

Table des matières

Abréviations

Liste des illustrations

Résumé

I- Introduction.....	Page 1
1- Acides nucléiques circulants (ADNcf).....	Page 1
2- Photochimiothérapie extracorporelle.....	Page 2
3- Contexte.....	Page 3
4- Objectifs	Page 6
II- Matériels et Méthodes.....	Page 7
1- Sujets.....	Page 7
2- Réalisation des prélèvements.....	Page 7
3- Extraction de l'ADNcf à partir du plasma.....	Page 8
4- Évaluation de la quantité d'ADNcf extrait.....	Page 9
4.1- Quantification de l'ADNcf par ddPCR.....	Page 9
4.2-Quantification de l'ADNcf par Qubit	Page 11
5-Quantification et Évaluation du profil de taille des ADNcf.....	Page 11
6-Analyses statistiques.....	Page 12
III- Résultats.....	Page 13
1- Sujets.....	Page 13
1.1- Évaluation de l'impact de l'extracteur utilisé.....	Page 13
1.1.1- Impact de l'extracteur sur la quantification de l'ADNcf.....	Page 13
1.1.2- Impact de l'extracteur sur la qualification de l'ADNcf.....	Page 13
1.1.3- Corrélation des taux d'ADNcf mesuré par les différentes méthodes de quantification.....	Page 16
1.1.3.1- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par ddPCR.....	Page 16
1.1.3.2- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par et par le BiaBooster.....	Page 17
1.1.3.2.1- Corrélation technique entre concentration totale en ADNcf mesuré par ddPCR et	

par le BiaBooster.....	Page 17
1.1.3.2.2- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et les différentes fractions de tailles d'ADNcf mesurés par BiaBooster.....	Page 18
1.1.3.3- Corrélation technique entre la concentration totale en ADNcf mesuré par Qubit et par le BiaBooster.....	Page 20
1.1.3.3.1- Corrélation technique entre la concentration totale en ADNcf mesuré par Qubit et par le BiaBooster.....	Page 20
1.1.3.3.2- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et les différentes fractions de tailles d'ADNcf mesurés par BiaBooster.....	Page 21
1.2- Détermination des valeurs normales de quantification de l'ADNcf.....	Page 24
1.2.1- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par ddPCR.....	Page 24
1.2.2- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par RPP30.....	Page 25
1.2.3- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par BiaBooster.....	Page 26
1.2.4- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par Qubit.....	Page 27
1.3- Corrélation de la concentration d'ADNcf entre les différentes méthodes de mesures.....	Page 28
1.3.1 – Évaluation du profil normal de taille d'ADNcf obtenu par le Biabooster.....	Page 28
1.3.1.1 - Corrélation entre la taille des pics 1 et 2 et la concentration d'ADNcf mesurée par BiaBooster.....	Page 28
1.3.1.2- Corrélation entre la taille des pics 1 et 2 et les différentes proportions de tailles d'ADNcf.....	Page 29
1.3.2- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par RPP30.....	Page 30
1.3.3- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par BiaBooster.....	Page 30
1.3.4- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par Qubit.....	Page 30
1.3.5- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par BiaBooster.....	Page 30
1.3.6- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par RPP30.....	Page 30
1.3.7- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par BiaBooster et par RPP30.....	Page 30
2- Cohorte.....	Page 32
2.1- Inclusions et caractéristiques clinico-biologiques.....	Page 32
2.2- Effet de la procédure de PCE.....	Page 34
2.2.1- Variation de l'expression de l'ADNcf à une heure après la PCE.....	Page 34
2.2.2- Variation du profil de taille de l'ADNcf à une heure après séance de PCE.....	Page 37

2.3- Cinétique.....	Page 38
2.3.1- Cinétique d'expression de l'ADNcf.....	Page 38
2.3.2- Cinétique de qualification de l'ADNcf.....	Page 40
2.4- Evolution de l'expression et de la qualification de l'ADNcf au long de la thérapie par PCE	Page 42
2.4.1- Patients Lichen/LcTc.....	Page 42
2.4.2- Patients en rejet de transplant cardiaque	Page 44
IV- Discussion.....	Page 48
V- Conclusion et perspectives	Page 54

Références bibliographiques

Abréviations

ADNcf : ADN circulating free

LCCT : lymphome cutané à cellules T

FDA : Food and Drug Administration

MAI : maladies auto-immunes

GvH : maladie du greffon contre l'hôte

8-MOP : 8-Methoxypsoralene

PBMCs : cellules mononucléées

INESS : Institut National d'Excellence en Santé et en Services sociaux

PCE : photochimiothérapie extracorporelle

HAS : Haute Autorité de Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

RT PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

ddPCR : Digital PCR ou PCR numérique

HLA: Human Leucocyte Antigen

SNP: single nucleotide polymorphism

Liste des illustrations

Liste des tables

Tableau 1. Caractéristiques des différents Kit d'extraction utilisés.

Table 1. Taux d'ADNcf en fonction de la méthode d'extraction

Table 2. Taux d'ADNcf en fonction de méthode d'analyse

Table 3. Taille du Pic 1 en fonction de la méthode d'extraction

Table 4. Taille du Pic 1 en fonction de l'extracteur utilisé

Table 5. Taille du Pic 2 en fonction de la méthode d'extraction

Table 6. Proportion d'ADNcf de petites tailles en fonction de la méthode d'extraction

Table 7. Profils de tailles de l'ADNcf en fonction de la méthode d'extraction

Table 8. Taux d'ADNcf mesuré au sein de la cohorte de volontaires sains par différentes techniques (ddPCR, RPP30, Biabooster, Qubit).

Table 9. Taux moyen d'ADNcf mesuré par ddPCR en fonction de l'âge et du sexe

Table 10. Taux moyen d'ADNcf mesuré par RPP30 en fonction de l'âge et du sexe

Table 11. Quantification et qualification de l'ADNcf de la cohorte de volontaire sain par BiaBooster en fonction de l'âge et du sexe

Table 12. Taux moyen d'ADNcf mesuré par Qubit en fonction de l'âge et du sexe

Table 13. Caractéristiques générales du protocole de PCE de la cohorte de patients.

Table 14. Caractéristiques des patients en rejet de transplant cardiaque.

Table 15. Caractéristiques des patients LCTC

Table 16. Caractéristiques des patients atteints de lichen

Table 17. Facteur de variation moyen du taux d'ADNcf après séance de PCE

Table 18. Taux ADNcf mesuré avant et après séance de PCE

Table 19. Taux d'ADNcf une heure avant et après séance de PCE.

Table 20. Cinétique d'expression de l'ADNcf

Table 21. Cinétique de variation du profil de tailles

Table 22. Expression de l'ADNcf au long court des patients lichen et LcTc par ddPCR et par BiaBooster

Table 23. Qualification de l'ADNcf au long court des patients lichen et LcTc

Table 24. Expression de l'ADNcf au long court des patients en rejet de transplant cardiaque par ddPCR et par BiaBooster.

Table 25. Profils de taille de l'ADNcf au long court des patients en rejet de transplant cardiaque

Table 26. Seuil pathologique du taux d'ADNcf en fonction de la technique de quantification utilisée

Liste des figures

Figure 1. Enroulement de l'ADNcf autour du nucléosome en fonction de sa taille

Figure 2. Schéma représentant le déroulement d'une séance de PCE.

Figure 3. Schéma représentant le déroulement de la ddPCR

Figure 4. Schéma représentant le principe de la technologie BiABooster

Figure 5. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et par ddPCR

Figure 6. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par BiaBooster et par ddPCR

Figure 7. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb

Figure 8. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb

Figure 9. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb

Figure 10. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb

Figure 11. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par BiaBooster et par Qubit

Figure 12. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb

Figure 13. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb

Figure 14. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb

Figure 15. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb

Figure 16. Corrélation de mesure de la taille des pics obtenus par BiaBooster

Figure 17. Corrélation de mesure entre la taille des pics et la proportion des différentes fractions de tailles d'ADNcf obtenus par BiaBooster

Figure 18. Corrélation de mesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par RPP30

Figure 19. Corrélation demesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par BiaBooster

Figure 20. Corrélation de mesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par BiaBooster

Figure 21. Variation du taux d'ADNcf après séance de PCE. Exemple de deux patients.

Figure 22. Profils de taille de l'ADNcf avant et après séance de PCE, exemple d'un patient.

Figure 23. Cinétique d'expression du taux d'ADNcf

Figure 24. Cinétique du profil de taille de l'ADNcf

Figure 25. Evolution du taux d'ADNcf au long court exemple de deux patients.

Figure 26. Evolution de l'expression et du profil de taille de l'ADNcf au long court.

Résumé

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est largement utilisée dans le traitement du syndrome de Sézary ou plus récemment du rejet aigu chez les transplantés cardiaques, mais son efficacité est variable et aucun biomarqueur n'a fait la preuve d'une prédictivité d'efficacité. L'apoptose étant au centre du mécanisme d'action de la PCE, nous avons cherché à apprécier son efficacité *via* un biomarqueur indirecte d'apoptose, l'ADN circulant (ADNcf). L'extracteur semi-automatique (IDEAL, ID solution ®) utilisant le kit IDXTRACT-MAG a été retenu parmi 3 autres candidats car permettant une extraction d'ADNcf quantitativement élevé avec l'obtention reproductible de petites tailles de fragments. Les valeurs normales d'extraction ont ensuite été déterminées à partir de 120 sujets. Le taux moyen d'ADNcf mesuré par digital PCR (ddPCR) est de $5,6 \pm 3$ U.A (CV = 53%). Un analyseur innovant de taille de fragment d'ADNcf, Biabooster(Picometrics®) a mis en évidence que 73 ± 6 % (CV = 8%) des fragments étaient < 239 pB.

Le suivi de 12 patients dont 4 transplantés cardiaques traités par PCE a mis en évidence une tendance statistique à l'augmentation du taux d'ADNcf à une heure après séance de PCE avec augmentation des fractions de moyennes et de grandes tailles. Cependant, les taux sont variables, en fonction du patient et de son évolution clinique. Nos résultats préliminaires suggèrent que l'ADNcf n'est pas un marqueur pertinent de suivi de l'efficacité de la PCE. Cependant, notre cohorte étant de faible taille, une étude plus large, multicentrique est en perspective afin de finaliser la pertinence de l'ADNcf dans la procédure de PCE.

Mots clefs : ADN circulant, Photochimiothérapie extracorporelle, Apoptose, marqueur, Transplantation cardiaque.

I- Introduction

1- Acides nucléiques circulants (ADNcf)

Depuis les travaux de P. Mandel et P. Métais en 1948, il est clairement établi que le sang véhicule une petite quantité d'ADN libre circulant provenant de la libération de matériel génétique par les tissus. Cet ADN libre circulant sans cellule (ADNcf) est sous la forme d'ADN double-brin d'une taille moyenne de 150-180pb correspondant à l'enroulement de l'ADN autour du nucléosome (Figure 1). Sa durée de vie est de moins de deux heures, avant qu'il ne soit filtré et éliminé de la circulation sanguine par la rate, le foie et les reins.

Son origine n'est pas encore parfaitement élucidée mais serait liés à 3 phénomènes : l'apoptose, la nécrose et dans une moindre mesure la sécrétion active. Chez les individus sains, l'ADNcf provient essentiellement des cellules en apoptose (1). Les longueurs des fragments d'ADN sont dans ce cas généralement comprises entre 185-200 pb (2). En revanche, dans les tissus cancéreux, la taille de l'ADN circulant varie beaucoup, car outre l'apoptose, la nécrose et l'autophagie sont responsables de la mort des cellules cancéreuses, les fragments peuvent atteindre jusqu'à des tailles telles que 450-500 pb (3, 4 et 5).

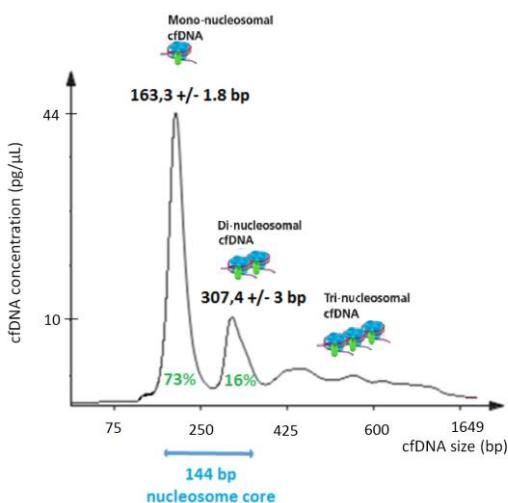


Figure 1. Enroulement de l'ADNcf autour du nucléosome en fonction de sa taille

Toutes les études s'accordent en une détection faible d'ADNcf chez les individus sains et en son augmentation dans différentes situations cliniques telles que les accidents vasculaires cérébraux et infarctus du myocarde, les exercices musculaires intensifs, l'insuffisance rénale aigue, la cytolysé hépatique, les traumatismes, la chirurgie et le cancer. S. Jahr et al. (6) ont rapporté des concentrations comprises entre 10 - 1 200 ng/ml pour les patients atteints de cancer,

avec une moyenne de 219 ng/ml. En comparaison, le sang des individus sains inclus dans cette étude contenait en moyenne 3,7 ng/ml d'ADNcf. On retrouve également de l'ADN circulant fœtal circulant chez les femmes enceintes.

Actuellement, la quantification de l'ADNcf est réalisée par des techniques spectrophotométriques et/ou fluorométriques, par PCR quantitative (7), ou par des techniques plus récentes et innovantes comme le séquençage de nouvelle génération (NGS) ou la PCR digitale (ddPCR). Au laboratoire HLA de l'EFS PACA, la technologie de PCR digitale a été retenue car plus sensible (sensibilité : 1 à 10% pour la NGS versus 2 % pour la ddPCR (8)) et plus rapide (temps d'analyse : 24-36h pour la NGS versus 1h pour la ddPCR). Le principe de la ddPCR repose sur une dilution limite de l'échantillon d'ADN dans des millions de microgouttelettes. L'échantillon est partitionné pour que chaque goutte contienne tout au plus une molécule d'ADN et le mélange réactionnel nécessaire à la réaction de PCR. Chaque microgouttelette est analysée individuellement.

L'analyse des tailles de l'ADNcf se fait par des techniques électrophorétiques. Parmi les plus communément répandus, l'Experion (BIORAD), le Bioanalyzer et le Tapestation (Agilent), le QIAxcel (Qiagen), le LabChip® GX Touch™ (PerkinElmer) peuvent être cités. Les dispositifs les plus sensibles détectent des concentrations inférieures au ng/µL (9, 10, 11). Dans notre laboratoire nous utilisons un système innovant d'électrophorèse capillaire, nommée BIABooster. Ce système basé sur la technologie µLAS, permet de réaliser simultanément des opérations de concentration et de séparation de l'ADN. Avec ce système, la limite de détection est de 10 fg/uL (12).

2- Photochimiothérapie extracorporelle

La PCE s'est développée au début des années 1980 suite aux travaux de recherche d'Edelson, un dermatologue américain, sur le traitement du lymphome cutané à cellules T (LCTC) (13). Il s'agit de la première immunothérapie ciblée contre un cancer autorisée par la Food and Drug Administration (FDA). La première indication était donc le LCTC érythrodermique à un stade avancé présentant des cellules malignes circulantes (14). Depuis, il y a eu extensions à plusieurs autres pathologies (maladies auto-immune (MAI), maladie du greffon contre l'hôte (GvH), rejet de greffe d'organe solide etc. (15).

La photophorèse se déroule en plusieurs étapes successives (Figure 2). Après le prélèvement par aphérèse des cellules mononucléées, ces dernières sont mises en présence d'un agent photosensibilisant, le 8-Methoxypsoraléne (8-MOP), et irradiées *ex vivo* par rayonnement UV-

A (320-400nm) (2J/cm²) avant leur réinjection par voie intraveineuse au patient (14). Le tout peut être réalisé en système fermé ou en système ouvert. Dans un système fermé, toutes les étapes sont réalisées en ligne, en une seule opération et au sein d'un même dispositif. Dans un système ouvert, l'aphérèse cellulaire et l'irradiation sont réalisées par deux appareils distincts.

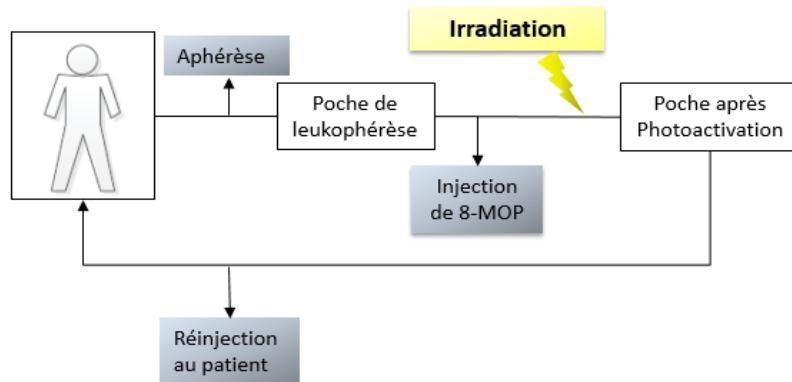


Figure 2. Schéma représentant le déroulement d'une séance de PCE.

Le prélèvement des cellules mononucléées se fait par aphérèse. Elles sont ensuite mises en présence d'un agent photosensibilisant (8-MOP), et irradiées ex vivo par rayonnement UV-A (320-400nm) (2J/cm²) pour être réinjecter au patient par voie intraveineuse.

Encore à ce jour, les mécanismes d'action de la PCE ne sont pas complètement élucidés. Il semblerait, que la PCE induit un effet anti-mitotique et pro-apoptotique sur les lymphocytes traités. Après ré-infusion, les lymphocytes traités subissent une apoptose dans les 48 à 72h (16, 17, 18 et 19). Les lymphocytes T apoptotiques, seraient pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) non traitées du patient. Ceci serait l'élément initial, car induisant une immunomodulation spécifique (20, 21 et 22).

3- Contexte

Aujourd'hui, il n'existe pas d'étude clinique prospective, contre placébo et randomisée permettant d'évaluer l'impact de la PCE dans le traitement du LCTC (23). Etant une maladie orpheline, la mise en place d'études cliniques de haut niveau de preuve est difficile. Les études menées suggèrent cependant que la PCE, seule ou en combinaison avec d'autres immunomodulateurs, est le traitement le plus efficace contre le LCTC et les formes érythrodermique du mycosis fongoïde avec 25 à 88 % de réponse globale dont 10 à 20% sont des réponses complètes (24). Le rapport de la HAS en 2010 a conclu que la PCE améliore la

rémission clinique et hématologique ainsi que la qualité de vie des patients. Le choix du nombre et de la fréquence des séances dépend de l'évolutivité, de la masse tumorale et de la réponse du patient au traitement. Actuellement, selon les centres, le nombre de séances varie de 2 à 10 séances par mois (HAS, 2010).

Les critères d'évaluation de la réponse à la PCE dans le LCTC sont cliniques (régression des atteintes cutanées et ganglionnaire) et biologique (diminution du clone T) (25, 26). La réponse à la PCE doit être évaluée tous les trois mois en vue du maintien ou de la modification du traitement (15, 23). Un délai de six mois est nécessaire avant que l'on puisse se prononcer sur l'absence d'efficacité de la PCE (23). En effet le délai moyen de réponse observé est de 5 à 6 mois et certains patients ne montrent une réponse clinique qu'après 10 mois de traitement (24, INESS 2016).

L'efficacité de la PCE lors de la GVH aigu varie selon le type d'organe atteint. Dans leur revue systématique, Abu-Dalle et coll. [2014] (portant sur 9 études prospectives regroupant 323 patients) et Zhang et coll. [2015] (portant sur 7 études prospectives regroupant 121 patients) rapportent un taux de réponse globale de 69% (IC 95 % 34-95) et 71% [IC à 95 % : 54-89] et un taux de réponse complète de 53 % [IC à 95 % : 31-74] et 71 % (IC 95 % 58-84), respectivement (27, 28).

Lors d'une GVH chronique, le taux de réponse à la PCE varie également selon le type d'atteinte. En effet, le taux de réponse est d'environ 70 % concernant la peau et les muqueuses et d'environ 50 % concernant les autres types d'atteinte, excepté le poumon (15 à 48%).

Les critères d'évaluation de la réponse thérapeutique de la GvH à la PCE sont appréciés en termes de diminution du traitement immunosupresseur et de la régression des atteintes organiques (25).

En ce qui concerne les transplantations d'organe, la PCE est indiquée pour le traitement et la prévention du rejet aigu récidivant et réfractaire, l'épargne des immunosupresseurs chez les patients infectés et chez les patients présentant une lymphoprolifération post transplantation comme traitement complémentaire de l'immunosuppression standard [HAS, 2010]. L'efficacité de la PCE est évaluée en termes de diminution des immunosupresseurs, de l'amélioration ou de la régression du stade de rejet (29, HAS 2010, INESS 2016).

Ainsi, l'efficacité de la PCE est très variable ; elle est en fonction de la pathologie, du type d'atteinte, des patients...

Les critères d'évaluation sont archaïques et relèvent essentiellement de l'appréciation de l'évolution clinique du patient. De plus, plusieurs semaines, voire plusieurs mois, sont nécessaire afin d'en évaluer l'efficacité, or il s'agit d'une thérapeutique coûteuse (environ 1200 Euros/séance (coût AP-HM)) et lourde nécessitant un milieu hospitalier.

Lorsque la PCE est réalisée en système ouvert, des contrôles qualité biologiques sont en sus menés sur la poche d'aphérèse cellulaire. De nombreuses études ont donc tentées d'identifier des **facteurs prédictifs** de la réponse à la PCE. Dans le LCTC, le taux de cellules de Sézary circulantes des patients constitue un critère important avant traitement par PCE, car leur taux est corrélé à la réponse thérapeutique (30). Des auteurs rapportent que le meilleur indice prédictif de la réponse à la PCE est le stade de GvH aiguë (31, 32). Il est considéré que les patients souffrant d'une réaction de GvH aiguë à un stade III ou IV, ou ayant un plus grand nombre d'organes atteints, ou des doses plus élevées de corticostéroïdes administrées en première intention ou n'étant pas en rémission complète après 3 mois de PCE sont généralement non répondeurs à la PCE (33). Dans le traitement de la réaction GVH chronique, une atteinte généralisée, une atteinte pulmonaire et des antécédents de réaction GvH aiguë ou de thrombopénie sont des facteurs prédictifs d'une moins bonne réponse à la PCE (31, 33). Dans le traitement du rejet chronique de transplantation pulmonaire, les patients atteints d'une Bronchiolite oblitérante de moins de 3 ans après la transplantation semblent mieux répondre à la PCE (29).

Ces facteurs prédictifs clinico-biologiques sont approximatifs et tardifs. D'autres auteurs ont tenté d'identifier un marqueur biologique pertinent de suivi et/ou d'évaluation de l'efficacité de la PCE. Rao et al [2006], avaient cherché à déterminer si des marqueurs, tels que la lactate déshydrogénase (LDH), le récepteur à l'interleukine 2, la néoptérine, la β 2-microglobuline et le granzyme B pourraient être prédictifs de la réponse à la PCE. Mais aucune corrélation positive ou négative n'a pu être établie (34). Suite à son étude publiée en 2013, M.-T. Dieterlen et al recommande un monitoring immunologique incluant la quantification et l'analyse des lymphocytes T régulateurs (Treg), des cellules dendritiques plasmocytoïdes et d'établir un profil d'expression cytokinique (IL-2, INF γ , IL-4, IL-10 et IL-17) avant et jusqu'à 12 mois après le début de la PCE. Cette étude menée sur 25 patients suggère que le monitoring cytokinique pourrait fournir des informations sur l'efficacité de la PCE et permettre d'adapter la thérapie à chaque patient (délai de début de la PCE par rapport à la transplantation, détermination de la fréquence et du nombre de séance nécessaire etc.) (35). Mais cette étude nécessite d'être complétée et approfondi par un essai clinique plus large afin d'identifier les éventuels marqueurs prédictifs de l'efficacité de la PCE. De plus, l'augmentation des Tregs circulant n'a pas été retrouvée corrélée à la réponse clinique à la PCE (36).

Ainsi, à ce jour, il n'a pas été identifié de marqueur biologique permettant d'évaluer l'efficacité de la PCE. Notre postulat est que l'apoptose est au centre du mécanisme d'action de la PCE et que cette dernière signe l'efficacité de la PCE. Notre stratégie est donc d'apprécier l'efficacité

de la PCE par la quantification et la qualification de l'ADNcf, marqueur indirect de l'induction de l'apoptose cellulaire. De plus, l'ADNcf pourrait au cours des séances de photophorèse identifier les patients répondeurs des non répondeurs. Il pourrait être ainsi un marqueur biologique unique, peu coûteux et facilement réalisable dans tous les laboratoires.

4- Objectifs

L'objectif principal de cette étude est de déterminer si la quantification et/ou la qualification de l'ADNcf, mesurée par des techniques innovantes telles que la ddPCR et le Biabooster, est un marqueur pertinent de l'efficacité thérapeutique de la PCE.

