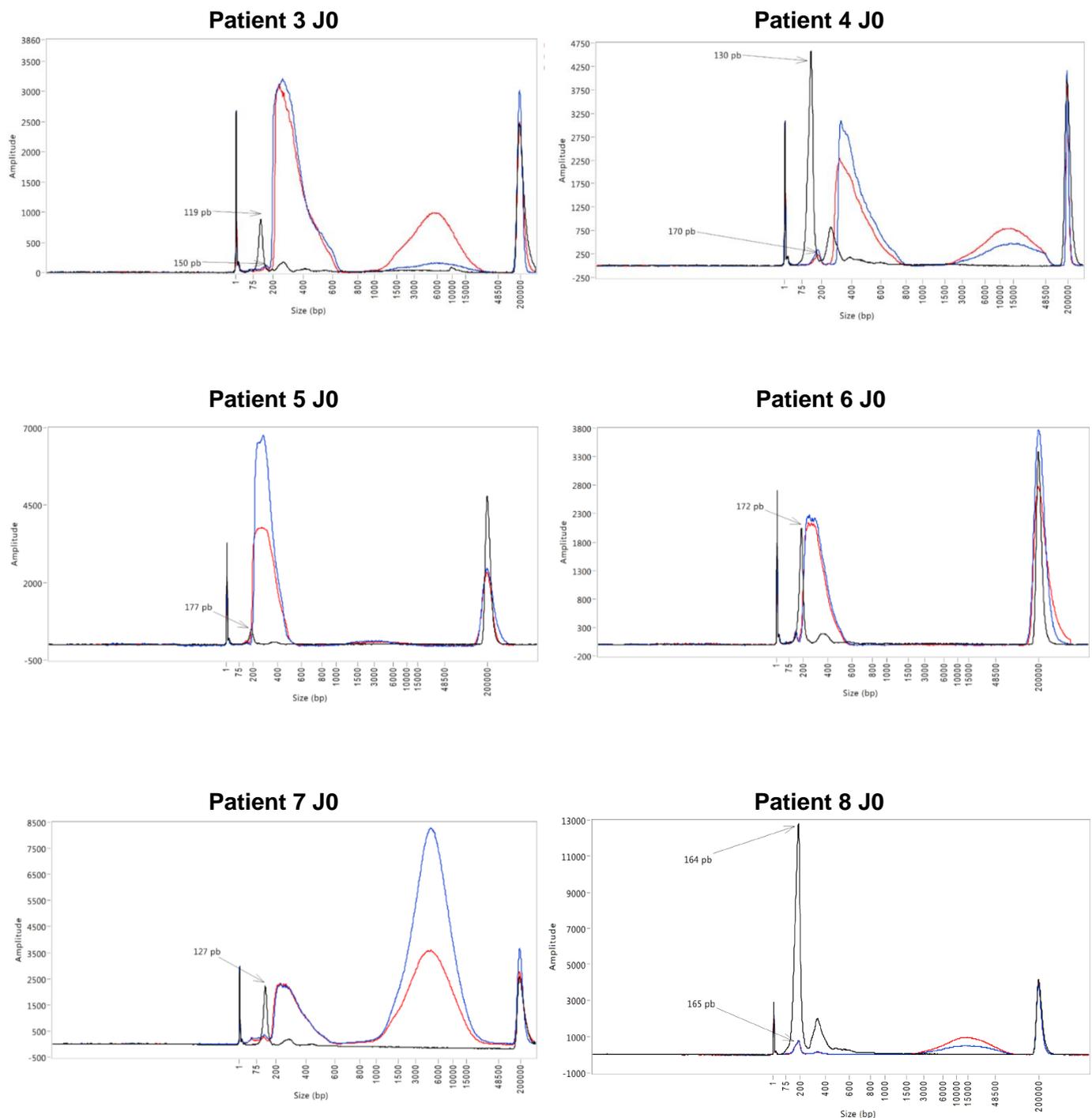


Figure 34 : Profils des prélèvements à J0 de 6 patients OPTIMEL

Sur les profils obtenus à partir de l'ADN extrait du plasma (en noir), on observe un pic d'ADN tumoral circulant aux alentours de 150 paires sans contamination par de l'ADN génomique fragmenté. Les profils obtenus après traitement des culots globulaires montrent pour les témoins (en bleu) et les tests (en rouge) la présence d'ADN tumoral circulant en plus petite quantité que dans le plasma ainsi qu'une contamination en ADN génomique fragmenté dans les tubes témoins et tests. Un pic artéfactuel est visible pour les ADN qui ont été extraits avec le carrier RNA (patients 3 à 7).

