

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	ii
LISTE DES FIGURES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ANNEXES.....	iv
LIEU DE STAGE.....	v
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	2
I. Histoire des acides nucléiques.....	3
II. L'ADN circulant	4
III. biopsie liquide.....	4
IV. Source des ADN circulants.....	6
V. Caractéristiques générales des acides nucléiques circulants.....	8
VI. ADN circulant dans les pathologies autres que le cancer	8
VII. L'intérêt de la recherche d'ADN circulant	9
1) <i>La détection des altérations géniques</i>	9
2) <i>La détection des stades de cancer</i>	10
3) <i>Le suivi et la surveillance des récurrences</i>	11
4) <i>L'évaluation de la réponse au traitement</i>	12
VIII. Avantages d'ADN circulant.....	13
MATERIEL ET METHODES.....	15
I. Etapes pré analytiques pour l'extraction de l'ADNc	16
II. Méthodes d'extraction	17
1) <i>Isolement de l'ADN normal à partir des leucocytes</i>	17
a. Principe	17
b. Protocole	17
2) <i>L'isolement de l'ADNc</i>	18
a. Principe	18

b. Protocole	18
III. Dosage : Méthodes de quantification de l'ADNc	18
IV. PCR = Technique d'amplification en chaine par polymérase.....	19
1) <i>Principe de base d'une PCR</i>	19
2) <i>Choix du gène de référence</i>	19
3) <i>Choix des amorces</i>	19
4) <i>Protocole</i>	20
V. Analyse d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose	21
RESULTATS ET DISCUSSION.....	22
I. L'extraction de l'ADNc	23
1) <i>Essai N°1</i>	23
2) <i>Essai N°2:</i>	23
3) <i>Essai N°3</i>	24
4) <i>Essai N°4</i>	24
II. L'amplification du gène BRCA1.....	26
III. Utilités cliniques potentielles de l'ADN tumoral circulant.....	27
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	28
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	29

LISTE DES ABREVIATIONS

CHU	Centre Hospitalier Universitaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN circulant
ADNtc	ADN tumoral circulant
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
pb	paire de base
Kb	Kilo base
MSI	instabilité des microsatellites
KRAS	gène V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogenehomolog
EGFR	epidermal growth factor receptor
PCR	Polymerase Chain Reaction
BRCA1	gène breast cancer 1
17q	bras long du chromosome 17
Ta	température d'hybridation
Tm	température de demi-dénaturation
dNTP	deoxynucleotide
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
TBE	Tris borate EDTA
BET	Bromure d'Ethidium
UV	UltraViolet
OMS	l'Organisation Mondiale de Santé
NCI	National Cancer Institute
SCC	Société canadienne du cancer

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Différence entre une biopsie de tissus et une biopsie liquide.....	5
Figure 2: Les différentes sources d'ADN circulant dans le sang.....	6
Figure 3: Evolution des concentrations d'ADNc et de leur profil de taille dans un modèle murin après induction de l'apoptose et de la nécrose.....	7
Figure 4: Les différents facteurs détectés à partir de l'ADNc.....	10
Figure 5 : La survie globale des patients avec et sans altération génétique	11
Figure 6 : Variation de la concentration d'ADNc selon le traitement.....	12
Figure 7: les différentes questions à quoi peut répondre l'ADNc.....	14
Figure 8 : Application de la biopsie liquide.....	14
Figure 9 : Recommandations et étapes pré-analytiques pour l'extraction de l'ADNc.....	16
Figure 10: Protocole traditionnel d'extraction de l'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit PureLink™.....	17
Figure 11: Protocole du kit de séparation MagMAX Cell-Free DNA Isolation.....	18
Figure 12 : La région génomique du gène BRCA1.....	19
Figure 13: Le spectre d'absorption caractéristique d'ADN pur.....	24
Figure 14: Spectre d'absorption d'ADN.....	25
Figure 15: Images du gel d'agarose après électrophorèse pour (A) l'exon10A et (B) l'exon10B.....	26
Figure 16: Les applications potentielles de l'ADN tumoral circulant selon le contexte clinique.....	27

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Etapes clés de la découverte de l'ADNc.....	3
Tableau 2: La différence entre les deux fractions de l'ADNc dans la circulation.....	4
Tableau 3: Les différents essais procédés pour l'extraction d'ADNc.....	16
Tableau 4: les caractéristiques des couples d'amorces utilisées dans la PCR.....	19
Tableau 5: Le mélange réactionnel utilisé pour PCR.....	20
Tableau 6: Les différents tubes PCR.....	20
Tableau 7: Conditions d'amplification du gène pour les différentes amorces.....	20

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Protocole d'extraction d'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit Purelink™.....	35
Annexe 2: Protocole d'isolement d'ADNc à partir du plasma à l'aide du kit MagMAX™....	36



**FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE FÈS**



**CENTRE HOSPITALIER
UNIVERSITAIRE HASSAN II FES**

LIEU DE STAGE

Le stage est une étape indispensable pour l'étudiant, en vue d'apprendre les méthodes de travail, les problèmes du domaine, et surtout de pratiquer ce qui a été acquis durant les études. Mon stage de deux mois s'est consisté à mettre en place les techniques de la biologie moléculaire au sein de deux structures :

- ⇒ Le laboratoire de recherche de biologie moléculaire situé à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès sous la direction de Mme. **LE PROFESSEUR BENNIS SANAË**
- ⇒ Ainsi qu'au sein de laboratoire de génétique et d'oncogénétique à CHU de Fès.

Ce stage s'est avéré très intéressant et très enrichissant pour ma propre expérience dans le domaine médical. En effet, ma formation **SBAS** s'inscrit précisément dans ce cadre, et grâce à ce stage, j'ai eu l'opportunité de mettre en pratique mes connaissances théoriques acquises durant ma formation à la FST.

Introduction

Le cancer constitue la deuxième cause de décès dans le monde après les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux, il a fait 8,8 millions de morts en 2018. Selon l'organisation mondiale de la santé, près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer.

Les premiers types de cancers qui causent la mortalité sont les suivants :

1. cancer du poumon (1,69 million de décès);
2. cancer du foie (788 000 décès);
3. cancer colorectal (774 000 décès);
4. cancer de l'estomac (754 000 décès);
5. cancer du sein (571 000 décès). [OMS, 2018]

Le terme « cancer » signifiait mortalité et morbidité, il n'existait aucun test sensible et fiable permettant de surveiller les patients et de détecter les métastases à distance avant une récurrence manifeste. De nouvelles recherches décrivent une analyse sanguine qui pourrait potentiellement permettre de détecter le cancer des mois ou même des années plus tôt qu'avec les examens habituels. Avec une détection précoce et un traitement adéquat, les chances de guérison sont prometteuses pour de nombreux cancers.

En effet, c'est dans ce cadre que s'inscrit mon projet de fin d'études. Mon travail va consister à mettre au point la technique d'extraction de l'ADN circulant à partir du sang dans le but de comparer entre l'ADNc et l'ADN normal chez des patientes atteintes de cancer de sein au CHU de Fès.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Dès qu'une tumeur est présente dans l'organisme, des acides nucléiques disséminent et se retrouvent dans le sang. "Ils sont porteurs d'un grand nombre d'informations utiles pour le suivi du patient. Toute la difficulté consiste d'une part, à les détecter et d'autre part, à déterminer leur signification", explique le Dr François-Clément Bidard, oncologue médical à l'Institut Curie, spécialiste des biomarqueurs circulants. Ces acides nucléiques sont accessibles par une simple prise de sang, ils renseignent sur la nature du cancer, la progression tumorale, et la réponse au traitement. [François-Clément Bidard, 2012]

I. Histoire des acides nucléiques :

5 ans avant la description de la structure en double hélice de l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) par Watson et Crick, la présence d'acide nucléique dans le plasma a été décrite en 1948 par Mendel et Metais. Ils ont montré qu'ils pouvaient être détectés dans le plasma humain de sujets malades et sains.

C'est en 1977 que Leon et al. ont mis en évidence l'ADN circulant (ADNc) dans le sérum de patients atteints de cancer en quantité plus importante que chez des sujets non cancéreux.

En 1997, l'équipe de Lo a montré la présence d'acide nucléique circulant d'origine fœtale dans le sang maternel ; grâce à ces travaux, la première méthode de diagnostic de la trisomie 21 a été mise en place ([Lo et al, 1997], [Chiu et al, 2011]).

Les acides nucléiques circulants extracellulaires sont des ADN retrouvés hors des cellules dans le sang, le plasma et la lymphe, les acides nucléiques sont également retrouvés dans les fluides non circulants comme les ascites, le lait maternel, les fluides de lavages bronchiques, la bile, et l'urine [Galeazzi et al, 2003].

Il a été montré également que les différentes procédures thérapeutiques et les traumatismes peuvent entraîner la libération d'ADN libre dans la circulation [Bettegowda et al, 2014].

Plus récemment, les ADN circulants se sont avérés porter une partie de la même information moléculaire que les biopsies tissulaires [El Messaoudi, 2016].

Les étapes clés de la découverte de l'ADNc sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Les étapes clés de la découverte de l'ADNc.

1948	Identification d'ADN dans le sang	[Mandel P, 1948]
1965	Implication de l'ADNc dans l'oncogenèse	[Bendich, 1965]
1966-1975	Détection de concentrations élevées d'ADNc chez des patients atteints de lupus, polyarthrite rhumatoïde ou de leucémie	[Tan EM, 1966-Steinman, 1975]
1977	Découverte de l'aspect pronostique des concentrations d'ADNc en fonction du stade tumoral	[Leon, 1977]
1989	Description de similitudes entre l'ADNc et l'ADN tumoral pour un patient donné	[Stroun M, 1989]
1994-1999	Identification de la présence d'altérations moléculaires dans l'ADNc	[Sorenson, 2000-Anker, 1999]
2000-2010	Rôle diagnostique et pronostique de l'ADNc dans des pathologies variées.	[Chang, 2003-Hu L, 2010]

Ces acides nucléiques peuvent être des ARN, des micros ARN (miARN) circulants, des ARN messagers circulants, des ADN nucléiques et des ADN circulants.

