



**HAL**  
open science

# Présentation et utilisation en médecine vétérinaire de l'ADN libre circulant : une étude bibliographique

Camille de Castro

## ► To cite this version:

Camille de Castro. Présentation et utilisation en médecine vétérinaire de l'ADN libre circulant : une étude bibliographique. Médecine vétérinaire et santé animale. 2023. dumas-04415443

**HAL Id: dumas-04415443**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-04415443v1>**

Submitted on 24 Jan 2024

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

Année 2023

**PRÉSENTATION ET UTILISATION EN MÉDECINE  
VÉTÉRINAIRE DE L'ADN LIBRE CIRCULANT : UNE ÉTUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

**THÈSE**

pour obtenir le diplôme d'État de  
**DOCTEUR VÉTÉRINAIRE**  
présentée et soutenue publiquement devant  
la Faculté de Médecine de Créteil (UPEC)  
le 14 décembre 2023

par

**Camille, Devi, DE CASTRO**

sous la direction de  
**Pierre DESHUIILLERS**

**JURY**

<b>Président du jury :</b>	<b>M. Sylvain BELLIER</b>	Professeur à l'EnvA
<b>Directeur de thèse :</b>	<b>M. Pierre DESHUIILLERS</b>	Maître de Conférences à l'EnvA
<b>Examinatrice :</b>	<b>Mme Ghita BENCHEKROUN</b>	Maître de Conférences à l'EnvA



Liste des enseignants intervenant dans l'encadrement des thèses de Doctorat vétérinaire



Version juillet 2023

Liste des Professeurs et Maîtres de conférences titulaires de l'HDR

M	Adjou	Karim	Professeur	DPASP
M	Audigié	Fabrice	Professeur	DEPEC
M	Bellier	Sylvain	Professeur	DSBP
M	Blaga	Radu	Professeur	DSBP
M	Blot	Stéphane	Professeur	DEPEC
M	Boulouis	Henri-Jean	Professeur émérite	DSBP
Mme	Chahory	Sabine	Professeur	DEPEC
M	Chateau	Henry	Professeur	DSBP
Mme	Chetboul	Valerie	Professeur	DEPEC
Mme	Crevier-Denoix	Nathalie	Professeur	DSBP
M	Degueurce	Christophe	Professeur	DSBP
M	Denoix	Jean-Marie	Professeur	DEPEC
M	Desquilbet	Loïc	Professeur	DSBP
Mme	Dufour	Barbara	Professeur émérite	DPASP
M	Eloit	Marc	Professeur	DSBP
M	Fayolle	Pascal	Professeur émérite	DEPEC
M	Federighi	Michel	Professeur	DPASP
M	Fontbonne	Alain	Professeur	DEPEC
Mme	Gilbert	Caroline	Professeur	DSBP
M	Grandjean	Dominique	Professeur	DEPEC
Mme	Grimard-Ballif	Bénédicte	Professeur	DPASP
Mme	Haddad-Hoang Xuan	Nadia	Professeur	DPASP
M	Jouvion	Gregory	Professeur	DSBP
M	Kohlhauer	Matthias	Professeur	DSBP
Mme	Le Poder	Sophie	Professeur	DSBP
Mme	Le Roux	Delphine	Maître de conférences HDR	DSBP
M	Manassero	Mathieu	Professeur	DEPEC
Mme	Maurey-Guéneç	Christelle	Professeur	DEPEC
M	Millemann	Yves	Professeur	DPASP
Mme	Pilot-Storck	Fanny	Professeur	DSBP
M	Ponter	Andrew	Professeur	DPASP
Mme	Risco-Castillo	Véronica	Maître de conférences HDR	DSBP
Mme	Rivière	Julie	Maître de conférences HDR	DPASP
Mme	Robert	Céline	Professeur	DSBP
M	Tiret	Laurent	Professeur	DSBP
M	Tissier	Renaud	Professeur	DSBP
M	Verwaerde	Patrick	Professeur	DEPEC
Mme	Viateau	Véronique	Professeur	DEPEC

Liste des Maîtres de conférences et Ingénieurs de recherche DMV

M	Amé	Pascal	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barassin	Isabelle	Maître de conférences	DPASP
Mme	Barbarino	Alix	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Benckroun	Ghita	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Bertoni	Lelia	Maître de conférences	DEPEC
M	Bolnot	François	Maître de conférences	DPASP
Mme	Canonne-Guibert	Morgane	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Chevallier	Lucie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Cochet-Faivre	Noëlle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Cordonnier-Lefort	Nathalie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Coudry	Virginie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Crepeaux	Guillemette	Maître de conférences	DSBP
M	Crozet	Guillaume	Maître de conférences	DPASP
Mme	De Paula Reis	Alline	Maître de conférences	DPASP
M	Delsart	Maxime	Maître de conférences	DPASP
Mme	Denis	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Deshuillers	Pierre	Maître de conférences	DSBP
M	Gauthier	Michel	Maître de conférences associé	DPASP
Mme	Guérin	Virginie	Maître de conférences	DSBP
Mme	Guétin-Poirier	Valentine	Maître de conférences	DPASP
Mme	Jacquet	Sandrine	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Kurtz	Maxime	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Lagrée	Anne-Claire	Maître de conférences	DSBP
Mme	Le Dudal	Marine	Ingénieur de recherche (DMV)	DSBP
Mme	Legrand	Chantal	Maître de conférences associé	DSBP
M	Mammeri	Mohamed	Maître de conférences	DSBP
Mme	Manguin	Estelle	Maître de conférences	DEPEC
Mme	Marignac	Genevieve	Maître de conférences	DSBP
Mme	Marotto	Stéphanie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Maurice	Emeline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mespoules-Rivière	Céline	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Mtimet	Narjès	Maître de conférences	DPASP
M	Mortier	Jérémy	Maître de conférences associé	DEPEC
M	Nudelmann	Nicolas	Maître de conférences	DEPEC
M	Pignon	Charly	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
M	Polack	Bruno	Maître de conférences	DSBP
Mme	Quéré	Émilie	Ingénieur de recherche (DMV)	DEPEC
Mme	Ravary-Plumioën	Bérangère	Ingénieur de recherche (DMV)	DPASP
M	Reyes-Gomez	Edouard	Maître de conférences	DSBP
Mme	Rose	Hélène	Maître de conférences associé	DSBP
M	Tanquerel	Ludovic	Maître de conférences	DEPEC



# Remerciements

**Au Président du Jury de cette thèse, M. Sylvain Bellier, Professeur à l'EnvA,**

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Hommage respectueux.

**À M. Pierre Deshuillers, Maître de conférences à l'EnvA,**

Pour m'avoir proposé ce sujet, et pour m'avoir guidée avec pédagogie et bienveillance durant ces deux dernières années.

Sincères remerciements.

**À Mme Ghita Benchekroun, Maître de conférences à l'EnvA,**

Pour avoir accepté d'être examinatrice de cette thèse, et pour votre pédagogie tout au long de ces cinq années d'école.

Sincères remerciements.



# Table des matières

---

Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des annexes.....	7
Liste des abréviations.....	9
Introduction.....	11
<b>Première partie : présentation de l'ADN libre circulant.....</b>	<b>13</b>
1. Rappels de biologie moléculaire : l'ADN.....	13
a. Définition.....	13
b. Localisation.....	13
c. Structure.....	13
d. Chromatine.....	17
e. Rôles.....	18
f. Réplication.....	18
2. Présentation des ADN libres circulant.....	18
a. Historique : découverte et premières études, un domaine d'intérêt croissant.....	19
b. Concentrations.....	20
c. Le pool de cfDNA.....	21
a. Composition.....	21
b. Processus physiopathologiques à l'origine d'une variation du pool d'ADN libres circulant.....	22
d. Libération et élimination des ADN libres circulant.....	24
a. Sources d'ADN libres circulant.....	24
b. Élimination de l'organisme.....	28
e. Intérêts en médecine humaine et vétérinaire.....	29
a. Avantages des biopsies liquides.....	29
b. Informations apportées par les cfDNA.....	30
3. Obtention des ADN libres circulant.....	30
a. Nature des prélèvements.....	30
a. Sang : plasma ou sérum.....	30
b. Autres liquides biologiques.....	31
b. Matériel et méthodes de récolte, facteurs pré-analytiques influençant la qualité des échantillons.....	32
a. Facteurs d'influence avant la collecte du prélèvement.....	33
b. Technique et matériel de prélèvement.....	35
c. Choix du tube de prélèvement.....	35
d. Agitation des prélèvements.....	36
c. Traitement des prélèvements.....	36
a. Centrifugation.....	36
b. Méthodes d'extraction des cfDNA.....	37
d. Conditions de stockage après extraction.....	43
4. Variables étudiées dans la littérature.....	43
<b>Deuxième partie : utilisation des ADN libres circulant en médecine humaine et en médecine vétérinaire.....</b>	<b>45</b>
1. Utilisation actuelle des ADN libres circulant en médecine humaine.....	45
a. Oncologie : exemple du cancer colorectal.....	45
a. Diagnostic.....	45
b. Pronostic.....	49
c. Monitoring thérapeutique.....	49
b. Maladies infectieuses.....	50
a. Sepsis.....	50
b. Pneumonies infectieuses.....	52
c. Méningites bactériennes.....	54
d. Infections parasitaires.....	55
c. Diabète sucré.....	61



a. Diabète de type 1.....	61
b. Diabète de type 2.....	62
d. <i>Lupus érythémateux disséminé (LED)</i> .....	64
e. <i>Gestation : analyses pré-natales, affections associées</i> .....	65
a. Facteurs de variation de la fraction fœtale.....	65
b. Dépistage prénatal non invasif (DPNI).....	66
c. Affections associées à la grossesse.....	74
f. <i>Greffes d'organe</i> .....	78
a. Méthodes de détection des dd-cfDNA.....	78
b. Application aux transplantations d'organes.....	79
g. <i>Maladies cardio-vasculaires</i> .....	88
a. Hypertension artérielle.....	88
b. Infarctus du myocarde.....	89
c. Fibrillation atriale.....	90
d. Insuffisance cardiaque.....	90
e. Accident vasculaire cérébral.....	91
f. Arrêt cardiaque.....	93
h. <i>Maladies ostéo-articulaires</i> .....	94
a. Polyarthrite rhumatoïde.....	94
b. Infection de prothèse articulaire.....	95
2. <b>Utilisation actuelle des ADN libres circulant en médecine vétérinaire</b> .....	97
a. <i>Oncologie</i> .....	97
a. Diagnostic.....	97
b. Pronostic.....	99
c. Monitoring thérapeutique.....	99
b. <i>Maladies infectieuses</i> .....	100
a. Infections bactériennes.....	100
b. Infections parasitaires.....	101
c. <i>Anémie hémolytique à médiation immune (AHMI)</i> .....	102
d. <i>Dilatation-torsion de l'estomac (DTE)</i> .....	102
e. <i>Traumatismes et lésions tissulaires</i> .....	103
a. Sévérité des lésions tissulaires.....	103
b. Rhabdomyolyse d'effort.....	103
c. Intérêt pronostique.....	104
f. <i>Maladies cardio-vasculaires</i> .....	104
a. Effets de l'effort prolongé sur la concentration en cfDNA chez l'animal sain, comparaison à des marqueurs de maladies cardiaques.....	104
b. Maladies thrombo-emboliques.....	105
g. <i>Maladies ostéo-articulaires : exemple de l'arthrose chez le cheval</i> .....	106
h. <i>Sexage</i> .....	107
<b>Conclusion</b> .....	<b>109</b>
<b>Liste des références bibliographiques</b> .....	<b>111</b>
<b>Annexe 1 : Kits d'extraction des cfDNA</b> .....	<b>131</b>

# Liste des figures

---

Figure 1 : Structure générale d'un nucléotide (d'après Nelson et Cox, 2021).....	14
Figure 2 : Bases pyrimidiques et puriques (d'après Rodwell <i>et al.</i> , 2018).....	14
Figure 3 : Désoxyribonucléosides (d'après Zheng <i>et al.</i> , 2018).....	15
Figure 4 : Adénosines monophosphate, diphosphate et triphosphate (d'après Rodwell <i>et al.</i> , 2018) .....	15
Figure 5 : Structure d'une chaîne polynucléotidique (d'après Blanco et Blanco, 2017).....	16
Figure 6 : Représentation du modèle de Watson et Crick de la structure en double hélice de l'ADN B (d'après Rodwell <i>et al.</i> , 2018).....	17
Figure 7 : Structure générale d'un nucléosome (d'après Rodwell <i>et al.</i> , 2018).....	18
Figure 8 : Représentation graphique du nombre de résultats fournis par PubMed avec les mots- clés « <i>cell-free DNA</i> » et « <i>circulating DNA</i> » par année, de 1949 à 2022.....	20
Figure 9 : Origine des ctDNA et illustration du pool de cfDNA : exemple d'un patient atteint d'un cancer de l'estomac (d'après de Huang <i>et al.</i> , 2021).....	24
Figure 10 : Comparaison des biopsies tissulaires et des biopsies liquides (d'après de Lone <i>et al.</i> , 2022).....	29
Figure 11 : Variables pré-analytiques influençant les résultats des mesures de cfDNA (d'après Ungerer <i>et al.</i> , 2020).....	33
Figure 12 : Nombre de copies / $\mu$ L obtenus par PCR digitale en gouttelettes (d'après Sorber <i>et al.</i> , 2017).....	42
Figure 13 : Principe de l'approche digitale du dosage relatif de mutation (d'après Lun <i>et al.</i> , 2008) .....	68



# Liste des tableaux

---

Tableau 1 : Dénomination des cfDNA selon leur origine.....	22
Tableau 2 : Paramètres de centrifugation (d'après Martignano, 2019).....	37
Tableau 3 : Durée du processus d'extraction de différents kits (d'après Qiagen, 2019 ; Westburg Life Science, n.d. ; EpiGentek, 2022 ; Promega, 2021).....	40
Tableau 4 : Présentation des kits utilisés dans l'étude de Sorber <i>et al.</i> (2017).....	41
Tableau 5 : Performances de la concentration médiane sérique en cfDNA, de l'index d'intégrité et de l'antigène carcino-embryonnaire pour distinguer les patients atteints de cancer colorectal et les individus sains (d'après Flamini <i>et al.</i> , 2006 ; Hao <i>et al.</i> , 2014).....	46
Tableau 6 : Comparaison des résultats issus de la bactériologie et du NGS chez 18 patients atteints de pneumonie infectieuse (d'après Langelier <i>et al.</i> , 2020).....	53
Tableau 7 : Comparaison des résultats issus des différents tests diagnostiques chez des patients atteints de pneumonie à <i>Pneumocystis jirovecii</i> (d'après Jiang <i>et al.</i> , 2021).....	54
Tableau 8 : Résultats de différentes études basées sur la détection des cf-pDNA issus de parasites du genre <i>Schistosoma</i> (d'après Eraky et Aly, 2016 ; Hussein <i>et al.</i> , 2012 ; Ullah <i>et al.</i> (2020) ; Weerakoon <i>et al.</i> , 2017 ; Wichmann <i>et al.</i> , 2009 ).....	56
Tableau 9 : Spécificité et sensibilité de la PCR sur cf-pDNA contenus dans les urines de patients atteints de leishmaniose (d'après Motazedian <i>et al.</i> , 2008 ; Veland <i>et al.</i> , 2011).....	58
Tableau 10 : Performances de la détection des cf-pDNA issus de <i>Strongyloides stercoralis</i> sur urine et sérum (d'après Gorgani-Firouzjaee <i>et al.</i> , 2018 ; Lodh <i>et al.</i> , 2016).....	59
Tableau 11 : Performances comparées des variables seules et combinées dans la détection de la rétinopathie diabétique (d'après Han <i>et al.</i> , 2021).....	63
Tableau 12 : Effets de différents facteurs sur la valeur de la fraction fœtale (d'après Sarzynska-Nowacka <i>et al.</i> , 2019).....	66
Tableau 13 : Risque encouru par le fœtus selon le nombre de répétition du trinuéotide CAG au niveau de l'exon 1 du gène de la huntingtine (d'après van den Oever <i>et al.</i> , 2015).....	69
Tableau 14 : Performances du test de dépistage de la trisomie 21 par analyse des cfDNA (d'après Norton <i>et al.</i> , 2015).....	71
Tableau 15 : Performances du test de dépistage de la trisomie 13 et de la trisomie 18 par analyse des cfDNA (d'après Norton <i>et al.</i> , 2015 ; Pergament <i>et al.</i> , 2014).....	72
Tableau 16 : VPP (%) du test de dépistage de aneuploïdies touchant les chromosomes sexuels par analyse des cfDNA (d'après Margiotti <i>et al.</i> , 2020 ; Wang <i>et al.</i> , 2020).....	73

Tableau 17 : Concordance des résultats obtenus par analyse des cfDNA et par analyse cytogénétique des produits de conception pour établir un diagnostic d'anomalies chromosomiques (d'après Clark-Ganheart <i>et al.</i> , 2015 ; Colley <i>et al.</i> , 2020 ; Yaron <i>et al.</i> , 2020).....	76
Tableau 18 : VPN (%) du test de détection d'un rejet de greffe cardiaque par dosage des dd-cfDNA (d'après Deshpande <i>et al.</i> ; 2022).....	81
Tableau 19 : Évaluation par étude des aires sous la courbe ROC des performances de la fraction en dd-cfDNA plasmatiques dans la distinction des complications post-greffe pulmonaire (d'après De Vlamincq <i>et al.</i> , 2015 ; Jang <i>et al.</i> , 2021 ; Ju <i>et al.</i> , 2023).....	84
Tableau 20 : Comparaison de la performance des dd-cfDNA et des paramètres du panel hépatique par études des aires sous la courbe ROC dans l'établissement du diagnostic de rejet aigu du greffon (d'après Goh <i>et al.</i> , 2019).....	87
Tableau 21 : Performance d'un test diagnostique de la polyarthrite rhumatoïde combinant plusieurs biomarqueurs (d'après Rykova <i>et al.</i> , 2017).....	94
Tableau 22 : Concentration moyenne en cfDNA plasmatiques (ng/mL) chez des chiens sains, atteints d'une affection non néoplasique et atteints d'un cancer (d'après Kim <i>et al.</i> , 2021 ; Tagawa <i>et al.</i> , 2019).....	97

# Liste des annexes

---

Annexe 1 : Kits d'extraction des cfDNA.....131



# Liste des abréviations

---

5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine

ACPA : *anticitrullinated protein autoantibodies*

ADN : acide désoxyribonucléique

AHMI : anémie hémolytique à médiation immune

AMR : *antibody mediated rejection*

APPLE : *acute patient physiology and laboratory evaluation*

ARN : acide ribonucléique

AVC : accident vasculaire cérébral

CAG : cytosine-adénine-guanine

cf-micDNA : *cell-free microbial DNA*

cf-mtDNA : *cell-free mitochondrial DNA*

cf-pDNA : *cell-free parasite DNA*

cf-virDNA : *cell-free viral DNA*

cfDNA : *cell-free DNA*

cffDNA : *cell-free foetal DNA*

CK : créatine kinase

CMH : cardiomyopathie hypertrophique

CRP : protéine C réactive

ctDNA : *circulating tumor DNA*

dd-cfDNA : *donor derived cell free DNA*

ddPCR : *digital droplet polymerase chain reaction*

DFGe : débit de filtration glomérulaire estimé

DCGP : dysfonction chronique du greffon pulmonaire

DPNI : dépistage pré-natal non invasif

DTE : dilatation-torsion de l'estomac

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

gDNA : *genomic DNA*



hCG : gonadotrophine chorionique humaine  
LCS : liquide cérébro-spinal  
LED : lupus érythémateux disséminé  
MPSS : *massively parallel shotgun sequencing*  
NETs : *neutrophil extracellular traps*  
NGS : *next generation sequencing*  
NT-proBNP : *N-terminal pro brain natriuretic peptide*  
PCR : *polymerase chain reaction*  
qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*  
RCIU : retard de croissance intra-utérin  
ROC : *receiver operating characteristic*  
SCA : syndrome coronarien aigu  
SNP : *single-nucleotide polymorphism*  
TCMR : *T-cell mediated rejection*  
TNF : facteur de nécrose tumorale  
TPLO : ostéotomie de nivellement du plateau tibial  
ucfDNA : *urinary cell-free DNA*  
VPN : valeur prédictive négative  
VPP : valeur prédictive positive

# Introduction

---

L'ADN libre circulant, ou *cell-free DNA* en anglais, correspond à l'ensemble formé par les fragments d'ADN retrouvés dans le milieu extra-cellulaire. En effet, il est possible de retrouver ces fragments dans les divers liquides biologiques d'un organisme vivant : sang, urine, fèces, liquide de lavage broncho-alvéolaire, pour n'en citer que certains. L'avantage que représentent ces *cell-free DNA* réside essentiellement dans l'aspect minimalement invasif des procédures nécessaires à leur obtention. En effet, à l'inverse des biopsies classiques, une simple ponction peut suffire à récupérer un échantillon de taille suffisante pour procéder à leur analyse : on parle de biopsie liquide. Ainsi, depuis leur découverte à la fin des années 1940, le nombre d'étude s'étant intéressées aux *cell-free DNA* connaît une croissance exponentielle.

Le potentiel des *cell-free DNA* appliqué à la médecine est grand : en effet, ils pourraient fournir des informations diagnostiques, pronostiques mais également servir au monitoring thérapeutique de diverses maladies, en complétant les informations apportés par les biomarqueurs déjà disponibles. Étant parfois impliqués (ou du moins suspectés être impliqués) dans certains processus pathologiques, les *cell-free DNA* peuvent également représenter une nouvelle cible thérapeutique. Les *cell-free DNA* sont donc des molécules polyvalentes, aux applications multiples. Dans un monde où la médecine de précision est en pleine expansion, l'apport des *cell-free DNA* pourrait donc s'avérer inestimable. De nombreux kits sont disponibles sur le marché pour permettre l'extraction de ces petites molécules en vue de leur quantification et de leur analyse. En ce qui concerne la médecine vétérinaire, les domaines ayant fait l'objet de recherches sont bien moins nombreux qu'en médecine humaine, du moins à l'heure actuelle.

L'objectif de cette thèse est de faire un bilan sur l'état des connaissances actuelles concernant les *cell-free DNA*, en médecine humaine et en médecine vétérinaire. Dans un premier temps, les caractéristiques, les mécanismes à l'origine d'une variation du pool et les méthodes d'obtention des *cell-free DNA* seront présentés. Puis, de façon non exhaustive, leur utilisation en médecine humaine sera exposée. Enfin, un état des lieux des études menées en médecine vétérinaire sera réalisé, afin d'exposer les potentielles applications des *cell-free DNA* chez les animaux domestiques.



# Première partie : présentation de l'ADN libre circulant

---

## 1. Rappels de biologie moléculaire : l'ADN

### A. Définition

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est un type de macromolécule porteuse de l'information génétique. L'ensemble des molécules d'ADN forme le génome d'un individu : chez l'homme, il s'agit de l'ADN contenu dans les 46 chromosomes, regroupés en 23 paires et localisés dans le noyau cellulaire, et de l'ADN mitochondrial (Minchin et Lodge, 2019). L'espèce humaine ainsi que les espèces d'intérêt vétérinaires étudiées ici sont dites diploïdes : le génome est constitué de paires de chromosomes, dont le nombre varie selon l'espèce considérée. Chaque gène est ainsi présent en deux exemplaires, dit allèles (Nelson et Cox, 2021).

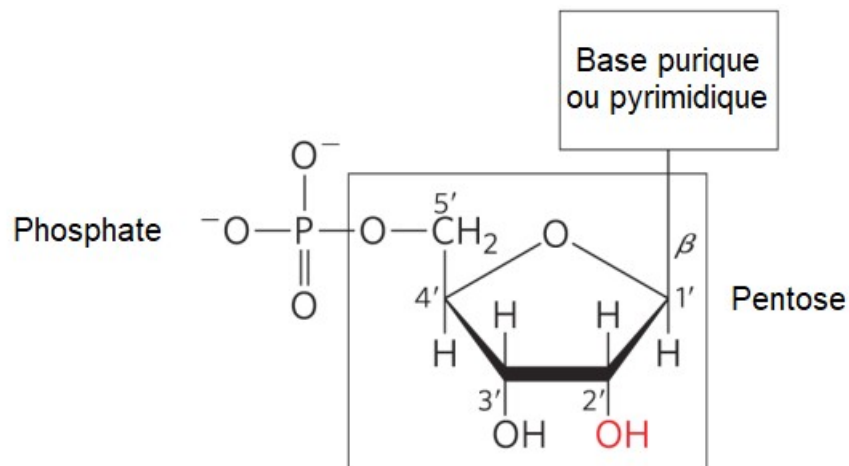
### B. Localisation

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est retrouvé sous forme de chromosomes dans les noyaux cellulaires, mais aussi au sein des mitochondries et des chloroplastes (uniquement chez les organismes végétaux pour ces derniers). Les procaryotes se distinguent des eucaryotes par l'absence de noyau cellulaire : ils possèdent un unique chromosome circulaire compacté à l'aide de protéines histones pour former le nucléoïde, mais peuvent également être pourvus de plasmides, qui correspondent à de l'ADN sous forme non chromosomique (Abali *et al.*, 2021).

### C. Structure

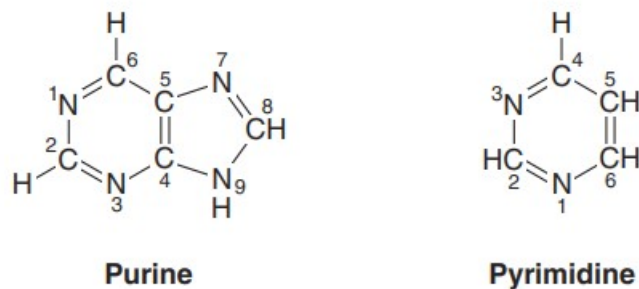
L'ADN est un polymère, formé de différents monomères appelés les désoxyribonucléotides. Chaque nucléotide est constitué de trois types d'éléments : une base nucléique (aussi appelée base azotée), un pentose sous forme de désoxyribose, et une ou plusieurs molécules d'acide phosphorique (figure 1) (Nelson et Cox, 2021).

**Figure 1 : Structure générale d'un nucléotide (d'après Nelson et Cox, 2021)**



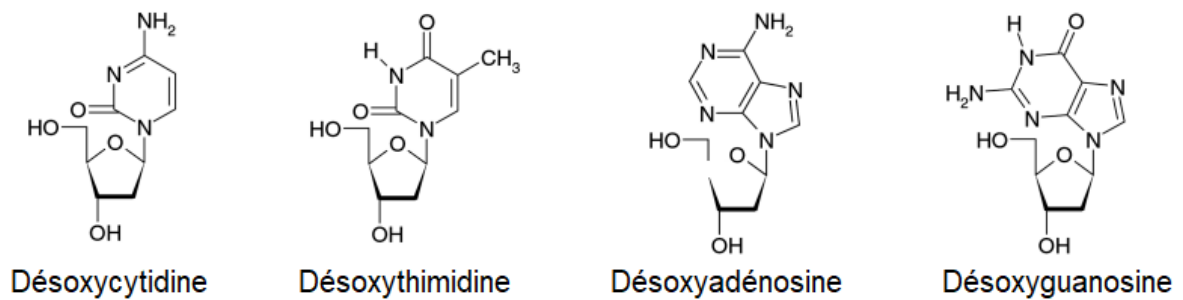
Il existe quatre types de bases nucléiques retrouvées au sein d'une molécule d'ADN, regroupées en deux catégories : l'adénine et la guanine sont des bases puriques, la cytosine et la thymine sont des bases pyrimidiques. Les purines sont dérivées des pyrimidines, par ajout d'un cycle imidazole, et présentent donc une structure différente (Blanco et Blanco, 2017). Les pyrimidines sont constituées d'un cycle hexagonal formé de quatre atomes de carbone et de deux atomes d'azote. Les purines, elles, sont formées de l'accolement de deux cycles : un premier cycle hexagonal identique à celui des purines associé à un cycle pentagonal à trois atomes de carbone et deux atomes d'azote. La structure des purines et des pyrimidines est visible sur la figure 2, qui fait apparaître la numérotation des atomes selon le système international.

**Figure 2 : Bases pyrimidiques et puriques (d'après Rodwell *et al.*, 2018)**



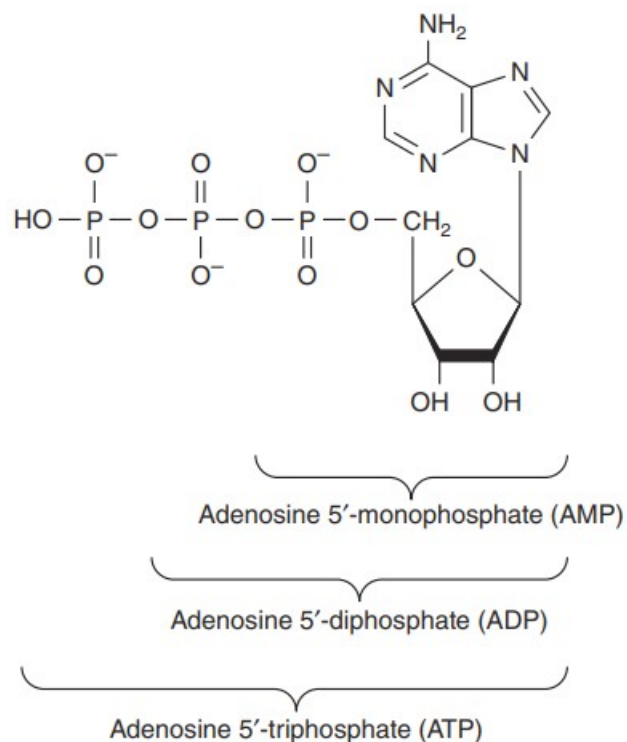
Un nucléoside correspond à l'association d'un pentose et d'une base nucléique, sans groupe phosphate, par une liaison N-glycosidique : cette liaison se fait entre le groupe hydroxyle de l'atome de carbone C1' du pentose et un atome d'azote de la base nucléique (azote N1 d'une base pyrimidique, azote N9 d'une base purique). Dans le cas de l'ADN, ce pentose correspondant à un désoxyribose, on parle donc de désoxyribonucléoside (figure 3) (Rodwell *et al.*, 2018).

**Figure 3 : Désoxyribonucléosides (d'après Zheng *et al.*, 2018)**



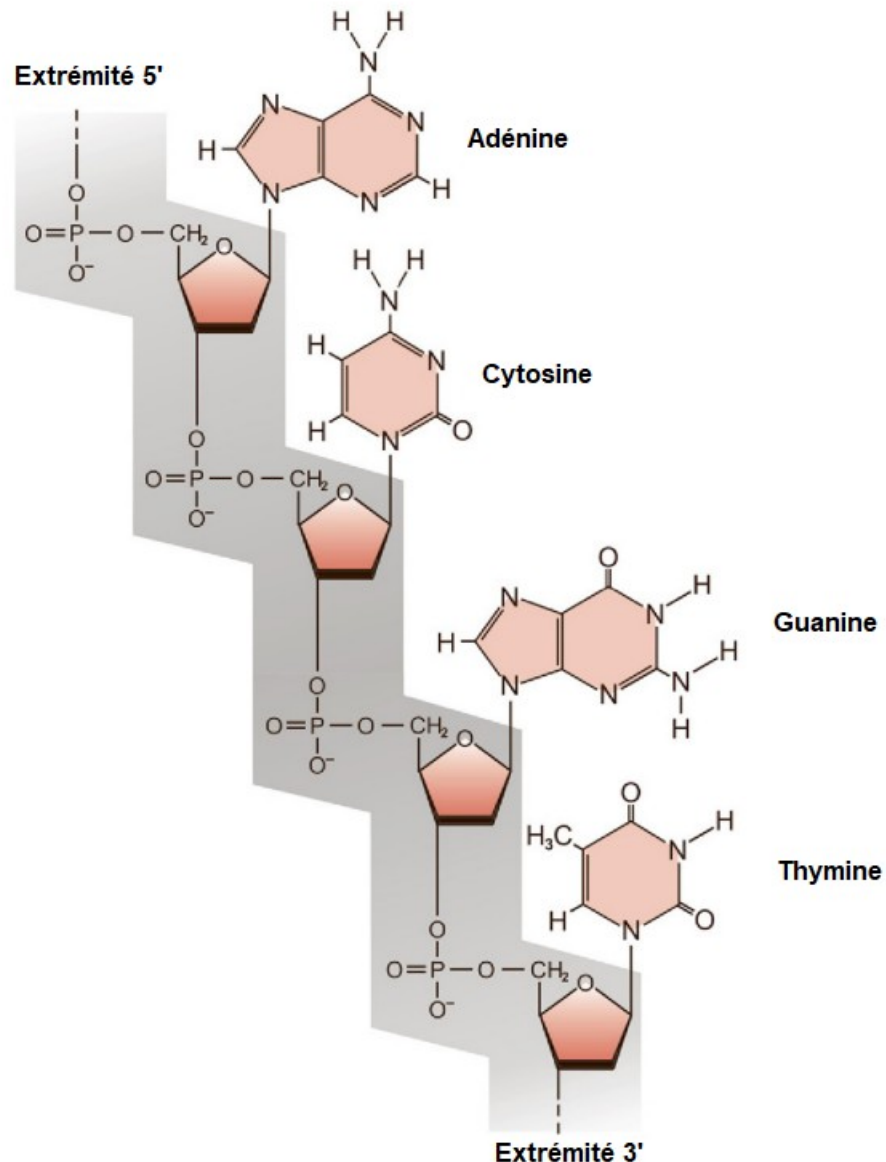
Chaque nucléotide résulte de l'estérification d'un à trois acides phosphoriques au cinquième atome de carbone du pentose d'un nucléoside. Les nucléotides sont donc des nucléosides phosphorylés (Rodwell *et al.*, 2018). Selon le nombre d'acides phosphoriques présents, les nucléosides sont dits mono-, di- ou triphosphates (figure 4).

**Figure 4 : Adénosines monophosphate, diphosphate et triphosphate (d'après Rodwell *et al.*, 2018)**



Les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons phosphodiesters, grâce au groupe phosphate qui relie le troisième atome de carbone d'un premier désoxyribose au cinquième atome de carbone d'un second désoxyribose. L'ensemble des nucléotides reliés entre eux forme une chaîne polynucléotidique, soit un brin d'ADN, qui s'étend du groupe phosphate libre du premier nucléotide de la chaîne (extrémité 5'-phosphate) au groupe hydroxyle libre du troisième atome de carbone du pentose du dernier nucléotide (extrémité 3'-hydroxyle) (Blanco et Blanco, 2017) (figure 5).

Figure 5 : Structure d'une chaîne polynucléotidique (d'après Blanco et Blanco, 2017)

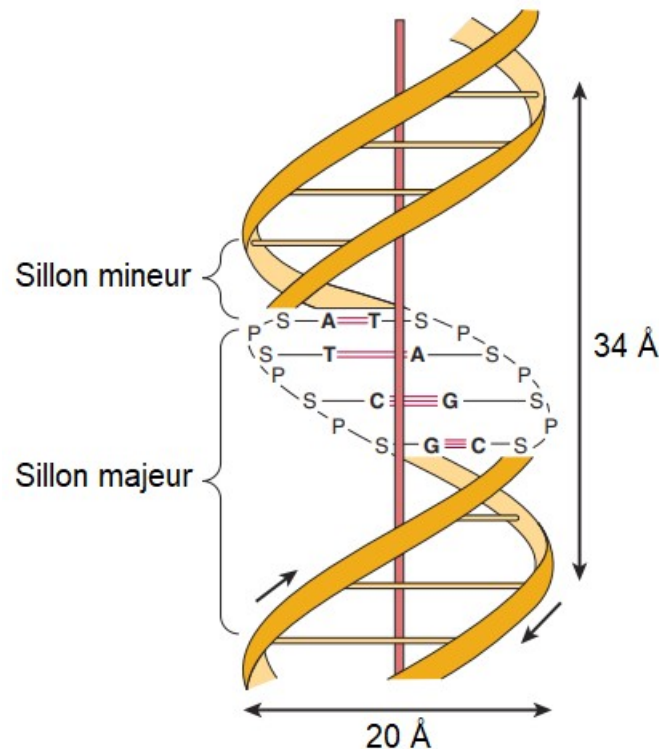


Cette chaîne est caractérisée par une séquence, qui correspond à l'enchaînement des différentes bases nucléiques. Par convention, cette séquence est lue de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' (Abali *et al.*, 2021).

Dans le noyau des cellules des organismes eucaryotes, l'ADN présente une structure en double hélice : deux brins d'ADN sont reliés entre eux de manière anti-parallèle, l'extrémité 5' de l'une faisant face à l'extrémité 3' de la seconde. Une adénine est toujours appariée à une thymine de l'autre brin, une cytosine est toujours reliée à une guanine : il est donc possible de déterminer la séquence d'une chaîne à partir de celle de la chaîne complémentaire. Les bases sont reliées entre elles par des liaisons hydrogènes, au nombre de deux entre une adénosine et une thymine et de trois entre une cytosine et une guanine, offrant une importante stabilité à la molécule d'ADN (Blanco et Blanco, 2017). La double hélice est organisée de la façon suivante : le squelette hydrophile sucre-phosphate est orienté vers le milieu aqueux extérieur, les bases hydrophobes sont orientées vers l'intérieur de façon perpendiculaire à l'axe central de l'hélice. Cela forme une alternance de sillons majeurs et de sillons mineurs, permettant aux protéines et enzymes

d'accéder aux domaines de liaisons de l'ADN au niveau des sillons majeurs (Abali *et al.*, 2021) (figure 6).

**Figure 6 : Représentation du modèle de Watson et Crick de la structure en double hélice de l'ADN B (d'après Rodwell *et al.*, 2018)**



#### **d. Chromatine**

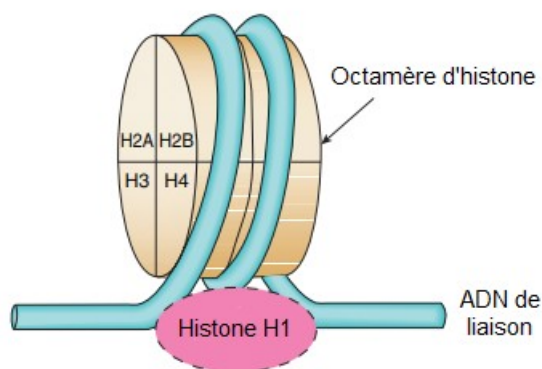
L'ADN génomique se trouve sous forme de chromatine, formée de plusieurs nucléosomes reliés entre eux.

Un nucléosome est un octamère de huit protéines histones, autour duquel s'enroule de l'ADN d'une longueur de 145 à 147 paires de bases. Il existe quatre protéines histones différentes, chacune présente au nombre de deux au sein de l'octamère : H2A, H2B, H3 et H4. Chaque protéine histone est composée d'un cœur en hélice  $\alpha$  et de deux extrémités N-terminales (ainsi que d'une extrémité C-terminale pour l'histone H2A), non structurées et de taille différente. Différents types d'interactions entre l'ADN et les histones permettent la stabilité des nucléosomes : il s'agit d'interactions de nature électrostatique, entre les acides aminés chargés positivement et le squelette de l'ADN chargé négativement, ou d'interactions entre les résidus protéiques et les bases nucléiques situés au niveau des sillons de la double hélice (Huertas et Cojocar, 2021).

Entre chaque nucléosome, sont retrouvés deux types d'éléments. L'ADN de liaison permet de les relier les uns aux autres. Sa taille varie selon le tissu concerné, l'organisme considéré et l'activité des gènes. En effet, d'après Correll *et al.* (2012), celui-ci peut mesurer de 8 paires de bases (chez *Schizosaccharomyces pombe*, appelée levure à fission) à 93 paires de bases (chez le sperme des échinodermes). Enfin, cette région est également constituée d'histones internucléosomales : il s'agit des histones H1 (figure 7).



**Figure 7 : Structure générale d'un nucléosome (d'après Rodwell *et al.*, 2018)**



## **E. Rôles**

L'ADN contient les informations nécessaires à la vie des cellules, de la division cellulaire impliquant la réplication de l'ADN permettant le transfert de l'information génétique aux cellules filles, à leur bon fonctionnement grâce à la transcription de l'ADN en acide ribonucléique (ARN) et sa traduction en divers protéines (Madkour, 2019). Chaque cellule de l'organisme a un rôle précis, et n'exprime que les gènes qui sont nécessaires à l'accomplissement de ce rôle (Abali *et al.*, 2021).

## **F. Réplication**

La réplication de l'ADN fait intervenir plusieurs étapes, au cours desquelles les deux brins d'ADN de la molécule mère sont séparés, servant ainsi chacun de modèle pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire. On parle donc de réplication semi-conservative : en effet, chaque molécule d'ADN fille sera composée d'un premier brin issu de la molécule mère et d'un second brin nouvellement formé. Les deux molécules d'ADN filles, identiques, sont réparties au cours du processus de mitose entre les cellules filles, permettant ainsi une conservation de l'information génétique (Rodwell *et al.*, 2018).

## **2. Présentation des ADN libres circulant**

Les cfDNA correspondent à des fragments d'ADN (principalement double brin) extra-cellulaires hautement dégradés, caractérisés par un faible poids moléculaire et une concentration faible (Ranucci, 2019). La majorité des cfDNA sont de petite taille, avec une longueur inférieure à 200 paires de bases, mais des fragments de taille plus importante, pouvant aller jusqu'à plusieurs kilo paires de bases, ont été décrits dans la littérature (Grabuschnig *et al.*, 2020).

Ces fragments sont libérés dans les liquides biologiques, circulants (sang, lymphe) ou non circulants (urine, selles, salive, semence, liquide amniotique, liquide cébrospinal, bile, lavage broncho-alvéolaire, expectorations, sécrétions mammaires, larmes). Plusieurs mécanismes sont responsables de leur libération, comme l'apoptose ou la nécrose des cellules de l'organisme (issues de la lignée hématopoïétique ou de d'autres lignées de cellules nucléées) (Martignano, 2019). La néctose, forme particulière de mort cellulaire programmée, a également été citée comme mécanisme de libération de cfDNA dans le sang, via la libération de complexes ADN-histones (Celec *et al.*, 2018), mais de nombreux autres processus de mort cellulaire ont aujourd'hui été

décrits comme partiellement responsables de cette libération. De plus, certaines cellules seraient à l'origine d'une libération spontanée d'ADN nouvellement synthétisé : cet élément est en faveur de l'existence d'un rôle propre aux cfDNA dans le fonctionnement cellulaire ou la communication intercellulaire (Ranucci, 2019).

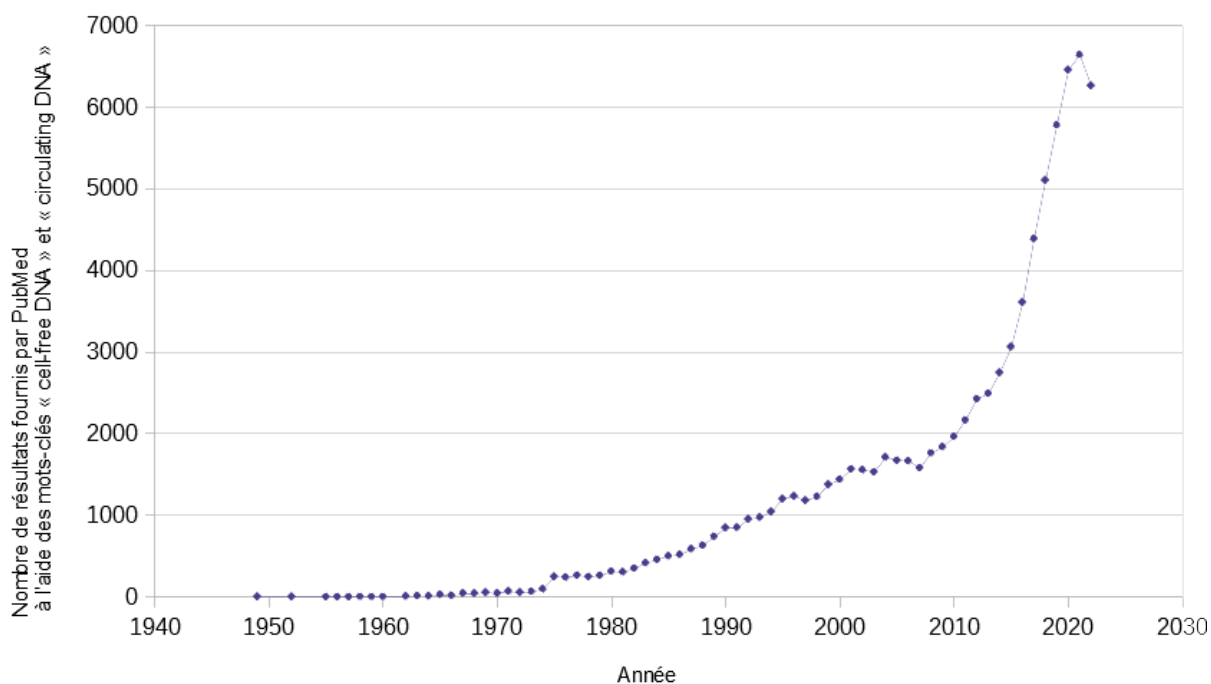
Chez les individus sujets à certains états physiologiques et pathologiques, la composition du pool des cfDNA est soumise à des variations : par exemple, des fragments d'ADN issus du fœtus chez la femme enceinte, et issus des tumeurs primaires ou secondaires chez les patients atteints d'un cancer sont retrouvés dans le sang périphérique de ces individus (Heitzer *et al.*, 2020).

### **A. Historique : découverte et premières études, un domaine d'intérêt croissant**

Les cfDNA ont été décrits pour la première fois par Mandel et Métais en 1948, dans le sérum d'individus sains et malades (Nagy, 2019). Une première corrélation entre le taux sérique en cfDNA et un processus pathologique a été établie en 1966 par Tan *et al.*, grâce à l'étude de complexes immuns de patients souffrant de lupus érythémateux disséminés (LED), une maladie auto-immune (Donaldson et Park, 2018). Puis, il aura fallu attendre 1977 avant que soit établi par Leon *et al.* (1977) le niveau de cfDNA chez des patients atteints d'un cancer, chez lesquels a été mesuré un taux en cfDNA total supérieur à celui des individus sains, variant de 0 à 5 000 ng/mL avec une moyenne à  $180 \pm 38$  ng/mL. En 1989, il a été mis en évidence que la présence d'ADN du même type que celui de la tumeur dans le plasma de patients souffrant d'un processus néoplasique pouvait s'expliquer par la libération d'une partie de cet ADN directement par les cellules tumorales (Stroun *et al.*, 1989). En 1997, des cfDNA d'origine fœtale (cffDNA pour *cell-free foetal DNA*) ont été retrouvés chez des femmes enceintes par quantification du gène *sry*, spécifique des individus de sexe masculin, mettant ainsi en évidence la contribution du fœtus au pool maternel de cfDNA. Cette découverte a permis le développement de méthodes non invasives de dépistage chez le fœtus par utilisation du sang de la mère (van Boeckel *et al.*, 2018).

Les cfDNA sont, en quelques dizaines d'années, devenus un sujet d'intérêt croissant, notamment dans le domaine de l'oncologie. La base de recherche PubMed permet de représenter le nombre de publications contenant les mots-clés « *cell free DNA* » et « *circulating DNA* » (figure 8). Depuis la fin des années 1970, le nombre de publications s'intéressant à ce sujet augmente de façon exponentielle. Il peut être intéressant de corréler cette évolution au développement de la réaction en chaîne par polymérase (PCR pour *polymerase chain reaction*), développée en 1983 par Kary Mullis (VanGuilder *et al.*, 2008). En médecine vétérinaire, les premières études concernant les cfDNA datent de la fin des années 2000, et, à ce jour le nombre de publications à ce sujet reste limité.

**Figure 8 : Représentation graphique du nombre de résultats fournis par PubMed avec les mots-clés « *cell-free DNA* » et « *circulating DNA* » par année, de 1949 à 2022**



## B. Concentrations

Chez l'homme, la concentration en cfDNA plasmatiques est décrite comme variant de 0 à 100 ng/mL chez l'individu sain (Kustanovich *et al.*, 2019; Yoon *et al.*, 2009). Cependant, un grand nombre de processus, physiologiques ou pathologiques, sont à l'origine d'une variation de cette concentration : gestation, exercice, néoplasie bénigne ou maligne, inflammation, processus infectieux, maladie métabolique et bien d'autres. Par exemple, dans un contexte néoplasique, une grande variabilité de la concentration en cfDNA est observée chez les patients humains : celle-ci peut être démultipliée et varier de 0 à parfois plus de 1 000 ng/mL (Frattini *et al.*, 2006; Kustanovich *et al.*, 2019). Cependant, selon la nature de la tumeur et son tissu d'origine, les concentrations atteintes diffèrent : cela pourrait s'expliquer par l'existence de barrières physiologiques (comme la barrière hémato-encéphalique) ou de capsules entourant les organes qui, de par leur présence, limitent la libération des cfDNA dans le sang et autres liquides biologiques (Kustanovich *et al.*, 2019). Certains facteurs individuels, tels que l'âge, le sexe, l'ethnicité (Hu *et al.*, 2021), le poids corporel (Celec *et al.*, 2018) mais aussi les habitudes de vie (consommation de légumes, tabagisme) (Kananen *et al.*, 2023) impactent également ces valeurs. À titre d'exemple, les individus en surcharge pondérale présentent une concentration plus élevée en cfDNA que les individus considérés minces, s'expliquant par une libération accrue de cfDNA suite à une accélération du *turnover* des adipocytes (Celec *et al.*, 2018).