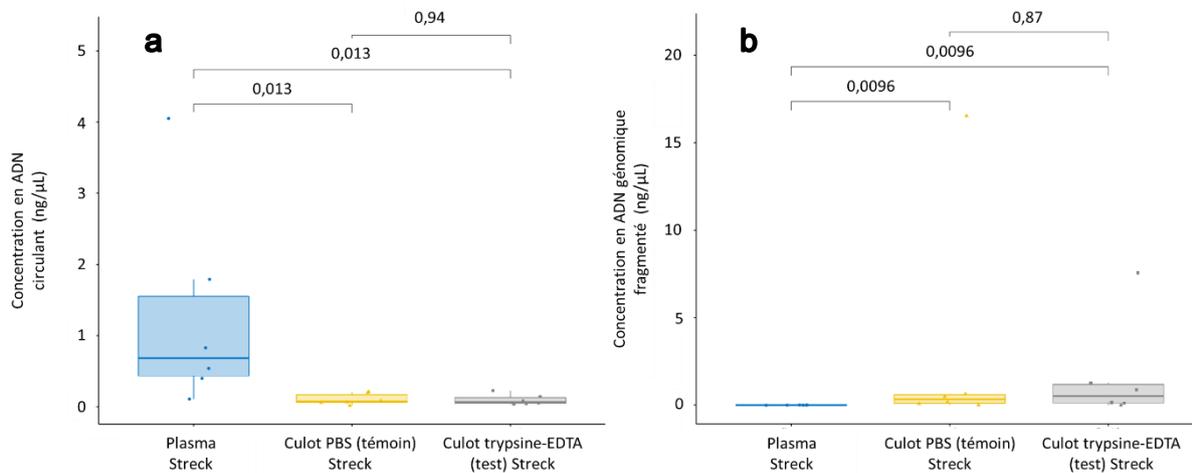


Figure 35 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues dans les plasmas et les surnageants des culots globulaires témoins et tests de 6 patients OPTIMEL prélevés sur tube Streck à J0

a : On observe une différence significative entre les concentrations en ADN tumoral circulant obtenues dans le plasma et dans les culots globulaires témoins ainsi qu'entre celles obtenues dans le plasma et dans les culots globulaires tests ($p=0,013$). On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN tumoral circulant obtenues avec les culots témoins et tests.

b : On observe une différence significative entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues dans le plasma et dans les culots globulaires témoins ainsi qu'entre celles obtenues dans le plasma et dans les culots globulaires tests ($p=0,0096$). On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues à partir des surnageants des culots témoins et tests.

4.5.2. Comparaison des profils et concentrations obtenus avec ou sans traitement par la solution de trypsine-EDTA dans les surnageants des culots globulaires EDTA et Streck

Les 26 culots EDTA et les 27 culots Streck ont permis d'obtenir les surnageants témoins dont ont été extraits 26 échantillons d'ADN témoin EDTA et 27 échantillons d'ADN témoin Streck ainsi que les surnageants tests dont ont été extraits 26 échantillons d'ADN test EDTA et 27 échantillons d'ADN test Streck. Les profils de fragmentation de l'ADN ont été réalisés afin de pouvoir quantifier l'ADN circulant et l'ADN génomique fragmenté dans les échantillons témoins et tests.

Les concentrations obtenues à partir des surnageants des culots témoins et tests EDTA ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à la fois pour l'ADN circulant (**figure 36a**) et pour l'ADN génomique fragmenté (**figure 36b**). De la même manière, les concentrations obtenues à partir des surnageants des culots témoins et tests Streck ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) à la fois pour l'ADN circulant (**figure 37a**) et pour l'ADN génomique fragmenté (**figure 37b**). Le **tableau IV** résume les concentrations en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté obtenues pour les 106 extraits.

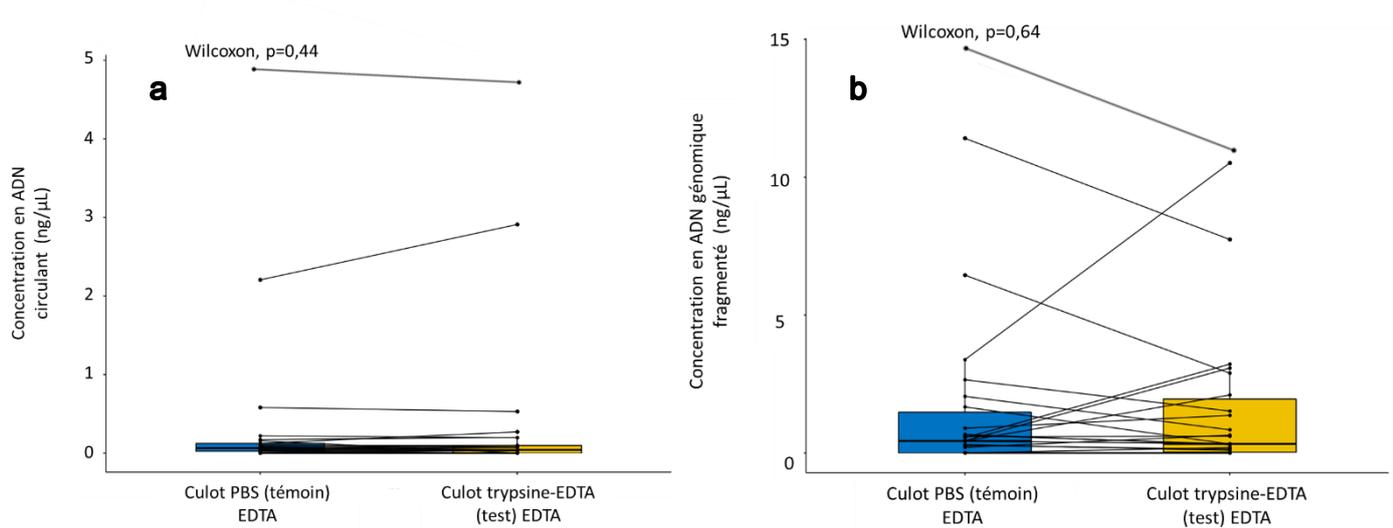


Figure 36 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests de 26 prélèvements sur tube EDTA

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des surnageants des culots EDTA témoins et tests.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues à partir des surnageants des culots EDTA témoins et tests.