II. L'ADN circulant :

Une électrophorèse d'acides nucléiques extraits de plasma a permis de mesurer la taille des ADN double brin circulants. Leur poids moléculaire est très variable. Ces fragments d'ADN ont des poids moléculaires distinctement plus faibles que les ADN génomiques. [Jahr S, 2001]

La présence de l'ADN circulant est physiologique mais sa concentration augmente significativement lors des processus tumoraux, et une fraction de cet ADN libre est alors au moins partiellement d'origine tumorale : on parle d'ADN tumoral circulant (ADNtc). C'est un matériel tumoral facilement disponible via une simple prise de sang. [Schwarzenbach H, 2011]

De l'ADN libre circulant (ADNc) dérivant de la tumeur peut être isolé dans le plasma des patients présentant un cancer. Cet ADNtc permet un accès indirect à la tumeur puisqu'il porte les mêmes caractéristiques génétiques et épigénétiques (tableau2) et permet ainsi une biopsie liquide. [El Messaoudi, 2016]

Tableau 2:La différence entre les deux fractions de l'ADNc dans la circulation :

ADN libre circulant (ADNc)	ADN tumoral circulant (ADNtc)
libéré par des cellules normales, identifiable chez des sujets sains dans différentes situations physiologiques	libéré par les cellules tumorales, Permet d'identifier des anomalies génétiques spécifiques de la tumeur, prouvant son origine

III. biopsie liquide:

Presque toutes les cellules d'un organisme multicellulaire libèrent divers types de vésicules (exosomes) et macromolécules (ADN, ARN, microARN...) dans les fluides physiologiques, tels que le sang, la salive, l'urine, les fluides ascitique et amniotique. Ils sont les principaux fragments de signalisation extracellulaires régulant de multiples processus physiologiques. Fait important, ces voies sont souvent dérégulées dans des processus pathologiques tels que le cancer. Selon la définition du dictionnaire du NCI (National Cancer Institute), la biopsie liquide est « un test effectué sur un échantillon de sang pour la recherche de cellules cancéreuses ou de fragments d'ADN provenant d'une tumeur et circulant dans le sang ».

L'un des grands avantages d'une biopsie liquide, au contraire de la biopsie de tissus, est l'utilisation de liquides facilement accessibles dont le prélèvement est en général, rapide et « non effractif » et cause relativement peu de douleur ou d'inconfort. Ainsi, les plusieurs prélèvements sanguins peuvent aider les médecins à comprendre les changements moléculaires qui se produisent dans une tumeur (fig.1).

- 1- Dans une biopsie de tissus les médecins prennent un échantillon qui vient directement d'une tumeur et vérifient s'il contient des cellules cancéreuses. La biopsie de tissus peut être douloureuse et invasive.
- 2- Dans la biopsie liquide : Les médecins prennent un échantillon de sang (ou d'un autre liquide corporel) et vérifient s'il contient des signes de cancer. La biopsie n'est pas invasive, se fait rapidement et cause moins de douleur.

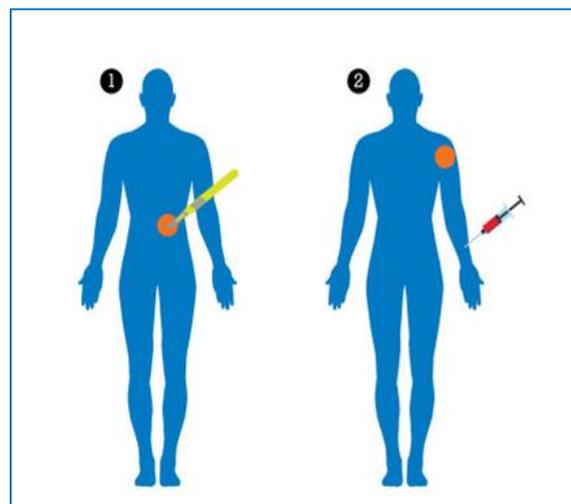


Figure 1: Différence entre une biopsie de tissus et une biopsie liquide. [SCC, 2017]

Le prélèvement d'une biopsie liquide permet donc d'extraire:

1. Des cellules cancéreuses qui se détachent des tumeurs et se retrouvent dans le sang (Cellules tumorales circulantes).
2. Des portions de cellules cancéreuses qui s'échappent et circulent dans le sang (Exosomes).
3. Des fragments de matériel génétique cancéreux qui se détachent des tumeurs et se retrouvent dans la circulation sanguine (ADN tumoral circulant).

IV. Source des ADN circulants :

En condition physiologique, l'ADN circulant peut provenir de la nécrose ou l'apoptose des lymphocytes ou d'autres cellules nucléés, le contenu des cellules apoptotiques est rapidement absorbé par les macrophages et d'autres acteurs cellulaires « cellules scavenger » et digéré par des DNases de type II dans les lysosomes [Choi JJ, 2005]. On peut formuler l'hypothèse que les fragments d'ADN libérés lors de l'apoptose puissent être d'abord ingérés par les macrophages puis digérés et sécrétés activement (fig.2). Des études in vitro ont montré que les lymphocytes peuvent libérer en continu de l'ADN dans leur milieu [Stroun M, 2001]. Ce qui pourrait expliquer la présence de très faibles concentrations d'ADN circulant chez les sujets sains. L'augmentation d'ADNc lors d'exercices physiques (syndrome de surentraînement) a été décrite et s'explique par la mort cellulaire massive [Breitbach S, 2012].

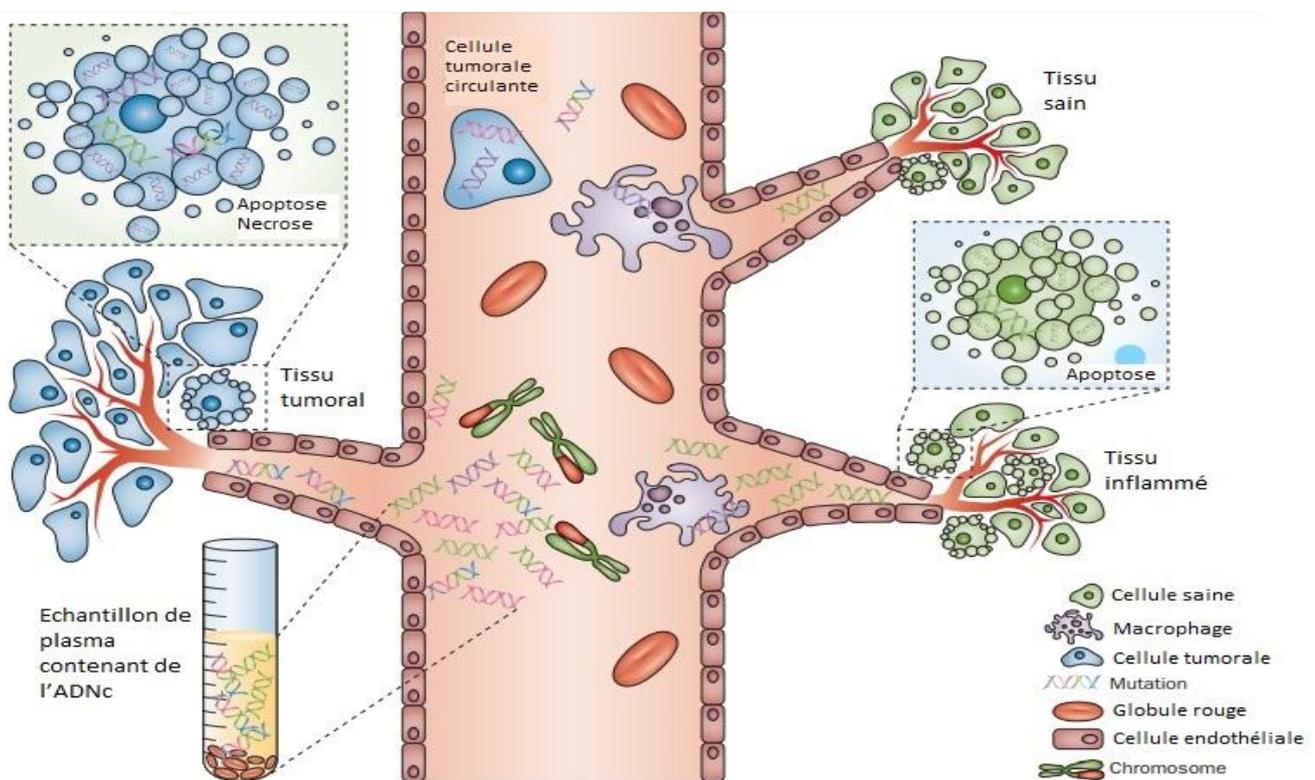
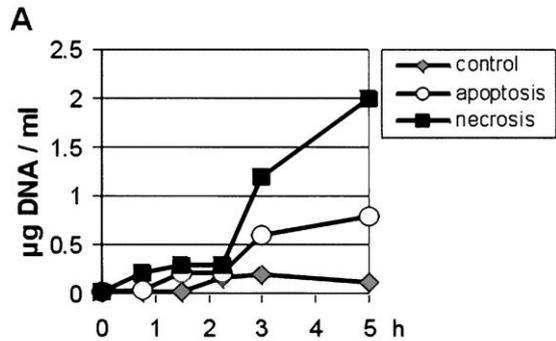
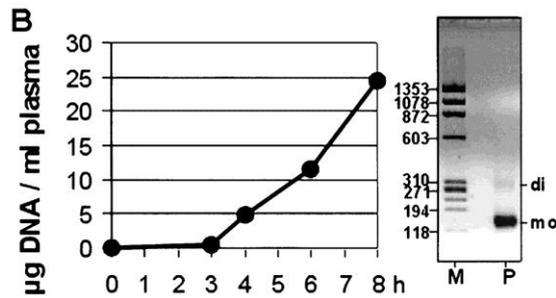


Figure 2 : Les différentes sources d'ADN circulant dans le sang. [Crowley E, 2013]

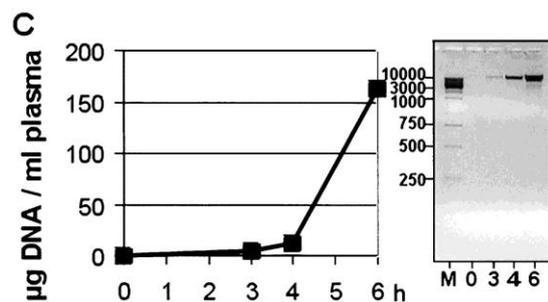
Les ADN tumoraux peuvent être présents en différentes quantités et tailles, en simples ou doubles brins et la libération de cet ADN peut se faire par l'apoptose ou par la nécrose des cellules tumorales [Schwarzenbach, 2011] (fig.3).



(A).Quantités d'ADN surnageantes après induction de l'apoptose (par la staurosporine) et de la nécrose (par la staurosporine et l'oligomycine).



(B). Cinétique des concentrations d'ADNc in vivo après induction de l'apoptose par anti-CD95 chez le rat et profil électrophorétique des fragments isolés.



(C). Cinétique des concentrations d'ADNc in vivo après induction de nécrose cellulaire par acétaminophène chez le rat et profil électrophorétique des fragments isolés.

Figure 3 : Evolution des concentrations d'ADNc et de leur profil de taille dans un modèle murin après induction de l'apoptose et de la nécrose. [Jahr, 2001]

V. Caractéristiques générales des acides nucléiques circulants :

Les ADN circulants libres sont essentiellement d'origine hématopoïétique et sont présents chez les individus sains à des concentrations comprises entre 0 et 100 ng/ml de plasma avec une moyenne de 30ng/ml [Gormally E, 2007].

Pour permettre la circulation dans le sang des ADNc, il existe trois catégories de structures avec lesquelles l'ADNc peut se complexer et qui peuvent également assurer la protection des ADNc contre l'activité nucléasique et l'environnement extracellulaire. Il s'agit des particules à base de :

- ❖ vésicules (vésicules apoptotiques, exosomes),
- ❖ des complexes nucléosomes (ADN enroulé autour d'un octamère d'histones) et
- ❖ des complexes vitrosomes [Florent Mouliere,2012].