Comme dit précédemment, les études concernant les cfDNA sont beaucoup moins nombreuses en médecine vétérinaire. Cependant, des observations similaires peuvent être établies. En effet, chez des chiens en bonne santé, la concentration plasmatique en cfDNA semble varier entre 200 et 800 ng/mL (Burnett *et al.*, 2016; Tagawa *et al.*, 2019) ; cependant, certaines études rapportent des valeurs de références très inférieures (Schaefer *et al.*, 2007). Chez les

chiens malades, de la même façon que chez les patients humains malades, la concentration augmente de façon significative (Burnett *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2021). Pour reprendre l'exemple d'un contexte néoplasique (toutes natures confondues), la concentration moyenne en cfDNA plasmatiques s'élève à  $1\,553,9 \pm 544,3$  ng/mL chez les chiens souffrant d'un processus tumoral (Kim *et al.*, 2021). Cependant, de manière encore une fois similaire à ce qui a été établi en médecine humaine, d'autres processus sont à l'origine d'une variation de la concentration en cfDNA chez les animaux, tels que des maladies infectieuses, systémiques, cardio-vasculaires, la survenue d'un traumatisme.

## **C. Le pool de cfDNA**

### ***a. Composition***

La composition du pool de cfDNA dans les liquides biologiques dépend de nombreux facteurs : la localisation du liquide biologique, la contribution des divers organes et types cellulaires, les mécanismes de libération dans l'organisme, la demi-vie et la stabilité des fragments dans leur environnement, les conditions de passage du milieu extra-cellulaire vers le liquide biologique (Bronkhorst *et al.*, 2021). Ainsi, le pool de cfDNA d'un liquide biologique est hétérogène, composé de fragments d'origines variées, aussi bien endogènes qu'exogènes. Chez tous les individus, une partie des cfDNA provient de l'ADN nucléaire mais également mitochondrial. Certains états physiologiques sont à l'origine d'un enrichissement de ce pool : lors de la gestation, une fraction des cfDNA est d'origine fœtale. Des variations du pool sont également identifiées dans un contexte pathologique, par exemple néoplasique. Enfin, une partie des cfDNA peut être exogène, en cas d'infection bactérienne ou virale, mais aussi lors de transplantation d'organe (Bronkhorst *et al.*, 2021). Le tableau 1 récapitule la nomenclature utilisée par la suite pour distinguer les cfDNA selon leur origine.

Cependant, ces différents fragments conservent des caractéristiques génétiques et épigénétiques (méthylation et modification des histones) spécifiques, propres à leur source d'origine, et sont porteurs d'éléments structuraux uniques (complexes protéiques, associations à des vésicules extra-cellulaires, taille, motifs terminaux, densité nucléosomique). Malgré cette complexité, ces caractéristiques peuvent se recouper entre elles, rendant parfois difficile l'identification de l'origine des différents cfDNA retrouvés dans les liquides biologiques.

**Tableau 1 : Dénomination des cfDNA selon leur origine**

<b>Origine</b>	<b>Dénomination</b>	<b>Abréviation</b>
Nucléaire	<i>cell-free nuclear DNA</i>	cf-nDNA
Mitochondriale	<i>cell-free mitochondrial DNA</i>	cf-mtDNA
Tumorale	<i>circulating tumoral DNA</i>	ctDNA
Fœtale	<i>cell-free foetal DNA</i>	cffDNA
Donneur (greffe)	<i>donor derived cell-free DNA</i>	dd-cfDNA
Microbienne	<i>cell-free microbial DNA</i>	cf-micDNA
Parasitaire	<i>cell-free parasite DNA</i>	cf-pDNA
Virale	<i>cell-free viral DNA</i>	cf-virDNA

***b. Processus physiopathologiques à l'origine d'une variation du pool d'ADN libres circulant***

◦ *Exercice*

L'activité physique peut être à l'origine d'une augmentation des taux circulants en cfDNA. Cela s'explique par plusieurs mécanismes : dommages (métaboliques et mécaniques) infligés aux cellules musculaires, stress oxydatif, réponse inflammatoire, apoptose (des cellules musculaires et des leucocytes). Il est possible que, selon l'intensité et le type d'exercice, les mécanismes de libération à l'origine de cette augmentation diffèrent (Aucamp *et al.*, 2018).

◦ *Gestation*

En cas de gestation, la variation des taux circulants en cfDNA peut être expliquée par deux mécanismes : il survient à la fois une augmentation des taux de cfDNA d'origine maternelle, mais également une libération de cfDNA d'origine fœtale dans les liquides biologiques de la mère (liquide amniotique, plasma, sérum, urines, LCS, liquide péritonéal). Plusieurs processus sont suspectés comme étant à l'origine de la libération de ces cffDNA : prolifération des cellules fœtales (de façon similaire à celle des cellules cancéreuses), destruction de cellules fœtales (circulant dans les liquides de la mère ou non) par réaction immunitaire, diffusion des cffDNA dans les liquides maternels depuis le liquide amniotique sous l'action d'un gradient de concentration, apoptose des cellules placentaires et fœtales (Aucamp *et al.*, 2018).

- *Lésions tissulaires*

La concentration en cfDNA dans le plasma augmente chez les patients souffrant d'affections associées à des lésions tissulaires : une augmentation de 50 % a été constatée en cas d'infarctus du myocarde, corrélée aux autres marqueurs de lésions myocardiques (Celec *et al.*, 2018). Cette élévation est également observée en cas de traumatisme ou de chirurgie, et l'intensité de cette augmentation est corrélée à leur sévérité et aux complications post-opératoires dans ce dernier cas (Aucamp *et al.*, 2018). Dans ce contexte, il est estimé que la nécrose est à l'origine de cette libération accrue.

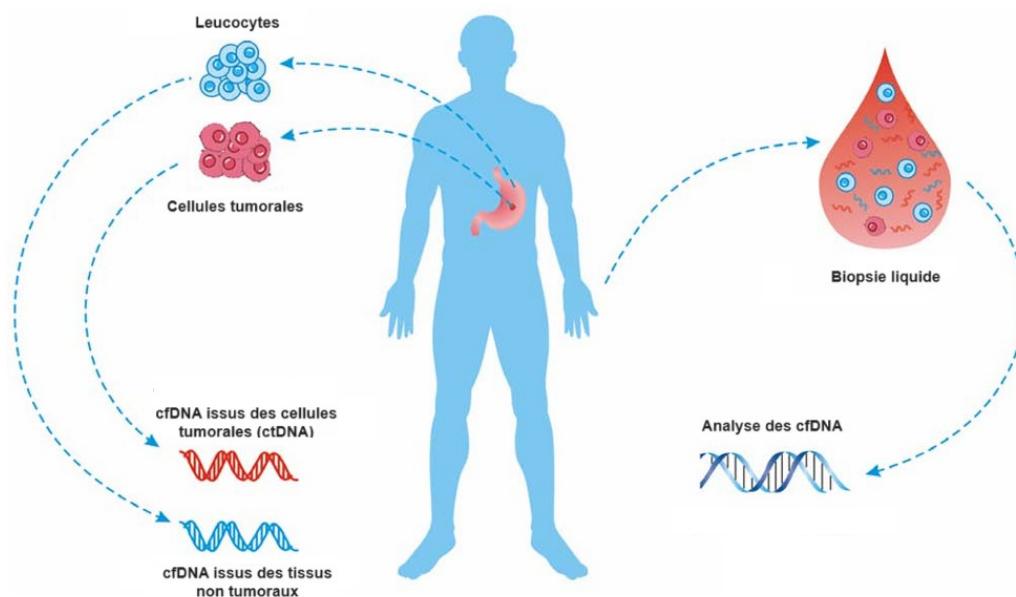
- *Inflammation*

L'inflammation, qu'elle soit stérile (par la libération de médiateurs pro-inflammatoires, la mise en place des mécanismes homéostatiques en cas de saignements secondaires à un trauma, la mort cellulaire ou encore suite à une stimulation chronique par l'obésité) ou non, est à l'origine d'une augmentation de la concentration en cfDNA. En cas d'inflammation stérile, cette augmentation est suspectée être liée à la nécrose, le recrutement de phagocytes, le nettoyage des débris cellulaires ou encore le *turnover* cellulaire (des adipocytes en cas d'obésité, par exemple). En cas d'infection, certaines études se contredisent quant à l'implication de la nécrose ; il est également suspecté que les cfDNA peuvent être libérés secondairement par nécrose ou apoptose tissulaire, ou encore par les cellules endothéliales directement (Aucamp *et al.*, 2018).

- *Processus tumoral*

Comme évoqué précédemment, les individus atteints d'une néoplasie présente une augmentation de leur concentration en cfDNA dans leurs liquides biologiques (Celec *et al.*, 2018). Cela peut s'expliquer par une diminution de l'activité des enzymes désoxyribonucléases ou par une libération accrue en cfDNA directement par les cellules tumorales. Dans ce dernier cas, on parle de ctDNA (figure 9).

**Figure 9 : Origine des ctDNA et illustration du pool de cfDNA : exemple d'un patient atteint d'un cancer de l'estomac (d'après de Huang *et al.*, 2021)**



- *Greffe d'organe*

La greffe d'organe est à l'origine d'une libération de cfDNA provenant des cellules (notamment hématopoïétiques) du donneur : on peut donc qualifier ces cfDNA d'exogènes. De la même façon qu'en cas de lésion tissulaire, il existe une corrélation entre l'importance de la procédure chirurgicale et l'intensité de la variation de la concentration en cfDNA, suggérant que la nécrose en est responsable (Aucamp *et al.*, 2018). Par exemple, la fraction en dd-cfDNA chez le receveur d'une greffe de poumon est significativement plus élevée en cas de double transplantation que lors d'une greffe simple (Pedini *et al.*, 2023).

## D. Libération et élimination des ADN libres circulant

### a. Sources d'ADN libres circulant

Comme expliqué précédemment, plusieurs mécanismes contribuent à la constitution du pool de cfDNA, dans des proportions variables.

- *Apoptose*

L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée, correspond à une mort cellulaire physiologique qui fait intervenir un processus actif contrôlé par un programme génétique permettant d'éliminer des cellules endommagées (infection, senescence, perte d'intégrité de l'ADN) ou indésirables (Elmore, 2007). L'apoptose a un rôle opposé mais toutefois complémentaire de la mitose, et permet de réguler les populations cellulaires des organismes animaux (Kerr *et al.*, 1972). Elle intervient donc dans le développement des organismes pluricellulaires, l'homéostasie cellulaire (chez l'adulte) et la défense contre les agents infectieux. L'apoptose est déclenchée par des stimuli physiologiques ou non : stimulation de « récepteurs de mort », déficit en facteurs de croissance, déficit en hormones, déficit en cytokines, agents génotoxiques (rayons  $\gamma$  et

ultraviolets), chocs thermiques et osmotiques, hypoxie, radicaux libres, molécules cytotoxiques (dexaméthasone, staurosporine), infections (bactéries, virus). Toutes les cellules ne répondent pas de la même façon à ces stimuli : pour un stimulus de même intensité, certaines cellules entrent en apoptose, tandis que d'autres ne sont pas affectées (Elmore, 2007).

Il existe deux voies apoptotiques, dites intrinsèque et extrinsèque, qui aboutissent à l'activation de protéines de la famille des caspases (Elmore, 2007). Ces caspases jouent un rôle clé dans le mécanisme de l'apoptose, notamment dans la fragmentation de l'ADN : la forme active des caspases-3 libère une désoxyribonucléase spécifique de l'ADN, appelée *caspase-activated DNase*, qui permet de cliver des portions d'ADN double brin. Cette fragmentation de l'ADN est périodique et permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille dont la valeur modale est d'environ 167 paires de bases : cette longueur correspond aux 147 paires de bases du brin d'ADN d'un nucléosome auxquelles sont ajoutées les vingt paires de bases de l'ADN de liaison internucléosomique (Heitzer *et al.*, 2020).

- *Nécrose*

La nécrose est un type de mort cellulaire souvent décrite comme accidentelle et donc opposée à l'apoptose. Survenant suite à une perte des capacités de production d'énergie et de régénération cellulaires (Aucamp *et al.*, 2018), elle se caractérise par un gonflement rapide de la cellule et de ses organites et par une perte de l'intégrité membranaire, à l'origine d'une libération dans le milieu extra-cellulaire d'éléments d'origine cellulaire de nature inflammatoire (Fink et Cookson, 2005; Hetz, 2008). Il existe de nombreux événements pathologiques déclencheurs de la nécrose : ischémie et hypoxie cellulaires, déséquilibres ioniques, altérations mitochondriales, hypercalcémie, libération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote par ischémie reperfusion ou médiateurs de l'inflammation (Szabó, 2005). Toutefois, elle survient également lors du développement de l'organisme et plus tard au cours de la vie adulte, afin d'assurer l'homéostasie tissulaire (Golstein et Kroemer, 2007). Quant au mécanisme précis de la nécrose, il est difficile d'établir avec certitude quels événements moléculaires sont mis en jeu et dans quel ordre chronologique ils surviennent.

La nécrose, contrairement à l'apoptose, est à l'origine de fragments d'ADN de taille plus conséquente, pouvant atteindre plus 10 000 paires de bases (Hu *et al.*, 2021). Cette différence de taille serait liée à la différence de temps nécessaire pour éliminer les cellules nécrotiques ou apoptotiques, beaucoup plus long dans le cas de la nécrose (Aucamp *et al.*, 2018).

- *Nétose*

La nétose correspond à une forme de mort cellulaire soumise à régulation (contrairement à la nécrose) et aboutissant à la formation de pièges extra-cellulaires des neutrophiles (NETs, pour *neutrophil extracellular traps*) en réponse à un processus inflammatoire, infectieux ou non, pouvant être déclenchée par des stimuli très variés. La nétose joue donc un rôle important dans les mécanismes de défense de l'organisme (Jackson Chornenki *et al.*, 2019) car elle permet aux neutrophiles de renforcer leurs propriétés anti-microbiennes (Li et Tablin, 2018).

Les constituants des NETs sont multiples : ADN nucléaire décondensé, histones, protéines, peptides. L'ADN est enroulé autour des histones, et est lui-même recouvert de protéines variées (Barrientos, 2013). Ainsi, les cfDNA représentent un élément constitutif majeur de ces NETs.

La nétose fait intervenir de nombreux mécanismes et acteurs, dont le rôle n'est pas toujours connu (Thiam *et al.*, 2020). Par comparaison aux autres mécanismes de mort cellulaire, la



décondensation de la chromatine est une caractéristique déterminante de la nétose (Barrientos, 2013). Le mécanisme suspecté de décondensation fait intervenir des modifications post-translacionnelles des histones, notamment par la protéine-arginine déiminase de type 4 à l'origine d'une citrullination de l'arginine en citrulline, mais également la méthylation et l'acétylation. Certaines protéines, en intervenant sur la protéolyse des histones, jouent également un rôle majeur dans ce processus de décondensation.

Lors de la nétose, la libération de la chromatine dans le cytosol nécessite la rupture de la membrane nucléaire les séparant, faisant intervenir plusieurs mécanismes (comme des modifications par phosphorylation ou dégradation du maillage de lamines) (Thiam *et al.*, 2020). L'ADN serait ensuite libéré de la membrane nucléaire soit par formation de pores y créant ainsi des brèches, soit par vésiculation de la membrane nucléaire. Enfin, la chromatine décondensée doit traverser le cytosol et la membrane plasmique avant de se retrouver dans le milieu extra-cellulaire (Thiam *et al.*, 2020). Cela fait d'abord intervenir le remodelage des différents organites cellulaires et du cytosquelette de la membrane plasmique, permettant à l'ADN d'atteindre enfin la membrane plasmique. Même si les mécanismes aboutissant à sa rupture finale restent inconnus à ce jour, celle-ci est supposée être médiée par l'augmentation progressive de sa perméabilité au cours de la nétose et par le gonflement de la chromatine. Finalement, des cfDNA se retrouvent libérés dans l'espace extra-cellulaire : cet ADN est majoritairement d'origine nucléaire, mais les NETs contiennent également de l'ADN mitochondrial (Hashimoto *et al.*, 2021).

- *Autres mécanismes de mort cellulaire*

D'autres mécanismes de mort cellulaire, plus rarement évoqués dans la littérature comme sources de cfDNA, seraient impliqués dans leur libération : nécroptose, pyroptose, ferroptose, catastrophe mitotique (Ungerer *et al.*, 2020).

La nécroptose correspond à une forme programmée de mort cellulaire, qui présente des similarités avec la nécrose, déclenchée par de nombreux stimuli physiologiques ou pathologiques. Le mécanisme de la nécroptose, initié en cas de cas d'inhibition pharmacologique ou génétique de la voie des caspases (Galluzzi *et al.*, 2014), fait intervenir plusieurs récepteurs : récepteurs de mort (tel que le récepteur 1 au facteur de nécrose tumorale (TNF)), récepteurs aux interférons, récepteurs *Toll-Like* (Hashimoto *et al.*, 2021). L'activation de ces récepteurs provoque des dommages membranaires, aboutissant à la libération de cfDNA.

La pyroptose est un type de mort cellulaire programmée dépendant de l'action de la caspase-1, initiée suite à des stimuli dommageables pour la cellule (notamment de nature pathogène) (Hashimoto *et al.*, 2021). Elle se caractérise par une rupture de la membrane plasmique et la libération de substances pro-inflammatoires, à l'origine d'une activation de cytokines et d'interleukines, aboutissant ainsi à une mort cellulaire rapide (Aucamp *et al.*, 2018). La mitochondrie reste initialement intacte, puis est éliminée par autophagie, ce qui serait à l'origine d'une libération d'ADN mitochondrial dans l'espace extra-cellulaire.

La ferroptose est un autre type de mort cellulaire programmée induite secondairement à l'accumulation de fer et d'espèces réactives de l'oxygène. Au cours de la ferroptose, des modifications morphologiques de la mitochondrie et une altération de la fonction de la membrane plasmique par peroxydation lipidique sont observées, aboutissant à la libération excessive de produits de l'oxydation lipidique, dont de l'ADN (Hashimoto *et al.*, 2021).

La catastrophe mitotique survient suite à une mitose au déroulement anormal aboutissant à la formation de cellules non viables possédant plusieurs micronoyaux, notamment en réponse à des traitements anti-cancéreux (radiothérapie, chimiothérapie) : ces micronoyaux pourraient donc servir de source de cfDNA, secondairement à leur dégradation (Aucamp *et al.*, 2018).

- *Sécrétion active*

Il a été mis en évidence, via l'étude de la culture *in vitro* de cellules cancéreuses, que la libération de cfDNA est possible même en l'absence de processus de mort cellulaire, impliquant qu'il existe des mécanismes de sécrétion par les cellules vivantes (Hu *et al.*, 2021). À l'heure actuelle, ces mécanismes ne sont pas tous identifiés ou compris, mais plusieurs voies de sécrétion actives seraient impliquées (Ungerer *et al.*, 2020).

Les cellules vivantes sont capables de libérer spontanément de l'ADN nouvellement synthétisé au sein de leur noyau, qui sera ensuite complexé à des glycolipoprotéines et associé à de l'ARN : on parle de virtosome (Aucamp *et al.*, 2018). L'ADN contenu dans les virtosomes, mesurant 450 à 700 paires de bases, n'en représenterait toutefois qu'une faible portion (moins de 4 %) (Grabuschnig *et al.*, 2020). La sécrétion active d'ADN est cependant régulée par plusieurs facteurs : quantité d'ADN libre lié aux protéines d'attache localisées à la surface des cellules et/ou aux phospholipides membranaires, concentration extra-cellulaire en virtosomes, activation ou inhibition des mécanismes de sécrétion de protéoglycanes et protéolipides (Aucamp *et al.*, 2018).

Plusieurs mécanismes de libération faisant intervenir des vésicules extra-cellulaires, produites par les tissus sains mais également les cellules tumorales et ensuite libérées dans les liquides biologiques, ont été proposés (Amintas *et al.*, 2021). L'un d'eux fait intervenir les exosomes : ils correspondent à des vésicules extra-cellulaires de petite taille (30 à 150 nm de diamètre) sécrétées par les cellules de l'organisme et jouant un rôle dans la communication intercellulaire. Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'ADN (génomique, mitochondrial) au sein de ces exosomes (Aucamp *et al.*, 2018), mais la proportion exacte de cfDNA qui y est contenue reste à confirmer ; une étude récente aurait toutefois mis en évidence que 93 % des cfDNA plasmatiques seraient localisés dans les exosomes (Hu *et al.*, 2021). En termes de taille de fragments, il a été rapporté que celle-ci varie de 150 à 6 000 paires de bases (Ungerer *et al.*, 2020). Ces exosomes peuvent contenir des ctDNA ; cependant, il a été rapporté que les oncosomes, des vésicules extra-cellulaires de grande taille impliquées dans le transfert intercellulaire d'information oncogénique (Aucamp *et al.*, 2018) et libérées par la fusion de la membrane plasmique et d'un corps multivésiculaire, en contiennent une quantité plus importante (Abe *et al.*, 2020). Une autre des voies de sécrétion active mettrait en jeu les amphisomes, organites hybrides résultant de la fusion d'un autophagosome et d'un corps multivésiculaire. Le mécanisme proposé, toutefois non confirmé, met en jeu la fusion de ces amphisomes à la membrane plasmique, aboutissant à la libération d'ADN double brin (Amintas *et al.*, 2021). Malgré la diversité des modèles proposés, l'utilisation clinique des cfDNA contenus dans les vésicules extra-cellulaires n'est pas encore validée (Ghanam *et al.*, 2022) ; cependant, leur étude pourrait s'avérer intéressante, notamment dans le domaine de l'oncologie.

Il est également à noter qu'une partie des cfDNA contenus dans les vésicules extra-cellulaires pourrait être secondaire à l'adhésion à la surface de ces vésicules de cfDNA libérés au cours d'un mécanisme de mort cellulaire, et donc ne pas résulter de la sécrétion active par des cellules vivantes (Ghanam *et al.*, 2022). Dans tous les cas, le fait que les cfDNA soient ainsi

enclavés dans une bicouche lipidique les protègent de la dégradation et les rend plus stables (Abe *et al.*, 2020).

- **Énucléation des érythroblastes**

L'énucléation correspond au mécanisme par lequel l'érythroblaste orthochromatique, issu des multiples mitoses subies par le pro-érythroblaste, se sépare en un réticulocyte (qui contient la majorité du cytoplasme et se dirige vers le flux sanguin, où il subira une étape de maturation) et un pyrénocyte (qui contient le noyau condensé, recouvert d'une fine couche de cytoplasme) (Migliaccio, 2010). Certains suspectent que ce processus d'énucléation érythroblastique soit à l'origine d'une libération de cfDNA ; toutefois, les preuves expérimentales restent peu nombreuses, et reposent essentiellement sur le fait que les cfDNA seraient majoritairement issus des cellules hématopoïétiques (Aucamp *et al.*, 2018).

### **b. Élimination de l'organisme**

Le niveau d'élimination des cfDNA repose sur une balance entre les mécanismes de libération et d'élimination.

Les mécanismes d'élimination peuvent avoir lieu dans le tissu d'origine, dans les liquides biologiques (sang et autres) ou bien encore dans d'autres organes (foie, rate, reins, nœuds lymphatiques). Dans le sang, les cfDNA ont plusieurs devenir possibles : ils peuvent être clivés par les nucléases qui y sont présentes mais également par le facteur H et une protéase à sérine appelée FSAP (Kustanovich *et al.*, 2019), ou bien se lier aux protéines de liaison présentes à la surface des cellules (circulantes ou en contact avec le sang) (Ungerer *et al.*, 2020). Le foie, via les cellules de Kuppfer, est le principal responsable de l'élimination de l'ADN : en dix minutes, la clairance s'élève de 71,0 % à 84,7 % (Kustanovich *et al.*, 2019). Les macrophages spléniques, comme les cellules de Kuppfer, piègent puis éliminent les cfDNA et les nucléosomes. Le niveau de clairance rénale est influencé par certains facteurs, dont la taille des cfDNA : en effet une étude, sans tout à fait reproduire les conditions *in vivo* par injection d'ADN simple brin libre chez des souris, montre que seuls les fragments de 160 à 200 paires de bases sont encore détectés dans les glomérules rénaux après 24 heures, contrairement aux fragments de 2 000 à 6 000 paires de bases (Celec *et al.*, 2018). Néanmoins, le rein ne semble pas être un acteur principal de l'élimination des cfDNA, car des animaux atteints de maladie rénale chronique ne présentent pas d'augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA.

L'élimination des cellules apoptotiques et des cfDNA est rapide chez l'individu sain, ce qui explique leur faible niveau en cfDNA sanguin. À l'inverse, une accumulation des cfDNA est observée chez l'individu malade (processus malin, inflammation chronique, mort cellulaire excessive), secondaire à un défaut de clairance. Les causes exactes restent inconnues, mais un dépassement des capacités du système d'élimination, en plus d'une libération excessive de cfDNA par les cellules de l'organisme, pourraient expliquer cette accumulation (Kustanovich *et al.*, 2019).

La demi-vie exacte des cfDNA reste incertaine et la valeur estimée varie selon les études. La demi-vie des cfDNA chez l'homme dans le sang total varie de 4 minutes à environ 2 heures (Kustanovich *et al.*, 2019). Chez le chien, la demi-vie dans le plasma est estimée à 5,64 heures (Wilson *et al.*, 2018). Elle est donc relativement courte, mais cela fait des cfDNA un outil dynamique dans le suivi des maladies et des traitements mis en place (Stewart *et al.*, 2018).

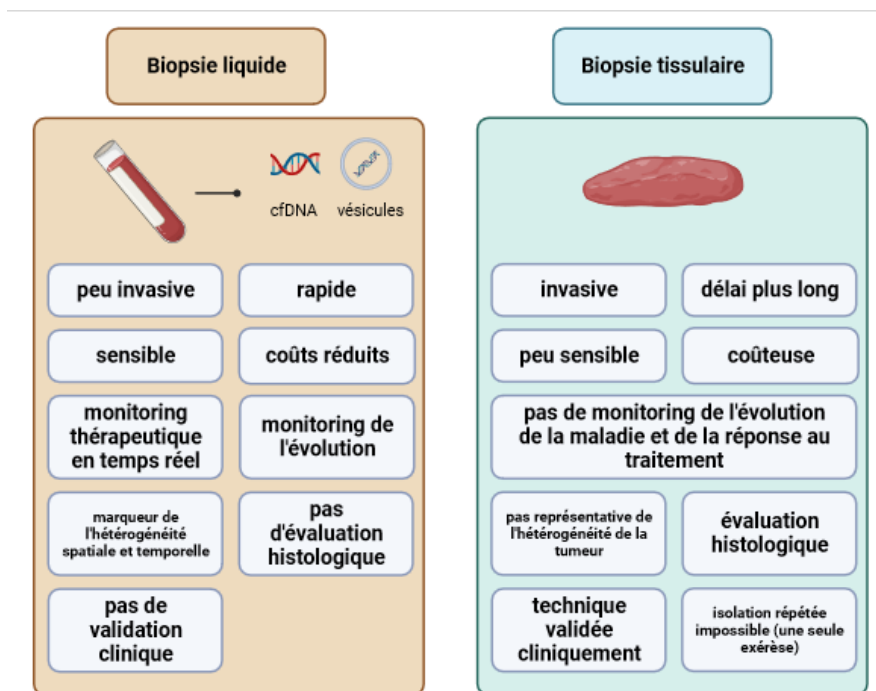
## E. Intérêts en médecine humaine et vétérinaire

### a. Avantages des biopsies liquides

Les biopsies liquides, définies comme l'analyse des composants des liquides biologiques, permettent d'obtenir des informations similaires à celles des biopsies tissulaires. Elles sont de plus en plus utilisées dans divers domaines de la médecine, du dépistage pré-natal non invasif au monitoring d'une greffe après transplantation, en passant par l'oncologie. Il a été estimé que l'industrie des biopsies liquides pourrait générer plus de cinq milliards de dollars américains en 2023 (Liu et Wang, 2022).

Les biopsies liquides présentent plusieurs avantages par rapport aux biopsies tissulaires, usuellement utilisées pour diagnostiquer un processus néoplasique par exemple (figure 10). Celles-ci sont moins invasives et pallient à la difficulté d'accès aux tumeurs et au manque d'hétérogénéité des prélèvements de tissus, augmentant ainsi la sensibilité diagnostique des tests réalisés (Kustanovich *et al.*, 2019). Elles sont également plus rapides et moins onéreuses que leur équivalent tissulaire (Tagawa *et al.*, 2019) et permettent un monitoring en temps réel de la réponse thérapeutique (Lone *et al.*, 2022).

**Figure 10 : Comparaison des biopsies tissulaires et des biopsies liquides (d'après Lone *et al.*, 2022)**



Les cfDNA sont un composant d'importance majeure de ces biopsies liquides : par exemple, en cas de tumeur primaire ou secondaire (métastases), des cfDNA dérivés de la tumeur dénommés ctDNA, sont libérés dans la circulation. Ceux-ci peuvent être utilisés pour décrire des tumeurs primaires au niveau moléculaire et ainsi représenter un pilier pour le développement de la médecine de précision. Face à l'augmentation du nombre de décès causés par les processus cancéreux, il est d'une importance majeure d'avoir recours aux biopsies liquides pour aider à la détection précoce de la maladie et la prise de décision thérapeutique, afin de réduire l'impact des cancers sur la santé humaine (Heitzer *et al.*, 2020).

### ***b. Informations apportées par les cfDNA***

Les cfDNA sont des molécules stables, qui conservent les caractéristiques génétiques et épigénétiques des cellules desquelles elles sont issues (Ungerer *et al.*, 2020). Cela en fait des biomarqueurs intéressants à l'étude de nombreuses maladies.

Les cfDNA ont de multiples intérêts, allant de l'établissement du diagnostic d'une affection à l'estimation du pronostic associé. Par exemple, en cas de tumeur, il existe une corrélation positive entre son avancée et la concentration plasmatique en cfDNA, et plus celle-ci est importante, plus l'issue est défavorable pour le patient (Stewart *et al.*, 2018). Les cfDNA sont également utiles au monitoring de certaines maladies. En effet, en cas de néoplasie, la concentration en cfDNA et plus précisément en ctDNA, est corrélée à l'évolution clinique : le niveau en ctDNA chute suite à la mise en place d'un traitement anti-cancéreux efficace, augmente en cas de récurrence (Underhill *et al.*, 2016), même si cette utilisation présente des limites dans sa précision. Les cfDNA peuvent être utilisés pour détecter des mutations spécifiques des maladies, et ainsi établir une stratification du risque et permettre au clinicien de guider sa décision thérapeutique (Stewart *et al.*, 2018; Vymetalkova *et al.*, 2018). Enfin, les cfDNA peuvent être utilisés pour rechercher l'acquisition de mécanismes de résistance et pour détecter une maladie résiduelle minimale. Même si l'oncologie est un des principaux domaines d'application des cfDNA, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, d'autres champs médicaux font l'objet de recherches à ce sujet, plus ou moins nombreuses, afin d'améliorer les connaissances médicales en termes de diagnostic, pronostic et prise de décision thérapeutique.

## **3. Obtention des ADN libres circulant**

### **A. Nature des prélèvements**

Les cfDNA sont usuellement isolés à partir de prélèvements sanguins. D'autres liquides biologiques peuvent néanmoins être utilisés : urines, liquide cérébro-spinal, épanchement pleural, expectorations (Heitzer *et al.*, 2020; Martignano, 2019).

#### ***a. Sang : plasma ou sérum***

L'isolement des cfDNA à partir d'un prélèvement de sang peut se faire aussi bien sur sérum que sur plasma. La concentration en cfDNA dans le sérum est trois à vingt-quatre fois supérieure à celle du plasma (Jung *et al.*, 2003). Cela peut s'expliquer par une prédisposition des échantillons de sérum à une contamination par de l'ADN génomique (gDNA) non spécifique, en lien avec l'étape de coagulation précédant la centrifugation lors du stockage du prélèvement, causant ainsi une dilution des cfDNA d'intérêt (Martignano, 2019). De plus, en cas de néoplasie, le plasma a l'avantage de présenter environ neuf fois plus de mutations parmi les cfDNA ainsi que trois fois plus de fractions d'allèles tumoraux que ce qui est retrouvé dans le sérum. Enfin, le sérum est sujet à une grande variabilité inter-individuelle, ce qui rend peu voire non fiables les mesures quantitatives de cfDNA réalisées sur ce type d'échantillon sanguin. Il semble donc plus pertinent d'avoir recours à des échantillons de plasma pour le dosage des cfDNA et notamment pour la détection des ctDNA, car il fournit des résultats plus sensibles et plus spécifiques (Ungerer *et al.*, 2020).

### **b. Autres liquides biologiques**

Chez un individu sain, après filtration glomérulaire du sang par les reins, les cfDNA contenus dans le sang passent naturellement dans les urines : on parle d'ADN transrénal. La concentration en ucfDNA (*urinary cell-free DNA*) peut être augmentée chez un individu souffrant d'une maladie du tractus urinaire (Stewart *et al.*, 2018), par libération suite à la nécrose ou à l'apoptose des cellules du tractus urinaire (Martignano, 2019). Les urines et les ucfDNA qu'elles contiennent ont donc un intérêt en médecine, et notamment en oncologie, que ce soit dans le diagnostic, le monitoring d'une potentielle rechute ou le pronostic. Par exemple, chez des patients atteints d'une tumeur de la vessie infiltrant le muscle, l'utilisation des ucfDNA avant et après chimiothérapie a vocation d'aider à établir un pronostic (Stewart *et al.*, 2018). L'utilité de l'ADN contenu dans les urines ne se limite pas aux affections du tractus urinaire : une étude s'étant intéressée à ce type de biomarqueur a permis de mettre en évidence son utilité dans la prédiction d'une rechute chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire, après un premier traitement (Hann *et al.*, 2017). Le recours à l'utilisation des urines présente plusieurs avantages par rapport aux autres liquides biologiques : la technique de prélèvement peut être totalement non invasive (en cas de prélèvement par miction spontanée) et il est possible de récolter de grands volumes d'urines, ce qui se révèle utile notamment en pédiatrie, où il peut être difficile d'obtenir des échantillons d'une autre nature (plasma, tissu) en quantité importante (Stewart *et al.*, 2018). Cependant, il existe différents facteurs de variations du niveau de biomarqueurs contenus dans les urines, liés au mécanisme d'excrétion de ce liquide et pouvant impacter leur détection : niveau d'hydratation du patient, fonctionnement des reins.

Le liquide cérébro-spinal (LCS), dans lequel sont immergés le cerveau et la moelle épinière, est isolé du reste de la circulation systémique par l'existence de la barrière hématoencéphalique. L'existence de cette barrière a plusieurs conséquences : le LCS ne contient à l'état physiologique qu'un faible niveau de cfDNA. Cependant, en cas d'état pathologique du système nerveux central et notamment de tumeur, la concentration en ctDNA plasmatique est plus faible en comparaison à ce qui est observé en cas de tumeurs solides d'une autre nature, d'où l'intérêt de travailler sur un échantillon de LCS, alors enrichi en cfDNA (Stewart *et al.*, 2018). Le LCS est également moins sujet à la contamination par les gDNA car moins riche en cellules, ce qui permet de s'affranchir d'une seconde centrifugation lors de la préparation des échantillons (Martignano, 2019), à l'inverse de ce qui est conseillé lorsque les analyses sont faites sur échantillons sanguins (voir partie I.3.c.a). L'étude du LCS semble donc pertinente, en tant qu'alternative au plasma usuellement utilisé, dans le cadre de lésions primaires ou secondaires du système nerveux central (Seoane *et al.*, 2019).










Le liquide d'épanchement pleural est issu d'un mécanisme de transsudation impliquant la plèvre ou le parenchyme pulmonaire. Sa production est fortement corrélée à la circulation lymphatique : en effet, en présence d'une tumeur, le drainage de la lymphe dans la région touchée est aberrant, ce qui contribue à la production de cet épanchement, tout en influençant sa composition (Mokánszki *et al.*, 2021). Le liquide d'épanchement est enrichi en cfDNA, ce qui fait de lui un échantillon adapté aux tests moléculaires, notamment chez les patients atteints de processus tumoraux malins dont l'exérèse est impossible (notamment en cas de processus métastatique) (Patel *et al.*, 2021). Cependant, de nombreux facteurs pré-analytiques à l'utilisation du liquide d'épanchement pleural en tant que source de cfDNA restent à être identifiés et étudiés.

Une étude récente s'est intéressée à l'étude des cfDNA contenus dans la bile et le plasma de patients atteints de cancer des voies biliaires (carcinome de la vésicule biliaire et cholangiocarcinome), en supposant que la bile, directement en contact avec le tissu tumoral, pourrait refléter plus fidèlement les altérations génétiques exprimées par les cellules tumorales (Li *et al.*, 2022). Une quantité plus importante de cfDNA a été extraite dans le surnageant de bile que dans le plasma. De plus, d'avantage de mutations ont été identifiées dans la bile et les altérations génomiques biliaires présentaient une concordance significativement supérieure avec celles du tissu tumoral que celles identifiées dans le plasma (respectivement 90,0 % de concordance pour le surnageant biliaire et 35,0 % pour le plasma pour les dix gènes fréquemment mutés en cas de cancer des voies biliaires). Enfin, des potentielles cibles thérapeutiques ont pu être identifiées dans les échantillons biliaires. Même si un plus grand nombre de mutations sont détectées dans le tissu tumoral que dans les échantillons de bile, celle-ci reste un substitut à considérer pour la réalisation de tests génétiques chez les individus souffrant d'un cancer des voies biliaires.

### **B. Matériel et méthodes de récolte, facteurs pré-analytiques influençant la qualité des échantillons**

Plusieurs facteurs pré-analytiques peuvent impacter le dosage des cfDNA dans un échantillon donné, comme illustré par la figure 11 : nature du prélèvement, nature du tube de prélèvement, type de tube utilisé, conditions de transport et de traitement du prélèvement sanguin, conditions de stockage du plasma, méthode d'extraction de l'ADN et modifications des protocoles, contrôle qualité. Chacun de ces facteurs peut intervenir à chaque étape du procédé d'isolement des cfDNA, ce qui a de nombreuses conséquences : subjectivité de l'interprétation de la quantité et de la qualité des cfDNA dans un échantillon augmentée, reproductibilité des analyses et des données compromise, comparaison des résultats entre individus et entre études limitée, interprétation difficile des résultats. Il n'existe cependant, à l'heure actuelle, aucun consensus sur les conditions à respecter permettant d'optimiser la qualité des cfDNA (en termes de concentration, pureté et fragmentation), avant traitement de l'échantillon sanguin total (Ungerer *et al.*, 2020).

Figure 11 : Variables pré-analytiques influençant les résultats des mesures de cfDNA (d'après Ungerer et al., 2020)

	<b>Nature de l'échantillon</b>	<b>Sang</b> : sérum, plasma <b>Autre</b> : urine, fecès, liquide d'épanchement pleural, liquide cérébro-spinal, salive, liquide amniotique
	<b>Technique de prélèvement</b>	<b>Aiguille</b> : taille, type (aiguille épicroténienne) <b>Autres</b> : ponctions multiples, garrot, tube à vide
	<b>Tube de prélèvement</b>	<b>Marque</b> <b>Taille</b> : volume de conservateur, volume d'échantillon prélevé
	<b>Conditions de transport et de manutention</b>	<b>Transport</b> : stress mécanique <b>Température</b> : température ambiante, réfrigération, congélation, chaleur extrême <b>Durée</b> : heures, jours, mois, années
	<b>Traitement du sang</b>	<b>Nombre de cycles de centrifugation</b> : simple, double <b>Vitesse de centrifugation</b> : faible à chaque cycle, faible au premier cycle, faible au second cycle, haute au second cycle
	<b>Conditions de stockage</b>	<b>Température de stockage</b> : réfrigération, congélation <b>Durée de stockage</b> : jours, semaines, long terme <b>Température de décongélation</b> <b>Nombre de cycle de congélation/décongélation</b>
	<b>Méthode d'extraction de l'ADN</b>	<b>Technique utilisée</b> <b>Automatisation</b>
	<b>Modifications du protocole d'extraction</b>	<b>Nature du tampon</b> <b>Étape de digestion protéique</b> <b>Nombre d'étapes de lavage</b> <b>Volume d'éluat</b>
	<b>Contrôle qualité</b>	<b>Contrôles qualité et quantité</b> <b>Programmes de contrôle qualité externes</b>

#### a. Facteurs d'influence avant la collecte du prélèvement

Avant même d'avoir récolté l'échantillon de liquide biologique afin d'en analyser le contenu en cfDNA, de nombreux facteurs pré-analytiques peuvent intervenir sur la qualité et la quantité des cfDNA retrouvés dans le prélèvement, de façon dépendante ou non de la volonté du clinicien.



- *Variables biologiques*

Comme cité précédemment, le mécanisme à l'origine de la libération des cfDNA impacte la taille des fragments récupérés : par exemple, l'apoptose va produire des fragments d'environ 167 paires de base (Heitzer *et al.*, 2020), alors que la nécrose est à l'origine de fragments de plusieurs milliers de paires de bases (Hu *et al.*, 2021).

La nature des cfDNA a également son importance : les cfDNA mutés (ctDNA) sont de plus petite taille que les cfDNA non mutés (porteurs du génotype sauvage), pouvant atteindre une taille de 90 paires de bases (Ungerer *et al.*, 2020). La taille des cfDNA est un facteur important à considérer, car la technique d'extraction doit être choisie de façon à pouvoir récupérer des fragments de taille réduite.

L'existence de barrières biologiques physiologiques limite le passage des cfDNA dans la circulation, diminuant ainsi la quantité de matériel pouvant être extraite pour analyse (Ungerer *et al.*, 2020).

- *Variables physiologiques*

Il existe de nombreux facteurs physiologiques, variant donc de façon inter-individuelle, pouvant impacter la libération des cfDNA. Les données sur le sujet sont limitées, mais certains de ces facteurs ont fait l'objet d'étude.

Plusieurs études ont montré que les personnes âgées de plus de 60 ans présentaient un taux de cfDNA supérieur à celui d'individus plus jeunes, ce qui peut s'expliquer par des mécanismes liés au vieillissement de l'organisme (sénescence cellulaire, mort cellulaire par inflammation, capacités de clairance et phagocytose réduites) (Ungerer *et al.*, 2020).

La pratique d'une activité sportive intensive est à l'origine d'une augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA (Meddeb *et al.*, 2019). Plusieurs explications peuvent être proposées : survenue de dommages musculaires, d'un stress oxydatif et d'inflammation leucocytaire. Cette augmentation apparaîtrait de façon précoce, dans les trente premières minutes suivant le début de l'activité physique. Il est donc recommandé, dans les études comparatives, de s'assurer que les patients soient soumis à un repos strict (durée non précisée) avant toute collecte de sang, pour éviter le pic de cfDNA lié à la pratique d'une activité sportive (Ungerer *et al.*, 2020).

Le moment de la journée où est prélevé l'échantillon influencerait la concentration en cfDNA ; toutefois la nature du facteur en cause reste incertaine (rythme circadien, effets du jeûne ou de la prise alimentaire), mais les études se contredisent sur l'effet précis de ce facteur (Ungerer *et al.*, 2020).

De nombreux autres facteurs provoquent une augmentation de la quantité de cfDNA récoltés : sexe, consommation de tabac, ménopause, ethnie (Meddeb *et al.*, 2019). Certains traitements (administrés en cas de grossesse ou de cancer par exemple) influencent également le pool total.

Ces facteurs sont à documenter de façon rigoureuse et systématique afin de rendre les résultats des études portant sur le sujet interprétables et comparables, et doivent parfois conduire à exclure des individus afin de ne pas fausser les résultats de ces études.

### **b. Technique et matériel de prélèvement**

La technique de prélèvement représente une source de variabilité pré-analytique pouvant impacter les résultats des analyses des cfDNA.

Une unique étude s'est intéressée à l'impact de l'utilisation prolongée d'un garrot au cours de la ponction veineuse sur les dosages des cfDNA. Aucun effet significatif n'a été mis en évidence à ce jour, mais les données disponibles sont insuffisantes pour conclure avec certitude à l'absence d'influence du recours à un garrot (Ungerer *et al.*, 2020).

L'hémolyse de l'échantillon sanguin est un facteur de variabilité important, la concentration en cfDNA étant supérieure en cas d'hémolyse. Les différents tubes de prélèvement disponibles sur le marché diffèrent par leur force d'aspiration, qui, si trop élevée, peut induire une lyse mécanique des hématies. Il est donc recommandé de suivre une démarche spécifique codifiée lors de l'utilisation de tubes avec un niveau de vide élevé, notamment les tubes Streck (Ungerer *et al.*, 2020). Les cathéters intraveineux sont à l'origine d'une hémolyse plus importante que les aiguilles épicrotiniennes, qu'il est donc recommandé d'utiliser. La taille de l'aiguille importe également, la force de cisaillement augmentant de façon inversement proportionnelle à la gauge : chez l'homme adulte, des aiguilles de 21 à 23 G sont usuellement utilisées. Il est également conseillé d'éviter de ponctionner plusieurs fois une même veine, pour éviter d'abîmer le site de prélèvement et de causer du stress chez le patient.

### **c. Choix du tube de prélèvement**

La qualité du prélèvement (pureté, intégrité et concentration des cfDNA) dépend en partie du type et de la marque du tube de prélèvement utilisé pour récolter l'échantillon sanguin, du fait des différents éléments les composant (parois, bouchon) et de leur contenu (anticoagulant, activateur de coagulation, gel séparateur, lubrifiant), justifiant ainsi la comparaison des tubes de prélèvement sanguin, afin de déterminer lesquels sont les plus adaptés à l'analyse des cfDNA (Ungerer *et al.*, 2020).

De nombreux types de tubes sont présents sur le marché. Les tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), auparavant considérés comme le gold-standard, ont l'avantage d'être peu coûteux et accessibles à tous, et permettent une conservation des cfDNA pendant six heures avant le traitement du prélèvement, grâce à l'inactivation des désoxyribonucléases par l'EDTA. Un délai supérieur ainsi qu'un stockage à température ambiante avant analyse augmentent le risque de contamination par du gDNA en lien avec la lyse cellulaire : il est donc recommandé de procéder au traitement des échantillons dans les deux heures suivant leur obtention (Martignano, 2019). Néanmoins, ce court délais après collecte peut être difficile à respecter, car les échantillons ont souvent besoin d'être transportés vers un laboratoire d'analyse extérieur (Ungerer *et al.*, 2020). Il est toutefois possible de les conserver plus longtemps (durée non précisée) à une température située entre 2 et 8 °C (Martignano, 2019).

D'autres types de tubes ont été spécifiquement élaborés pour palier aux limites des tubes EDTA et s'assurer de la conservation de l'intégrité des cfDNA sur une période plus longue : les tubes CellSave et Streck's Cell-Free DNA BCT permettent de conserver la qualité des cfDNA jusqu'à 96 heures après collecte du plasma, voire même jusqu'à deux semaines pour les échantillons sur tube Streck. De plus, les tubes Streck présentent l'avantage de pouvoir être stockés à température ambiante, sans risquer d'altérer la qualité des prélèvements ; au contraire,

un stockage à une température inférieure à 10 °C ou supérieure à 40 °C est déconseillé (Martignano, 2019).

#### ***d. Agitation des prélèvements***

L'agitation d'un prélèvement sanguin serait à l'origine d'une augmentation de la concentration en cfDNA : l'équipe de El Messaoudi *et al.* (2013) a mis en évidence une légère augmentation de la concentration par rapport aux valeurs basales après agitation des échantillons sanguins pendant trois heures à température ambiante. D'autres études ont investigué l'effet du transport des tubes sur les concentrations en cfDNA : une chute d'un mètre n'a eu aucun effet sur les échantillons contenus dans des tubes Streck (contenant un conservateur dont la nature n'est pas précisée par le fabricant) placés dans des cartons avec des sachets de gel réfrigérant. Dans leur étude, Medina Diaz *et al.* (2016) ont mimé les conditions de transport en agitant des tubes Streck remplis de sang total pendant trois jours (durée usuelle d'acheminement des échantillons vers les laboratoires), mais aucune augmentation de la concentration en cfDNA n'a été mise en évidence, contrairement aux résultats évoqués ci-dessus, ce qui témoigne de l'efficacité de ces tubes pour prévenir la libération d'ADN par les leucocytes dans des conditions adaptées au transport de sang total (Chan *et al.*, 2005).

### **c. Traitement des prélèvements**

#### ***a. Centrifugation***

##### *◦ Paramètres de centrifugation*

La centrifugation est une étape essentielle : elle permet de s'affranchir de la contamination de l'échantillon par du gDNA libéré lors de la lyse des cellules hématopoïétiques, en garantissant l'obtention d'un plasma dépourvu de tout élément cellulaire (Martignano, 2019).