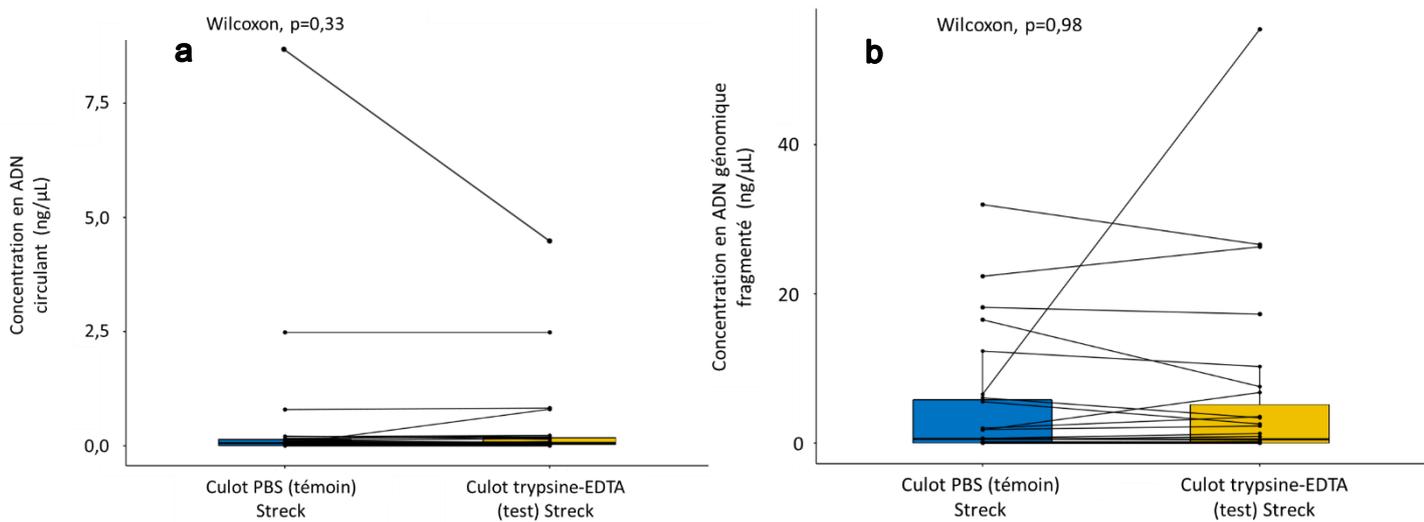


Figure 37 : Comparaison des concentrations en ADN circulant (a) et en ADN génomique fragmenté (b) obtenues après extraction des surnageants des culots globulaires témoins et tests de 27 prélèvements sur tube Streck

a : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN circulant obtenues à partir des surnageants des culots Streck témoins et tests.

b : On n'observe pas de différence significative ($p > 0,05$) entre les concentrations en ADN génomique fragmenté obtenues à partir des surnageants des culots Streck témoins et tests.

Tableau IV : Concentrations (en ng/μL) en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté obtenues après extraction des surnageants des culots témoins et tests des tubes EDTA et Streck des patients OPTIMEL

N° inclusion Optimel	Prélèvement	Tube EDTA				Tube Streck			
		Culot globulaire témoin (ng/μL)		Culot globulaire test (ng/μL)		Culot globulaire témoin (ng/μL)		Culot globulaire test (ng/μL)	
		ADN circulant	ADN génomique fragmenté	ADN circulant	ADN génomique fragmenté	ADN circulant	ADN génomique fragmenté	ADN circulant	ADN génomique fragmenté
01-001	J0	/	/	/	/	/	/	/	/
	J15	0,17	0,55	0,20	3,22	0,16	1,99	0,20	3,54
	J30	0,00	0,44	0,00	3,08	Absence	12,32	0,09	10,25
	M3	/	/	/	/	/	/	/	/
	M6	0,09	0,90	0,04	1,36	0,05	1,81	0,08	2,28
	M9	0,10	0,00	0,10	0,00	0,12	0,00	0,15	0,00
01-002	J0	/	/	/	/	/	/	/	/
	J15	0,08	0,59	0,07	0,61	0,10	1,75	0,06	6,78
	J30	0,16	0,43	0,00	0,33	0,00	18,19	0,00	17,28
	M3	/	/	/	/	/	/	/	/
	M6	0,10	0,00	0,08	0,00	0,07	0,00	0,07	0,00
01-003	J0	0,06	0,43	0,04	2,10	0,06	0,08	0,05	0,11
	J15	0,00	14,33	0,00	10,78	0,00	31,97	0,00	26,61
	J30	/	/	/	/	/	/	/	/
	M3	0,00	2,65	0,00	1,52	0,00	5,54	0,01	2,55
	M6	0,02	0,00	0,00	0,20	0,04	0,00	0,80	0,00
	PROGRESSION	0,03	0,67	0,03	0,30	0,04	0,04	0,02	0,09
01-004	J0	0,05	0,64	0,04	0,32	0,07	0,48	0,05	0,88
	J15	/	/	/	/	0,15	0,00	0,22	0,17
	J30	/	/	/	/	/	/	/	/
	M3	0,07	0,00	0,10	0,00	0,12	0,00	0,06	0,00
01-005	J0	0,00	0,30	0,03	0,09	0,02	0,17	0,04	0,15
	J15	0,00	3,38	0,00	10,52	0,00	6,53	0,00	55,46
	J30	0,00	11,41	0,00	7,74	0,00	22,36	0,00	26,31
	M3	0,04	0,00	0,04	0,00	0,04	0,00	0,06	0,00
01-006	J0	0,04	0,00	0,07	0,00	0,09	0,00	0,09	0,00
	J15	4,83	0,00	4,69	0,00	8,70	0,00	4,54	0,00
	J30	2,21	0,00	2,91	0,00	2,48	0,00	2,48	0,00
	M3	0,58	0,27	0,53	0,14	0,79	0,55	0,83	0,39
01-007	J0	0,13	6,45	0,27	2,89	0,21	16,53	0,14	7,56
	J15	0,02	0,20	0,00	0,65	0,00	6,06	0,00	3,38
	J30	0,05	2,05	0,03	0,84	0,03	0,62	0,04	0,50
02-008	J0	0,22	1,67	0,20	0,32	0,20	0,63	0,23	1,27

4.6. Recherche de mutations sur les prélèvements des patients atteints d'un mélanome métastatique

La recherche de mutations sur le gène *BRAF* a été réalisée par la technique Idylla® sur 14 des 27 prélèvements déjà inclus dans l'étude OPTIMEL directement à partir d'1 mL de plasma issu des tubes Streck.