Les ADN circulants libres circulent également dans le sang sous forme de complexes nucléoprotéiques ou nucléolipoprotéiques et de plus, chez les personnes saines, une autre partie des ADNc est trouvée absorbée sur la surface des cellules sanguines.

La demi-vie des ADN circulants fœtaux dans le sang maternel a été observée et varie entre 4 et 30 min [Lo YM, 1999].

Des études chez les animaux ont montré que le foie, les reins et la rate peuvent être responsables de la disparition rapide de l'ADNc [Korabecna M, 2008] [Tamkovich SN, 2006], son élimination se fait en 2 étapes: une étape initiale plus rapide et une autre plus lente.

L'ADNc muté provenant des cellules tumorales est en fait très fragmenté comparé à l'ADN circulant non muté [Mouliere F, 2014].

VI. ADN circulant dans les pathologies autres que cancer :

En 1999, l'équipe de Lo a montré que chez les femmes enceintes porteuses de fœtus mâle, il est possible d'identifier les séquences fœtales dérivées Y [Lo YM, 1999]. Chose qui rend les ADNc utilisables dans le diagnostic prénatal d'aneuploïdie chez les femmes à haut risque.

Des études ont montré qu'en cas de traumatisme, d'AVC (Accident Vasculaire Cérébral) et de maladies auto-immunes (lupus ou polyarthrite rhumatoïde) il y a une augmentation des ADNc [Geiger S, 2006], [Amoura Z, 1997].

Récemment (en 2015), dans une étude multicentrique, il a été démontré que la détection de la trisomie 21 (syndrome de Down) par les ADNc a une très haute sensibilité et spécificité en

comparaison avec les méthodes de screening standards chez les femmes à haut risque (âge, antécédent familial), ce qui permet d'éviter le diagnostic existant pour cette maladie qui est très invasif [Norton ME, 2015]. Cette étude a montré que la probabilité de faux positif est 100 fois plus basse qu'avec les méthodes standards existantes.

VII. L'intérêt de la recherche d'ADN circulant :

Dans la plupart des cancers, les cellules tumorales sont caractérisées par des anomalies génétiques diverses, ce qui les distingue des cellules non-tumorales. Des études réalisées par l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), confirment l'intérêt de l'utilisation de ces anomalies moléculaires comme biomarqueurs pour guider les traitements anti-tumoraux et améliorer le pronostic de la maladie [Emily Crowley, 2013]. Chez les patients avec un cancer, les mutations de la tumeur initiale peuvent être recherchées dans le plasma, avant, pendant et après traitement. L'extraction d'ADN tumoral circulant et son évaluation va donc permettre :

1. La détection des altérations géniques :

L'ADN circulant peut être utilisé pour examiner l'instabilité des microsatellites (MSI), la détection et le suivi de multiples classes de mutations, la méthylation, le polymorphisme, le changement de l'intégrité (la taille) et la classification ou le sous-typage du cancer, grâce à son ADN codant et non codant [Tangkijvanich et al, 2007], [Naoyuki et al, 2006], [Schulz et al, 2006].

Une analyse qualitative de l'ADNc va donc nous permettre la détection non invasive d'altérations géniques liées à différents types de cancer, par exemple :

- les mutations touchant les gènes KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) dans le cancer colorectal, l'ADNc est retrouvé avec un pourcentage de 92% [Thierry AR, 2014].
- l'ADNc est retrouvé également dans 62 % des cancers du poumon muté EGFR (epidermal growth factor receptor) [Qiu, 2015].

2. La détection des stades de cancer:

Puisque sa concentration est corrélée avec le stade, plus ce dernier est élevé plus la quantité d'ADNc est importante. Cette augmentation est expliquée par un problème de vascularisation (Car les vaisseaux ne peuvent pas suivre l'augmentation de taille de la tumeur ce qui provoque une hypoxie qui active à son tour des mécanismes apoptotiques p53-dépendante et p53-indépendante).

Une étude quantitative a détecté chez les patients de différents types de cancer avec un stade I une proportion d'ADNc de 47% alors que chez des patients en stade II, III et IV une proportion d'ADNc de 82% [Holdenrieder S, 1999]. Cela confirme que le plasma des patients avec des cancers métastatiques comporte beaucoup plus d'ADN circulants que le plasma des malades avec des cancers non métastatiques. Les ADN circulants trouvés chez les patients cancéreux ont des caractéristiques quantitatives et qualitatives particulières qui peuvent donner une idée sur plusieurs facteurs résumés dans le schéma 5 suivant :

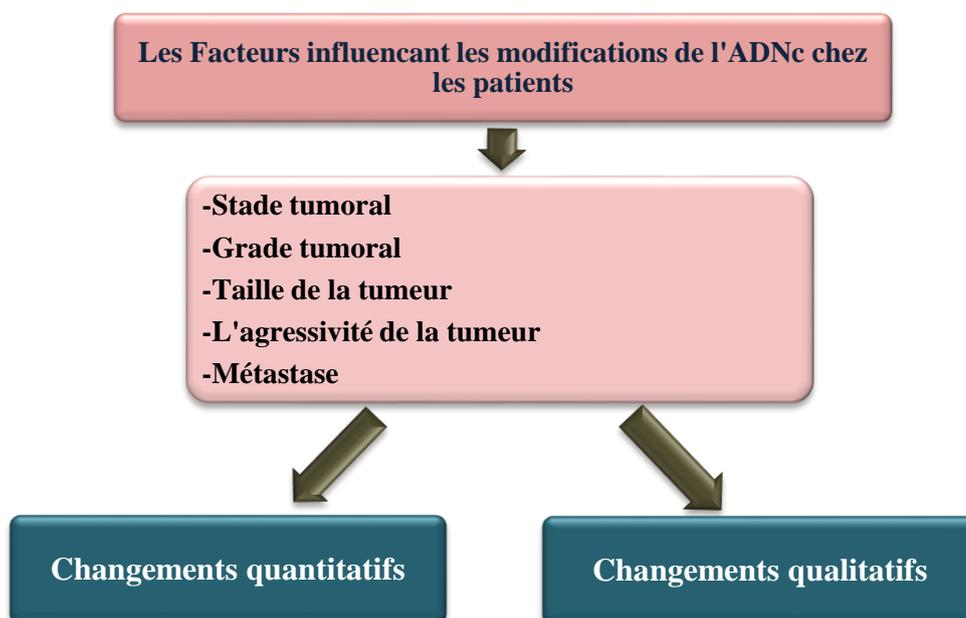
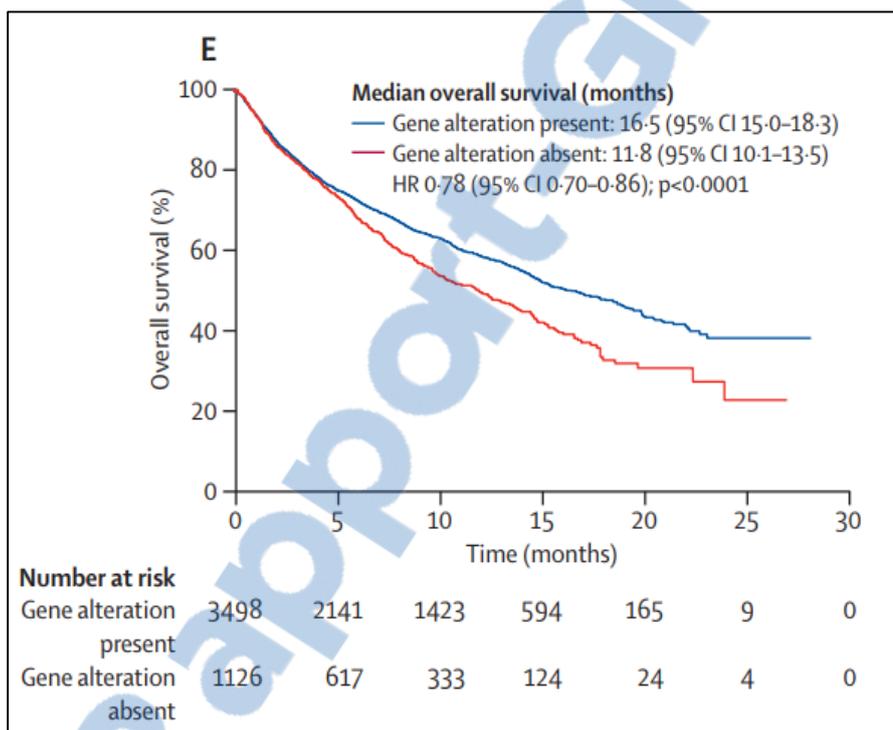


Figure 4: Les différents facteurs détectés à partir de l'ADNc.

3. Le suivi et la surveillance des récurrences :

Chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, le Dr. Jimmy Lin démontre dans des études récentes, que l'analyse d'ADNtc plasmatique peut constituer une approche fortement sensible et spécifique de la surveillance de la maladie. Cette analyse surpasse les moyens conventionnels de surveillance et se montre prometteuse en tant qu'outil pour guider la médecine de précision future [R. Charles Coombes, 2019].

L'étude du profil génomique et le suivi des patients à l'aide de l'ADN tumoral circulant, augmentent les chances de survie globale des patients avec et sans altération génétique moléculaire (fig.5):



-Courbe bleue

Courbe de survie globale représentant la durée de survie de patients pour lesquels une altération génétique est présente et le traitement a été adapté.

-Courbe rouge

Altération génétique absente.

Figure 5 : La survie globale des patients avec et sans altération génétique [Emily Crowley, 2013].

4. L'évaluation de la réponse au traitement:

Dans le plasma, la concentration d'ADNtc est sujette à une variation en fonction de temps (fig. 6).

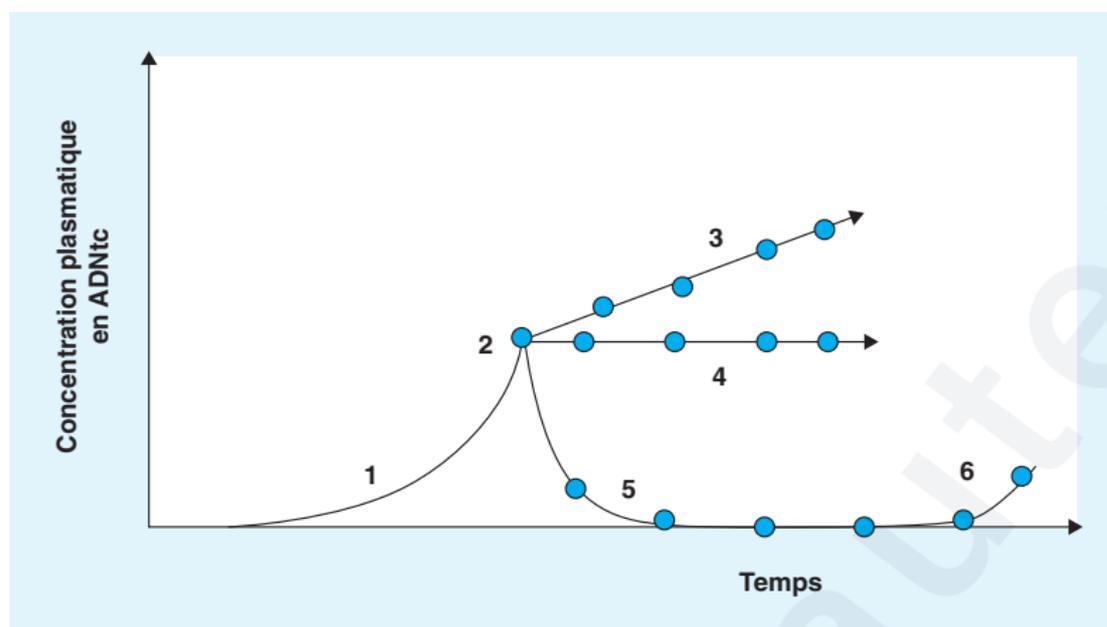


Figure 6 : Variation de la concentration d'ADNtc selon le traitement. [Audrey Vallée, 2015]

(1) La quantité d'ADNtc (concentration absolue des copies mutées ou fréquence allélique) augmente avec le développement de la maladie (cancer),

(2) Ces anomalies deviennent détectables.