Les objectifs secondaires sont de déterminer

- des valeurs normales des taux d'ADNcf mesurés par ddPCR et par BiaBooster,
- d'identifier les variations quantitatives et qualitatives d'ADNcf des pathologies traitées
- d'identifier les variations quantitatives et qualitatives d'ADNcf associées à l'efficacité de la PCE
- d'identifier les variations quantitatives et qualitatives d'ADNcf associées à l'identification des patients répondeurs ou non à la PCE

Pour cela, nous avons tout d'abord sélectionné une méthode d'extraction semi-automatique d'ADNcf, à partir d'une étude comparant 4 extracteurs d'ADNcf. Puis, nous avons déterminé les valeurs normales quantitatives et qualitatives d'ADNcf extraits par cette méthode, à partir de mesures issues de différentes techniques (ddPCR, BiaBooster et Qubit). Enfin, nous avons étudié les variations quantitatives et qualitatives de l'ADNcf chez les patients traités par PCE.

II- Matériaux et Méthodes

1- Sujets

Le protocole expérimental est mis en place le 15 mai 2018 en collaboration avec le service de plasmaphérèse et photochimiothérapie extracorporelle de l'hôpital de la conception, le service de culture et thérapie cellulaire de l'hôpital de la conception, le service de médecine interne et le service de transplantation cardiaque de l'hôpital de la Timone (Assistance publique des hôpitaux de Marseille, Marseille).

Les patients sont recrutés par les services de plasmaphérèse et de transplantation cardiaque après information et consentement des patients.

Une base de données est constituée par les cliniciens du service de transplantation cardiaque et de prélèvement cellulaire afin de recueillir les données relatives aux patients recrutés. Cette base de données comprend l'ensemble des informations relatives à la pathologie initiale de chaque patient (date de diagnostic, stade clinique, marqueurs biologiques de suivi et d'évaluation, traitements), la date de début de la thérapie par PCE, date d'inclusion dans le protocole, phénomènes interférents durant l'étude (infection, prise médicamenteuse, épisodes de rejets...) et l'évolution des patients durant le protocole à partir des comptes rendus standardisés du Service (table 12, 13 et 14)

Afin de comparer les extracteurs d'ADNcf, deux échantillons issus de deux sujets sains, un échantillon issu d'un sujet en rejet de transplant cardiaque traité par PCE et deux mélanges de sang de deux sujets sains (chimérisme) ont été testés sur cinq extracteurs différents.

Afin de déterminer les valeurs normales d'ADNcf, 120 volontaires sains ont été prélevés après information et consentement au sein de la maison du don de Marseille (Marseille, France). La cohorte est composée de 53 hommes et 67 femmes, dont la moyenne d'âge est de 41 ± 15 ans (CV = 37%) et la médiane 41 ans (Table 6).

2- Réalisation des prélèvements

Les patients sont prélevés par ponctions veineuses au pli du coude par les infirmières du service de photochimiothérapie extracorporelle et d'aphérèse avant et après chaque séance de PCE. Les volontaires sains, sont également prélevés par ponctions veineuses au pli du coude, par les infirmières de la maison du don. Les prélèvements sont réalisés sur un tube spécifique (Tube Streck®, Roche). L'utilisation de ces tubes simplifie les étapes pré analytiques avec un délai moyen de conservation de 7 jours à température ambiante, avant la première centrifugation.

3- Extraction de l'ADNcf à partir du plasma

Quatre méthodes d'extraction ont été testés : (A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemagic 360 (Perkin Elmer®).

Les kits d'extractions utilisés sont MagNA Pure 24 Total NA Isolation, NextPrep-Mag cfDNA (Perkin Elmer®), IDXTRACT-MAG (IDSolution®) et combo Virus 24C-LVX480-1000 (Taigen®) pour les automates MagNA Pure 24 (Roche®), Chemagic 360, IDEAL et LABTurbo respectivement.

Les caractéristiques de chaque méthode d'extraction sont décrites dans le tableau 1. Les échantillons ont été traités selon les protocoles fournis par les fournisseurs.

MagNA Pure 24, Chemagic 360 et IDEAL sont des automates d'extraction sur billes magnétiques alors que LABTurbo est un automate d'extraction sur colonnes.

Dans tous les cas, l'ADNcf a été isolé à partir de 2 ml de plasma obtenu après double centrifugation du prélèvement sanguin initial (1600g, 10 min à température ambiante puis 4500g, 10 min à température ambiante) et ont ensuite été élués avec 100 uL, 100uL, 120 uL et 50 uL de tampon pour les kits MagNA Pure 24 Total NA Isolation, NextPrep-Mag cfDNA isolation, IDXTRACT-MAG et le kit 24C-LVX480-1000 respectivement selon les recommandations du fournisseur.

Les éluât ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation. Tous les échantillons de plasma congelés ont été utilisés dans un délai d'un mois suivant le recueil.

FABRICANT	ROCHE	ID-SOLUTION	TAIGEN	PERKIN ELMER
AUTOMATE	MagNA Pure 24	IDEAL	LabTurbo 24 AB	Chemagic 360D
KIT D'EXTRACTION	MagNA Pure 24 Total NA Isolation	IDXTRACT-MAG	combo virus 24C-LVX480- 1000	NextPrep-Mag cf DNA
TECHNIQUE D'EXTRACTION	Billes magnétiques	Billes magnétiques	Colonne	Billes magnétiques
VOLUMES ÉCHANTILLON (mL)	2 - 4	0.5 - 5	0.3 - 3	0.5 - 10
VOLUME ELUTION (µL)	30 - 200	30 - 120 (adaptable)	30 - 200	30 - 100
TECHNIQUE AUTOMATIQUE	Complètement	semi	Complètement	semi
PRE-TRAITEMENT MANUEL		Reconstitution de la PK et incubation (15 minutes à température ambiante), ajout des billes magnétiques et du tampon (incubation sous agitation 30 minutes à 56°C). Ajout du tampon et du réactif d'élution.		Ajout des billes magnétiques, du réactif d'élution. Reconstitution de la PK.
DURÉE DU PRE-TRAITEMENT MANUEL (minutes)	0	45	0	20
DURÉE DE LA PARTIE AUTOMATISE (minutes)	90	45	70	70
DURÉE TOTALE DE L'EXTRACTION (minutes)	90	90	70	90
ÉCHANTILLONS UNITAIRE	24	24	24	12
	Oui	Oui	Oui	Oui

Tableau 1. Caractéristiques des différents Kit d'extraction utilisés.

4- Évaluation de la quantité d'ADNcf extrait

4.1- Quantification de l'ADNcf par ddPCR

Nous avons utilisé le kit ddPCR IDQUANT (ID-Solutions®, Grabels France) permettant la co amplification de la séquence « Alien » (ICE) ainsi que d'un gène humain (ADNh). Les résultats sont exprimés par le ratio ADNh/ICE exprimé par ml de plasma. La préparation des mix réactionnels est la suivante : 13 µl d'ARM-IDQUANT + 8µL d'ADNcf (dont un contrôle positif et négatif d'extraction (ICE et NEC) et un contrôle positif et négatif de quantification (TPC-IDQUANT et NAC)).

Parallèlement, nous avons amplifié le gène RPP30. Ce gène est non polymorphique, ne possède pas de pseudogène, code pour la Ribonuclease P protein subunit p30 et se localise sur le chromosome 10q. Il s'agit d'une amplification de 123 pb (position sur le génome

hg38:chr10:90,900,616-90,900,739). Le volume réactionnel est de 21 µL composé de 11 µL de SuperMix (ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)), 1 µL de mélange RPP30, 3 µL d'eau additionné de 6 µL d'ADNc (ou 6 µL d'eau pour le contrôle négatif (NTC)).

Après la préparation des mix (figure 3) :

- Création des émulsions eau/huile pour chaque point (70 µL d'huile + 20 µL de mix/ADN) grâce au générateur de gouttelettes Biorad®.
- Amplification génique (10 min à 95°C x 1 cycle, 10 secondes 94°C + 60 secondes 60°C x 40 cycles, 10 min 98°C x 1 cycle, refroidissement à 12°C).
- Lecture des gouttelettes avec QX200 (Biorad®) en sélectionnant les canaux de lecture (FAM/HEX)

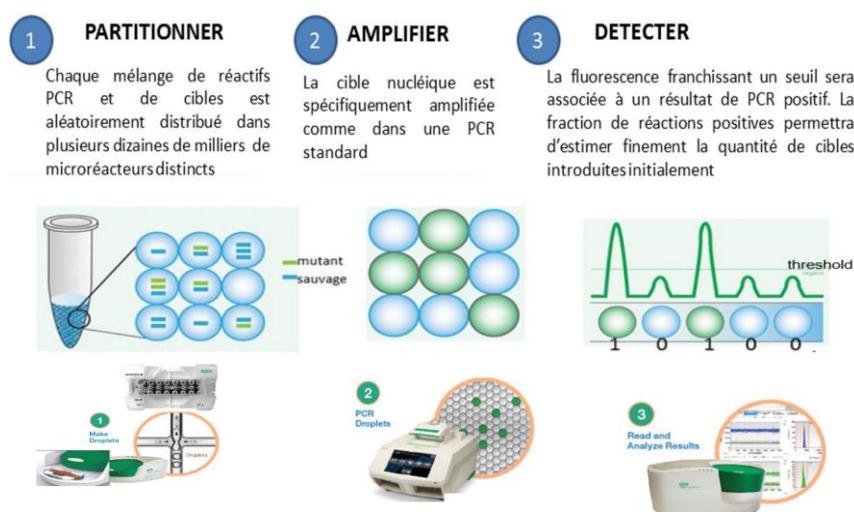


Figure 3. Schéma représentant le déroulement de la ddPCR

Le test est validé selon les critères suivants (si l'un des critères n'est pas accepté, l'analyse ne peut pas être interprétée de manière fiable) :

- Contrôle positif d'extraction (ICE) : détecté dans chaque échantillon en HEX à une valeur attendue de nombre de gouttelettes positives
- Contrôle positif de quantification (TPC-IDQUANT) : signal présent en FAM et HEX à une valeur attendue de nombre de gouttelettes positives
- Contrôle négatif d'extraction (NEC) : signal ICE détecté en HEX mais aucun signal en FAM
- Contrôle négatif de quantification (NAC) : absence totale de gouttelettes positives
- Nombre total d'événements > 8 000

Le taux d'ADNcf est exprimé en U.A.

Afin d'évaluer l'efficacité de la procédure de PCE, les taux d'ADNcf avant et après séance de PCE sont observés. Un ratio est effectué entre le taux d'ADNcf avant la séance et le taux d'ADNcf après la séance de PCE.

Le suivi au long court de la thérapie par PCE est évalué par les mesures effectuées avant chaque séance de PCE.

Les patients inclus dans le cadre de rejet du transplant cardiaque ainsi que les patients 11 et 12, ont débuté les séances de PCE simultanément à l'inclusion dans l'étude. Le taux de base d'ADNcf de ces patients, correspond donc au taux mesuré lors du premier prélèvement. Pour ces patients, le ratio du taux d'ADNcf à la séance de PCE numéro x rapporté au taux d'ADNcf initial du patient est calculé. Ce ratio permet de voir l'effet de la PCE sur le taux initial d'ADNcf du patient tout au long des séances.

4.2 Quantification de l'ADNcf par Qubit

L'ADNcf est quantifié à l'aide du kit QUBIT dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Aalst, Belgium), selon les recommandations du fournisseur. Les résultats sont exprimés en ng/mL.

5- Quantification et Evaluation du profil de taille des ADNcf

Le profil de taille des fragments d'ADNcf sera évalué en utilisant l'analyseur BIABooster (Picometrics Technologies), système capillaire d'exploitation exclusive de la technologie μ LAS. Il s'agit d'une technique sans amplification ou hybridation qui permet l'enrichissement, la séparation et la détection spécifique en séquence d'acides nucléiques par voie optique. Le mode mis en œuvre actuel se fait sur ADN extrait. Cet instrument utilise un champ électrique et un écoulement hydrodynamique de contrecourant pour des liquides viscoélastiques, dans lequel on montre l'occurrence de forces transversales orientées vers les parois. Ces forces augmentent avec le poids moléculaire de l'ADN et induisent ainsi une réduction progressive de la vitesse de migration de l'ADN qui déclenche la séparation en taille de fragments d'ADN (Figure 4.). Cette innovation est décrite dans l'article Ranchon et al. (37). Une première étape de concentration de l'ADN par application d'un flux électrohydrodynamique est menée (Figure 4.). L'ADN est dirigé vers une constriction grâce à un flux hydrodynamique à la pression de 5 bars durant 80 secondes (flèches bleu), un champ électrophorétique de 25 kV et à la pression de 10 bars est ensuite appliqué durant 6,5 minutes (flèches rouges). Ainsi l'ADN se concentre au niveau de la constriction. La séparation de l'ADN se fait par la diminution progressive du

voltage de 25 à 0,1 kV durant 15 minutes. L'analyse BIAboster est réalisée à partir de 10 μ L de l'éluât.

Ainsi, cette technologie nous permet de distinguer l'ADNcf de petite taille (75 à 239 pb), de taille moyenne (240 à 369 pb et 370 à 579 pb) et de grande taille (580 à 1649 pb). Les différentes tranches de taille d'ADNcf sont exprimés en proportion (%). La concentration totale d'ADNcf ainsi que de chaque portion des fragments est mesurée. Le taux de l'ADNcf est exprimé en ng/mL.

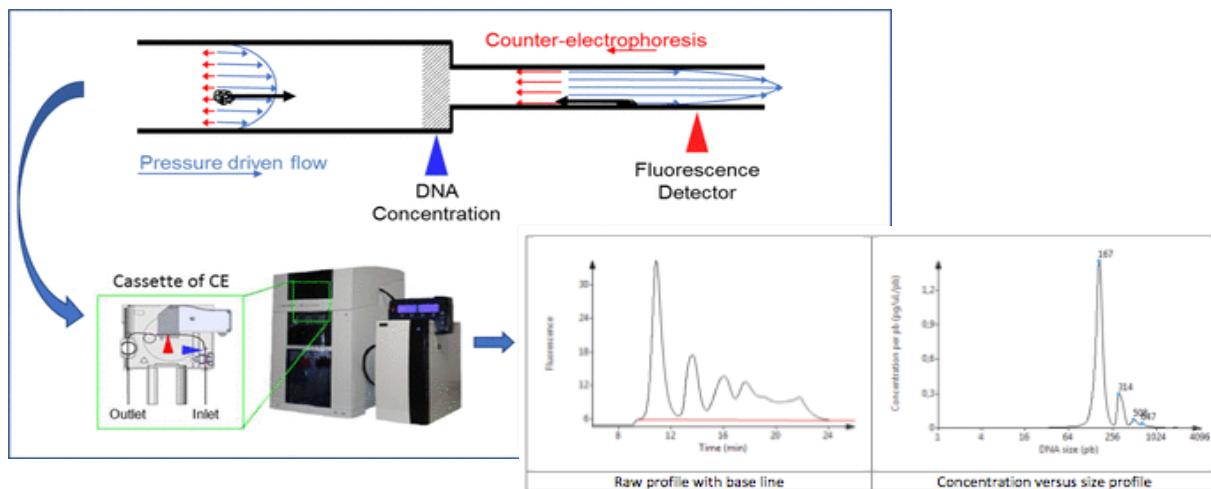


Figure 4. Schéma représentant le principe de la technologie BiABoster

Première étape : l'ADNcf est dirigé vers une constriction grâce à un flux hydrodynamique à la pression de 5 bars durant 80 secondes (flèches bleu), un champ électrophorétique de 25 kV et à la pression de 10 bars est ensuite appliqué durant 6,5 minutes (flèches rouges). Ainsi l'ADN se concentre au niveau de la constriction.

Deuxième étape : Séparation de l'ADNcf par diminution progressive du voltage de 25 à 0,1 kV durant 15 minutes.

6- Analyses statistiques

Afin d'étudier l'influence de l'extracteur sur la quantification et la qualification de l'ADNcf nous avons eu recours au test ANOVA.

Afin d'évaluer les valeurs normales des taux d'ADNcf, la moyenne globale ainsi que le coefficient de variation (CV) sont déterminées. Le CV étant l'écart type rapporté à la moyenne. La concordance de résultats entre les méthodes d'extraction et entre les méthodes de mesures a été évaluée par un test de corrélation. Les différences de concentrations d'ADNcf en fonction du sexe et de l'âge des volontaires sains mesurées par les différentes méthodes de l'étude ont été comparées en utilisant le test de Student.

Pour les patients traités par PCE dont nous disposons du taux initial d'ADNcf, le ratio de la concentration d'ADNcf par rapport à la concentration initiale du patient a été calculé. Les variations des moyennes de la quantité totale d'ADNcf et de la quantité des différentes portions de fragments de tailles après PCE ont été comparées aux moyennes de quantités avant PCE et ont été analysées par un test de Student.

III- Résultats

1- Sujets

1.1- Évaluation de l'impact de l'extracteur utilisé

1.1.1- Impact de l'extracteur sur la quantification de l'ADNcf

Tous les extracteurs donnent des résultats d'extraction comparables en termes de concentration d'ADNcf (p-value = 0.827, 0.907, 0.438 et 0.0706 mesurées par ddPCR, RPP30, Biabooster et Qubit respectivement) Table 1. Le taux d'ADNcf obtenu par les différentes techniques d'extraction variait entre des taux moyens allant de 82.6 à 122.2 ng / ml mesuré par ddPCR, 7.22 à 12.93 ng / ml mesuré par RPP30, 66.8 à 304.2 ng / ml mesuré QUBIT et 34.46 à 136.88 ng / ml mesuré par BIABooster. Table 1

Les concentrations d'ADNcf mesurées par QUBIT HS étaient statistiquement différentes de celles mesurées par ddPCR et BiaBooster (QUBIT HS vs ddPCR, p = 0,009; QUBIT HS vs BIABooster, p = 0,012; ddPCR vs BIABooster, p = 0,787). Table 2

Mesuré par Qubit, le taux d'ADNcf est plus faible lorsque l'extraction a été réalisée par l'extracteur A que par les extracteurs B, C et D (p-value = 0.032) Table 1.

Extracteur		ddPCR (pg/uL)				RPP30 (pg/uL)				BiaBooster (pg/uL)				QUBIT (pg/uL)			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
concentration (pg/uL)	Moyenne	82,6	68,6	122,2	81,6	9,58	7,22	12,93	10,80	34,46	122,92	21,28	136,88	66,8	302,2	304,2	164,2
	EC	86,12	94,86	84,65	112,62	12,21	9,60	10,79	16,49	38,99	165,51	13,67	211,96	43,75	170,12	100,32	236,23
	CV	104%	138%	69%	138%	127%	133%	83%	153%	113%	135%	64%	155%	65%	56%	33%	144%
	Min	35,0	13,0	60,0	20,0	2,57	1,03	4,45	1,08	1,80	24,40	9,20	22,40	24	147	208	25
	Max	235,0	236,0	266,0	281,0	31,17	23,95	31,37	40,09	100,00	412,00	43,60	515,20	128	575	472	581
	p-value	0,827				0,907				0,438				0,076			
		C vs [A, B et D]		0,349		[A et C] vs [B et D]		0,0924		A versus [B, C et D]		0,032					

Table 1. Taux d'ADNcf en fonction de la méthode d'extraction

(A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemagic 360 (Perkin Elmer®).

	ddPCR (pg/uL)	BiaBooster (pg/uL)	Qubit (pg/uL)
Moyenne	89	79	209
EC	89,78	135,55	175,74
CV	101%	172%	84%
Min	13	2	24
Max	281	515	581
p-value		0,006	
p-value ddPCR vs BiaBooster		0,787	
p-value ddPCR vs Qubit		0,009	
p-value BiaBooster vs Qubit		0,012	

Table 2. Taux d'ADNcf en fonction de méthode d'analyse

1.1.2- Impact de l'extracteur sur la qualification de l'ADNcf

La taille du pic 1 est différente en fonction de l'extracteur utilisé (p-value < 0.005, table 3).

Pic 1	Extracteur	A	B	C	D
	Moyenne	119,75	164,40	165,20	166,00
	EC	17,84	1,14	1,10	1,00
	CV	0,15	0,01	0,01	0,01
	Min	93,00	163,00	164,00	165,00
	Max	129,00	166,00	167,00	167,00
	p-value			<0,005	
	p-value B-C-D			0,104	

Table 3. Taille du Pic 1 en fonction de la méthode d'extraction

(A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemagic 360 (Perkin Elmer®).

L'extracteur A, donne un pic 1 sensiblement différent des autres extracteurs (119.75 ± 17.9 (CV = 15%) vs 165.2 ± 1.21 (CV = 1%), p-value = 0.014) Table 3 et 4.

Extracteur	A	B - C - D
Moyenne	119,75	165,20
EC	17,84	1,21
CV	0,15	0,01
Min	93,00	163,00
Max	129,00	167,00
p-value		0,014

Table 4. Taille du Pic 1 en fonction de l'extracteur utilisé

La taille du pic 2 est également différente en fonction de l'extracteur utilisé (p-value < 0.005, table 5).

Pic 2	Extracteur	A	B	C	D
	Moyenne		306,80	310,00	315,40
	EC		4,15	1,58	2,19
	CV		0,01	0,01	0,01
	Min		301,00	308,00	314,00
	Max		312,00	312,00	319,00
	p-value B-C-D		0,00158		

Table 5. Taille du Pic 2 en fonction de la méthode d'extraction

(A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemicag 360 (Perkin Elmer®).

L'analyse des profils de tailles montre que l'extracteur A fourni un profil de tailles sensiblement différent des autres extracteurs (p-value = 0.008, Table 6). En effet, son profil de taille a une forte proportion de petits ADNcf (75-239 pb) (90% \pm 9 % (CV = 10%)).

	Extracteur	A	B - C - D
75-239bp	Moyenne	90%	74%
	EC	9%	8%
	CV	10%	11%
	Min	79%	61%
	Max	100%	85%
	p-value	0,008	

Table 6. Proportion d'ADNcf de petites tailles en fonction de la méthode d'extraction

(A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemicag 360 (Perkin Elmer®).

Pour les extracteurs B, C et D, des profils typiques d'ADNcf sont obtenus (Table 7) et ne sont pas statistiquement différents. En effet, l'extracteur B extrait 79 \pm 7 % (CV=9%) d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 235 pb, 15 \pm 3 % (CV = 18%) d'ADNcf de tailles comprises entre 240 et 369 pb, 3 \pm 3 % (CV = 114%) d'ADNcf de tailles comprises entre 370 et 579 pb et 4 \pm 2 % (CV = 54%). L'extracteur C extrait 73 \pm 9 % (CV=13%) d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 235 pb, 15 \pm 3 % (CV = 19%) d'ADNcf de tailles comprises entre 240 et 369 pb, 6 \pm 2 % (CV = 40%) d'ADNcf de tailles comprises entre 370 et 579 pb et 6 \pm 4 % (CV = 68%). L'extracteur D extrait 71 \pm 8 % (CV=12%) d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 235 pb, 15 \pm 3 % (CV = 18%) d'ADNcf de tailles comprises entre 240 et 369 pb, 7 \pm 3 % (CV = 47%) d'ADNcf de tailles comprises entre 370 et 579 pb et 7 \pm 3 % (CV = 41%). Table 7

	Extracteur	A	B	C	D
75-239bp	Moyenne	90%	79%	73%	71%
	EC	9%	7%	9%	8%
	CV	10%	9%	13%	12%
	Min	79%	68%	61%	62%
	Max	100%	85%	84%	84%
	p-value		0,97		
	p-value B-C-D			0,995	
240-369bp	Extracteur	A	B	C	D
	Moyenne	5%	15%	15%	15%
	EC	5%	3%	3%	3%
	CV	99%	18%	19%	18%
	Min	0%	11%	10%	11%
	Max	10%	17%	17%	18%
	p-value		0,81		
	p-value B-C-D			0,998	
370-579bp	Extracteur	A	B	C	D
	Moyenne	1%	3%	6%	7%
	EC	2%	3%	2%	3%
	CV	148%	114%	40%	47%
	Min	0%	1%	3%	2%
	Max	5%	8%	9%	10%
	p-value		0,869		
	p-value B-C-D			0,762	
580-1649bp	Extracteur	A	B	C	D
	Moyenne	3%	4%	6%	7%
	EC	3%	2%	4%	3%
	CV	83%	54%	68%	41%
	Min	0%	2%	2%	4%
	Max	7%	7%	13%	10%
	p-value		0,203		
	p-value B-C-D			0,915	

Table 7. Profils de tailles de l'ADNcf en fonction de la méthode d'extraction

(A) MagNA Pure 24 (Roche®), (B) IDEAL (IDSolution®), (C) LabTurbo 24 (Taigen®) et (D) Chemagic 360 (Perkin Elmer®).