Cent vingt échantillons d'ADN extrait ont été testés en ddPCR. La **figure 38** présente les résultats de manière graphique pour un échantillon muté (**figure 38a**) et un échantillon non muté (**figure 38b**). Le détail des échantillons passés en ddPCR et en Idylla® et les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau V**.

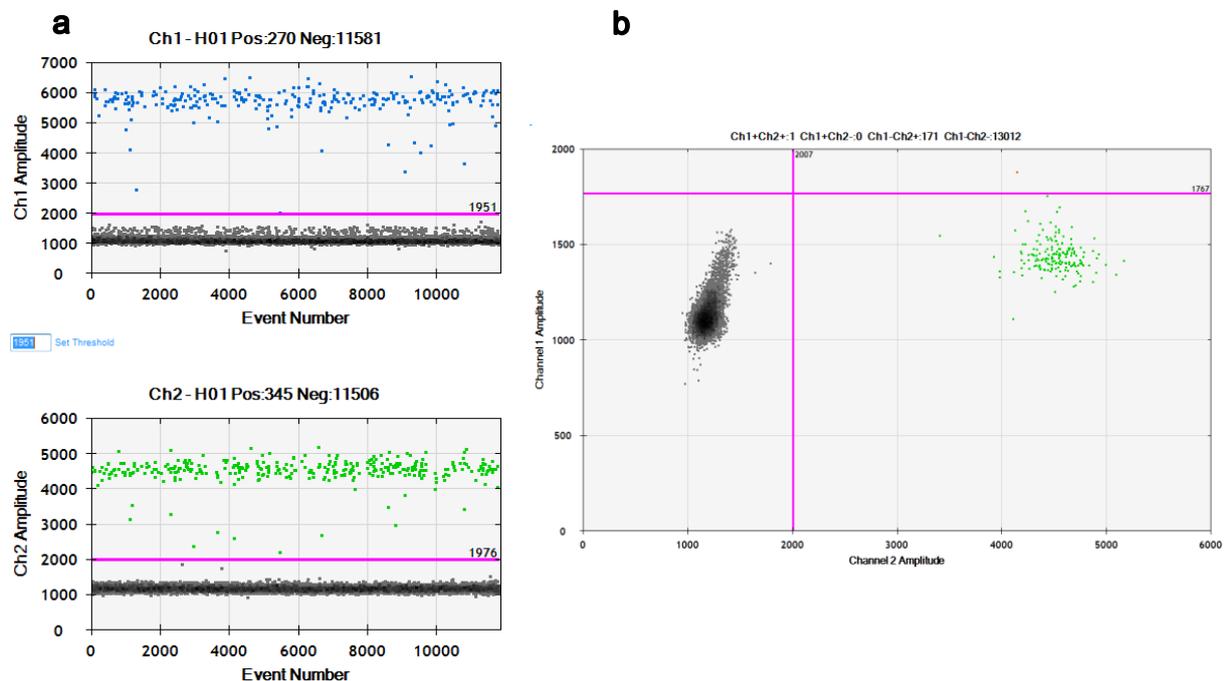


Figure 38 : Représentation graphique des résultats de ddPCR pour un échantillon muté et pour un échantillon non muté

Le premier canal Ch1 permet de détecter la sonde *BRAF* V600E. Toutes les gouttelettes en bleu, situées au-dessus du cut-off (ligne horizontale rose) sont des gouttelettes contenant de l'ADN portant la mutation *BRAF* V600E. Le deuxième canal Ch2 permet de détecter la sonde *BRAF* WT. Toutes les gouttelettes en vert situées au-dessus du cut-off (ligne horizontale rose) sont des gouttelettes contenant de l'ADN WT pour le codon 600 du gène *BRAF*.

a : Résultats obtenus à partir de l'ADN extrait du plasma du patient 4 : on observe des gouttelettes bleues signifiant la présence d'une mutation *BRAF* V600E.

b : Résultats obtenus à partir de l'ADN extrait du plasma du patient 5 : on observe uniquement des gouttelettes vertes signifiant la présence d'ADN ne portant pas la mutation V600E sur le gène *BRAF*.

Tableau V : Résultats de la recherche de mutations sur le gène *BRAF* par la technique Idylla® à partir des plasmas des patients OPTIMEL et par la technique de ddPCR à partir de l'ADN extrait des plasmas et des culots globulaires témoins et tests des patients OPTIMEL