Si le patient bénéficie d'un traitement à partir de ce point, plusieurs situations peuvent exister :

(3) La quantité d'ADNtc augmente ou (4) reste stable ; la plupart des études publiées à ce jour montrent que ces situations correspondent à des patients qui ne répondent pas au traitement utilisé. Dans ces cas-là, il conviendrait donc, dans la mesure du possible, de changer de traitement.

(5) À l'inverse, la quantité d'ADNtc peut diminuer jusqu'à devenir indétectable. Cette baisse est le plus souvent le signe d'une efficacité thérapeutique et est associée à une réponse clinique/radiologique.

(6) Le traitement peut donc être poursuivi. Au bout d'un certain temps, l'ADNtc redevient détectable et sa concentration augmente. Cette « progression biologique » reflète la progression de la tumeur. Un nouveau traitement devrait être utilisé, et le cycle recommencerait au (2).

VIII. Avantages d'ADNc

La possibilité d'isoler et d'enrichir les ADN dérivés de tumeurs dans des échantillons plasmatiques complexes va pouvoir donner des avantages indénombrables grâce à sa préparation facile, rapide et moins coûteuse. Il est considéré comme une source potentielle d'informations pour la détection du cancer et l'évaluation de la progression tumorale et des métastases.

Une analyse quantitative du taux de l'ADN circulant pourrait donc:

- Renseigner sur la présence ou l'absence d'un cancer
- Suivre le développement de la tumeur
- Être le signe d'une éventuelle rechute.

La sous-représentation de l'hétérogénéité d'une tumeur et la faible disponibilité des échantillons signifient que les biopsies tissulaires ont une valeur limitée pour l'évaluation de la dynamique de la tumeur aux stades avancés de la maladie [Emily Crowley, 2013]. Or, une simple prise de sang de 5mL a un avantage qui est la possibilité de réaliser l'analyse sanguine à tout moment du traitement tout au long de la maladie, à presque tous les stades de la prise en charge des patients atteints de cancer et de présenter une invasivité nettement réduite [Schwarzenbach H, 2011].

Un avantage majeur de l'isolement d'ADNc est le diagnostic précoce ; c'est l'une des stratégies clés pour freiner le cancer, chez des individus pré-symptomatiques. Un simple prélèvement du sang suggère la possibilité d'une analyse et l'identification de l'ADNc comme outil de détection et de dépistage plus précoce. La surveillance parallèle de multiples mutations peut augmenter la sensibilité de la détection de l'ADNc et peut être utilisée pour évaluer l'évolution clonale de la maladie du patient et peut identifier des mutations de résistance avant que la progression clinique ne soit observée [Jonathan C. M. Wan, 2017].

En résumé, l'ADNc possède les caractéristiques d'un marqueur tumoral. Dans son application théranostique, l'ADN circulant offre une alternative rapide et de prélèvement aisé au matériel tissulaire. La spécificité de l'analyse est primordiale, afin d'éviter l'administration à un patient d'un traitement qui serait inefficace.

L'analyse de l'ADNtc présente plusieurs avantages qui peuvent être résumés dans le schéma 7 suivant :

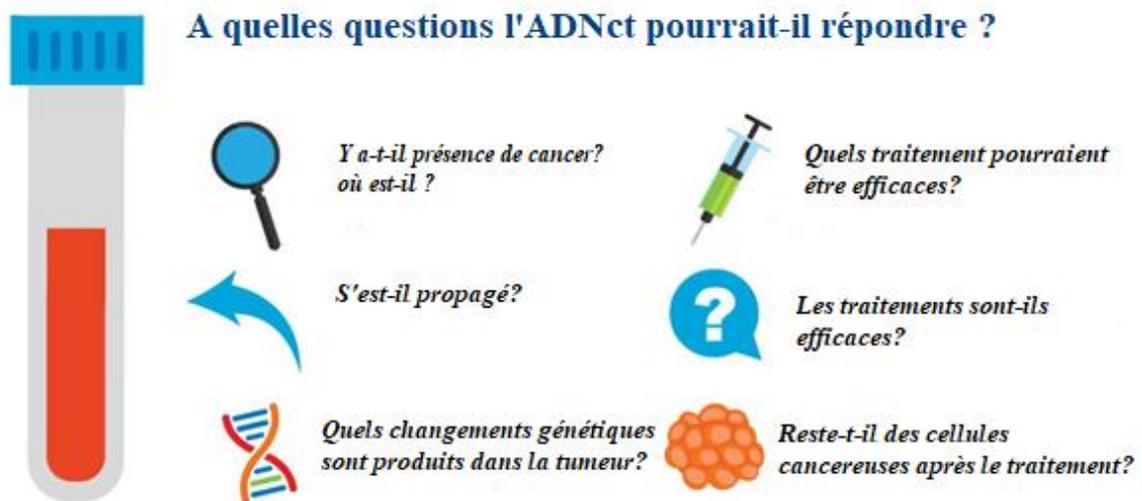


Figure 7: les différentes questions à quoi peut répondre l'ADNtc. [SCC, 2017]

Cette biopsie peut être utilisée pour la détection de cancers dans les stades précoces, pour le suivi de traitement, le diagnostic, la décision thérapeutique et le suivi des patients atteints de cancer pour la détection de résistance aux traitements (fig.8) [Bettegowda, C., 2014].

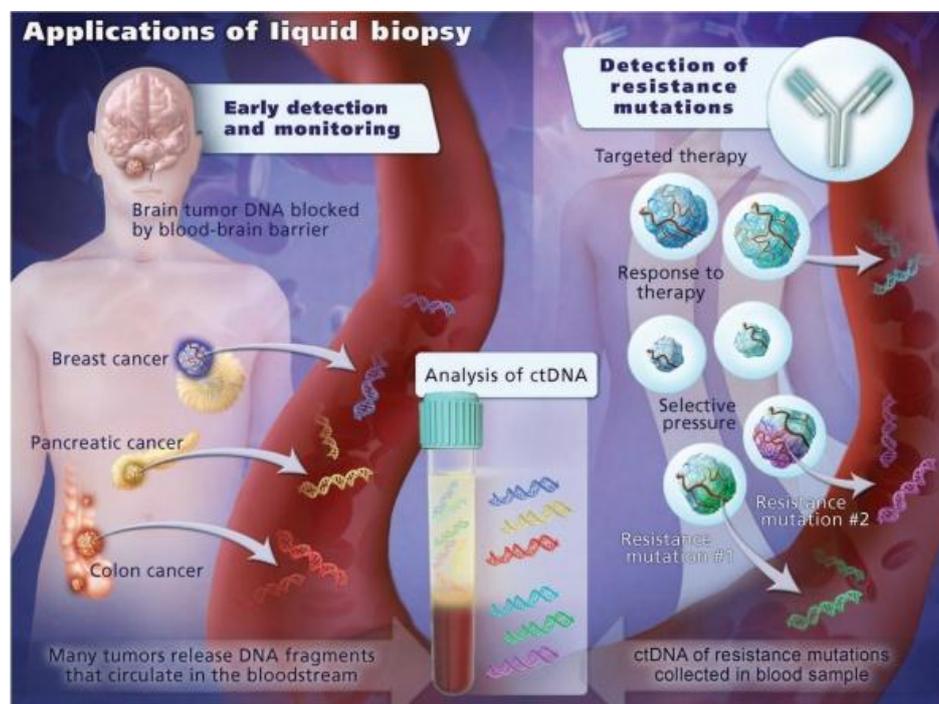


Figure 8: Application de la biopsie liquide. [Bettegowda et al, 2014].

MATERIEL ET METHODES

Mon travail va consister à mettre au point la technique d'extraction de l'ADN circulant à partir du sang chez des patientes atteintes de cancer de sein au CHU de Fès afin de mettre en évidence une mutation somatique qui peut être évaluée dans le cadre du suivi de la tumeur.

Ces méthodes d'extraction doivent également être mises en place facilement à l'hôpital dans le cadre du soin courant.

Pour mettre en évidence la présence de l'ADNc dans la circulation, nous nous sommes basés sur le sang des patientes atteintes de cancer de sein.

Un prélèvement sanguin périphérique chez une patiente a été collecté. Chez la même patiente, l'ADNc a été extrait à partir du plasma, et l'ADN génomique à partir des leucocytes. La partie pratique va consister à réaliser différents tests pour l'extraction de l'ADN circulant et l'ADN génomique et de les comparer par la suite. Les différents tests réalisés se résument dans le tableau suivant :

Tableau 3: Les différents essais utilisés pour l'extraction d'ADNc.

Le travail a consisté en 5 essais différents :				
En utilisant le kit PureLink™		En utilisant le kit MagMAX™		
Sang normal et congelé	Tubes traités par EDTA/ héparinés	Sang congelé	Sang frais dans des tubes héparinés	Sang frais dans des tubes traités par EDTA

I. Etapes pré-analytiques pour l'extraction de l'ADNc:

Le plasma sanguin est obtenu dans les 3 premières heures après le prélèvement, par 2 centrifugations de faible et de forte vitesse, à température ambiante puis congelé à -80 °C.

Il sera décongelé et centrifugé à température ambiante au moment de l'extraction (fig.9).



Figure 9 : Recommandations et étapes pré-analytiques pour l'extraction de l'ADNc.

II. Méthodes d'extraction :

1) Isolement de l'ADN normal à partir des leucocytes :

a. Principe :

L'extraction de l'ADN génomique a été faite à l'aide du kit PureLink™ (référence : K1820-01, K1820-02), son protocole est basé sur la liaison sélective de l'ADN à une membrane à base de silice en présence de sels chaotropes. Le lysat est préparé à partir du sang, les cellules sont digérées avec la protéinase K à 60°C en utilisant une formulation de tampon de digestion optimisée facilitant la dénaturation des protéines et renforçant l'activité de la protéinase K. Le lysat est mélangé à l'éthanol et au tampon de liaison génomique qui permet une forte liaison de l'ADN avec la colonne de rotation.