Il n'existe pas de consensus concernant les paramètres à appliquer pour la centrifugation. Cependant, le protocole le plus utilisé à l'heure actuelle consiste en une double centrifugation, même si la seconde étape n'est pas obligatoire (Ungerer *et al.*, 2020). La première centrifugation du sang total permet de séparer le plasma par aspiration à l'aide d'une pipette du reste de l'échantillon, en veillant à ne pas toucher la couche leuco-plaquettaire. La seconde centrifugation du plasma obtenu à l'étape précédente permet de se débarrasser des cellules et des débris restant, ainsi que des fragments de cfDNA de plus de 300 paires de bases, usuellement non désirés dans les analyses. Les paramètres des étapes de centrifugation proposés par Martignano (2019) sont présentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Paramètres de centrifugation (d'après Martignano, 2019)**

Type de centrifugation		Vitesse	Durée	Température
Centrifugation simple		2 000 à 3 000 x g	10 minutes	4°C ou température ambiante
Centrifugation double	Première centrifugation	1 600 à 3 000 x g		
	Seconde centrifugation	10 000 à 14 000 x g		

◦ *Stockage après centrifugation*

Peu de données sont disponibles sur les conditions de stockage des échantillons après leur centrifugation, et les études se contredisent sur l'effet de la congélation du plasma sur sa concentration en cfDNA (Ungerer *et al.*, 2020). Cependant, il semble important d'utiliser des congélateurs dont la température est finement régulée et étant équipés d'un système d'alarme signalant toute fluctuation de température, ainsi que de remplacer les tubes à centrifugation standards par des cryotubes. Martignano (2019) recommande de conserver le plasma à  $-80\text{ °C}$  et seulement après centrifugation, pour éviter la fragmentation des cfDNA et la contamination par du gDNA suite à la lyse cellulaire. Dans ces conditions, aucune modification de la quantité de cfDNA contenue dans le plasma n'est observée pendant une durée de deux semaines. La répétition des cycles de congélation-décongélation n'affecte pas la concentration en cfDNA des échantillons mais est à l'origine de leur fragmentation, ce qui en altère la qualité : il est donc conseillé de se limiter à deux cycles et de fractionner le plasma récolté en plus petits échantillons afin de préserver la qualité des cfDNA (El Messaoudi *et al.*, 2013). Il est également possible d'extraire l'ADN avant stockage plutôt que de stocker le plasma tel quel, car ce premier semble moins prédisposé à la fragmentation lorsqu'il n'est pas conservé directement dans le plasma (Chan *et al.*, 2005). La température de décongélation n'a fait l'objet que de peu d'études : Bronkhorst *et al.* (2015) ont travaillé sur l'extraction des cfDNA obtenus à partir d'un milieu de culture et ont mis en évidence qu'une décongélation à  $37\text{ °C}$  permettait d'obtenir un rendement significativement supérieur, par comparaison à un protocole de décongélation à température ambiante. Cependant, aucune étude n'a été menée sur le plasma.

En cas de plasma hémolysé, ictérique ou lipémique, l'échantillon ne doit pas être utilisé car ces altérations influencent l'analyse de leur contenu en cfDNA (Ungerer *et al.*, 2020). En effet, l'ictère est à l'origine d'une concentration erronée en cfDNA par interférence avec la technique de PCR. De la même façon, la lipémie d'origine postprandiale entraîne une diminution de la quantité en cfDNA isolés (Meddeb *et al.*, 2019).

**b. Méthodes d'extraction des cfDNA**

Les cfDNA étant peu concentrés dans les liquides biologiques et les sous-catégories d'intérêt, notamment les ctDNA, ne représentant qu'une faible fraction du pool total, le recours à des

méthodes d'extraction dont le rendement est satisfaisant et assurant l'intégrité des cfDNA est indispensable. Cependant, cela en fait souvent des procédés difficiles et chronophages. Afin d'avoir recours aux cfDNA en tant que biomarqueurs de différentes maladies, il est dans l'intérêt de la communauté scientifique de développer des techniques d'extraction efficaces et standardisées.

- *Techniques utilisées*

Face à leur taille réduite, les méthodes standards d'extraction de l'ADN ne sont pas adaptées aux cfDNA. Il a donc été nécessaire de développer des procédés d'extraction adéquats. À l'heure actuelle, il existe de nombreux kits, utilisant des techniques différentes, permettant d'isoler les cfDNA depuis un liquide biologique. Dans ce paragraphe, différentes techniques, pour certaines commercialisées sous forme de kits, seront présentées. L'annexe 1, sans se vouloir être exhaustive, rassemble les caractéristiques de différents kits dont l'utilisation est rapportée dans la littérature.

- Colonne de centrifugation

Le kit le plus utilisé à l'heure actuelle, toutes techniques confondues, est le kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid, élaboré par le laboratoire Qiagen (Sorber *et al.*, 2017). Il permet de récupérer les cfDNA contenus dans des échantillons, frais ou congelés une fois, de plasma, de sérum ou d'urine. Ce kit repose sur l'utilisation d'une colonne de centrifugation constituée d'une membrane de silice et associée à un système de pompe à vide. La première étape consiste en une lyse, permettant de libérer les acides nucléiques circulants des molécules (protéines, lipides) auxquelles ils sont éventuellement liés ou des vésicules qui les contiennent : cette étape se fait à haute température, sous l'action de protéinases et d'un tampon spécifique. Puis, sous l'effet du vide exercé par le système de pompe, les acides nucléiques (d'une taille d'au moins 20 paires de bases) se lient à la colonne de silice, alors que les contaminants vont traverser la membrane de silice. Les contaminants résiduels sont ensuite éliminés grâce à trois étapes de lavage, pendant que les acides nucléiques sont élués dans une solution tampon, dont le volume peut descendre jusqu'à 20 µL, permettant ainsi de concentrer fortement les cfDNA. Le volume final d'éluat obtenu dépend de la nature de l'échantillon utilisée. Les conditions de stockage recommandées dépendent du temps de stockage souhaité : une température de 2 à 8 °C est conseillée pour un stockage de moins de 24 heures ; si la durée de stockage prévue est plus longue, il faut congeler l'éluat à une température comprise entre -30°C et -15°C. Cette procédure présente l'avantage de pouvoir traiter jusqu'à vingt-quatre échantillons à la fois, et peut être automatisée à l'aide des appareils QIAcube (Qiagen, 2019).

- Billes magnétiques

De nombreux kits ont recours à l'utilisation de billes magnétiques. C'est le cas du kit EpiQuick Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit, commercialisé par EpiGentek. Celui-ci permet d'isoler les cfDNA contenus dans un échantillon de plasma ou de sérum (frais ou congelé), dont le volume peut varier de 0,1 à 1 mL. La première étape consiste en une lyse enzymatique des complexes nucléosomiaux, permettant de libérer les fragments d'ADN. Sous l'effet d'un champ magnétique, les billes magnétiques vont capturer les cfDNA, puis sont ensuite lavées deux fois à l'éthanol, ce qui permet de purifier les cfDNA avant leur élution dans la solution tampon. Les billes sont ensuite recapturées par magnétisme. L'éluat, dans lequel sont contenus les cfDNA, peut ensuite être utilisé immédiatement ou stocké à -20°C pour un usage futur (EpiGentek, 2022a).

- Polymer Mediated Enrichment

Cette technologie est par exemple utilisée dans le kit PME free-circulating DNA Extraction Kit, commercialisé par Analytik Jena. Le principe repose sur l'utilisation de billes de polymère pouvant se lier à tous les cfDNA présents dans un échantillon donné. Ce complexe polymère-cfDNA est ensuite centrifugé. Puis, les fragments d'acides nucléiques sont libérés dans un volume réduit de solution tampon, par lyse de ces complexes. La dernière étape consiste en l'utilisation d'une colonne de biologie moléculaire, permettant la purification de l'échantillon. Après lavage et élution, les cfDNA sont ensuite prêts à être analysés, par PCR, *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR), séquençage au bisulfite (pour identifier les sites de méthylation de l'ADN) ou autres réactions enzymatiques (Analytik Jena, 2014). Ce kit fonctionne avec des échantillons de nature variée (sérum, plasma ou urine) et s'avère flexible quant au volume à utiliser, à toutefois adapter à la nature de l'échantillon. Il existe une version manuelle et une version automatique ; cette dernière permet le traitement de plusieurs échantillons (jusqu'à seize) de façon simultanée.

- Phénol-chloroforme

Des méthodes d'extraction des cfDNA à base de phénol-chloroforme ont été décrites dans la littérature. De façon générale, l'extraction liquide-liquide au phénol-chloroforme permet d'isoler les acides nucléiques (dans notre cas, les cfDNA), en les séparant des protéines grâce à leur différence de solubilité, dans une émulsion à deux phases (une aqueuse et une organique) obtenue après centrifugation (Pillon, 2020). Les acides nucléiques se trouvent alors dans la phase aqueuse, moins dense que la phase organique qui contient les protéines et les autres débris hydrophobes. La phase aqueuse est ensuite isolée et de l'éthanol y est ajouté pour faire précipiter les acides nucléiques.

En comparant le rendement de leur méthode d'extraction à base de phénol-chloroforme à celui obtenu par utilisation du kit de Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini Kit) qui repose sur l'utilisation d'une membrane de silice, Schmidt *et al.* (2005) se sont rendus compte que leur méthode à base de phénol-chloroforme leur permettait d'obtenir plus de cfDNA à partir d'un échantillon de liquide de lavage broncho-alvéolaire que le kit commercial, à la fois chez les individus sains et chez les patients atteints de cancer du poumon ; cela s'explique par le fait que des cfDNA restent accrochés à la colonne de centrifugation du kit, même après double élution. De la même façon, Hufnagl *et al.* (2013) ont obtenu un meilleur rendement avec leur protocole d'extraction modifié à la fois par rapport aux kits commerciaux (Maxwell 16 LEV DNA Purification Kit de Promega, QIAamp DNA Mini Blood Mini kit de Qiagen) mais également par rapport au protocole de Schmidt *et al.* (2005) : ce dernier point peut s'expliquer par la différence du nombre d'étape de centrifugation (une seule *versus* deux), et les concentrations différentes en sel utilisées. Cependant, si les méthodes à base de phénol-chloroforme semblent plus performantes en termes de rendement, elles sont plus chronophages (un à deux jours) (Hufnagl *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2005), exposent le personnel à des produits dont la toxicité est non négligeable et nécessitent de travailler sous hotte chimique (Pillon, 2020).

- *Comparaison des kits disponibles sur le marché*

- Durée des protocoles d'extraction

Les différents kits disponibles sur le marché diffèrent par la technique et le protocole utilisés, mais également par la délai nécessaire avant l'obtention de cfDNA purifiés (tableau 3).

**Tableau 3 : Durée du processus d'extraction de différents kits (d'après Qiagen, 2019 ; Westburg Life Science, n.d. ; EpiGentek, 2022 ; Promega, 2021)**

Nom du kit utilisé	Laboratoire	Durée du processus d'extraction
QIAamp® Circulating Nucleic Acid	Qiagen	< 2 heures pour 24 échantillons
PME free-circulating DNA Extraction Kit	Westburg	Échantillon de 1 mL : 30 minutes Échantillon de > 1 mL : 1 heure
EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit	EpiGentek	1 heure
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	Promega	70 minutes

- Rendement en cfDNA

Dans leur étude, Sorber *et al.* (2017) ont comparé l'efficacité de plusieurs kits d'extraction des cfDNA disponibles sur le marché, présentés dans le tableau 4. Dix échantillons de plasma, dont cinq présentant la mutation KRAS, de neuf individus souffrant et traités pour une maladie pancréatique (deux kystes pancréatiques, trois adénocarcinomes du canal pancréatique, quatre processus métastatiques) ont été utilisés pour comparer ces différents kits. Le statut KRAS de chaque patient a été déterminé antérieurement à cette étude par PCR digitale en gouttelettes (ddPCR pour *droplet digital polymerase chain reaction*), à la fois sur les ctDNA et sur l'échantillon d'exérèse quand celui-ci était disponible. Le kit QIAamp® Circulating Nucleic Acid de Qiagen sert de référence dans cette étude.

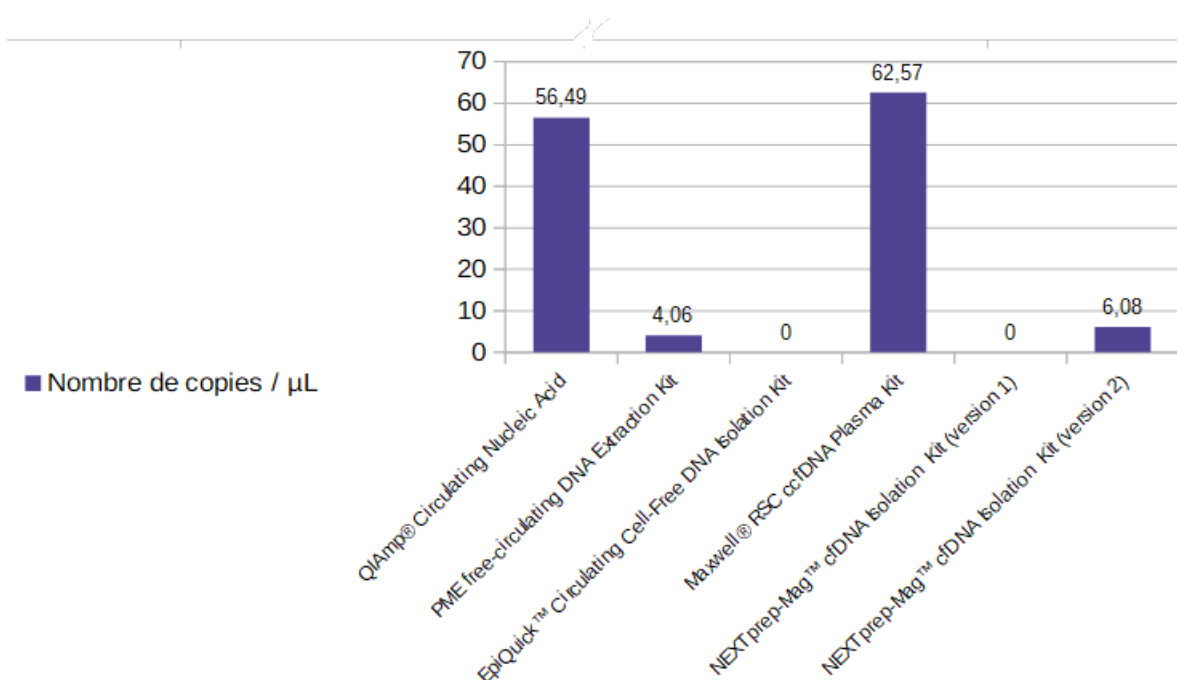
**Tableau 4 : Présentation des kits utilisés dans l'étude de Sorber *et al.* (2017)**

Nom du kit utilisé	Laboratoire	Technique utilisée	Volume de plasma utilisé	Lyse avant l'étape de liaison ?
QIAamp® Circulating Nucleic Acid	Qiagen	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	0,5 mL	Oui
PME free-circulating DNA Extraction Kit	Analytik Jena	Polymer Mediated Enrichment		Non
EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit	EpiGentek	Billes magnétiques		Non
Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	Promega	Billes magnétiques		Oui
NEXTprep-Mag™ ccfDNA Isolation Kit (versions 1 et 2)	Sanbio B.V.	Billes magnétiques		Oui

L'efficacité d'extraction de chacun de ces kits a été établie par ddPCR, permettant la quantification des cfDNA totaux et de la fraction de ctDNA porteurs de la mutation KRAS (figure 12). Le rendement en cfDNA totaux du kit de Qiagen est comparable à celui du kit Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit ( $p = 0,853$ ), et significativement plus élevé que celui des kits PME free-circulating DNA Extraction ( $p < 0,0005$ ) et NEXTprep-Mag™ ccfDNA Isolation Kit version 2 ( $p = 0,001$ ). Cette différence peut s'expliquer par l'étape de lyse avant l'étape de liaison et donc par la lyse des exosomes qui contiennent de l'ADN double brin. Concernant les kits EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit et NEXTprep-Mag™ ccfDNA Isolation Kit version 1, aucune copie n'a été détectée après amplification des échantillons.



**Figure 12 : Nombre de copies /  $\mu$ L obtenus par PCR digitale en gouttelettes (d'après Sorber et al., 2017)**



La présence de sept types de mutation du gène *kras* et d'une séquence sauvage de l'exon 2 a été déterminée par ddPCR. Les kits les plus performants sont encore une fois les kits de Qiagen et de Promega : en effet, ils ont identifié les mutations chez les quatre patients atteints d'adénocarcinome du pancréas de stade 4 (métastasé), mais pas chez le celui atteint d'un cancer de stade 2 (atteinte des organes voisins mais résécable). Cette baisse de sensibilité sur les stades moins avancés peut s'expliquer par une corrélation positive entre la concentration en cfDNA et le stade tumoral. Parmi les autres kits, seule la version 2 du kit Sanbio B.V. a pu identifier la mutation du gène *kras* parmi les deux échantillons à la charge mutationnelle la plus élevée, et cela sans différence significative avec les deux kits cités précédemment, ce qui peut s'expliquer par le faible nombre d'échantillons testés ici. La capacité des différents kits à identifier ou non la présence de mutations peut être à relier à leur efficacité d'extraction : plus la quantité de cfDNA isolée est faible, plus celle de ctDNA mutés l'est également, rendant la fraction mutée trop faible pour être identifiée. Il est également possible que l'éluat de certains kits contienne des agents inhibiteurs de la ddPCR, rendant leur analyse via cette technique impossible.

- Intégrité des cfDNA

Dans le cadre de l'étude de Sorber et al. (2017), l'intégrité des cfDNA après extraction a été déterminée par qPCR, utilisant deux types d'amorces produisant des amplicons de 105 et de 206 paires de bases du gène *gapdh*, ne se recoupant pas. À l'exception du kit EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit, tous les échantillons de cfDNA issus des autres kits ont permis l'amplification des deux types de fragments. Dans le cas du kit EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit, un premier échantillon a montré une amplification du fragment de 105 paires de bases et un second une amplification du fragment de 236 paires de bases ; aucune amplification n'a été observée parmi les autres échantillons soumis à ce kit. Les performances des kits des laboratoires Qiagen et Promega sont encore une fois comparables, pour les deux tailles de

fragments. Cependant, les quatre autres kits ont montré une efficacité moindre pour isoler les fragments de petites tailles, en comparaison au kit de Qiagen.

#### **d. Conditions de stockage après extraction**

Les conditions de stockage des cfDNA isolés sur le court et long terme ont un impact sur leur concentration, leur taille et leur pureté : il est donc important de les contrôler afin de garantir la qualité des cfDNA, d'autant plus que les échantillons peuvent être stockés sur des durées prolongées car les études s'intéressant aux cfDNA sont souvent de nature rétrospective (Ungerer *et al.*, 2020). Les recommandations dépendent de l'utilisation finale des cfDNA : en vue de la quantification et de l'étude de la fragmentation des cfDNA, il est conseillé de stocker les échantillons à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant moins de trois mois, alors que les échantillons de cfDNA isolés peuvent être conservés jusqu'à neuf mois à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  dans le cadre d'étude de mutations. En termes de cycles de congélation/décongélation, leur répétition n'affecte pas la structure des cfDNA après isolement, mais il est tout de même conseillé de se limiter à trois cycles ou moins pour empêcher la fragmentation des cfDNA (Meddeb *et al.*, 2019). En général, le type de tube utilisé pour le stockage des cfDNA après extraction n'est pas spécifié. Certaines études recommandent l'utilisation de tubes à base de propylène de type *low-bind*, sensés limiter l'absorption d'ADN (Meddeb *et al.*, 2019). Néanmoins, Bronkhorst *et al.* (2015) ont démontré une diminution de la quantité de cfDNA lorsque ceux-ci étaient stockés dans les tubes Eppendorf *low-bind* par rapport à aux échantillons stockés dans des tubes Eppendorf standards. En ce qui concerne le transport des cfDNA, il est conseillé de les congeler avant leur transport, mais il est toutefois possible de les conserver à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Meddeb *et al.*, 2019).

## **4. Variables étudiées dans la littérature**

Dans la littérature, différentes variables basées sur les cfDNA ont fait l'objet d'études.

La concentration en cfDNA peut être mesurée dans des échantillons de nature différente : sang (total, plasma et sérum), urines, LCS, liquide synovial pour n'en citer que quelques uns (Martignano, 2019; Panizzi *et al.*, 2023). La concentration totale en cfDNA (toutes natures confondues) peut être évaluée, ou seule une partie des cfDNA peut être quantifiée (comme les ctDNA (Diehl *et al.*, 2008) ou les cfDNA issus d'agents pathogènes (Wichmann *et al.*, 2009))

L'index d'intégrité des cfDNA fait référence au ratio entre les fragments longs et les fragments courts, et est notamment utilisé en oncologie humaine et vétérinaire (Hao *et al.*, 2014; Tagawa *et al.*, 2019).

Le pool de cfDNA étant composé de fragments d'origine variée, certaines études s'intéressent spécifiquement à des cfDNA d'une nature précise et quantifient la proportion représentée par les cfDNA de cette nature parmi la totalité des cfDNA. On parle donc de fraction en cfDNA, notamment utilisée dans un contexte de néoplasie (fraction en ctDNA quantifiés chez le malade (Walker *et al.*, 2022)), de transplantation d'organe (fraction en dd-cfDNA quantifiés chez le receveur) (Pedini *et al.*, 2023) et en dépistage pré-natal (fraction en cffDNA quantifiés chez la mère, dite fraction fœtale) (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019).

D'autres caractéristiques des cfDNA ont fait l'objet d'études : degré de méthylation à certains gènes (comme le gène *sept9* (Wu *et al.*, 2016)), taille des fragments (Zhao *et al.*, 2021), recherche de marqueurs spécifiques (comme la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) (Xiao *et al.*,

2021)), recherche de mutations (par exemple, mutations des gènes *kras* et *braf* (Liebs *et al.*, 2019)).

Ainsi, le pool de cfDNA est formé d'un ensemble de fragments d'origines diverses et sujet à de nombreuses variations selon les processus physiologiques et pathologiques auxquels sont soumis les organismes vivants. Afin de récolter les cfDNA, différents liquides biologiques peuvent être prélevés et divers kits reposant sur des méthodes d'extraction variées peuvent être utilisés. Cependant de nombreux facteurs pré-analytiques influencent la qualité et la quantité des cfDNA ainsi obtenus : un contrôle de ces facteurs est donc nécessaire afin de limiter leur altération et de garantir la performance des tests basés sur les cfDNA, qui font l'objet de recherches en médecine humaine et vétérinaire.

# Deuxième partie : utilisation des ADN libres circulant en médecine humaine et en médecine vétérinaire

---

## 1. Utilisation actuelle des ADN libres circulant en médecine humaine

### a. Oncologie : exemple du cancer colorectal

Pour illustrer l'application des cfDNA en oncologie humaine, nous prendrons ici pour exemple le cancer colorectal. Celui-ci représente le deuxième type de cancer le plus fréquent dans le monde avec presque un million de cas diagnostiqués chaque année, un chiffre en constante augmentation en Europe depuis plusieurs années (Vymetalkova *et al.*, 2018). Dans ce contexte, de nombreuses études se sont intéressées à l'utilisation des cfDNA, et notamment des ctDNA qui sont porteurs de mutations apportant des informations sur la tumeur, en tant que nouvel outil d'aide au diagnostic, au pronostic et au monitoring thérapeutique.

#### a. Diagnostic

À cause d'un diagnostic souvent tardif, le taux de survie en cas de cancer colorectal est faible (Hao *et al.*, 2014). En effet, cinq ans après le diagnostic, le taux de survie s'élève à 14 % en cas de cancer de stade IV (métastases à distance), alors qu'il est de 91 % pour les patients en stade I. Ainsi, il est nécessaire de détecter précocement la maladie pour mettre en place une stratégie thérapeutique adaptée et allonger l'espérance de vie des individus concernés. Les méthodes diagnostiques utilisées à l'heure actuelle présentent toutes un ou plusieurs inconvénients : caractère invasif, manque de sensibilité et/ou de spécificité. Il est donc important de mettre au point un test diagnostique au caractère invasif minimal et à la sensibilité et spécificité maximales (Wu *et al.*, 2021).

Chez les patients atteints d'un cancer colorectal, les concentrations médianes en cfDNA sériques et plasmatiques étaient significativement augmentées ( $p < 0,0001$ ) par rapport aux groupes contrôles (individus sains et individus présentant un polype intestinal (Hao *et al.*, 2014) ou individus sains et individus présentant une lésion adénomateuse pré-cancéreuse (Bedin *et al.*, 2017), selon l'étude) ; cette augmentation était d'autant plus marquée que la progression du cancer était avancée. En ce qui concerne l'index d'intégrité des cfDNA, qui correspond au ratio entre fragments longs et courts, les études se contredisent : en cas de cancer colorectal, certaines ont mis en évidence une baisse de l'intégrité des cfDNA (Yörüker *et al.*, 2015), alors que d'autres ont identifié un index d'intégrité plus élevé (Bedin *et al.*, 2017; Hao *et al.*, 2014). Ainsi, pour déterminer l'intérêt diagnostique potentiel de ces deux marqueurs dans la distinction d'individus sains et de patients atteints de cancer colorectal, Hao *et al.* (2014) ont étudié leurs performances, seuls, associés entre eux ou avec l'antigène carcino-embryonnaire (biomarqueur surexprimé en cas de cancer colorectal, mais peu sensible). Seuls, les marqueurs basés sur les cfDNA étaient

plus performants que l'antigène carcino-embryonnaire pour détecter la néoplasie. Cependant, leur association améliorerait leur efficacité diagnostique (tableau 5) (Flamini *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2014). Ainsi, l'utilisation combinée de ces marqueurs pourrait servir d'aide plus précise au diagnostic de la maladie, ce qui est notamment intéressant en stade précoce. En effet, la combinaison des marqueurs permet d'améliorer la sensibilité (Flamini *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2014) et permet d'atteindre une spécificité parfaite si les deux marqueurs sont positifs (Flamini *et al.*, 2006). Les performances des ctDNA et de l'antigène carcino-embryonnaire ont également été comparées dans un contexte de récurrence suite à une prise en charge chirurgicale du cancer éventuellement associée à une chimiothérapie adjuvante : en cas de récurrence diagnostiquée par radiographie, il était non seulement plus fréquent d'identifier la présence de ctDNA qu'une élévation de l'antigène carcino-embryonnaire (85 % *versus* 41 %), mais la détection des ctDNA s'est également révélée être plus précoce (Tie *et al.*, 2016). Ainsi, ce gain de temps pourrait éventuellement permettre une adaptation plus rapide du protocole thérapeutique et résulter en un meilleur pronostic pour les patients concernés.

**Tableau 5 : Performances de la concentration médiane sérique en cfDNA, de l'index d'intégrité et de l'antigène carcino-embryonnaire pour distinguer les patients atteints de cancer colorectal et les individus sains (d'après Flamini *et al.*, 2006 ; Hao *et al.*, 2014)**

Étude	Marqueur étudié	Valeur seuil #	Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	Valeur prédictive positive (VPP) (%)	Valeur prédictive négative (VPN) (%)
Flamini <i>et al.</i> (2006)	Concentration médiane sérique en cfDNA (ng/mL)	12,5	81,3 [71,0 ; 88,5]	73,3 [62,3 ; 82,0]	Non précisée	Non précisée
	Concentration médiane sérique en antigène carcino-embryonnaire (ng/mL)	5	38,7 [28,4 ; 50,0]	97,3 [90,7 ; 99,2]	Non précisée	Non précisée
	Marqueurs combinés		88,0 [78,7 ; 93,5]	Un seul marqueur positif : 70,7 [59,7 ; 79,5] Deux marqueurs positifs : 100 §	Non précisée	Non précisée
Hao <i>et al.</i> (2014)	Concentration médiane sérique en cfDNA (ng/mL)	0,85	69,23 [59,42 ; 77,90]	99,09 [95,04 ; 99,98]	98,63	77,3

Étude	Marqueur étudié	Valeur seuil #	Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	Valeur prédictive positive (VPP) (%)	Valeur prédictive négative (VPN) (%)
	<b>Index d'intégrité</b>	0,52	73,08 [63,49 ; 81,31]	97,27 [92,24 ; 99,43]	96,20	79,26
	<b>Concentration médiane sérique en antigène carcino- embryonnaire (ng/mL)</b>	5	42,31 [31,77 ; 51,42]	100 [96,70 ; 100]	100	64,71
	<b>Marqueurs combinés</b>		85,57 §	97,27 §	96,74	87,7

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir des résultats issus du diagnostic histologique sur biopsie.

# La valeur seuil est la valeur permettant de distinguer les résultats positifs et les résultats négatifs.

§ L'intervalle de confiance à 95% n'a pas été fourni.

L'étude de la méthylation des cfDNA apporte des informations intéressantes pour le diagnostic : en s'intéressant à la méthylation des dinucléotides cytosine-guanine, Liu *et al.* (2018) ont développé une technique de séquençage permettant d'établir un score de méthylation des cfDNA plasmatiques, leur permettant ainsi de déterminer la présence d'un cancer colorectal chez 88,5 % des patients atteints de ce type de tumeur. De nombreuses études se sont également intéressées à la méthylation d'une grande variété de gènes impliqués de différentes manières dans le développement et la progression du cancer (même si leur rôle exact est parfois encore mal compris). Le gène *sept9* est le plus étudié dans un contexte de cancer colorectal (Worm Ørntoft, 2018). Il existe un test sanguin basé sur la détection du gène *sept9* méthylé : il s'agit du test Epi proColon®, dont la sensibilité et la spécificité pour la détection précoce du cancer colorectal s'élèvent jusqu'à 79,3 % et 99,1 % respectivement, selon les études (Wu *et al.*, 2016) ; à l'heure actuelle, il existe une version améliorée nommée Epi proColon® 2.0 CE, qui est la seule disponible sur le marché. Plusieurs études rapportent que l'utilisation de cette technique pour identifier une hyperméthylation du gène *sept9* pourrait être utile dans le cadre du dépistage opportuniste de la maladie (Song *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2016). Cependant, la valeur clinique et l'avantage conférée de l'étude de la méthylation du gène *sept9* par rapport à d'autres techniques de dépistage moins invasives dans ce contexte n'ont pas encore été prouvés (Worm Ørntoft, 2018). De plus, le dépistage opportuniste, à l'inverse du dépistage organisé, ne garantit pas l'égalité de l'accès au soin et de la qualité des services, ce qui en fait une méthode de dépistage controversée (Garborg *et al.*, 2013). L'analyse de la méthylation du gène *sept9* est également intéressante pour identifier,

avant la mise en place d'une thérapie, la présence de métastases ; toutefois, elle n'apporte pas de renseignement sur le nombre de sites métastatiques (Bergheim *et al.*, 2018). L'évaluation de l'hyperméthylation des gènes *bcat1* et *ikzf1* permet de détecter une récurrence chez des patients dont le cancer colorectal fût précédemment pris en charge, et cela de façon plus sensible que l'antigène carcino-embryonnaire (également utilisé pour monitorer une éventuelle récurrence du cancer) (Musher *et al.*, 2020) ; le test basé sur la méthylation de ces deux gènes est notamment 2,5 fois plus sensible lorsqu'une prise en charge chirurgicale est possible (Pedersen *et al.*, 2022). De nombreux autres gènes ont fait l'objet d'études (tels que les gènes *npv*, *wif-1*, *alx4*, *apc*) mais les recherches, moins nombreuses, semblent être moins avancées dans le processus de développement de nouveaux biomarqueurs d'aide au diagnostic (Worm Ørntoft, 2018).

La 5hmC résulte de la modification d'une cytosine par oxydation de la 5-méthylcytosine au cours de la déméthylation de l'ADN et est présumée posséder un rôle dans l'expression des gènes (Gilat *et al.*, 2017). Cette modification épigénétique serait impliquée dans différents processus pathologiques : athérosclérose, maladies neurodégénératives, processus tumoraux (Xiao *et al.*, 2021). Dans ce dernier cas, et notamment pour de nombreuses tumeurs malignes, une perte de 5hmC est observée (Gilat *et al.*, 2017). Plusieurs études se sont donc intéressées aux 5hmC retrouvés au sein des cfDNA des patients atteints de cancer, notamment colorectal. Grâce à la mise en place d'un système de classification basé sur l'étude de ces marqueurs, il s'est avéré possible de distinguer les individus atteints d'un cancer colorectal des individus sains, avec une sensibilité de 88% et une spécificité de 89% (Li *et al.*, 2017). Cette technique permettrait également un dépistage précoce chez les patients en stade I, même en cas de faible fraction en ctDNA (Walker *et al.*, 2022). En cas d'historique d'adénome ayant précédé le développement d'un cancer colorectal, l'étude des marqueurs 5hmC met en lumière la présence de caractéristiques spécifiques chez ces patients, pouvant ainsi servir à estimer le risque de transformation maligne d'un adénome colorectal et à diagnostiquer précocement le cancer (Xiao *et al.*, 2021). Très récemment, il a été montré que le niveau en 5hmC du gène *tlr4* serait similaire entre les cfDNA et les gDNA directement issus du tissu tumoral, ce qui fait de ce gène un candidat prometteur pour des études ultérieures concernant le cancer colorectal (Jevšinek Skok et Hauptman, 2023).

Les ctDNA, cfDNA spécifiques des cellules tumorales, ont fait l'objet d'études visant à identifier la présence de mutations impliquées dans la carcinogenèse (par mutations à l'origine de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *apc* et *p53* et de l'activation de l'oncogène *kras*) (Wang *et al.*, 2004), mais aussi dans un défaut de réponse à la thérapie ciblée contre le récepteur du facteur de croissance épidermique (par mutations de l'oncogène *kras* et du gène *braf*) qui nécessitent donc la mise en place d'une thérapie personnalisée (Liebs *et al.*, 2019). L'analyse des ctDNA s'est révélée parfaitement spécifique : tous stades confondus, aucun ctDNA muté n'a été détecté chez les patients dont la tumeur n'exprime pas de mutation (Liebs *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2004). Cependant, si la spécificité est satisfaisante, selon certaines études, la sensibilité de cette technique l'est peu. En effet, chez les patients dont la tumeur exprime des mutations du gène *apc*, du gène *p53* ou de l'oncogène *kras*, seuls 46,2 % d'entre eux ont pu être identifiés par analyse de leurs ctDNA plasmatiques (toutes mutations confondues) (Wang *et al.*, 2004) ; de même, Liebs *et al.* (2019) n'ont pu identifier la présence de mutations des gènes *kras* ou *braf* au sein des ctDNA de seulement 31 % des échantillons plasmatiques provenant de patients atteints de cancer colorectal. Il faut noter que ces valeurs varient de façon conséquente selon l'étude considérée, ce qui est sûrement attribuable à de nombreux facteurs pré-analytiques (Wang *et al.*, 2004). Si la sensibilité de ces tests augmente avec la progression du cancer, un élément en faveur de

l'implémentation en routine de ce test chez les patients présentant des métastases, l'intérêt de la recherche de mutations au sein des ctDNA reste toutefois cependant limitée en stade précoce du fait d'une sensibilité plus faible qu'en cas de processus métastatique (Bettegowda *et al.*, 2014; Liebs *et al.*, 2019).

### **b. Pronostic**

La détection de ctDNA dans le plasma de patients atteints de cancer colorectal serait un élément pronostique défavorable : chez des patients en stade I à III, Lecomte *et al.* (2002) ont mis en évidence un taux de survie à deux ans après prise en charge chirurgicale réduit si des ctDNA avaient été retrouvés dans le plasma en période pré-opératoire (48 % contre 100 % de survie en cas d'absence de détection de ctDNA). Ces patients seraient également plus à risque de rechute. De façon quantitative, une concentration élevée en cfDNA (supérieure à 1 000 ng/mL dans l'étude de Schwarzenbach *et al.* (2008)) au moment du diagnostic était corrélée à une durée de survie réduite (El Messaoudi *et al.*, 2013; Schwarzenbach *et al.*, 2008). En ce qui concerne les informations apportées par une mesure en période post-opératoire, Diehl *et al.* (2008) ont observé une tendance à la rechute dans l'année suivant la prise en charge si des ctDNA étaient détectables dans le plasma des patients traités chirurgicalement. Chez des patients au cancer colorectal de stade II, la présence de ctDNA en post-opératoire en l'absence de chimiothérapie adjuvante ou leur persistance après complétion d'une chimiothérapie sont deux indicateurs en faveur d'un fort risque de récurrence radiographique (Tie *et al.*, 2016).

Certaines caractéristiques des cfDNA peuvent apporter des informations pronostiques. En ce qui concerne la méthylation des cfDNA, il a été démontré que la méthylation des gènes *hltf* et/ou *hpp1* représente un facteur pronostique indépendant corrélé à un taux de mortalité supérieur (Wallner *et al.*, 2006). La méthylation des gènes *sept9* et *shox2* présente une association significative avec la classification TNM, un indicateur de survie de confiance (Bergheim *et al.*, 2018). Dans l'étude de Liu *et al.* (2018), un score de méthylation considéré élevé, soit supérieur à 5 %, était associée à une durée de survie réduite. Quant au niveau de fragmentation des cfDNA, plus celui-ci était élevé, plus le pronostic de survie semblait mauvais (espérance de survie réduite) (El Messaoudi *et al.*, 2016). L'identification de la présence de mutations dans certains gènes semblent également être corrélée à une durée de survie moindre : les patients au cancer colorectal métastasé dont une mutation au gène *kras* a été identifiée par analyse de leurs cfDNA plasmatiques présentaient un pronostic plus mauvais que ceux au gène *kras* sauvage (Xu *et al.*, 2014). Chez ces patients, en cas de mutation des gènes *kras* ou *braf*, plus la fraction en cfDNA mutés était élevée plus l'espérance de vie semblait être courte, même si aucune différence significative n'a été identifiée par El Messaoudi *et al.* (2016).

De façon générale, El Messaoudi *et al.* (2016) ont postulé que tous les paramètres associés aux cfDNA pourraient servir de marqueurs pronostiques.

### **c. Monitoring thérapeutique**

Après une prise en charge chirurgicale, lorsque celle-ci est possible, une augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA peut être observée fugacement, au cours de la dizaine de jours suivant l'intervention, possiblement secondairement à l'inflammation liée à la procédure (Frattoni *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2014). Cependant, au cours des quatre mois suivants, une diminution est observée, avec une cinétique qui varie d'un patient à l'autre : diminution linéaire ou drastique, éventuellement après une première phase d'augmentation telle que décrite



précédemment. Cette diminution se poursuit dans le temps chez les patients ne présentant pas de récurrence. À l'inverse, en cas de récurrence ou de métastase, les suivis de contrôle montrent une drastique ré-augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA, et ce, avant l'apparition de signes cliniques évocateurs de la maladie (Cassinotti *et al.*, 2013; Frattini *et al.*, 2006). Ainsi, la quantification des cfDNA en post-opératoire pourrait servir d'aide à la détection d'une éventuelle récurrence par maladie résiduelle ou d'un processus métastatique en cours. En s'intéressant spécifiquement aux ctDNA, ceux-ci semblent être le reflet de la masse tumorale, sans toutefois pouvoir affirmer avec certitude qu'ils y soient proportionnels. Selon si l'exérèse chirurgicale initiale est complète ou non et donc selon la persistance de cellules tumorales, la dynamique de variation de la concentration en ctDNA n'est pas la même, avec une diminution beaucoup plus marquée en cas d'exérèse complète ; en cas d'identification de nouvelles lésions tumorales sur les images radiographiques, on observe en parallèle une augmentation des ctDNA dans le plasma des patients (Diehl *et al.*, 2008). L'étude de la méthylation des cfDNA fournit des informations similaires : en cas d'exérèse chirurgicale, une diminution du niveau de méthylation du gène *sept9* était notée chez les individus dont le cancer était localisé, alors qu'aucune modification n'a été observée en cas de processus métastatique ou d'exérèse en marges non saines (Bergheim *et al.*, 2018). Dans une étude s'étant intéressée aux gènes *bcat1* et *ikzf1*, une persistance des ctDNA après thérapie, notamment beaucoup plus fréquente en cas de non complétion du traitement (absence de thérapie adjuvante ou thérapie adjuvante incomplète après résection chirurgicale), était associée à une progression de la maladie (Symonds *et al.*, 2022). Ainsi, ces différents tests pourraient servir à détecter les cas de maladie résiduelle, notamment suite à un échec thérapeutique, et à adapter la prise en charge afin de favoriser les chances de survie des patients.

En cas d'exérèse chirurgicale complète de la tumeur impossible nécessitant une chimiothérapie palliative, le monitoring des ctDNA permet d'évaluer son efficacité. Le suivi de la concentration plasmatique en cfDNA chez des patients au cancer colorectal métastaté a montré une tendance initiale à la diminution grâce à l'effet cytostatique des molécules de chimiothérapie, avant une phase d'augmentation correspondant à la progression de la maladie (Schwarzenbach *et al.*, 2008). En cas de mise en place d'un protocole de chimiothérapie de seconde intention, le suivi de la concentration plasmatique en ctDNA après huit semaines a montré une diminution significative chez les patients stables ou présentant une réponse partielle au traitement, par comparaison aux patients dont le cancer est en progression. De plus, la réponse à la chimiothérapie était meilleure si le ratio de la concentration en ctDNA avant/après mise en place du traitement pendant huit semaines est inférieur à 50 % (Osumi *et al.*, 2019).

## **b. Maladies infectieuses**

### **a. Sepsis**

Le sepsis peut se définir comme une dysfonction organique secondaire à une réponse anormale de l'organisme face une infection (Li et Tablin, 2018), qui se caractérise par une activation des mécanismes d'inflammation et de coagulation (Dwivedi *et al.*, 2012). C'est une cause importante de morbidité et de mortalité dans le monde, et notamment la cause majeure de mortalité chez les patients critiques.

En cas de sepsis, il peut y avoir une dérégulation du processus de nétose, qui joue usuellement un rôle de défense de l'organisme en limitant la croissance et la dissémination des agents pathogènes. Cet emballement est à l'origine d'une libération excessive de NETs favorisant

alors différents facteurs impliqués dans la morbidité et la mortalité associées au sepsis : thrombose vasculaire et coagulation intravasculaire disséminée par activation anormale des mécanismes de coagulation, syndrome de défaillance multiviscérale (Li et Tablin, 2018). Comme expliqué précédemment, il y a une libération de cfDNA suite à la nécrose. Ceux-ci jouent un rôle dans la pathologie du sepsis : les cfDNA favorisent la coagulation et inhibent la lyse des caillots sanguins, aboutissant ainsi à la formation de thrombi vasculaires (Jackson Chornenki *et al.*, 2019). Ainsi, il peut donc s'avérer intéressant de se pencher sur les informations, à la fois diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques, apportées par les cfDNA dans un contexte de sepsis, d'autant plus que la quantification des NETs par immunofluorescence peut s'avérer être un challenge en clinique (Li et Tablin, 2018).

En termes de diagnostic, Long *et al.* (2016) ont comparé les performances de détection d'agents pathogènes de la culture bactériologique et du séquençage de nouvelle génération (NGS pour *next generation sequencing*), à partir d'échantillons de plasma de patients atteints de sepsis. Le NGS, qui consiste à séquencer rapidement des millions de fragments d'ADN de façon simultanée, présente l'avantage non négligeable de pouvoir détecter les bactéries difficiles à mettre en culture et les virus, à l'inverse de la culture bactériologique. Ainsi, dans l'étude de Long *et al.* (2016), l'application du NGS aux cfDNA a permis d'augmenter la sensibilité diagnostique par rapport à l'hémoculture seule, et de détecter efficacement la présence de multiples agents pathogènes le cas échéant. Une autre méthode diagnostique, développée par Chen *et al.* (2020), consiste à détecter une quantité anormale de cfDNA d'origine bactérienne dans le sang de patients atteints de sepsis, en comparant les dits cfDNA au génome des bactéries : cette méthode s'est révélée beaucoup plus performante que l'hémoculture pour diagnostiquer le sepsis, avec une sensibilité de 91 % et une spécificité de 83 %. De plus, les deux méthodes nouvellement décrites étaient également moins chronophages que la culture bactériologique ; toutefois, elles nécessitaient tout de même un délai de un à trois jours, qui reste trop long dans ce contexte (Chen *et al.*, 2020; Long *et al.*, 2016). Il n'est cependant pas aberrant d'espérer que ce délai puisse être drastiquement réduit dans le futur, permettant grâce aux cfDNA une identification rapide des pathogènes en cause dans un contexte de sepsis.

Dwivedi *et al.* (2012) se sont intéressés à l'apport pronostique des cfDNA chez des patients atteints de sepsis sévère. Ils ont d'abord établi que la concentration plasmatique en cfDNA chez les patients ayant survécu était similaire à celle des individus sains, mais significativement plus faible que celle des patients ayant succombé au sepsis, ce qui est cohérent avec les résultats établis précédemment (Saukkonen *et al.*, 2008). L'étude comparée des aires sous la courbe ROC (*receiver operating characteristic*) de différents paramètres (concentration plasmatique en cfDNA, systèmes de scoring MOD et APACHE II utilisés pour évaluer la sévérité d'une affection, protéine C réactive (CRP), interleukine-6) a été réalisée pour déterminer le pouvoir prédictif de chaque variable. De tous, la concentration plasmatique en cfDNA correspondait au paramètre le plus performant pour prédire la mortalité aux soins intensifs, avec une sensibilité et une spécificité d'une valeur de 87,9 % et de 93,5 % respectivement, pour une valeur seuil de 2,35 ng/ $\mu$ L (Dwivedi *et al.*, 2012). L'équipe de Avriel *et al.* (2014) s'est intéressée à la valeur prédictive de la concentration sérique en cfDNA à l'admission, de la concentration en procalcitonine (un biomarqueur potentiellement utile dans un contexte de sepsis car fiable pour prédire l'issue chez des patients critiques) et de la valeur du score APACHE II chez des patients atteints de sepsis sévère, afin d'identifier quel marqueur était le plus intéressant pour déterminer la mortalité à 28 jours. Leurs recherches ont montré que la concentration sérique en cfDNA à l'admission, mesurée

par fluorométrie, permettait de prédire avec précision la mortalité à court terme chez les patients atteints de sepsis sévère. De plus, les performances de ce nouveau marqueur dépassaient celles de la procalcitonine et du score APACHE II pour différencier les patients ayant survécu et ceux décédés à 28 jours.

L'étude des cfDNA dans un contexte de sepsis a aussi un intérêt thérapeutique. En effet, les cfDNA jouent un rôle dans l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire par activation des récepteurs *Toll-Like* des cellules du système immunitaire (macrophages de l'espace péritonéal) (Dawulieti *et al.*, 2020). De plus, ils modifient la structure des caillots sanguins en modulant la synthèse de thrombine et perturbent la fibrinolyse via l'atténuation de l'activité de la plasmine par création d'un complexe avec la plasmine et la fibrine (Gould *et al.*, 2015). Ainsi, il est pertinent de considérer les cfDNA comme des cibles thérapeutiques potentielles, puisque leur neutralisation pourrait permettre de moduler la réponse immunitaire en cours. En 2020, Dawulieti *et al.* ont montré que l'utilisation de nanoparticules se liant aux cfDNA chez des souris où un sepsis a été induit expérimentalement semble prometteuse : en effet, elles ont permis de réduire la mortalité en empêchant la survenue d'une réaction inflammatoire létale et en limitant les dommages causés aux organes touchés par le sepsis (Dawulieti *et al.*, 2020). Ces résultats soulignent l'intérêt potentiel des cfDNA dans la prise en charge médicale du sepsis.

### **b. Pneumonies infectieuses**

Les pneumonies sont des affections inflammatoires qui, comme leur nom l'indique, touchent les poumons ; nous nous intéresserons ici aux pneumonies d'origine infectieuse. Parmi la grande diversité de maladies d'origine infectieuse, les pneumonies représentent une des causes majeures de décès et la première cause mondiale de décès chez les enfants (Shimizu, 2023). Le diagnostic peut s'avérer difficile, car les techniques bactériologiques ne permettent d'obtenir un résultat positif que dans moins de 20 % des cas (Langelier *et al.*, 2020). Il est donc nécessaire de mettre au point des techniques diagnostiques facilitant le travail des cliniciens et la prise en charge des patients.

Les techniques usuellement utilisées pour identifier les agents pathogènes responsables d'une infection présentent toutes des limites : certaines bactéries sont difficiles à cultiver et le délai avant l'obtention des résultats issus de la bactériologie est long, dans les cas où un résultat est effectivement obtenu (seulement 4 à 18 % de cultures positives en cas de pneumonie (Langelier *et al.*, 2020)). De plus, le recours à des antibiotiques avant la réalisation d'une hémoculture peut influencer les résultats de cette dernière (Dworsky *et al.*, 2022). La PCR multiplex est plus rapide mais ne peut tester qu'un petit nombre d'agents étiologiques. La spectrométrie de masse, bien qu'intéressante, nécessite tout de même d'isoler les pathogènes (Han *et al.*, 2020). L'utilisation du NGS à partir des cfDNA provenant des pathogènes retrouvés dans les liquides biologiques des patients souffrant de pneumonies infectieuses a fait l'objet de plusieurs études afin de proposer une alternative à ces techniques. D'après l'étude menée par Langelier *et al.* en 2020 chez 18 patients admis pour détresse respiratoire aiguë secondaire à une pneumonie dont l'origine infectieuse a été confirmée par culture bactériologique sur liquide respiratoire (liquide de lavage broncho-alvéolaire ou d'aspiration trachéale) et dont les résultats sont présentés dans le tableau 6, le NGS (technique de séquençage Illumina) a permis d'identifier les pathogènes en cause en cas de pneumonie infectieuse. Ainsi, le recours au plasma peut s'avérer être une alternative, bien qu'imparfaite, à l'utilisation des liquides respiratoires quand ceux-ci sont indisponibles (Langelier *et al.*, 2020). Chez des enfants atteints de pneumonie aiguë communautaire, le NGS était plus performant que la culture (sur sang, expectoration ou liquide d'épanchement pleural) pour identifier

une origine infectieuse (et l'agent pathogène impliqué dans 89 % des cas) expliquant la symptomatologie, notamment après une antibiothérapie initiale (ce qui peut s'expliquer par une persistance plus longue dans le sang des cf-micDNA que des bactéries vivantes après un traitement antibiotique) (Dworsky *et al.*, 2022; Farnaes *et al.*, 2019). Par conséquent, le NGS a permis d'adapter le traitement notamment par la mise en place d'un antibiotique de spectre plus restreint sans qu'une rechute ne soit observée ultérieurement (Dworsky *et al.*, 2022; Farnaes *et al.*, 2019). Cependant, il est important de noter que, malgré le fait que le NGS n'apporte aucune information sur la sensibilité aux antibiotiques des pathogènes identifiés (Dworsky *et al.*, 2022), ces deux études ne mentionnent pas avoir recherché une éventuelle antibiorésistance, par exemple via la réalisation d'un antibiogramme ou la recherche de gène de résistance, avant le changement d'antibiotique. D'autres limites inhérentes à cette technique d'analyse résident dans le coût et le temps nécessaires à sa mise en œuvre (Dworsky *et al.*, 2022). De plus, des études supplémentaires sont nécessaires pour évaluer les performances diagnostiques (spécificité, sensibilité) du NGS sur plasma (Farnaes *et al.*, 2019; Langelier *et al.*, 2020) et pour déterminer si les résultats issus du NGS ne sont pas simplement le signe d'une infection concomitante localisée autre part dans l'organisme en cas de l'identification de multiples pathogènes, notamment lorsque ceux-ci sont rares (Farnaes *et al.*, 2019).