N° inclusion Optimel	Prélèvement	Culot globulaire				Plasma Streck	
		EDTA témoin	EDTA test	Streck témoin	Streck test	ddPCR	Idylla
		ddPCR					
01-001	J0	/	/	/	/	/	WT
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	WT	WT	WT	WT	/	/
	M3	/	/	/	/	/	/
	M6	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	M9	WT	WT	WT	WT	WT	WT
01-002	J0	/	/	/	/	/	/
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	WT	WT	WT	WT	/	/
	M3	/	/	/	/	/	/
	M6	WT	WT	WT	WT	/	/
01-003	J0	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	/	/	/	/	WT	WT
	M3	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	M6	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	PROGRESSION	WT	WT	WT	WT	Muté 1,8%	Muté
01-004	J0	Muté 4,4%	Muté 8,3%	Muté 8,1%	Muté 3,9%	Muté 40,1%	Muté V600E
	J15	/	/	WT	WT	WT	WT
	J30	/	/	/	/	/	/
	M3	WT	WT	WT	WT	WT	WT
01-005	J0	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	WT	WT	WT	WT	/	/
	M3	WT	WT	WT	NI	/	/
01-006	J0	WT	WT	WT	WT	Muté 1,3%	WT
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	WT	WT	WT	WT	/	/
	M3	WT	WT	NI	NI	/	/
01-007	J0	NI	NI	Muté 0,1%	Muté 0,5%	Muté 25,7%	Muté V600E
	J15	WT	WT	WT	WT	/	/
	J30	NI	WT	WT	WT	/	/
02-008	J0	WT	WT	WT	WT	WT	Muté V600K/R

WT : wild-type

Muté : quand la mutation n'est pas précisée dans le tableau, il s'agit de la mutation V600E du gène *BRAF*

NI : non interprétable

5. DISCUSSION ET CONCLUSION

Dans ce projet, nous avons cherché à évaluer, chez des sujets sains, l'influence de plusieurs anticoagulants sur l'interaction entre l'ADN circulant et les cellules sanguines puis à étudier cette liaison chez des patients atteints d'un mélanome métastatique et ce afin d'évaluer la possibilité d'isoler cet ADN pour optimiser la recherche de mutations du gène *BRAF* dans le sang de ces patients.

Lors de la mise en place du protocole et du choix du gel de migration des fragments nous avons été confrontés à la présence d'une interférence liée à l'utilisation de carrier RNA dans le protocole d'extraction. On pourrait donc s'interroger sur l'influence de cet artefact sur la mesure des concentrations en ADN. Pour chaque échantillon, nous avons évalué les concentrations en ADN circulant et en ADN génomique fragmenté à partir de chaque pic présent sur les profils de fragmentation. Le pic artéfactuel correspondant au carrier n'est donc pas pris en compte et n'affecte pas les concentrations évaluées.

Dans un premier temps, l'influence de l'anticoagulant utilisé a été étudiée à partir d'échantillons de plasma de sujets sains. L'utilisation des tubes EDTA, citrate et héparine a permis d'isoler de l'ADN circulant à des concentrations faibles comme précédemment décrit chez les sujets sains (Wan *et al.*, 2017). Dans les conditions préanalytiques normales, aucune contamination par de l'ADN génomique fragmenté n'est présente avec les tubes EDTA et citrate alors que la concentration en ADN génomique fragmenté augmente avec l'utilisation des tubes héparinés. La différence de mécanisme d'action de ces 3 anticoagulants explique le phénomène. L'EDTA et le citrate vont chélater le calcium et bloquer la cascade de coagulation en amont de la génération de thrombine. Au contraire, l'héparine inhibe la coagulation après la génération de thrombine et de facteur Xa, lesquels activent les leucocytes qui peuvent ainsi libérer de l'ADN génomique fragmenté qui va contaminer l'ADN libre circulant et augmenter sa concentration de manière artéfactuelle dans le tube. Le cas du sujet sain 4 nous montre néanmoins qu'un défaut de prise en charge préanalytique du tube citrate peut conduire à une contamination par de l'ADN génomique fragmenté. Il pourrait s'agir, par exemple, d'un délai trop important entre le prélèvement et la centrifugation du tube. Les tubes EDTA sont donc ceux qui permettent de limiter au mieux la contamination en ADN génomique fragmenté ce qui est cohérent avec les résultats des études précédemment réalisées sur le plasma (El Messaoudi *et al.*, 2013).

Notre projet est centré sur les culots globulaires. A notre connaissance, aucune étude n'a comparé l'influence de ces trois anticoagulants sur les mécanismes de rétention de l'ADN à la surface des cellules sanguines. C'est pourquoi les sujets sains ont été prélevés sur 3 anticoagulants différents. Les concentrations obtenues ne sont pas significativement différentes entre les 3 anticoagulants et ce pour l'ADN circulant et pour l'ADN génomique fragmenté.

Contrairement à ce qui était attendu, les concentrations en ADN obtenues avec ou sans traitement des culots globulaires par la solution de trypsine-EDTA ne sont pas significativement différentes. En s'appuyant sur les données de la littérature, on pouvait s'attendre à obtenir des concentrations en ADN plus importantes après traitement des culots par la solution de trypsine-EDTA qui était censée rompre les liaisons protéiques et ioniques entre l'ADN et les cellules sanguines.

Nous avons utilisé un protocole similaire à celui précédemment décrit. Néanmoins, il existe une différence notable qui est, dans notre étude, la réalisation d'un culot globulaire témoin. En effet, dans les études précédentes, tout l'ADN récupéré après traitement des culots globulaires avec de la trypsine ou du PBS-EDTA a été considéré comme lié aux cellules. Une limite apparaît à ce niveau. En effet, l'absence de culots témoins ne permet pas d'évaluer la présence, avant traitement par la solution de trypsine-EDTA, d'ADN libre circulant dans le culot globulaire mais non lié aux cellules et qui pourrait augmenter de manière artificielle les concentrations en ADN lié aux cellules.

De plus, nous avons montré que l'augmentation des concentrations en ADN dans les culots globulaires était principalement liée à la présence de fragments de grande taille, correspondant à de l'ADN génomique fragmenté issu de la dégradation des cellules sanguines.