L'ADN se lie à la membrane à base de silice dans la colonne et les impuretés sont éliminées par lavage en profondeur avec des tampons de lavage. L'ADN génomique est ensuite élué dans du tampon d'éluion à faible teneur en sel.

b. Protocole :

Dans un tube Eppendorf de 1,5ml, un volume de 200µl du sang a été mélangé avec 20µl de la protéinase k et 200µl de la solution de lyse, vortexé puis incubé pendant 10 min à 60°C. Par la suite, une série de lavages a été effectuée; à l'aide de 200µl de l'éthanol absolu dans un premier temps. Par la suite, le mélange est mis dans une colonne PureLink™ et centrifugé 1min à 8000 rpm, le filtrat qui se dépose dans le tube collecteur fourni par le kit doit être jeté à chaque fois. Un deuxième lavage se fait avec 400µl d'une solution tampon Wash Buffer1, le mélange est centrifugé 1min à 8000rpm et le culot est jeté. Le dernier lavage est réalisé avec 400µl de tampon Wash Buffer 2 et centrifugé 3min à 14000rpm.

Le résultat de lavage est mis dans un tube eppendorf de 1,5ml et 70µl de tampon d'éluion sont ajoutés. L'ensemble est incubé 1min à température ambiante. Une dernière centrifugation d'1min à 8000rpm est réalisée pour récupérer l'ADN génomique (fig.10)

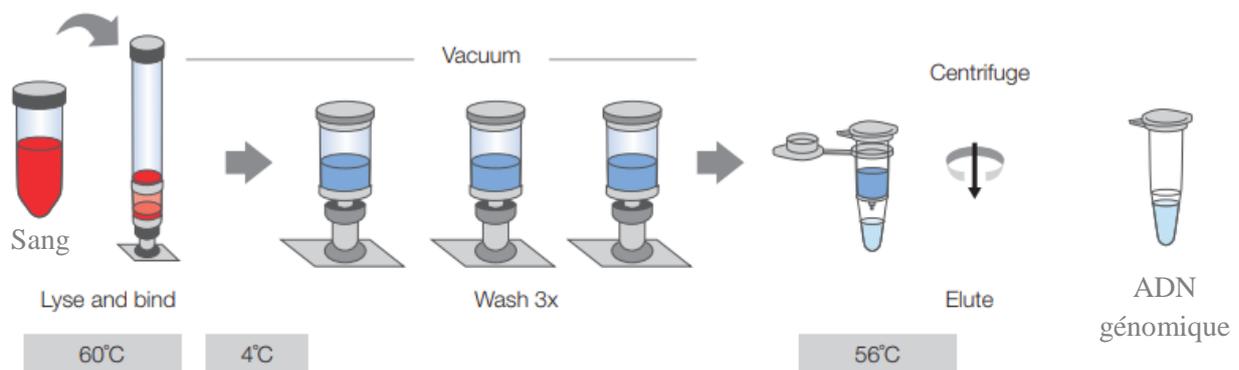


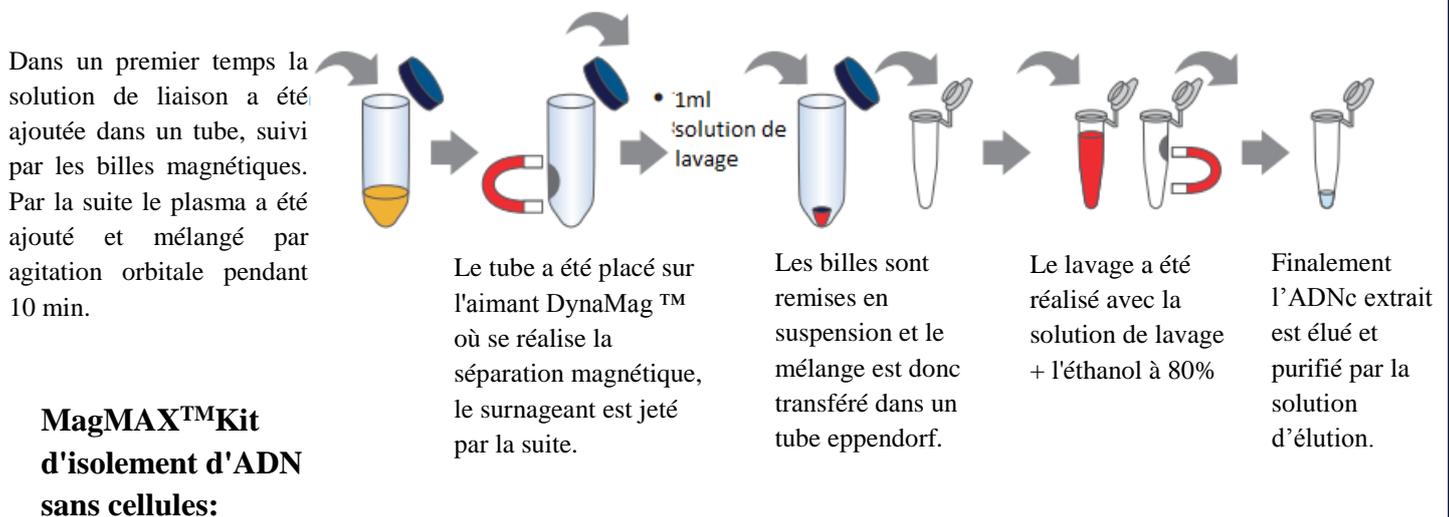
Figure 10: Protocole traditionnel d'extraction de l'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit PureLink™.

2) L'isolement de l'ADNc:

a. Principe :

L'extraction de l'ADNc a été réalisée à partir du plasma à l'aide du kit **MagMAX™ Cell Free DNA Isolation Kit** (référence A29319) par une méthode basée sur une technique de séparation magnétique ; Cette méthode est basée sur la liaison réversible de l'ADN à une surface de particule magnétique (Magnetic Beads) recouverte par un anticorps liant l'ADN ou un groupe fonctionnel interagissant spécifiquement avec l'ADN (Lysis/Binding Solution). Après liaison de l'ADN, les billes sont séparées des autres composants cellulaires contaminants, lavées à l'aide de la solution de lavage MagMAX™ Cell-Free DNA Wash Solution et finalement l'ADNc purifié est élué par extraction à l'éthanol et MagMAX™ Cell-Free DNA Elution Solution (fig.11).

b. Protocole :



La durée de la technique est de 40min maximum à température ambiante

Figure 11: Protocole du kit de séparation MagMAXCell-Free DNA Isolation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

III. Dosage : Méthodes de quantification de l'ADNc :

L'objectif de cette étape est de valider la qualité et la quantité de ces ADN après leur purification. Le NanoDrop® (un spectrophotomètre à micro-volume) qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet) a été utilisé. Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm.

Notre ADN est donc qualifié de pure si le ratio 260/280 est compris entre 1,8 – 2,0.

- ❖ Si ce rapport est >2 : Il y a contamination par les ARN,
- ❖ Si le rapport est <1,8 : Il y a donc contamination par des protéines.

IV. PCR = Technique d'amplification en chaine par polymérase:

La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) a été utilisée pour amplifier le gène BRCA1 à partir des traces d'ADN génomique et d'ADNc extraits, afin de vérifier la réussite de l'extraction.

1) Principe de base d'une PCR :

La PCR est une technique d'amplification enzymatique de l'ADN in vitro par une ADN polymérase (La Taq polymérase) et des amorces délimitant la région à amplifier à partir d'une faible quantité d'acide nucléique.

La PCR est basée sur le mécanisme de répllication de l'ADN in vivo.

2) Choix du gène de référence :

Le gène BRCA1 (abréviation de *breast cancer 1*) est celui choisi pour l'étude. Il est localisé sur le chromosome 17q21. C'est un gène suppresseur de tumeur dans le cancer du sein. Selon l'Institut National du Cancer, les mutations du gène BRCA1 sont responsables d'environ 40% des cancers de sein héréditaires.

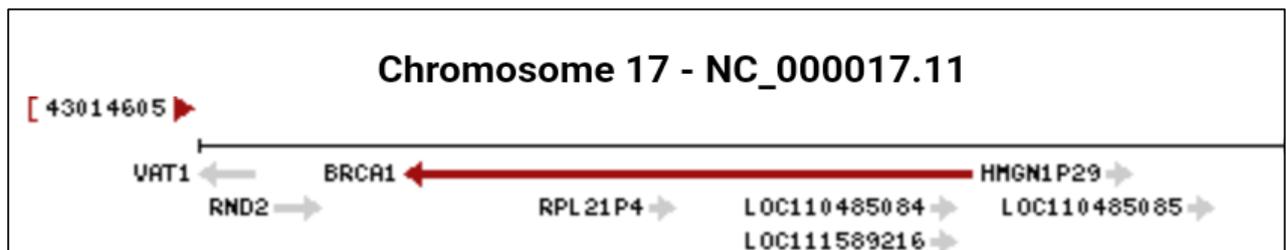


Figure 12 : La région génomique du gène BRCA1 [NCBI, 2019].

3) Choix des amorces :

Deux couples d'amorces ont été choisis pour la détection et l'amplification de l'exon10 du gène BRCA1.

Tableau 4: les caractéristiques des couples d'amorces utilisées dans la PCR.

	Séquence	Tm	Origine (société)
Exon10A Amorce Sens	5' TGT TAT GTT GGC TCC TTG CT 3'	66	Invitrogene primers
Exon10B Amorce sens	5' TCT GCT TTC TTG ATA AAA TCC T 3'	64	Invitrogene primers

Afin de garantir la réussite de la PCR, chaque couple d'amorce a été modélisé pour permettre l'amplification de petits fragments d'ADN en optimisant au maximum la température de fusion (Tm) à 60°C. (Ta= Tm-5°C).

4) Protocole :

Le mélange réactionnel de chaque tube est résumé dans le tableau 4 suivant:

Tableau 5 : Le mélange réactionnel utilisé pour PCR

MELANGE POUR UN TUBE	
	Volume (µl)
Eau pure	12
Le Mastermix DreamTaq Green PCR	10
Amorce F	1
Amorce R	1
ADN/ADNc	1

Le Mastermix **DreamTaq Green PCR** comprend : L'ADN Taq polymérase, les dNTP, le tampon (Buffer), MgCl₂ en plus de la solution de charge (alourdisseur + marqueur de mobilité) pour le chargement direct du produit de PCR sur gel d'agarose. N.B: Il ne faut pas ajouter l'ADN à l'intérieur de la salle PCR afin d'éviter toute contamination.

En parallèle, deux tubes témoins négatifs (Sans ADN) ont été préparés. L'ensemble des tubes utilisés dans la PCR sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 6: Les différents tubes PCR.

Amorce 1=Exon10A			Amorce 2=Exon10B		
Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6
Témoin négatif	L'ADN circulant	L'ADN normal	Témoin négatif	L'ADN circulant	L'ADN normal

La réaction d'amplification PCR se déroule dans un Thermocycleur programmé de façon à réaliser 35 cycles ;

Tableau 7: Condition d'amplification du gène pour les différentes amorces.

Dénaturation initiale	95°C	3min	} 35cycles
Dénaturation	95°C	30sec	
Hybridation	60°C	30sec	
Elongation	72°C	1min	
Elongation finale	72°C	9min	

La phase de dénaturation initiale: Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, de casser les structures secondaires et de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution. Cette étape ne se fait qu'une seule fois.