**Tableau 6 : Comparaison des résultats issus de la bactériologie et du NGS chez 18 patients atteints de pneumonie infectieuse (d'après Langelier *et al.*, 2020)**

	Résultats issus du NGS sur plasma	Résultats issus du NGS sur liquide respiratoire
<b>Identification du ou des pathogènes mis en évidence par culture bactériologique</b>	12/18 patients	18/18 patients
<b>Identification du ou des pathogènes impliqués comme le ou les plus abondants</b>	8/18 patients	11/18 patients

Plusieurs études se sont spécifiquement intéressées aux pneumonies causées par *Pneumocystis jirovecii*, une infection fongique sévère et potentiellement mortelle chez les patients immunodéprimés (secondairement à une infection virale, une greffe d'organe ou de moelle osseuse, une néoplasie, une thérapie immunosuppressive) (Jiang *et al.*, 2021). Plusieurs techniques diagnostiques existent : une PCR, méthode la plus couramment utilisée pour détecter *P. jirovecii*, peut être réalisée sur lavage bronchoalvéolaire mais le prélèvement est invasif donc impossible sur patient instable et les analyses sur expectorations sont moins sensibles. Par rapport à la PCR, l'immunofluorescence (permettant un diagnostic de certitude) nécessite une certaine expertise et est moins sensible, la détection des  $\beta$ -glucanes moins spécifique. Quant à la culture, il est impossible de cultiver *in vitro* le champignon (Moreno *et al.*, 2022). C'est là que les cfDNA rentrent en jeu : l'analyse des cfDNA plasmatiques par PCR a permis d'obtenir des résultats satisfaisants chez les patients dont la pneumonie à *P. jirovecii* est prouvée (sensibilité de 100 %, spécificité de 93,4 %). Chez les patients dont l'infection était prouvée ou probable, tous confondus, la sensibilité était médiocre mais comparable à celle du dosage des  $\beta$ -glucanes ; la spécificité était elle cependant bien supérieure et même excellente (99,1 %). Ainsi, la PCR sur cf-

pdNA plasmatiques présente l'avantage, par rapport aux  $\beta$ -glucanes, de ne pas nécessiter le recours à des analyses supplémentaires invasives en cas de résultat positif (Moreno *et al.*, 2022). Le recours au NGS semble également prometteur dans ce contexte : en plus d'être beaucoup plus rapide que la technique d'immunofluorescence (24 heures contre 5 jours minimum) (Lu *et al.*, 2022), les performances comparées des différents tests diagnostiques font du NGS le test à la fois le plus sensible et très spécifique (tableau 7). De plus, le NGS permet l'adaptation de la thérapie, notamment grâce à l'identification de co-infections (non détectables par PCR classique) (Foong *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2021) et, comme la PCR sur cfDNA, d'éviter dans certains cas le recours à une bronchoscopie invasive (Foong *et al.*, 2022).

**Tableau 7 : Comparaison des résultats issus des différents tests diagnostiques chez des patients atteints de pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* (d'après Jiang *et al.*, 2021)**

	Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *
<b>NGS sur cf-pDNA plasmatiques</b>	100 [94,0 ; 100]	96,3 [91,5 ; 98,8]
<b>Immunofluorescence direct</b>	25,0 # [10,7 ; 44,9]	100 [89,1;100]
<b>Dosage des <math>\beta</math>-glucanes sériques</b>	67,4 # [52,0;80,5]	81,4# [71,6;89]

\* Pour la détermination des valeurs de sensibilité et spécificité, le diagnostic établi par des cliniciens sur la base des examens cliniques, biologiques, radiographiques et microbiologiques a servi de méthode de référence.

#  $p < 0,001$  par comparaison aux performances du NGS.

### c. Méningites bactériennes

La méningite correspond à une inflammation des méninges, les membranes qui sont localisées concentriquement autour du système nerveux central. Les méningites peuvent être d'origine infectieuse ou aseptique. Les méningites bactériennes sont les plus fréquemment associées au décès du patient, parfois très rapidement (moins de 24 heures), d'où l'intérêt d'identifier précocement la maladie, qui représente une urgence médicale (World Health Organization, 2023).

La tuberculose peut se présenter sous la forme d'une méningite dite tuberculeuse, particulièrement morbide et mortelle, dont le diagnostic peut se révéler être un challenge (présentation clinique peu évocatrice, pauvreté du LCS en *Mycobacterium tuberculosis*) : l'intérêt diagnostique des cf-micDNA a alors fait l'objet de plusieurs études (Xuelian Li *et al.*, 2020). Xuelian Li *et al.* ont montré en 2020 qu'il était possible de rechercher une séquence spécifique du génome de la bactérie (appelée IS6110) parmi les cf-micDNA contenus dans le LCS des patients dont le diagnostic de méningite tuberculeuse a été établi ; à l'instar des techniques de culture mycobactériologique, d'examen microscopique d'un frottis de LCS et de qPCR (test Xpert MTB/RIF), l'analyse des cf-micDNA était parfaitement spécifique ; cependant elle se distinguait par une sensibilité bien meilleure, et ce peu importe le sous-groupe considéré (méningite tuberculeuse certaine, probable ou possible) (Xuelian Li *et al.*, 2020). Les cf-micDNA transrénaux, retrouvés dans l'urine sous forme libre ou contenus dans des vésicules extra-cellulaires, sont également

prometteurs. En effet, la spécificité de la PCR quantitative basée sur les cf-micDNA était parfaite, peu importe le ou les sous-groupes de patients considérés et la forme des cf-micDNA (libres ou contenus dans des vésicules extra-cellulaires). La sensibilité, elle, variait beaucoup selon ces paramètres, mais la prise en compte des deux formes de cf-micDNA semblait améliorer la sensibilité (Dass *et al.*, 2022).

D'autres agents pathogènes à l'origine de méningite pourraient être identifiés grâce aux cfDNA, mais les cas ayant fait l'objet d'études sont cependant rares : par exemple, une méningite à *Capnocytophaga canimorsus* a été diagnostiquée par NGS sur cf-micDNA sanguins (11 molécules/ $\mu$ L) chez une patiente chez qui les analyses bactériologiques et mycologiques sur LCS sont revenues négatives (Asif *et al.*, 2021).

#### **d. Infections parasitaires**

Les infections parasitaires représentent un danger pour la santé publique, du fait de leur morbidité et de leur mortalité ; le parasitisme est un problème majeur en régions tropicales endémiques, mais son émergence est actuellement observée en milieu tempéré, du fait des échanges internationaux et de l'immigration. Pour aider à éliminer le parasitisme en zone endémique et à le diagnostiquer rapidement en zone non endémique, il est de mise de développer des nouvelles méthodes précises et pratiques (Weerakoon et McManus, 2016).

##### **◦ Schistosomiase**

La schistosomiase est une parasitose liée à des trématodes du genre *Schistosoma*. La détection, par sérologie ou identification microscopique des œufs, est imparfaite : la sérologie ne permet pas de faire la distinction entre une infection active ou non, les œufs peuvent ne pas être retrouvés au microscope à cause de leur libération fluctuante, et dans les deux cas des faux négatifs sont possibles en stade aiguë de la maladie (Wichmann *et al.*, 2009). Cependant, le diagnostic est un enjeu important de la santé publique, puisque cette maladie, prévalente dans près de 80 pays, touche plus de 240 millions d'individus dans le monde (Ullah *et al.*, 2020).

Diverses techniques basées sur les cf-pDNA ont été testées afin de déterminer leur intérêt dans la détection des parasites *Schistosoma* : les résultats de différentes études sont présentés dans le tableau 8. Plusieurs études soulignent l'intérêt des cfDNA dans la détection précoce de la maladie chez la souris (Hussein *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2020), impliquant la possibilité d'une détection précoce chez l'homme, contrairement aux techniques habituelles, permettant ainsi la mise en place précoce d'une thérapeutique adaptée. Un autre intérêt diagnostique de l'analyse des cfDNA réside dans son utilisation suite à un résultat négatif par coproscopie, tel que suggéré par Weerakoon *et al.* (2017).

En termes de monitoring thérapeutique, le suivi des cf-pDNA par PCR quantitative après la mise en place d'un traitement a montré une augmentation initiale de la quantité de cf-pDNA retrouvés dans le sérum des souris, avant sa diminution et sa disparition totale (Eraky et Aly, 2016; Wichmann *et al.*, 2009). Cela suggère que les cf-pDNA retrouvés dans les liquides biologiques résulteraient de la mort des parasites (Eraky et Aly, 2016). Chez l'homme cependant, une durée de plusieurs mois s'est révélée nécessaire avant de ne plus détecter de cf-pDNA dans le sérum des patients : il a été proposé par Wichmann *et al.* (2009) que cette cinétique serait liée à la libération d'ADN par des œufs de parasites inactifs. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de conclure à l'apport du suivi des cf-pDNA sur l'efficacité du traitement.

**Tableau 8 : Résultats de différentes études basées sur la détection des cf-pDNA issus de parasites du genre *Schistosoma* (d'après Eraky et Aly, 2016 ; Hussein et al., 2012 ; Ullah et al. (2020) ; Weerakoon et al., 2017 ; Wichmann et al., 2009 )**

Étude (espèce infectée)	Espèce de <i>Schistosoma</i>	Échantillon	Technique	Cible	Résultats
Wichmann et al. (2009) (homme)	<i>S. mansoni</i> <i>S. hematobium</i> <i>S. japonicum</i>	Sérum	qPCR	Répétition en tandem (121 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients en infection active (œufs libérés dans les selles et les urines) confirmée : 100 % (14/14) de détection des cf-pDNA</li> <li>• Patients en infection aiguë : 100 % (8/8) de détection précoce des cf-pDNA</li> <li>• Délai de 82 à 100 semaines post-traitement avant d'avoir une PCR négative</li> </ul>
Hussein et al. (2012) (souris)	<i>S. mansoni</i>	Sérum	PCR	Répétition en tandem (121 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détection des cf-pDNA dès le 3<sup>e</sup> jour post-infection</li> <li>• Persistance de la détection d'ADN et signal de plus en plus intense au cours du suivi de l'infection</li> </ul>
Eraky et Aly (2016) (souris)	<i>S. mansoni</i>	Sérum	qPCR	Répétition en tandem (121 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détection des cf-pDNA dès le 2<sup>e</sup> jour post-infection</li> <li>• Persistance de la détection d'ADN et signal de plus en plus intense au cours du suivi de l'infection jusqu'à initiation du traitement</li> <li>• Augmentation marquée pendant 10 jours puis diminution des cf-pDNA après initiation du traitement</li> </ul>
Weerakoon et al. (2017) (homme)	<i>S. japonicum</i>	Fèces Urine Sérum Salive	ddPCR	Gène <i>nad1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Avec la copromicroscopie pour référence : bonne sensibilité de la ddPCR sur fèces (98%) et sur sérum (94%); spécificité médiocre (34 % et 42 % respectivement)</li> <li>• Praticité de récolte des échantillons (un seul pour la ddPCR contre deux pour la copromicroscopie)</li> </ul>

Étude (espèce infectée)	Espèce de <i>Schistosoma</i>	Échantillon	Technique	Cible	Résultats
Ullah <i>et al.</i> (2020) (souris)	<i>S. japonicum</i>	Sérum	PCR	Fragment <i>its2</i> (192 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Détection des cf-pDNA dès une semaine post-infection peu importe la charge infectieuse initiale</li> <li>• Absence de détection des cf-pDNA après deux semaines de traitement anti-parasitaire (praziquantel)</li> </ul>

◦ *Leishmaniose*

La leishmaniose est une affection liée aux parasites du genre *Leishmania* (regroupés en complexes, comportant chacun différentes espèces). Elle se présente sous différentes formes cliniques : viscérale, cutanée, cutanéomuqueuse. Les méthodes diagnostiques considérées comme le gold-standard présentent plusieurs inconvénients : pour la forme viscérale par exemple, la visualisation des parasites sur ponctions de moelle osseuse, rate ou nœud lymphatique est invasive, douloureuse et nécessite une certaine expertise. Depuis, d'autres méthodes ont été développées, comme la sérologie ou la PCR. Cette dernière a été décrite sur des prélèvements dont l'obtention est parfois invasive : ponctions de moelle osseuse, rate ou nœud lymphatique et sang périphérique pour la forme viscérale (Motazedian *et al.*, 2008) ; ponctions, raclages et biopsies pour les formes cutanée et cutanéomuqueuse (Veland *et al.*, 2011).

Ainsi, pour aider au diagnostic tout en limitant le recours à des procédures invasives, des techniques de PCR sur urines ayant pour but de détecter l'ADN des parasites ont fait l'objet d'études. Le choix de travailler sur des prélèvements d'urines pour la détection de la leishmaniose est pertinent pour plusieurs raisons : une insuffisance rénale a été documentée chez des patients atteints de leishmaniose viscérale, des individus ayant reçu une greffe de rein ont déclaré cette forme de leishmaniose, de l'ADN de *Leishmania infantum* a été retrouvé par qPCR dans l'urine de chiens cliniquement atteints (Motazedian *et al.*, 2008) et, en cas de forme cutanée, de l'ADN originaire du parasite peut être retrouvé dans le sang de l'hôte par dissémination hématogène. Il n'est donc pas aberrant de s'attendre de retrouver une trace du parasite dans les urines (Veland *et al.*, 2011). Le tableau 9 présente les résultats de deux études s'étant penchées sur la question en recherchant des cf-pDNA issus du kinétoplaste des *Leishmania*. Les résultats semblent prometteurs en cas de forme viscérale (Motazedian *et al.*, 2008). Cependant, l'étude de Veland *et al.* (2011) a mis en évidence une sensibilité médiocre de la PCR sur urines pour détecter les patients atteints de leishmaniose cutanée. Ce résultat s'est révélé cohérent avec l'étude de Motazedian *et al.* menée en 2008, dont la moitié de la population contrôle était atteinte de cette forme de leishmaniose et chez lesquels la PCR était négative (Motazedian *et al.*, 2008). La confirmation de ces résultats nécessite cependant de contrôler les performances de ces techniques sur des échantillons de taille plus conséquente, et de vérifier l'influence potentielle d'une exposition à long terme au parasite, en région endémique notamment.



**Tableau 9 : Spécificité et sensibilité de la PCR sur cf-pDNA contenus dans les urines de patients atteints de leishmaniose (d'après Motazedian *et al.*, 2008 ; Veland *et al.*, 2011)**

Étude	Forme de leishmaniose	Nombre de patients au diagnostic de certitude	Technique de référence	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Motazedian <i>et al.</i> (2008)	Viscérale	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients infectés : 30</li> <li>• Contrôles : 30 (5 sains, 15 cas de leishmaniose cutanée, 10 cas de paludisme / brucellose / kystes hydatiques)</li> </ul>	Parasitologie (visualisation des parasites sur ponctions de moelle osseuse)	96,8 (29/30)	100 (30/30)
Veland <i>et al.</i> (2011)	Cutanée	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patients infectés : 86</li> <li>• Contrôles : 10 (sains)</li> </ul>	Diagnostic établi en cas de positivité à deux des quatre tests suivants : frottis, culture, PCR, test de Montenegro	20,9 (18/86)	100 (10/10)

En termes de coûts et de durée des protocoles d'extraction des cf-pDNA depuis les urines des patients atteints de leishmaniose, il est possible, en vue de la réalisation d'une PCR, d'avoir recours à des kits industriels, ou à une méthode manuelle basée sur l'action de la protéinase K suivie d'une extraction par phénol-chloroforme. Pour des limites de détection identiques (0,1 pg de cf-pDNA), la technique manuelle était moins onéreuse et plus sensible que le kit de Qiagen (QIAamp DNA Mini Kit) (sensibilité de 72,7 % et de 36,3 % respectivement) : cela pourrait s'expliquer par des facteurs inhérents aux techniques d'extraction (volume initial d'urine plus important, étape de précipitation à l'éthanol avant l'extraction) (Silva *et al.*, 2014). Toutefois, cette technique d'extraction manuelle présente les inconvénients classiquement associés à l'utilisation du phénol-chloroforme, tels que cités précédemment : temps d'extraction, toxicité, utilisation d'une hotte chimique.

◦ *Strongyloïdose*

Les strongyloïdes sont des nématodes pouvant, pour deux des espèces, être à l'origine d'infection chez l'homme. Parmi ces espèces, c'est l'infection par *Strongyloides stercoralis* qui est à l'origine de la plus forte prévalence ; cependant, les méthodes de détection de l'infection recommandées par l'organisme mondial de la santé et basées sur l'identification des œufs dans les selles manquent de sensibilité (absence de recherche des larves, excrétion sporadiques des œufs) (Lodh *et al.*, 2016). Ainsi, un résultat négatif ne permet pas d'exclure une infection. D'autres techniques ont été proposées : recherche d'anticorps (utile pour mesurer l'exposition mais limitée par la diminution du titre en anticorps au cours du temps pour estimer l'incidence et la prévalence après traitement) et détection de l'ADN du parasite. Cette dernière peut se faire sur des échantillons de natures diverses : urines (Lodh *et al.*, 2016), sérum (Gorgani-Firouzjaee *et al.*, 2018) (tableau 10). Il est intéressant de noter que la PCR peut aussi être utilisée pour détecter des fragments de l'ARN ribosomique 18s, sur sérum (Gorgani-Firouzjaee *et al.*, 2018) ou sur fèces (Basuni *et al.*, 2011). D'après l'étude de Lodh *et al.* menée en 2016, la recherche des ucfDNA serait plus performante que la coprologie pour détecter l'infection (Lodh *et al.*, 2016). Cependant, tous les

gènes ne sont pas des bons candidats à la PCR sur cf-pDNA, comme montré par l'absence d'amplification du gène *cox1* (Gorgani-Firouzjaee *et al.*, 2018).

**Tableau 10 : Performances de la détection des cf-pDNA issus de *Strongyloides stercoralis* sur urine et sérum (d'après Gorgani-Firouzjaee *et al.*, 2018 ; Lodh *et al.*, 2016)**

Étude	Échantillon	Technique	Cible	Résultats
Lodh <i>et al.</i> (2016)	Urine	PCR	Séquence répétée (125 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Différence significative (<math>p = 0,0058</math>) de la prévalence de l'infection chez un échantillon de 125 individus entre la technique basée sur la recherche des ucfDNA des <i>Strongyloides</i> (44,8 %) et la coprologie (28,0 %)</li> <li>• Coprologie positive et PCR sur urine négative dans 6,4 % des cas (interprétation possible : erreur technique)</li> </ul>
Gorgani-Firouzjaee <i>et al.</i> (2018)	Sérum	PCR	Fragment du gène <i>cox1</i> (121 paires de bases)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'amplification du gène <i>cox1</i> chez les 36 patients au résultat PCR positif (interprétation possible : gène non adapté à la détection des cf-pDNA)</li> </ul>

#### ◦ *Échinococcose*

L'échinococcose est une maladie causée par des cestodes du genre *Echinococcus*, existant sous plusieurs formes cliniques : les deux plus fréquentes sont les formes alvéolaire et kystique (Fan *et al.*, 2021).

##### ▪ Échinococcose alvéolaire

L'échinococcose alvéolaire est une maladie parasitaire zoonotique causée par *Echinococcus multilocularis*, qui représente un danger pour la santé publique dans certaines régions (Europe centrale et de l'Est, Russie, Chine, nord du Japon) (Fan *et al.*, 2021). Le développement de la maladie peut être comparé à celui d'un cancer, car une croissance invasive et une dissémination à d'autres organes sont observées au cours du temps (Baraquin *et al.*, 2018). Actuellement, le diagnostic repose sur la clinique, l'imagerie (tomodensitométrie, imagerie par résonance magnétique), mais également la sérologie qui est une méthode auxiliaire notamment utile en cas de lésions atypiques (Baraquin *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2021). Cependant, il n'existe pour l'instant pas de méthodes permettant d'estimer l'efficacité de la thérapie et de réaliser un suivi de la maladie.

Plusieurs techniques ont été testées afin d'identifier l'apport des cf-pDNA dans ce contexte d'échinococcose alvéolaire. Selon la technique utilisée, les résultats diffèrent. Le recours au NGS réalisé sur les cf-pDNA d'origine parasitaire extraits du plasma de patients atteints d'échinococcose alvéolaire semble être prometteur : les cf-pDNA pourraient servir d'indicateur diagnostique auxiliaire avec une sensibilité de 100 % (contre 77,61 % pour la sérologie) et une spécificité de 90,9 %, et permettraient également de monitorer l'efficacité de la prise en charge chirurgicale (diminution significative de la concentration en cf-pDNA après chirurgie) et d'identifier

une rechute. La concentration en cf-pDNA semble également corrélée à la taille de la lésion hépatique (Fan *et al.*, 2021). Les résultats obtenus par qPCR quantitative et ddPCR sont bien moins intéressants et ne permettent pas d'apporter des informations utiles au diagnostic ou au suivi thérapeutique : dans l'étude de Baraquin *et al.* réalisée en 2018, les deux techniques appliquées à une cible nucléaire et à une cible mitochondriale n'ont permis d'identifier, au moment du diagnostic, que 11 des 31 patients atteints d'échinococcose alvéolaire soit 35,5 % (dont seulement trois patients positifs pour les deux méthodes) ; des résultats similaires ont été établis au cours du suivi après mise en place du traitement (Baraquin *et al.*, 2018). Baraquin *et al.* (2018) ont donc estimé que ces résultats décevants étaient liés à des concentrations faibles en cf-pDNA, à l'origine d'erreur d'échantillonnage.

- Échinococcose kystique

L'échinococcose kystique est une zoonose causée par *Echinococcus granulosus* : l'homme est un hôte intermédiaire accidentel, qui s'infecte suite à la consommation des œufs embryonnés libérés dans l'environnement, dans les selles des hôtes définitifs que sont les canidés (Toribio *et al.*, 2020). Cette maladie a un impact sur la santé publique, mais également sur l'économie, puisqu'elle engendre des pertes agricoles majeures chaque année en impactant les capacités de production et les performances à la reproduction des animaux de rente.

Comme pour l'échinococcose alvéolaire, le diagnostic repose sur des techniques d'imagerie (échographie ou radiographie selon la localisation (foie et poumons respectivement) avant confirmation par tomodensitométrie et imagerie par résonance magnétique), peu accessibles aux populations vivant en milieu rural qui sont pourtant les plus sujettes à la maladie ; les performances de la sérologie sont limitées. De plus, le diagnostic est difficile en début d'infection, car les patients sont majoritairement asymptomatiques. Toribio *et al.* (2020) se sont intéressés à l'apport des ucfDNA dans l'approche diagnostique de cette maladie : l'amplification par PCR d'une séquence particulière (répétition en tandem) de 133 paires de bases a semblé permettre l'identification des individus malades présentant des kystes hépatiques actifs. Chez les patients dont les kystes étaient calcifiés ou uniquement pulmonaires, les résultats se sont révélés décevants : la PCR était négative chez 50 % des patients aux kystes calcifiés et chez le patient aux kystes pulmonaires de nature mixte. Ainsi, la détection des ucfDNA pourrait s'avérer être un outil d'aide au diagnostic, à la fois efficace et peu coûteux, pour identifier les individus nécessitant des investigations complémentaires par imagerie, mais d'autres études sont nécessaires afin de confirmer ces résultats.

En termes d'options thérapeutiques, plusieurs sont disponibles selon les caractéristiques des kystes, mais le recours à l'albendazole est fréquent. Le suivi de l'efficacité de ce dernier est possible par imagerie, mais les modifications échographiques, dont l'interprétation dépend de l'imageur, surviennent souvent après un certain délai et sont parfois réversibles (Zhao *et al.*, 2021). L'étude des changements des cf-pDNA issus du parasite *Echinococcus granulosus* retrouvés dans le plasma de neuf patients atteints d'échinococcose kystique (diagnostic établi par échographie) avant et après mise en place d'une thérapie à base d'albendazole a mis en évidence une variation significative de la concentration ( $p < 0,0078$ ) et de la taille moyenne des cf-pDNA plasmatiques ( $p = 0,013$ ), toutes deux en augmentation suite au traitement (probablement suite à la nécrose des kystes), alors qu'aucune modification significative des cfDNA de l'hôte humain n'a été observée, et que l'imagerie n'a pas révélé de changement de la taille du kyste. Ainsi, les cf-pDNA issus du

parasite *Echinococcus granulosus* pourraient aider au monitoring du traitement de l'échinococcose kystique (Zhao *et al.*, 2021).

### **c. Diabète sucré**

Le diabète sucré est une endocrinopathie, retrouvée sous différentes formes classées en type, qui se caractérise par un état d'hyperglycémie prolongée (Petersmann *et al.*, 2019).

Menegazzo *et al.* (2015) ont réussi à reproduire *in vitro* la nétose, en soumettant des leucocytes à un milieu riche en glucose et donc mimant une hyperglycémie *in vivo*. Cela souligne l'implication de ce processus de mort cellulaire chez les individus en état d'hyperglycémie ; de plus, la recherche de biomarqueurs associés au processus de nétose (dont les cfDNA) a mis en évidence leur augmentation chez les patients atteints de diabète de type 1 (Klocperk *et al.*, 2021) et de type 2 (Menegazzo *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes favorisant la nétose face à une hyperglycémie n'ont pas encore été identifiés avec certitude. Ce qui est certain, c'est que les produits de la nétose sont pro-inflammatoires et pro-thrombotiques : ils peuvent donc favoriser le développement de complications chez les patients diabétiques, mais également servir de nouveau marqueurs biologiques pour diagnostiquer et suivre ces complications (Menegazzo *et al.*, 2015). L'étude des cfDNA, notamment secondairement libérés suite à la nétose, prend donc tout son sens chez les individus souffrant d'un diabète, et ce peu importe le type.

#### **a. Diabète de type 1**

Le diabète de type 1 est caractérisé par une destruction des cellules  $\beta$  du pancréas, dont le rôle réside notamment dans la sécrétion d'insuline : en cas de diabète de type 1, l'insuffisance en insuline est alors dite absolue. L'origine de cette destruction est auto-immune (présence d'auto-anticorps, à l'origine de la destruction des cellules  $\beta$  par les lymphocytes T cytotoxiques) et/ou liée à une prédisposition génétique (Husseiny *et al.*, 2012). Le diabète de type 1 représente 10 % de tous les types de diabète confondus, et se manifeste entre l'enfance et l'âge adulte (Petersmann *et al.*, 2019).

En termes de détection, celle-ci est tardive, car le diagnostic n'est établi qu'après une perte d'environ 65 % des cellules  $\beta$  du pancréas, limitant ainsi les possibilités thérapeutiques. Une détection précoce permettrait donc de mettre en place un traitement préventif adapté, le plus rapidement possible. Comme le diabète de type 1 est une maladie multifactorielle, de nombreux potentiels biomarqueurs ont fait l'objet d'études afin de déterminer s'ils permettaient de détecter les individus à haut risque. Certains se sont révélés inutiles car seulement présents en cas de diabète déjà avancé (par exemple : concentration en insuline, proinsuline et peptide C), tandis que d'autres permettent d'estimer le risque de développement de la maladie mais ne peuvent déterminer la perte de cellules  $\beta$  et sont donc plutôt utilisés pour monitorer l'avancée du diabète (par exemple : interleukine 1 $\beta$ , interféron  $\gamma$ , TNF, glutamate décarboxylase) (Zhang *et al.*, 2017). Un intérêt croissant pour les cfDNA, et leur motif de méthylation, est donc né, afin de déterminer si ceux-ci permettaient de détecter précocement la mort des cellules  $\beta$ .

Dans leur étude, Kuroda *et al.* (2009) se sont intéressés aux dinucléotides cytosine-guanosine, retrouvés au niveau des promoteurs des gènes codant pour l'insuline chez la souris et chez l'homme et jouant un rôle dans l'expression des gènes par régulation de leur transcription selon leur état de méthylation. Chez les deux espèces, les dinucléotides cytosine-guanosine des promoteurs du gène codant pour l'insuline, dits *ins*, ne sont pas méthylés au sein des cellules  $\beta$  du

pancréas, à l'inverse de ce qui est observé dans des tissus d'une autre nature (dinucléotides cytosine-guanosine majoritairement méthylés) : en effet, Akirav *et al.* (2011) ont mis en évidence que, chez l'homme, l'index de déméthylation, qui estime l'abondance relative en ADN non méthylé, est significativement plus élevé sur l'ADN isolé à partir des îlots de Langerhans que sur celui issu du rein et du foie. Ainsi, il semble pertinent de rechercher ce pattern de méthylation spécifique des cellules  $\beta$ , afin d'identifier précocement leur destruction et donc la maladie en cours. Hussein *et al.* (2012) ont développé une technique de PCR quantitative pour détecter dans le sang la présence de cfDNA non méthylés issus de la mort des cellules  $\beta$  du pancréas, et de façon plus précoce que les tests diagnostiques habituellement utilisés. Le recours à un traitement à base de streptozotocine, molécule particulièrement toxique pour les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, était à l'origine d'une variation de l'index de déméthylation après administration à des souris : une augmentation significative à huit heures et à vingt-quatre heures après le traitement (respectivement de 2,6 et de 3,8 fois, par rapport aux valeurs obtenues avant administration de la streptozotocine) a été observée. Cela met en évidence la précocité des informations apportées par les fragments d'ADN non méthylés suite à des lésions des îlots de Langerhans (Akirav *et al.*, 2011). Chez les patients au diagnostic récent de diabète de type 1 (de quatre à dix-huit mois depuis le diagnostic), la concentration en cfDNA non méthylés issus du gène *ins* était significativement plus élevée, par comparaison aux sujets sains (Akirav *et al.*, 2011; Lebastchi *et al.*, 2013; Usmani-Brown *et al.*, 2014). Cette élévation a également pu être observée chez une population normoglycémique mais considérée à haut risque de développer cette maladie, c'est-à-dire avec au moins deux auto-anticorps et des anomalies métaboliques identifiées lors d'un test de tolérance au glucose mais sans qu'un diagnostic de diabète de type 1 n'ait été établi (Herold *et al.*, 2015; Usmani-Brown *et al.*, 2014). Ces différents résultats soulignent l'intérêt diagnostique des cfDNA, biomarqueurs stables et facilement disponibles par prélèvement sanguin, permettant l'identification précoce et spécifique des fragments d'ADN issus des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans (Zhang *et al.*, 2017). De plus leur demi-vie courte, estimée à deux heures, permet d'effectuer ce monitoring en temps réel (Herold *et al.*, 2015).

### **b. Diabète de type 2**

Le diabète de type 2, forme la plus fréquente du diabète sucré, se caractérise par une résistance à l'insuline liée à une prédisposition génétique et à l'implication de nombreux facteurs. Il se déclare chez l'adulte, qui présente alors une résistance à l'insulinothérapie : le traitement repose donc sur un changement du mode de vie et des antidiabétiques oraux qui améliorent l'efficacité de l'insuline administrée (Petersmann *et al.*, 2019).

Le diabète de type 2 est associé à un certain nombre de complications, qui ont une conséquence sur la qualité et la durée de vie des patients souffrant de cette maladie (Y. Yang *et al.*, 2019). L'identification d'un marqueur pour surveiller l'apparition de ces complications permettrait donc, via leur prévention, d'améliorer la qualité de vie des patients.

Plusieurs études se sont intéressées aux altérations des 5hmC des cfDNA chez les patients souffrant de diabète de type 2 et leur lien avec les complications de cette maladie, grâce à une méthode de profilage hautement sensitive nommée 5hmC-Seal. Après élaboration d'un panel de détection basé sur 16 gènes, les marqueurs 5hmC retrouvés dans les cfDNA se sont montrés révélateurs de la présence de complications vasculaires (indépendamment de leur nature micro- ou macrovasculaire et de leur nombre) chez les patients atteints de diabète de type 2 ; les mêmes conclusions peuvent être tirées des performances d'un second panel de 13 gènes conçu pour

distinguer les patients atteints d'un seul ou de plusieurs types de complications vasculaires (Y. Yang *et al.*, 2019). Han *et al.* (2021) se sont spécifiquement penchés sur la question de la rétinopathie diabétique (complication de type microvasculaire) et ont mis au point un panel de trois gènes basé sur les marqueurs 5hmC pour distinguer la présence de cette complication chez les individus souffrant d'un diabète de type 2. Pour une valeur seuil de 29,0, le score obtenu grâce à ce modèle permettait d'atteindre une sensibilité de 88,6 % et une spécificité de 91,4 %. Ces résultats ne semblaient pas être influencés par la durée d'évolution du diabète et le caractère proliférant ou non de la rétinopathie. Le recours aux marqueurs 5hmC offrait de meilleures performances que celles obtenues par les autres variables cliniques étudiées (pour n'en citer que quelques unes : glucose, lipoprotéines de faible et de haute densité, triglycérides) pour le diagnostic des complications vasculaires (Han *et al.*, 2021; Y. Yang *et al.*, 2019), mais leur association est parfois souhaitable (tableau 11).

**Tableau 11 : Performances comparées des variables seules et combinées dans la détection de la rétinopathie diabétique (d'après Han *et al.*, 2021))**

Variables considérées	Aire sous la courbe ROC (%)	Intervalle de confiance à 95 %	Sensibilité (%) *	Spécificité (%) *
Score pondéré d'après le modèle 5hmC	91,4	[94,3 ; 98,5]	88,6 %	91,4 %
Glycémie après 2 heures de jeun	61,4	[42,7 ; 80,0]	Non précisée	Non précisée
Modèle 5hmC + Glycémie après 2 heures de jeun	96,7	[90,6 ; 100,0]	Non précisée	Non précisée

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir des résultats issus du diagnostic clinique (par utilisation d'une caméra rétinienne non mydriatique).

La recherche des complications du diabète de type 2 ne s'arrête pas à l'étude des marqueurs 5hmC. J. Liu *et al.* (2016) se sont intéressés à l'existence d'un lien entre la présence de cfDNA dans le sang des patients atteints de diabète de type 2 et la présence d'une complication d'ordre cardiaque : le dosage des cf-mtDNA plasmatiques chez les patients souffrant d'un diabète de type 2 et d'une maladie coronarienne a révélé que leur concentration était significativement plus élevée que chez ceux ne souffrant que d'une maladie coronarienne ou d'aucune des deux affections ( $p < 0,01$  dans les deux cas), et permettait également de distinguer les individus souffrant des deux maladies des individus sains avec une sensibilité de 96 % (mais une spécificité médiocre de 55,6 %) pour une valeur seuil en cf-mtDNA optimale de 1,003 ng/mL. En 2020, une étude prospective a été menée par Xuan Li *et al.* sur le pouvoir prédictif des cfDNA sériques quant à la progression d'une néphropathie diabétique, une cause majeure d'insuffisance rénale terminale qui touche 40 % des individus diabétiques et dont le diagnostic repose sur l'identification d'une albuminurie et une diminution du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) (Xuan Li *et al.*, 2020). D'après un modèle de régression logistique multivarié, il existe une association entre la concentration initiale en cfDNA sériques et la progression de la maladie rénale (estimée par suivi

du DFGe et du ratio albumine/créatinine urinaire sur trois ans), cependant inexplicée ce jour ; le rôle des cfDNA dans le développement des lésions de néphropathie diabétique reste donc à prouver.

#### **d. Lupus érythémateux disséminé (LED)**

Le LED est une maladie auto-immune dont la présentation clinique, la sévérité (moyenne à mortelle) et l'évolution (alternance entre des périodes de flambée et des périodes de rémission) sont très variables. Presque tous les organes du corps peuvent être impactés par cette maladie : peau, reins, vaisseaux, système nerveux, tractus digestif, nœuds lymphatiques (pour n'en citer que certains) (Truszevska *et al.*, 2017). Les multiples anomalies de l'immunité innée et de l'immunité adaptative, caractérisant le LED, sont à l'origine d'une production d'auto-anticorps (comme les anticorps anti-ADN double brin), d'une hyperactivation des lymphocytes, d'une inflammation chronique et du dépôt de complexes immuns. Tout cela entraîne des lésions des tissus et des organes (Truszevska *et al.*, 2017; Tug *et al.*, 2014). Il est suspecté que les cfDNA jouent un rôle dans la pathogénie du LED, d'où les nombreuses recherches dédiées à ces biomarqueurs dans ce contexte particulier.

Plusieurs études se sont intéressées à l'apport des cfDNA en termes d'aide au diagnostic. Si la maladie ne semble pas avoir d'influence sur l'intégrité des cfDNA (Tug *et al.*, 2014), la quantification du taux plasmatique en cfDNA chez les patients atteints de LED a montré une augmentation significative chez ces derniers, par rapport aux individus sains (Giaglis *et al.*, 2021; Hendy *et al.*, 2016; Tug *et al.*, 2014). En s'intéressant à la nature des cfDNA, le nombre de copies de cf-nDNA étant quasi identique chez les deux groupes, cette différence semble s'expliquer par une augmentation du nombre de cf-mtDNA en cas de LED (estimée comme étant multipliée par un facteur 8,8) et non par une variation du nombre de copies de cf-nDNA (Giaglis *et al.*, 2021). Entre la concentration totale en cfDNA (toutes natures confondues), le nombre de copies cf-nDNA et en cf-mtDNA, c'est ce dernier paramètre qui montrait les performances diagnostiques les plus intéressantes. Pour une valeur seuil de  $1,8 \cdot 10^7$  copies/mL, les cf-mtDNA permettaient d'identifier les individus souffrant de LED, même quiescent, avec une sensibilité de 87,4 % et une spécificité de 94,6 % (Giaglis *et al.*, 2021). Le lien entre les cfDNA et l'activité de la maladie a également été étudié : l'existence d'une corrélation entre la concentration plasmatique totale en cfDNA et l'index d'activité de la maladie n'a pas été systématiquement identifiée (Giaglis *et al.*, 2021; Hendy *et al.*, 2016; Tug *et al.*, 2014), mais Tug *et al.* (2014) ont cependant relevé un lien significatif entre la fluctuation de la concentration en cfDNA et le passage entre un état de rémission et un état de détérioration des patients. Le nombre de copies de cf-mtDNA, lui, était significativement associé à l'index d'activité, de façon indépendante des autres marqueurs d'activité de la maladie (Giaglis *et al.*, 2021). L'autre avantage des cf-mtDNA est de présenter une évolution corrélée à celle de l'index d'activité au cours du temps. Ainsi, dans un contexte de LED, il semble plus pertinent de s'intéresser aux cf-mtDNA, plutôt qu'à tous les types de cfDNA confondus ou aux cf-nDNA uniquement, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer avec certitude leur valeur diagnostique.

Comme expliqué ci-dessus, les manifestations cliniques du LED sont très variables, car de nombreux organes peuvent être touchés : différentes études se sont donc intéressées au lien potentiellement existant entre les cfDNA et les différentes complications associées au LED. En cas de néphrite lupique, la littérature semble se contredire : alors que Zhang *et al.* (2014) ont identifié, chez des patients souffrant de LED, une élévation de la concentration plasmatique en cfDNA en

cas de néphrite lupique, d'autant plus marquée lorsque la gloméluronéphrite était active, une autre étude a rapporté des résultats inverses et expliquait la diminution en cfDNA par une augmentation du taux circulant en anticorps anti-ADN double brin (Wang *et al.*, 2022), qui est pourtant également observée dans l'étude de Zhang *et al.* (2014). Ainsi, il semble difficile, à l'heure actuelle, de tirer des conclusions sur l'apport des cfDNA pour caractériser les manifestations cliniques associées au LED.

Le suivi des cfDNA au cours de la prise en charge médicale du LED a fait l'objet de peu de recherches. Hendy *et al.* (2016) ont mis en évidence une diminution significative de la concentration plasmatique en cfDNA après un traitement à base de molécules cytotoxiques, accompagnée d'une diminution des anticorps anti-nucléosomes et anti-ADN double brin. Cette tendance à la diminution a également été observée dans le sérum après utilisation de chloroquine, une molécule antipaludique qui bloque la voie TLR-9 (Cepika *et al.*, 2012). Le recours aux corticoïdes a également permis de faire diminuer le taux en cfDNA, mais de façon non significative, à l'inverse des deux molécules citées précédemment, ce qui suggère que c'est la diminution de l'inflammation qui fait varier la concentration sérique en cfDNA. Ainsi, le suivi des cfDNA pourrait servir au monitoring thérapeutique du LED.

#### **e. Gestation : analyses pré-natales, affections associées**

##### **a. Facteurs de variation de la fraction fœtale**

La fraction fœtale correspond à la proportion représentée par les cfDNA parmi le pool total de cfDNA d'une femme enceinte. Celle-ci est restreinte : en effet, la valeur médiane est estimée à 10 % entre la onzième à la treizième semaine de grossesse (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019). Il existe cependant plusieurs éléments à l'origine d'une variation de cette valeur, présenté dans le tableau 12.



**Tableau 12 : Effets de différents facteurs sur la valeur de la fraction fœtale (d'après Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019)**

Origine	Facteurs de variation	Effet sur la fraction fœtale
Facteurs d'origine maternelle	État d'embonpoint	Diminution
	Âge	
	Hypertension chronique	
	Multiparité	Augmentation
	Concentration sérique en $\beta$ -hCG libre et en protéine A plasmatique associée à la grossesse	
	Tabagisme	
	Ethnicité	Variable
Méthode de conception		
Facteurs d'origine fœtale	Longueur crânio-caudale	Augmentation
	Trisomie 21	

### ***b. Dépistage prénatal non invasif (DPNI)***

Depuis la découverte des cffDNA dans le plasma et le sérum de la mère par Lo *et al.*, en 1977, leur utilisation est de plus en plus répandue et est en train de devenir la méthode de choix pour détecter les anomalies fœtales au niveau chromosomique : il s'agit du dépistage prénatal non invasif (DPNI) (Carbone *et al.*, 2020). En effet, les méthodes non invasives précédemment développées, telles que l'échographie du fœtus ou le dosage de protéines et d'hormones dans le sang maternel, manquent d'exactitude, ce qui motive le recours à des méthodes plus risquées, à l'origine d'un risque de fausse couche estimé de 0,5 à 1 % : cordocentèse, échantillonnage des villosités chorales (B. Liu *et al.*, 2016). À l'heure actuelle, les cffDNA sont utilisés pour détecter les maladies monogéniques et les aneuploïdies fœtales (Alberry *et al.*, 2021).

- *Techniques d'analyses des cfDNA appliquées au DPNI*
  - Maladies monogéniques

Trois techniques permettent d'étudier les maladies monogéniques.

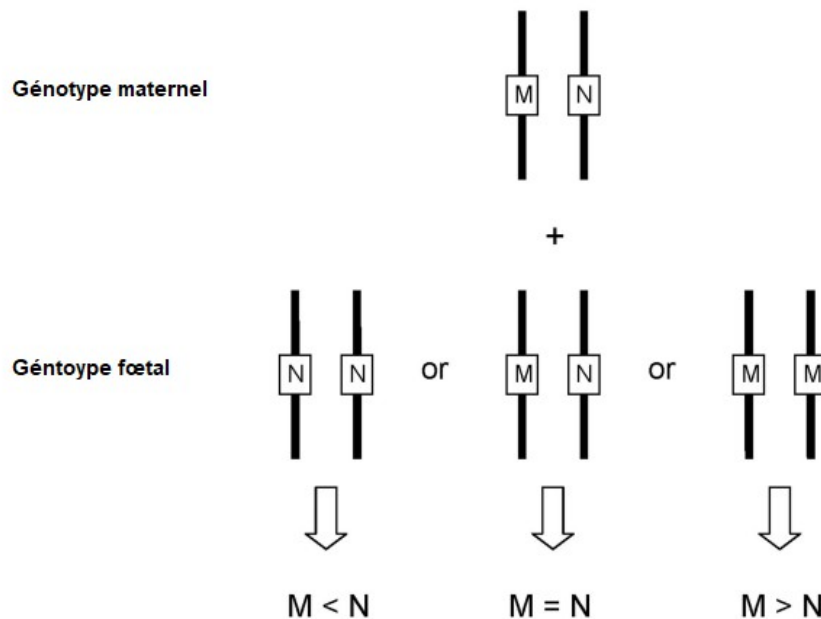
Le recours à la PCR suivie d'une digestion par une enzyme de restriction permet de détecter la présence d'allèles mutants. Les fragments d'ADN obtenus par PCR sont soumis à une digestion par une endonucléase. Cependant, la présence de polymorphisme nucléotidique crée de nouveaux sites de restriction ou en efface : cela est à l'origine de modifications de la taille des fragments, qui peuvent être identifiés par électrophorèse. C'est une méthode simple et peu coûteuse (Ota *et al.*, 2009).

Le NGS permet de séquencer les cfDNA contenus dans le plasma maternel et ainsi de rechercher un grand nombre de gènes afin d'identifier des maladies monogéniques de façon plus précoce et moins dangereuse par rapport au séquençage de l'ADN fœtal obtenu de façon invasive (Alberry *et al.*, 2021).

La technique de dosage relatif de mutation permet, à partir des cfDNA récoltés chez une mère hétérozygote, de déterminer le génotype du fœtus, malgré la présence de cfDNA d'origine maternelle : cela se fait grâce au dosage relatif des différents allèles (sauvage et mutés) d'un gène dans le plasma de la mère, qu'ils soient d'origine fœtale ou maternelle. Lun *et al.* (2008) ont proposé une approche digitale du dosage relatif de mutation, dont le principe est présenté dans la figure 13. Le recours à un test du rapport de probabilité séquentiel permet d'identifier un potentiel déséquilibre. Un déséquilibre de la proportion allélique suggère donc que le fœtus est homozygote, pour l'allèle sauvage ou pour l'allèle muté. À l'inverse, un équilibre entre les deux allèles est en faveur d'une hétérozygotie.

**Figure 13 : Principe de l'approche digitale du dosage relatif de mutation (d'après Lun *et al.*, 2008)**

- Aneuploïdies fœtales



Trois techniques permettent d'étudier les aneuploïdies fœtales.

Le séquençage de masse (s-MPS pour *shotgun massively parallel sequencing*) permet de séquencer et de compter un grand nombre (plusieurs millions) de fragments d'ADN dans le plasma, puis d'identifier le chromosome dont ils proviennent grâce à des marqueurs de séquence (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019). En cas d'aneuploïdie, par défaut (monosomie), ou par excès (trisomie), le nombre de fragments retrouvés est donc, respectivement, inférieur ou supérieur à celui d'un individu sain (Benn, 2014). Les premières études portant sur la trisomie 21, datant de 2008, ont montré que cette technique était d'une grande précision : sur un petit nombre d'échantillon, la sensibilité et la spécificité ont atteint 100 % (Lo, 2012). Cette technique a également été validée pour les trisomies 13 et 18, mais leur détection est plus difficile, en lien avec le coefficient de Chargaff (pourcentage de guanines et de cytosines au sein d'une séquence d'ADN) des chromosomes concernés, qui induit un biais lors de l'analyse. Un des autres problèmes liés à cette technique réside dans son coût élevé.

Le séquençage de masse dit ciblé (t-MPS pour *targeted massively parallel sequencing*) inclue une étape supplémentaire, qui permet une amplification sélective des régions chromosomiques d'intérêt (par exemple, les chromosomes 21, 18 et 13) et détermine l'éventuel excès d'un chromosome par rapport à un autre. Cette technique est moins onéreuse que le s-MPS, puisque tout le génome n'est pas séquencé, et permet de dénombrer un plus grand nombre de cfDNA correspondant à une région d'intérêt donnée (Benn, 2014).

Le recours au polymorphisme nucléotidique (SNP pour *single-nucleotide polymorphism*) permet l'identification de variation d'un nucléotide, entre la mère et son fœtus, au sein d'une séquence donnée (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019). L'étude de Pergament *et al.* (2014) a permis d'établir qu'une technique informatisée basée sur le recours à ces SNP présentait une haute

sensibilité et une haute spécificité pour détecter différents types d'aneuploïdies (trisomie 13, trisomie 18, trisomie 21 et monosomie X), chez les individus à faible et haut risque. Cette technique pourrait être étendue à la détection de micro-délétions ou de micro-duplications (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019).

- *Applications du DPNI*
  - Maladies monogéniques héritées des parents

Le sexage du fœtus repose sur la détection de cfDNA dérivés du chromosome Y. Ce sexage est possible dès la septième semaine d'aménorrhée (soit plus précocement que par échographie), et présente un intérêt afin de rechercher certaines affections génétiques liées au chromosome X, comme la maladie de Duchenne et l'hémophilie (Benn, 2014). Si la mère est porteuse de la maladie, alors un fœtus mâle a 50 % de chance d'hériter du chromosome X anormal et sera alors malade le cas échéant. Dans ce cas, il est pertinent d'envisager dans un second temps la recherche de la mutation par une méthode plus invasive. À l'inverse, cela s'avère inutile pour les fœtus femelles, qui seront asymptomatiques qu'ils soient porteurs ou non de la mutation (Alberry *et al.*, 2021). Cependant, la détermination du sexe grâce aux cfDNA peut poser un problème éthique, s'il en est fait usage pour des raisons non médicales.