1.1.3- Corrélation des taux d'ADNcf mesuré par les différentes méthodes de quantification

1.1.3.1- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par ddPCR

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et celui mesuré par ddPCR est de 0.63, 0.72, 0.81 et 0.99 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 5)

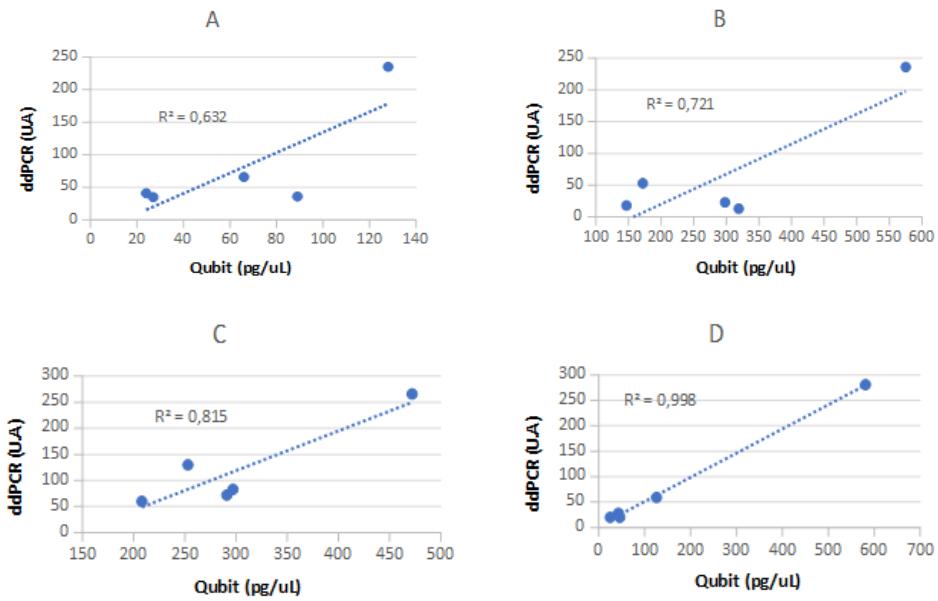


Figure 5. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et par ddPCR

1.1.3.2- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par le BiaBooster

1.1.3.2.1- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par le BiaBooster

Le facteur de corrélation entre la concentration totale d'ADNcf mesuré par ddPCR et celui mesuré par BiaBooster est de 0.91, 0.99, 0.94 et 0.96 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 6)

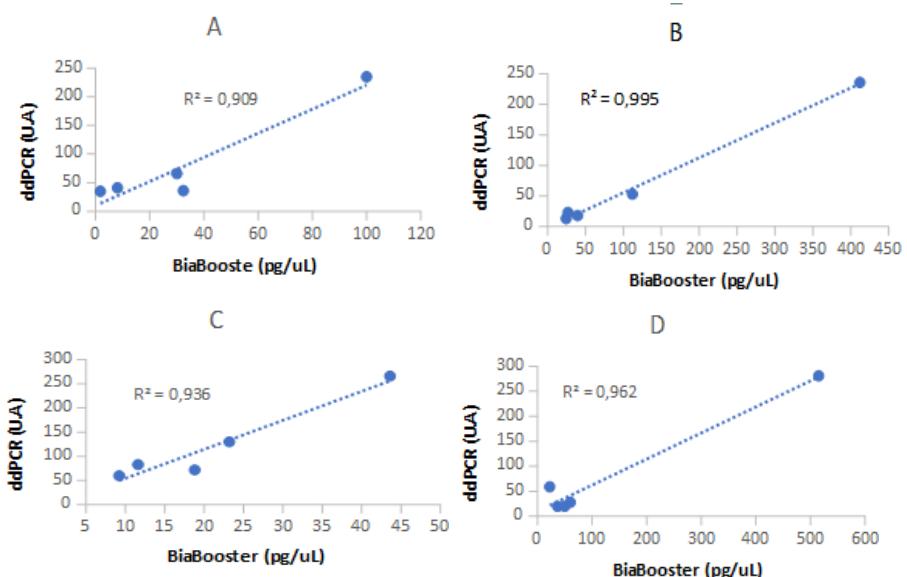


Figure 6. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par BiaBooster et par ddPCR

1.1.3.2.2- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et les différentes fractions de tailles d'ADNcf mesurés par BiaBooster

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb est de 0.92, 0.98, 0.89 et 0.96 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. Figure 7

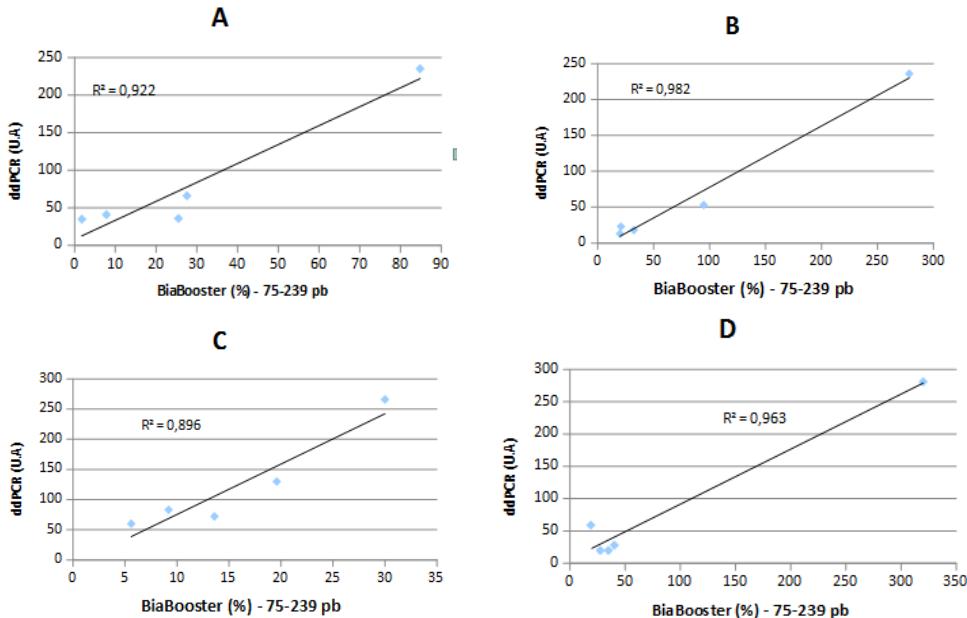


Figure 7. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb est de 0.91, 0.99, 0.90 et 0.95 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. Figure 8

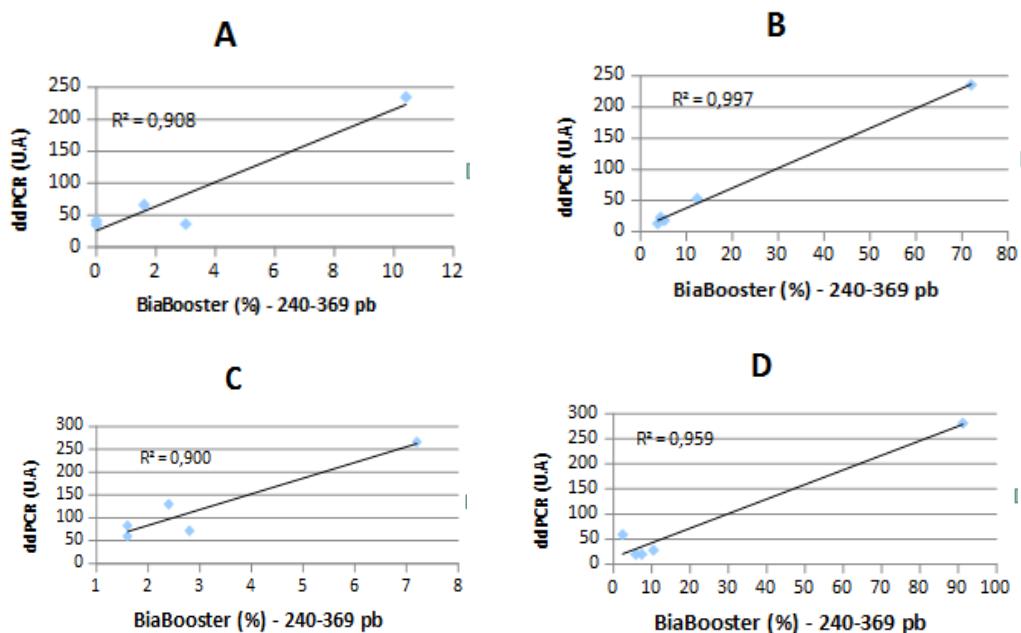


Figure 8. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb est de 0.59, 0.97, 0.82, 0.96 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement.

Figure 9

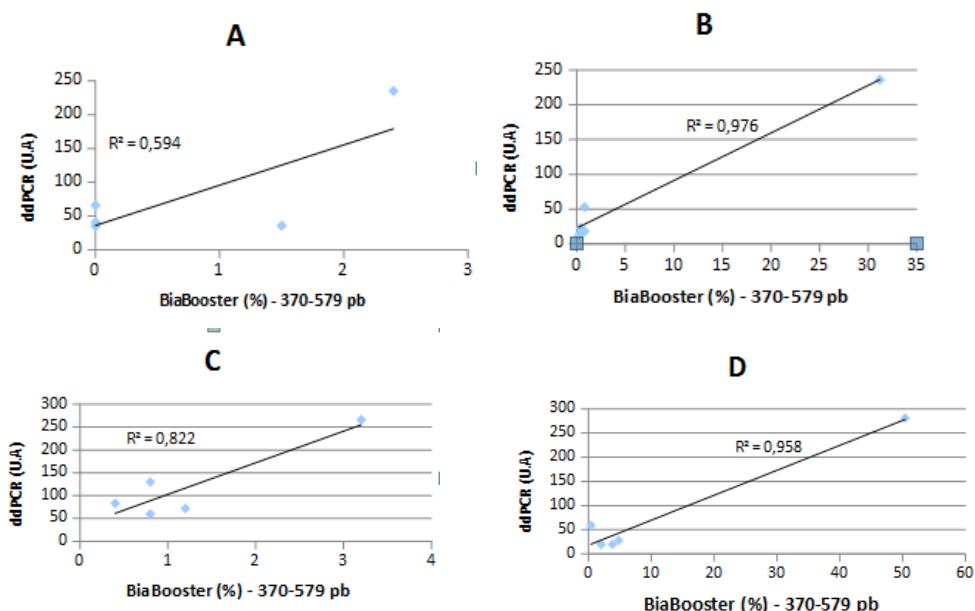


Figure 9. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb est de 0.33, 0.99, 0.65 et 0.96 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. Figure 10

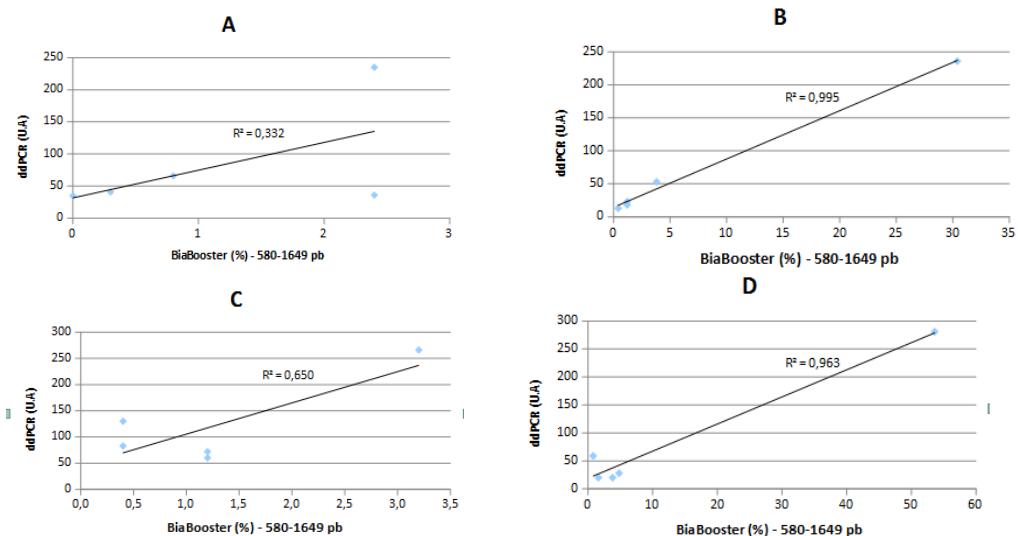


Figure 10. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par ddPCR et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb

1.1.3.3- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par le BiaBooster

1.1.3.3.1- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par le BiaBooster

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et celui mesuré par BiaBooster est de 0.88, 0.67, 0.80, 0.954 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 11)

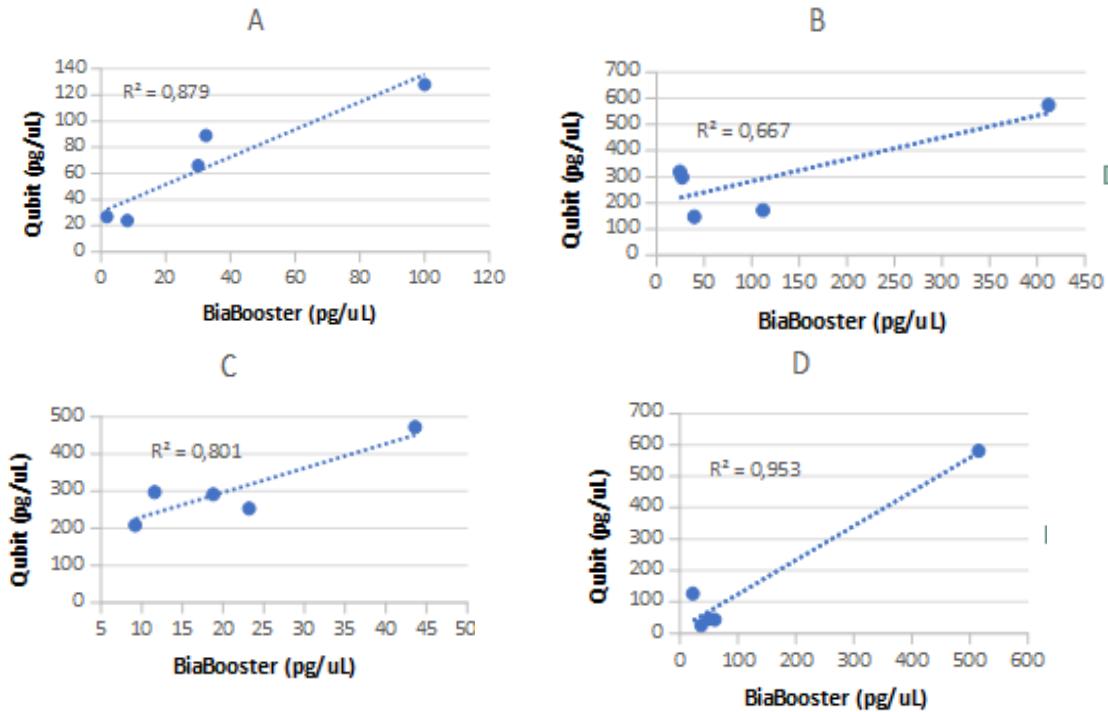


Figure 11. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par BiaBooster et par Qubit

1.1.3.3.2- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et les différentes fractions de tailles d'ADNcf mesurés par BiaBooster

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb est de 0.86, 0.61, 0.71 et 0.95 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 12)

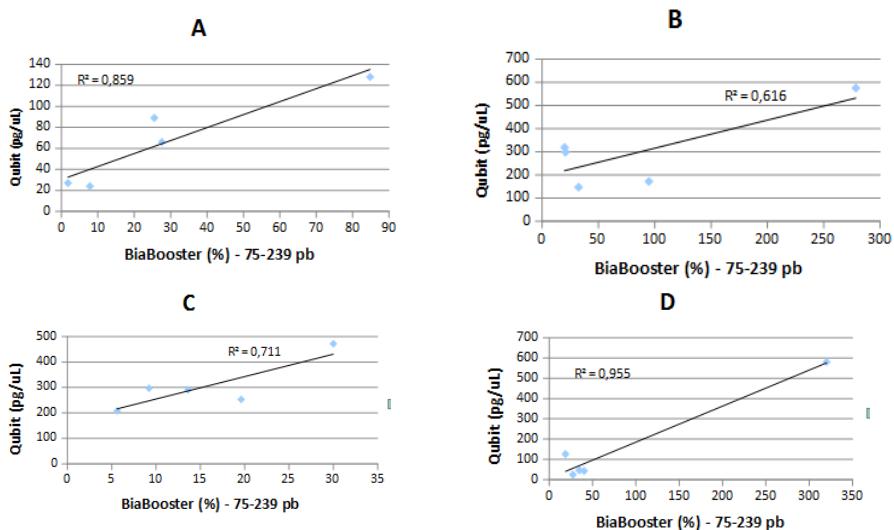


Figure 12. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb est de 0.86, 0.74, 0.88 et 0.95 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 13)

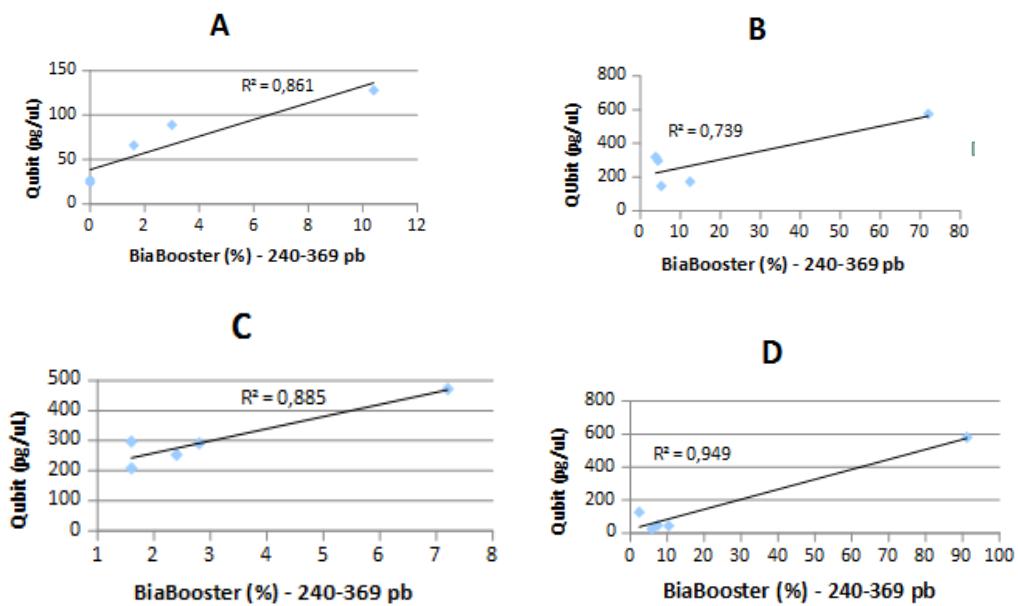


Figure 13. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 240 à 369 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb est de 0.85, 0.79, 0.81 et 0.95 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 14)

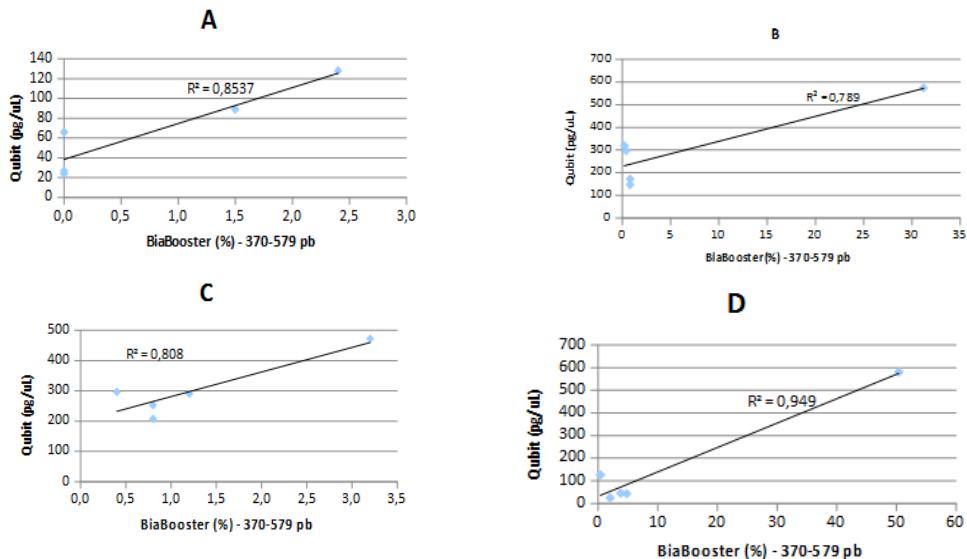


Figure 14. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 370 à 579 pb

Le facteur de corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb est de 0.86, 0.75, 0.69 et 0.95 pour les extracteurs A, B, C et D respectivement. (Figure 15)

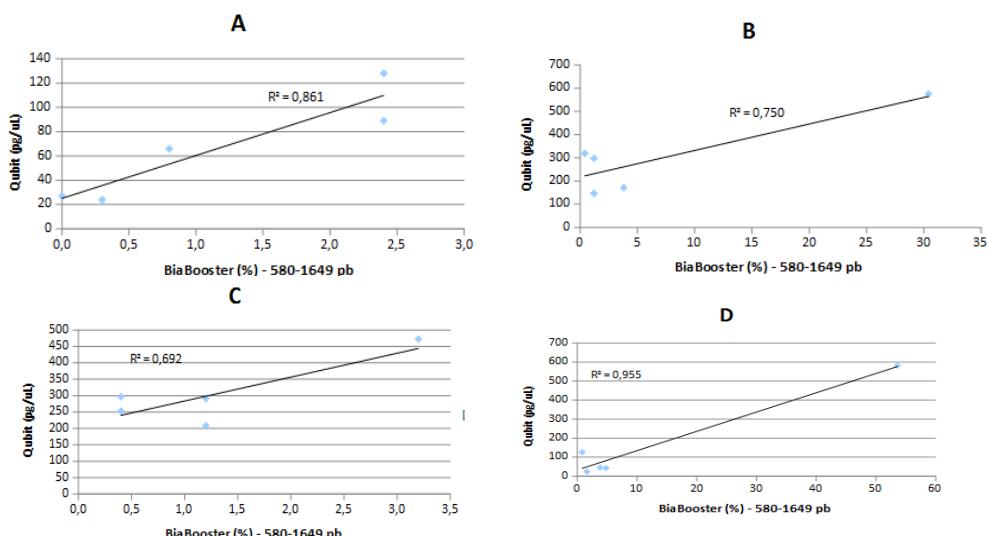


Figure 15. Corrélation de mesure du taux d'ADNcf par Qubit et la fraction d'ADNcf de tailles 580 à 1649 pb

Ainsi, le taux d'ADNcf est supérieur lorsque mesuré par Qubit mais similaire lorsque mesuré par ddPCR ou BiaBooster. Mesuré par Qubit, le taux d'ADNcf est plus faible lorsque extrait par MagNa Pure 24. Mesuré par ddPCR et BiaBooster, le taux d'ADNcf est similaire quel que soit la méthode d'extraction.

Les mesures de taux d'ADNcf par ddPCR, BiaBooster et Qubit sont toutes corrélées.

Les extracteurs ont également une influence sur l'intégrité de l'ADNcf, en effet, extrait par MagNa Pure 24, la taille du pic 1 est nettement plus faible et présente un profil de tailles avec une forte proportion de petits ADNcf (75-239 pb). La taille du pic 2 est variable fonction de l'extracteur utilisé. Pour les extracteurs B, C et D des profils typiques sont obtenus.

Pour la suite de nos travaux, nous avons retenu l'extracteur semi-automatique IDEAL (ID solution ®) utilisant le kit IDXTRACT-MAG car permettant une extraction d'ADNcf plasmatique quantitativement élevé avec des tailles de fragments répartis comme classiquement décrits (4, 6, 38)

1.2- Détermination des valeurs normales de quantification de l'ADNcf

1.2.1- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par ddPCR

Au total 120 échantillons ont été prélevés, 53 de sexe féminin et 67 de sexe masculin. Le taux moyen d'ADNcf est de $5,6 \pm 3$ U.A (CV = 53%), soit $23,1 \pm 12$ pg/μL (CV = 53%) (Table 8).

Cinq volontaires sains présentent un taux d'ADNcf supérieur à un taux équivalent à la [moyenne \pm deux écarts type] soit 47,36 pg/μL.