Nos résultats laissent donc penser que, chez les sujets sains, l'ADN génomique fragmenté est libéré par les cellules sanguines indépendamment du traitement avec la solution de trypsine-EDTA. Il pourrait s'agir d'une dégradation spontanée lors de la manipulation des culots globulaires.

La technique de coloration utilisée n'a pas permis de mettre en évidence des fragments d'ADN à la surface des cellules sanguines. En effet, la technique manque de sensibilité et ne permet pas de marquer les fragments de petites tailles d'ADN présents de surcroît en faible concentration. Des techniques plus sensibles de microscopie électronique avec une plus grande résolution, utilisées notamment pour la mise en évidence des NETs, seraient nécessaires afin d'évaluer la présence d'acides nucléiques à la surface des cellules sanguines.

Dans notre étude, la concentration moyenne en ADN circulant obtenue dans le plasma est de 1,29 ng/ μ L chez les patients atteints d'un mélanome métastatique et de 0,14 ng/ μ L chez les sujets sains. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature qui rapportent des concentrations en ADN circulant supérieures chez les patients atteints d'un cancer par rapport à celles mesurées chez les sujets sains (Wan *et al.*, 2017).

Chez les patients atteints d'un mélanome métastatique, les concentrations en ADN tumoral circulant obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et tests sont significativement inférieures à celles obtenues dans le plasma. Les surnageants des culots globulaires contiennent par contre de l'ADN génomique fragmenté absent des extraits obtenus à partir du plasma.

Notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les concentrations en ADN libre circulant ou en ADN génomique fragmenté obtenues à partir des surnageants des culots globulaires témoins et traités par la solution de trypsine-EDTA. Comme pour les sujets sains, on peut émettre l'hypothèse que cet ADN soit libéré par les cellules sanguines *via* des mécanismes indépendants du traitement par la solution de trypsine-EDTA. On observe néanmoins la présence d'ADN tumoral circulant dans les extraits des culots globulaires. On peut donc s'interroger sur l'origine de cet ADN tumoral circulant. Il pourrait s'agir d'ADN tumoral circulant libre qui n'a pas été isolé dans le plasma malgré le protocole de centrifugation mais il se pourrait aussi que cet ADN soit issu d'autres éléments présents dans le sang tels que les vésicules extracellulaires décrites précédemment comme pouvant contenir de l'ADN. Il serait donc intéressant de pouvoir isoler ces vésicules extracellulaires afin de les analyser et de déterminer si elles contiennent de l'ADN tumoral circulant.

Concernant la recherche de mutations du gène *BRAF*, la technique de ddPCR a donné des résultats concordants entre ADN plasmatique et ADN des culots globulaires dans 11 cas sur 14. Pour le prélèvement à progression du patient 3 et le prélèvement à J0 du patient 6, les tests en ddPCR réalisés sur les ADN extraits des culots globulaires ne permettent pas de retrouver de mutation. Cela s'explique par la faible concentration en ADNtc dans ces extraits et la faible fréquence allélique de la mutation. Pour le patient 6, la mutation n'a d'ailleurs pas été détectée dans le plasma avec la technique Idylla[®]. Seule la ddPCR qui possède une meilleure sensibilité (1 copie mutée sur 8 750 pour la technique Idylla[®] et 1 copie sur 10 000 pour la ddPCR) a permis de détecter la mutation dans le plasma. De plus, la technique Idylla[®] utilise 1mL de plasma alors que l'ADN est extrait à partir de 3 mL de plasma pour la ddPCR. Certains résultats obtenus sont ininterprétables du

fait de la faible proportion d'ADN tumoral parmi l'ADN extrait des culots. Le problème n'a pas été rencontré pour l'ADN extrait du plasma.

Pour conclure, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence la présence de fragments d'ADN à la surface des cellules sanguines à des concentrations significatives. Néanmoins, les culots globulaires contiennent une faible fraction d'ADN tumoral circulant sur laquelle il est possible de détecter des mutations sur le gène d'intérêt. Malgré cela, l'utilisation de l'ADN issu des culots globulaires n'a pas permis de détecter des mutations qui n'auraient pas été trouvées dans le plasma. La mise en place de cette étape préanalytique supplémentaire ne semble donc pas pertinente dans le protocole de prise en charge des biopsies liquides.

REFERENCES

- Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, Constantin T, Salari R, *et al.* Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 2017;545(7655):446-451.
- Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(9):623-31.
- Anker P, Jachertz D, Maurice PA, Stroun M. Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochem Funct*. 1984;2:33–37.
- Anker P, Jachertz D, Stroun M, Brögger R, Lederrey C, Henri J, *et al.* The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J Immunogenet*. 1980;7:475–481.
- Anker P, Lyautey J, Lefort F, Lederrey C, Stroun M. [Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]. *C R Acad Sci III*. 1994;317(10):869-74.
- Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Research*. 1975;35(9):2375–2382.
- Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous extracellular synthesis of DNA released by human blood lymphocytes. *Cancer Research*. 1976;36(8):2832-2839
- Anker P, Stroun M, Maurice PA. Characteristics of nucleic acids excreted by non-stimulated normal human lymphocytes. *Schweizerische Medizinische Wochenschrift*. 1977;107(41):1457
- Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumors were seen in the blood after death. *The Australian Medical Journal*. 1869;14:146-9.
- Bachet JB, Bouché 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 AGEO RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1211-1219.
- Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a possible factor in oncogenesis. *Science*. 1965;148(3668):374-376.
- Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014;6:224ra24.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RI, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:394-424.

Bryzgunova OE, Tamkovich SN, Cherepanova AV, Yarmoshchuk SV, Permyakova VI, Anykeeva OY, *et al.* Redistribution of Free- and Cell-Surface-Bound DNA in Blood of Benign and Malignant Prostate Tumor Patients *Acta Naturae*. 2015;7(2):115-118.