Dans le cas où une mutation génétique est héritée du père, il est possible de dépister certaines maladies autosomiques dominantes (dystrophie myotonique, maladie de Huntington, dystonie primaire débutante) en recherchant la mutation d'origine paternelle dans le pool de cfDNA (Benn, 2014). Par exemple, chez les familles où un historique de maladie d'Huntington est rapporté, le dépistage de la maladie peut se faire par recherche de la taille de la répétition d'un trinucleotide cytosine-adénine-guanine (CAG) au niveau de l'exon 1 du gène de la huntingtine, dans le plasma de la mère, par PCR semi-quantitative (van den Oever *et al.*, 2015). Une catégorie est ensuite attribuée à chaque séquence, selon le nombre de répétition du triplet CAG (tableau 13). Dans leur étude datant de 2015, van den Oever *et al.* ont montré que les résultats de ce dépistage à l'aide des cfDNA retrouvés dans le plasma maternel concordaient avec ceux obtenus par échantillonnage des villosités choriales, avec une sensibilité et une spécificité de 100 % à condition que le test de dépistage soit répété deux à trois fois (van den Oever *et al.*, 2015). Ainsi, si le nombre de répétitions du triplet CAG est supérieur à 35, l'enfant développera avec certitude la maladie. La détermination du groupe sanguin du fœtus, pour éviter une maladie hémolytique, est une des autres applications possibles du dépistage de mutations héritées du père, notamment par génotypage Rhésus D fœtal chez les mères Rhésus D négatif (Alberry *et al.*, 2021; Benn, 2014).

**Tableau 13 : Risque encouru par le fœtus selon le nombre de répétition du trinucleotide CAG au niveau de l'exon 1 du gène de la huntingtine (d'après van den Oever *et al.*, 2015)**

<b>Nombre de répétitions du trinucleotide CAG</b>	<b>&lt; 27</b>	<b>27 à 35</b>	<b>&gt; 35</b>
<b>Risque pour le fœtus</b>	Normal : Aucun risque de développer la maladie	Intermédiaire : Foetus à risque de développer la maladie, par extension du nombre de répétitions	Anormal : Foetus qui développera la maladie de Huntington au cours de sa vie

Plusieurs cas de figure sont à considérer en cas de maladie secondaire à des mutations autosomiques récessives. Si les deux parents sont porteurs de la mutation, le fœtus pourra être considéré sain en montrant l'absence de la mutation d'origine paternelle dans le pool de cfDNA maternel. Cela peut s'avérer simple si le fœtus est hétérozygote, porteur d'un allèle paternel différent de l'allèle maternel, ou s'il est possible d'identifier clairement quel allèle a été hérité du père grâce au polymorphisme (Benn, 2014). Le diagnostic se révèle plus difficile dans le cas où les deux parents sont porteurs du même allèle muté ou s'il faut exclure le portage de l'allèle maternel chez le fœtus : cela est lié à la faible fraction représentée par les allèles fœtaux mutants en comparaison à la proportion d'allèles maternels mutants dans le pool de cfDNA plasmatiques maternels (Alyafee *et al.*, 2022). Dans leur étude, Alyafee *et al.* (2022) ont cherché à développer une méthode d'amplification du génome hautement sensible et spécifique permettant la purification et l'enrichissement des cffDNA, dans ce contexte de maladies autosomiques récessives familiales, afin d'aider à leur détection et à leur prévention. Les cffDNA ont été enrichis par un processus de double purification (permettant d'éliminer au maximum les cfDNA de grande taille, d'origine maternelle) suivi d'une amplification, afin d'atteindre une quantité de cffDNA suffisante pour rendre leur détection possible, permettant ainsi de conclure sur le statut génétique du fœtus au cours du premier trimestre de grossesse.

- Maladies monogéniques d'apparition spontanée chez le fœtus

Certaines mutations autosomiques dominantes peuvent apparaître *de novo* chez le fœtus. Ces mutations peuvent toucher le gène *fgfr-3* codant pour les récepteurs des facteurs de croissance des fibroblastes et peuvent ainsi être à l'origine de différentes dysplasies. Le choix entre une méthode invasive et une méthode non invasive dépend du diagnostic différentiel, car certaines de ces dysplasies ne peuvent être détectées par analyses des cfDNA (Alberry *et al.*, 2021; Benn, 2014).

- Aneuploïdies fœtales

Comme dit précédemment, le dépistage de la trisomie 21 (aussi appelée syndrome de Down) par les cfDNA est très sensible et très spécifique : le taux de faux positif s'élève à 0,1 % seulement. Cependant, la plupart ne s'intéresse qu'aux populations à haut risque. D'après Pergament *et al.* (2014), dans le cas où les cfDNA ont permis d'obtenir un résultat, le dépistage de la trisomie 21 a atteint 100 % de sensibilité et de spécificité chez l'ensemble de la population de femmes enceintes. Dans leur étude, Norton *et al.* (2015) se sont également intéressés à une population de femmes enceintes à faible et à haut risque. Chaque femme enceinte participant à l'étude a été soumise au dépistage standard de la trisomie 21 (dosage de la protéine A et de la sous-unité  $\beta$  de la gonadotrophine chorionique humaine (hCG), mesure de la clarté nucale) et s'est vue prélever du sang pour extraction et analyse des cfDNA. Un risque de trisomie 21 a également été attribué selon l'âge de la mère et l'âge gestationnel : la mère était considérée à haut risque si ce risque s'est révélé supérieur à 1 %. Les résultats obtenus dans l'étude sont présentés dans le tableau 14. Le dépistage de la trisomie 21 par les cfDNA présentait une sensibilité et spécificité significativement plus élevées que la méthode standard de dépistage au premier trimestre de grossesse, peu importe l'âge de la mère. Aucun faux négatif n'a été établi par utilisation des cfDNA. Cependant, 3 % des tests de dépistage par les cfDNA n'ont pas permis d'établir de résultats, possiblement à cause d'une fraction fœtale réduite. À l'heure actuelle en France, la Haute Autorité de Santé recommande l'utilisation du test ADN LC T21, basé sur l'analyse des

cffDNA, chez les femmes enceintes dont le risque estimé de trisomie 21 fœtale est compris entre 0,1 et 2 % (Haute Autorité de Santé, 2020).

**Tableau 14 : Performances du test de dépistage de la trisomie 21 par analyse des cfDNA (d'après Norton *et al.*, 2015)**

Variable	Dépistage pré-natal standard	Dépistage par les cfDNA
Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	78,9 [62,7 ; 90,4]	100 [90,7 ; 100] #
Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	94,6 [94,2 ; 94,9]	99,9 [99,9 ; 100] #
VPP (%) (Intervalle de Confiance à 95%)	3,4 [2,3 ; 4,8]	80,9 [90,7 ; 100] #
VPN (%) (Intervalle de Confiance à 95%)	99,0 [99,9 ; 100]	100 [99,9 ; 100] #

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir des résultats issus du diagnostic de trisomie 21 établi par test génétique et par observation du nouveau-né à la naissance.

# Toutes les valeurs de p value sont inférieures ou égales à 0,008.

Concernant la trisomie 13 et la trisomie 18, les résultats des études de Pergament *et al.* (2014) et de Norton *et al.* (2015) sont présentés dans le tableau 15. Les valeurs absolues de la sensibilité et de la spécificité des tests utilisant les cfDNA étaient effectivement supérieures à celles du dépistage standard, mais pas toujours significativement différentes. De plus, la sensibilité du dépistage de la trisomie 18 par les cfDNA établie par ces deux études restait faible, ce qui peut s'expliquer par la présence d'un unique faux négatif dans chacune des études, ne s'intéressant qu'à un échantillon de faible taille.

**Tableau 15 : Performances du test de dépistage de la trisomie 13 et de la trisomie 18 par analyse des cfDNA (d'après Norton *et al.*, 2015 ; Pergament *et al.*, 2014)**

Maladie	Variable	Dépistage standard	Dépistage par les cfDNA	Dépistage par les cfDNA
		Norton <i>et al.</i> (2015)	Norton <i>et al.</i> (2015)	Pergament <i>et al.</i> (2014)
Trisomie 13	Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	50,0 [1,2 – 98,7]	100 [15,8 – 100]	100 [73,5 – 100]
	Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	99,7 [99,6 – 99,8]	100 [99,9 – 100]	100 [99,6 – 100]
Trisomie 18	Sensibilité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	80,0 [44,4 – 97,5]	90,0 [55,5 – 99,7] (un faux négatif)	96,0 [79,7 – 99,9] (un faux négatif)
	Spécificité (%) (Intervalle de Confiance à 95%) *	99,7 [99,6 – 99,8]	100 [99,9 – 100]	99,9 [99,4 – 100]

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir des résultats issus du dépistage standard des trisomies 13 et 18.

Les aneuploïdies ne touchent pas que les autosomes. Les chromosomes sexuels, X et Y, peuvent également être concernés par ces anomalies : la fréquence s'élève à un cas pour 400 (Margiotti *et al.*, 2020). Plusieurs maladies sont décrites chez l'homme : monosomie X (syndrome de Turner), trisomie XXX, trisomie XXY (syndrome de Klinefelter) et trisomie XYY. Avec les méthodes classiques de dépistage, la détection non invasive de ces maladies est souvent fortuite ou peu efficace. Les données disponibles concernant l'efficacité du DPNI sont limitées, mais il semblerait que le taux de détection soit encore plus faible. Wang *et al.* (2020) ont cherché à estimer la précision du dépistage de ces aneuploïdies par des méthodes de DPNI ayant recours au séquençage de masse des cfDNA, en comparant les résultats obtenus au caryotype post-natal. Les résultats de cette étude et de celle de Margiotti *et al.* (2020) sont présentés dans le tableau 16 ; la VPP du dépistage de ces maladies s'est avérée être faible, notamment pour la monosomie X. Plusieurs éléments peuvent expliquer que le taux de faux positifs soit élevé : la présence de séquences de Chargaff, du mosaïcisme maternel ou placentaire, une trisomie XXX maternelle, la perte biologique chez la mère d'un chromosome X en lien avec l'âge. Face à ces observations et au faible nombre de cas étudiés dans la littérature, il est donc conseillé de procéder à un diagnostic post-natal en cas de DPNI positif en attendant l'obtention de nouvelles données sur la précision des informations apportées par les cfDNA (Wang *et al.*, 2020).

**Tableau 16 : VPP (%) du test de dépistage de aneuploïdies touchant les chromosomes sexuels par analyse des cfDNA (d'après Margiotti *et al.*, 2020 ; Wang *et al.*, 2020)**

Maladie	DPNI par utilisation des cfDNA	
	Wang <i>et al.</i> , 2020	Margiotti <i>et al.</i> , 2020
	VPP (%) *	
Monosomie X	21,4	69,2
Trisomie XXX	75,0	100
Trisomie XXY	90,9	80,0
Trisomie XYY	75,0	100
Toutes maladies confondues	57,6	77,3

\* Les valeurs de VPP ont été déterminées à partir des résultats issus du caryotype post-natal.

- Diabète néonatal

Le diabète néonatal est une affection qui se déclare dans les premiers mois de vie (avant six mois en général, mais parfois plus tard) d'un nourrisson. À l'inverse du diabète sucré classique, résultant d'un ensemble d'interactions entre des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques, le diabète néonatal est majoritairement lié à des mutations monogéniques : à l'heure actuelle, on en recense plus d'une vingtaine. L'identification précoce du diabète néonatal est d'importance majeure, car la mise en place d'un traitement adapté permet d'améliorer la gestion du diabète et de prévenir les conséquences de ses complications, notamment d'ordre neurologique (Lemelman *et al.*, 2018).

Pour la première fois en 2017, un *case report* a recherché une mutation du gène *kcnj11* au sein des cfDNA maternels porteur d'un fœtus à risque, car issu d'un père porteur d'une mutation par substitution à l'origine de diabète néonatal permanent et souffrant lui-même de diabète néonatal (De Franco *et al.*, 2017). En effet, le gène *kcnj11*, codant pour une des sous-unités du canal potassique dépendant de l'adénosine triphosphate, est à l'origine de la majorité des cas de diabète néonatal lorsqu'il est muté (Lemelman *et al.*, 2018). Le recours à la ddPCR n'a pas permis d'identifier la mutation paternelle au sein des cffDNA retrouvés dans le plasma maternel : le résultat de ce diagnostic prénatal s'est révélé cohérent avec le séquençage de l'ADN du nourrisson réalisé à sa naissance sur un échantillon sanguin, qui s'est révélé être non porteur de la mutation (De Franco *et al.*, 2017). L'identification de mutations d'origine maternelle héritées par le fœtus est toutefois plus complexe, car le génome maternel est source de confusion lors des analyses.



- *Limites à l'utilisation des cfDNA dans le cadre du DPNI*

Plusieurs contextes peuvent être à l'origine d'erreurs diagnostiques lors de la réalisation de tests de DPNI basés sur les cfDNA.

La « fetal sex discordance » se définit comme la contradiction du phénotype et du génotype fœtal, respectivement usuellement identifiés par échographie et test génétique. Ce phénomène est difficilement évaluable en termes de fréquence, car plusieurs termes peuvent être utilisés pour le désigner (Soto *et al.*, 2020), mais Smet *et al.* (2020) ont estimé que celle-ci s'élève à un pour 1 500 à 2 000 grossesses. Cependant, une augmentation de cette fréquence est attendue, avec l'utilisation de plus en plus importante du DPNI aboutissant à une meilleure accessibilité aux informations génétiques prénatales (Soto *et al.*, 2020). Plusieurs causes sont à l'origine de cette discordance : elles peuvent être d'ordre technique ou biologique. Des erreurs laboratoires peuvent d'abord être mises en cause, qu'elles soient liées à l'opérateur, en cas de mauvaise gestion de l'échantillon (perte, contamination, erreur d'identification), ou à la technique analytique utilisée : en effet, les cfDNA permettent de déterminer le sexe du fœtus avec de bonnes sensibilité et sensibilité, mais des erreurs persistent (Soto *et al.*, 2020).

En cas de greffe (organe, moelle osseuse) ou de transfusion, le pool de cfDNA se voit modifié : ces changements peuvent masquer les cffDNA et ainsi aboutir à des erreurs de sexage, voire à la non détection de maladies fœtales telles que des aneuploïdies (Smet *et al.*, 2020). La présence d'un processus néoplasique chez la mère peut également engendrer des résultats incohérents.

En cas de gestation multiple, le recours aux tests de DPNI est déconseillé car le risque d'erreur est important. Un cas particulier est cependant à considérer : en cas de syndrome du jumeau perdu ou évanescent, lors duquel un des deux fœtus disparaît au cours de la grossesse, il est observé une persistance de la libération de cffDNA pendant plusieurs semaines, après la résorption du fœtus ; une étude rapporte que cette libération peut perdurer jusqu'à neuf semaines après la lyse du jumeau, ce qui peut induire des erreurs dans l'interprétation des résultats des tests basés sur ces cffDNA (Smet *et al.*, 2020; Soto *et al.*, 2020).

### ***c. Affections associées à la grossesse***

Il existe une association entre les cffDNA et différents types de complications liées à la grossesse, même si les mécanismes permettant d'expliquer ce lien ne sont pas encore tout à fait identifiés (van Boeckel *et al.*, 2018).

- *Pré-éclampsie*

La pré-éclampsie, maladie dont la prévalence est en augmentation, est difficile à dépister notamment de par son origine multifactorielle. Il a cependant été déterminé, grâce à l'étude de gènes subissant une régulation épigénétique modifiant leur degré de méthylation, que le taux de cffDNA chez les femmes enceintes atteintes de pré-éclampsie serait supérieur à celui des femmes enceintes saines : en effet, chez des femmes entre 29 et 36 semaines de gestation atteintes de pré-éclampsie, la concentration plasmatique en cffDNA était multipliée d'un facteur 2,12, à l'origine d'une augmentation significative par comparaison au groupe sain (Sekizawa *et al.*, 2003). Cette augmentation a également été observée en début de grossesse (8 à 32 semaines) chez des femmes ayant ensuite déclaré une pré-éclampsie (Palei, 2021). Cependant, les études se contredisent, et de nombreuses équipes de chercheurs n'ont pas mis en évidence de lien entre

une augmentation des cffDNA au cours du premier trimestre de grossesse et le développement d'une pré-éclampsie chez la mère (Sarzynska-Nowacka *et al.*, 2019).

- *Retard de croissance intra-utérin (RCIU)*

Le RCIU, défini comme une incapacité du fœtus à se développer selon son potentiel génétique, est considéré comme étant un facteur majeur de morbidité et mortalité, au cours des périodes périnatale et infantile mais également plus tardivement, en prédisposant les individus à de multiples affections d'ordre systémique (Smith, 2018).

Sekizawa *et al.* (2003) ont quantifié la concentration en cfDNA totaux et en cffDNA (à l'aide d'un marqueur spécifique du chromosome Y, le gène *dys14*), chez des femmes portant un fœtus de sexe masculin atteint de RCIU. Par comparaison avec des femmes dont le fœtus montrait une croissance normale, aucune différence significative n'a été mise en évidence en termes de concentration en cfDNA totaux ou en cffDNA. Quelques années plus tard, une étude sur le sujet a été menée en prenant en compte les différentes causes possibles de RCIU, notamment l'insuffisance placentaire (Al Nakib *et al.*, 2009). Contrairement à ce qui avait été établi en 2003 par Sekizawa *et al.*, les femmes dont le fœtus présentait un RCIU ont montré une concentration plasmatique en cfDNA totaux significativement supérieure à celle des femmes au fœtus sain ( $p < 0,001$ ), indépendamment de l'âge gestationnel. En cas de RCIU secondaire à une insuffisance placentaire, la concentration était d'autant plus élevée et significativement différente que lorsqu'une autre cause était responsable ( $p = 0,001$ ). La concentration en cffDNA, identifiés grâce au gène *sry* spécifique du chromosome Y du fœtus (tous de sexe masculin ici), n'était significativement différente entre les groupes aux fœtus atteints de RCIU et le groupe aux fœtus sains qu'au troisième trimestre de grossesse, mais ne permettait pas de discriminer l'insuffisance placentaire d'une autre cause de RCIU. Il a été supposé que le choix du gène utilisé pour détecter les cffDNA pouvait être responsable de ce résultat (Al Nakib *et al.*, 2009), puisque la même année, Alberry *et al.* (2009) ont postulé que le gène *dys14* pourrait permettre d'atteindre une meilleure sensibilité et précision par comparaison au gène *sry*, du fait de leur nombre de copies différent par chromosome Y (respectivement dix copies et une copie).

Cependant, le véritable intérêt clinique des cfDNA reste encore à prouver : en termes de diagnostic étiologique, la valeur seuil de 1,613 copies/mL de cfDNA totaux chez une mère porteuse d'un fœtus atteint de RCIU n'a permis d'identifier une insuffisance placentaire qu'avec 78,95 % de sensibilité et 61,29 % de spécificité ; le Doppler, utilisé pour rechercher des anomalies utérines, a fait preuve d'une efficacité bien meilleure pour identifier des dommages placentaires, toutes causes de RCIU confondues (Al Nakib *et al.*, 2009). Même si une fraction fœtale réduite est observée dans les cas de RCIU précoces, aucune étude n'a prouvé sa supériorité par rapport aux autres marqueurs de dysfonctionnement placentaire (Morano *et al.*, 2018).

- *Fausse couche*

L'avortement spontané, aussi appelé fausse couche, survient avant la vingtième semaine de grossesse ou la vingt-deuxième semaine d'aménorrhée ; il est qualifié de précoce ou de tardif selon le moment précis de sa survenue (premier ou deuxième trimestre de grossesse). Cette complication est assez fréquente, et concerne 15 % des grossesses (Vidal, 2013a). On distingue plusieurs causes de fausses couches : celles liées à l'embryon lui-même telles que des anomalies chromosomiques ou de développement, celles liées à la santé de la mère ou encore les causes imputables à des facteurs externes (infection par des agents pathogènes, toxiques, substances

récréatives) (Vidal, 2013b). Il est important d'identifier la cause d'une fausse couche, car cela peut impacter le pronostic des futures gestations (Colley *et al.*, 2020). À l'heure actuelle, en cas de fausse couche, les tests génétiques utilisent les produits de conception (tissus placentaires et fœtaux) ; cependant, la bonne interprétation des résultats du test nécessite que ces tissus soient frais et non contaminés, notamment par les cellules maternelles. De plus, dans de nombreuses instances, ces tissus peuvent ne plus être disponibles ou tout simplement non envoyés en laboratoire par les patientes (Colley *et al.*, 2020). Le recours à l'analyse des cfDNA, contenus dans un simple échantillon sanguin, et déjà utilisés dans le cadre du DPNI, permettrait d'identifier des anomalies chromosomiques à l'origine d'avortements spontanés.

Peu d'études se sont intéressées à l'analyse des cfDNA dans l'établissement d'un diagnostic chez des femmes dont la grossesse s'est compliquée d'une fausse couche. Le tableau 17 présente les résultats de trois études ayant comparé les performances de l'analyse des cfDNA plasmatiques et de l'analyse cytogénétique des produits de conception pour identifier des anomalies chromosomiques chez ces femmes. Face à la présence de discordances entre les deux types d'analyses réalisées (surtout identifiées en cas de monosomie, de micro-délétions et de mosaïcisme diagnostiqués par analyse des produits de conception mais pas par analyse des cfDNA), Clark-Ganheart *et al.* (2015) et Colley *et al.* (2020) ont postulé que celles-ci pouvaient s'expliquer par du mosaïcisme placental confiné, qui peut ne pas être détectée par analyse des cfDNA. Les anomalies les plus fréquemment identifiées en cas de fausse couche sont les trisomies 13, 18 et 21 (Clark-Ganheart *et al.*, 2015), mais les cfDNA sont également capables de mettre en évidence des aneuploïdies plus rares telles que les trisomies 7, 10, 14 et 16 (Clark-Ganheart *et al.*, 2015; Colley *et al.*, 2020). Il y a donc plusieurs cas de figure où le recours aux cfDNA, à partir de huit semaines de grossesse, peut être intéressant et ainsi éviter aux patientes de subir une amniocentèse ou un prélèvement post-mortem des produits de conception : suspicion d'une des trois trisomies majeures lors d'un contrôle échographique, impossibilité de réaliser une analyse cytogénétique classique, préférence de la part des patientes.

**Tableau 17 : Concordance des résultats obtenus par analyse des cfDNA et par analyse cytogénétique des produits de conception pour établir un diagnostic d'anomalies chromosomiques (d'après Clark-Ganheart *et al.*, 2015 ; Colley *et al.*, 2020 ; Yaron *et al.*, 2020)**

Étude	Nombre de patientes testées pour les cfDNA et les produits de conception	Âge gestationnel au moment du diagnostic (semaines) (a) moyenne (b) médiane	Concordance des résultats obtenus par analyse des cfDNA avec ceux obtenus par analyse cytogénétique des produits de conception (%)
Clark-Ganheart <i>et al.</i> (2015)	16	16,9 <sup>(a)</sup>	87,5
Yaron <i>et al.</i> (2020)	86	9,6 <sup>(a)</sup>	82
Colley <i>et al.</i> (2020)	57	7,1 <sup>(b)</sup>	75

En cas de fausses couches récurrentes, dont la cause principale correspond à la présence d'anomalies chromosomiques aléatoires, Yaron *et al.* ont proposé en 2020 un nouvel algorithme à suivre, incluant l'analyse des cfDNA : en cas d'aneuploïdie détectée par les cfDNA à partir de la deuxième fausse couche, il n'est pas utile de procéder à de plus amples investigations ; un caryotype des deux parents doit être réalisé en cas de réarrangement chromosomique ; enfin, il est conseillé de suivre le protocole standard dans tous les autres cas (Yaron *et al.*, 2020). Dans les résultats de leur étude, cet algorithme a permis d'éviter le recours au protocole standard dans plus de la moitié des cas.

Enfin, au-delà de l'apport des cfDNA d'un point de vue purement médical, les réponses qu'ils fournissent peuvent procurer du réconfort aux parents ayant perdu leur enfant et atténuer la culpabilité ressentie suite à une fausse couche (Colley *et al.*, 2020; Yaron *et al.*, 2020).

- *Accouchement prématuré*

L'accouchement prématuré, correspondant à une mise-bas avant la trente-septième semaine de grossesse, est la première cause de morbidité et de mortalité chez les nouveaux-nés. Parmi les causes d'accouchement prématuré, le travail prématuré spontané en représente l'origine majeure (van Boeckel *et al.*, 2020), mais d'autres mécanismes peuvent être en cause, tel qu'une rupture prématurée des membranes (Farina *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, il n'existe aucun moyen de prédire la survenue d'un accouchement prématuré, et les preuves d'efficacité des thérapies préventives sont conflictuelles.

Plusieurs études ont été menées pour déterminer si les cffDNA ont un intérêt prédictif quant à la survenue d'un accouchement prématuré. Cependant, les résultats se contredisent. En effet, Farina *et al.* (2005) se sont intéressés au dosage des cffDNA (reposant sur la détection du gène *dys1* spécifique du chromosome Y du fœtus, par PCR) chez des femmes à risque d'accoucher prématurément d'un fœtus mâle, suite à un travail ou une rupture des membranes précoce, afin d'identifier un lien entre la concentration en cffDNA et la durée de gestation chez ces femmes. Les concentrations plasmatiques en cffDNA ont ensuite été converties en multiples de la médiane, et la valeur seuil de 1,82 a été retenue comme celle maximisant la différence entre les femmes ayant et celle n'ayant pas accouché de façon précoce. Ainsi, il a été mis en évidence que les taux cumulés d'accouchement à moins de 30 et de 36 semaines chez les femmes du groupe dont la concentration en cfDNA était supérieure à cette valeur seuil étaient significativement supérieurs à ceux du groupe dont la concentration en cffDNA était inférieure à cette valeur (Farina *et al.*, 2005). Deux études plus récentes, menées par Illanes *et al.* (2011) et Quezada *et al.* (2015), sur des échantillons sanguins prélevés entre 22 et 24 semaines de gestation et 11 et 13 semaines de gestation respectivement, n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélation entre la concentration plasmatique en cffDNA et l'âge gestationnel à l'accouchement. Les deux équipes ont donc conclu à l'absence d'intérêt des cffDNA pour prédire un accouchement prématuré.

- *Diabète gestationnel*

Le diabète gestationnel est défini comme toute intolérance au glucose à l'origine d'une hyperglycémie de sévérité variable, qui commence ou qui est diagnostiquée pour la première fois au cours de la grossesse. Le diabète gestationnel se résout usuellement de façon spontanée, suite à l'accouchement. Cependant, il est associé à la survenue de complications chez la mère mais également chez l'enfant, telles que des maladies cardiovasculaires et le développement d'un diabète sucré de type 2 (Plows *et al.*, 2018).

Plusieurs études se sont intéressées au lien pouvant exister entre les cffDNA et le diabète gestationnel. Les résultats sont contradictoires, certaines études ayant mis en évidence une association significative entre le diabète gestationnel et une concentration en cffDNA élevée (Shen *et al.*, 2021), faible (Thurik *et al.*, 2016), ou une absence d'association entre ces deux paramètres (Bauer *et al.*, 2006; Hopkins *et al.*, 2020). Il est donc, à l'heure actuelle, difficile de tirer des conclusions sur l'apport des cffDNA dans un contexte de diabète gestationnel.

## **f. Greffes d'organe**

Après une procédure de greffe, il est essentiel de monitorer chez le receveur l'évolution de la qualité du greffon, afin de détecter un éventuel rejet et de mettre en place une thérapie adaptée pour maintenir le patient en vie le plus longtemps possible. Cependant, les techniques actuellement utilisées pour le suivi présentent de nombreux inconvénients (Snyder *et al.*, 2011).

C'est en 1998 que la présence de cfDNA provenant du donneur, dits dd-cfDNA, a été mise en évidence chez des femmes ayant reçu une greffe de foie ou de rein (Lo *et al.*, 1998). L'intérêt des cfDNA en tant que marqueur du rejet de greffe (ou de dommages tissulaires du greffon en général) a alors été soulevé, puisque les dd-cfDNA pourraient être libérés suite à la nécrose ou à l'apoptose des cellules du greffon ou des cellules hématopoïétiques du donneur présentes dans l'organisme du receveur.

### **a. Méthodes de détection des dd-cfDNA**

La détection des dd-cfDNA était initialement réalisée chez des femmes ayant reçu un organe provenant d'un individu de sexe masculin, car celle-ci reposait sur la détection de marqueurs spécifiques du chromosome Y (Burnham *et al.*, 2017) : cependant cette configuration ne représente qu'une faible fraction des transplantations d'organes (moins de 25 %), limitant ainsi l'utilité diagnostique des cfDNA dans ce contexte (Snyder *et al.*, 2011). Une technique similaire reposait sur l'utilisation des gènes codant pour le système rhésus (Knight *et al.*, 2019). En 2011, une méthode universelle a été élaborée par Snyder *et al.* (2011) afin de détecter les dd-cfDNA peu importe le sexe du donneur et du receveur : cette méthode repose sur la détection du polymorphisme nucléotidique par utilisation du séquençage shotgun, après avoir établi une empreinte génétique spécifique du donneur et du receveur par génotypage. Cette méthode permet également de déterminer la proportion de dd-cfDNA parmi le pool total de cfDNA plasmatiques du receveur et ainsi de monitorer d'éventuelles modifications de la proportion en dd-cfDNA. Toutefois, d'autres méthodes moins coûteuses et moins chronophages ont été développées. En 2006, Gadi *et al.* ont élaboré une technique de détection basée sur la qPCR et reposant sur le polymorphisme de la séquence codant pour l'antigène leucocytaire humain (Gadi *et al.*, 2006). De façon similaire, la ddPCR peut être utilisée pour distinguer les cfDNA issus du donneur et du receveur en se basant sur des variations génétiques telles que les SNP, des insertions et délétions de bases (Martuszewski *et al.*, 2021) ; et, comme pour la qPCR, il est également possible d'utiliser l'antigène leucocytaire humaine en cas de « *mismatch* » entre le donneur et le receveur (McClure *et al.*, 2020). Grskovic *et al.* (2016) ont proposé une méthode basée sur le NGS, permettant de s'affranchir de l'étape de génotypage chez le receveur et le donneur, en utilisant 266 SNP non associés à des affections communes. Chaque SNP est amplifié et séquencé pour déterminer la proportion d'allèles du donneur et ainsi estimer la proportion de dd-cfDNA.

## **b. Application aux transplantations d'organes**

### **◦ Greffe de rein**

Le diagnostic de rejet d'une greffe de rein peut se faire par dosage de la créatinine, dont l'augmentation suggère une baisse du DFGe et ainsi une insuffisance rénale d'origine rénale. Toutefois, chez les patients ayant subi une greffe de rein, ce débit est influencé par de nombreux facteurs : cette méthode manque donc de précision et la réalisation de biopsies rénales, invasives, coûteuses et parfois d'interprétation longue, est nécessaire pour aboutir à un diagnostic de certitude (Sigdel *et al.*, 2018). Il est donc dans l'intérêt des patients de mettre au point une méthode non invasive, rapide et de confiance pour monitorer l'apparition de lésions du greffon et adapter le traitement immunosuppresseur au moment opportun (Martuszewski *et al.*, 2021). Depuis 2017, l'utilisation du test AlloSure®, reposant sur les dd-cfDNA et visant à déterminer la probabilité de rejet du greffon de rein chez des patients présentant une clinique compatible avec un épisode de rejet afin de d'estimer la nécessité de réaliser une biopsie, est prise en charge aux États Unis par l'assurance santé Medicare (Martuszewski *et al.*, 2021; Medicare Coverage Database, 2020).

Plusieurs études ont permis d'identifier une élévation significative de la proportion en dd-cfDNA chez des patients au greffon en cours de rejet actif par comparaison aux patients du groupe contrôle ne présentant pas de rejet actif (Bloom *et al.*, 2017; Sigdel *et al.*, 2018). De plus, la fraction en dd-cfDNA permettrait de suivre l'évolution de lésions précoces associées au rejet puisque aucune élévation significative n'a été retrouvée chez des patients présentant des lésions autres du greffon (rejet *borderline* ou lésions autres que le rejet) par comparaison aux patients dont le greffon est stable (Sigdel *et al.*, 2018). Dans leur étude menée en 2018, Sigdel *et al.* ont également établi qu'avec une valeur seuil de 1 %, l'utilisation de la fraction en dd-cfDNA permettait de détecter les individus en cours de rejet actif avec une sensibilité de 88,7 % et une spécificité de 72,6 %, ce qui assurait une meilleure performance que le DFGe (sensibilité de 67,8 % et spécificité de 65,3 % pour une valeur seuil de 60 mL/min/1,73m<sup>2</sup>) (Sigdel *et al.*, 2018). À l'inverse, une étude plus récente réalisée par Gielis *et al.* en 2020 n'a pas mis en évidence de supériorité de la fraction en dd-cfDNA par rapport à la mesure des paramètres rénaux (créatininémie) pour identifier un rejet aigu de greffe de rein (Gielis *et al.*, 2020).

Des études ont également été menées pour déterminer l'intérêt des cfDNA dans l'identification d'un rejet de greffe à médiation cellulaire T (TCMR pour *T-cell mediated rejection*) et/ou à médiation par anticorps (AMR pour *antibody mediated rejection*). En effet, dans ce second cas, la présence seule d'anticorps anti-donneur est insuffisante pour diagnostiquer l'AMR puisque jusqu'à 80 % des patients receveurs présentant ces anticorps ne souffrent pas d'AMR (Huang *et al.*, 2019). Initialement, aucune différence significative de la fraction en dd-cfDNA n'a été identifiée entre les patients avec AMR et avec TCMR (Sigdel *et al.*, 2018) ; cependant, un an après, Huang *et al.* (2019) ont mis en évidence une fraction significativement plus élevée en dd-cfDNA chez les patients présentant un AMR (seul ou associé à un TCMR) par comparaison aux patients sans signes histologiques de rejet ou présentant un TCMR seul, suggérant ainsi que les dd-cfDNA pourraient être utiles dans la détection de l'AMR.

Les dd-cfdDNA pourraient également être intéressants dans le monitoring d'un traitement immunosuppresseur : en effet, la courte demi-vie des cfDNA en fait les candidats idéaux pour refléter la présence de lésions d'un organe (pouvant engendrer son dysfonctionnement) suite à une greffe et sa réponse à une thérapie immunosuppressive. Dans leur étude, Shen *et al.* (2020)

se sont intéressés à la fraction en dd-cfDNA avant initiation et un jour après la fin d'un traitement immunosuppresseur à base de méthylprednisolone d'une durée de trois jours, chez des patients atteints de rejet aigu de leur greffon rénal (par AMR ou TCMR). Une diminution significative de la fraction en dd-cfDNA a été observée immédiatement après complétion du traitement puis une stabilisation au contrôle à deux semaines a été identifiée, et cela peu importe le type de rejet. La créatininémie, elle, n'a pas montré d'évolution significative avant un délai de deux semaines après la fin du traitement.

En termes de pronostic sur le long terme, une étude a été menée sur des patients ayant reçu une greffe de rein trois ans auparavant. Ces patients ont été classés en deux groupes : groupe AMR et groupe stable (qu'ils présentent des anticorps anti-donneur ou non) (Zhang *et al.*, 2020). Les patients du groupe AMR présentaient une fraction en dd-cfDNA significativement plus élevée que ceux du groupe stable. Cependant, au sein des patients stables, ceux présentant des anticorps anti-donneur montraient une fraction comparable à celui des patients AMR et significativement plus élevée que les patients sans anticorps anti-donneur : il est possible que les cytoponctions à l'aiguille fine n'aient pas permis d'identifier des lésions compatibles avec l'AMR chez certains patients, alors que la fraction en dd-cfDNA aurait permis de poser le diagnostic. Avec une valeur seuil de 1 %, Zhang *et al.* ont établi en 2020 que la fraction en dd-cfDNA permettait de distinguer les patients AMR des patients stables avec une sensibilité de 88,9 % et une spécificité de 73,7 %, permettant ainsi d'identifier précocement les patients dont le rein greffé est soumis à des lésions médiées par des anticorps (Zhang *et al.*, 2020). Ces résultats sont similaires à ceux établis précédemment par Bloom *et al.* (2017).

Le recours aux cfDNA suite à une transplantation rénale ne s'arrête pas qu'à leur étude dans le plasma. En 2019, Watson *et al.* ont développé le *Kidney Injury Test* dosant six marqueurs dans l'urine, dont les ucfDNA, afin de détecter les individus atteints de maladie rénale chronique, mais également les individus à risque de développer une maladie rénale chronique malgré des variables rénales dans les normes (Watson *et al.*, 2019). Plusieurs études se sont alors intéressées à l'intérêt du *Kidney Injury Test* appliqué aux greffes de reins. Dans l'une d'entre elles, les auteurs ont élaboré une échelle de 1 à 100 basée sur les six même marqueurs, appelée *QiSant score* (Yang *et al.*, 2020). Avec une valeur seuil de 32, le *QiSant score* permettait de distinguer les individus aux greffons stables de ceux souffrant de rejet aigu avec une sensibilité de 95,2 % et une spécificité de 95,9 %. Une seconde échelle, le *Q-Score*, développée à partir du *QiSant score*, permettait de distinguer avec plus de précision les greffons en cours de rejet aigu des greffons stables, avec une sensibilité de 95,8 % et une spécificité de 99,3 % pour la même valeur seuil (Nolan *et al.*, 2020). Cependant, aucune différence n'a été identifiée en fonction du type de rejet (TCMR ou AMR,  $p > 0,05$ ) par ces deux études (Nolan *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020). Le *QiSant score* présentait également l'avantage de pouvoir prédire un épisode de rejet de façon précoce, jusqu'à 200 jours avant que celui-ci ne soit confirmé histologiquement par biopsie (Martuszewski *et al.*, 2021).

- *Greffe de cœur*

Le gold-standard du monitoring d'une greffe de cœur repose sur la réalisation de biopsies endomyocardiques, qui permettent de grader le rejet. Cependant, cette technique n'est pas parfaite, puisque 20 % de rejets sont rapportés chez des patients dont la biopsie s'est révélée négative (Sharma *et al.*, 2021). De plus, elle présente d'autres inconvénients : elle est invasive et coûteuse, son interprétation varie selon l'expérience du pathologiste, ne corrèle pas

systématiquement à la clinique et peut être à l'origine de complications graves, bien que rares (Deshpande *et al.*, 2022; Snyder *et al.*, 2011). Environ 40 % des patients ayant subi une transplantation cardiaque sont sujets à au moins un épisode de rejet aigu de leur greffe de cœur dans la première année suivant la greffe, à l'origine d'une mortalité d'environ 10 % (Sharma *et al.*, 2021). Il est donc dans l'intérêt de tous d'identifier un marqueur sensible et spécifique, non invasif, permettant de monitorer la santé du greffon et d'identifier un rejet aigu dans un contexte de transplantation cardiaque.

Feingold *et al.* (2023) se sont intéressés à l'intérêt de l'implantation du dosage de dd-cfDNA dans le cadre de la surveillance de la santé du greffon chez des patients âgés de moins de dix ans lors de leur transplantation cardiaque. En n'ayant recours aux techniques diagnostiques habituelles qu'en cas de dépassement de la fraction en dd-cfDNA du seuil de risque faible décrit par les fabricants des tests de dosage, l'utilisation des dd-cfDNA à intervalle régulier chez les patients ayant reçu une greffe cardiaque dans leur enfance a permis de réduire de 81 % l'usage des techniques invasives que sont la biopsie endomyocardique et le cathétérisme du cœur droit, sans pour autant observer d'issue négative chez ces patients au cours des trente-cinq mois suivants.

Plusieurs études se sont intéressées à l'apport des dd-cfDNA pour diagnostiquer un rejet chez les patients ayant reçu une greffe de cœur. Les dd-cfDNA sont décrits dans la littérature comme ayant une forte VPN pour identifier un épisode de rejet ; ainsi l'identification d'une fraction en dd-cfDNA dans les normes permet d'écarter avec confiance l'hypothèse d'un rejet chez les patients ayant reçu une transplantation cardiaque (Sharma *et al.*, 2021), et cela chez les patients adultes mais également pédiatriques (Deshpande *et al.*, 2022; Richmond *et al.*, 2020). Les résultats de l'étude de Deshpande *et al.* (2022), qui ont utilisé des courbes ROC pour établir des valeurs seuil optimales chez différentes catégories d'âge, sont présentés dans le tableau 18. En cas de fraction ou de concentration en dd-cfDNA élevée, suggérant une lésion du greffon, il est conseillé de procéder à une analyse histologique sur biopsie pour établir le diagnostic, car une élévation des dd-cfDNA n'est pas spécifique de la nature de la lésion (qui peut être virale par exemple) (Sharma *et al.*, 2021).

**Tableau 18 : VPN (%) du test de détection d'un rejet de greffe cardiaque par dosage des dd-cfDNA (d'après Deshpande *et al.* ; 2022)**

Population considérée	Valeur seuil de la fraction en dd-cfDNA considérée (%)	VPN associée (%)
Population totale	0,13	99
Patients pédiatriques	0,13	99
Patients adultes	0,15	99



Le score AlloSure® Heart utilise le NGS pour quantifier les dd-cfDNA plasmatiques chez le receveur d'un greffon et permet d'identifier des signes de lésions ou de rejet du greffon (Care Dx, 2021). Kamath *et al.* (2022) ont étudié la performance de la variabilité du score AlloSure® Heart (calculée à partir des multiples valeurs obtenues au cours du suivi) pour prédire la mortalité chez des patients adultes ayant reçu une greffe de cœur. La variabilité du score AlloSure® Heart, calculée sur trois mesures, s'est révélée significativement associée à la mortalité ( $p = 0,009$ ) uniquement dans un modèle univarié. Toutefois, la valeur seuil de 0,3 permet de distinguer les patients à faible ou à haut risque de mortalité.

En termes de coût, le recours aux dd-cfDNA a l'avantage d'être beaucoup moins onéreux que les techniques précédemment utilisées dans un contexte de transplantation rénale : il a été estimé que les économies sur les vingt années suivant la greffe peuvent s'élever à au moins 8 545 \$ par patient (Feingold *et al.*, 2023), ce qui représente un argument d'importance considérable en faveur des cfDNA.

- *Greffe de poumon*

La greffe de poumon est la seule option thérapeutique envisageable pour les individus souffrant d'une affection pulmonaire terminale (Ju *et al.*, 2023). Après une greffe de poumon, les patients sont fréquemment soumis à des examens complémentaires (bronchoscopie, histologie sur biopsie transbronchiale) afin de détecter précocement l'apparition de complications. Cependant, ces procédures nécessitent une anesthésie générale, sont pour certaines invasives (biopsies) et parfois non conclusives (biopsies réalisées à l'aveugle, interprétation soumise à la variabilité inter-observateur) (Jang *et al.*, 2021). Parmi les principales complications associées à la greffe de poumon, on compte le développement d'une infection (notamment virale liée au cytomégalo virus), le rejet du greffon, dont la distinction est parfois difficile, et la dysfonction chronique du greffon pulmonaire elle-même favorisée par un épisode de rejet aigu (De Vlaminc *et al.*, 2015; Ju *et al.*, 2023). Ainsi, la durée de vie médiane après une greffe de poumon (5,3 ans) est considérablement inférieure à celle observée chez les patients ayant reçu une greffe cœur (11 ans) ou de foie (8,5 ans) (De Vlaminc *et al.*, 2015) : ces chiffres soulignent la nécessité de disposer d'outils diagnostiques précoces et précis pour optimiser la qualité et la durée de vie des patients.

L'étude de la corrélation des dd-cfDNA plasmatiques avec des indicateurs de lésions du greffons, utilisés pour guider la décision thérapeutique, montre l'intérêt potentiel de leur utilisation dans un contexte de greffe pulmonaire : en effet, il existe, avec la fraction en dd-cfDNA, une corrélation positive avec le grade histologique du TCMR (Jang *et al.*, 2021) et le diagnostic clinique d'une dysfonction chronique du greffon (Jang *et al.*, 2021), ainsi qu'une corrélation négative avec le volume expiratoire maximal seconde (De Vlaminc *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2021). Le séquençage des dd-cfDNA permet également d'identifier une complication infectieuse, et parfois même d'identifier l'agent pathogène en cause (De Vlaminc *et al.*, 2015; Pedini *et al.*, 2023). Cependant, la cinétique d'évolution des dd-cfDNA est à prendre en compte : en effet, une augmentation initiale est observée après la procédure de greffe, liée à l'inflammation secondaire à la chirurgie et au mécanisme d'ischémie reperfusion.

Pour faciliter le diagnostic des complications, plusieurs chercheurs se sont donc intéressés aux informations apportées par les dd-cfDNA. Cependant, les résultats établis se contredisent. Jusqu'à récemment, une élévation de la fraction en dd-cfDNA plasmatiques était rapportée chez les patients souffrant de rejet aigu (Ju *et al.*, 2023; Sayah *et al.*, 2020; Zou *et al.*, 2017) et de

dysfonction chronique du greffon pulmonaire (DCGP) (Ju *et al.*, 2023). Cependant, en 2023, Pedini *et al.* (2023) n'ont pas identifié de différence considérable entre le groupe infecté et le groupe rejet aigu. La littérature se contredit également concernant la présence ou non d'une différence significative entre le groupe au greffon infecté et le groupe au greffon stable (Rosenheck *et al.*, 2022; Sayah *et al.*, 2020). De façon générale, tous types de lésions confondus, Pedini *et al.* (2023) ont proposé la valeur de 1,72 % en dd-cfDNA à 30 jours post-transplantation comme valeur seuil pour décider ou non de poursuivre les explorations avec des examens parfois plus invasifs, afin d'identifier une lésion du greffon ; ce seuil prodiguait une VPN de 91,4 % et une VPP de 75,0 %. Les performances de la fraction en dd-cfDNA plasmatiques pour distinguer les différentes complications pouvant survenir après la greffe et identifier un épisode de rejet aigu sont présentées dans le tableau 19. Les valeurs prédictives négatives ainsi établies étaient élevées : cela signifie que le calcul de la fraction en dd-cfDNA était un bon indicateur de la stabilité d'une greffe et peuvent servir d'outil de surveillance de la santé d'une greffe. Une valeur en dd-cfDNA haute doit donc pousser à la réalisation d'examens supplémentaires pour établir le diagnostic de certitude d'un épisode de rejet aigu (Jang *et al.*, 2021). À l'inverse, la faible VPP est expliquée par le fait que l'examen histopathologique n'a permis de détecter qu'un tiers des cas identifiés comme positifs par les dd-cfDNA, alors que 90 % des deux tiers de cas restants (alors considérés faux positifs) étaient concordants avec des complications cliniques (Jang *et al.*, 2021). Il est donc pertinent de s'interroger sur l'existence d'erreurs à l'examen histopathologique. Dans un contexte de rejet aigu, l'évolution observée des dd-cfDNA varie selon le type de médiation : l'augmentation de la fraction en dd-cfDNA semble être plus marquée et plus fréquemment retrouvée en cas d'AMR qu'en cas de TCMR (Jang *et al.*, 2021; Pedini *et al.*, 2023).

**Tableau 19 : Évaluation par étude des aires sous la courbe ROC des performances de la fraction en dd-cfDNA plasmatiques dans la distinction des complications post-greffe pulmonaire (d'après De Vlamincq *et al.*, 2015 ; Jang *et al.*, 2021 ; Ju *et al.*, 2023)**

Étude (technique utilisée)	Complication considérée	Valeur seuil de la fraction en dd- cfDNA (%)	Sensibilité (%) *	Spécificité (%) *	VPN (%)	VPP (%)
De Vlamincq <i>et al.</i> (2015) (NGS)	Rejet aigu modéré à sévère (à distinguer d'un greffon stable)	1	100	73	Non précisée	Non précisée
Jang <i>et al.</i> (2021) (NGS)	Rejet aigu (à distinguer d'un greffon stable)	1	77	84	90	64
		0,5	95	65	96	51
Ju <i>et al.</i> (2023) (NGS)	Rejet aigu (à distinguer d'une dysfonction chronique, d'une infection et d'un greffon stable)	1,17	89,19	86,47	96,6	64,7
	Dysfonction chronique (à distinguer d'une infection et d'un greffon stable)	0,89	95	76,99	98,8	42,2

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir des résultats issus du diagnostic histologique sur biopsie transbronchiale (De Vlamincq *et al.*, 2015; Jang *et al.*, 2021), du diagnostic histologique sur biopsie transbronchiale ou du diagnostic thérapeutique (Ju *et al.*, 2023).