La 2^{ème} phase se fait en 3 étapes pour 35 cycles ;

- La 1^{ère} étape est celle de **dénaturation** de l'ADN, elle permet de déshybrider la double hélice.
- La 2^{ème} étape : **Phase d'hybridation des amorces** selon la température d'hybridation des amorces utilisées.
- 3^{ème} étape : **Phase d'élongation** cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire de l'ADN à partir des dNTPs présents dans le milieu réactionnel.

A la fin de cette étape, un nouveau cycle commence et chacun des cycles connaît une phase de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. Après les 35 cycles, la réaction se termine par une phase d'élongation terminale. Cette réaction se déroule en 2 heures au maximum. Le produit PCR est par la suite récupéré et vérifié par électrophorèse.

V. Analyse d'ADN par électrophorèse en gel d'agarose :

Le but de cette étape est de savoir dans un premier temps, si l'amplification du gène a réussi et dans un deuxième temps, de comparer l'information que donnent l'ADNc et l'ADN normal.

Protocole :

- 1- Préparation du gel d'agarose à 2% : 2g d'agarose ont été pesés, et mélangés avec 100ml du tampon de migration TBE (Tris borate EDTA), le mélange a été solubilisé par chauffage et puis 4µl du BET ont été ajoutés (Le Bromure d'Ethidium qui s'intercale entre les bases nucléotidiques ; pour pouvoir visualiser le gène). Le mélange est coulé par la suite dans une cuve d'électrophorèse avec un peigne qui va être retiré après solidification du gel.
- 2- Dépôt des échantillons: le produit PCR est déposé directement dans un puits du gel (6µl d'ADN) tout en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette. Le support avec le gel chargé a été placé dans le dispositif d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode (pôle noir). La cuve doit être remplie de tampon TBE qui doit être versé délicatement et très lentement. Après la fermeture de la cuve, la migration sera lancée à un voltage de 130mV. La migration se poursuit jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel
- 3- La visualisation des bandes d'ADN se fait par exposition à des rayons UV à l'aide d'un Transluminateur.

RESULTATS ET DISCUSSION

I. L'extraction de l'ADNc :

Afin d'arriver à une méthodologie d'extraction d'ADN circulant efficace, facile, rapide et qui peut être utilisée dans la routine pour le suivi des patients atteints de cancer à partir d'un prélèvement sanguin, plusieurs essais ont été mis en place dans le but de valider une qualité et une quantité d'ADNc suffisante et utilisable pour l'étude au sein de laboratoire de génétique et biologie moléculaire au CHU Fès.

Les concentrations d'ADNc ont été mesurées à l'aide du Nanodrop (spectrophotomètre).

1) Essai N°1:

Les premiers essais ont été faits à l'aide du kit habituel pour l'isolement d'ADN normal (PureLink™) pour l'extraction d'ADNc à partir du plasma issu du sang congelé.

Les résultats de dosage donnent une concentration d'acides nucléiques de **9 ng/ml** qui est une concentration presque nulle. Ceci montre que la technique utilisée n'est pas adaptée pour l'extraction de l'ADNc.

La concentration reste nulle même en utilisant du sang frais prélevé dans des tubes traités par de nombreux anticoagulants. De ce fait on peut bien conclure que le kit d'isolement d'ADN génomique n'est pas efficace pour l'extraction d'ADNc.

2) Essai N°2: Par un kit spécifique pour l'isolement d'ADNc (MagMAX™).

Pour cette technique, le même sang congelé a été évalué, et le dosage donne une concentration d'ADNc de **20 ng/ml**. Ce type d'extraction utilisant le kit MagMAX™ est **meilleur que celui utilisant Purelink™**. Ceci peut être expliqué par le fait que les billes magnétiques se lient à l'ADN d'une façon plus efficace que les filtres en silice, ce qui permet d'obtenir des rendements plus élevés et plus constants. De plus, étant donné que les filtres et les collecteurs de vide ne sont pas utilisés, il n'y a aucun risque que des particules cellulaires encrassent ces articles pendant le processus d'extraction. En outre, il n'y a pas de risque de colmatage de la membrane au cours du processus d'extraction. Ce problème de colmatage est particulièrement préoccupant avec des échantillons riches en protéines de grand volume tels que le plasma.

Cependant, ce rendement reste toujours faible et insuffisant pour être amplifié par PCR.

3) Essai N°3:

Dans cet essai, le plasma utilisé a été prélevé à partir du sang frais dans des tubes héparinés => Les résultats sont beaucoup plus importants (**80 ng/ml**), chose qui nous permet de conclure que l'extraction permettant d'isoler l'ADNc doit être réalisée dans les heures suivant le prélèvement afin d'éviter toute dégradation car les cycles de congélation-décongélation peuvent altérer les acides nucléiques.

Castelli et son équipe confirment dans des études récentes (2018) que la détection de l'ADN tumoral circulant repose sur l'analyse d'échantillons de plasma frais, centrifugés le plus rapidement possible suivant le prélèvement sanguin (au maximum quelques heures après).

Or, plusieurs travaux [El Messaoudi et al., 2013] prouvent que les cycles congélation-décongélation sont vivement déconseillés lors de l'extraction d'ADNc.

L'inconvénient de cette méthode est le fait que l'ADNc obtenu est contaminé avec des protéines car le ratio 260/280 donne une valeur de $1,36 < 1,8$ (fig.15), qui le rend non exploitable en PCR.

4) Essai N°4 :

Les mêmes étapes précédentes ont été réalisées en changeant un seul facteur : le tube de prélèvement a été traité par EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) comme anticoagulant.

Les résultats de dosage sont restés les mêmes (une concentration d'ADNc= **80ng/ml**) or le rapport 260/280 a donné une valeur de $1,97$ (fig.14) => meilleur résultat par rapport au tube hépariné. Notre ADNc est donc qualifié de pur et il peut bien être utilisé dans la PCR.

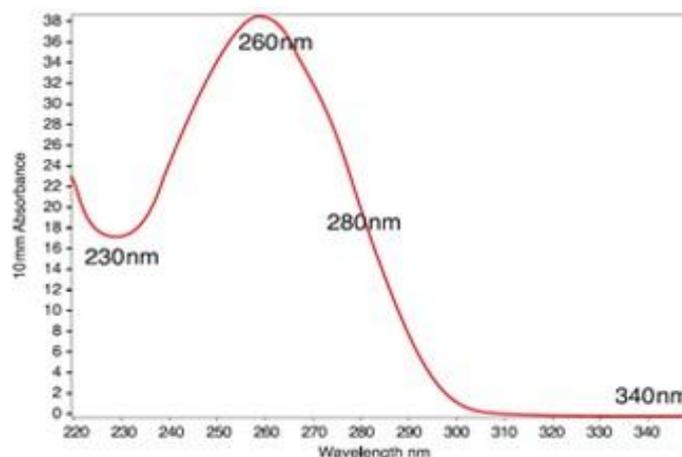


Figure13: le spectre d'absorption caractéristique d'ADN pur.

La figure 15 montre les différents spectres d'absorption possibles qu'on puisse obtenir après une extraction d'ADN.

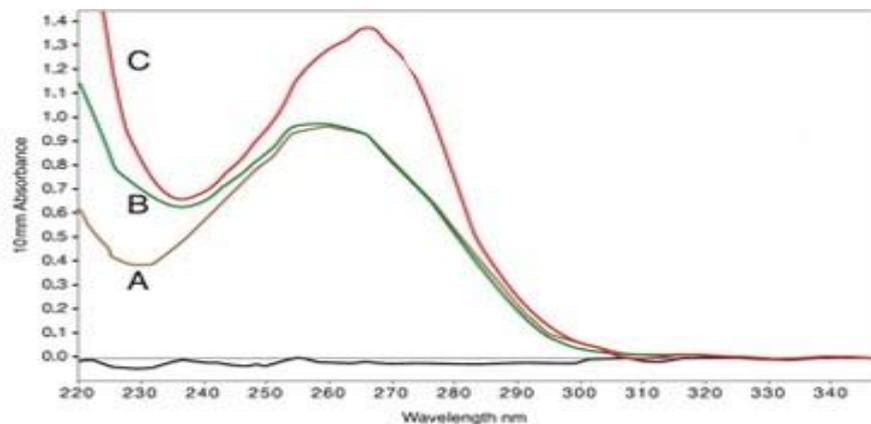


Figure 14: Spectre d'absorption d'ADN.

- (A) sans contamination,
- (B) contaminé par les ARN,
- (C) contaminé par les protéines.

Donc pour la réalisation de cette technique il est recommandé d'utiliser des tubes contenant de l'EDTA comme anticoagulant lors des prises de sang. Il permet une meilleure conservation de l'ADN, évite une trop grande contamination par les globules blancs et n'inhibe pas la réaction de PCR comme l'héparinate de lithium.

Cette avancée est confirmée par d'autres travaux qui ont utilisé l'EDTA et conclu que l'ADNc isolé avec le kit d'isolement d'ADN sans cellules MagMAX pourrait être stable pendant 6 heures pour le sang total EDTA et il peut être possible de garantir environ 48 heures de temps par rapport au stockage du sang total EDTA à 4 ° C pour l'analyse de l'ADNc si le plasma EDTA est immédiatement séparé et stocké à 4 ° C. [Tae-Dong Jeong, 2019]

Finalement pour savoir le volume du prélèvement nécessaire pour une quantité suffisante d'ADNc, un tube de 2ml du sang a été testé => Quantité d'ADNc non suffisante pour la réalisation de PCR.

Donc il faut prendre un volume de 4ml du sang périphérique.

II. L'amplification du gène BRCA1:

Pour valider les résultats d'extraction et pouvoir comparer l'ADN tumoral circulant avec l'ADN normal provenant des leucocytes. L'exon10 du gène BRCA1 a été amplifié en utilisant deux couples d'amorces différents. Les résultats PCR sont visualisés par la suite par électrophorèse sur gel d'agarose :

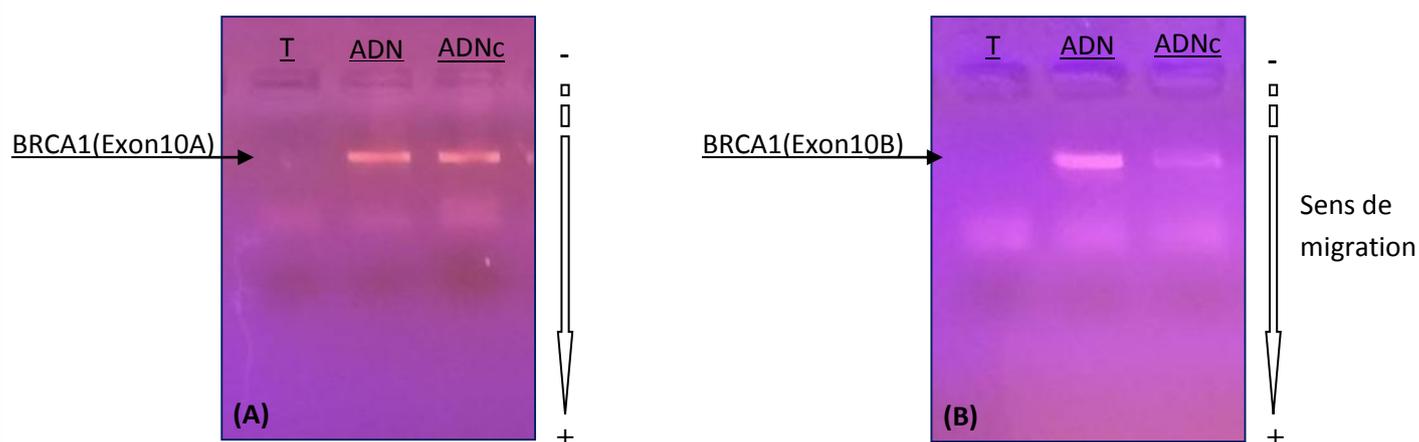


Figure 15: Images du gel d'agarose après électrophorèse pour (A) l'exon10A et (B) l'exon10B.