Calapre L, Warburton L, Millward M, Ziman M, Gray ES. Circulating tumour DNA (ctDNA) as a liquid biopsy for melanoma. *Cancer Lett*. 2017;404:62-69.

Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:255-89.

Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, *et al.* Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3446-58.

Diefenbach RJ, Lee JH, Kefford RF, Rizos H. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free DNA. *Cancer Genet*. 2018;228-229:21-27.

Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*. 2017;9(2):2912-2922.

Duvvuri B, Lood C. Cell-Free DNA as a Biomarker in Autoimmune Rheumatic Diseases. *Front Immunol*. 2019;10:502

El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013;424:222-30.

Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PLoS ONE*. 2017:e0183915.

Franczak C, Filhine-Tressarrieu P, Broseus J, Gilson P, Merlin JL, Harle A. Clinical Interest of Circulating Tumor DNA in Oncology. *Arch Med Res*. 2018;49(5):297-305.

Franczak C, Filhine-Tressarrieu P, Gilson P, Merlin JL, Au L, Harle A. Technical considerations for circulating tumor DNA detection in oncology. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019; 19:121-135.

Fu M, Gu J, Jiang P, Qian H, Xu W, Zhan X. Exosomes in gastric cancer: roles, mechanisms, and applications. *Molecular Cancer*. 2019;18:41.

Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, *et al.* Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:1219-25.

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

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

García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, *et al.* Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res*. 2010;70(2):560-7.

García-Olmo DC, Picazo MG, García-Olmo D. Transformation of non-tumor host cells during tumor progression: theories and evidence. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12 Suppl 1:S199-207.

Haemmerle M, Stone RL, Menter DG, Afshar-Kharghan V, Sood AK. The Platelet Lifeline to Cancer: Challenges and Opportunities. *Cancer Cell*. 2018;33:965-983.

Harlé A, Salleron J, Franczak C, Dubois C, Filhine-Tressarieu P, Leroux A, *et al.* Detection of BRAF Mutations Using a Fully Automated Platform and Comparison with High Resolution Melting, Real-Time Allele Specific Amplification, Immunohistochemistry and Next Generation Sequencing Assays, for Patients with Metastatic Melanoma. *PLoS One*. 2016;11: e0153576.

Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*. 2019;20(2):71-88.

Hibi K, Robinson CR, Booker S, Wu L, Hamilton SR, Sidransky D, *et al.* Molecular detection of genetic alterations in the serum of colorectal cancer patients. *Cancer Res*. 1998;58(7):1405-7.

Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem*. 2011;83:8604-10.

Kahlert C, Melo SA, Protopopov A, Tang J, Seth S, Koch M, *et al.* Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 2014;289:3869-75.

Khani M, Hosseini J, Mirfakhraie R, Habibi M, Azargashb E, Pouresmaeili F. The value of the plasma circulating cell-free DNA concentration and integrity index as a clinical tool for prostate cancer diagnosis: a prospective case-control cohort study in an Iranian population. *Cancer Manag Res*. 2019;11:4549-4556.

Kolesnikova EV, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Shelestyuk PI, Permyakova VI, Vlassov VV, *et al.* Circulating DNA in the blood of gastric cancer patients. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:226-31.

Laktionov PP, Tamkovich SN, Rykova EY, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, *et al.* Cell-surface-bound nucleic acids: Free and cell-surface-bound nucleic acids in blood of healthy donors and breast cancer patients. *Ann NY Acad Sci*. 2004;1022:221-227.

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977;37:646-50.

Liu S, Zhan Y, Luo J, Feng J, Lu J, Zheng H, *et al.* Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018;111:338-346.

Liu Y, Cao X. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. *Cancer Cell.* 2016;30(5):668-81.

Ma M, Chen S, Liu Z, Xie H, Deng H, Shang S, *et al.* miRNA-221 of exosomes originating from bone marrow mesenchymal stem cells promotes oncogenic activity in gastric cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:4161-71.

Mandel P, Métais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142:241-243.

Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opin Biol Ther.* 2012;12(Suppl 1):S209-15.

Mouliere F, Chandrananda D, Piskorz AM, Moore EK, Morris J, Ahlborn LB, *et al.* Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Sci Transl Med.* 2018;10(466).

Novello S, Barlesi F, Califano R, Cufer T, Ekman S, Levra MG, *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann oncol.* 2016;27:v1-v27.

Pantel K and Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol.* 2019. doi: 10.1038/s41571-019-0187-3.

Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(2):134-147.

Pocernich C, Pike W, Wong KS. Accurate QC analysis of cfDNA with the Fragment Analyzer™, Application Note. Disponible sur <https://www.aati-us.com/accurate-cfdna-qc-analysis/> (consulté le 09/04/19).

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):265-73.

Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M. 2011. Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43:106-19

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2019. URL: <http://www.R-project.org>.

Rikkert LG, Van Der Pol E, Van Leeuwen TG, Nieuwland R, Coumans FAW. Centrifugation Affects the Purity of Liquid Biopsy-Based Tumor Biomarkers. *Cytometry A*. 2018;93:1207-1212.

Rykova EY, Laktionov PP, Skvortsova TE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV. Extracellular DNA in breast cancer: Cell-surface-bound, tumor-derived extracellular DNA in blood of patients with breast cancer and nonmalignant tumors. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1022:217-20.

Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, *et al*. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opinion on Biological Therapy*; 2012;12(Suppl 1):S141-153.

Shaw JA, Smith BM, Walsh T, Johnson S, Primrose L, Slade MJ, *et al*. Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000;6:1119-24.