En cas d'infection, les cytomégalovirus représentent le danger le plus important. Chez les patients infectés par ce virus, il est possible de retrouver dans leur plasma des cf-virDNA en étant issus : le monitoring d'un rejet aigu et d'une infection au cytomégalovirus peut donc se faire simultanément, grâce au séquençage des cfDNA (De Vlamincq *et al.*, 2015). En 2015, De Vlamincq *et al.* n'ont identifié une augmentation significative des dd-cfDNA plasmatiques que lors de l'implication des cytomégalovirus, et pas lorsque d'autres pathogènes sont impliqués (De Vlamincq *et al.*, 2015). Cependant, une étude récente a mis en évidence une élévation significative de la fraction en dd-cfDNA en cas d'infection, peu importe l'agent pathogène impliqué (Pedini *et al.*, 2023). Pedini *et al.* (2023) ont également trouvé une corrélation entre la proportion de cfDNA de petite taille (entre 80 et 120 paires de bases) estimée par électrophorèse capillaire et la présence d'une infection. En associant ce marqueur avec la fraction en dd-cfDNA, les performances diagnostiques se sont vues améliorer : en cas de fraction en dd-cfDNA supérieure à 1,72 % (seuil établi précédemment), une proportion en cfDNA de petite taille supérieure à 3,7 % permettait d'identifier une infection avec une VPN de 82 % et une VPP de 100 %. De plus, ces

marqueurs ne sont pas corrélés à la CRP, et peuvent donc permettre de suivre l'évolution d'une infection localisée de façon indépendante de cette dernière, qui reflète l'inflammation systémique.

Les études s'étant intéressées à l'apport des dd-cfDNA dans le cadre de la détection d'une DCGP sont moins nombreuses. Comme cité précédemment, une augmentation significative de la fraction plasmatique en dd-cfDNA est observée en cas de DCGP (Ju *et al.*, 2023), et est notamment retrouvée en cas de phénotype obstructif (Khush *et al.*, 2021). L'étude du liquide de lavage broncho-alvéolaire révèle, lui, une élévation de la concentration totale en cfDNA par comparaison aux patients stables (J. Y. C. Yang *et al.*, 2019). Cependant, si l'établissement du diagnostic de DCGP est toujours intéressante, c'est surtout sa détection précoce et la capacité du clinicien à stratifier le risque de développer ce type de complication qui est importante, car il en relève de la survie du patient (complication non traitable) (Keller *et al.*, 2023). Le suivi de la cinétique d'évolution de la fraction en dd-cfDNA au cours des trois premiers mois suivants la transplantation a permis de montrer que les patients montrant un déclin lent suivi d'un plateau à un niveau élevé persistant de la fraction en dd-cfDNA avaient près de huit fois plus de chances de développer une DCGP que les patients ayant montré un déclin rapide de la fraction en dd-cfDNA aboutissant à une valeur faible et stable (Agbor-Enoh *et al.*, 2019). Chez les patients ayant développé une dysfonction primaire du greffon, complication qui survient dans les 72 heures suivant la transplantation, un lien entre une fraction élevée en dd-cfDNA à trois jours post-greffe et la survenue d'une DCGP *a posteriori* a été établi : en effet, parmi les patients ayant souffert d'une dysfonction primaire, ceux ayant ensuite développé une DCGP présentaient à l'admission une fraction en dd-cfDNA deux fois plus élevée que ceux n'ayant pas été touchés par cette complication chronique (Keller *et al.*, 2021). Ainsi, l'estimation précoce de la fraction en dd-cfDNA et son suivi seraient des indicateurs potentiels du risque de développement d'une DCGP chez les patients.

L'estimation de la fraction en dd-cfDNA est également intéressante en termes de suivi. Un mois avant l'établissement du diagnostic de TCMR, une augmentation de plus de 1 % a été observée chez 83 % des patients (Jang *et al.*, 2021). En ce qui concerne le monitoring thérapeutique, suite à la mise en place d'un traitement, Ju *et al.* (2023) ont rapporté, chez 18 patients ayant reçu un greffon pulmonaire, une diminution significative de la fraction en dd-cfDNA après mise en place d'un traitement adapté à la complication développée après la greffe (rejet aigu, dysfonction chronique ou infection) : ce résultat suggère que les dd-cfDNA peuvent également aider à évaluer l'efficacité d'une thérapie.

À l'heure actuelle, des tests (AlloSure®, Prospera™) dont l'objectif est de déterminer la fraction en dd-cfDNA ont déjà été validés et commercialisés en vue de leur utilisation clinique chez des patients ayant reçu une greffe de poumon : d'autres études sont en cours pour préciser les performances de ces tests diagnostiques (Rosenheck *et al.*, 2022).

- *Greffe de foie*

La greffe de foie est un outil thérapeutique crucial en cas de maladie hépatique avancée. *A posteriori*, le patient reste tout de même à risque, notamment à cause de complications secondaires : infection, épisode de rejet du greffon (et ce, malgré une thérapie immunosuppressive adaptée). Les tests de la fonction hépatique sont sensibles mais très peu spécifiques de ces complications, ce qui nécessite ainsi la réalisation d'examens supplémentaires (radiographies, endoscopies, biopsies) chronophages, coûteux et parfois invasifs. Ainsi, il est pertinent de

chercher à mettre en place de nouveaux outils diagnostiques, à la fois sensibles et spécifiques, accessibles et peu invasifs (McClure *et al.*, 2020).

Le suivi des dd-cfDNA chez des patients ayant reçu une greffe de foie montre, immédiatement suite à la transplantation, une augmentation de différents marqueurs basés sur les dd-cfDNA (fraction en dd-cfDNA (Beck *et al.*, 2013; Schütz *et al.*, 2017), concentration totale (Goh *et al.*, 2019), concentration en fragments spécifiques du chromosomes Y chez des patients de sexe féminin ayant reçu le foie d'un homme (Macher *et al.*, 2014)), probablement liée aux lésions d'ischémie reperfusion (Schütz *et al.*, 2017). En l'absence de complication, une diminution est ensuite observée pour atteindre un niveau stable. Par exemple, immédiatement après la greffe, la fraction en dd-cfDNA s'élève à 90 %, et diminue jusqu'à atteindre moins de 15 % à dix jours post-greffe sans complications (Beck *et al.*, 2013). À terme, pour les patients stables, la médiane de la fraction en dd-cfDNA se situe à 3,3 % (Schütz *et al.*, 2017), et il est considéré que la valeur haute de la fraction en dd-cfDNA est de 10 % : le dépassement de ce seuil suggère une lésion du greffon (Beck *et al.*, 2013; Schütz *et al.*, 2017). Chez les patients du groupe ayant déclaré un rejet aigu, la médiane se situe plutôt autour de 29,6 % (Schütz *et al.*, 2017).

L'apport diagnostique des dd-cfDNA a été évalué en cas de rejet et comparé aux marqueurs habituellement utilisés (tests de la fonction hépatique : alanine transaminase, aspartate transaminase, phosphatase alcaline,  $\gamma$ -glutamyltransférase, bilirubine). Tout d'abord, il est intéressant de noter que la fraction en dd-cfDNA est corrélée à ces marqueurs (Schütz *et al.*, 2017). En ce qui concerne l'évaluation de leur performances respectives, Beck *et al.* (2013) rapportent que chez un patient ayant déclaré un épisode de rejet, la fraction en dd-cfDNA a commencé à augmenter et est restée élevée (supérieure à 60 %) quelques jours avant l'établissement du diagnostic par biopsie, alors que l'aspartate transaminase a montré des fluctuations. De façon plus générale, les dd-cfDNA se sont révélés plus performants que les tests de la fonction hépatique pour identifier un rejet aigu ; en effet, la valeur de l'aire sous la courbe ROC de ces premiers était bien supérieure à celle des paramètres du panel hépatique (tableau 20) (Goh *et al.*, 2019). Cette supériorité diagnostique peut s'expliquer par le fait que les dd-cfDNA sont issus de la mort des cellules du greffon, alors que de multiples processus pathologiques peuvent générer une augmentation des paramètres hépatiques. Pour différencier les patients souffrant d'un rejet aigu du groupe d'individus stables (individus sains et patients dont le greffon est stable), Goh *et al.* ont montré en 2019 que les performances de la concentration en dd-cfDNA ainsi estimées s'élevaient à 83,3 % pour la sensibilité et 100 % pour la spécificité, pour une valeur seuil de 898 copies/mL (Goh *et al.*, 2019). Il est à noter que, suite à l'augmentation initiale des dd-cfDNA après la procédure de transplantation, et ce même en l'absence de complication, cette valeur seuil n'est intéressante qu'après un délai de deux semaines.

**Tableau 20 : Comparaison de la performance des dd-cfDNA et des paramètres du panel hépatique par études des aires sous la courbe ROC dans l'établissement du diagnostic de rejet aigu du greffon (d'après Goh *et al.*, 2019)**

Paramètre étudié	Aire sous la courbe ROC (%)	Intervalle de confiance à 95 %
dd-cfDNA (copies/mL)	96,7	[88,5 ; 100]
Alanine transaminase	64,2	[31,5 ; 96,8]
Phosphatase alcaline	48,3	[15,0 ; 81,6]
γ-Glutamyltransférerase	55,8	[24,9 ; 86,8]
Bilirubine	38,3	[9,5 ; 67,1]

*L'épisode de rejet aigu a été diagnostiqué par analyse histologique sur biopsie hépatique.*

Le rejet aigu n'est pas le seul type de complication qui peut survenir après une greffe. En cas de cholestase, la tendance était plutôt à l'augmentation des paramètres du panel hépatique et à des valeurs en dd-cfDNA similaires (concentration et fraction) à celles observées chez les patients n'ayant pas déclaré de complications après la transplantation (Beck *et al.*, 2013; Goh *et al.*, 2019). Ainsi, l'évaluation de ces différents paramètres peut aider à prendre une décision en ce qui concerne les examens d'explorations : en cas de panel hépatique anormal mais de fraction en dd-cfDNA dans les valeurs usuelles après une procédure de greffe, le clinicien peut, de façon compréhensible, choisir de retarder la réalisation de biopsies hépatiques (Goh *et al.*, 2019). À l'inverse, des paramètres hépatiques augmentés associés à une élévation des dd-cfDNA doivent inciter à réaliser cet examen.

La mesure des cfDNA permet également d'apporter des informations sur le pronostic de survie : d'après l'étude de Krenzien *et al.* (2020) les patients dont la concentration post-transplantation en cfDNA, déterminée par qPCR, était considérée élevée (concentration en fragments de 90 paires de bases supérieure à 68,4 ng/mL) présentaient une mortalité à un an post-transplantation exacerbée par rapport aux patients dont la concentration était faible. De plus, alors que d'autres paramètres ont également montré un intérêt pronostique en analyse univariée, seuls les cfDNA ont conservé cette caractéristique en analyse multivariée. Ainsi, l'estimation de la concentration en cfDNA après la procédure de greffe semble intéressante pour fournir des éléments pronostiques aux patients.

Les dd-cfDNA sont aussi utiles dans le suivi de l'efficacité d'un traitement contre les complications post-transplantation, en association avec la mesure des paramètres du panel hépatique, notamment quand leur normalisation est lente. En effet, Goh *et al.* ont montré en 2019 qu'une diminution jusqu'à normalisation de la fraction en dd-cfDNA était observée après mise en place d'un traitement en cas de rejet aigu (Goh *et al.*, 2019). Les dd-cfDNA ont également été

étudiés afin d'identifier la concentration minimale efficace en tacrolimus, un immunosuppresseur, compatible avec la stabilité du greffon : Oellerich *et al.* (2014) ont déterminé que la valeur minimale efficace du niveau résiduel en tacrolimus compatible avec l'intégrité du greffon (fraction en dd-cfDNA inférieure à 10 %) s'élevait à 6,8 µg/L.

Une autre utilisation possible des cfDNA repose sur leur potentiel comme cible thérapeutique. En effet, von Meijenfeldt *et al.* (2018) ont mis en évidence que les cfDNA étaient associés à l'activation de la coagulation survenant au cours de la procédure de greffe ; hors, il se peut que cela favorise les phénomènes de thrombose et d'ischémie reperfusion, et ainsi la survenue de complications vasculaires péri-opératoires ou post-opératoires. Cependant, aucune étude ne s'est, à l'heure actuelle, penchée sur la question. En termes de procédure thérapeutique pouvant viser les cfDNA, il est intéressant de noter que l'hémofiltration, et notamment l'hémofiltration continue, permet une certaine clairance des cfDNA et donc une diminution de leur taux circulant à la suite d'une transplantation hépatique. Il faut cependant noter que cette pratique n'a pour l'instant pas fait ses preuves en terme d'amélioration du pronostic et qu'il manque d'études s'intéressant à l'application de cette technique à des patients ne souffrant pas d'insuffisance rénale (Krenzien *et al.*, 2020).

## **g. Maladies cardio-vasculaires**

Les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de décès aux États-Unis (Ilatovskaya et DeLeon-Pennell, 2018). L'utilisation des cfDNA en tant que marqueurs diagnostiques et pronostiques est donc une source d'espoir majeure pour mieux détecter et prévenir les complications de ces affections.

### **a. Hypertension artérielle**

L'hypertension est une affection chronique, associée à un taux de mortalité élevé et étroitement liée à un état inflammatoire. Quand celle-ci n'est pas maîtrisée, une augmentation des cfDNA plasmatiques est observée. Cela s'explique par l'intervention de plusieurs processus, à l'origine de dommages tissulaires : l'augmentation en angiotensine qui provoque une inflammation favorisant la formation d'espèces dérivés de l'oxygène (telles que les radicaux libres), le stress oxydatif qui lèse l'ADN génomique, pouvant ainsi influencer la composition du pool de cfDNA et faire varier la concentration totale en cfDNA. Plusieurs études suggèrent que l'augmentation des cfDNA est associée à une perte d'élasticité artérielle, et plus généralement à des lésions vasculaires endothéliales, et pourrait ainsi servir au suivi de l'évolution de l'hypertension et au pronostic associé à la survenue de ses complications (Polina *et al.*, 2020).

Brusca *et al.* (2022) se sont intéressés aux cfDNA dans un contexte d'hypertension artérielle pulmonaire. Suite à cette étude, plusieurs conclusions ont pu être établies. Premièrement, la concentration en cfDNA était associée à la sévérité de la maladie : celle-ci était significativement augmentée chez les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire, et d'autant plus que leur score *REVEAL 2.0* (utilisé pour évaluer le pronostic et monitorer le traitement) était élevé. Cette augmentation était également associée à d'autres facteurs utilisés pour estimer le risque et la sévérité de la maladie, tels que la pression artérielle moyenne, la concentration en peptide natriurétique de type B, troponine et CRP, et bien d'autres. Les cfDNA ont également montré un intérêt pronostique, et permettaient d'estimer la durée de survie chez les individus n'ayant pas eu recours à une greffe pulmonaire : les individus situés dans le tertile

supérieur en termes de concentration en cfDNA avaient un risque 3,8 fois supérieur de décéder ou d'avoir recours à une greffe en comparaison à ceux situés dans le tertile inférieur.

### ***b. Infarctus du myocarde***

Chang *et al.* (2003) sont les premiers à s'être intéressés aux niveaux de cfDNA chez des individus souffrant d'infarctus du myocarde : ceux-ci présenteraient, en moyenne, une concentration en cfDNA multipliée par un facteur dix au minimum en comparaison à des sujets sains. Cui *et al.* (2013) se sont eux intéressés au dosage des cfDNA chez des patients souffrant de syndrome coronarien aigu (SCA), qui regroupe différentes maladies aboutissant à une réduction brutale de l'apport de sang au cœur, dont les infarctus du myocarde. En cohérence avec ce qui a été établi ci-dessus, ils ont mis en évidence une élévation significative de la concentration en cfDNA plasmatiques chez ces individus, en comparaison avec des individus sains et avec des individus souffrant d'angor stable. Chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde, la concentration en cfDNA était corrélée aux marqueurs de nécrose myocardique (troponine, créatine-kinase, CRP) ; cette corrélation était notamment forte dans le cas de la troponine. Par rapport à cette dernière, les cfDNA pourraient cependant être plus avantageux pour le suivi, du fait de leur demi-vie courte qui fait d'eux des biomarqueurs dynamiques, alors que la troponine restait augmentée jusqu'à 14 heures après l'admission. De plus, la sensibilité des cfDNA était supérieure à celle de la créatinine kinase (CK) : en effet, une augmentation de la concentration en cfDNA a été objectivée chez des individus souffrant d'infarctus du myocarde, alors que les valeurs CK étaient dans l'intervalle de référence (Polina *et al.*, 2020). Dans le cadre du SCA, la mesure de la concentration en cfDNA permettait d'identifier les individus souffrant de SCA avec beaucoup plus de sensibilité (91,85 %) que les autres marqueurs biochimiques, le plus sensible étant la créatinine kinase avec une sensibilité de 58,54 % (Cui *et al.*, 2013). De plus, les cfDNA présentaient un autre intérêt diagnostique, puisqu'ils permettaient également d'identifier une des causes sous-jacentes au SCA, leur concentration étant significativement plus élevée en cas d'infarctus du myocarde avec élévation persistante du segment ST par rapport aux autres causes (angor instable, infarctus du myocarde sans élévation du segment ST).

L'élévation des cfDNA est également associée à la sévérité des lésions : le recours au score de Gensini, utilisé pour quantifier l'importance des lésions d'athérosclérose, appliqué ici aux artères coronaires, a permis de mettre en évidence que plus le score était élevé, plus la concentration en cfDNA l'était également (Cui *et al.*, 2013). Une étude a montré que cette élévation reflétait la sévérité des lésions pendant une durée d'au moins cinq jours suivant la survenue de l'infarctus (Destouni *et al.*, 2009).

Un lien entre la survenue de complications post-infarctus et la concentration plasmatique en cfDNA a été établi : la valeur médiane du pic de concentration était significativement plus élevée d'un facteur 3,5 chez les individus appartenant au groupe ayant présenté au moins une complication après l'épisode initial d'infarctus comparé à ceux n'ayant présenté aucune complication au cours de leur hospitalisation (Destouni *et al.*, 2009). De plus, cette élévation persistait le jour suivant la survenue de la complication : cela pourrait s'expliquer par un processus de dommages tissulaires en cours.

La cinétique des cfDNA apporte des informations importantes : l'augmentation des cfDNA est également plus précoce que celle des autres marqueurs, puisqu'une élévation de leur concentration est observée dans les deux heures suivant l'apparition d'une douleur thoracique. De



plus, contrairement à la troponine qui reste augmentée jusqu'à deux semaines après l'épisode ischémique, la concentration des cfDNA est soumise à des variations rapides, permettant ainsi l'évaluation immédiate de l'efficacité d'un traitement mis en place (Polina *et al.*, 2020).

Le dosage des cfDNA serait donc complémentaire de la mesure des autres marqueurs usuellement utilisés dans le cadre des infarctus du myocarde. L'intérêt des cfDNA pour prédire le risque de développer une insuffisance cardiaque après un infarctus du myocarde reste encore à déterminer, tout comme leur potentielle implication dans la physiopathologie de cette maladie (Ilatovskaya et DeLeon-Pennell, 2018).

### **c. Fibrillation atriale**

La fibrillation atriale est le type d'arythmie le plus fréquent, associée à des complications sévères. L'électrocardiogramme permet de détecter la fibrillation atriale, mais ne permet pas d'en déterminer le stade, élément important pour le choix de la thérapie. Il est donc important de savoir l'identifier précocement, afin de prévenir l'avancée de la maladie jusqu'à un stade permanent associé à un échec thérapeutique. Les dysfonctionnements mitochondriaux étant sous-jacents à la fibrillation atriale, les cf-mtDNA issus de l'ADN mitochondrial pourraient servir de marqueurs spécifiques de la fibrillation atriale (Wiersma *et al.*, 2020).

La première étude s'étant intéressée à ce sujet n'a pas mis en évidence de différence de nombre de copies de cf-mtDNA dans le sang périphérique total ni dans le plasma des individus sains et des individus souffrant de fibrillation atriale (Soltész *et al.*, 2019). Dans leur étude datant de 2020, Wiersma *et al.* ont utilisé des échantillons de sérum et se sont intéressés à deux gènes mitochondriaux, *cox3* et *nd1*, afin de déterminer par qPCR la concentration en cf-mtDNA de patients atteints de fibrillation atriale pour la comparer à celle du groupe contrôle (Wiersma *et al.*, 2020). Les individus souffrant de fibrillation atriale paroxystique présentaient une concentration sérique en cf-mtDNA issus du gène *cox3* significativement plus élevée que la population contrôle. Chez les individus souffrant de fibrillation atriale persistante ou permanente, les concentrations en cf-mtDNA des deux gènes étaient significativement plus faibles que dans la population contrôle. Ces résultats reflètent donc l'existence d'un lien entre la concentration en cf-mtDNA et le type de fibrillation atriale.

De plus, les cfDNA peuvent être, dans certains cas, utilisés pour prédire la rechute de la fibrillation atriale après traitement : en effet, Wiersma *et al.* ont établi que les individus souffrant de fibrillation atriale paroxystique et présentant une rechute après prise en charge thérapeutique montraient des concentrations sériques en *cox3* et *nd1* significativement plus élevées que les individus sains et les individus n'ayant pas montré de rechute de leur fibrillation atriale paroxystique, deux groupes chez lesquels les concentrations sont comparables (Wiersma *et al.*, 2020).

### **d. Insuffisance cardiaque**

L'insuffisance cardiaque est une des affections cardiovasculaires les plus fréquentes, à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importantes. L'insuffisance cardiaque est liée à des changements structurels, associés à la mort de cardiomyocytes et de cellules endothéliales. Les cfDNA pourraient être utilisés pour détecter le processus de mort cellulaire ayant lieu au cours d'un processus ischémique touchant le cœur, à l'aide du gène *fam101a* permettant de détecter les acides nucléiques spécifiquement issus des cardiomyocytes, grâce à son motif de méthylation

particulier (Mansueto *et al.*, 2020). En effet, s'il n'existait pas de différence significative de la quantité en cfDNA totaux chez les patients souffrants d'insuffisance cardiaque décompensée par comparaison aux individus sains, le recours à la ddPCR pour détecter les cfDNA spécifiques des cardiomyocytes grâce au gène *fam101a* a permis de montrer une élévation significative de ceux-ci chez les individus malades (Yokokawa *et al.*, 2020). Cette élévation serait potentiellement proportionnelle au nombre de cellules mortes, permettant ainsi de quantifier le taux de mort cellulaire.

Une étude réalisée par Zaravinos *et al.* en 2011 chez un groupe de 19 patients souffrant d'un dysfonctionnement sévère du ventricule gauche a permis de mettre en évidence une diminution significative de la concentration en cfDNA (Zaravinos *et al.*, 2011). Ainsi, les cfDNA pourraient refléter l'amélioration du fonctionnement du myocarde sous traitement médical.

En ce qui concerne l'apport pronostique des cfDNA, il a été montré que dans le cadre d'une greffe de cœur, l'implantation d'un dispositif d'assistance circulatoire précédant la greffe était associée à un risque de rejet précoce du greffon plus important si le taux de dd-cfDNA était élevé dans le plasma du receveur. Les cfDNA pourraient également être utilisés pour la stratification du risque : une élévation de la concentration en cf-mtDNA était liée à une mortalité plus importante chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque aiguë (Mansueto *et al.*, 2020).

Cependant, aucune corrélation n'a été mise en évidence entre la concentration en cfDNA spécifique des cardiomyocytes et le peptide natriurétique de type B, utilisé pour évaluer l'avancée de la maladie car fortement corrélé à cette dernière : les cfDNA n'apporteraient donc pas d'information pertinente au monitoring de l'insuffisance cardiaque (Yokokawa *et al.*, 2020).

#### **e. Accident vasculaire cérébral**

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont d'une importance majeure en médecine humaine, étant la cinquième cause de mortalité chez l'homme. Il est possible de distinguer deux types d'AVC : les AVC ischémiques (qui représentent la majorité des cas) et les AVC hémorragiques (Cui *et al.*, 2020). L'identification de biomarqueurs de cette maladie fait l'objet de nombreuses recherches, afin d'identifier des éléments d'intérêt diagnostique, thérapeutique et pronostique.

##### **◦ Intérêt diagnostique**

Dans leur étude, Cui *et al.* (2020) ont mis en évidence que la concentration en cfDNA plasmatiques chez les individus souffrant d'AVC ischémique était significativement plus importante que chez les individus sains ( $p < 0,05$ ). Cependant, d'après Rainer *et al.* (2007) la protéine S100, marqueur assez spécifique du tissu cérébral, serait un meilleur marqueur diagnostique : dans leur étude, la protéine S100 était augmentée chez 64 % des patients ayant souffert d'un AVC, alors que seulement 18 % de patients présentaient une augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA (gène de la  $\beta$ -globine, non spécifique du système nerveux) mise en évidence par qPCR. Toutefois, en combinant ces deux variables, on obtient un *odd ratio* élevé (16,55) pour différencier un AVC de type hémorragique d'un autre type. L'analyse par régression logistique a permis d'apprécier le risque de survenue d'un AVC hémorragique dans les six heures suivant le début des symptômes : le risque augmentait de 110 % pour toute augmentation de 0,735  $\mu\text{g/L}$  de la concentration en protéine S100, et de 23 % pour toute augmentation de 200 *kilogenome-equivalents/L* de la concentration en fragments plasmatiques du gène de la  $\beta$ -globine.

L'étude de la taille des fragments en cfDNA a mis en évidence l'existence d'une cinétique différente de la concentration en fragments de bas poids moléculaire selon le type d'AVC : suite à un AVC hémorragique, ces fragments atteignaient leur pic de concentration (72,8 ng/mL) trois heures après le début des symptômes et un déclin survenait après six heures, jusqu'à un retour à la normale après 72 heures. En cas d'AVC ischémique, la concentration en cfDNA de bas poids moléculaire était significativement augmentée après trois heures (40,2 ng/mL), mais cette augmentation s'est poursuivie jusqu'à 48 heures (54,7 ng/mL) après le début des symptômes ; le retour à des valeurs basales était observé sur les 72 heures suivant ce pic (Vasilyeva *et al.*, 2020).

- *Intérêt pronostique*

Les cfDNA ont un intérêt pronostique. En 2003, Rainer *et al.* se sont intéressés au dosage du gène de la  $\beta$ -globine par qPCR au sein des cfDNA extraits à partir du plasma de 88 patients ayant présenté un épisode d'AVC (Rainer *et al.*, 2003). Les cfDNA ont permis d'évaluer la sévérité de l'AVC, puisque leur concentration était corrélée au score établi par l'échelle de Glasgow ( $p = 0,002$ ). L'analyse univariée a permis d'identifier trois variables significativement associées à l'issue de la maladie, dont la concentration en cfDNA plasmatiques : au sein des échantillons de plasma prélevés dans les trois heures suivant l'AVC, celle-ci s'est révélée cinq fois supérieure chez les patients ayant succombé en comparaison à ceux ayant survécu. Avec une valeur seuil de 1 400 *kilogenome-equivalents/L*, le dosage des cfDNA dans les trois heures suivant le début des symptômes a permis d'établir le taux de mortalité à l'hôpital après un AVC ischémique ou hémorragique avec une sensibilité de 100 % et une spécificité de 74,4 %. Cette étude n'a cependant pas permis de déterminer le moment optimal de prélèvement de l'échantillon pour quantifier les cfDNA. Sur sérum, il semblerait toutefois que le pic de concentration sérique soit atteint entre le troisième et le cinquième jour après l'apparition des symptômes (Glebova *et al.*, 2018).

Les cfDNA pourraient également permettre d'établir un pronostic à plus long terme : Rainer *et al.* ont établi en 2003 que le risque de mortalité dans les six mois suivants un AVC augmentait de 58,5 % à chaque fois que la concentration en cfDNA plasmatiques s'élevait de 460 *kilogenome-equivalents/L* (Rainer *et al.*, 2003). En ce qui concerne l'intérêt pronostique comparé de différents potentiels marqueurs d'AVC, il existerait une corrélation entre les concentrations en cfDNA, protéine S100 et émolase neurospécifique avec l'état clinique des patients, mesuré par l'indice de Barthel sur le long terme (douze mois). Toutefois, seule la concentration en cfDNA permettrait d'établir un pronostic de non-récupération après un an, évalué par un indice de Barthel inférieur à 100, avec une spécificité de 100 % (Glebova *et al.*, 2018). Cependant, pour Rainer *et al.* (2007), il semblerait que la protéine S100 soit un meilleur facteur de prédiction de la mortalité au long terme.

Une élévation du taux de cfDNA était également corrélée au risque de présenter un score de Rankin modifié supérieur à deux (handicap mineur au minimum) après six mois, et permettait donc d'estimer la qualité de vie des patients après leur hospitalisation avec une spécificité de 94 %, mais une sensibilité médiocre (23 %) (Rainer *et al.*, 2007, 2003). Pour une valeur seuil à 800 *kilogenome-equivalents/L*, la spécificité s'élevait à 100 % et la sensibilité était accrue à 42 % (Glebova *et al.*, 2018).

La concentration n'est pas le seul critère apportant des informations pertinentes concernant le pronostic. En effet, la taille des fragments de cfDNA semble utile : Glebova *et al.* ont établi en 2018 que les patients dont le plasma présentait des fragments de plus de 15 kilo paires de bases

ont montré une récupération plus rapide de leurs fonctions neurologiques que ce qui avait initialement été estimé à partir de leur état clinique. À l'inverse, la présence de fragments courts a été détectée chez des patients ayant déclarés des symptômes sévères et exhibant une concentration élevée en cfDNA (Glebova *et al.*, 2018).

- *Intérêt thérapeutique*

Les cfDNA présentent un autre intérêt dans un contexte d'AVC aigu. Il a été montré par plusieurs études qu'il existait un lien entre la concentration en cfDNA plasmatiques et l'issue après traitement d'un AVC (par thrombectomie mécanique ou thrombolyse intraveineuse) : l'utilisation des cfDNA permettrait donc d'adapter la décision thérapeutique selon le pronostic en complétant les informations apportées par les techniques de neuro-imagerie, notamment chez les patients pour lesquels ces examens reviennent négatifs (Fathima *et al.*, 2022). En effet, la concentration en cfDNA serait un facteur de prédiction indépendant des conséquences d'un AVC chez les patients n'ayant montré aucune anomalie aux examens d'imagerie utilisés dans ce contexte (tomodensitométrie et imagerie par résonance magnétique) (Glebova *et al.*, 2018).

- *Limites*

Dans un contexte d'AVC où la fenêtre thérapeutique est restreinte, la quantification en cfDNA d'un échantillon est un processus long, parfois trop : une accélération des méthodes analytiques est donc requise afin de bénéficier au maximum des informations apportées par les cfDNA (Glebova *et al.*, 2018).

#### **f. Arrêt cardiaque**

Après un arrêt cardiaque, il est utile de pouvoir établir un pronostic de survie chez le patient, car les multiples processus pathologiques se mettant en place secondairement à l'arrêt cardiaque et se poursuivant après la sortie d'hospitalisation sont à l'origine d'une mortalité précoce.

À travers leur étude, Huang *et al.* (2012) se sont intéressés à l'évolution de la concentration en cfDNA chez des patients ayant survécu à un arrêt cardiaque jusqu'à leur sortie de l'hôpital et chez d'autres y ayant succombé avant. Cette concentration varie au cours du temps chez les deux groupes, avec un pic à deux heures suivant l'arrêt cardiaque, dont la valeur était significativement plus élevée ( $p = 0,003$ ) chez les individus décédés à l'hôpital après l'arrêt cardiaque que chez ceux ayant survécu jusqu'à leur sortie de l'hôpital. Les médianes des concentrations en cfDNA dans les 24 heures et 72 heures suivant le retour à une circulation spontanée n'ont pas montré de différence significative entre les deux groupes. La courbe ROC a été utilisée pour déterminer une valeur seuil prédictive de la survie jusqu'à la sortie de l'hôpital après un arrêt cardiaque : la valeur seuil de 1 170 *genome-equivalents/mL* dans les deux heures suivant l'arrêt cardiaque permettait de prédire avec 77,3 % de sensibilité et 60,0 % de spécificité la mortalité au cours de l'hospitalisation. Appliquée à une étude de survie, cette valeur seuil a également permis de déterminer que les patients dont la concentration se situait en dessous (c'est-à-dire présentant une concentration inférieure à 1 170 *genome-equivalents/mL*) avaient de plus grandes chances de survivre jusqu'à 90 jours ( $p = 0,021$ ). Les cfDNA présenteraient donc un intérêt pronostique dans un contexte de réanimation suite à un arrêt cardiaque.

## h. Maladies ostéo-articulaires

### a. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde est une affection inflammatoire chronique qui correspond à une forme auto-immune d'arthrite, dont la pathogénie fait intervenir des facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux (Hashimoto *et al.*, 2021). Elle se caractérise par la présence d'auto-anticorps dirigés contre l'immunoglobuline G (appelés facteurs rhumatoïdes) et contre les protéines citrullinées (dites ACPA pour *anticitrullinated protein autoantibodies*) (Ciechomska *et al.*, 2019).

Les cfDNA ont été étudiés comme potentiels marqueurs diagnostiques de la maladie. Rykova *et al.* (2017) ont comparé les performances diagnostiques de plusieurs combinaisons de biomarqueurs de la maladie, dont les cfDNA. Quelques une de ces combinaisons sont présentées dans le tableau 21. Les cfDNA liés à la surface des cellules peuvent être isolés par utilisation d'un mélange de tampon phosphate salin et d'EDTA, puis quantifiés par qPCR. La prise en compte de ces cfDNA d'origine nucléaire ou mitochondriale permet d'améliorer la précision des tests diagnostiques pour distinguer un individu sain d'un individu atteint de polyarthrite rhumatoïde. Dans leur revue, Ciechomska *et al.* (2019) se sont intéressés aux études menées sur le motif de méthylation de l'ADN en cas de polyarthrite rhumatoïde : d'après eux, l'étude des cfDNA et de leurs aberrations de méthylation dans ce contexte pathologique permettrait d'améliorer le diagnostic de polyarthrite rhumatoïde, qui repose aujourd'hui sur des méthodes imparfaites. Cependant, aucune étude n'a encore été menée sur le sujet.

**Tableau 21 : Performance d'un test diagnostique de la polyarthrite rhumatoïde combinant plusieurs biomarqueurs (d'après Rykova *et al.*, 2017)**

Biomarqueurs utilisés	Sensibilité (%) *	Spécificité (%) *
cf-nDNA <sup>(a)</sup> + cf-mtDNA <sup>(a)</sup>	84	89
ACPA	83	90
ACPA + cf-nDNA <sup>#</sup> + cf-mtDNA <sup>#</sup>	97	98

\* Les valeurs de sensibilité et spécificité ont été déterminées à partir du diagnostic de polyarthrite rhumatoïde établi selon les critères du collège américain de rhumatologie (1987).

# Les cfDNA mesurés correspondent à la fraction de cfDNA liés à la surface cellulaire.

En ce qui concerne les informations apportées par les cfDNA sur l'intensité de l'activité de la maladie, la littérature se contredit : Rykova *et al.* (2017) n'ont pas identifié d'association significative malgré une tendance à la corrélation entre la concentration plasmatique en cf-nDNA et l'indice *Disease Activity Score 28* utilisé pour déterminer l'activité de la maladie, même si le niveau en cf-nDNA était augmenté chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde classée comme très active, par comparaison aux patients souffrant d'arthrite peu ou modérément active. À l'inverse, d'autres études ont pu mettre en évidence une corrélation significative entre la

concentration plasmatique en cfDNA, le l'indice *Disease Activity Score 28* mais aussi avec la CRP (Abdelal *et al.*, 2016; Lauková *et al.*, 2018) et la vitesse de sédimentation (Eldosoky *et al.*, 2018; Lauková *et al.*, 2018) qui sont deux marqueurs de l'inflammation et donc de l'activité de la maladie. Ainsi, malgré l'existence de contradictions, il existe plus de preuves en faveur de l'existence d'un lien entre la concentration en cfDNA plasmatiques et le niveau d'activité de la polyarthrite rhumatoïde que de l'absence d'une association entre ces deux paramètres.

Dans un contexte de polyarthrite rhumatoïde, les cfDNA auraient également un intérêt sur le plan thérapeutique. Plusieurs études se sont intéressées à l'apport des cfDNA dans le monitoring de la réponse à une biothérapie (à base de méthotrexate associé à l'étoricoxib ou au rituximab, de tocilizumab, d'abatacept ou d'un inhibiteur de TNF). Encore une fois, les résultats obtenus ne sont pas univoques quant à l'intérêt des cfDNA ici, et la comparaison de ces résultats est rendue difficile par les nombreux facteurs de variations entre les études (moment de mesure des cfDNA, molécules thérapeutiques utilisées) (Hashimoto *et al.*, 2021).

Un point intéressant à souligner est l'éventuel implication des cfDNA dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, Dong *et al.* ont montré en 2020 que la concentration médiane en cfDNA contenus dans le liquide synovial était 77 fois plus élevée que dans leur plasma et près de 39 fois plus élevée que chez les patients atteints d'arthrose (Dong *et al.*, 2020). Les cfDNA retrouvés dans le liquide synovial des patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde stimulent de la production de cytokines inflammatoires (TNF, interleukine 6) impliqués dans la pathogénèse de la maladie (alors que, *in vitro*, la même concentration chez des patients souffrant d'arthrose n'a pas montré de rôle pro-inflammatoire). Cette activité pro-inflammatoire peut s'expliquer par l'abondance de séquences cytosine-guanosine hypométhylées retrouvées au sein de ces cfDNA, qui ont une forte capacité à induire une inflammation. Ainsi, cibler les cfDNA pourrait aider à la prise en charge médicale de la polyarthrite rhumatoïde (Dong *et al.*, 2020). L'utilisation de nanoparticules cationiques (une catégorie de polymère cationique connue pour sa meilleure distribution dans les articulations inflammées) dites *scavengers* et ciblant les cfDNA a donc été proposée comme option thérapeutique (Liang *et al.*, 2018). En conditions expérimentales, les nanoparticules sont capables de prévenir l'activation des récepteurs *Toll-Like*, et secondairement la libération de cytokines inflammatoires, en se liant aux cfDNA et en les neutralisant. *In vitro*, l'administration intraveineuse de nanoparticules cationiques a eu pour effet de diminuer les symptômes d'arthrite induite par le collagène (dont la réponse inflammatoire est similaire à celle observée chez l'homme en cas de polyarthrite rhumatoïde) chez un groupe de rats de laboratoire, à la fois en phase précoce mais aussi à un stade plus tardif de la maladie, et cela de façon plus efficace que les polycations solubles. Si de nombreuses études sur le sujet restent à mener, notamment concernant la balance bénéfiques/risques de l'utilisation de nanoparticules cationiques visant les cfDNA (dont la toxicité reste non négligeable, mais pourrait être limitée par un processus de pégylation (Wu *et al.*, 2020)) et l'application clinique de cette technique, il semblerait que les cfDNA représentent une cible thérapeutique potentielle en cas de polyarthrite rhumatoïde (Liang *et al.*, 2018).

### **b. Infection de prothèse articulaire**

Après réalisation d'une arthroplastie, l'infection de la prothèse est une complication certes rare mais toutefois redoutée : en effet, la qualité de vie du patient est fortement impactée et la prise en charge de l'infection nécessite d'associer une antibiothérapie de longue durée à de multiples reprises chirurgicales (Cobra *et al.*, 2022; Schindler *et al.*, 2023). Le diagnostic peut se révéler

complicqué en l'absence de critères évocateurs (la présence de pus autour de la prothèse étant diagnostique mais loin d'être systématiquement retrouvée), et repose sur des éléments sérologiques, microbiologiques, histologiques et radiographiques. Malgré le challenge diagnostique posé par cette complication, il est cependant essentiel de bien différencier une complication septique d'une complication aseptique, puisque la prise en charge n'est pas la même. Ces dernières années, de nouveaux marqueurs diagnostiques ont été proposés pour faciliter le diagnostic mais l'identification d'un biomarqueur à la fois spécifique et sensible faciliterait la tâche aux cliniciens et améliorerait la qualité de vie des patients (Schindler *et al.*, 2023).

La quantification des cfDNA contenus dans la synovie de patients présentant une infection chronique de leur prothèse de genou a mis en évidence une augmentation significative marquée ( $122,5 \pm 57,2$  ng/ $\mu$ L, soit une multiplication par un facteur 20 environ) par comparaison aux patients dont la prothèse est saine (Cobra *et al.*, 2022). Ainsi, une valeur seuil de 15 ng/ $\mu$ L permettait de différencier la présence d'une infection de la prothèse avec une sensibilité de 96,2 % (liée à un unique faux négatif) et une spécificité de 100 % (Cobra *et al.*, 2022). À l'heure actuelle, cette étude prétend être la seule à avoir mis en évidence une élévation de la concentration en cfDNA dans le liquide synovial en cas d'infection chronique d'une prothèse articulaire ; il est toutefois intéressant de noter que les cfDNA ont permis d'identifier un processus infectieux même en cas de culture bactériologique négative, ce qui souligne leur potentiel intérêt diagnostique. Cependant, des études restent à mener pour comparer les performances diagnostiques des cfDNA à celles d'autres biomarqueurs utilisés dans ce contexte et pour en déterminer les valeurs prédictives positive et négative. En cas d'infection d'une prothèse articulaire, il semblerait que le facteur déterminant dans la réussite des démarches diagnostique et thérapeutique soit l'identification du pathogène en cause. Cependant, la culture bactériologique fait preuve d'une sensibilité variable selon les études, mais assez médiocre, ce qui est bien trop fréquemment à l'origine d'un échec thérapeutique (Indelli *et al.*, 2021). Le séquençage des cfDNA par NGS métagénomique (permettant l'identification de toutes les classes d'organismes à partir de l'échantillon prélevé chez le patient) est utilisé pour identifier la présence et la nature d'agents pathogènes responsables d'infection (par exemple en cas de sepsis, méningite bactérienne, infection parasitaire), et présente plusieurs avantages par rapport à la culture bactériologique classique : délai d'obtention des résultats plus court, détection de pathogènes dont la culture est difficile, détection de gène de résistance. Ainsi, l'utilisation du NGS métagénomique sur les cfDNA contenus dans le liquide synovial des patients souffrant d'une infection de leur prothèse articulaire pourrait donc s'avérer être un outil diagnostique très intéressant.

Ainsi, les cfDNA présentent des domaines d'application variés en médecine humaine, et leur utilisation commence à être démocratisée en pratique clinique, notamment via l'utilisation du test AlloSure® dans un contexte de transplantation d'organe. Toutefois, des études supplémentaires, afin de valider les nombreux résultats déjà établis en contexte expérimental, sont nécessaires avant d'espérer que les cfDNA puissent être couramment utilisés en routine. Si les recherches réalisées en médecine humaine sont très nombreuses, il n'en est toutefois pas de même en médecine vétérinaire. La suite de ce travail vise à établir un bilan des connaissances au sujet des cfDNA en médecine des animaux domestiques.

## 2. Utilisation actuelle des ADN libres circulant en médecine vétérinaire

### a. Oncologie

En médecine humaine, l'oncologie est le domaine ayant généré le plus de recherches au sujet des cfDNA ; la même observation peut être établie en médecine vétérinaire, mais le nombre d'études menées reste toutefois restreint. Comme en médecine humaine, l'objectif est de déterminer si les cfDNA représentent un outil d'aide au diagnostic, au pronostic et au monitoring thérapeutique afin de favoriser la survie des animaux souffrant d'un processus tumoral, la cause la plus fréquente de décès en médecine vétérinaire.

#### a. Diagnostic

La concentration médiane en cfDNA plasmatiques est significativement plus élevée chez les chiens atteints de cancers de natures diverses que chez les chiens présentant des masses bénignes (tumoraux ou non) et chez les chiens sains (tableau 22) (Kim *et al.*, 2021; Tagawa *et al.*, 2019). À l'inverse, l'index d'intégrité des cfDNA (correspondant au ratio entre fragments longs et courts) est significativement plus faible chez les chiens présentant une tumeur que chez les chiens atteints d'une maladie non néoplasique et les chiens sains, et cette diminution est d'autant plus marquée si la tumeur est de nature maligne (Beffagna *et al.*, 2017; Tagawa *et al.*, 2019). Cependant, ces variations significatives ne sont pas systématiquement retrouvées : en effet, chez des chats atteints de mélanome irien diffus, Rushton *et al.* ont montré en 2019 que la mesure de la concentration plasmatique en cfDNA et le calcul de l'index d'intégrité ne révèlent aucune différence entre les chats du groupe malade et ceux du groupe contrôle. De plus, aucune corrélation n'a pu être établie entre ces deux marqueurs et les paramètres clinico-pathologiques de la tumeur (Rushton *et al.*, 2019). Il est cependant possible que, du fait de la taille réduite des chats (par comparaison à la plupart des chiens) et d'une faible libération de cfDNA par le mélanome irien diffus, la quantité de cfDNA en circulation dans le sang soit trop faible pour être détectée ; une alternative pourrait être le dosage des cfDNA contenus dans l'humeur aqueuse, qui présente l'avantage d'être localisée à proximité de la localisation de la tumeur.

**Tableau 22 : Concentration moyenne en cfDNA plasmatiques (ng/mL) chez des chiens sains, atteints d'une affection non néoplasique et atteints d'un cancer (d'après Kim *et al.*, 2021 ; Tagawa *et al.*, 2019)**

Étude	Concentration moyenne en cfDNA plasmatiques (ng/mL)		
	Cancer	Affection de nature non néoplasique	Sains
Tagawa <i>et al.</i> , 2019	6 290	652	481
Kim <i>et al.</i> , 2021	1 553,9	1 154,4	877,8



Au sein du groupe de chiens présentant une néoplasie maligne, la concentration en cfDNA varie selon la nature de cette dernière. En effet, les chiens atteints d'une néoplasie de type lymphoïde ont montré une élévation encore plus marquée de la concentration plasmatique en cfDNA (Kim *et al.*, 2021; Tagawa *et al.*, 2019) et un index d'intégrité plus faible (Tagawa *et al.*, 2019), par comparaison à ceux atteints d'un sarcome, d'un carcinome ou d'un cancer d'une autre nature. Dans une étude s'étant intéressée au taux circulant de nucléosomes, constitués d'ADN entouré autour d'un octamère d'histones, dans le sang de chiens atteints de lymphome, il a été mis en évidence une augmentation significativement plus importante (d'un facteur 2,7) de la concentration plasmatique en nucléosomes circulants en cas de lymphome à cellules B, par rapport aux cas de lymphome à cellules T. Cependant, il est incertain si ce résultat était lié à l'inclusion de chiens au lymphome T indolent et/ou à des différences de physiopathologie entre les différents sous-types de lymphome (Dolan *et al.*, 2021). La concentration en cfDNA est également différente selon l'avancée du cancer : une augmentation significative est notée en cas de processus tumoral métastatique (Tagawa *et al.*, 2019). Ainsi, pour distinguer les chiens dont le cancer (toutes natures confondues) a métastasé des autres, une estimation de la concentration plasmatique en cfDNA offre une sensibilité de 73,7 % et une spécificité de 88,6 % pour une valeur seuil de 852 ng/mL.

Mise à part la concentration et l'index d'intégrité, l'analyse du pattern de méthylation des cfDNA est un autre élément qui peut apporter des informations intéressantes : l'étude de la méthylation des éléments nucléaires dispersés longs LINE-1 chez des chiens atteints de tumeurs mammaires (de nature diverse) a permis de mettre en évidence une hypométhylation de ce rétrotransposon, à l'origine d'une aire sous la courbe ROC d'une valeur de 0,933 pour distinguer ces chiens du groupe contrôle sain (sensibilité et spécificité non précisées) (Lee *et al.*, 2019). Cette tendance à l'hypométhylation a été retrouvée en cas de cancers d'une autre nature, mais la différence n'était cependant pas significative.

L'analyse des ctDNA, spécifiques des cellules de nature tumorale et donc porteurs du génome de ces cellules (et des altérations qu'il comporte), apporte des informations intéressantes en oncologie vétérinaire. Il a précédemment été établi qu'au moins 80 % des chiens souffrant de carcinome urothélial sont porteurs d'une mutation du gène *braf* (mutation V595E), homologue à la mutation V600E retrouvée chez les patients humains atteints de mélanome et dont les ctDNA servent de biomarqueurs spécifiques. Dans une étude s'étant intéressée à onze de ces chiens porteurs de la mutation, l'analyse des ctDNA plasmatiques a permis d'identifier la mutation chez huit des patients dès la première analyse à l'admission dans l'étude, puis chez les trois autres au cours du suivi, à une concentration significativement supérieure à celle retrouvée chez les chiens atteints d'un carcinome urothélial au gène *braf* non muté (14,01 ng/mL *versus* 0,21 ng/mL,  $p = 0,031$ ). Ainsi, la quantification des ctDNA plasmatiques mutés pourraient servir d'outil non invasif d'aide au diagnostic du carcinome urothélial canin ; cependant, aucune association n'a pu être identifiée avec le stade de la maladie ou la présence de métastases (Tagawa *et al.*, 2020). D'autres types de cancers peuvent bénéficier de l'étude des mutations portées par les ctDNA : par exemple, chez des chiens présentés pour sarcome histiocytaire, Prouteau *et al.* ont montré, à travers leur étude datant de 2020, que la recherche d'une mutation de l'oncogène *ptpn11*, présente chez jusqu'à 56,7 % des cas de sarcome histiocytaire canin, permettait de diagnostiquer de façon non invasive ce cancer avec une spécificité de 98,8 % et une sensibilité de 42,8 % (il est important de noter que, parmi les 45 chiens inclus dans l'étude, seuls 23 d'entre eux étaient effectivement porteurs de la mutation, qui a été détectée chez 21 chiens soit 91,3 % grâce à

l'analyse de leurs cfDNA plasmatiques) (Prouteau *et al.*, 2020). Chez des chiennes atteintes de tumeurs mammaires, Colombo *et al.* (2021) ont eu recours au NGS pour déterminer le type de mutation le plus fréquent et les gènes les plus couramment touchés : leurs résultats les ont amenés à suspecter l'existence d'un lien entre un polymorphisme à l'exon 11 du gène *brca2* et la carcinogenèse mammaire, puisque presque 98 % des chiennes de l'étude présentaient, au niveau de cet exon, un des trois polymorphismes à l'action probablement délétère. L'apport diagnostique des ctDNA a également été évalué chez des chiens présentant des lésions spléniques : alors qu'aucune différence significative de concentration totale en cfDNA n'a été identifiée entre des chiens présentés pour hémobdomen sur lésions spléniques bénignes ou malignes, la fraction en ctDNA a permis de distinguer les individus selon la nature de la lésion (bénigne *versus* maligne) (Favaro *et al.*, 2022). Au sein du groupe de chiens atteints de cancer, ce marqueur n'a cependant pas permis d'identifier ceux chez qui un processus métastatique était en cours. De plus, la technique utilisée (séquençage du génome complet dit *low-pass*) n'était pas adaptée à l'urgence que représente l'hémobdomen, au vu du délai nécessaire avant l'obtention des résultats (environ 24 heures dans cette étude). L'étude du pattern de fragmentation des ctDNA aurait également un intérêt en oncologie : en effet, les ctDNA seraient plus fragmentés que les cfDNA d'origine non tumorale. Une étude réalisée par Guil-Luna *et al.* en 2023 a montré que les chiennes atteintes de tumeur mammaire (toutes natures, bénignes ou malignes, confondues) présentaient une concentration significativement supérieure en fragments de petite taille (inférieure à 190 paires de bases) que les chiennes saines. De plus, en cas de carcinome, plus le stade était élevé, plus l'augmentation l'était également (Guil-Luna *et al.*, 2023). Ces résultats soulignent l'apport des ctDNA en tant que biomarqueurs dans le diagnostic de diverses néoplasies, notamment malignes, pour lesquelles l'efficacité du traitement est notamment conditionnée par la précocité du diagnostic.