Le gène BRCA1 est un gène de très grande taille, il est composé de 24 exons recouvrant plus de 80 kb d'ADN génomique. Sa séquence codante est constituée de 22 exons et donne naissance à un ARN messager d'une longueur de 7,8 kb [Y Miki, 1994].

Les puits T contiennent la solution témoin de la réussite de l'amplification ; les témoins négatifs pour les deux amorces donnent une seule bande correspondante aux amorces utilisées dans la réaction PCR donc il n'y a aucune contamination dans la technique.

Les puits ADN et ADNc contiennent l'exon10 d'une taille de 77 pb amplifié respectivement à partir de l'ADN génomique extrait des leucocytes et l'ADN circulant extrait du plasma, leur migration donne deux bandes ; les bandes en avant correspondent aux amorces car elles ont une taille plus faible que celle de l'exon, les bandes qui suivent correspondent donc à l'exon 10 du gène BRCA1 amplifiées à l'aide de deux couples d'amorces différents et sont dans le même niveau ce qui nous permet de conclure que l'ADN tumoral porte la même information que l'ADN normal et peut être utilisé comme un fort biomarqueur tumoral facilement exploitable.

Les bandes de l'exon 10A sont plus intenses que celles de l'exon10B, ce qui témoigne d'une amplification meilleure.

III. Utilités cliniques potentielles de l'ADN tumoral circulant

L'ADN tumoral circulant présente divers intérêts théoriques (Fig.16), qui ont fait l'objet d'études de validité clinique. Les améliorations apportées aux méthodes génomiques et moléculaires élargissent la gamme d'applications potentielles de l'ADNtc.

Après un exposé des méthodes d'extraction d'ADNtc, notre étude présente la place potentielle de l'ADN tumoral circulant en cancérologie.

Toutes les applications cliniques de l'ADNtc dont résumé sous forme de la figure 16 ;

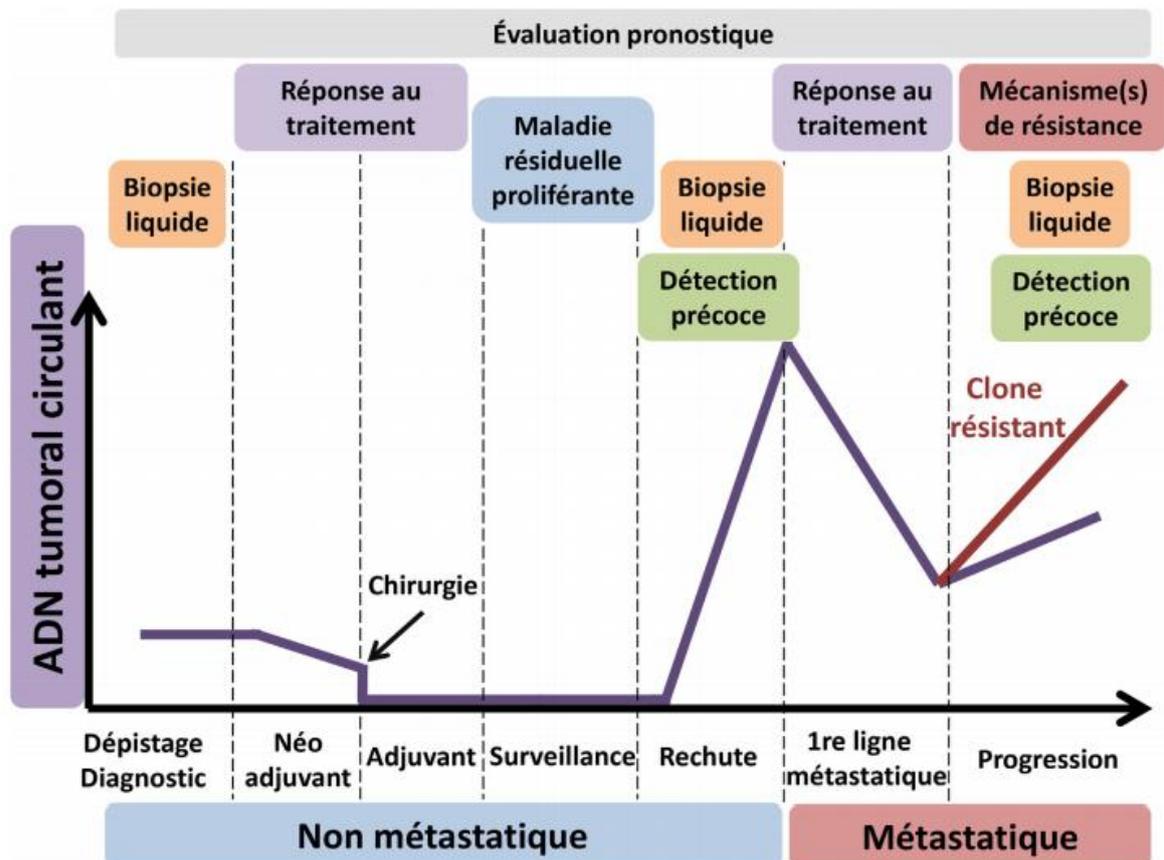


Figure 16: Les applications potentielles de l'ADN tumoral circulant selon le contexte clinique.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous avons mis au point une méthodologie d'extraction d'ADN circulant, cette méthode offre une sensibilité et une spécificité en plus de sa rapidité et son caractère automatisable pour la récupération de l'ADNc à partir d'un volume faible de plasma. Il est donc possible d'intégrer cette méthode dans la routine du dépistage de cancer chez les personnes saines, en évaluant la quantité des ADN circulants avec une simple prise de sang.

L'étude est toujours en progression et les résultats de l'amplification PCR à partir de l'ADNc extrait du plasma vont être évalués par séquençage afin de détecter les différentes mutations qui touchent le gène BRCA1 chez les patientes atteintes de cancer de sein. La détection et la recherche des mutations sur l'ADNc seraient essentielles dans l'évaluation de la réponse au traitement et permettraient l'adaptation des traitements en fonction de l'apparition des résistances grâce aux différents types de biomarqueurs moléculaires (ADNc, cellules tumorales circulant, exosomes). Cette méthode peut être utilisée pour suivre l'avancement du cancer et la présence des métastases, tout ceci en diminuant la souffrance des patients et en rendant la surveillance plus accessible et économiquement plus intéressante. Des recherches avancées dans ce domaine vont nettement diminuer la mortalité par cancers.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amoura Z, Piette JC, Chabre H, Cacoub P, Papo T, Wechsler B, et al. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum anti nucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum.* 40(12):2217-25. **1997**

Anker P, Mulcahy H, Chen XQ, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer metastasis reviews.* 18(1):65-73. PubMed PMID: 10505546. **1999**

Audrey Vallée, Marc Denis, Judith Raimbourg, JaafarBennouna. ADN tumoral circulant et mutation EGFR T790M Volume 1, numéro 1. **2015**

Bettegowda, C. Sausen, M. Leary, R. J. Kinde, I. Wang, Y. Agrawal, N, Alani, R. M. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*, 6(224), 224ra24–224ra24.doi:10.1126/scitranslmed.3007094. **2014**

Bendich A, Wilczok T, Borenfreund E. Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science.* 148(3668):374-6. PubMed PMID: 14261529. **1965**

Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med.* 42(7):565-86. **2012**

Castelli, J., Cabel, L., Bidard, F.-C., Duvergé, L., & Bachet, J.-B. (2018). ADN tumoral circulant : principes, applications actuelles en radiothérapie et développement futur. *Cancer/Radiothérapie*.doi:10.1016/j.canrad. **2018**

Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *International journal of clinical chemistry.* 327(1-2):95- 101. PubMed PMID: 12482623. **2003**

Chiu RWK, Akolekar R, Zheng YWL, Leung TY, Sun H, Chan KCA, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ* ; 342:c7401. **2011**

Choi JJ, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. 115(1):55-62. PubMed PMID: 15819697. Pubmed Central PMCID: 1782131. **2005**

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 10(8):472–84. **2013**

El Messaoudi A. R. Thierry P. B. Gahan P. Anker M. Stroun Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. **2016**

Emily Crowley, Federica Di Nicolantonio, Fotios Loupakis Et Alberto Bardelli. Biopsie liquide: surveillance de la génétique du cancer dans le sang. *Nature Reviews Clinical Oncology* volume10, pages472 – 484. **2013**

Florent Mouliere & Alain R.Thierry. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. Pages S209-S215. **2012**

François-Clément Bidard, Tanja Fehm, Michail Ignatiadis, Jeffrey B. Smerage, Catherine Alix-Panabières, Wolfgang Janni, Carlo Messina, Costanza Paoletti, Volkmar Müller, Daniel F. Hayes, Martine Piccart, Jean-Yves Pierga. Clinical application of circulating tumor cells in breast cancer: overview of the current interventional trials. **2012**

Galeazzi M, Morozzi G, Piccini M, Chen J, Bellisai F, Fineschi S, et al. Dosage and characterization of circulating DNA: present usage and possible applications in systemic autoimmune disorders. *Autoimmun Rev*. 2(1):50-5. **2003**

Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Et Al. Nucleosomes In Serum Of Patients With Early Cerebral Stroke. *Cerebrovasc Dis*. 21(1-2):32-7. **2006**

Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *MutatRes*. 635(2-3):105-17. **2007**

Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, Kühl M, Schulz L, Busch M, Et Al. Apoptosis In Serum Of Patients With Solid Tumours. *Anticancer Res.* 19(4A):2721-4. **1999**

Hu L, Chen G, Yu H, Qiu X. Clinicopathological significance of RASSF1A reduced expression and hypermethylation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology international.* 4(1):423-32. PubMed PMID: 20305761. Pubmed Central PMCID: 2836437. **2010**

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research.* 61(4):1659-65. PubMed PMID: 11245480. **2001**

James D Watson, Francis HC. The structure of DNA Crick Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 18, 123-131. **1953**