	Age	Quantification ddPCR (copies/μL)	concentration ADNcf échantillon (pg/μL)	quantification ddPCR RPP30 (copies/μL)	quantification ddPCR RPP30 (pg/μL)	1er pic (bp)	2ème pic (bp)	Quantification BiaBooster (pg/μL)	75-239bp	pg/uL	240-369bp	pg/uL	370-579bp	pg/uL	580-1649bp	pg/uL	Qubit png/μL
moyenne	41	5,57	23,12	5,26	36,23	163,26	307,40	59,92	73%	43,94	16%	9,10	6%	3,20	6%	3,40	90,10
écart type	15	2,97	12,12	2,42	21,02	1,80	3,04	32,22	6%	24,38	2%	4,67	2%	1,83	3%	1,89	33,90
CV	37	53,36	52,43	45,97	57,80	1,10	0,99	53,77	8%	55,49	12,00	51,31	29,00	56,00	52,58	55,79	37,65
minimum	19	0,70	3,00	0,55	5,00	160,00	301,00	8,40	46%	5,60	9%	1,40	2%	0,60	2%	0,60	17,00
maximum	70	17,74	73,00	10,88	90,00	167,00	315,00	205,00	88%	149,00	19%	26,80	10%	10,40	32%	10,20	187,00
25 ^e percentile	26	3,63	15,00	3,28	17,75	162,00	305,00	36,80	0,69	26,40	0,15	5,55	0,04	1,80	0,04	2,00	65,00
75 ^e percentile	54	6,68	28,00	6,94	50,50 ²²	165,00	309,00	76,00	0,76	58,00	0,17	11,70	0,07	4,20	0,07	4,40	112,00
mediane	41																

Table 8. Taux d'ADNcf mesuré au sein de la cohorte de volontaires sains par différentes techniques (ddPCR, RPP30, Biabooster, Qubit).

De manière globale, les femmes présentent un taux d'ADNcf similaire aux hommes ($5,5 \pm 3,3$ UA (CV = 60%) versus $5,65 \pm 2,13$ UA (CV = 47%), p-value = 0.67). Mais le taux d'ADNcf

est plus élevé dans les échantillons issus de volontaires sains d'âge supérieur à 41 ans ($6,3 \pm 3,2$ (51%) versus $4,9 \pm 2,7$ (55%). p-value = 0,007). (Table 9)

Les hommes et les femmes ayant un âge supérieur à 41 ans présentent un taux similaire d'ADNcf ($5,8 \pm 3$ (48%) versus $7,5 \pm 4,6$ (55%). p-value = 0.34). Mais les hommes âgés de moins de 41 ans présentent un taux d'ADNcf supérieur au taux des femmes de moins de 41 ans ($5,9 \pm 2,9$ (49%) versus $4,26 \pm 2,36$ (56%) (p-value = 0.04). (Table 9)

		N	age (m ± ET (CV))	ADNcf (m ± ET (CV))	p-value
Hommes vs Femmes	hommes	67	$41,8 \pm 15,8$ (38%)	$5,7 \pm 2,13$ (47%)	0,67
	femmes	53	$39,1 \pm 14,6$ (37%)	$5,5 \pm 3,3$ (60%)	
> 41 ans vs < 41 ans	> 41 ans	59	$54 \pm 8,4$ (15%)	$6,3 \pm 3,23$ (51%)	0,007
	< 41 ans	61	26 ± 6 (23%)	$4,9 \pm 2,7$ (55%)	
Hommes > 41 ans vs Femmes > 41 ans	Hommes > 41 ans	34	$55 \pm 8,7$ (16%)	$5,8 \pm 3$ (48%)	0,34
	Femmes > 41 ans	25	$52,5 \pm 8,2$ (16%)	$7,5 \pm 4,6$ (55%)	
Femmes < 41 ans vs Hommes < 41 ans	Hommes < 41 ans	33	$27,1 \pm 6,34$ (23%)	$5,9 \pm 2,9$ (49%)	0,036
	Femmes < 41 ans	28	$24,7 \pm 5,6$ (23%)	$4,26 \pm 2,36$ (56%)	

Table 9. Taux moyen d'ADNcf mesuré par ddPCR en fonction de l'âge et du sexe

1.2.2- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par RPP30

Le taux moyen d'ADNcf est de 36.2 ± 21 pg/ μ L (CV=58%). La variation des mesures du taux d'ADNcf par RPP30 est équivalente à celles obtenues par ddPCR et BiaBooster (58% versus 53.4% et 53.7% respectivement) (Table 8).

Deux volontaires sains présentent un taux d'ADNcf supérieur à un taux équivalent à la [moyenne \pm deux écarts type] soit 78.13 pg/ μ L, tous deux communs à ceux retrouvés par ddPCR et un commun à ceux retrouvés par BiaBooster.

Le taux d'ADNcf ne varie pas en fonction de l'âge ou du sexe des individus (Table 10).

		N	age (m±ET (CV))	ADNcf (m±ET (CV))	p-value
Hommes vs Femmes	hommes	22	$41,8 \pm 15,8$ (38%)	$5,7 \pm 2,13$ (47%)	0,44
	femmes	21	$39,1 \pm 14,6$ (37%)	$5,11 \pm 2,8$ (54%)	
> 41 ans vs < 41 ans	> 41 ans	22	$54 \pm 8,4$ (15%)	$5,7 \pm 2,6$ (46%)	0,43
	< 41 ans	22	26 ± 6 (23%)	$5,4 \pm 2,36$ (44%)	
Hommes > 41 ans vs femmes > 41 ans	Hommes > 41 ans	10	$55 \pm 8,7$ (16%)	$5,7 \pm 2$ (34%)	0,92
	Femmes > 41 ans	11	$52,5 \pm 8,2$ (16%)	$5,8 \pm 3,4$ (59%)	
Femmes < 41 ans vs hommes < 41 ans	Hommes < 41 ans	12	$27,1 \pm 6,34$ (23%)	$6,6 \pm 2,2$ (33%)	0,2
	Femmes < 41 ans	10	$24,7 \pm 5,6$ (23%)	$4,44 \pm 2,11$ (48%)	

Table 10. Taux moyen d'ADNcf mesuré par RPP30 en fonction de l'âge et du sexe

1.2.3- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par BiaBooster

Le taux moyen d'ADNcf 59.9 ± 32.2 pg/ μ L (CV = 54%) dont $73 \pm 6\%$ (CV=8%) sont de taille comprise entre 75 et 239 pb, $16 \pm 2\%$ (CV = 12%) est de taille comprise entre 240 et 369 pb, $6 \pm 2\%$ (CV = 29%) sont de taille comprise entre 370 et 579 pb et $6 \pm 3\%$ (CV = 53%) sont de taille comprise entre 580 et 1649 pb (Table 8). Ainsi, mesuré par BiaBooster, le taux d'ADNcf est 2.56 fois plus élevé en moyenne que lorsqu'il est mesuré par ddPCR. (Table 6)

La variation des mesures est meilleure pour les fractions d'ADNcf de taille 75-249 pb (CV= 8%). Plus les fragments d'ADNcf sont grand, plus la variation est importante (CV = 12%, 29% et 53% pour les fractions de tailles 240 à 369 pb, 370 à 579 pb et 580 à 1649 pb respectivement) (Table 8).

Quatre volontaires sains présentent un taux d'ADNcf supérieur à un taux équivalent à la [moyenne \pm deux écarts type] soit 124.36 pg/ μ L, dont deux sont communs à ceux retrouvé par ddPCR.

Les hommes et les femmes présentent un taux d'ADNcf similaire (59.8 ± 28.3 (47%) versus 60 ± 37 (61%), p-value = 0.65), mais le taux est plus élevé chez les volontaires sains d'âge supérieur à 51 ans (71.3 ± 33.8 (47%) versus 54.5 ± 30 (55%), p-value = 0.011). Le profil de taille ne varie pas en fonction de l'âge ou du sexe des individus. Table 11

			N	age (m± ET (CV))	ADNcf (m±ET (CV))	p-value
Hommes vs Femmes	BiaBooster	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	59,8±28,3 (47%)	0,65
		femmes	53	39,1±14,6 (37%)	60±37 (61%)	
	75-239 pb	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	72±6 (8%)	0,35
		femmes	53	39,1±14,6 (37%)	73±5 (7%)	
	240-369 pb	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	15,6±2 (12%)	0,6
		femmes	53	39,1±14,6 (37%)	15±2 (13%)	
	370-580 pb	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	5,77±2 (28%)	0,29
		femmes	53	39,1±14,6 (37%)	5,5±2 (30%)	
	580-1649 pb	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	6,4±4 (61%)	0,41
		femmes	53	39,1±14,6 (37%)	5,9±2 (38%)	
> 41 ans vs < 41 ans	BiaBooster	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	67,23±32 (47%)	0,3
		< 41 ans	61	26±6 (23%)	54±33 (61%)	
	75-239 pb	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	73±6 (8%)	0,15
		< 41 ans	61	26±6 (23%)	71,8±6 (8%)	
	240-369 pb	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	15,3±2 (12%)	0,11
		< 41 ans	61	26±6 (23%)	15,8±2 (13%)	
	370-580 pb	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	5,4±2 (29%)	0,138
		< 41 ans	61	26±6 (23%)	5,85±2 (31%)	
	580-1649 pb	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	5,9±4 (68%)	0,39
		< 41 ans	61	26±6 (23%)	6,49±2 (36%)	
> 51 ans vs < 51 ans	BiaBooster	> 51 ans	38	59,5±5,06 (8%)	71,3±33,8 (47%)	0,011
		< 51 ans	79	32,1±9,24(29%)	54,5±30 (55%)	
	75-239 pb	> 51 ans	39	59,5±5,06 (8%)	73±6 (9%)	0,495
		< 51 ans	81	32,1±9,24(29%)	72±5 (7%)	
	240-369 pb	> 51 ans	39	59,5±5,06 (8%)	15±2 (11%)	0,302
		< 51 ans	81	32,1±9,24(29%)	16±2 (13%)	
	370-580 pb	> 51 ans	39	59,5±5,06 (8%)	5±2 (29%)	0,484
		< 51 ans	81	32,1±9,24(29%)	6±2 (29%)	
	580-1649 pb	> 51 ans	39	59,5±5,06 (8%)	6±5 (77%)	0,77
		< 51 ans	81	32,1±9,24(29%)	6±2 (37%)	
Hommes > 41 ans vs femmes > 41 ans	BiaBooster	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	61,3±23 (37%)	0,16
		Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	78,6±45 (57%)	
	75-239 pb	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	72±7(10%)	0,16
		Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	75±4 (5%)	
	240-369 pb	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	15±2 (12%)	0,28
		Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	15±2(12%)	
	370-580 pb	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	6±2 (31%)	0,09
		Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	5±1 (25%)	
	580-1649 pb	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	6±5 (81%)	0,37
		Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	5±2 (34%)	
Femmes < 41 ans vs hommes < 41 ans	BiaBooster	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	64,8±37 (57%)	0,077
		Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	46±27,5(60%)	
	75-239 pb	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	73±5 (7%)	0,96
		Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	72±6 (8%)	
	240-369 pb	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	15±2 (13%)	0,88
		Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	16±2 (14%)	
	370-580 pb	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	6±2 (30%)	0,99
		Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	6±2 (32%)	
	580-1649 pb	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	6±2 (32%)	0,82
		Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	6±3 (32%)	

Table 11. Quantification et qualification de l'ADNcf de la cohorte de volontaire sain par BiaBooster en fonction de l'âge et du sexe

1.2.4- Valeurs normales de l'ADNcf mesuré par Qubit

Le taux moyen d'ADNcf est de $90,1\pm33,9$ pg/ μ L (CV 38%), soit 3.9 fois le taux mesuré par ddPCR et 1.51 fois celui mesuré par BiaBooster. Les mesures du taux d'ADNcf par Qubit est moins variable que celles obtenues par ddPCR et par BiaBooster (CV 38% versus 53.4% et 53.7% respectivement) Table 8.

Quatre volontaires sains présentent un taux d'ADNcf supérieur à un taux équivalent à la [moyenne \pm deux écarts type] soit 157,8 pg/ μ L, dont un commun à ceux retrouvé par ddPCR et un commun à ceux retrouvé par BiaBooster.

Le taux d'ADNcf ne varie pas en fonction de l'âge ou du sexe des individus (Table 12).

		N	age (m ± ET (CV))	ADNcf (m±ET (CV))	p-value
Hommes vs Femmes	hommes	67	41,8±15,8 (38%)	89,6±31,3 (35%)	0,853
	femmes	53	39,1±14,6 (37%)	90,8±37 (41%)	
> 41 ans vs < 41 ans	> 41 ans	59	54±8,4 (15%)	88±37 (41%)	0,911
	< 41 ans	61	26±6 (23%)	89,4±31 (35%)	
Hommes > 41 ans vs femmes > 41 ans	Hommes > 41 ans	34	55±8,7 (16%)	84,6±32 (38%)	0,55
	Femmes > 41 ans	25	52,5±8,2 (16%)	107±39 (37%)	
Femmes < 41 ans vs hommes < 41 ans	Hommes < 41 ans	33	27,1±6,34 (23%)	91,9±29,5 (32%)	0,65
	Femmes < 41 ans	28	24,7±5,6 (23%)	87,6±33 (38%)	

Table 12. Taux moyen d'ADNcf mesuré par **Qubit** en fonction de l'âge et du sexe

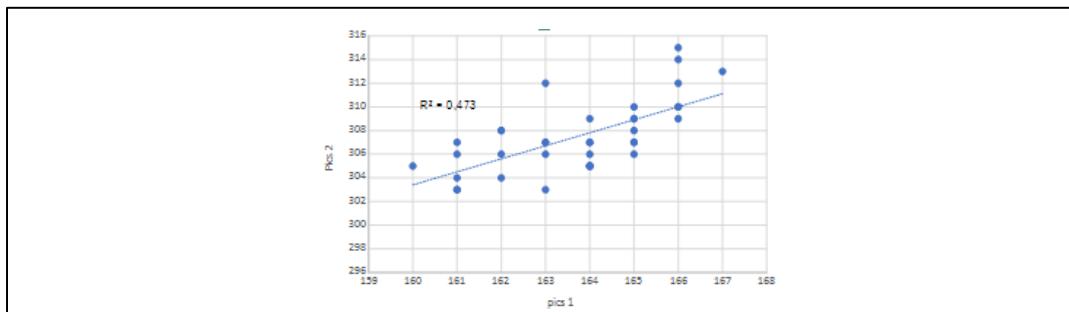
1.3- Corrélation de la concentration d'ADNcf entre les différentes méthodes de mesures

1.3.1 – Évaluation du profil normal de taille d'ADNcf obtenu par le Biabooster

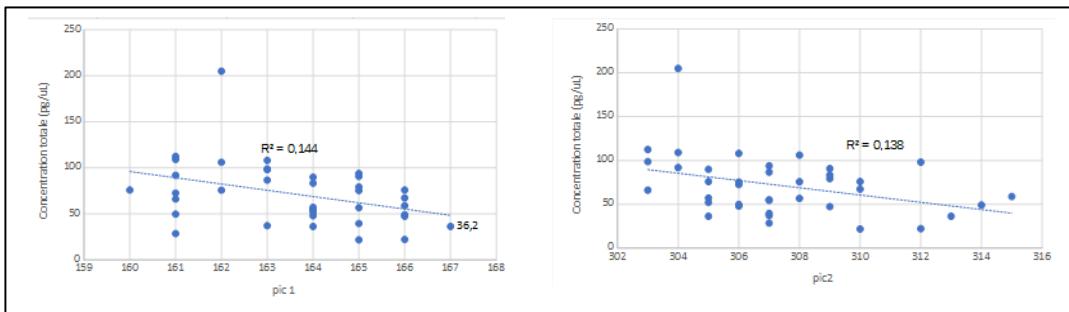
1.3.1.1 - Corrélation entre la taille des pics 1 et 2 et la concentration d'ADNcf mesurée par BiaBooster

La taille du premier pic est de $163,26 \pm 1,8$ (CV=110%) pb, la taille du deuxième pic est de $307,4 \pm 3,04$ (CV=99%) pb (Table 8).

Il est observé une corrélation entre la taille du pic 1 et la taille du pic 2 ($r^2 = 0.473$) (Figure 16A) mais il n'existe aucune corrélation entre la concentration totale mesurée par BiaBooster et les tailles des pic 1 ou 2 ($r^2 = 0.144$ et 0.138 pour le pic 1 et le pic 2 respectivement). Figure 16B



A. Corrélation de mesure entre la taille du pic 1 et la taille du pic 2 mesuré par BiaBooster



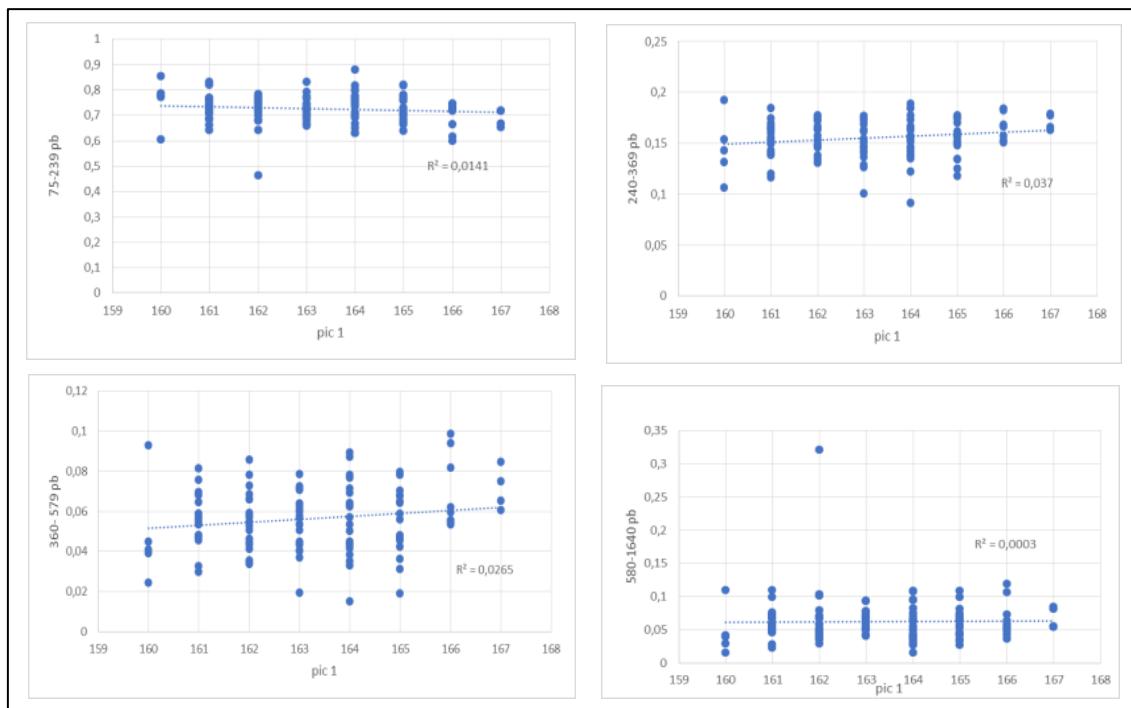
B. Corrélation de mesure entre la taille des pics 1 et 2 et la concentration totale en ADNcf mesuré par BiaBooster

Figure 16. Corrélation de mesure de la taille des pics obtenus par BiaBooster

1.3.1.2- Corrélation entre la taille des pics 1 et 2 et les différentes proportions de tailles d'ADNcf

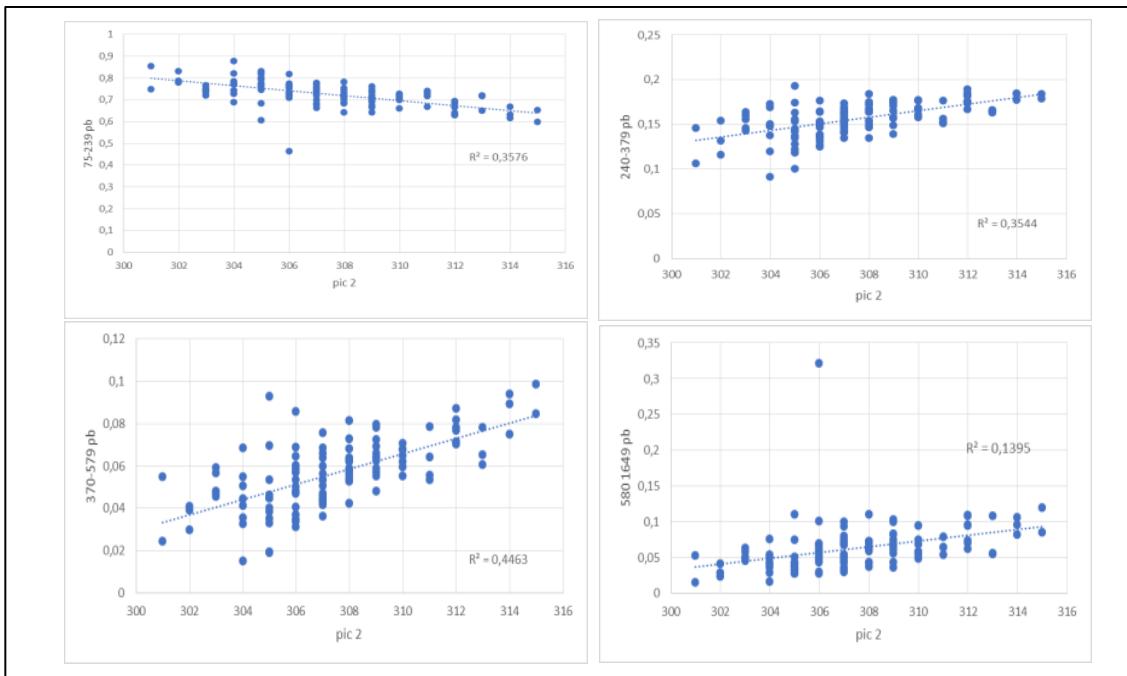
Il n'existe aucune corrélation entre la taille du pic 1 et les proportions des différentes fractions de tailles de l'ADNcf ($r^2 = 0.014$, 0.037 , 0.026 et 0.003 pour les fractions de tailles $75\text{-}239\text{pb}$, $240\text{-}369\text{ pb}$, $370\text{-}579\text{ pb}$ et $580\text{-}1640\text{ pb}$ respectivement) Figure 17A.

Il n'existe aucune corrélation entre la taille du pic 2 et les proportions des différentes fractions de tailles de l'ADNcf ($r^2 = 0.357$, 0.354 , 0.446 et 0.139 pour les fractions de tailles $75\text{-}239\text{pb}$, $240\text{-}369\text{ pb}$, $370\text{-}579\text{ pb}$ et $580\text{-}1640\text{ pb}$ respectivement). Figure 17B



A. Corrélation de mesure entre la taille du pic 1 et les proportions des différentes fractions de tailles d'ADNcf

Figure 17. Corrélation de mesure entre la taille des pics et la proportion des différentes fractions de tailles d'ADNcf obtenus par BiaBooster



B. Corrélation de mesure entre la taille du pic 2 et les proportions des différentes fractions de tailles d'ADNcf

Figure 17. Corrélation de mesure entre la taille des pics et la proportion des différentes fractions de tailles d'ADNcf obtenus par BiaBooster

1.3.2- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par RPP30

Le facteur de corrélation entre la mesure de la concentration totale d'ADNcf par ddPCR et celle par RPP30 est de 0,54. (Figure 18)

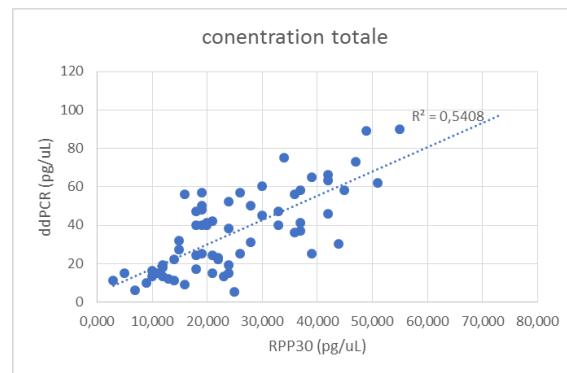


Figure 18. Corrélation de mesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par RPP30

1.3.3- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par BiaBooster

Le facteur de corrélation entre la mesure de la concentration totale d'ADNcf par ddPCR et celle par BiaBooster est de 0,75. Le meilleure corrélation observée est celle obtenue concernant les mesures de la concentration totale en ADNcf par ddPCR et les mesures de concentration de la fraction d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 239 pb ($r^2 = 0,74$, versus $r^2 = 0,68$, 0,53 et 0,35 pour la concentration des fraction d'ADNcf de tailles comprise entre 240 et 369 pb, entre 370 et 569 pb et entre 570 et 1649 pb respectivement). (Figure 19)

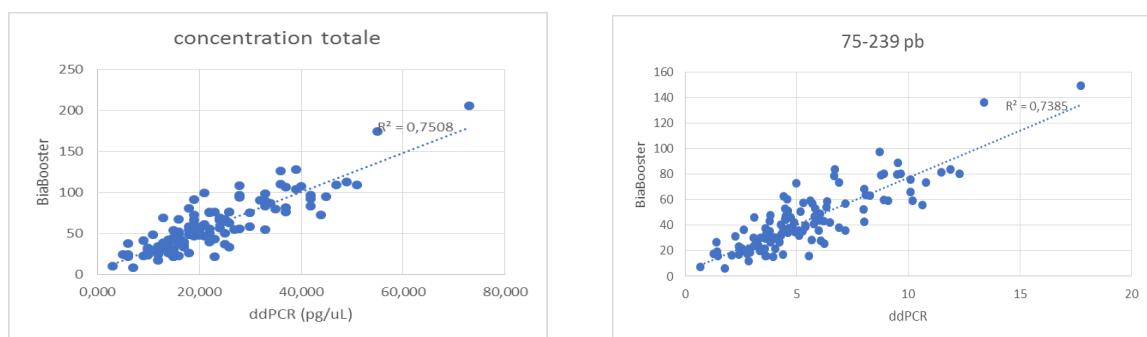


Figure 19. Corrélation de mesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par BiaBooster

1.3.4- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par ddPCR et par Qubit

Les concentrations d'ADNcf obtenues par Qubit ne sont pas fortement corrélées à celles obtenues par ddPCR ($r^2 = 0.38$).