### ***b. Pronostic***

Les cfDNA présentent aussi une utilité dans l'établissement d'un pronostic en oncologie vétérinaire. La concentration en cfDNA à l'admission semble être discriminante : Schaefer *et al.* (2007) ont déterminé qu'une concentration plasmatique élevée était associée à une durée de rémission significativement réduite. En utilisant comme seuil la valeur de 1 247,5 ng/mL, le taux de survie des chiens atteints de néoplasie à 60 semaines de suivi était drastiquement réduit si leur concentration plasmatique initiale en cfDNA était supérieure à cette valeur seuil (82,1 % *versus* 26,5 %) (Kim *et al.*, 2021). L'estimation du nombre d'éléments nucléaires dispersés courts au sein des cfDNA, chez des femelles atteintes de tumeur mammaire (toutes natures confondues), a permis de mettre en évidence une corrélation négative entre la durée de survie et le nombre de copies de ce type de rétrotransposon (Gelaleti *et al.*, 2014). De même, selon leur concentration initiale en ctDNA mutés pour le gène *braf*, une tendance à la réduction de la durée de survie était observée chez les chiens souffrant d'un carcinome urothélial si celle-ci est supérieure à 8,6 ng/mL (Tagawa *et al.*, 2020).

### ***c. Monitoring thérapeutique***

En plus de leur intérêt diagnostique et pronostique en oncologie vétérinaire, les cfDNA peuvent également apporter des informations sur l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux et aider à la détection de la maladie résiduelle minimale.

Concernant les cfDNA plasmatiques, la mesure de leur concentration au cours de la chimiothérapie a mis en évidence une évolution corrélée à la réponse thérapeutique. En effet, Kim *et al.* ont montré en 2021, en comparant la concentration en cfDNA chez six chiens atteints de lymphome avant et après la mise en place d'un protocole de chimiothérapie, que cette concentration était diminuée en phase de réponse complète chez les deux animaux ayant totalement répondu à la chimiothérapie, alors qu'elle augmentait au cours du temps chez les chiens ayant fini par décéder de la progression de leur cancer (après une éventuelle diminution juste après l'initiation du protocole de chimiothérapie) (Kim *et al.*, 2021). La cinétique d'évolution des cfDNA au cours de la chimiothérapie est significativement corrélée au diamètre des nœuds lymphatiques, paramètre clinique utilisé pour estimer l'efficacité du traitement.

Le suivi des ctDNA chez des chiens atteints d'un cancer fournit diverses informations. Il permet par exemple de contrôler la réponse à la chimiothérapie : chez des chiens atteints de lymphome multicentrique à cellules B de haut grade, la fraction en ctDNA était corrélée à la réponse à la chimiothérapie (taille des nœuds lymphatiques, charge tumorale) (Prouteau *et al.*, 2020) ; il en est de même de la concentration plasmatique en ctDNA porteurs de la mutation *braf* V595E chez des chiens atteints de carcinome urothélial (Tagawa *et al.*, 2020). Les ctDNA reflètent également la progression de la maladie sous traitement et l'apparition de métastases (Tagawa *et al.*, 2020), et permettent ainsi la détection d'une rechute malgré la mise en place d'un traitement, parfois plus précocement que le suivi clinique (plus d'un mois avant chez un chien suivi pour lymphome multicentrique à cellules B de haut grade) (Prouteau *et al.*, 2020).

## **b. Maladies infectieuses**

### **a. Infections bactériennes**

#### **◦ Sepsis**

Le sepsis est un syndrome fréquent chez le chien, à l'origine d'une morbidité et d'une mortalité importantes, pouvant s'élever jusqu'à 68 % pour cette dernière (Letendre et Goggs, 2018a). L'identification d'un biomarqueur fiable et simple à doser permettant de faciliter la gestion des patients présente donc un intérêt non négligeable.

Dans une première étude, Letendre et Goggs (2017) ont mis en évidence une augmentation significative des cfDNA plasmatiques chez les chiens souffrant de sepsis de causes variées, par rapport aux chiens sains constituant le groupe contrôle, supposant que cela pouvait s'expliquer par une élévation significative, non confirmée toutefois, de la nétose. De plus, les chiens présentant une bactériémie, diagnostiquée par culture bactériologique, ont montré des concentrations significativement plus élevées en cfDNA : cette information aurait un intérêt thérapeutique, permettant ainsi l'adaptation précoce du traitement (Letendre et Goggs, 2018a).

En 2018, Letendre et Goggs se sont ensuite intéressés à l'apport pronostique des cfDNA dans un tel contexte. Après avoir reconfirmé leur constatations précédentes, ils n'ont cependant pas observé de différence significative entre les chiens souffrant de sepsis et ceux atteints de syndrome inflammatoire à réponse systémique non infectieux (Letendre et Goggs, 2018a). Aucune association n'a été établie entre la concentration plasmatique en cfDNA et la lactatémie, les numérations leucocytaires et neutrophiliques, et le score de sévérité APPLE (pour *acute patient physiology and laboratory evaluation*) complet. Cependant, le recours à un score APPLE simplifié, qui a été estimé plus fiable pour évaluer la sévérité du sepsis chez le chien et prédire le décès de

l'animal (Pashmakova *et al.*, 2014), a, lui, montré une corrélation avec les cfDNA. Enfin, une mortalité plus importante a été identifiée chez les chiens présentant à la fois une neutropénie et une concentration en cfDNA élevée.

- *Pyomètre*

Le pyomètre est une affection touchant la femelle entière qui se caractérise par une accumulation intra-utérine de pus secondaire à une infection bactérienne, survenant au cours du dioestrus du fait d'un contexte hormonal favorisant (imprégnation par les œstrogènes et la progestérone). Le pyomètre s'accompagne de complications sérieuses (telles que le développement d'une insuffisance rénale, d'un syndrome inflammatoire à réponse systémique, ou d'un sepsis), ce qui fait d'elle une affection mortelle en cas de prise en charge inadaptée ou absente (Hagman, 2012).

Chez les chiennes atteintes de pyomètre, la concentration plasmatique en cfDNA était significativement supérieure à celle des chiens sains et associée à des paramètres reflétant la sévérité du pyomètre (Ahn *et al.*, 2021) ; cependant, lors d'un contrôle suite à une prise en charge chirurgicale par ovariohystérectomie (Ahn *et al.*, 2021), ou un traitement médical basé sur une antibiothérapie (Letendre et Goggs, 2017), aucune variation significative de la concentration plasmatique en cfDNA n'a été observée. Ces résultats suggèrent donc que les cfDNA peuvent être utilisés comme marqueurs de l'inflammation associée au pyomètre et de sa sévérité, mais ne sont pas un élément utile au monitoring précoce de la récupération clinique.

- *Mammite*

La mammite correspond à une inflammation de la glande mammaire, causée par différents agents pathogènes, majoritairement des bactéries. En élevage bovin laitier, la mammite est à l'origine de pertes économiques considérables : diminution du rendement et de la qualité du lait, coût du traitement (Leishangthem *et al.*, 2018). Les mécanismes pathologiques à l'œuvre lors de mammites étant à l'origine d'une inflammation et de la mort des cellules du parenchyme mammaire, certaines études se sont intéressées aux cfDNA dans ce contexte.

En cas de mammite, une augmentation significative de la concentration en cfDNA est observée (Chen *et al.*, 2023), notamment en cf-mtDNA, dans le sang et dans le lait (Leishangthem *et al.*, 2018). Ainsi, les cfDNA peuvent servir de biomarqueurs de la maladie. Cette découverte souligne également les dommages subis par les mitochondries lors d'inflammation du tissu mammaire, et doit pousser à s'interroger sur la nécessité de mettre en place un traitement visant à soutenir la fonction mitochondriale dans ce contexte (Leishangthem *et al.*, 2018).

### **b. Infections parasitaires**

Les parasites retrouvés chez les animaux sont à l'origine d'un risque pour leur santé mais également pour la santé publique, puisque certaines de ces affections parasitaires sont zoonotiques (telles que l'échinococcose, la toxoplasmose et la toxocarose). Le parasitisme est notamment un problème majeur chez les animaux errants, qui ne sont donc pas médicalisés et maintiennent une pression d'infection permanente. Après extraction depuis un échantillon sanguin issu de quatorze chiens errants vivant au Bangladesh, Akter *et al.* (2019) ont soumis les cfDNA ainsi obtenus à des analyses successives (séquençage Illumina, PCR, analyse BLAST (*basic local alignment search tool*), séquençage de Sanger) afin d'identifier des séquences d'ADN similaires au génome de différents parasites. Ainsi, un total de 150 séquences ont été attribuées à dix-neuf genres de parasites différents, dont *Babesia* chez cinq chiens (PCR positive pour *Babesia gibsoni*

chez quatre d'entre eux) et *Leishmania* chez quatre chiens (PCR positive pour *Leishmania donovani* chez tous les chiens). Les cfDNA auraient donc un intérêt dans la détection d'un parasitisme chez le chien. L'établissement de la prévalence de ces parasites, au Bangladesh ou dans les autres pays en développement, reste cependant à établir.

### **c. Anémie hémolytique à médiation immune (AHMI)**

Chez le chien, l'AHMI est associée à des processus nécrotiques et inflammatoires neutrophiliques, à l'origine d'une libération de cfDNA et donc à une augmentation de la concentration de cfDNA circulant, potentiellement aggravée par une diminution de leur dégradation par les ADNase de type I (telle qu'identifiée chez des patients humains atteints de maladies auto-immunes) (Jeffery *et al.*, 2017). Ces cfDNA, de par leurs propriétés pro-thrombotiques explicitées précédemment, pourraient contribuer aux mécanismes thrombotiques à l'œuvre en cas d'AHMI, à l'origine d'une forte morbidité et mortalité (Lawson *et al.*, 2018). Les cfDNA pourraient s'avérer, par le futur, utiles à différents niveaux : estimation du risque de thrombose, sélection des patients nécessitant un traitement anti-coagulant, identification d'une nouvelle cible thérapeutique (Jeffery *et al.*, 2017). Il a été montré que la concentration en cfDNA plasmatiques était significativement plus élevée chez les chiens atteints d'AHMI que chez les chiens sains, sans pour autant avoir identifiée une différence significative de l'activité sérique des ADNase, suggérant ainsi que l'augmentation en cfDNA serait secondaire à un excès de production plutôt qu'à un défaut de dégradation (Jeffery *et al.*, 2017).

Cependant, la technique de quantification utilisée semble avoir une importance, et non pas des moindres, sur cette observation : en effet, les résultats obtenus par utilisation d'un colorant des acides nucléiques peuvent être influencés par la qualité du prélèvement sanguin, et notamment en cas de pigmentémie (par hémoglobinémie ou bilirubinémie, retrouvée chez de nombreux chiens atteints d'AHMI) (Lawson *et al.*, 2018).

En termes de pronostic, Jeffery *et al.* (2017) n'ayant pas recruté autant de cas qu'escompté, il est difficile de tirer des conclusions de leur travail à l'heure actuelle. En effet, il persiste le doute d'une association artéfactuelle entre la durée de survie et la concentration plasmatique en cfDNA, lié à l'absence d'association établie entre la concentration en cfDNA et les D-dimères et entre la concentration en cfDNA et la survenue d'un phénomène de thrombose.

### **d. Dilatation-torsion de l'estomac (DTE)**

La dilatation-torsion de l'estomac, affection suraiguë faisant suite à l'accumulation de gaz et de liquide dans l'estomac à l'origine de sa dilatation et parfois accompagnée de sa torsion, relève de l'urgence vitale, par les désordres variés qu'elle engendre (tels qu'un choc hypovolémique, une ischémie tissulaire pouvant évoluer en nécrose). C'est une affection qui nécessite une stabilisation médicale et chirurgicale précoce, et dont la mortalité peut s'élever à 40 % malgré une prise en charge adaptée (Gibson, 2020).

L'évaluation du pronostic des animaux présenté en DTE repose essentiellement sur la mesure de la lactatémie à l'admission et le suivi de sa cinétique de décroissance (Zacher *et al.*, 2010), mais Troia *et al.* (2018) se sont intéressés à l'éventuel apport pronostique d'autres biomarqueurs, et notamment aux cfDNA qui sont libérés notamment en cas de nécrose tissulaire. Malgré une augmentation significative de la concentration plasmatique en cfDNA chez les chiens présentés pour DTE, l'étude des cfDNA plasmatiques à l'admission n'a pas permis de mettre en

évidence un apport des cfDNA pour distinguer les chiens ayant survécu ou non à leur DTE, ceux ayant développé ou pas une nécrose gastrique (qui représente un facteur pronostique négatif (Zacher *et al.*, 2010)) et les chiens ayant souffert ou non de complications post-opératoires. Il a été postulé que le suivi de la concentration en cfDNA jusqu'à la prise en charge chirurgicale, c'est-à-dire sur toute la durée pendant laquelle le processus de nécrose se poursuit, pourrait être plus discriminant que la seule mesure à l'admission (Troia *et al.*, 2018).

## **e. Traumatismes et lésions tissulaires**

### **a. Sévérité des lésions tissulaires**

Wilson *et al.* (2018) se sont questionnés sur l'apport de la cinétique des cfDNA plasmatiques pour estimer la sévérité des lésions tissulaires aiguës. Dans leur étude, les chiens étaient répartis en trois groupes, selon l'opération subie et le degré de dommages tissulaires y étant associé : faible pour l'ovariohystérectomie, modéré pour l'ostéotomie de nivellement du plateau tibial (TPLO) et sévère pour une hémilaminectomie. Les concentrations en cfDNA à six heures et à douze heures post-opératoires étaient significativement plus élevées chez les chiens ayant subi une hémilaminectomie qu'une TPLO et une ovariohystérectomie, ce qui correspond aux pics de concentration significatifs en cfDNA plasmatiques chez les chiens du groupe hémilaminectomie, avant le retour à des valeurs basales. En revanche, chez les chiens des groupes ovariohystérectomie et TPLO, il n'y a pas eu d'augmentation significative de la concentration en cfDNA au cours du temps. La concentration plasmatique cfDNA représenterait donc un marqueur précoce en cas de lésions tissulaires sévères, avec une demi-vie de 5,64 heures. Concernant les CK, plusieurs études ont montré que leur activité au cours du temps dépend également de la sévérité des lésions et est le reflet de dommages tissulaires en cours (Nevill *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2018). Cependant leur demi-vie biologique estimée (28,7 heures) est bien plus longue que celle des cfDNA (Wilson *et al.*, 2018). Ainsi, l'association du dosage des cfDNA et des CK, deux marqueurs aux demi-vies bien différentes, permettrait donc de distinguer des dommages tissulaires aigus et des dommages tissulaires progressifs (pouvant être secondaires à un phénomène de thrombose ou d'un syndrome des loges faisant suite un traumatisme initial).

### **b. Rhabdomyolyse d'effort**

La rhabdomyolyse d'effort est une affection musculaire retrouvée chez les chiens soumis à un effort intense ou de longue durée, associée à des dommages musculaires squelettiques et à une insuffisance rénale aiguë secondaire à l'accumulation de myoglobine. Le dosage des CK reste l'examen le plus pertinent pour détecter et déterminer la sévérité de la rhabdomyolyse d'effort. Cependant, ce biomarqueur reste imparfait, puisque la demi-vie des CK est longue et le dosage au chevet du patient sur le terrain n'est pas encore possible (Devall *et al.*, 2018). Dans leur étude, Devall *et al.* (2018) se sont intéressés à la cinétique de la concentration sérique en cfDNA au cours d'une course chez des chiens de traîneau. Les chiens chez lesquels une rhabdomyolyse a été diagnostiquée (sur la base de signes cliniques et paracliniques) n'ont pas montré de différence significative en termes de concentration sérique en cfDNA par comparaison aux chiens sains de l'équipe gagnante, alors que les concentrations sériques en CK et myoglobines étaient significativement supérieures et fortement corrélées. Ainsi, les cfDNA n'ont pas fait leurs preuves en tant que biomarqueurs précoces potentiels de la rhabdomyolyse d'effort chez le chien.

### **c. Intérêt pronostique**

Les traumatismes représentent un motif de consultation en urgence important en pratique vétérinaire, notamment chez le chien. Un animal ayant survécu au trauma initial n'est cependant pas tiré d'affaire, car de nombreuses complications peuvent survenir dans les heures voire les jours qui suivent. Il existe des systèmes de scoring (score de triage, score APPLE) permettant d'évaluer les patients hospitalisés, mais ils ne fournissent pas d'informations sur les effets pathologiques du choc et des lésions en découlant (Letendre et Goggs, 2018b). L'identification de biomarqueurs fiables et dosables au chevet du patient est donc importante pour mieux prédire la sévérité d'un traumatisme et le pronostic y étant associés.

En 2017, Letendre et Goggs ont mis en évidence une augmentation significative de la concentration plasmatique en cfDNA chez les chiens ayant subi un trauma d'intensité modérée à sévère, c'est-à-dire présentant un score de triage traumatique supérieur à cinq à l'admission (Letendre et Goggs, 2017). En 2018, ils se sont ensuite questionnés sur leur intérêt pronostique. La concentration plasmatique en cfDNA a présenté une corrélation positive significative avec l'index de choc, mais aucune différence notable n'a été objectivée entre le groupe de chiens ayant survécu au traumatisme initial et le groupe de chiens y ayant succombé (Letendre et Goggs, 2018b). Cela est contraire à ce qui a été établi en médecine humaine, où les cfDNA se sont révélés être d'intérêt pronostique après des chirurgies ou trauma multiples. Il a alors été supposé par Letendre et Goggs que le type de traumatisme (pénétrant ou contondant), la sévérité des lésions, et le taux d'euthanasie aient eu une influence sur le résultat auquel ils ont abouti.

### **f. Maladies cardio-vasculaires**

#### **a. Effets de l'effort prolongé sur la concentration en cfDNA chez l'animal sain, comparaison à des marqueurs de maladies cardiaques**

Les *N-terminal pro brain natriuretic peptide* dits NT-proBNP, fragments issus du peptide natriurétique de type B, sont utilisés comme biomarqueurs diagnostiques et pronostiques des maladies cardiaques chez l'homme, mais aussi en médecine vétérinaire notamment chez les carnivores domestiques. Chez l'homme, un effort intense prolongé est à l'origine de dysfonctionnements cardiaques temporaires, parfois même de nécrose subclinique du myocarde, induisant une augmentation de la concentration plasmatique du NT-proBNP. Cependant, il n'a pas été déterminé si une augmentation peut être observée chez l'animal sain soumis à des périodes d'effort prolongé et ainsi être à l'origine d'erreur diagnostique par excès.

Dans leur étude, Hunt *et al.* (2018) se sont donc intéressés au NT-proBNP et aux cfDNA, afin de déterminer leur fiabilité diagnostique chez des chiens sains soumis à un effort physique important régulier. Une augmentation significative de la concentration plasmatique en NT-proBNP est observée après la période de travail, à l'origine de valeurs dépassant la valeur haute de l'intervalle de référence, sans pour autant observer de signes de dysfonctionnement cardiaque à l'examen clinique ou au cours de l'effort. Il est donc conseillé de repousser le dosage des NT-proBNP après un effort prolongé afin de ne pas surinterpréter une augmentation de leur valeur et éviter de diagnostiquer par excès une maladie cardiaque. Face à cette observation, il est donc intéressant de se pencher sur les informations apportées par les cfDNA et de déterminer s'ils permettent de s'affranchir de ce délai de mesure. Secondairement à l'effort, la concentration plasmatique en cfDNA augmente également de façon significative. L'origine de cette augmentation reste incertaine, mais l'absence de corrélation avec des marqueurs de l'activité musculaire

cardiaques et squelettiques (CK et aspartate aminotransférase) suggère que la libération d'origine musculaire n'est pas seule responsable de cette augmentation. De plus, un enrichissement en cfDNA est observé dans le plasma des chiens de travail (par comparaison à des chiens inactifs), pouvant être le reflet d'une endurance acquise ou de lésions tissulaires subcliniques (Hunt *et al.*, 2018). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour établir des valeurs de référence chez le chien de travail, pour ensuite pouvoir identifier une augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA compatible avec une affection cardiaque.

### ***b. Maladies thrombo-emboliques***

Les maladies thrombo-emboliques sont la conséquence d'une modification anormale des mécanismes d'hémostase, qui reposent normalement sur un processus complexe faisant intervenir de nombreux acteurs. Ces maladies sont sous-diagnostiquées en médecine vétérinaire, mais ont pourtant une importance clinique non négligeable (Good et Manning, 2003).

#### *◦ Thrombo-embolie aortique féline*

Les chats atteints de cardiomyopathie hypertrophique (CMH), soit 15 % de la population féline, sont sujets à développer des complications mortelles, telles qu'une insuffisance cardiaque congestive, une arythmie ou une thrombo-embolie aortique (TEA). En ce qui concerne cette dernière, d'autres affections (cardiaques ou non) peuvent être impliquées dans son développement telles qu'une maladie thyroïdienne, une néoplasie ; cependant, 19 % des chats présentés pour TEA sont atteints de CMH (dont 4 % d'animaux atteints de la forme obstructive de la maladie) (Smith et Tobias, 2004). La TEA se manifeste souvent de façon brutale, sans signe avant-coureur, ce qui est source de détresse pour l'animal et son propriétaire. En effet, hormis l'échocardiographie, il y a peu d'éléments permettant d'identifier les chats à risque de développer une TEA. Cependant, celle-ci n'est pas réalisée systématiquement, notamment en l'absence d'anomalie à l'auscultation cardiaque.

Dans leur étude, Li *et al.* (2023) se sont intéressés à l'implication des NETs dans ce contexte de TEA. Les NETs ont des propriétés pro-thrombotiques, utiles dans l'immunité ; cependant, un excès de NETs circulant favorise la formation de caillots. Ceux-ci ont notamment été retrouvés dans le thrombus artériel des chats présentés pour TEA, et semblent jouer un rôle dans le développement de ce dernier chez les chats atteints de CMH. Après quantification des cfDNA plasmatiques, Li *et al.* ont mis en évidence que les chats atteints de TEA présentaient une concentration significativement plus élevée en cfDNA que les chats du groupe sain et du groupe atteints de CMH (Li *et al.*, 2023). Cependant, cette augmentation n'était pas corrélée avec les facteurs échocardiographiques considérés (vitesse du flux atrial gauche, fraction de raccourcissement du ventricule gauche). L'étude de la taille des cfDNA par électrophorèse a donc été réalisée pour identifier l'origine des cfDNA et déterminer si l'augmentation observée chez les chats souffrant de TEA était spécifique de la maladie ou non : en effet, les cfDNA quantifiés pourraient être des contaminants d'origine génomique ou provenant de la lyse cellulaire, et ne pas être issus des mécanismes associés à la TEA (nécrose musculaire, lésion ischémique, libération active). Le plasma des chats atteints de CMH et TEA présentaient une majorité de fragments de taille comprise entre 100 et 500 paires de base avec un pic à 167 paires de bases, un motif qui correspond à celui identifié chez les nucléosomes. Chez les chats souffrant de TEA, l'augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA ne résulterait donc pas de la nécrose musculaire, qui est à l'origine de fragments de taille plus importante (plus de 10 000 paires de



bases), mais serait secondaire à une sécrétion par les cellules vivantes. L'implication thérapeutique de cette découverte est importante : en effet, les cfDNA jouent un rôle dans la stabilité et la formation des caillots sanguins, respectivement en interagissant avec les leucocytes et les plaquettes et en se liant aux facteurs de von Willebrand. Une étude sur les AVC menée chez la souris a permis de mettre en évidence que l'utilisation d'ADNase de type I favorisait la dissolution des NETs, diminuant ainsi le risque d'hémorragie secondaire à l'administration d'activateur tissulaire du plasminogène, utilisé dans le traitement des AVC chez l'homme (Wang *et al.*, 2021). Il serait alors intéressant de poursuivre les recherches sur les liens existant entre les cfDNA et la TEA, compte-tenu de la mortalité importante de cette maladie, avec un taux de survie estimé à seulement 39 % (Hogan, 2017).

- *Embolie pulmonaire aiguë*

Uzuelli *et al.* (2009) se sont intéressés à l'éventuel lien existant entre la concentration plasmatique en cfDNA et la sévérité d'une embolie pulmonaire aiguë induite expérimentalement chez le chien, ainsi qu'à l'influence d'un traitement à base de nitrite sur cette concentration. Deux méthodes ont été utilisées afin de provoquer *in vivo* une embolie pulmonaire : l'une reposait sur l'injection de caillots de sang de différentes tailles, préparés à partir du sang de l'animal receveur, directement dans l'atrium droit à l'aide d'une canule pendant 5 à 10 minutes, l'autre sur l'utilisation de microsphères injectées de façon répétées dans la veine cave caudale. Cette étude a permis de mettre en évidence que l'augmentation de la concentration plasmatique en cfDNA était proportionnelle à la sévérité de l'embolie pulmonaire. Cependant, cette augmentation n'était significative uniquement chez le groupe ayant reçu des caillots issus de la coagulation d'un volume de sang plus grand (5 mL). *In vitro*, ces caillots de sang ont libéré, deux heures après leur incubation, des quantités de cfDNA de façon dose-dépendante et corrélée aux paramètres hémodynamiques mesurés (pression artérielle pulmonaire moyenne, index de résistance vasculaire pulmonaire). Les chiens chez lesquels des microsphères ont été injectées pour simuler une embolie pulmonaire n'ont pas montré d'augmentation significative de la concentration plasmatique en cfDNA, alors que les paramètres hémodynamiques ont été impactés de la même manière par les microsphères que par les caillots de sang. De plus, le traitement à base de nitrite, molécule permettant la diminution de l'hypertension artérielle pulmonaire associée à un épisode d'embolie pulmonaire aiguë, n'a pas permis de faire diminuer la concentration en cfDNA après l'épisode d'embolie. Tous ces éléments suggèrent que la libération des cfDNA dans un contexte d'embolie pulmonaire dépend de la nature de l'embolie, et notamment des leucocytes le constituant (Uzuelli *et al.*, 2009). Les cfDNA pourraient donc avoir un intérêt diagnostique dans un contexte d'embolie pulmonaire, ce qui pourrait notamment s'avérer utile lors de la recherche des complications d'un syndrome de Cushing. Cependant, cela nécessite une méthode plus rapide que celle utilisée dans cette étude, où plusieurs heures ont été nécessaires à la réalisation des analyses. Une amélioration de la spécificité de ce test est également indispensable pour diagnostiquer précisément cette affection.

### **g. Maladies ostéo-articulaires : exemple de l'arthrose chez le cheval**

Chez le cheval, l'arthrose représente une des causes principales de boiterie. Chez le cheval de course, elle est à l'origine d'une diminution du nombre jours d'entraînement. Son diagnostic fait appel à l'imagerie, qui toutefois est peu sensible quand la maladie est précoce et n'informe pas sur le pronostic (Panizzi *et al.*, 2023). Il est possible de se baser sur des techniques de sérologie ELISA, réalisées sur des biomarqueurs synoviaux : cependant, celles-ci ne sont pas encore

disponibles en clinique, notamment pour des raisons de coûts, de manque de praticité et de manque de répétabilité des résultats.

Panizzi *et al.* (2023) se sont donc intéressés à l'apport des cfDNA dans ce contexte. Si le dosage des cfDNA contenus dans le plasma en l'absence ou en la présence d'arthrose du carpe n'a apporté aucune information, il semblerait plus pertinent de s'intéresser au liquide synovial. En effet, en cas d'arthrose induite expérimentalement par lésion ostéochondrale, la concentration en cfDNA du liquide synovial présentait une augmentation quasi systématiquement significative pendant plus de 60 jours, ne semblant pas être imputable à la procédure expérimentale. Ainsi, il semblerait que la mesure des cfDNA contenus dans le liquide synovial présente un intérêt dans le monitoring de l'arthrose chez le cheval ; cependant, d'avantages d'études sont nécessaires pour aboutir à la validation clinique de cette découverte.

## **h. Sexage**

En médecine vétérinaire, les cffDNA sont utilisés pour déterminer le sexe des fœtus et permettent de remplacer l'échographie, traditionnellement utilisée pour le sexage. En effet, cette technique comporte quelques inconvénients : par exemple, chez la brebis, elle nécessite une certaine expérience de la part de l'opérateur et est parfois difficile à appliquer si la gestation est trop avancée. L'utilisation des cffDNA représente donc une éventuelle alternative intéressante. Après extraction des cffDNA du sang de 46 brebis gestantes (depuis moins ou plus de trois mois), Kadivar *et al.* (2013) ont ensuite eu recours à la qPCR pour mettre en évidence la présence du gène *sry*, spécifique du chromosome Y donc des fœtus mâles, afin de déterminer le sexe du fœtus. En comparant les résultats ainsi obtenus au sexe du nouveau-né déterminé à la mise-bas, la sensibilité et la spécificité de la technique utilisant les cffDNA s'élevaient à 100 %. Cette technique s'étend naturellement à d'autres espèces. Chez le cheval, elle a permis de prédire le sexe des futurs poulains avec une sensibilité 90,9 %, de façon identique à ce qui a été obtenu en réalisant deux PCR successives (de Leon *et al.*, 2012). Dans les deux cas, la spécificité était parfaite, avec une valeur de 100 %. Le recours à d'autres gènes spécifiques du chromosome Y est possible : l'amplification par qPCR du gène *tspy* a permis d'identifier un veau mâle avec une sensibilité de 90 % à 91,6 %, selon l'âge gestationnel (Ristanic *et al.*, 2018). Un faible nombre de copies de gènes spécifique du chromosome Y sont nécessaires pour prédire le sexe du fœtus : dans les conditions expérimentales de leur étude, Singh *et al.* (2022) ont établi qu'il suffisait de 31,3 pg/mL de copies de ces gènes afin de sexer le fœtus par PCR.

Il est important de noter que les espèces citées ci-dessus présentent un type de placentation différent de celui de la femme (placenta hémochorial) : le placenta est de type épithélio-chorial chez la vache et la jument, et syndesmo-chorial chez la brebis, ce qui limite le passage des cffDNA à travers celui-ci (Kadivar *et al.*, 2013; Ristanic *et al.*, 2018). Face à une libération restreinte des cffDNA dans le sang de la mère, il est donc nécessaire d'avoir recours à des méthodes d'extraction de la plus haute efficacité, car le sexage pourrait s'avérer utile notamment en élevage laitier, où la naissance de femelles est préférée par les éleveurs pour des raisons économiques.

Après avoir suscité un grand intérêt en médecine humaine, les cfDNA ont également fait l'objet de recherches en médecine vétérinaire, notamment de oncologie. En ce qui concerne les autres domaines de la médecine vétérinaire (notamment la traumatologie, l'infectiologie et la

médecine interne), les papiers de recherches publiés à l'heure actuelle sont plus rares, et concernent principalement le chien. Comme en médecine humaine, des études supplémentaires sont nécessaires pour consolider et affiner les connaissances déjà établies, avant d'espérer voir ces nouveaux biomarqueurs rejoindre les outils déjà à disposition des vétérinaires praticiens.

# Conclusion

---

Les *cell-free DNA* correspondent à des fragments d'ADN, retrouvés dans les liquides biologiques des êtres vivants, dont la demi-vie est courte. De ce fait, leur récolte est facile, peu invasive et répétable dans le temps ; les modifications que connaissent le pool de cfDNA, aussi bien en termes de quantité que de composition, illustrent les processus physiopathologiques en cours chez un organisme. Découverts il y a presque soixante ans, de nombreuses études se sont intéressées aux cfDNA, aussi bien pour comprendre les mécanismes à l'origine de leur libération, que pour explorer leurs propriétés afin d'espérer faire d'eux de nouveaux biomarqueurs utilisables en pratique clinique.

Cette thèse a permis de dresser une liste, non exhaustive, des nombreux domaines de la médecine humaine pouvant bénéficier des informations apportées par les cfDNA, allant de l'oncologie au dépistage pré-natal. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires afin de confirmer les résultats déjà établis dans la littérature, les cfDNA représentent toutefois un biomarqueur prometteur en médecine humaine, aussi bien en tant qu'outil diagnostique et pronostique mais également au niveau thérapeutique. Si de nombreux kits permettant leur extraction sont commercialisés, leur utilisation reste actuellement majoritairement restreinte à la recherche en laboratoire.

En médecine vétérinaire, si des affections variées ont fait l'objet d'études concernant l'intérêt potentiel des cfDNA, le niveau de preuve reste faible : en effet, le nombre d'études est restreint, les échantillons testés de petite taille. Il est donc difficile, à l'heure actuelle, de savoir si et quand les cfDNA seront reconnus comme des biomarqueurs de confiance, permettant de compléter les informations apportées par ceux actuellement utilisés. Cependant, face à l'intérêt toujours croissant que suscitent les cfDNA et au développement récent qu'ils connaissent en médecine humaine, notamment avec la mise en place de tests diagnostiques validés cliniquement comme le test AlloSure®, il n'est pas interdit d'espérer que ces avancées concernent bientôt la médecine vétérinaire.

Ainsi, les cfDNA pourraient, à terme, devenir un nouveau biomarqueur utilisés par les médecins et les vétérinaires, aussi bien en pratique de routine que dans des contextes représentant des urgences médicales. La conduite de recherches supplémentaires, notamment à plus grande échelle pour les domaines ayant déjà fait l'objet d'études, ainsi qu'une standardisation des techniques d'extraction sont cependant indispensables afin de pouvoir, un jour, développer l'application pratique de ces cfDNA.



# Liste des références bibliographiques

---

- ABALI, E.E., CLINE, S.D., FRANKLIN, D.S., *et al.* (2021) Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry, 8th Edition. Philadelphia, Wolters Kluwer Health.
- ABDELAL, I., ZAKARIA, M., SHARAF, M., *et al.* (2016) Levels of plasma cell-free DNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *The Egyptian Rheumatologist* vol. 38. [<https://doi.org/10.1016/j.ejr.2016.06.005>]
- ABE, T., NAKASHIMA, C., SATO, A., *et al.* (2020) Origin of circulating free DNA in patients with lung cancer. *PloS One* vol. 15, n° 7, p. e0235611. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235611>]
- AGBOR-ENOH, S., WANG, Y., TUNC, I., *et al.* (2019) Donor-derived cell-free DNA predicts allograft failure and mortality after lung transplantation. *EBioMedicine* vol. 40, p. 541-553. [<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.029>]
- AHN, S., BAE, H., KIM, J., *et al.* (2021) Comparison of clinical and inflammatory parameters in dogs with pyometra before and after ovariohysterectomy. *Canadian Journal of Veterinary Research* vol. 85, n° 4, p. 271-278.
- AKIRAV, E.M., LEBASTCHI, J., GALVAN, E.M., *et al.* (2011) Detection of  $\beta$  cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 108, n° 47, p. 19018-19023. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1111008108>]
- AKTER, S., NAKAO, R., IMASATO, Y., *et al.* (2019) Potential of cell-free DNA as a screening marker for parasite infections in dog. *Genomics* vol. 111, n° 4, p. 906-912. [<https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.05.020>]
- AL NAKIB, M., DESBRIÈRE, R., BONELLO, N., *et al.* (2009) Total and fetal cell-free DNA analysis in maternal blood as markers of placental insufficiency in intrauterine growth restriction. *Fetal Diagnosis and Therapy* vol. 26, n° 1, p. 24-28. [<https://doi.org/10.1159/000236355>]
- ALBERRY, M.S., AZIZ, E., AHMED, S.R., *et al.* (2021) Non invasive prenatal testing (NIPT) for common aneuploidies and beyond. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* vol. 258, p. 424-429. [<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.01.008>]
- ALBERRY, M.S., MADDOCKS, D.G., HADI, M.A., *et al.* (2009) Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 200, n° 1, p. 98.e1-98.e6. [<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.063>]
- ALYAFEE, Y., AL TUWAIJRI, A., UMAIR, M., *et al.* (2022) Non-invasive prenatal testing for autosomal recessive disorders: A new promising approach. *Frontiers in Genetics* vol. 13. [<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1047474>]
- AMINTAS, S., VENDRELY, V., DUPIN, C., *et al.* (2021) Next-Generation Cancer Biomarkers: Extracellular Vesicle DNA as a Circulating Surrogate of Tumor DNA. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* vol. 8. [<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.622048>]
- ANALYTIK JENA (2014) PME Free-circulating DNA Extraction Kit. [[https://www.westburg.eu/free-circulating-dna-extraction/\\$24108/\\$24126/\\$24127](https://www.westburg.eu/free-circulating-dna-extraction/$24108/$24126/$24127)] (consulté le 12/11/2022).
- APPLIED BIOSYSTEMS (2003) BloodPrep™ Chemistry: DNA Isolation from Whole Blood, Tissue-Cultured Cells, Buccal Swabs, and Other Materials. [[https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiT7oXDzLSBAXVvXaQEHYojC4oQFnoECA0QAw&url=https%3A%2F%2Fassets.fishersci.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2FWarranties%2Fcms\\_040195.pdf&usg=AOvVaw2J1EGP5sxz1TQt2rL9xele&opi=89978449](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiT7oXDzLSBAXVvXaQEHYojC4oQFnoECA0QAw&url=https%3A%2F%2Fassets.fishersci.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2FWarranties%2Fcms_040195.pdf&usg=AOvVaw2J1EGP5sxz1TQt2rL9xele&opi=89978449)] (consulté le 18/09/2023).
- ASIF, A.A., ROY, M., TELLIER, B.R., *et al.* (2021) Capnocytophaga canimorsus meningitis diagnosed using next- generation sequencing of microbial cell-free DNA. *IDCases* vol. 24, p. e01126. [<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2021.e01126>]

- AUCAMP, J., BRONKHORST, A.J., BADENHORST, C.P.S., *et al.* (2018) The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews* vol. 93, n° 3, p. 1649-1683. [<https://doi.org/10.1111/brv.12413>]
- AVRIEL, A., WIESSMAN, M.P., ALMOG, Y., *et al.* (2014) Admission Cell Free DNA Levels Predict 28-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis in Intensive Care. *PLoS One* vol. 9, n° 6, p. e100514. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100514>]
- BARAQUIN, A., HERVOUET, E., RICHOUE, C., *et al.* (2018) Circulating cell-free DNA in patients with alveolar echinococcosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* vol. 222, p. 14-20. [<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.04.004>]
- BARRIENTOS, L.S. (2013) Modulation fonctionnelle des cellules dendritiques par les « Neutrophil Extracellular Traps ». Thèse d'immunologie. Paris, Université Paris Sud - Paris XI.
- BASUNI, M., MUHI, J., OTHMAN, N., *et al.* (2011) A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 84, n° 2, p. 338-343. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0499>]
- BAUER, M., HUTTERER, G., EDER, M., *et al.* (2006) A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome. *Prenatal Diagnosis* vol. 26, n° 9, p. 831-836. [<https://doi.org/10.1002/pd.1513>]
- BECK, J., BIERAU, S., BALZER, S., *et al.* (2013) Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clinical Chemistry* vol. 59, n° 12, p. 1732-1741. [<https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.210328>]
- BEDIN, C., ENZO, M.V., DEL BIANCO, P., *et al.* (2017) Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer* vol. 140, n° 8, p. 1888-1898. [<https://doi.org/10.1002/ijc.30565>]
- BEFFAGNA, G., SAMMARCO, A., BEDIN, C., *et al.* (2017) Circulating Cell-Free DNA in Dogs with Mammary Tumors: Short and Long Fragments and Integrity Index. *PLoS One* vol. 12, n° 1, p. e0169454. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169454>]
- BENN, P. (2014) Non-Invasive Prenatal Testing Using Cell Free DNA in Maternal Plasma: Recent Developments and Future Prospects. *Journal of Clinical Medicine* vol. 3, n° 2, p. 537-565. [<https://doi.org/10.3390/jcm3020537>]
- BERGHEIM, J., SEMAAN, A., GEVENSLEBEN, H., *et al.* (2018) Potential of quantitative SEPT9 and SHOX2 methylation in plasmatic circulating cell-free DNA as auxiliary staging parameter in colorectal cancer: a prospective observational cohort study. *British Journal of Cancer* vol. 118, n° 9, p. 1217-1228. [<https://doi.org/10.1038/s41416-018-0035-8>]
- BETTEGOWDA, C., SAUSEN, M., LEARY, R.J., *et al.* (2014) Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine* vol. 6, n° 224, p. 224ra24. [<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007094>]
- BIOO SCIENTIFIC (2017) NextPrep-Mag™ cfDNA ISOLATION KIT. [[www.thunderbiosci.co.kr/wp-content/uploads/2017/08/Bioo-Scientific-NextPrep-Mag-cfDNA-Isolation-Kit-2.pdf](http://www.thunderbiosci.co.kr/wp-content/uploads/2017/08/Bioo-Scientific-NextPrep-Mag-cfDNA-Isolation-Kit-2.pdf)] (consulté le 19/09/2023).
- BLANCO, A., BLANCO, G. (2017) Chapter 6 - Nucleic Acids. In *Medical Biochemistry*, Cambridge. Academic Press, p. 121-140. [<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00006-9>]
- BLOOM, R.D., BROMBERG, J.S., POGGIO, E.D., *et al.* (2017) Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *Journal of the American Society of Nephrology* vol. 28, n° 7, p. 2221-2232. [<https://doi.org/10.1681/ASN.2016091034>]
- BRONKHORST, A.J., AUCAMP, J., PRETORIUS, P.J. (2015) Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* vol. 450, p. 243-253. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.08.028>]
- BRONKHORST, A.J., UNGERER, V., DIEHL, F., *et al.* (2021) Towards systematic nomenclature for cell-free DNA. *Human Genetics* vol. 140, n° 4, p. 565-578. [<https://doi.org/10.1007/s00439-020-02227-2>]
- BRUSCA, S.B., ELINOFF, J.M., ZOU, Y., *et al.* (2022) Plasma Cell-Free DNA Predicts Survival and Maps Specific Sources of Injury in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* vol. 146, n° 14, p. 1033-1045. [<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.056719>]

- BURNETT, D.L., CAVE, N.J., GEDYE, K.R., *et al.* (2016) Investigation of cell-free DNA in canine plasma and its relation to disease. *Veterinary Quarterly* vol. 36, n° 3, p. 122-129. [https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1182230]
- BURNHAM, P., KHUSH, K., DE VLAMINCK, I. (2017) Myriad Applications of Circulating Cell-Free DNA in Precision Organ Transplant Monitoring. *Annals of the American Thoracic Society* vol. 14, n° Supplement\_3, p. S237-S241. [https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201608-634MG]
- CARBONE, L., CARIATI, F., SARNO, L., *et al.* (2020) Non-Invasive Prenatal Testing: Current Perspectives and Future Challenges. *Genes* vol. 12, n° 1, p. E15. [https://doi.org/10.3390/genes12010015]
- CARE DX (2021) HeartCare Interpretive Guide. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjB4taah9L\_AhWCUqQEHW3zCUUQFnoECBAQAQ&url=https%3A%2F%2F caredx.com%2Fwp-content%2Fuploads%2F2021%2F09%2FLK-10482-Heartcare-Interpretive-Guide.pdf&usq=AOvVaw0AAif8G6\_3E4akTG41Ay-\_&opi=89978449] (consulté le 20/06/2023).
- CASSINOTTI, E., BONI, L., SEGATO, S., *et al.* (2013) Free circulating DNA as a biomarker of colorectal cancer. *International Journal of Surgery* vol. 11, p. S54-S57. [https://doi.org/10.1016/S1743-9191(13)60017-5]
- CELEC, P., VLKOVÁ, B., LAUKOVÁ, L., *et al.* (2018) Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine* vol. 20, p. e1. [https://doi.org/10.1017/erm.2017.12]
- CEPIKA, A.-M., SOLDÓ JUREŠA, D., MOROVIĆ VERGLES, J., *et al.* (2012) Decrease in circulating DNA, IL-10 and BAFF levels in newly-diagnosed SLE patients after corticosteroid and chloroquine treatment. *Cellular Immunology* vol. 276, n° 1-2, p. 196-203. [https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.05.009]
- CHAN, K.A., YEUNG, S.-W., LUI, W.-B., *et al.* (2005) Effects of Preanalytical Factors on the Molecular Size of Cell-Free DNA in Blood. *Clinical Chemistry* vol. 51, n° 4, p. 781-784. [https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.046219]
- CHANG, C.P.-Y., CHIA, R.-H., WU, T.-L., *et al.* (2003) Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica Chimica Acta* vol. 327, n° 1, p. 95-101. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00337-6]
- CHEN, P., LI, S., LI, W., *et al.* (2020) Rapid diagnosis and comprehensive bacteria profiling of sepsis based on cell-free DNA. *Journal of Translational Medicine* vol. 18, n° 1, p. 5. [https://doi.org/10.1186/s12967-019-02186-x]
- CHEN, Y., ABBAS, Z., HU, L., *et al.* (2023) Extraction and Elevation of Cell-Free DNA under Mastitis and Heat Stress in Dairy Cattle. *Animals* vol. 13, n° 9, p. 1487. [https://doi.org/10.3390/ani13091487]
- CIECHOMSKA, M., ROSZKOWSKI, L., MASLINSKI, W. (2019) DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. *Cells* vol. 8, n° 9, p. 953. [https://doi.org/10.3390/cells8090953]
- CLARK-GANHEART, C.A., FRIES, M.H., LEIFHEIT, K.M., *et al.* (2015) Use of Cell-Free DNA in the Investigation of Intrauterine Fetal Demise and Miscarriage. *Obstetrics & Gynecology* vol. 125, n° 6, p. 1321. [https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000863]
- COBRA, H.A. de A.B., MOZELLA, A.P., DA PALMA, I.M., *et al.* (2022) Cell-free Deoxyribonucleic Acid: A Potential Biomarker of Chronic Periprosthetic Knee Joint Infection. *The Journal of Arthroplasty* vol. 37, n° 12, p. 2455-2459. [https://doi.org/10.1016/j.arth.2022.07.002]
- COLLEY, E., DEVALL, A.J., WILLIAMS, H., *et al.* (2020) Cell-Free DNA in the Investigation of Miscarriage. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9, n° 11, p. 3428. [https://doi.org/10.3390/jcm9113428]
- COLOMBO, J., MOSCHETTA-PINHEIRO, M.G., NOVAIS, A.A., *et al.* (2021) Liquid Biopsy as a Diagnostic and Prognostic Tool for Women and Female Dogs with Breast Cancer. *Cancers* vol. 13, n° 20, p. 5233. [https://doi.org/10.3390/cancers13205233]