Jimmy Lin Cheng-Ho , R. Charles Coombes , Karen Page , Raheleh Salari , Robert K. Hastings , Anne C. Armstrong , Samreen Ahmed , Simak Ali , Susan Jane Cleator , Laura M. Kenny ,Justin Stebbing , Mark J. Rutherford , Himanshu Sethi , Anna Rita Boydell et Ryan Swenerton. , Daniel Fernandez-Garcia , Kelly Gleason , Katie Sarah Goddard , David S Guttery, Zoe Assaf , Hsin-Ta Wu , Prashanthi Natarajan , David A Moore , Lindsay Primrose , Scott Dashner , Antony S Tin , Mustafa Balcioglu , Ramya Srinivasa , Svetlana Shchegrova ,Alexander G Olson , Dina Hafez , Paul Billings ,Alexey Aleshin , Farah Rehman , Bradley Toghill , Allison H Hills , Maggie C. Louie , Bernhard G. Zimmermann et Jaqueline A Shaw. Détection personnalisée de l'ADN de tumeur en circulation avant la récurrence métastatique du cancer du sein DOI: 10.1158 / 1078-0432.CCR-18-366. **2019**

Jonathan C. M. Wan, Charles Massie, Javier Garcia-Corbacho, Florent Mouliere, James D. Brenton, Carlos Caldas, Simon Pacey, Richard Baird & Nitzan Rosenfeld. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer* volume17, pages223–238. **2017**

Korabecna M, Opatrna S, Wirth J, Rulcova K, Eiselt J, Sefrna F, Et Al. Cell-Free Plasma DNA During Peritoneal Dialysis And Hemodialysis And In Patients With Chronic Kidney Disease. *Ann NY AcadSci.* 1137:296- 301. **2008**

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research.* 37(3):646-50. PubMed PMID: 837366. **1977**

Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 350(9076):485-7. **1997**

Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 64(1):218-24. **1999**

Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma DNA sanguin chez l'Homme. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales.* 142(3-4):241-3. PubMed. PMID: 18875018. **1948**

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

Naoyuki Umetani AEG. Prediction of Breast Tumor Progression by Integrity of Free Circulating DNA in Serum. *J Clin Oncol.* 24(26):4270-6. **2006**

NCBI BRCA1 Réparation de l'ADN BRCA1 associée [Homo sapiens (humain)] Gene ID: 672. **2019**

NCI dictionary of cancer terms Natl Cancer dictionaries.

Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA Analysis for Non invasive Examination of Trisomy. *N Engl J Med.* 372(17):1589-97. **2015**

OMS Organisation mondiale de santé cancer. **2018**

Qiu, M., Wang, J., Xu, Y., Ding, X., Li, M., Jiang, F., Xu, L., and Yin, R. Circulating Tumor DNA Is Effective for the Detection of EGFR Mutation in Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-analysis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 24, 206–212. **2015**

SCC. La biopsie liquide pour la détection précoce du cancer. *Société canadienne du cancer.* **2017**

Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation Of Endogenous Human Retroelements In Health And Disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 310:211-50. **2006**

Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-Free NucleicAcids As Biomarkers In Cancer Patients. *Nat Rev Cancer.* 11(6):426-37. **2011**

Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *The Journal of clinical investigation.* 56(2):512-5. PubMed PMID: 1150882. Pubmed Central PMCID: 436612. **1975**

Sorenson GD. Detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 6(6):2129-37. PubMed PMID: 10873061. **2000**

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*.46(5):318-22. PubMed PMID: 2779946. **1989**

Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Mulcahy HE, Anker P. Alu. Repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serumDNA: evidence for a preferential release from viable cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 945:258-64. PubMed PMID: 11708488. **2001**

Tae-Dong Jeong, M.D.1, Mi Hwa Kim, M.T.1, Sholhui Park, M.D.1, Hae-Sun Chung, M.D1, Jin Wha Lee, M.D.2, Jung Hyun Chang, M.D.2, Jungwon Huh, M.D.1. Effects of Pre-analytical Variables on Cell-free DNA Extraction for Liquid Biopsy. *Lab Med Online*.Vol. 9, No. 2: 45-56. **2019**

Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleicacid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*. 45(11):1732-40. PubMed PMID: 4959277. Pubmed Central PMCID: 292857. **1966**

Tangkijvanich P, Hourpai N, Rattanatanyong P, Wisedopas N, Mahachai V, Mutirangura A. Serum LINE-1 Hypomethylation As A Potential Prognostic Marker For Hepatocellular Carcinoma. *Clinica Chimica Acta*. 379(1-2):127-33. **2007**

Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, Et Al. Circulating DNA And Dnase Activity In Human Blood. *Ann N YAcadSci*. 1075:191-6. **2006**

Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, Et Al. Clinical Validation Of The Detection Of KRAS And BRAF Mutations From Circulating Tumor DNA. *Nat Med*. 20(4):430-5. **2014**

YM Dennis Lo. Circulating nucleic acids in plasma and serum, an overview *Annals of the New York Academy of Sciences* 945 (1), 1-7. **2001**

Y Miki, J Swensen, D Shattuck-Eidens, PA Futreal, K Harshman, S Tavtigian, Q Liu, C Cochran, LM Bennett, W Ding, al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* Vol. 266, Issue 5182, pp. 66-71 DOI: 10.1126/science.7545954. **1994**

ANNEXES

Annexe 1: Protocole d'extraction d'ADN génomique à partir de sang à l'aide du kit PureLink™.

Introduction

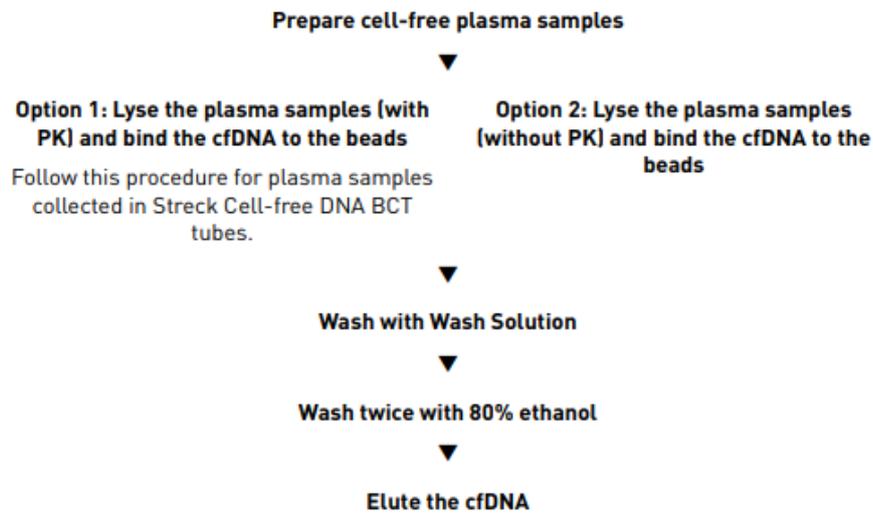
This quick reference sheet is included for experienced users of the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. For more details, refer to this manual.

Step	Procedure																								
Preparing lysates	Prepare the lysate using an appropriate sample preparation protocol as follows:																								
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Sample</th> <th style="text-align: left;">Amount</th> <th style="text-align: left;">Page no.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Mammalian cells, tissues and mouse tail</td> <td>5 x 10⁶ cells, up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen), 0.5-1 cm tail</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>Blood</td> <td>Up to 1 ml nonnucleated blood (need additional reagents, see page 9) 5-10 µl nucleated blood</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>Bacteria</td> <td>Up to 2 x 10⁹ cells</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Yeast cells</td> <td>Up to 5 x 10⁷ cells</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>Buccal swab</td> <td>Human buccal swab</td> <td>11</td> </tr> <tr> <td>FFPE tissue</td> <td>1-8 sections of 5-15 µm thick of about 20-50 mm² area</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>Oragene™ preserved saliva</td> <td>Up to 1 ml</td> <td>13</td> </tr> </tbody> </table>	Sample	Amount	Page no.	Mammalian cells, tissues and mouse tail	5 x 10 ⁶ cells, up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen), 0.5-1 cm tail	8	Blood	Up to 1 ml nonnucleated blood (need additional reagents, see page 9) 5-10 µl nucleated blood	9	Bacteria	Up to 2 x 10 ⁹ cells	10	Yeast cells	Up to 5 x 10 ⁷ cells	11	Buccal swab	Human buccal swab	11	FFPE tissue	1-8 sections of 5-15 µm thick of about 20-50 mm ² area	12	Oragene™ preserved saliva	Up to 1 ml	13
	Sample	Amount	Page no.																						
	Mammalian cells, tissues and mouse tail	5 x 10 ⁶ cells, up to 25 mg tissue (up to 10 mg spleen), 0.5-1 cm tail	8																						
	Blood	Up to 1 ml nonnucleated blood (need additional reagents, see page 9) 5-10 µl nucleated blood	9																						
	Bacteria	Up to 2 x 10 ⁹ cells	10																						
	Yeast cells	Up to 5 x 10 ⁷ cells	11																						
	Buccal swab	Human buccal swab	11																						
FFPE tissue	1-8 sections of 5-15 µm thick of about 20-50 mm ² area	12																							
Oragene™ preserved saliva	Up to 1 ml	13																							
Binding DNA	1. Remove a PureLink™ Spin Column in a Collection Tube from the package.																								
	2. Load the lysate (~640 µl) with Lysis/Binding Buffer and ethanol prepared as described on pages 8-13 to the PureLink™ Spin Column.																								
	3. Centrifuge the column at 10,000 × g for 1 minute at room temperature.																								
	4. Discard the collection tube and place the spin column into a new collection tube.																								
	5. Proceed to Washing DNA , below.																								
Washing DNA	1. Wash the column with 500 µl Wash Buffer 1 prepared with ethanol (page 15).																								
	2. Centrifuge the column at 10,000 × g for 1 minute at room temperature. Discard the collection tube and place column into a new collection tube.																								
	3. Wash the column with 500 µl Wash Buffer 2 prepared with ethanol (page 15).																								
	4. Centrifuge the column at maximum speed for 3 minutes at room temperature. Discard the collection tube.																								
	5. Proceed to Eluting DNA , below.																								
Eluting DNA	1. Place the spin column in a sterile 1.5-ml microcentrifuge tube.																								
	2. Elute the DNA with 25-200 µl of PureLink™ Genomic Elution Buffer. See Elution Parameters (page 5) to choose a suitable elution volume for your needs.																								
	3. Incubate the column at room temperature for 1 minute.																								
	4. Centrifuge the column at maximum speed for 1 minute at room temperature. <i>The tube contains purified DNA.</i>																								
	5. If desired, perform a second elution to increase recovery which lowers the overall concentration. <i>The tube contains purified DNA.</i> Remove and discard the column.																								
	6. Use the purified gDNA for the desired downstream application. Store the purified gDNA at 4°C for short-term or -20°C for long-term storage.																								



Isolate cfDNA manually

Workflow



Prepare cell-free plasma samples

1. Centrifuge the blood samples at $2000 \times g$ for 10 minutes at 4°C .
 2. Transfer the plasma to a new centrifuge tube.
 3. Centrifuge the plasma samples at $16,000 \times g$ for 10 minutes at 4°C .
- Note:** Alternatively, the plasma samples can be centrifuged at $6000 \times g$ for 30 minutes to remove any residual blood and cell debris.