1.3.5- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par BiaBooster

Les concentrations d'ADNcf obtenues par Qubit ne sont pas fortement corrélées à celles obtenues par BiaBooster ($r^2 = 0.36$). Les mesures de la concentration totale en ADNcf par Qubit et les mesures de concentration des fractions de taille d'ADNcf par BiaBooster ne sont pas fortement corrélées ($r^2 = 0.36$, 0.34, 0.22 et 0.16 pour la concentration des fraction d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 239 pb, 240 et 369 pb, entre 370 et 569 pb et entre 570 et 1649 pb respectivement).

1.3.6- Corrélation entre le taux d'ADNcf mesuré par Qubit et par RPP30

Les concentrations d'ADNcf obtenues par Qubit ne sont pas fortement corrélées à celles obtenues par RPP30 ($r^2 = 0.25$).

1.3.7- Corrélation technique entre le taux d'ADNcf mesuré par BiaBooster et par RPP30

Le facteur de corrélation entre les concentrations d'ADNcf obtenues par RPP30 et celles

obtenues par BiaBooster est de 0,69. La meilleure corrélation observée est celle entre les concentrations ADNcf obtenues par RPP30 et celles de la fraction d'ADNcf de tailles comprises entre 75 et 239 pb ($r^2 = 0,68$, versus $r^2 = 0,59$, 0,38 et 0,23 pour la concentration des fraction d'ADNcf de tailles comprises entre 240 et 369 pb, entre 370 et 569 pb et entre 570 et 1649 pb respectivement). (Figure 20)

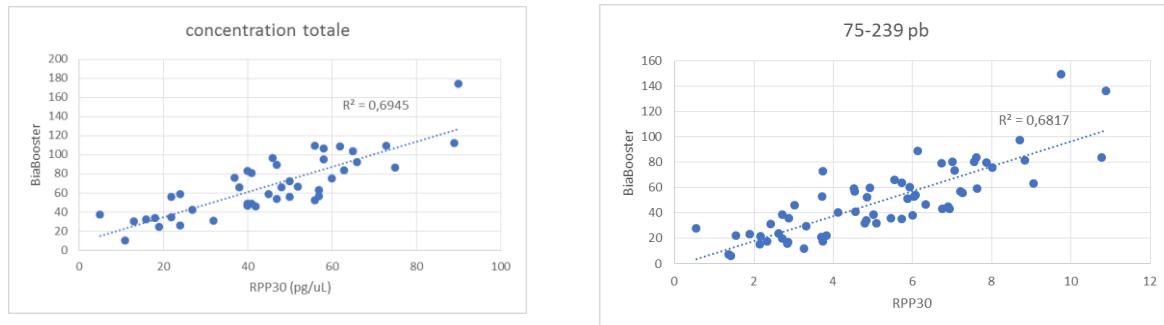


Figure 20. Corrélation de mesure de la concentration d'ADNcf par ddPCR et par BiaBooster

2- Cohorte

2.1- Inclusions et caractéristiques clinico-biologiques

Le premier patient est inclus le 10/08/2018. Au total, douze patients sont recrutés, sept hommes, cinq femmes. La moyenne d'âge est de 62 ans. Quatre patients reçoivent des cures de PCE pour rejet de greffe cardiaque, quatre pour traitement de LCTC et quatre pour traitement d'un lichen. Les patients traités pour rejet de greffe cardiaque suivent un protocole au rythme de 2 séances de PCE par semaines tous les 15 jours. Les patients traités pour LCTC et lichen suivent un rythme d'une séance de PCE par semaine. Au total 296 prélèvements ont été recueillis. Les patients pour rejet de transplant cardiaque ont été inclus à la première cure de la PCE. Deux patients inclus pour LCTC ont débuté la thérapie par PCE quelques mois avant le début de l'étude, un patient quatre ans avant et un patient lors du début de l'étude. Parmi les patients inclus pour lichen, trois ont débuté la thérapie par PCE plusieurs années avant le début de l'étude, et un patient lors du début de l'étude. (Table 13)

Patients	Sexe	DDN	Pathologie	Début PCE	Inclusion	Protocole PCE	Nb de séances
1	M	18/05/69	Rejet de greffe d'organe solide	10/08/18	10/08/18	2 séances / semaine tous les 15 jours	24
2	M	29/03/90		20/08/18	20/08/18		22
3	M			29/08/18	29/08/18		8 (dcd)
4	M	01/04/88		12/09/18	12/09/18		17
5	F	3/7/45	LCTC	12/02/18	13/08/18	1 séance / semaine	13
6	M	4/11/35		09/09/14	20/08/18		11
7	M	6/6/84		22/05/18	23/08/18		7
12	F	15/4/32		10/01/19	10/01/19		6
8	F	23/2/40	Lichen	24/02/14	13/08/18	13	13
9	F	26/7/56		14/02/13	03/09/18		11
10	F	17/6/69		15/04/14	20/09/18		8
11	M	9/4/69		13/12/18	13/12/18		12

Table 13. Caractéristiques générales du protocole de PCE de la cohorte de patients.

Les patients inclus pour rejet de transplant cardiaque, présentent un grade 1A/1R selon la classification ISLHT 4 et AMR. Trois mois après le début des PCE, le patient 1 est resté stable à un grade 1A/1R tandis que le patient 2 et le patient 4 se sont améliorés et présentent un grade 0. Le patient 3 s'est vu dégradé son état clinique et est décédé. Table 14

Patient	Date de naissance	Date de greffe	protocole immunosupresseur	Date de rejet greffe	Date début PCE	echo avant PCE	Stade ABMR avant début PCE	Coro avant début PCE	Echographie post PCE	Stade ABMR post PCE
1	18/05/69	08/01/13	neoral/myfortic/solupred 10mg	04/11/2013	10/08/18	fonction systolique normale, FEVG 80%, syndrome restrictif TRIC 108, E/Ea à 2,9at	1A/1R sans nécrose et sans composante humorale			10/12/2018 : grade 1A/1R
2	29/03/90	10/11/09	prograf/certican/solupred 10mg/Myfortic	24/11/2009	20/08/18	fonction systolique normale avec FEVG 80%, syndrome restrictif avec E/A 3.1, TRIV 127	24/11/2009 : rejet aigu avec nécrose. Puis rejet faible 1A/1R sans nécrose. Le 20/04/2018 : rejet avec nécrose et rejet humorale traité par plasmaphérèse.	CAV stade 3 avec stent CD	FEVG 83%, amélioration du syndrome restrictif avec une E/A 1.8 et TRIV à 140	10/11/2018 : grade 0. 01/04/2019 : 1A/1R
3					29/08/18					
4	01/04/88	19/04/14	prograf/myfortic/solupred 10mg/certican	26/06/2015	12/09/18	fonction systolique normale, FEVG 84%, syndrome restrictif avec E/A 3,6, TRIV 120	1A/1R	Plaque 30% IVa (stade 1 CAV)	FEVG à 89%, E/A 1,5, TRIV 140	10/12/2018 : grade 0

Table 14. Caractéristiques des patients en rejet de transplant cardiaque.

Les patients inclus pour LCTC sont tous au stade IVa de leur pathologie. Depuis le début des PCE, le patient 5 présente une amélioration symptomatique (diminution des prurits) avec une diminution du clone de sezary de 15%. Le patient 6 est en rémission et ne présente plus de cellules de sezary circulantes. Le patient 7 présente une amélioration des symptômes cutanés mais le clone de sezary n'a cessé d'augmenter, passant de 4% à 80% durant l'étude. Le patient 12 est en lente amélioration clinique et a son clone de sezary diminué jusqu'à 1% durant l'étude.

Table 15

Patient	Date de naissance	pathologie	date diagnostic	traitement pharmaceutique	Date début PCE	Date inclusion protocole ADNcf	Marqueurs clinique au diagnostic	Evolution des marqueurs clinique après début PCE	Etat clinique avant début protocole	Cellule de sezary au diagnostic	Evolution des cellules de sezary après début PCE	ND et % cellules de sezary avant début protocole	traitement intercurrent durant le protocole	évolution clinique durant le protocole	évolution biologique durant le protocole
5	3/7/45	LCTC	1/8/17	non	12/02/18	13/08/18	Stade IVA	05/2018: amélioration symptomatique (prurit)	08/2018: idem	6 G/I lympho (90% de Sézary)	02/2018: 6800 lympho (80% Sézary)	13/08/2018: 5330 lympho (85% Sézary)	Aucun	stable: quelques plaques abdominales prurigineuses	03/2019 : persistance lymphocytose 5-5,5 G/l et 75% de sezary
6	4/11/35		1/7/14	topiques corticoïdes	09/09/14	20/08/18	Stade IVA	11/2014: Stagnation \$ cutanés	quasi-rémission cutanée	3 G/I lympho (22% de Sézary)	12/2014 : 1400 lympho (50% de Sézary)	06/2018: 580 lymphocytes - rares cell de sézary	interféron 6 Millions U x 3/semaine	rémission cutanée	03/2019: 280 lympho - pas de Sézary
7	6/6/84		1/3/17	interféron/gemcitabine	22/05/18	23/08/18	Stade IVA	09/2018 : amélioration cutanée	en amélioration	inconnu (diagnostic dans un autre CHU)	08/2018: 920 lympho (4% Sézary)	09/2018: 1,6 G/I lympho (31% Sézary)	09/2018: Targretin	progression	11/2018: 1530 lympho (80% de Sézary)
12	15/4/32		1/11/17	Metotrexate	10/01/19	10/01/19	Stade IVA	en amélioration minimale (érythrodermie)	idem initial	2600 lympho (18% Sézary)	28/03/2019: 1100 lympho (2% Sézary)	10/01/2019: 1600 lympho (17% Sézary)	Aucun	lente amélioration	05/2019: 730 lympho (1% de Sézary)

Table 15. Caractéristiques des patients LCTC.

Les patients 8 et 10, inclus pour lichen, présentent une amélioration et une stabilisation respectivement avec phénomène de dépendance à l'espacement des PCE. Le patient 9 est en amélioration mais sans rémission. Le patient 11 est en amélioration significative avec disparition de certaines lésions. Table 16

Patient	Date de naissance	pathologie	date diagnostic	traitement pharmaceutique	Date début PCE	Date inclusion protocole ADNcf	Marqueurs clinique au diagnostic	Evolution des marqueurs clinique après début PCE	Etat clinique avant début protocole	marqueurs biologique au diagnostic	traitement intercurrent durant le protocole	évolution clinique durant le protocole
8	23/2/40	LICHEN	1/2/13	corticothérapie/Mycophénolate	24/02/14	13/08/18	plaques buccales	pas de rémission, amélioration avec phénomène de dépendance à l'espacement des PCE	stable, poussées a minima	non	Aucun	stable
9	26/7/56		année 1994	Ciclosporine/Efalizumab/metotrexate/acitrétine	année 2009	03/09/18	plaques buccales, génitales	amélioration (sans rémission)	en poussée (alors que les séances avaient été espacées à 1/mois)	non	Acitrétine 25 mg/j	amélioration (reprise des séances à 1/15 j)
10	17/6/69		année 2005	Corticothérapie/mycophénolate/acitrétine	15/4/14	20/09/18	plaques buccales, génitales + atteinte cutanée (pieds)	stabilisation des poussées avec dépendance à l'interruption des séances	en poussée ++ (avait interrompu les séances l'été)	non	mycophénolate 1 g/j - Corticothérapie 10 mg/j	amélioration à la reprise des séances
11	9/4/69		enfance ?	corticothérapie/ta-crolimus/acirétine/métopréxate/ciclosporine	13/12/18	13/12/18	atteinte linguale avec dégénérescence carcinomateuse en 1996	amélioration significative avec disparition de certaines lésions (03/2019)	atteinte linguale, leucoplasie ++	non	ciclosporine 100 mg x 2/j	en amélioration constatée en mars 2019

Table 16. Caractéristiques des patients atteints de lichen.

2.2- Effet de la procédure de PCE

2.2.1- Variation de l'expression de l'ADNcf à une heure après la PCE

Globalement, par rapport au taux mesuré avant séance de PCE, le taux d'ADNcf après séance augmente de 1.63 fois par ddPCR et de 1.74 par BiaBooster. Seul le patient 2 présente un profil particulier, avec deux phases : une première phase (séances de PCE 1 à 13) au cours de laquelle le taux d'ADNcf diminue après séance de PCE et une deuxième phase stable (séance de PCE 13 à 22) au cours de laquelle le taux d'ADNcf augmente après chaque séance de PCE comme les autres patients de la cohorte.

Une augmentation significative du taux d'ADNcf après une séance de PCE est observée pour le patient 1, le patient 5 et le patient 8 par ddPCR (p-value < 0.001, < 0.005 et 0.024 pour le patient

1, le patient 5 et le patient 8 respectivement) et chez le patient 1, le patient 4, le patient 5, le patient 6, le patient 8 et le patient 9 par BiaBooster (p-value < 0,0001, 0,0191, 0,001, < 0.001, 0.035, 0.025 pour le patient 1, patient 4, patient 5, patient 6, patient 8 et le patient 9 respectivement). Table 17

	Facteur de variation moyen du taux d'ADNcf après PCE		p-value	
	ddPCR	BiaBooster	ddPCR	BiaBooster
Patient 1	2,31	2,08	0,0001	0,0002
Patient 2	1,03	1,16	0,278	0,693
Patient 3	1,46	1,49	0,390	0,471
Patient 4	1,26	2,24	0,383	0,0191
Patient 5	2,34	2,13	0,0016	0,001
Patient 6	1,15	1,63	0,75	0,0009
Patient 7	1,47		0,1	
Patient 8	2,54	2,18	0,024	0,035
Patient 9	1,94	1,84	0,129	0,025
Patient 10	1,41		0,46	
Patient 11	1,03	0,95	0,869	0,66
Patient 12	1,66		0,0589	
MOYENNE	1,63	1,74		

Table 17. Facteur de variation moyen du taux d'ADNcf après séance de PCE

Après chaque séance de PCE, le taux d'ADNcf du patient 1 augmente jusqu'à un maximum de 3,9 fois par ddPCR et 4,2 fois par BiaBooster. La moyenne différentielle d'augmentation du taux d'ADNcf est de + 11,1 U.A par ddPCR et + 93.4 pg/µL par BiaBooster. (Figure 20, Table 18)

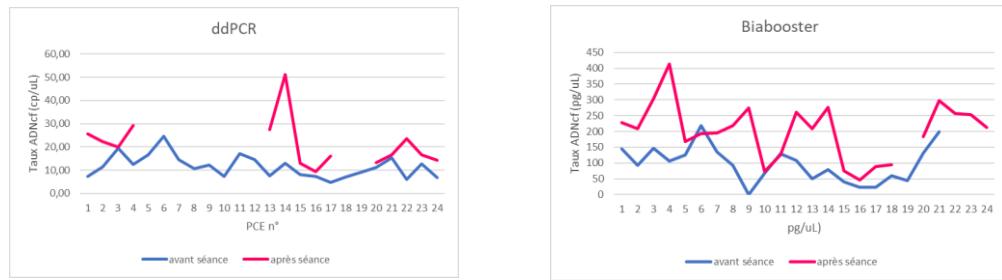
Après chaque séance de PCE, le taux d'ADNcf du patient 5 augmente jusqu'à un maximum de 4.28 fois par ddPCR et 3.24 fois par BiaBooster. La moyenne différentielle d'augmentation du taux d'ADNcf est de + 6.35 U.A par ddPCR et de + 57.96 pg/µL par BiaBooster. (Table 18)

Lors de la première phase, après séance de PCE, le taux d'ADNcf du patient 2 diminue jusqu'à un maximum de 0.84 fois par ddPCR et 0.94 fois par BiaBooster. La moyenne différentielle de variation est de - 32.9 U.A par ddPCR et de -139.1 pg/uL par BiaBooster. Durant la deuxième phase, après séance de PCE, le taux d'ADNcf du patient augmente jusqu'à un maximum de 2.64 par ddPCR et 3.24 fois par BiaBooster. La moyenne différentielle de variation est de + 4.27 U.A par ddPCR et de + 55.65 pg/uL par BiaBooster. (Figure 21, Table 18).

		taux ADNcf avant PCE		Taux ADNcf après PCE		Taux ADNcf après PCE/taux ADNcf avant PCE		Taux ADNcf après PCE – Taux ADNcf avant PCE	
		ddPCR	BiaBooster	ddPCR	BiaBooster	ddPCR	BiaBooster	ddPCR	BiaBooster
PATIENT 1	moyenne	11,56	105,11	21,36	202,56	2,31	2,08	11,11	93,35
	écart type	4,81	56,34	10,42	89,01	1,13	1,15	10,40	81,80
	CV	0,42	0,54	0,49	0,44	0,49	0,56	0,94	0,88
	min	4,76	22,20	9,50	46,50	1,03	0,00	0,60	-24,80
	max	24,60	217,40	51,20	414,00	3,91	4,17	38,10	307,60
PATIENT 2	moyenne	55,08	498,47	40,54	421,16	1,03	1,16	-15,39	-47,46
	écart type	46,67	441,77	28,90	287,71	0,63	0,65	27,21	187,46
	CV	0,85	0,89	0,71	0,68	0,61	0,56	-1,77	-3,95
	min	9,39	55,80	13,10	102,00	0,41	0,51	-95,10	-526,00
	max	162,00	1905,00	125,00	979,00	2,64	3,24	18,70	235,80
PATIENT 1	moyenne 1ere phase	87,47	801,33	57,41	611,20	0,65	0,85	-32,87	-139,11
	écart type 1ere phase	39,77	381,68	30,80	240,70	0,16	0,18	26,35	190,36
	CV 1ere phase	0,45	0,48	0,54	0,39	0,25	0,21	-0,80	-1,37
	min 1ere phase	40,20	389,20	30,30	260,00	0,41	0,64	-95,10	-526,00
	max 1ere phase	162,00	1505,00	125,00	979,00	0,84	0,94	-8,90	141,00
PATIENT 3	moyenne phase stable	16,23	135,03	21,55	207,38	1,46	1,47	4,27	55,65
	écartype phase stable	8,54	90,93	6,89	155,95	0,69	0,81	8,00	126,33
	CV phase stable	0,53	0,67	0,32	0,75	0,47	0,55	1,87	2,27
	min phase stable	9,39	55,80	13,10	102,00	0,90	0,51	-3,10	-147,40
	max phase stable	34,90	309,60	31,80	545,40	2,64	3,24	18,70	235,80
PATIENT 4	moyenne	84,03	661,67	49,70	1048,00	1,46	1,49	13,15	358,50
	écart type	58,57	408,93	0,71	726,01	0,55	0,29	13,93	429,27
	CV	0,70	0,62	0,01	0,69	0,38	0,19	1,06	1,20
	min	27,20	326,00	49,20	519,00	1,07	1,15	3,30	76,00
	max	160,00	1204,00	50,20	2202,00	1,85	1,83	23,00	998,00
PATIENT 4	moyenne	15,60	147,08	20,39	231,20	1,26	2,24	4,84	92,64
	écart type	5,12	78,66	16,76	119,21	0,85	2,63	16,03	105,84
	CV	0,33	0,53	0,82	0,52	0,67	1,18	3,32	1,14
	min	2,22	13,40	3,62	93,00	0,26	0,58	-14,37	-92,00
	max	22,20	304,20	74,70	574,00	3,54	11,20	53,60	323,00
PATIENT 5	moyenne	5,80	58,45	11,49	114,38	2,34	2,13	6,35	57,96
	écart type	1,41	18,78	3,25	36,80	0,97	0,73	3,74	34,94
	CV	0,24	0,32	0,28	0,32	0,42	0,34	0,59	0,60
	min	3,98	28,80	7,11	49,80	1,29	0,94	1,58	-3,20
	max	8,10	91,80	17,60	166,00	4,28	3,24	13,49	114,80
PATIENT 6	moyenne	20,72	165,42	31,80	271,08	1,15	1,63	3,40	92,92
	écart type	11,22	61,10	13,89	39,64	0,19	0,42	4,10	50,87
	CV	0,54	0,37	0,44	0,15	0,16	0,26	1,21	0,55
	min	9,06	73,60	18,20	227,30	0,98	1,01	-0,30	3,00
	max	51,20	268,00	51,20	340,40	1,32	2,23	7,00	143,20
PATIENT 7	moyenne	135,22	1821,44	181,80		1,47		49,74	
	écart type	40,40	1397,60	40,11		0,47		50,31	
	CV	0,30	0,77	0,22		0,32		1,01	
	min	193,00	3520,00	233,00		2,09		102,00	
	max	193,00	3520,00	233,00		2,09		102,00	
PATIENT 8	moyenne	21,90	233,98	34,23	452,66	2,54	2,18	20,27	237,11
	écart type	8,48	65,17	7,65	213,57	0,37	0,94	2,83	209,74
	CV	0,39	0,28	0,22	0,47	0,14	0,43	0,14	0,88
	min	9,49	134,00	26,50	267,40	2,12	1,14	17,01	33,60
	max	37,90	336,20	41,80	905,60	2,79	3,90	22,10	673,40
PATIENT 9	moyenne	5,73	63,49	9,87	99,48	1,94	1,84	3,83	41,00
	écart type	2,66	21,73	3,15	40,29	0,81	1,12	2,38	44,31
	CV	0,47	0,34	0,32	0,41	0,42	0,61	0,62	1,08
	min	2,55	39,20	7,20	52,00	1,13	0,87	1,60	-8,20
	max	12,80	113,60	14,40	187,40	2,95	4,78	7,44	148,20
PATIENT 10	moyenne	8,33		9,42		1,41		2,83	
	écart type	2,80		3,66		0,17		1,85	
	CV	0,34		0,39		0,12		0,65	
	min	5,31		6,83		1,29		1,52	
	max	12,80		12,00		1,52		4,13	
PATIENT 12	moyenne	16,78		23,45		1,66			
	écart type	5,24		1,06		0,17			
	CV	0,31		0,05		0,10			
	min	11,10		22,70		1,54			
	max	25,30		24,20		1,79			

Table 18. Taux ADNcf mesuré avant et après séance de PCE

Patient 1



Patient 2

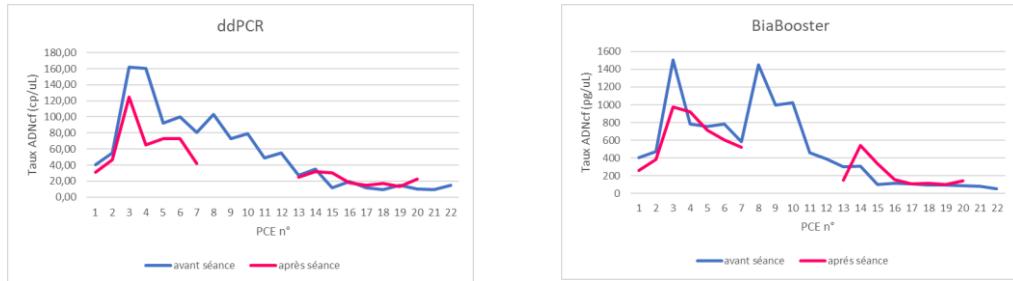


Figure 21. Variation du taux d'ADNcf après séance de PCE. Exemple de deux patients.

2.2.2- Variation du profil de taille de l'ADNcf à une heure après séance de PCE

De manière globale, une augmentation des fractions d'ADNcf de moyennes et grandes tailles (239-1649 pb) au profit de la fraction d'ADNcf de petites tailles (75-239 pb) est observée après séance de PCE (Table 19, figure 22).