Shaw KJ, Thain L, Docker PT, Dyer CE, Greenman J, Greenway GM, *et al*. The use of carrier RNA to enhance DNA extraction from microfluidic-based silica monoliths. *Anal Chim Acta*. 2009;652:231-3.

Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531-548.

Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, *et al*. Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer*. 2006;94(10):1492-5.

Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016;164(1-2):57-68.

Sol N, Wurdinger T. Platelet RNA signatures for the detection of cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(2):263-272.

Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):67-71.

Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*. 1987;23(6):707-712.

Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318-322.

Sullivan RJ, Atkins MB, Kirkwood JM, Agarwala SS, Clark JI, Ernstoff MS, *et al*. An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: version 2.0. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):44.

Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, *et al.* Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J. Biotechnol.* 2013;165:77-84.

Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, Kolesnikova EV, Shelestiuk PI, Laktionov PP, *et al.* [Circulating nucleic acids in blood of patients with stomach and colon neoplasms]. *Biomed Khim.* 2005;51(3):321-8.

Tamkovich SN, Litviakov NV, Bryzgunova OE, Dobrodeev AY, Rykova EY, Tuzikov SA, *et al.* Cell-surface-bound circulating DNA as a prognostic factor in lung cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:214-7.

Tamkovich SN, Laktionov P. Cell-Surface-Bound Circulating DNA in the Blood: Biology and Clinical Application. *IUBMB Life.* 2019. doi: 10.1002/iub.2070. [Epub ahead of print]

Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation.* 1966;45(11):1732-1740.

Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(3):347-76.

Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, *et al.* ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(8):1386-1422.

Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol.* 1994;86(4):774-9.

Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, *et al.* Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:223-238.

Wang JJ, Wang ZY, Chen R, Xiong J, Yao YL, Wu JH, *et al.* Macrophage secreted exosomes delivering miRNA-21 inhibitor can regulate BGC-823 cell proliferation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16:4203-9.

Wang JY, Hsieh JS, Chang MY, Huang TJ, Chen FM, Cheng TL, *et al.* Molecular detection of APC, K-ras, and p53 mutations in the serum of colorectal cancer patients as circulating biomarkers. *World J Surg.* 2004;28:721-6.

Wang M, Zhao C, Shi H, Zhang B, Zhang L, Zhang X, *et al.* Deregulated microRNAs in gastric cancer tissue-derived mesenchymal stem cells: novel biomarkers and a mechanism for gastric cancer. *Br J Cancer.* 2014;110:1199-210.

Xie Y, Dang W, Zhang S, Yue W, Yang L, Zhai X, *et al.* The role of exosomal noncoding RNAs in cancer. *Molecular Cancer.* 2019;18:37.

Zheng P, Chen L, Yuan X, Luo Q, Liu Y, Xie G, *et al.* Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36:53.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 20 septembre 2019

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Claire FRAN CZAK</p> <p>Sujet : Tumeurs solides et circulation sanguine : influence des composants sanguins dans le processus tumoral et optimisation de l'analyse des ADN tumoraux circulants</p> <p>Jury :</p> <p>Président : M. Jean-Louis MERLIN, Professeur Directeur : M. Alexandre HARLE, Maître de conférences Juges : M. Jean-Yves JOUZEAU, Professeur M. Julien PERRIN, Maître de conférences</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 14/6/2019</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p align="center">   </p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 20.08.2019</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Pr. Raphaël DUVAL </p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 27 AOUT 2019</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center">  Pierre MUTZENHARDT </p> <p>N° d'enregistrement : 10804</p>

N° d'identification :

TITRE :

Tumeurs solides et circulation sanguine : influence des composants sanguins dans le processus tumoral et optimisation de l'analyse des ADN tumoraux circulants

Thèse soutenue le 20.09.2019

Par Claire FRAN CZAK

RESUME :

Dans la prise en charge médicale d'un cancer métastatique, la recherche de mutations spécifiques à la tumeur est souvent nécessaire dans un but théranostique et se fait habituellement à partir d'une biopsie tissulaire ou d'une pièce opératoire. Une alternative prometteuse et moins invasive consiste à rechercher de l'ADN tumoral circulant à partir d'un prélèvement sanguin. Ce concept de biopsie liquide se heurte pourtant à des difficultés techniques, notamment par un manque de sensibilité et nécessite donc un protocole préanalytique et analytique adapté afin de pouvoir isoler l'ADN tumoral circulant présent en faible quantité dans le plasma. Il est mentionné dans la littérature d'une fraction d'ADN qui ne serait pas libre dans le plasma mais liée à la surface des cellules sanguines. Notre étude a pour but d'isoler et de caractériser cet ADN lié aux cellules afin d'évaluer l'intérêt de l'utiliser pour augmenter la quantité totale d'ADN circulant analysable. Le protocole de traitement des culots globulaires a été mis au point sur les prélèvements de 5 sujets sains puis appliqué sur des prélèvements répétés chez 8 patients atteints d'un mélanome métastatique. Malgré la possibilité de détecter des mutations à partir de l'ADN extrait des culots globulaires, notre étude n'a pas permis de mettre en évidence la présence d'ADN à la surface des cellules à des concentrations significatives pour envisager son utilisation en routine.

MOTS CLES : ADN lié aux cellules sanguines, ADN tumoral circulant, biopsie liquide, culot globulaire, mélanome métastatique.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Alexandre HARLÉ	Unité de biologie des tumeurs – service de biopathologie Institut de Cancérologie de Lorraine Faculté de Pharmacie Université de Lorraine	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> Bibliographique <input type="checkbox"/> Thèmes <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

2 – Hygiène/Environnement

3 – Médicament

4 – Alimentation – Nutrition

5 – Biologie

6 – Pratique professionnelle