		Moyenne avant séance PCE ± écart type (%) (CV)	Moyenne après séance de PCE ± écart type (%) (CV)	p-value
PATIENT 1	75-239pb	77,4 ± 7,7 (10%)	64,6 ± 12,7 (19%)	< 0,001
	239-1649 pb	23,2 ± 8,2 (35%)	35,1 ± 13,3 (38%)	< 0,001
PATIENT 2	75-239pb	69,9 ± 9,7 (14%)	67,9 ± 10,3 (15%)	0,576
	239-1649 pb	28,8 ± 9,8 (33%)	32 ± 10,3 (32%)	0,532
PATIENT 3	75-239pb	76,5 ± 8,7 (11%)	68 ± 11,3 (17%)	0,283
	239-1649 pb	23,2 ± 8,3 (35%)	31,8 ± 11,2 (35%)	0,271
PATIENT 4	75-239pb	70,1 ± 6,5 (9%)	63,5 ± 11,2 (17%)	0,071
	239-1649 pb	29,9 ± 6,7 (22%)	36,5 ± 30,6 (31%)	0,070
PATIENT 5	75-239pb	71,93 ±5,45 (7,58%)	65,45 ±7,2 (11%)	0,036
	239-1649 pb	27,9 ±5,5 (19,8%)	34,24 ±7,2 (21,2%)	0,022
PATIENT 6	75-239pb	81,37 ±4,1 (5,03%)	75,41 ±4,23 (5,62%)	0,032
	239-1649 pb	35 ±38,4 (110%)	24,6 ±4,2 (17,2%)	0,539
PATIENT 8	75-239pb	73,76 ±5,45 (7,39%)	77,94 ±3,26 (4,18%)	0,086
	239-1649 pb	26,24 ±5,45 (20,8%)	22,06 ±3,26 (14,8%)	0,086
PATIENT 9	75-239pb	77,45 ±5,51 (7,11%)	72,53 ±4,59 (6,33%)	0,056
	239-1649 pb	22,3 ±4,94 (22%)	27,6 ±4,66 (16,86)	0,031
PATIENT 11	75-239pb	71,57 ±15,89(22,2%)	69,19 ±7,06 (10,2%)	0,850
	239-1649 pb	31,3 ±13,8(44%)	32,2 ±5,9 (18,4%)	0,910

Table 19. Taux d'ADNcf une heure avant et après séance de PCE.

Les patients 1, 5 et 6 présentent une diminution significative de la fraction d'ADNcf de petite taille (74-239 pb) après chaque séance de PCE ($77,4 \pm 7,7\%$ (CV = 10%) versus $64,6 \pm 12,7\%$ (CV = 19%), P-value < 0.001, $71,93 \pm 5,45$ (CV = 7,58%) versus $65,45 \pm 7,2$ (CV = 11%), p-value = 0.036 et $81,37 \pm 4,1$ (CV = 5,03%) versus $75,41 \pm 4,23$ (CV = 5,62%), p-value = 0.032 pour les patients 1, 5 et 6 respectivement). La diminution de la fraction d'ADNcf de petite taille après PCE est non significative pour les patients 2, 3, 4, 9 et 11 (Table 19).

Les patients 1, 5 et 9 présentent une augmentation significative de la fraction des ADNcf de moyenne et grande taille (240 – 1649 pb) après chaque séance de PCE ($23,2 \pm 8,2\%$ (CV = 35%) versus $35,1 \pm 13,3\%$ (CV = 38%), p-value < 0,001, $27,9 \pm 5,5$ (CV = 19,8%) versus $34,24 \pm 7,2$ (CV = 21,2%), p-value = 0.022, $22,3 \pm 4,94$ (CV = 22%) versus $27,6 \pm 4,66$ (CV = 16,86%), p-value = 0.031 pour les patients 1, 5 et 9 respectivement) Table 19.

Les patients 2, 3, 4, 6 et 11 ne présentent pas de variation significative des fractions d'ADNcf de moyenne et grande taille (Table 19).

Seul le patient 8 présente une variation inverse. En effet, après séance de PCE, la fraction d'ADNcf de petites tailles augmente ($73,76 \pm 5,45$ (CV = 7,39%) versus $77,94 \pm 3,26$ (CV = 4,18%), p-value = 0.086) alors que la fraction d'ADNcf de moyennes et grandes tailles diminue ($26,24 \pm 5,45$ (CV = 20,8%) versus $22,06 \pm 3,26$ (CV = 14,8%), p-value = 0.086).

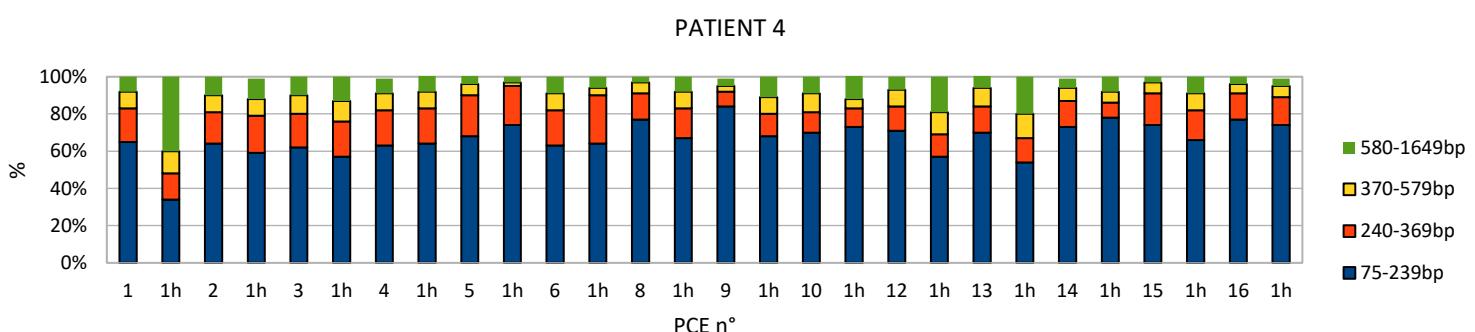


Figure 22. Profils de taille de l'ADNcf avant et après séance de PCE, exemple d'un patient.

2.3- Cinétique

2.3.1- Cinétique d'expression de l'ADNcf

Les patients inclus dans le cadre de rejet de transplant cardiaque suivent un protocole de thérapie au rythme de 2 séances de PCE par semaine, soit un cycle, tous les quinze jours. Une cinétique du taux d'ADNcf aux temps T0, T48h, T72h ou T96h, en fonction du rythme des prélèvements, a pu être obtenue pour les patients 2, 3 et 4 (Table 20).

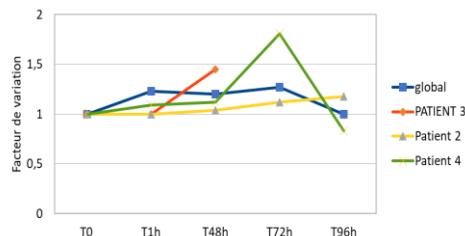
			Facteur de variation du taux d'ADNcf par rapport à T0					
			T48h	P-value	T72h	P-value	T96h	P-value
GLOBAL	ddPCR	moyenne	1,2	0,18	2,01	0,22	1	0,98
		min	0,81		0,68		0,76	
		max	1,69		7,93		1,27	
	BiaBooster	moyenne	1,02	0,9	0,93	0,34	1,37	0,42
		min	0,21		0,66		0,6	
		max	1,59		1,24		2,47	
PATIENT 2	ddPCR	moyenne	1,04	0,3	1,12	0,32	1,18	
		min	0,99		0,68		1,09	
		max	1,08		1,7		1,27	
	BiaBooster	moyenne	0,96	0,5	0,96	0,41	1,75	
		min	0,65		0,84		1,03	
		max	1,18		1,12		2,47	
PATIENT 3	ddPCR	moyenne	1,45					
		min	1,21					
		max	1,69					
	BiaBooster	moyenne	1,32					
		min	1,04					
		max	1,59					
PATIENT 4	ddPCR	moyenne	1,12		3,85	0,07	0,83	
		min	0,81		1,51		0,76	
		max	1,42		7,93		0,89	
	BiaBooster	moyenne	0,82		0,99		0,99	0,75
		min	0,21		0,73		0,6	
		max	1,43		1,24		1,38	

Table 20. Cinétique d'expression de l'ADNcf

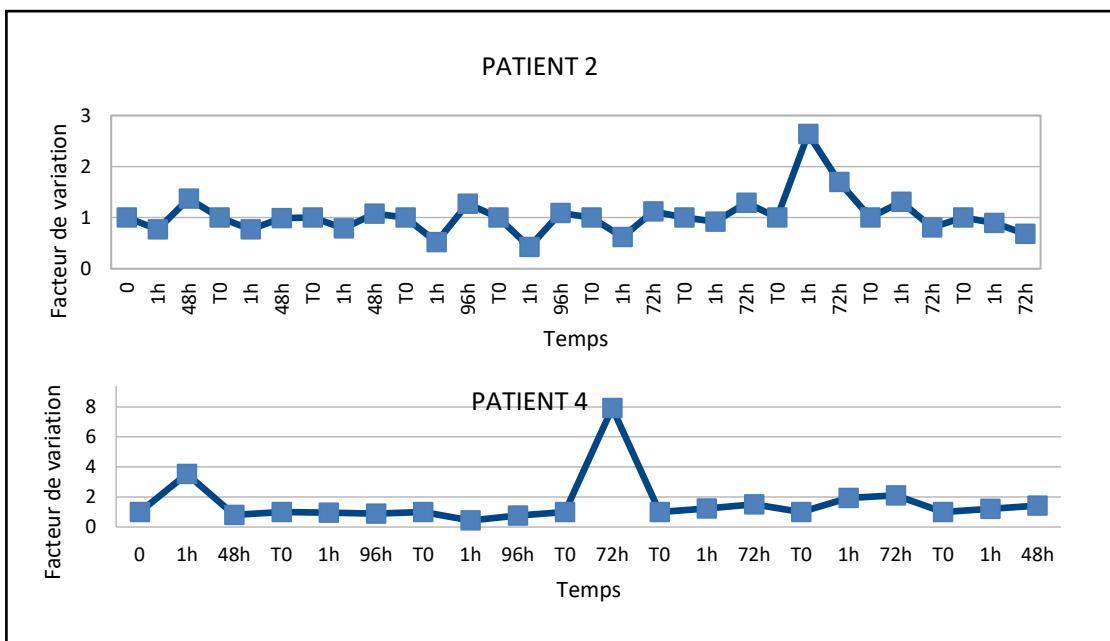
De manière globale, au temps T48h les patients augmentent leurs taux d'ADNcf de 1,2 fois par ddPCR et de 1.02 fois par BiaBooster par rapport au T0. Au temps T72h, les patients augmentent leurs taux d'ADNcf de 2,01 fois par ddPCR et de 0.93 fois par BiaBooster par rapport au T0. Au temps T96h, les patients n'augmentent pas leur taux d'ADNcf par ddPCR et augmentent de 1.37 fois par BiaBooster par rapport au T0. Aucune de ces variations n'est statistiquement significative (Table 20, figure 23.A)

Comme vu précédemment, le taux d'ADNcf du patient 2, diminue à T1h, mais remonte, voire augmente régulièrement par la suite (Figure 23.B).

Le taux d'ADNcf des patients 3 et 4 sont hétérogènes sans cinétique particulière après les différentes séances de PCE (Facteur de variation moyen au temps T48h pour le patient 3 : 1,45. Facteur de variation moyen du patient 4 : 1,12, 3,85 et 0,83 aux temps T48h, T72h et T96h respectivement) (figure 23.B, Table 20).



A. Cinétique d'expression de l'ADNcf

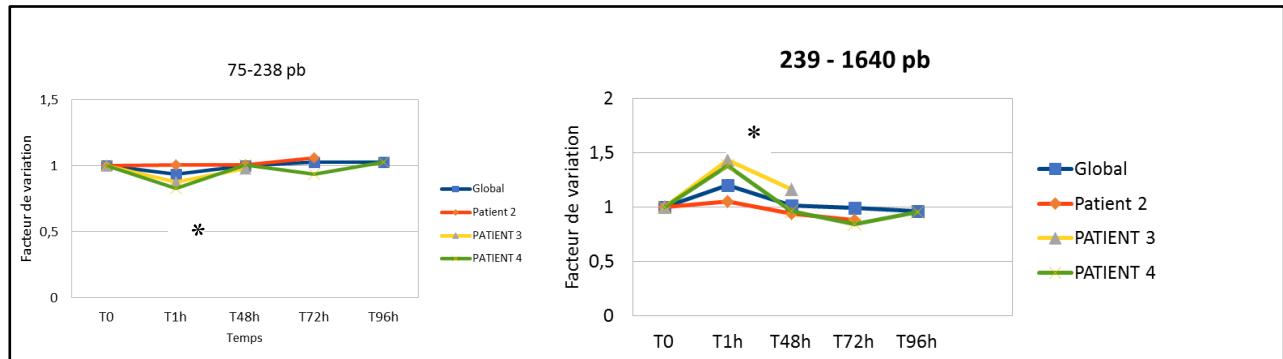


B. Cinétique d'expression du taux d'ADNcf, exemple de deux patients (ddPCR)

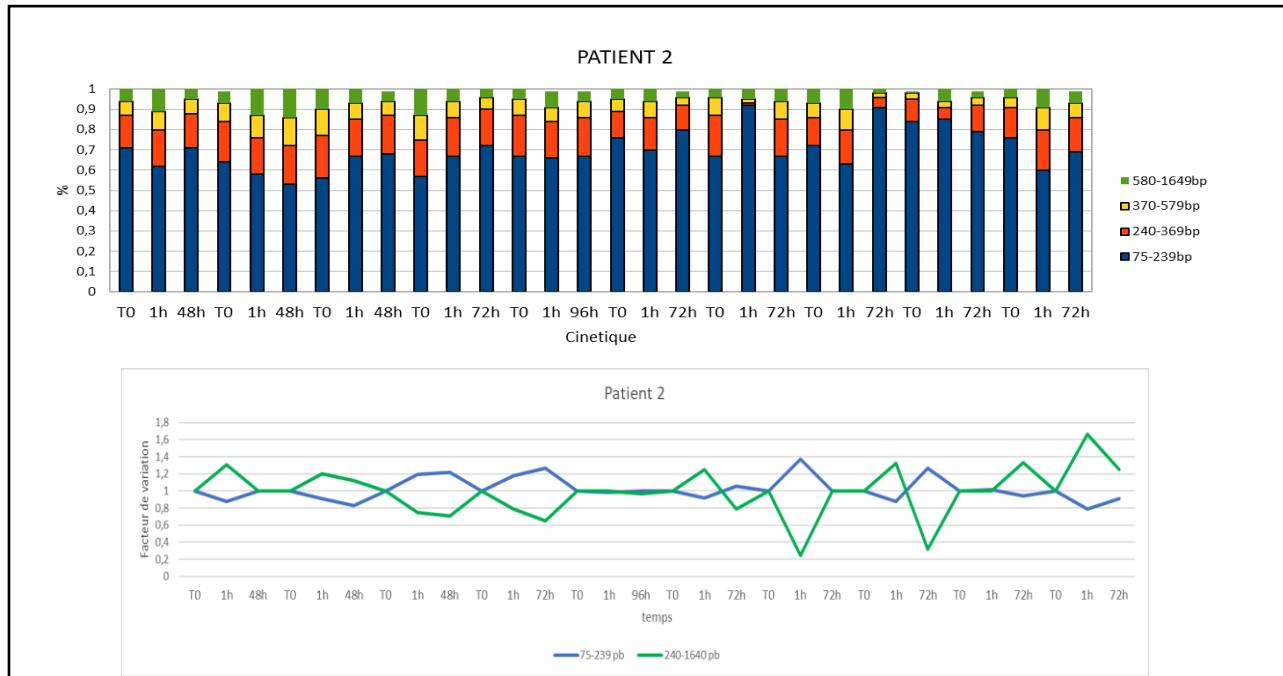
Figure 23. Cinétique d'expression du taux d'ADNcf

2.3.2- Cinétique de qualification de l'ADNcf

Aux temps T48h, T72h ou T96h après séance de PCE, aucun profil particulier n'est mis en évidence quel que soit le patient (figure 24, Table 21).



A- Cinétique du profil de taille de l'ADNcf



B- Cinétique du profil de taille de l'ADNcf. Exemple d'un patient.

Figure 24. Cinétique du profil de taille de l'ADNcf

			Facteur de variation par rapport à T0					
			T48h	P-value	T72h	P-value	T96h	P-value
GLOBAL	75-239 pb	moyenne	1		1,03		1,03	
		min	0,83	0,96	0,83	0,52	0,93	0,62
		max	1,21		1,26		1,15	
	239 – 1640 pb	moyenne	1,01		0,99		0,96	
		min	0,7	0,97	0,32	0,92	0,78	0,58
		max	1,18		2		1,12	
PATIENT 2	75-239 pb	moyenne	1,01		1,06			
		min	0,83	0,96	0,91	0,36		
		max	1,21		1,26			
	239 – 1640 pb	moyenne	0,94		0,88			
		min	0,7	0,97	0,32	0,32		
		max	1,12		1,33			
PATIENT 3	75-239 pb	moyenne	0,98					
		min	0,96					
		max	0,99					
	239 – 1640 pb	moyenne	1,16					
		min	1,14					
		max	1,18					
PATIENT 4	75-239 pb	moyenne	1,01		0,94		1,03	
		min	0,98		0,83		0,93	0,72
		max	1,04		1,04		1,15	
	239 – 1640 pb	moyenne	0,96		1,42		0,95	
		min	0,88		0,84		0,78	0,62
		max	1,03		2		1,12	

Table 21. Cinétique de variation du profil de tailles

2.4- Evolution de l'expression et de la qualification de l'ADNcf au long de la thérapie par PCE

2.4.1- Patients Lichen/LcTc

Les patients 5, 9, 10, 11 et 12 présentent des faibles variations intra et inter-individuelles avec des taux d'ADNcf stables au cours du temps et comparables aux valeurs obtenues pour la cohorte de volontaires sains (Table 22, figure 25). Ces résultats s'associent avec l'état clinique des patients. En effet, le patient 5 est stable et les patients 9, 10, 11 et 12 sont en amélioration.

		Concentration initiale d'ADNcf (U.A)	Concentration moyenne d'ADNcf (U.A)	Ecart type	CV (%)	Facteur d'augmentation moyen (Cx/C0)	Concentration minimale en ADNcf (U.A)	Concentration maximale en ADNcf (U.A)
PATIENT 5	ddPCR	5,8	1,41	24		3,98	8,1	
	BiaBooster							
PATIENT 6	ddPCR	20,7	11,2	54		9,06	51,2	
	BiaBooster							
PATIENT 7	ddPCR	165,4	62	54		73,6	268	
	BiaBooster							
PATIENT 8	ddPCR	135	40,4	29		84,6	193	
	BiaBooster							
PATIENT 9	ddPCR	3520	1184	33		243	3050	
	BiaBooster							
PATIENT 10	ddPCR	21,9	8,48	39		9,49	37,9	
	BiaBooster							
PATIENT 11	ddPCR	234	65,2	29		134	183	
	BiaBooster							
PATIENT 12	ddPCR	5,73	2,66	47		2,55	12,8	
	BiaBooster							
PATIENT 11	ddPCR	63,5	21,7	34		39,2	113,6	
	BiaBooster							
PATIENT 12	ddPCR	8,3	2,8	34		5,31	12,8	
	BiaBooster							
PATIENT 11	ddPCR	6,85	9,7	4,41	46	1,41	5,15	19,6
	BiaBooster							
PATIENT 12	ddPCR	51,4	65,9	22,9	35	1,16	34,8	97

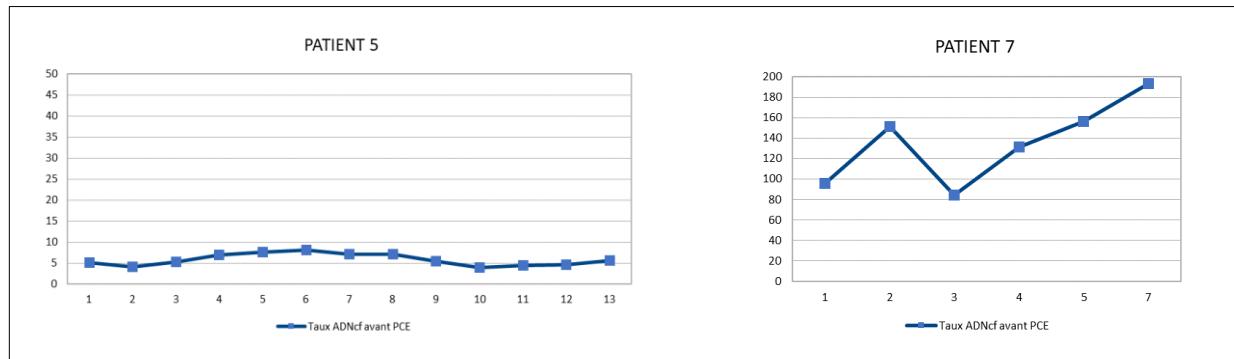
Table 22. Expression de l'ADNcf au long court des patients lichen et LcTc par ddPCR et par BiaBooster

Les patients 6 et 8 ont des taux moyen d'ADNcf légèrement supérieurs aux taux observés dans la cohorte de patients sains (taux moyen d'ADNcf = $20,7 \pm 11,2$ U.A (CV = 54%) par ddPCR et $165,4 \pm 62$ pg/uL (CV = 54%) par BiaBooster et $21,9 \pm 8,48$ U.A (CV = 39%) par ddPCR et $234 \pm 65,2$ (CV = 29%) par BiaBooster pour les patients respectivement) (Table 22). Le patient 6 n'est toujours pas en rémission complète et le patient 8 présentent des poussées cutanées à minima.

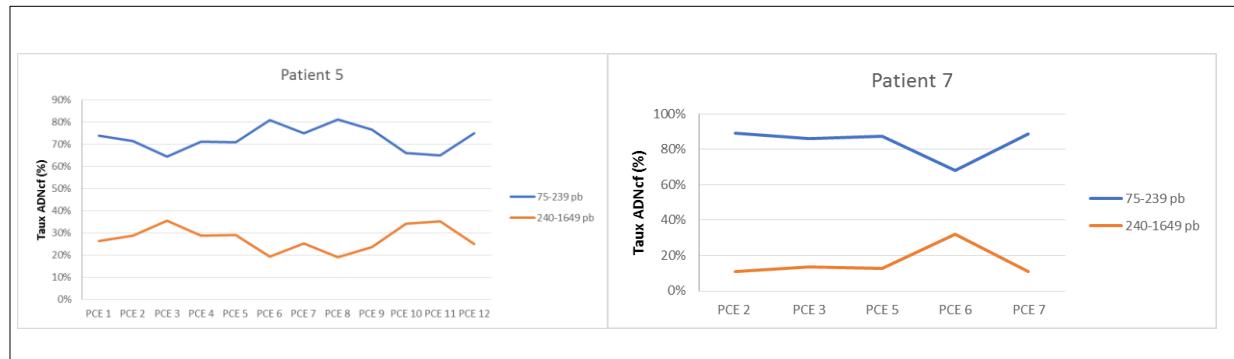
Le patient 7 présente de forts taux d'ADNcf (taux moyen $135 \pm 40,4$ UA (CV = 29%) par ddPCR et 3520 ± 1184 pg/uL (CV = 33%)) avec de forte variation au cours du temps (Table 22, figure 25.A). Ces résultats s'associent avec un état clinique du patient en progression (Figure 25.A). Cependant aucun profil de taille particulier n'est relevé (figure 25.B)

Ayant débuté la PCE simultanément à l'inclusion au sein de l'étude, les concentrations initiales d'ADNcf des patients 11 et 12 sont connus, de ce fait le facteur de variation a pu être déterminé. Malgré des taux d'ADNcf similaires aux taux observés chez les volontaires sains (Concentration maximale d'ADNcf : 19,6 U.A par ddPCR et 97 pg/uL par BiaBooster), le patient 11 voit son

taux d'ADNcf augmenter jusqu'à 2,86 fois par ddPCR 1,88 fois par BiaBooster (Facteur de variation moyen par rapport au taux initial : 1,41 par ddPCR et 1.16 par BiaBooster). Le patient 12, ne présente aucune variation de son taux initial d'ADNcf (Facteur de variation moyen par rapport au taux initial : 0,82). (Table 22)



A- Cinétique d'expression de l'ADNcf



B- Cinétique de qualification de l'ADNcf

Figure 25. Evolution du taux d'ADNcf au long court exemple de deux patients.

Patient 5 : exemple d'un patient stable.

Patient 7 : seul patient présentant de fortes variations, avec des valeurs hautes.

Le profil de taille a pu être établi pour les patients 5, 6, 7, 8, 9 et 11. Aucun profil de taille particulier n'a été observé (Figure 25.B, Table 23).

		1 ^{er} pic (bp)	2 ^{ème} pic (bp)	concentration (pg/µL)	75-239bp		240-369bp		370-579bp		580-1649bp		240-1649 pb	
		moyenne	163,58	302,75	58,45	73%	42,68	17,13%	9,75	3,71%	2,20	6,56%	3,82	27,41%
Patient 5	écart type	1,56	4,69	18,78	6%	15,42	2,82%	2,64	3,07%	1,84	2,63%	1,75	5,58%	4,95
	CV	1%	2%	32%	8%	36%	16%	27%	83%	84%	40%	46%	20%	31%
	min	161,00	294,00	28,80	64%	21,60	10,74%	5,80	0,88%	0,40	2,08%	0,60	18,89%	7,20
	max	166,00	309,00	91,80	81%	74,20	20,83%	13,80	9,48%	5,80	9,92%	7,60	35,55%	23,00
Patient 6	moyenne	162,20	299,60	165,42	81,64%	135,48	13,03%	21,48	2,92%	4,62	2,41%	4,11	18,36%	29,94
	écart type	1,14	2,22	61,10	3,68%	51,66	1,26%	8,13	1,82%	3,08	1,24%	1,87	3,68%	11,22
	CV	1%	1%	37%	5%	38%	10%	38%	62%	67%	51%	45%	20%	37%
	min	161,00	297,00	73,60	75,26%	60,00	10,85%	9,80	0,52%	0,80	0,95%	1,00	13,99%	13,60
	max	164,00	304,00	268,00	86,01%	222,60	14,34%	36,60	5,89%	9,80	5,15%	7,00	24,74%	45,60
Patient 7	moyenne	163,00	302,80	1821,44	83,85%	1592,28	10,92%	172,88	2,95%	32,00	2,28%	24,28	16,15%	229,16
	écart type	1,41	1,64	1397,60	8,94%	1249,41	4,17%	127,60	2,96%	16,67	1,95%	9,80	8,94%	150,60
	CV	1%	1%	77%	11%	78%	38%	74%	100%	52%	86%	40%	55%	66%
	min	162,00	301,00	243,20	68,01%	165,40	8,17%	44,40	1,42%	16,00	0,85%	13,40	11,03%	77,80
	max	165,00	305,00	3520,00	88,97%	3130,00	18,26%	310,00	8,22%	50,00	5,51%	34,00	31,99%	390,00
PATIENT 8	moyenne	167,22	303,33	233,98	73,70%	173,16	16,11%	37,56	5,18%	11,58	5,01%	11,69	26,30%	60,82
	écart type	3,73	4,12	65,17	7,15%	55,85	1,68%	10,25	3,72%	9,07	2,29%	5,51	7,15%	20,75
	CV	2%	1%	28%	10%	32%	10%	27%	72%	78%	46%	47%	27%	34%
	min	164,00	299,00	134,00	60,48%	105,00	14,34%	21,20	0,71%	2,40	2,54%	3,40	18,62%	29,00
	max	173,00	310,00	336,20	81,38%	273,60	20,19%	48,20	10,78%	25,20	8,55%	20,00	39,52%	92,40
PATIENT 9	moyenne	163,80	303,70	61,18	78%	48,60	14,67%	8,82	3,12%	1,74	3,88%	2,02	21,67%	12,58
	écart type	1,62	5,58	21,44	6%	20,06	1,57%	2,45	3,15%	1,51	2,42%	0,90	5,90%	2,83
	CV	1%	2%	35%	8%	41%	11%	28%	101%	87%	63%	45%	27%	22%
	min	162,00	300,00	39,20	66%	30,20	11,97%	5,80	0,51%	0,20	0,70%	0,80	13,73%	8,40
	max	167,00	318,00	113,60	86%	98,00	17,17%	13,60	9,44%	4,40	7,65%	3,40	33,91%	15,80
Patient 11	moyenne	163,50	302,13	65,93	72,23%	46,55	13,61%	8,73	5,89%	4,25	8,26%	6,40	27,77%	19,38
	écart type	1,31	7,83	22,89	12,42%	15,06	3,77%	3,50	3,94%	3,71	7,59%	7,85	12,42%	14,41
	CV	1%	3%	35%	17%	32%	28%	40%	67%	87%	92%	123%	45%	74%
	min	161,00	290,00	34,80	46,60%	22,80	8,70%	5,40	0,43%	0,20	2,33%	1,20	15,81%	8,60
	max	165,00	311,00	97,00	84,19%	76,00	20,11%	15,80	11,96%	11,60	25,15%	24,40	53,40%	51,80

Table 23. Qualification de l'ADNcf au long court des patients lichen et LcTc

2.4.2- Patients en rejet de transplant cardiaque

Les patients traités pour rejet de transplant cardiaque présentent trois profils (Figure 26, Table 24) :

Les patients 1 et 4 présentent des taux d'ADNcf stables et similaires aux taux mesurés dans les échantillons issus de volontaires sains. Le taux moyen d'ADNcf au cours du temps est de $11,6 \pm 4,8$ U.A (CV = 41%) et $15,2 \pm 5,1$ U.A (CV = 33%) par ddPCR et 105 ± 56 pg/µL (CV = 54%) et $147,8 \pm 78,7$ pg/µL (CV = 53%) par BiaBooster pour les patients 1 et 4 respectivement (Table 25, figure 26.A). L'analyse des profils de tailles ne montrent pas de profil particulier lié à la PCE. Ces résultats s'associent avec la clinique stable du patient 1 et en amélioration du patient 4 (Table 25, figure 26-A).

		Taux ADNcf		Facteur de variation	
		ddPCR	BiaBooster	ddPCR	BiaBooster
Patient 1	moyenne	11,6	105	1,58	0,72
	Ecart type	4,8	56	0,66	0,38
	CV (%)	41	54	42	53
	min	4,76	22,2	0,65	0,154
	max	24,6	217,4	3,36	1,507
Patient 2	Premiere phase (PCE 1 à 13)	moyenne	82,8	762,7	2,06
		Ecart type	41,6	391	1,03
		CV (%)	50	51	51
		min	27	299,8	0,67
		max	162	1505	4,02
	deuxieme pase	moyenne	15	116,7	0,37
		Ecart type	8,12	74,38	0,2
		CV (%)	54	64	64,00
		min	9,39	55,8	0,233
		max	34,9	309,6	0,868
Patient 3	Premiere phase (PCE 1 à 4)	moyenne	38,05	401,5	1,39
		Ecart type	8	87,4	0,29
		CV (%)	21	22	22
		min	27,2	326	1
		max	45,9	513	1,68
	deuxieme pase	moyenne	145,3	1182,00	5,34
		Ecart type	18,2	31,11	0,67
		CV (%)	12	2,60	13
		min	125	1160,00	4,59
		max	160	1204	5,88
Patient 4	moyenne	15,2	147	0,72	0,58
	Ecart type	5,1	78,7	0,24	0,31
	CV (%)	33	53	33	53
	min	2,22	13,4	0,105	0,053
	max	22,2	304,2	1,052	1,2

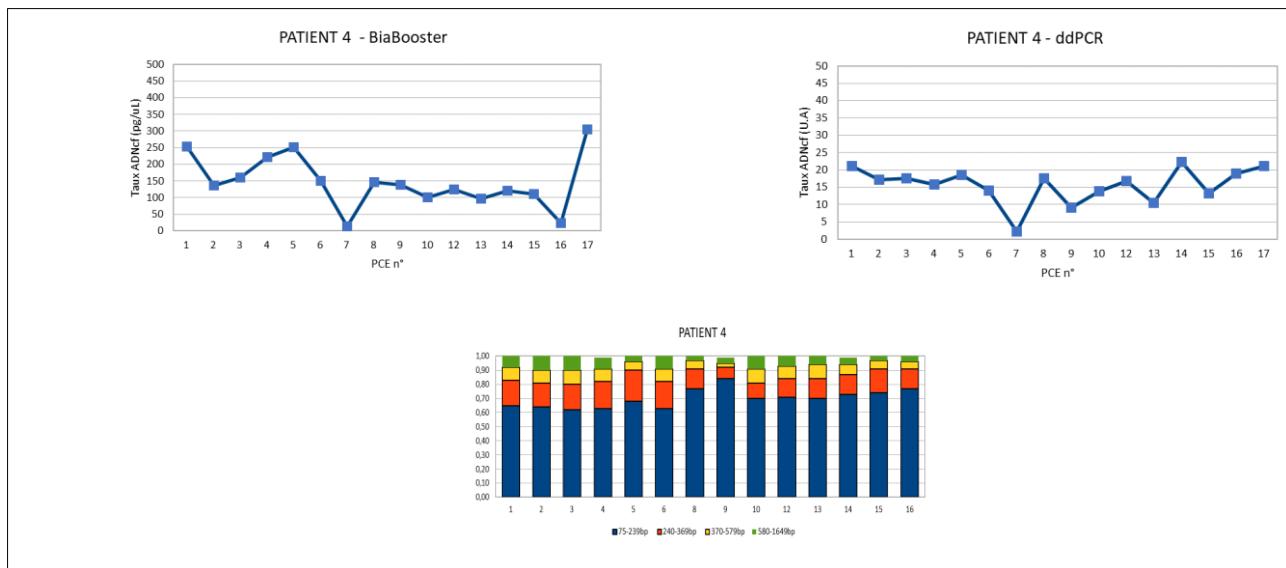
Table 24. Expression de l'ADNcf au long court des patients en rejet de transplant cardiaque par ddPCR et par BiaBooster.

Le patient 2, présente dans une première phase (séances de PCE numéros 1 à 13) des taux élevés d'ADNcf avec de fortes variations (facteur de variation maximum : 4,02 par ddPCR et 3,72 par BiaBooster), suivi d'une deuxième phase résolutive, avec des taux stables et de faibles variations (taux d'ADNcf moyen : 15 ± 8.12 U.A (CV = 54%) par ddPCR et 116.7 ± 74.38 pg/uL (CV = 64 %) par BiaBooster) (Table 24, figure 26-B). Une variation du profil de taille est constatée durant cette phase avec une augmentation significative des taux d'ADNcf de petite taille (taux moyen durant la première phase $65,2 \pm 7,45$ % (CV = 11%) versus 76.9 ± 8.5 % (CV = 11%) durant la deuxième phase, p-value = 0,0076) (Table 25, Figure 26-B). Cette modification du profil de taille en faveur des ADNcf de petite taille s'associent avec l'aggravation du grade de rejet du patient passant du grade 0 au grade 1A/1R.

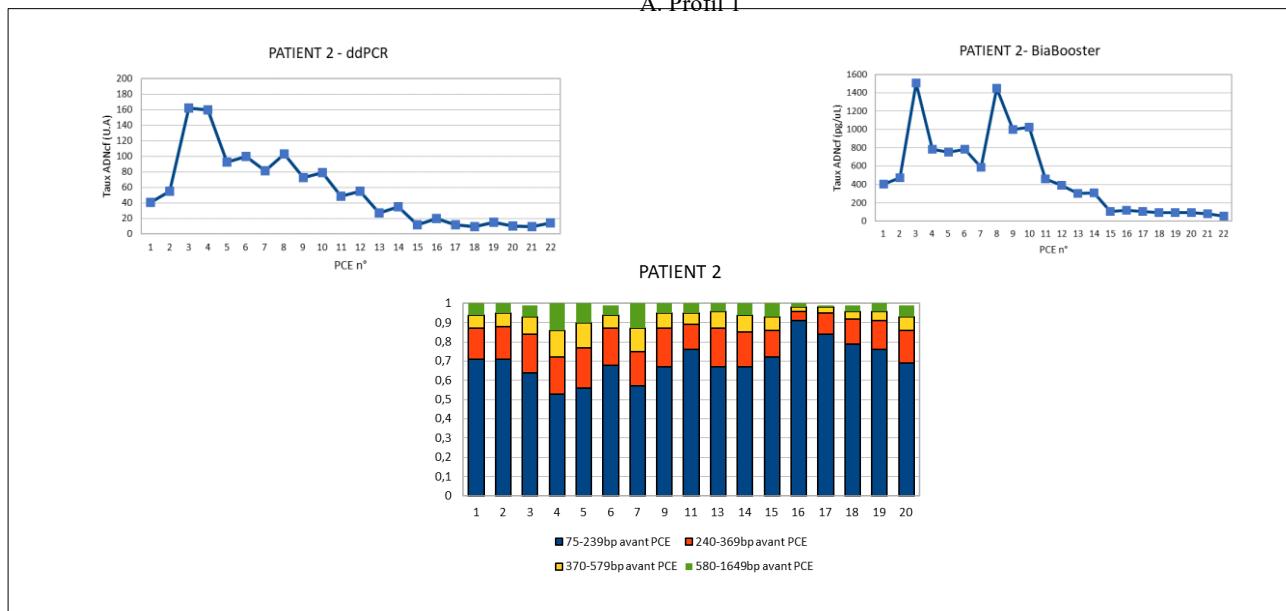
		75-239bp avant PCE	240-369bp avant PCE	370-579bp avant PCE	580-1649bp avant PCE	240-1649bp
PCE	concentration (pg/µL) avant PCE	75-239bp avant PCE	240-369bp avant PCE	370-579bp avant PCE	580-1649bp avant PCE	240-1649bp
PATIENT 1	moyenne	77%	79,7109524	12%	14,9427619	5%
	écart type	8%	39,98353568	5%	10,955222	2%
	coefficient de variation	10%	0,50160655	44%	0,73314572	38%
	min	61%	15,984	3%	0,708	2%
	max	92%	163,508	20%	41,306	10%
Patient 2	moyenne premiere phase (PCE 1 à 13)	65,00%	451,27	18,30%	132,79	9,20%
	écart type premiere phase (PCE 1 à 13)	7,45%	222,41	2,41%	76,51	2,82%
	CV premiere phase (PCE 1 à 13)	11,47%	0,49	13,15%	0,58	30,66%
	min premiere phase (PCE 1 à 13)	53,00%	200,33	13,00%	59,80	6,00%
	max premiere phase (PCE 1 à 13)	76,00%	963,20	21,00%	301,00	14,00%
	moyenne deuxième phase	76,86%	97,61	13,29%	18,48	5,29%
	écart type deuxième phase	8,55%	50,26	4,35%	16,73	2,50%
	CV deuxième phase	11,13%	0,51	32,73%	0,91	47,25%
	min deuxième phase	67,00%	62,65	5,00%	5,84	2,00%
	max deuxième phase	91,00%	207,03	18,00%	55,73	9,00%
Patient 3	moyenne première phase (PCE 1 à 4)	71,25%	284,6625	16,25%	66,23	6,00%
	écart type première phase (PCE 1 à 4)	5,06%	55,0200935	2,22%	22,2136069	1,83%
	CV première phase (PCE 1 à 4)	7,10%	0,19328185	13,65%	0,33540098	30,43%
	min première phase (PCE 1 à 4)	67,00%	226,46	14,00%	45,64	4,00%
	max première phase (PCE 1 à 4)	77,00%	343,71	19,00%	97,47	8,00%
	moyenne deuxième phase	88,33%	1088,61333	9,00%	110,506667	1,67%
	écart type deuxième phase	0,58%	75,1118774	1,00%	8,64604727	0,58%
	CV deuxième phase	0,65%	0,06899776	11,11%	0,07824005	34,64%
	min deuxième phase	88,00%	1032,4	8,00%	104,4	1,00%
	max deuxième phase	89,00%	1173,92	10,00%	120,4	2,00%
Patient 4	moyenne	0,70071429	100,068857	16%	23,9268571	8%
	écart type	0,06486249	39,7350129	4%	14,7409918	2%
	coefficient de variation	0,09256625	0,39707671	24%	0,61608558	29%
	min	0,62	17,864	8%	3,248	3%
	max	0,84	170,68	22%	55,22	10%

Table 25. Profils de taille de l'ADNcf au long court des patients en rejet de transplant cardiaque

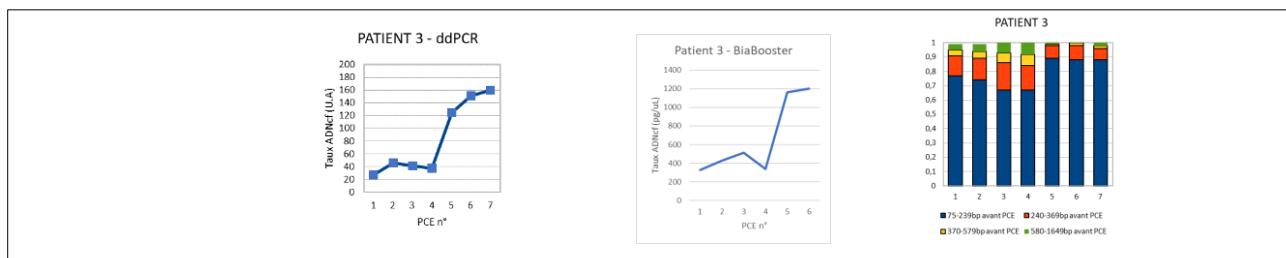
Inversement, le patient 3 présente une première phase stable (séance de PCE n° 1 à 4) avec un taux moyen d'ADNcf de 38 ± 8 U.A (CV = 21%) mesuré par ddPCR et 401.5 ± 87.4 pg/µL (CV = 22%) mesuré par BiaBooster. Puis le taux d'ADNcf augmente brutalement allant jusqu'à 5.88 le taux initial du patient mesuré par ddPCR et 3.69 fois le taux initial mesuré par BiaBooster (Table 24, figure 26-C) associée à une augmentation significative des taux d'ADNcf de petite taille (Taux moyen des ADNcf de petite taille durant la première phase : 71 ± 5 % (CV = 7%) versus $88 \pm 0,58$ % (CV = 0,65%) durant la deuxième phase, p-value = 0.006) Table 25, figure 26-C. L'état clinique du patient est en progression à partir de la séance de PCE numéro 4. Le patient décède après la septième séance.



A. Profil 1



B. Profil 2



C. Profil 3

Figure 26. Evolution de l'expression et du profil de taille de l'ADNcf au long court.

Profil 1 : Expression de l'ADNcf stable au court du temps sans profil de taille particulier.

Profil 2 : Première phase avec des taux d'ADNcf élevé, secondairement résolutive mais avec une augmentation des ADNcf de petite taille

Profil 3 : Première phase stable, suivi d'une augmentation brutale du taux d'ADNcf avec une augmentation de la proportion d'ADNcf de petite taille.

IV- Discussion

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est largement indiquée dans le traitement du syndrome de Sézary, de la maladie du greffon contre l'hôte, du rejet d'organe solide et de diverses maladies auto-immunes. L'efficacité de la PCE est très variable, dépendante de la pathologie, du type d'atteinte, de l'état clinique du patient... L'efficacité de la PCE est à ce jour seulement évaluée en fonction de l'évolution clinique du patient, n'ayant pas à disposition de critères biologiques fiables. Aussi, plusieurs semaines, voire plusieurs mois, sont nécessaires avant d'en connaître l'efficacité. Il s'agit d'une thérapie coûteuse (1200 Euros/séance (coût AP-HM)) et lourde nécessitant un milieu hospitalier. L'apoptose étant l'élément central du mécanisme d'action de l'effet de la PCE (20, 21, 22), l'ADNcf, marqueur biologique d'apoptose, semble judicieux comme marqueur sensible et précoce de son efficacité.

A ce jour, l'analyse de l'ADNcf est limitée par sa faible concentration et la petite taille des fragments. La disparité de ces deux caractéristiques induit des résultats analytiques différents dépendant de la méthode d'extraction. La première étape de ce travail a donc été de sélectionner un automate permettant une extraction d'ADNcf plasmatique quantitativement élevé tout en conservant les fragments de petite taille. Pour ce faire, quatre extracteurs ont été testés : MagNA Pure 24 développés par Roche®, IDEAL développé par IDSolution®, LabTurbo 24 développé par Taigen® et Chemagic 360 développé par Perkin Elmer®. Tous sont caractérisés par une capacité d'extraction de 24 tubes maximum dans un temps variant de 45 minutes à 2 heures. Deux systèmes sont complètement automatisés (LABTurbo 24 et MagNA Pure 24). La quantification de l'ADNcf, a été réalisée par la technique de ddPCR quantifiant le gène RPP30, par Qubit® et par BiaBooster (développé par la société Picometrics®). L'ADNcf était qualifié par BiaBooster (Picometrics®).

Tous ces extracteurs donnent des résultats d'extraction comparables en termes de quantification de l'ADNcf, mais la taille du pic 1 et les profils de tailles obtenues par MagNA Pure 24 est sensiblement différente de ceux obtenus avec les autres extracteurs. La taille du pic 2 est également différente en fonction de l'extracteur utilisé.

Cette étude présente plusieurs limites, notamment le petit nombre d'échantillons testés. Les extractions ont été réalisées immédiatement après installation et qualification du système automatisé. Aussi, cette étude présente les résultats des dosages sans optimisation de chaque méthode d'isolement. Chaque fournisseur n'a testé qu'un seul kit de réactifs sur son instrument. Pour deux fournisseurs, d'autres kits d'extraction étaient à disposition.

Plusieurs auteurs ont comparé différentes méthodes d'extraction automatique ou manuelle (39, 40, 41, 42 et 43). Comme dans notre étude, ils mettent en évidence des variations significatives

en termes de quantité et de qualité d'ADNcf extrait en fonction des méthodes d'extraction. Cependant, ces études ne semblent pas comparables entre elles, ces dernières utilisant différentes techniques de dosage et de qualification d'ADNcf, influençant *per se* la quantification et la mesure des tailles des fragments d'ADNcf comme nous l'avons aussi montré dans ce travail.

En effet, dans notre étude, les taux d'ADNcf varient énormément fonction de la méthode d'extraction et de la méthode de quantification utilisée. Extrait par LabTurbo 24 (Taigen®), le taux moyen d'ADNcf varie de 12,93 à 304,2 pg/uL selon la technique de quantification utilisée. Extrait par IDEAL® (IDSolutions®), le taux moyen d'ADNcf varie de 7,22 à 302,2 pg/uL selon la technique de quantification utilisée. Extrait par MagNA Pure 24 (Roche®), le taux moyen d'ADNcf varie de 9,58 à 82,6 pg/uL selon la technique de quantification utilisée. Et extrait par Chemagic 360 (Perkin Elmer®), le taux moyen d'ADNcf varie de 10,8 à 164,2 pg/uL selon la technique de quantification utilisée.

Mesuré par Qubit, le taux d'ADNcf est supérieur lorsqu'extrait par LabTurbo 24 (Taigen®), IDEAL® (IDSolutions®) ou Chemagic 360 (Perkin Elmer®) mais plus faible lorsqu'extrait par MagNa Pure 24 (Roche®). Mesuré par ddPCR et BiaBooster, le taux d'ADNcf est similaire quelle que soit la méthode d'extraction.

A l'instar de ces résultats, nous pouvons citer ceux de Fleischhacker et al. qui ont comparé l'extraction d'ADNcf par les solutions proposés par Qiagen®, MagNa Pure® et NucleoSpin à partir de 2ml de plasma de 44 échantillons et qui ont montré que la quantification de l'ADNcf mesuré par qPCR varient de 1.6 ng/mL à 28.1 ng/mL en fonction de l'extracteur utilisé (39). Perez-Barrios et al. qui ont comparé le MagNa Pure® au Maxwell® RSC sur 26 échantillons ont démontré une différence significative en termes de quantification (mesures effectué par Qubit 2.0 Fluorometer et ddPCR) et de qualification de l'ADNcf (mesuré par Agilent 2100 Bioanalyzer) (40). Le MagNa Pure® fournissait une quantité totale moindre en ADNcf mais avec une plus grande quantité de petites tailles (150-200 pb). De plus, les deux techniques d'extraction donnaient des concentrations différentes d'ADNcf pour le même échantillon avec parfois de grandes variations, notamment entre QUBIT et les deux autres méthodes de quantification. Ces variations ont également été observés par d'autres auteurs (42, 43). Une explication pourrait être la différence de capacités de chacune de ces techniques à quantifier avec précision les différentes tailles de fragments d'ADNcf. Il a été montré récemment que la fragmentation d'ADN génomique à 150pb entraînait une réduction de 67% par qPCR et une réduction de 29% par PicoGreen (44) de la concentration d'ADN génomique intact (non fragmenté). En revanche, la quantité d'ADN mesurée par NanoDrop n'était pas affectée par la fragmentation à 150 pb, probablement parce que la fragmentation n'affecte pas les mesures d'absorbance (45).

En terme de qualification de l'ADNcf, nous avons aussi montré que les extracteurs impactent l'intégrité de l'ADNcf, notamment avec l'extracteur MagNA Pure 24 (Roche®) qui fournit un profil de taille sensiblement différent des autres extracteurs avec une forte proportion de petites tailles (fraction 75 à 239 pb : $90 \pm 9\%$ (CV= 10%) vs $74 \pm 8\%$ (CV=11%) pour les autres extracteurs (p-value = 0,008)). La fraction d'ADNcf de tailles 75 à 239 pb varie de 71 à 79 % selon l'extracteur utilisé, la fraction 240 à 369 pb varie de 3 à 7 % selon l'extracteur utilisé et la fraction de 370 à 1649 pb varie de 4 à 7 % selon l'extracteur utilisé.

Une autre étude a montré que le MagNa Pure® fournit une plus petite quantité d'ADNcf avec une plus grande quantité d'ADNcf de petites tailles (150 à 200 pb) mesurée par Agilent 2100 Bioanalyzer (46). Kloten V et al. ont également observé des différences obtenues lors d'une extraction sur membrane de silice ou sur billes magnétiques. Alors que les quantités d'ADNcf étaient similaires, le profil de taille était différent fonction de la technique d'extraction utilisé. En effet, l'extraction sur billes magnétiques fournit un profil de taille avec une plus grande quantité de fragments d'ADNcf de petites taille (< 600 pb) alors que l'extraction sur membrane de silice fournit un profil de tailles avec une plus grande quantité de fragments de grandes tailles (> 600 pb) caractéristiques d'ADNcf issu de cellules lysées durant le processus d'extraction. (41). Notre étude ne l'a pas vérifié car l'automate LABTurbo utilise une technique d'extraction sur colonne et les trois autres sur billes magnétiques.

Au final, notre choix s'est porté sur l'extracteur semi-automatique (IDEAL, ID solution ®) qui utilise le kit d'extraction IDXTRACT-MAG car c'est une des méthodes qui permettait une extraction d'une plus grande quantité d'ADNcf avec un profil de taille conservant les petites tailles.

La seconde étape fut de déterminer des valeurs normales quantitatives et qualitatives pour cette méthode d'extraction. Elle a été réalisée à partir de 120 sujets sains.

Le taux moyen d'ADNcf mesuré par ddPCR est $5,6 \pm 3$ U.A (CV = 53%), par BiaBooster 59.9 ± 32.2 pg/µL (CV = 54%) et par Qubit 90.1 ± 33.9 pg/µL (CV 38%). Ainsi, mesuré par BiaBooster, le taux d'ADNcf est 2.56 fois plus élevé que lorsqu'il est mesuré par ddPCR. Cependant, les deux techniques ont une variation de mesure similaire (CV = 53.4% pour ddPCR versus 53.8% pour Biabooster). Mesuré par Qubit, le taux est 3.9 fois plus élevé que lorsqu'il est mesuré par ddPCR. Le Qubit HS avait une variation de mesure moindre (CV = 37.7%) que la ddPCR et le BiaBooster, mais ne présente aucune corrélation de mesure avec ces deux techniques.

Les concentrations mesurées par ddPCR étaient corrélées à celles mesurées par BiaBooster pour les tailles comprises entre 75 et 239 pb. Ces dernières correspondent à la taille d'amplification

des amorces de ddPCR (250 pb environ, non précisé par le fournisseur).

Il est difficile de comparer les résultats de ddPCR avec ceux de la littérature, ces derniers n'étant pas la même expression unitaire. Par contre, la concentration moyenne obtenue par le BiaBooster est relativement similaire à celle des publications. Une méta-analyse (47) a collecté les valeurs de concentrations d'ADNcf retrouvés dans la littérature. Les auteurs estiment la concentration d'ADNcf chez un sujet sain entre 0 et 100 ng/mL, avec une moyenne de 30 ng/mL. Une autre revue de Lippi et al (48) portant sur 8 études montre que les taux d'ADNcf dans les cohortes contrôles varient de 1 ng/mL à 36 ng/mL, Cependant ces revues utilisent des techniques de quantifications différentes. Depuis, les études portant sur la détection de marqueurs onco-hématologiques ont largement comparé les taux d'ADNcf de patients à ceux de cohorte contrôle appariée. Jahr et al. (49) retrouvent des concentrations moyennes d'ADNcf de 3.7 ng/mL par qPCR dans la cohorte contrôle d'une étude regroupant des patients atteints de cancer quel que soit son type. Agah et al. en 2017 (50), ont étudié des patients atteints de cancer colorectal et obtiennent des concentrations moyennes d'ADNcf de 12 ng/mL par qPCR parmi les contrôles.

Au final, notre étude a permis de déterminer des valeurs normales de concentration d'ADNcf à partir de la méthode d'extraction IDEAL en fonction de la technologie de mesure. Un taux d'ADNcf normal doit être inférieur à un taux équivalent à la moyenne additionnée de deux écarts types soit 52.2 pg/uL pour les patients de plus de 41 ans, 47.4 pg/uL pour les hommes de moins de 41 ans et 37.06 pg/uL pour les femmes de moins de 41 ans mesuré par ddPCR, 138.9 pg/uL pour les patients de plus de 51 ans et 114.5 pg/uL pour les patients de moins de 51 ans mesuré par BiaBooster et 157.8 pg/uL mesuré par Qubit. (Table 26)

	ddPCR (pg/uL)	BiaBooster (pg/uL)	Qubit (pg/uL)
> 41 ans	> 52,2		
< 41 ans	Hommes	> 47,4	
	Femmes	> 37,06	
> 51 ans		> 138,9	
< 51 ans		> 114,5	
Tous patients confondus			> 157,8

Table 26. Seuil pathologique du taux d'ADNcf en fonction de la technique de quantification utilisée

L'établissement de valeurs normales a permis d'étudier les variations d'ADNcf dans un contexte pathologique. Le mode d'action de la PCE étant l'apoptose, il a semblé licite d'émettre

l'hypothèse d'une modification de concentration et de qualité de l'ADNcf au cours des cycles de PCE. Cette variation d'ADNcf pouvant être le reflet d'efficacité de la PCE que ce soit lors de la cure ou à long terme.

Au total, douze patients ont été recrutés, correspondant à l'étude de 296 échantillons. Nous avons d'abord cherché à démontrer si l'ADNcf pouvait être un marqueur d'efficacité de la procédure de PCE en comparant son expression et le profil de taille avant et à 1 heure, 48 heures, 72 heures et 96 heures après chaque séance de PCE. De manière globale, il est observé une augmentation du taux d'ADNcf à 1 heure après une séance de PCE, avec une augmentation des fractions de moyennes et de grandes tailles au profit des fractions de petite taille. Pour les autres temps, aucune variation du taux et du profil d'ADNcf avant et après PCE n'est statistiquement relevant.

Ces variations observées seulement à T1h soulèvent des questions :

- Des mesures réalisées sur les poches d'aphérèse montrent une saturation totale des poches par l'ADNcf après illumination (données non montrées) et donc sans la moindre corrélation avec les taux mesurés sur les prélèvements sanguins après ré-infusion de ces dernières aux patients (table 18). La poche d'aphérèse étant ré-infusé à vitesse lente, durant au moins 30 minutes, l'ADNcf infusé est-il simplement filtré par l'organisme au fur et à mesure de la perfusion et ne persiste donc qu'à faible taux dans la circulation sanguine au bout de 1h pour se normaliser très vite par la suite ?

Si tel est le cas, ces variations de taux et de profil de taille de l'ADNcf à T1h signifieraient elles une efficacité de la procédure de PCE ?

Des mesures plus précoces (T10 min, T20 min et T30 min) seraient alors nécessaires afin de mieux évaluer l'efficacité de la procédure. Des mesures à T2h, T3h, T6h et T12h nous permettraient de savoir à quel moment le taux d'ADNcf des patients se normalisent après séance de PCE.

- L'apoptose des lymphocytes ne commence théoriquement qu'environ 6 heures après la procédure de PCE (51), l'augmentation du taux d'ADNcf et des fractions de moyennes et de grandes tailles (certainement en rapport à de la lyse cellulaire) est-elle simplement due à la lyse cellulaire entraînée par la procédure d'aphérèse et de re-perfusion de la poche lors de la séance ? Cette seconde hypothèse est moins plausible, car la quantité d'ADNcf détectée après PCE signifierait une lyse cellulaire beaucoup trop importante et donc incompatible avec l'état clinique des patients après la procédure et tout au long de la thérapie.

Afin d'écartier cette dernière hypothèse et de valider la première (augmentation du taux d'ADNcf et modification du profil de taille en faveur des moyennes et grandes tailles), il serait nécessaire de transfuser comparativement des sujets sains avec une poche cellulaire ne subissant

pas de PCE et avec une poche subissant une PCE afin de savoir si la procédure de PCE entraîne une augmentation de certaines tailles d'ADNcf.

L'apoptose des lymphocytes ne commence qu'environ 6 heures après la procédure de PCE et en moyenne, 40 à 50% des cellules T traitées entrent en apoptose 24 heures après le traitement avec un pic au bout du troisième jour (51). Les monocytes sont également sujets à l'apoptose, mais à moindre mesure. En effet, un jour après le traitement, seuls 20% des monocytes seraient apoptotiques alors qu'ils seraient 80% au 6ème jour (51). La cinétique que nous avons menée montre donc que le délai de prélèvements n'explique pas l'absence de corrélation entre le taux d'ADNcf et l'effet attendu de la PCE.

Dans notre étude, il est possible que le moment de la prise en charge thérapeutique du patient modifie ou module les résultats précédents. En effet, les patients transplantés sont encore en état de rejet lors de l'initiation de la thérapie alors que les patients inclus dans le cadre d'un LCTC ou d'un lichen ont tous débuté la PCE plusieurs mois voire plusieurs années avant le début du protocole et sont déjà dans un état clinique stable. Ainsi, les variations observées des taux d'ADNcf au cours du temps pourraient plutôt être liées à des épisodes aigus de la pathologie initiale ou à un évènement clinique interférant qu'à l'effet de la PCE.

Le taux d'ADNcf au long de la thérapie par PCE de la plupart des patients inclus dans le cadre d'un LCTC et d'un lichen est semblable aux taux observés chez les volontaires sains avec des faibles variations intra et inter-individuelles et sans profil de taille particulier.

L'évolution du taux d'ADNcf au long de la thérapie par PCE des patients transplantés met en évidence trois profils différents. Un premier profil avec deux patients aux résultats similaires aux volontaires sains et aux patients inclus pour lichen et LCTC. Un patient présente une première phase résolutive avec des taux d'ADNcf élevés, diminuant et se stabilisant dans un deuxième temps. Un autre patient, qui inversement présente dans un premier temps des taux stables mais qui augmentent dans une deuxième phase. Ces deux patients présentent une augmentation de la fraction d'ADNcf de petite taille lors de la deuxième phase, s'associant avec une évolution clinico-biologique péjorative. En effet les examens anatopathologiques des biopsies ont mis en évidence des signes d'évolution de rejet aigu cellulaire et humorale. Aussi, nous avons émis l'hypothèse que cette augmentation serait secondaire à une dégradation tissulaire importante dans le contexte d'une inflammation aigue avec une hyper-activité de l'enzyme DNase I.

Afin de prouver cette hypothèse, nous avons procédé à l'étude de la quantité chimérique

d'ADNcf issu du greffon chez ces patients. La quantification de l'ADNcf du donneur chez le transplanté se fait en amplifiant les gènes HLA et des SNPs par la technique de ddPCR. Le protocole utilisé pour l'amplification des gènes HLA est similaire à celui publié par l'équipe de Jun Zou et al. (52). Le protocole de quantification des polymorphismes SNP est similaire à celui mis au point par le service d'Immunogénétique dans le cadre de détection du chimérisme pour le suivi des patients greffés par des cellules souches hématopoïétiques. Mais, l'absence d'identification de marqueurs informatifs pour un donneur de cœur ainsi que la très faible quantité d'ADNcf pour l'autre n'a pas permis une amplification spécifique fiable.

V- Conclusion et perspectives

La photochimiothérapie extracorporelle (PCE) est largement indiquée dans le traitement d'un large spectre de pathologies. Seulement son efficacité est très variable et à ce jour nous n'avons pas à disposition de marqueurs biologiques fiables d'évaluation et/ou de suivi de cette thérapeutique. L'ADNcf étant un marqueur biologique sensible et précoce d'apoptose, semble judicieux comme marqueur de son efficacité, l'apoptose étant l'élément central du mécanisme d'action de la PCE.

Nous avons montré que le taux d'ADNcf varie énormément fonction de la capacité de chaque technique à extraire les fragments de petites tailles et à quantifier avec précision les différentes tailles de fragments d'ADNcf.

De même, nous avons démontré que les extracteurs impactent l'intégrité de l'ADNcf, modifiant ainsi le profil de taille obtenu en fonction de la technique utilisée.

120 sujets sains nous ont permis de déterminer des valeurs normales quantitatives et qualitatives pour l'extracteur semi-automatique (IDEAL, ID solution ®) qui utilise le kit d'extraction IDXTRACT-MAG.

Si l'étude de l'expression et du profil de l'ADNcf comme marqueurs de suivi au long court de la PCE chez les patients atteints de LCTC ou de lichen plan ne paraissent pas pertinents, l'analyse du profil de taille dans le suivi des transplantés cardiaques et de la procédure de PCE reste une piste intéressante à explorer.

Notre étude présente des limites, comme le faible nombre de patients et le spectre restreint de pathologies étudiées. De plus, la majorité des patients ont débuté la PCE plusieurs mois voire

plusieurs années avant l'initiation de notre protocole, rendant plus difficile l'interprétation des résultats.

De même, le manque de spécificité de l'ADNcf reste également un point limitant important à prendre en compte. En effet, l'ADNcf est sécrété dans divers contextes inflammatoires. Or nous sommes en présence de patients avec des pathologies chroniques et subissant de nombreux évènements cliniques intercurrents. Il est donc difficile de savoir si une fluctuation du taux d'ADNcf est liée à la PCE ou à d'autres phénomènes cliniques interférents tels qu'une prise médicamenteuse ou un épisode aigu de la pathologie dont le patient est atteint.

Finalement, il serait intéressant coupler cette étude avec d'autres marqueurs d'apoptose comme l'annexine V par cytométrie en flux (moins précoce que l'ADNcf), ou les microparticules (plus précoce que l'ADNcf).

Devant toutes ces limites, il serait intéressant de poursuivre l'étude en augmentant la taille de la cohorte, en incluant des patients débutant la PCE simultanément à l'étude, en élargissant le spectre des pathologies traités par PCE et de procéder à des mesures au temps, T10min, T20min, T30 min, T2h, T3h, T6h, T12h et T24h lors de l'évaluation de la cinétique.

Aussi, l'étude des poches de PCE avant et après irradiation permettrait de voir la quantité d'ADNcf sécrétée après induction de l'apoptose par injection du 8-MOP.

L'échec d'identification du chimérisme donneur pour prouver la corrélation entre le changement du profil de taille (augmentation du taux d'ADNcf de petite taille) et le rejet du transplant cardiaque a permis de mettre en place au sein du laboratoire la modification du protocole de prélèvement (ajout d'un tube de prélèvements) et de la gestion du pré-analytique du microchimérisme (concentration de l'ADNcf). Un travail est en cours afin d'isoler les fractions de différentes tailles détectées par le Biabooster et de les amplifier directement soit par ddPCR soit par NGS.

Références

- 1- M. B. Giacona, G. C. Ruben, K. A. Iczkowski, T. B. Roos, D. M. Porter, et al. Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, juillet 1998, vol 17, 89-97.
- 2- A. H. Wyllie, J. F. Kerr, et A. R. Currie, Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.*, 1980. Vol 68, 251-306.
- 3- Z. Jin et W. S. El-Deiry, Overview of cell death signaling pathways, *Cancer Biol. Ther.*, février. 2005, vol. 4, 139-163.
- 4- K Jung, M Fleischhacker, A Rabien. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker - A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica*, 2010, vol. 411, 1611–1624.
- 5- D. Pietrasz, N. Pécuchet, E. Fabre, H. Blons, L. Chevalier, V. Taly, et al. « Quel avenir pour l'ADN tumoral circulant? État des lieux et perspectives dans les cancers colorectaux, pulmonaires non à petites cellules et pancréatiques ». *Bulletin du cancer*, janvier 2016, vol. 103, 55-65.
- 6- S. Jahr, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.*, févr. 2001 vol. 61, 1659-1665.
- 7- Breitbach, S., Tug S, Helmig S, Kubiak T, Michal M, Gori T, Ehlert T. Direct Quantification of Cell-Free, Circulating DNA from Unpurified Plasma. *PLOS ONE*, mars 2014, vol. 9, e87838.
- 8- K. Perez-Toralla et al., PCR digitale en micro-compartiments - I. Détection sensible de séquences d'acides nucléiques rares, *Med Sci (Paris)*, janvier 2015, vol. 31, 84-92.
- 9- Zonta, E., Nizard, P. & Taly, V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. in *Advances in Clinical Chemistry*, 2015, vol 70, 197–246.
- 10- Shihabi, Z. K. Review of applications of capillary electrophoresis for clinical analysis. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, janvier 2000, Vol 23, 79–95.
- 11- Swerdlow, H. & Gesteland, R. Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, mars 1990, Vol 18, 1415–1419.
- 12- C Andriamanampisoa, A Bancaud, A Boutonnet-Rodat, A Didelot, J Fabre et al. On-line DNA concentration and size profiling with a limit of detection of 10 fg/μL. Application to high-sensitivity characterization of circulating cell-free DNA. *Analytical Chemistry*, mars 2018, vol 90, 3766-3774.
- 13- Edelson R, Berger C, Gasparro F, Jegesothy B, Heald P, Wintroub B et al., Treatment of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy of cutaneous T-cell lymphoma by extracorporeal photochemotherapy. Preliminary results. *N Engl J Med.*, 1987, vol. 316, 297-303.

- 14- D. Hannani, F. Gabert, L. Chaperot, M.J. Richard, J. Plumas. La photochimiothérapie extracorporelle ou l'immunothérapie par cellules modifiées par photochimie. *La Revue de médecine interne*, avril 2010, vol. 31, 321–324.
- 15- Photochimiothérapie extracorporelle – Rapport d'évaluation. HAS, 2010
- 16- McKenna KE, Whittaker S, Rhodes LE, Taylor P, Lloyd J, Ibbotson S et al. Evidence-based practice of photopheresis 1987-2001 a report of a workshop of the British Photodermatology Group and the U.K. Skin Lymphoma Group. *Br J Dermatol*, aout 2005, vol. 154 : 7-20.
- 17- Plumas J, Drillat P, Jacob MC, Richard MJ, Favrot MC. Extracorporeal photochemotherapy for treatment of clonal T cell proliferations. *Bull Cancer*, aout 2003, vol 90, 763-70.
- 18- Bladon J, Taylor PC. Extracorporeal photopheresis : A focus on apoptosis and cytokines. *J Dermatol Sci*, août 2006, vol 43, 85-94.
- 19- Blaydon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis differentially regulates the expression of phosphorylated STAT-1 and STAT-5 in treated monocytes and T-cells, respectively. *J Cutan Med Surg*, mai-juin 2004, vol.8, 148-156.
- 20- Berger CL, Xu AL, Hanlon D, Lee C, Schechner J, Glusac E, et al. Induction of human tumor-loaded dendritic cells. *Int J Cancer*. décembre 2001, vol. 91, 438–447.
- 21- Bladon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis normalizes some lymphocyte subsets (including T regulatory cells) in chronic graft-versus-host-disease. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, août 2008, vol 12, 311-318.
- 22- Szodoray P, Papp G, Nakken B, Harangi M, Zeher M. The molecular and clinical rationale of extracorporeal photochemotherapy in autoimmune diseases, malignancies and transplantation. *Autoimmunity Reviews*, avril 2010, vol 9, 459–464.
- 23- Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, et al. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Janvier 2014, vol. 28, 1-37.
- 24- R Willemze, G Burg, L Cerroni, E Berti, S H. Swerdlow et al. WHO-EORTC classification for cutaneous lymphomas. *Blood*, mai 2005, vol. 105, 3768-3785.
- 25- Scarsbrick JJ, Taylor P, Holtick U, Makar Y, Douglas K, Berlin G et al. Photopheresis Expert Group. U.K. consensus statement on the use of extracorporeal photopheresis for treatment of cutaneous T-cell lymphoma and chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol*. avril 2008, Vol. 158, 659-678.
- 26- Olsen EA, Whittaker S, Kim YH, Duvic M, Prince HM, Lessin SR, et al. Clinical end points and response criteria in mycosis fungoides and Sezary syndrome: a consensus statement of the International Society for Cutaneous Lymphomas, the United States Cutaneous Lymphoma Consortium, and the Cutaneous Lymphoma Task Force of the

European Organisation for Research and Treatment of Cancer. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2011, vol. 29, 2598-2607.

- 27- Abu-Dalle I, Reljic T, Nishihori T, Antar A, Bazarbachi A, Djulbegovic B, et al. Extracorporeal photopheresis in steroid-refractory acute or chronic graft-versus-host disease: results of a systematic review of prospective studies. *Biology of blood and marrow transplantation. journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation.* mai 2014, Vol 20, 1677-1686.
- 28- Zhang H, Chen R, Cheng J, Jin N, Chen B. Systematic review and meta-analysis of prospective studies for ECP treatment in patients with steroid-refractory acute GVHD. *Patient Prefer Adherence*, Janvier 2015, vol 9, 105-111.
- 29- Knobler R, Berlin G, Calzavara-Pinton P, Greinix H, Jaksch P, Laroche L, et al. Guidelines on the use of extracorporeal photopheresis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, Janvier 2014, vol. 28, 1-37.
- 30- Evans AV, Wood BP, Scarisbrick JJ, Fraser-Andrews EA, Chinn S, Dean A, et al. Extracorporeal photopheresis in Sézary syndrome: hematologic parameters as predictors of response. *Blood*, septembre 2001, vol. 98, 1298-1301.
- 31-Pierelli L, Bosi A, Olivieri A. « best practice » for extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease by Societa' Italiana di Emaferesi and Manipolazione Cellulare and Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo: a national survey to ascertain its degree of application in Italian transplant centers. *Transfusion*. Janvier 2018, vol. 58, 217-222.
- 32- Hautmann AH, Wolff D, Hahn J, Edinger M, Schirmer N, Ammer J, et al. Extracorporeal photopheresis in 62 patients with acute and chronic GVHD: results of treatment with the COBE Spectra System. *Bone marrow transplantation*, 2013, vol. 48, 439-445.
- 33- Greinix HT, Worel N, Just U, Knobler R. Extracorporeal photopheresis in acute and chronic graft-versus-host disease. *Transfusion and apheresis science*, juin 2014, vol 50, 349-357.
- 34- Rao V, Ryggen K, Aarhaug M, Dai H, Jorstad S, Moen T. Extracorporeal photochemotherapy in patients with cutaneous Tcell lymphoma: is clinical response predictable? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, octobre 2006, vol 20, 1100-1107.
- 35- M.-T.Dieterlen, H.B.Bittner, A. Pierzchalski, S. Dhein,F. W. Mohr and M. J. Barten, Immunological monitoring of extracorporeal photopheresis after heart transplantation. 2013 *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*, avril 2014, vol 176, 120-128.
- 36- Denney, HA, Whittle RJ, Lai J, Jacques RM and Taylor PC. Regulatory T cells in Chronic Graft-versus-host disease after Extracorporeal Photopheresis: Correlation with skin and global organ responses, and ability to taper steroids. *Transplantation*, Janvier 2017, vol 101, 204-211.

- 37- Ranchon H, Malbec R, Picot V, Boutonnet A, Teerapanich P, Joseph P et al. DNA separation and enrichment using electro-hydrodynamic bidirectional flows in viscoelastic liquids », *Lab. Chip*, février 2016, vol. 16, 1243-1253.
- 38- M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand, et P. Anker. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release », *Clin. Chim. Acta*, novembre 2001, vol. 313, 139-142.
- 39- M Fleischhaker, B Schmidt, S Weickman, D Fersching, G S Leszinski et al. Methods for isolation of cell-free DNA strongly affect DNA yield. *clinica chimica Acta*. novembre 2011, vol 412 ; 23-24.
- 40- Perez-Barrios, I Nieto-Alcolado, M Torrente, C Jimenez-Sanchez, V Calvo, L Gutierrez-Sanz et al., Comparison of methods for circulating cel-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Research*, septembre 2016, vol. 5, 665-672.
- 41- V Kloten, N Rüchel, N Ortiz Brüchle, J Gastrhaus, N Freudenmacher, F Steib et al. Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele specific PCR. *oncotarget*, septembre 2017, vol. 8, 86253-86263.
- 42- Georgiou CD, Papapostolou I. Assay for the quantification of intact/fragmented genomic DNA. *Anal Biochem*. novembre 2006, Vol. 358, 247–56.
- 43- Ikeda Y, Iwakiri S, Yoshimori T. Development and characterization of a novel host cell DNA assay using ultra-sensitive fluorescent nucleic acid stain “PicoGreen.” *J Pharm Biomed Anal*. Mai 2009, vol. 49, 997–1002.
- 44- Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. *Biological procedure Online* [Internet]. Decembre 2013 [cite le 9 avril 2020];15(1). Disponible sur: <https://biologicalproceduresonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1480-9222-15-5>
- 45- Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant. *Tumor Biol*. Août 2019, vol. 41, 1-9.
- 46- Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, et al. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res*. Decembre 2016 Dec, vol. 5, 665–672.
- 47- M. Fleischhacker et B. Schmidt, “Circulating nucleic acids (CNACs) and cancer - a survey”, *Biochim. Biophys. Acta*, janvier 2007, vol. 1775, 181-232.
- 48- G. Lippi, F. Sanchis-Gomar, et G. Cervellin. Cell-free DNA for diagnosing myocardial infarction: not ready for prime time. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, avril 2015, vol. 53, 1895–1901.

- 49- S. Jahr *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells, *Cancer Res.*, fevrier 2001, vol. 61, 1659-1665.
- 50- S. Agah *et al.*, Quantification of Plasma Cell-Free Circulating DNA at Different Stages of Colorectal Cancer, *Cancer Investigation*, novembre 2017, vol. 35, 625-632.
- 51- Hannani D, Gaber F, Laurin D, Sall M, Molens JP, Hequet O *et al.*, Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation*, mars 2010, vol. 89, 492-499.
- 52- J Zou J, B Duffy, M Slade, AL Young, N Steward, R Hachem, T Mohanakumar. Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch. *Hum Immunol*. Avril 2017, vol. 78, 342-349.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes 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, de respecter le secret professionnel.*
- ❖ *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, méprisé de mes confrères, si j'y manque.