- CORRELL, S.J., SCHUBERT, M.H., GRIGORYEV, S.A. (2012) Short nucleosome repeats impose rotational modulations on chromatin fibre folding. *The EMBO Journal* vol. 31, n° 10, p. 2416-2426. [https://doi.org/10.1038/emboj.2012.80]
- CUI, M., FAN, M., JING, R., *et al.* (2013) Cell-Free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology* vol. 124, n° 2, p. 76-84. [https://doi.org/10.1159/000345855]
- CUI, X., DU, S., LIU, H., *et al.* (2020) The Length and Distribution of Plasma Cell-Free DNA Fragments in Stroke Patients. *BioMed Research International* vol. 2020, p. 9054196. [https://doi.org/10.1155/2020/9054196]
- CYTIVA (2020) Sera-Xtracta Cell-Free DNA Kit User Guide. [https://d3.cytivalifesciences.com/prod/IFU/29438884.pdf] (consulté le 18/09/2023).
- DASS, M., AITTAN, S., MUTHUMOHAN, R., *et al.* (2022) Utility of cell-free transrenal DNA for the diagnosis of Tuberculous Meningitis: A proof-of-concept study. *Tuberculosis* vol. 135, p. 102213. [https://doi.org/10.1016/j.tube.2022.102213]
- DAWULIETI, J., SUN, M., ZHAO, Y., *et al.* (2020) Treatment of severe sepsis with nanoparticulate cell-free DNA scavengers. *Science Advances* vol. 6, n° 22, p. eaay7148. [https://doi.org/10.1126/sciadv.aay7148]
- DE FRANCO, E., CASWELL, R., HOUGHTON, J. a. L., *et al.* (2017) Analysis of cell-free fetal DNA for non-invasive prenatal diagnosis in a family with neonatal diabetes. *Diabetic Medicine* vol. 34, n° 4, p. 582-585. [https://doi.org/10.1111/dme.13180]
- DE VLAMINCK, I., MARTIN, L., KERTESZ, M., *et al.* (2015) Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112, n° 43, p. 13336-13341. [https://doi.org/10.1073/pnas.1517494112]
- DE LEON, P.M.M., CAMPOS, V.F., DELLAGOSTIN, O.A., *et al.* (2012) Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology* vol. 77, n° 3, p. 694-698. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.005]
- DESHPANDE, S.R., ZANGWILL, S.D., KINDEL, S.J., *et al.* (2022) Relationship between donor fraction cell-free DNA and clinical rejection in heart transplantation. *Pediatric Transplantation* vol. 26, n° 4, p. 14264. [https://doi.org/10.1111/petr.14264]
- DESTOUNI, A., VRETTOU, C., ANTONATOS, D., *et al.* (2009) Cell-free DNA levels in acute myocardial infarction patients during hospitalization. *Acta Cardiologica* vol. 64, n° 1, p. 51-57. [https://doi.org/10.2143/AC.64.1.2034362]
- DEVALL, V.C., GOGGS, R., HANSEN, C., *et al.* (2018) Serum myoglobin, creatine kinase, and cell-free DNA in endurance sled dogs and sled dogs with clinical rhabdomyolysis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 28, n° 4, p. 310-316. [https://doi.org/10.1111/vec.12731]
- DIEHL, F., SCHMIDT, K., CHOTI, M.A., *et al.* (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine* vol. 14, n° 9, p. 985-990. [https://doi.org/10.1038/nm.1789]
- DOLAN, C., MILLER, T., JILL, J., *et al.* (2021) Characterizing circulating nucleosomes in the plasma of dogs with lymphoma. *BMC Veterinary Research* vol. 17, p. 276. [https://doi.org/10.1186/s12917-021-02991-x]
- DONALDSON, J., PARK, B.H. (2018) Circulating Tumor DNA: Measurement and Clinical Utility. *Annual Review of Medicine* vol. 69, p. 223-234. [https://doi.org/10.1146/annurev-med-041316-085721]
- DONG, C., LIU, Y., SUN, C., *et al.* (2020) Identification of Specific Joint-Inflammatogenic Cell-Free DNA Molecules From Synovial Fluids of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology* vol. 11. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00662]
- DWIVEDI, D.J., TOLTL, L.J., SWYSTUN, L.L., *et al.* (2012) Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Critical Care* vol. 16, n° 4, p. R151. [https://doi.org/10.1186/cc11466]
- DWORSKY, Z.D., LEE, B., RAMCHANDAR, N., *et al.* (2022) Impact of Cell-Free Next-Generation Sequencing on Management of Pediatric Complicated Pneumonia. *Hospital Pediatrics* vol. 12, n° 4, p. 377-384. [https://doi.org/10.1542/hpeds.2021-006361]

- EL MESSAOUDI, S., MOULIERE, F., DU MANOIR, S., *et al.* (2016) Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clinical Cancer Research* vol. 22, n° 12, p. 3067-3077. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0297>]
- EL MESSAOUDI, S., ROLET, F., MOULIERE, F., *et al.* (2013) Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta* vol. 424, p. 222-230. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.022>]
- ELDOSOKY, M., HAMMAD, R., KOTB, H., *et al.* (2018) Cell Free DNA and CD38 Expression on T helper Cells as Biomarkers of Disease Activity in Rheumatoid Arthritis vol. 8, p. 60-68. [<https://doi.org/10.5923/j.ajb.20180803.03>]
- ELMORE, S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* vol. 35, n° 4, p. 495-516. [<https://doi.org/10.1080/01926230701320337>]
- EPIGENTEK (2022a) EpiQuik™ Circulating Cell-Free DNA (ccfDNA) Isolation Easy Kit User Guide. (consulté le 13/11/2022).
- EPIGENTEK (2022b) FitAmp™ Plasma/Serum DNA Isolation Kit. [<https://www.epigentek.com/catalog/redirect.php?action=url&goto=www.epigentek.com%2Fdocs%2FP-1004.pdf>] (consulté le 19/09/2023).
- ERAKY, M.A., ALY, N.S.M. (2016) Diagnostic and prognostic value of cell free circulating *Schistosoma mansoni* DNA: an experimental study. *Journal of Parasitic Diseases* vol. 40, n° 3, p. 1014-1020. [<https://doi.org/10.1007/s12639-014-0626-0>]
- FAN, H., GAI, W., ZHANG, L., *et al.* (2021) Parasite Circulating Cell-free DNA in the Blood of Alveolar Echinococcosis Patients as a Diagnostic and Treatment-Status Indicator. *Clinical Infectious Diseases* vol. 73, n° 1, p. e246-e251. [<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1679>]
- FARINA, A., LESHANE, E.S., ROMERO, R., *et al.* (2005) High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: A risk factor for spontaneous preterm delivery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 193, n° 2, p. 421-425. [<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.12.023>]
- FARNAES, L., WILKE, J., RYAN LOKER, K., *et al.* (2019) Community-acquired pneumonia in children: cell-free plasma sequencing for diagnosis and management. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* vol. 94, n° 2, p. 188-191. [<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.12.016>]
- FATHIMA, N., MANORENJ, S., VISHWAKARMA, S., *et al.* (2022) Role of cell-free DNA for predicting incidence and outcome of patients with ischemic stroke. *World Journal of Neurology* vol. 8, n° 1, p. 1-9. [<https://doi.org/10.5316/wjn.v8.i1.1>]
- FAVARO, P.F., STEWART, S.D., MCDONALD, B.R., *et al.* (2022) Feasibility of circulating tumor DNA analysis in dogs with naturally occurring malignant and benign splenic lesions. *Scientific Reports* vol. 12, n° 1, p. 6337. [<https://doi.org/10.1038/s41598-022-09716-6>]
- FEINGOLD, B., ROSE-FELKER, K., WEST, S.C., *et al.* (2023) Short-term clinical outcomes and predicted cost savings of dd-cfDNA-led surveillance after pediatric heart transplantation. *Clinical Transplantation* vol. 37, n° 5, p. e14933. [<https://doi.org/10.1111/ctr.14933>]
- FINK, S.L., COOKSON, B.T. (2005) Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity* vol. 73, n° 4, p. 1907-1916. [<https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>]
- FLAMINI, E., MERCATALI, L., NANNI, O., *et al.* (2006) Free DNA and Carcinoembryonic Antigen Serum Levels: An Important Combination for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* vol. 12, n° 23, p. 6985-6988. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1931>]
- FOONG, K.S., MABAYOJE, M., ALMAJALI, A. (2022) Clinical Impact of Noninvasive Plasma Microbial Cell-Free Deoxyribonucleic Acid Sequencing for the Diagnosis and Management of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Single-Center Retrospective Study. *Open Forum Infectious Diseases* vol. 9, n° 12, p. ofac652. [<https://doi.org/10.1093/ofid/ofac652>]
- FRATTINI, M., GALLINO, G., SIGNORONI, S., *et al.* (2006) Quantitative Analysis of Plasma DNA in Colorectal Cancer Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1075, n° 1, p. 185-190. [<https://doi.org/10.1196/annals.1368.025>]

- GADI, V.K., NELSON, J.L., BOESPFLUG, N.D., *et al.* (2006) Soluble Donor DNA Concentrations in Recipient Serum Correlate with Pancreas-Kidney Rejection. *Clinical Chemistry* vol. 52, n° 3, p. 379-382. [<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.058974>]
- GALLUZZI, L., KEPP, O., KRAUTWALD, S., *et al.* (2014) Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* vol. 35, p. 24-32. [<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.006>]
- GARBORG, K., HOLME, Ø., LØBERG, M., *et al.* (2013) Current status of screening for colorectal cancer. *Annals of Oncology*, In this issue: Focus on personalized medicine vol. 24, n° 8, p. 1963-1972. [<https://doi.org/10.1093/annonc/mdt157>]
- GELALETI, G.B., GRANZOTTO, A., LEONEL, C., *et al.* (2014) Short interspersed CAN SINE elements as prognostic markers in canine mammary neoplasia. *Oncology Reports* vol. 31, n° 1, p. 435-441. [<https://doi.org/10.3892/or.2013.2827>]
- GHANAM, J., CHETTY, V.K., BARTHEL, L., *et al.* (2022) DNA in extracellular vesicles: from evolution to its current application in health and disease. *Cell & Bioscience* vol. 12, n° 1, p. 37. [<https://doi.org/10.1186/s13578-022-00771-0>]
- GIAGLIS, S., DAOUDLARIAN, D., VOLL, R.E., *et al.* (2021) Circulating mitochondrial DNA copy numbers represent a sensitive marker for diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *RMD Open* vol. 7, n° 3, p. e002010. [<https://doi.org/10.1136/rmdopen-2021-002010>]
- GIBSON, T. (2020) Gastric Dilation and Volvulus in Small Animals. In *MSD Veterinary Manual*. [<https://www.msddvetmanual.com/digestive-system/diseases-of-the-stomach-and-intestines-in-small-animals/gastric-dilation-and-volvulus-in-small-animals>] (consulté le 03/07/2023).
- GIELIS, E.M., LEDEGANCK, K.J., DENDOOVEN, A., *et al.* (2020) The use of plasma donor-derived, cell-free DNA to monitor acute rejection after kidney transplantation. *Nephrology, Dialysis, Transplantation* vol. 35, n° 4, p. 714-721. [<https://doi.org/10.1093/ndt/gfz091>]
- GILAT, N., TABACHNIK, T., SHWARTZ, A., *et al.* (2017) Single-molecule quantification of 5-hydroxymethylcytosine for diagnosis of blood and colon cancers. *Clinical Epigenetics* vol. 9, n° 1, p. 70. [<https://doi.org/10.1186/s13148-017-0368-9>]
- GLEBOVA, K.V., VEIKO, N.N., NIKONOV, A.A., *et al.* (2018) Cell-free DNA as a biomarker in stroke: Current status, problems and perspectives. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* vol. 55, n° 1, p. 55-70. [<https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1420032>]
- GOH, S.K., DO, H., TESTRO, A., *et al.* (2019) The Measurement of Donor-Specific Cell-Free DNA Identifies Recipients With Biopsy-Proven Acute Rejection Requiring Treatment After Liver Transplantation. *Transplantation Direct* vol. 5, n° 7, p. e462. [<https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000902>]
- GOLSTEIN, P., KROEMER, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences* vol. 32, n° 1, p. 37-43. [<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001>]
- GOOD, L., MANNING, A.M. (2003) Thromboembolic Disease: Physiology of Hemostasis and Pathophysiology of Thrombosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* vol. 25, n° 9, p. 650-659.
- GORGANI-FIROUZJAEI, T., KALANTARI, N., JAVANIAN, M., *et al.* (2018) Strongyloides stercoralis: detection of parasite-derived DNA in serum samples obtained from immunosuppressed patients. *Parasitology Research* vol. 117, n° 9, p. 2927-2932. [<https://doi.org/10.1007/s00436-018-5985-5>]
- GOULD, T.J., VU, T.T., STAFFORD, A.R., *et al.* (2015) Cell-Free DNA Modulates Clot Structure and Impairs Fibrinolysis in Sepsis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 35, n° 12, p. 2544-2553. [<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.306035>]
- GRABUSCHNIG, S., BRONKHORST, A.J., HOLDENRIEDER, S., *et al.* (2020) Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21, n° 21, p. E8062. [<https://doi.org/10.3390/ijms21218062>]
- GRSKOVIC, M., HILLER, D.J., EUBANK, L.A., *et al.* (2016) Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *The Journal*

- of *Molecular Diagnostics* vol. 18, n° 6, p. 890-902. [https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.003]
- GUIL-LUNA, S., SÁNCHEZ-CESPEDES, R., RIVAS CRESPO, A., *et al.* (2023) Analysis of cell-free DNA concentration, fragmentation patterns and TP53 gene expression in mammary tumor-bearing dogs: A pilot study. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 10, p. 1157878. [https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1157878]
- HAGMAN, R. (2012) Clinical and Molecular Characteristics of Pyometra in Female Dogs. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 47, n° s6, p. 323-325. [https://doi.org/10.1111/rda.12031]
- HAN, D., LI, R., SHI, J., *et al.* (2020) Liquid biopsy for infectious diseases: a focus on microbial cell-free DNA sequencing. *Theranostics* vol. 10, n° 12, p. 5501-5513. [https://doi.org/10.7150/thno.45554]
- HAN, L., CHEN, C., LU, X., *et al.* (2021) Alterations of 5-hydroxymethylcytosines in circulating cell-free DNA reflect retinopathy in type 2 diabetes. *Genomics* vol. 113, n° 1, Part 1, p. 79-87. [https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.11.014]
- HANN, H.-W., JAIN, S., PARK, G., *et al.* (2017) Detection of urine DNA markers for monitoring recurrent hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Research* vol. 3, p. 105-111. [https://doi.org/10.20517/2394-5079.2017.15]
- HAO, T.B., SHI, W., SHEN, X.J., *et al.* (2014) Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *British Journal of Cancer* vol. 111, n° 8, p. 1482-1489. [https://doi.org/10.1038/bjc.2014.470]
- HASHIMOTO, T., YOSHIDA, K., HASHIRAMOTO, A., *et al.* (2021) Cell-Free DNA in Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 22, n° 16, p. 8941. [https://doi.org/10.3390/ijms22168941]
- HAUTE AUTORITÉ DE SANTÉ (2020) Trisomie 21 – Un dépistage plus performant et moins invasif. *In Haute Autorité de Santé*. [https://www.has-sante.fr/jcms/pprd\_2974232/fr/trisomie-21-un-depistage-plus-performant-et-moins-invasif] (consulté le 25/10/2023).
- HEITZER, E., AUINGER, L., SPEICHER, M.R. (2020) Cell-Free DNA and Apoptosis: How Dead Cells Inform About the Living. *Trends in Molecular Medicine* vol. 26, n° 5, p. 519-528. [https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.012]
- HENDY, O.M., MOTALIB, T.A., SHAFIE, M.A.E., *et al.* (2016) Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus severity and monitoring of therapy. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* vol. 17, n° 1, p. 79-85.
- HEROLD, K.C., USMANI-BROWN, S., GHAZI, T., *et al.* (2015)  $\beta$  Cell death and dysfunction during type 1 diabetes development in at-risk individuals. *The Journal of Clinical Investigation* vol. 125, n° 3, p. 1163-1173. [https://doi.org/10.1172/JCI78142]
- HETZ, C. (2008) Apoptosis, necrosis and autophagy: from mechanisms to biomedical applications. *Current Molecular Medicine* vol. 8, n° 2, p. 76-77. [https://doi.org/10.2174/156652408783769607]
- HOGAN, D.F. (2017) Feline Cardiogenic Arterial Thromboembolism: Prevention and Therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, Topics in Cardiology* vol. 47, n° 5, p. 1065-1082. [https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.05.001]
- HOPKINS, M.K., KOELPER, N., BENDER, W., *et al.* (2020) Association between cell-free DNA fetal fraction and gestational diabetes. *Prenatal Diagnosis* vol. 40, n° 6, p. 724-727. [https://doi.org/10.1002/pd.5671]
- HU, Z., CHEN, H., LONG, Y., *et al.* (2021) The main sources of circulating cell-free DNA: Apoptosis, necrosis and active secretion. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* vol. 157, p. 103166. [https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103166]
- HUANG, C.-H., TSAI, M.-S., HSU, C.-Y., *et al.* (2012) Circulating cell-free DNA levels correlate with postresuscitation survival rates in out-of-hospital cardiac arrest patients. *Resuscitation* vol. 83, n° 2, p. 213-218. [https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2011.07.039]
- HUANG, E., SETHI, S., PENG, A., *et al.* (2019) Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation* vol. 19, n° 6, p. 1663-1670. [https://doi.org/10.1111/ajt.15289]

- HUERTAS, J., COJOCARU, V. (2021) Breaths, Twists, and Turns of Atomistic Nucleosomes. *Journal of Molecular Biology* vol. 433, n° 6, p. 166744. [https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.166744]
- HUFNAGL, C., STÖCHER, M., MOIK, M., *et al.* (2013) A modified Phenol-chloroform extraction method for isolating circulating cell free DNA of tumor patients. *Journal of Nucleic Acids Investigation* vol. 4, n° 1, p. e1-e1. [https://doi.org/10.4081/jnai.2013.4282]
- HUNT, H., CAVE, N., BRIDGES, J., *et al.* (2018) Plasma NT-proBNP and Cell-Free DNA Concentrations after Prolonged Strenuous Exercise in Working Farm Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 1, p. 135-141. [https://doi.org/10.1111/jvim.14835]
- HUSSEIN, H.M., EL-TONSY, M.M., TAWFIK, R.A., *et al.* (2012) Experimental study for early diagnosis of prepatent schistosomiasis mansoni by detection of free circulating DNA in serum. *Parasitology Research* vol. 111, n° 1, p. 475-478. [https://doi.org/10.1007/s00436-012-2822-0]
- HUSSEINY, M.I., KURODA, A., KAYE, A.N., *et al.* (2012) Development of a Quantitative Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Beta Cell Death in Type 1 Diabetes. *PLoS One* vol. 7, n° 10, p. e47942. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047942]
- ILATOVSKAYA, D.V., DELEON-PENNELL, K.Y. (2018) An Offer We Cannot Refuse: Cell-Free DNA as a Novel Biomarker of Myocardial Infarction. *The American Journal of the Medical Sciences* vol. 356, n° 2, p. 88-89. [https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.05.009]
- ILLANES, S., GOMEZ, R., FORNES, R., *et al.* (2011) Free fetal DNA levels in patients at risk of preterm labour. *Prenatal Diagnosis* vol. 31, n° 11, p. 1082-1085. [https://doi.org/10.1002/pd.2838]
- INDELLI, P.F., GHIRARDELLI, S., VIOLANTE, B., *et al.* (2021) Next generation sequencing for pathogen detection in periprosthetic joint infections. *EFORT Open Reviews* vol. 6, n° 4, p. 236-244. [https://doi.org/10.1302/2058-5241.6.200099]
- JACKSON CHORNENKI, N.L., COKE, R., KWONG, A.C., *et al.* (2019) Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Medicine Experimental* vol. 7, n° 1, p. 29. [https://doi.org/10.1186/s40635-019-0251-4]
- JANG, M.K., TUNC, I., BERRY, G.J., *et al.* (2021) Donor-derived cell-free DNA accurately detects acute rejection in lung transplant patients, a multicenter cohort study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* vol. 40, n° 8, p. 822-830. [https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.04.009]
- JEFFERY, U., RUTERBORIES, L., HANEL, R., *et al.* (2017) Cell-Free DNA and DNase Activity in Dogs with Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 31, n° 5, p. 1441-1450. [https://doi.org/10.1111/jvim.14808]
- JEVŠINEK SKOK, D., HAUPTMAN, N. (2023) Steadfast Toll Like Receptor 4 (TLR4) 5-Hydroxymethylcytosine Levels in Cell-Free DNA: A Promising Consistency Marker for Colorectal Cancer Patients. *Genes* vol. 14, n° 8, p. 1636. [https://doi.org/10.3390/genes14081636]
- JIANG, J., BAI, L., YANG, W., *et al.* (2021) Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Non-HIV-Infected Patients: A Retrospective Study. *Infectious Diseases and Therapy* vol. 10, n° 3, p. 1733-1745. [https://doi.org/10.1007/s40121-021-00482-y]
- JU, C., XU, X., ZHANG, J., *et al.* (2023) Application of plasma donor-derived cell free DNA for lung allograft rejection diagnosis in lung transplant recipients. *BMC Pulmonary Medicine* vol. 23, n° 1. [https://doi.org/10.1186/s12890-022-02229-y]
- JUNG, M., KLOTZEK, S., LEWANDOWSKI, M., *et al.* (2003) Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clinical Chemistry* vol. 49, n° 6 Pt 1, p. 1028-1029. [https://doi.org/10.1373/49.6.1028]
- KADIVAR, A., HASSANPOUR, H., MIRSHOKRAEI, P., *et al.* (2013) Detection and quantification of cell-free fetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict fetal sex. *Theriogenology* vol. 79, n° 6, p. 995-1000. [https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.027]

- KAMATH, M., SHEKHTMAN, G., GROGAN, T., *et al.* (2022) Variability in Donor-Derived Cell-Free DNA Scores to Predict Mortality in Heart Transplant Recipients - A Proof-of-Concept Study. *Frontiers in Immunology* vol. 13, p. 825108. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.825108]
- KANANEN, L., HURME, M., BÜRKLE, A., *et al.* (2023) Circulating cell-free DNA in health and disease — the relationship to health behaviours, ageing phenotypes and metabolomics. *GeroScience* vol. 45, n° 1, p. 85-103. [https://doi.org/10.1007/s11357-022-00590-8]
- KELLER, M., BUSH, E., DIAMOND, J.M., *et al.* (2021) Use of donor-derived-cell-free DNA as a marker of early allograft injury in primary graft dysfunction (PGD) to predict the risk of chronic lung allograft dysfunction (CLAD). *The Journal of Heart and Lung Transplantation* vol. 40, n° 6, p. 488-493. [https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.02.008]
- KELLER, M.B., ANDARGIE, T.E., AGBOR-ENOH, S. (2023) Biomarkers in the Management of the Lung Transplant Allograft: A Focus on Donor-derived Cell-free DNA. *OBM Transplantation* vol. 7, n° 2, p. 1-17. [https://doi.org/10.21926/obm.transplant.2302190]
- KERR, J.F., WYLLIE, A.H., CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* vol. 26, n° 4, p. 239-257. [https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33]
- KHUSH, K.K., DE VLAMINCK, I., LUIKART, H., *et al.* (2021) Donor-derived, cell-free DNA levels by next-generation targeted sequencing are elevated in allograft rejection after lung transplantation. *ERJ Open Research* vol. 7, n° 1, p. 00462-02020. [https://doi.org/10.1183/23120541.00462-2020]
- KIM, J., BAE, H., AHN, S., *et al.* (2021) Cell-Free DNA as a Diagnostic and Prognostic Biomarker in Dogs With Tumors. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 8, p. 735682. [https://doi.org/10.3389/fvets.2021.735682]
- KLOCPERK, A., VCELAKOVA, J., VRABCOVA, P., *et al.* (2021) Elevated Biomarkers of NETosis in the Serum of Pediatric Patients With Type 1 Diabetes and Their First-Degree Relatives. *Frontiers in Immunology* vol. 12, p. 699386. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699386]
- KNIGHT, S.R., THORNE, A., LO FARO, M.L. (2019) Donor-specific Cell-free DNA as a Biomarker in Solid Organ Transplantation. A Systematic Review. *Transplantation* vol. 103, n° 2, p. 273. [https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002482]
- KRENZIEN, F., KATOU, S., PAPA, A., *et al.* (2020) Increased Cell-Free DNA Plasma Concentration Following Liver Transplantation Is Linked to Portal Hepatitis and Inferior Survival. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9, n° 5, p. 1543. [https://doi.org/10.3390/jcm9051543]
- KURODA, A., RAUCH, T.A., TODOROV, I., *et al.* (2009) Insulin Gene Expression Is Regulated by DNA Methylation. *PLoS One* vol. 4, n° 9, p. e6953. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006953]
- KUSTANOVICH, A., SCHWARTZ, R., PERETZ, T., *et al.* (2019) Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy* vol. 20, n° 8, p. 1057-1067. [https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759]
- LANGELIER, C., FUNG, M., CALDERA, S., *et al.* (2020) Detection of Pneumonia Pathogens from Plasma Cell-Free DNA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol. 201, n° 4, p. 491-495. [https://doi.org/10.1164/rccm.201904-0905LE]
- LAUKOVÁ, L., KONEČNÁ, B., VLKOVÁ, B., *et al.* (2018) Anti-cytokine therapy and plasma DNA in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* vol. 38, n° 8, p. 1449-1454. [https://doi.org/10.1007/s00296-018-4055-8]
- LAWSON, C., SMITH, S. a., O'BRIEN, M., *et al.* (2018) Neutrophil Extracellular Traps in Plasma from Dogs with Immune-mediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 1, p. 128-134. [https://doi.org/10.1111/jvim.14881]
- LEBASTCHI, J., DENG, S., LEBASTCHI, A.H., *et al.* (2013) Immune therapy and  $\beta$ -cell death in type 1 diabetes. *Diabetes* vol. 62, n° 5, p. 1676-1680. [https://doi.org/10.2337/db12-1207]
- LECOMTE, T., BERGER, A., ZINZINDOHOUE, F., *et al.* (2002) Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International Journal of Cancer* vol. 100, n° 5, p. 542-548. [https://doi.org/10.1002/ijc.10526]

- LEE, K.-H., SHIN, T.-J., KIM, W.-H., *et al.* (2019) Methylation of LINE-1 in cell-free DNA serves as a liquid biopsy biomarker for human breast cancers and dog mammary tumors. *Scientific Reports* vol. 9, n° 175. [https://doi.org/10.1038/s41598-018-36470-5]
- LEISHANGTHEM, G.D., SINGH, N.K., SINGH, N.D., *et al.* (2018) Cell free mitochondrial DNA in serum and milk associated with bovine mastitis: a pilot study. *Veterinary Research Communications* vol. 42, n° 4, p. 275-282. [https://doi.org/10.1007/s11259-018-9735-z]
- LEMELMAN, M.B., LETOURNEAU, L., GREELEY, S.A.W. (2018) Neonatal Diabetes Mellitus: An Update on Diagnosis and Management. *Clinics in Perinatology* vol. 45, n° 1, p. 41-59. [https://doi.org/10.1016/j.clp.2017.10.006]
- LETENDRE, J.-A., GOGGS, R. (2018a) Determining prognosis in canine sepsis by bedside measurement of cell-free DNA and nucleosomes. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 28, n° 6, p. 503-511. [https://doi.org/10.1111/vec.12773]
- LETENDRE, J.-A., GOGGS, R. (2018b) Concentrations of Plasma Nucleosomes but Not Cell-Free DNA Are Prognostic in Dogs Following Trauma. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 5, p. 180. [https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00180]
- LETENDRE, J.-A., GOGGS, R. (2017) Measurement of plasma cell-free DNA concentrations in dogs with sepsis, trauma, and neoplasia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 27, n° 3, p. 307-314. [https://doi.org/10.1111/vec.12592]
- LI, R.H.L., FABELLA, A., NGUYEN, N., *et al.* (2023) Circulating neutrophil extracellular traps in cats with hypertrophic cardiomyopathy and cardiogenic arterial thromboembolism. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 37, n° 2, p. 490-502. [https://doi.org/10.1111/jvim.16676]
- LI, R.H.L., TABLIN, F. (2018) A Comparative Review of Neutrophil Extracellular Traps in Sepsis. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 5, p. 291. [https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00291]
- LI, W., ZHANG, Xu, LU, X., *et al.* (2017) 5-Hydroxymethylcytosine signatures in circulating cell-free DNA as diagnostic biomarkers for human cancers. *Cell Research* vol. 27, n° 10, p. 1243-1257. [https://doi.org/10.1038/cr.2017.121]
- LI, Xuelian, DU, W., WANG, Y., *et al.* (2020) Rapid Diagnosis of Tuberculosis Meningitis by Detecting Mycobacterium tuberculosis Cell-Free DNA in Cerebrospinal Fluid. *American Journal of Clinical Pathology* vol. 153, n° 1, p. 126-130. [https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz135]
- LI, Xuan, HU, R., LUO, T., *et al.* (2020) Serum cell-free DNA and progression of diabetic kidney disease: a prospective study. *BMJ Open Diabetes Research and Care* vol. 8, n° 1, p. e001078. [https://doi.org/10.1136/bmjdr-2019-001078]
- LI, Z., LIU, Y., FU, J., *et al.* (2022) Bile is a reliable and valuable source to study cfDNA in biliary tract cancers. *Frontiers in Oncology* vol. 12, p. 961939. [https://doi.org/10.3389/fonc.2022.961939]
- LIANG, H., PENG, B., DONG, C., *et al.* (2018) Cationic nanoparticle as an inhibitor of cell-free DNA-induced inflammation. *Nature Communications* vol. 9, n° 1, p. 4291. [https://doi.org/10.1038/s41467-018-06603-5]
- LIEBS, S., KEILHOLZ, U., KEHLER, I., *et al.* (2019) Detection of mutations in circulating cell-free DNA in relation to disease stage in colorectal cancer. *Cancer Medicine* vol. 8, n° 8, p. 3761-3769. [https://doi.org/10.1002/cam4.2219]
- LIU, B., TANG, X., QIU, F., *et al.* (2016) DASAF: An R Package for Deep Sequencing-Based Detection of Fetal Autosomal Abnormalities from Maternal Cell-Free DNA. *BioMed Research International* vol. 2016, p. 2714341. [https://doi.org/10.1155/2016/2714341]
- LIU, J., ZOU, Y., TANG, Y., *et al.* (2016) Circulating cell-free mitochondrial deoxyribonucleic acid is increased in coronary heart disease patients with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* vol. 7, n° 1, p. 109-114. [https://doi.org/10.1111/jdi.12366]
- LIU, L., TOUNG, J.M., JASSOWICZ, A.F., *et al.* (2018) Targeted methylation sequencing of plasma cell-free DNA for cancer detection and classification. *Annals of Oncology* vol. 29, n° 6, p. 1445-1453. [https://doi.org/10.1093/annonc/mdy119]
- LIU, S., WANG, J. (2022) Current and Future Perspectives of Cell-Free DNA in Liquid Biopsy. *Current Issues in Molecular Biology* vol. 44, n° 6, p. 2695-2709. [https://doi.org/10.3390/cimb44060184]

- LO, Y.D., TEIN, M.S., PANG, C.C., *et al.* (1998) Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *The Lancet* vol. 351, n° 9112, p. 1329-1330. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)79055-3]
- LO, Y.M.D. (2012) Non-invasive prenatal diagnosis by massively parallel sequencing of maternal plasma DNA. *Open Biology* vol. 2, n° 6, p. 120086. [https://doi.org/10.1098/rsob.120086]
- LODH, N., CARO, R., SOFER, S., *et al.* (2016) Diagnosis of Strongyloides stercoralis: Detection of parasite-derived DNA in urine. *Acta Tropica* vol. 163, p. 9-13. [https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.07.014]
- LONE, S.N., NISAR, S., MASOODI, T., *et al.* (2022) Liquid biopsy: a step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer* vol. 21, n° 1, p. 79. [https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7]
- LONG, Y., ZHANG, Y., GONG, Y., *et al.* (2016) Diagnosis of Sepsis with Cell-free DNA by Next-Generation Sequencing Technology in ICU Patients. *Archives of Medical Research* vol. 47, n° 5, p. 365-371. [https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2016.08.004]
- LU, X., ZHANG, J., MA, W., *et al.* (2022) Pneumocystis Jirovecii Pneumonia Diagnosis via Metagenomic Next-Generation Sequencing. *Frontiers in Medicine* vol. 9. [https://doi.org/doi.org/10.3389/fmed.2022.812005]
- LUN, F.M.F., TSUI, N.B.Y., CHAN, K.C.A., *et al.* (2008) Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by digital size selection and relative mutation dosage on DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 105, n° 50, p. 19920-19925. [https://doi.org/10.1073/pnas.0810373105]
- MACHER, H.C., SUÁREZ-ARTACHO, G., GUERRERO, J.M., *et al.* (2014) Monitoring of Transplanted Liver Health by Quantification of Organ-Specific Genomic Marker in Circulating DNA from Receptor. *PLoS One* vol. 9, n° 12, p. e113987. [https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113987]
- MACHEREY-NAGEL (2022) User Manual. [https://www.mn-net.com/media/pdf/37/74/03/Instruction-NucleoSpin-Blood-L-XL-QuickPure.pdf] (consulté le 18/09/2023).
- MADKOUR, L.H. (2019) Chapter 2 - Characteristics of deoxyribonucleic acid. In Madkour, L.H. (Éd.), *Nucleic Acids as Gene Anticancer Drug Delivery Therapy*, Cambridge. Academic Press, p. 31-41. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819777-6.00002-0]
- MAGEN (2023) HiPure Circulating Nucleic acid Mini Kit. [https://www.magen-tec.com/products/info.aspx?lcid=35&itemid=71] (consulté le 18/09/2023).
- MANSUETO, G., BENINCASA, G., DELLA MURA, N., *et al.* (2020) Epigenetic-sensitive liquid biomarkers and personalised therapy in advanced heart failure: a focus on cell-free DNA and microRNAs. *Journal of Clinical Pathology* vol. 73, n° 9, p. 535-543. [https://doi.org/10.1136/jclinpath-2019-206404]
- MARGIOTTI, K., CESTA, A., DELLO RUSSO, C., *et al.* (2020) Cell-free DNA screening for sex chromosomal aneuploidies in 9985 pregnancies: Italian single experience. *BMC Research Notes* vol. 13, n° 1, p. 167. [https://doi.org/10.1186/s13104-020-05009-1]
- MARTIGNANO, F. (2019) Cell-Free DNA: An Overview of Sample Types and Isolation Procedures. *Methods in Molecular Biology* vol. 1909, p. 13-27. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\_2]
- MARTUSZEWSKI, A., PALUSZKIEWICZ, P., KRÓL, M., *et al.* (2021) Donor-Derived Cell-Free DNA in Kidney Transplantation as a Potential Rejection Biomarker: A Systematic Literature Review. *Journal of Clinical Medicine* vol. 10, n° 2, p. 193. [https://doi.org/10.3390/jcm10020193]
- MCCLURE, T., GOH, S.K., COX, D., *et al.* (2020) Donor-specific cell-free DNA as a biomarker in liver transplantation: A review. *World Journal of Transplantation* vol. 10, n° 11, p. 307-319. [https://doi.org/10.5500/wjt.v10.i11.307]
- MEDDEB, R., DACHE, Z.A.A., THEZENAS, S., *et al.* (2019) Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 5220. [https://doi.org/10.1038/s41598-019-41593-4]



- MEDICARE COVERAGE DATABASE (2020) MoIDX: AlloSure® or Equivalent Cell-Free DNA Testing for Kidney and Heart Allografts (L38355). [<https://www.cms.gov/medicare-coverage-database/view/lcd.aspx?LCDId=38355>] (consulté le 25/04/2023).
- MEDINA DIAZ, I., NOCON, A., MEHNERT, D.H., *et al.* (2016) Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PloS One* vol. 11, n° 11, p. e0166354. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166354>]
- MENEGAZZO, L., CICILIOT, S., PONCINA, N., *et al.* (2015) NETosis is induced by high glucose and associated with type 2 diabetes. *Acta Diabetologica* vol. 52, n° 3, p. 497-503. [<https://doi.org/10.1007/s00592-014-0676-x>]
- MGI TECH (2023) MGIEasy Circulating DNA Isolation Kit User Manual. [[https://en.mgitech.cn/Download/download\\_file/id/123](https://en.mgitech.cn/Download/download_file/id/123)] (consulté le 18/09/2023).
- MIGLIACCIO, A.R. (2010) Erythroblast enucleation. *Haematologica* vol. 95, n° 12, p. 1985-1988. [<https://doi.org/10.3324/haematol.2010.033225>]
- MINCHIN, S., LODGE, J. (2019) Understanding biochemistry: structure and function of nucleic acids. *Essays in Biochemistry* vol. 63, n° 4, p. 433-456. [<https://doi.org/10.1042/EBC20180038>]
- MOKÁNSZKI, A., BÁDON, E.S., MÓNUS, A., *et al.* (2021) Cell-free DNA From Pleural Effusion Samples: Is It Right for Molecular Testing in Lung Adenocarcinoma? *Pathology and Oncology Research* vol. 27, p. 613071. [<https://doi.org/10.3389/pore.2021.613071>]
- MORANO, D., ROSSI, S., LAPUCCI, C., *et al.* (2018) Cell-Free DNA (cfDNA) Fetal Fraction in Early- and Late-Onset Fetal Growth Restriction. *Molecular Diagnosis & Therapy* vol. 22, n° 5, p. 613-619. [<https://doi.org/10.1007/s40291-018-0353-9>]
- MORENO, A., EPSTEIN, D., BUDVYTIENE, I., *et al.* (2022) Accuracy of Pneumocystis jirovecii Plasma Cell-Free DNA PCR for Noninvasive Diagnosis of Pneumocystis Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* vol. 60, n° 5, p. e0010122. [<https://doi.org/10.1128/jcm.00101-22>]
- MOTAZEDIAN, M., FAKHAR, M., MOTAZEDIAN, M.H., *et al.* (2008) A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* vol. 60, n° 2, p. 151-154. [<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.09.001>]
- MUSHER, B.L., MELSON, J.E., AMATO, G., *et al.* (2020) Evaluation of Circulating Tumor DNA for Methylated BCAT1 and IKZF1 to Detect Recurrence of Stage II/Stage III Colorectal Cancer (CRC). *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* vol. 29, n° 12, p. 2702-2709. [<https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0574>]
- NAGY, B. (2019) Cell-Free Nucleic Acids. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20, n° 22, p. E5645. [<https://doi.org/10.3390/ijms20225645>]
- NELSON, D.L., COX, M.M. (2021) Lehninger Principles of Biochemistry, 8th Edition. New York, Macmillan International.
- NEVILL, B., LEISEWITZ, A., GODDARD, A., *et al.* (2010) An evaluation of changes over time in serum creatine kinase activity and C-reactive protein concentration in dogs undergoing hemilaminectomy or ovariohysterectomy. *Journal of the South African Veterinary Association* vol. 81, n° 1, p. 22-26. [<https://doi.org/10.4102/jsava.v81i1.90>]
- NOLAN, N., VALDIVIESO, K., MANI, R., *et al.* (2020) Clinical and Analytical Validation of a Novel Urine-Based Test for the Detection of Allograft Rejection in Renal Transplant Patients. *Journal of Clinical Medicine* vol. 9, n° 8, p. 2325. [<https://doi.org/10.3390/jcm9082325>]
- NORGEN (2023) Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kits - Protocol (50 Preps).
- NORTON, M.E., JACOBSSON, B., SWAMY, G.K., *et al.* (2015) Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *The New England Journal of Medicine* vol. 372, n° 17, p. 1589-1597. [<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407349>]
- OELLERICH, M., SCHÜTZ, E., KANZOW, P., *et al.* (2014) Use of Graft-Derived Cell-Free DNA as an Organ Integrity Biomarker to Reexamine Effective Tacrolimus Trough Concentrations After Liver Transplantation. *Therapeutic Drug Monitoring* vol. 36, n° 2, p. 136. [<https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000044>]
- OSUMI, H., SHINOZAKI, E., YAMAGUCHI, K., *et al.* (2019) Early change in circulating tumor DNA as a potential predictor of response to chemotherapy in patients with metastatic colorectal

- cancer. *Scientific Reports* vol. 9, n° 1, p. 17358. [<https://doi.org/10.1038/s41598-019-53711-3>]
- OTA, M., ASAMURA, H., OKI, T., *et al.* (2009) Restriction enzyme analysis of PCR products. *Methods in Molecular Biology* vol. 578, p. 405-414. [[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-411-1_25)]
- PALEI, A.C. (2021) Cell-free DNA as a potential biomarker for preeclampsia. *Expert Review of Molecular Diagnostics* vol. 21, n° 12, p. 1253-1256. [<https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1997593>]
- PANIZZI, L., DITTMER, K.E., VIGNES, M., *et al.* (2023) Plasma and Synovial Fluid Cell-Free DNA Concentrations Following Induction of Osteoarthritis in Horses. *Animals* vol. 13, n° 6, p. 1053. [<https://doi.org/10.3390/ani13061053>]
- PASHMAKOVA, M.B., BISHOP, M.A., STEINER, J.M., *et al.* (2014) Evaluation of serum thyroid hormones in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* vol. 24, n° 3, p. 264-271. [<https://doi.org/10.1111/vec.12172>]
- PATEL, A., HISSONG, E., ROSADO, L., *et al.* (2021) Next-Generation Sequencing of Cell-Free DNA Extracted From Pleural Effusion Supernatant: Applications and Challenges. *Frontiers in Medicine* vol. 8, p. 662312. [<https://doi.org/10.3389/fmed.2021.662312>]
- PEDERSEN, S.K., MUSER, B.L., LAPOINTE, L.C., *et al.* (2022) Detection of recurrent colorectal cancer with high specificity using a reporting threshold for circulating tumor DNA methylated in BCAT1 and IKZF1. *Cancer* vol. 128, n° 10, p. 1921-1928. [<https://doi.org/10.1002/cncr.34159>]
- PEDINI, P., COIFFARD, B., CHEROUAT, N., *et al.* (2023) Clinical relevance of cell-free DNA quantification and qualification during the first month after lung transplantation. *Frontiers in Immunology* vol. 14, p. 1183949. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1183949>]
- PERGAMENT, E., CUCKLE, H., ZIMMERMANN, B., *et al.* (2014) Single-Nucleotide Polymorphism–Based Noninvasive Prenatal Screening in a High-Risk and Low-Risk Cohort. *Obstetrics and Gynecology* vol. 124, n° 2 0 1, p. 210-218. [<https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000000363>]
- PETERSMANN, A., MÜLLER-WIELAND, D., MÜLLER, U.A., *et al.* (2019) Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* vol. 127, n° S 1, p. S1-S7. [<https://doi.org/10.1055/a-1018-9078>]
- PILLON, M. (2020) Mise au point de la méthode d'extraction de l'ADN bactérien de biopsies cutanées canines fixées par le formol puis incluses en paraffine pour identification par qPCR. Thèse de Médecine vétérinaire. Lyon, Ecole nationale vétérinaire VetAgroSup.
- PLOWS, J.F., STANLEY, J.L., BAKER, P.N., *et al.* (2018) The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, n° 11, p. 3342. [<https://doi.org/10.3390/ijms19113342>]
- POLINA, I.A., ILATOVSKAYA, D.V., DELEON-PENNELL, K.Y. (2020) Cell free DNA as a diagnostic and prognostic marker for cardiovascular diseases. *Clinica Chimica Acta* vol. 503, p. 145-150. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.013>]
- PROMEGA (2021) Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit Technical Manual.
- PROUTEAU, A., DENIS, J.A., FORNEL, P.D., *et al.* (2020) Interest of circulating tumor DNA as a biomarker for canine cancers: illustration in histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma and multicentric lymphoma. [<https://doi.org/10.1101/2020.07.10.189118>]
- QIAGEN (2023a) QIAamp DNA Blood Kits. [<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/genomic-dna/qiaamp-dna-blood-kits>] (consulté le 18/09/2023).
- QIAGEN (2023b) QIAamp MinElute Virus Kits. [<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/qiaamp-minelute-virus-kits>] (consulté le 18/09/2023).
- QIAGEN (2023c) QIAamp UltraSens Virus Kit. [<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/multianalyte-and-virus/qiaamp-ultrasens-virus-kit>] (consulté le 18/09/2023).

- QIAGEN (2023d) QIAamp DSP Virus Kit. [<https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiaamp-dsp-virus-kit>] (consulté le 18/09/2023).
- QIAGEN (2019) QIAamp® Circulating Nucleic Acid Handbook. [<https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=0c4b31ab-f4fb-425f-99bf-10ab9538c061&lang=en>] (consulté le 13/11/2022).
- QUEZADA, M.S., FRANCISCO, C., DUMITRASCU-BIRIS, D., *et al.* (2015) Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* vol. 45, n° 1, p. 101-105. [<https://doi.org/10.1002/uog.14666>]
- RAINER, T.H., WONG, K.S., LAM, W., *et al.* (2007) Comparison of plasma beta-globin DNA and S-100 protein concentrations in acute stroke. *Clinica Chimica Acta* vol. 376, n° 1-2, p. 190-196. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.08.025>]
- RAINER, T.H., WONG, L.K.S., LAM, W., *et al.* (2003) Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical Chemistry* vol. 49, n° 4, p. 562-569. [<https://doi.org/10.1373/49.4.562>]
- RANUCCI, R. (2019) Cell-Free DNA: Applications in Different Diseases. *Methods in Molecular Biology* vol. 1909, p. 3-12. [[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8973-7_1)]
- RICHMOND, M.E., ZANGWILL, S.D., KINDEL, S.J., *et al.* (2020) Donor fraction cell-free DNA and rejection in adult and pediatric heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* vol. 39, n° 5, p. 454-463. [<https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.11.015>]
- RISTANIC, M., STANISIC, L., MALETIC, M., *et al.* (2018) Bovine foetal sex determination-Different DNA extraction and amplification approaches for efficient livestock production. *Reproduction in Domestic Animals* vol. 53, n° 4, p. 947-954. [<https://doi.org/10.1111/rda.13193>]
- ROCHE (2020) High Pure Viral Nucleic Acid Kit. [<https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/pi/en/documents/download/d927229f-ad12-eb11-0091-005056a71a5d>] (consulté le 18/09/2023).
- RODWELL, V.W., BENDER, D., BOTHAM, K.M., *et al.* (2018) Harper's Illustrated Biochemistry, 31st Edition. McGraw Hill / Medical.
- ROSENHECK, J.P., ROSS, D.J., BOTROS, M., *et al.* (2022) Clinical Validation of a Plasma Donor-derived Cell-free DNA Assay to Detect Allograft Rejection and Injury in Lung Transplant. *Transplantation Direct* vol. 8, n° 4, p. e1317. [<https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001317>]
- RUSHTON, J.G., ERTL, R., KLEIN, D., *et al.* (2019) Circulating cell-free DNA does not harbour a diagnostic benefit in cats with feline diffuse iris melanomas. *Journal of Feline Medicine and Surgery* vol. 21, n° 2, p. 124-132. [<https://doi.org/10.1177/1098612X18762017>]
- RYKOVA, E., SIZIKOV, A., ROGGENBUCK, D., *et al.* (2017) Circulating DNA in rheumatoid arthritis: pathological changes and association with clinically used serological markers. *Arthritis Research & Therapy* vol. 19, n° 1, p. 85. [<https://doi.org/10.1186/s13075-017-1295-z>]
- SARZYNSKA-NOWACKA, U., KOSINSKI, P., WIELGOS, M. (2019) Is there a future for cell-free fetal dna tests in screening for preeclampsia? *Ginekologia Polska* vol. 90, n° 1, p. 55-60. [<https://doi.org/10.5603/GP.2019.0009>]
- SAUKKONEN, K., LAKKISTO, P., PETTILÄ, V., *et al.* (2008) Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical Chemistry* vol. 54, n° 6, p. 1000-1007. [<https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.101030>]
- SAYAH, D., WEIGT, S.S., RAMSEY, A., *et al.* (2020) Plasma Donor-derived Cell-free DNA Levels Are Increased During Acute Cellular Rejection After Lung Transplant: Pilot Data. *Transplantation Direct* vol. 6, n° 10, p. e608. [<https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000001063>]
- SCHAEFER, D.M.W., FORMAN, M.A., KISSEBERTH, W.C., *et al.* (2007) Quantification of plasma DNA as a prognostic indicator in canine lymphoid neoplasia. *Veterinary and Comparative Oncology* vol. 5, n° 3, p. 145-155. [<https://doi.org/10.1111/j.1476-5829.2007.00122.x>]

- SCHINDLER, M., WALTER, N., MADERBACHER, G., *et al.* (2023) Novel diagnostic markers for periprosthetic joint infection: a systematic review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 13. [<https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1210345>]
- SCHMIDT, B., WEICKMANN, S., WITT, C., *et al.* (2005) Improved Method for Isolating Cell-Free DNA. *Clinical Chemistry* vol. 51, n° 8, p. 1561-1563. [<https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.051003>]
- SCHÜTZ, E., FISCHER, A., BECK, J., *et al.* (2017) Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Medicine* vol. 14, n° 4, p. e1002286. [<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002286>]
- SCHWARZENBACH, H., STOEHLMACHER, J., PANTEL, K., *et al.* (2008) Detection and Monitoring of Cell-Free DNA in Blood of Patients with Colorectal Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 1137, n° 1, p. 190-196. [<https://doi.org/10.1196/annals.1448.025>]
- SEKIZAWA, A., JIMBO, M., SAITO, H., *et al.* (2003) Cell-free fetal DNA in the plasma of pregnant women with severe fetal growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 188, n° 2, p. 480-484. [<https://doi.org/10.1067/mob.2003.27>]
- SEOANE, J., DE MATTOS-ARRUDA, L., LE RHUN, E., *et al.* (2019) Cerebrospinal fluid cell-free tumour DNA as a liquid biopsy for primary brain tumours and central nervous system metastases. *Annals of Oncology* vol. 30, n° 2, p. 211-218. [<https://doi.org/10.1093/annonc/mdy544>]
- SHARMA, D., SUBRAMANIAM, G., SHARMA, N., *et al.* (2021) Cell-free DNA in the surveillance of heart transplant rejection. *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* vol. 37, n° 3, p. 257-264. [<https://doi.org/10.1007/s12055-020-01130-9>]
- SHEN, D., LU, Y., LI, G., *et al.* (2021) Mechanism of neutrophil extracellular traps generation and their role in trophoblasts apoptosis in gestational diabetes mellitus. *Cellular Signalling* vol. 88, p. 110168. [<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110168>]
- SHEN, J., GUO, L., YAN, P., *et al.* (2020) Prognostic value of the donor-derived cell-free DNA assay in acute renal rejection therapy: A prospective cohort study. *Clinical Transplantation* vol. 34, n° 10, p. 14053. [<https://doi.org/10.1111/ctr.14053>]
- SHIMIZU, Y. (2023) Pneumonia. *In World Health Organization*. [<https://www.who.int/health-topics/pneumonia>] (consulté le 04/07/2023).
- SIGDEL, T.K., ARCHILA, F.A., CONSTANTIN, T., *et al.* (2018) Optimizing Detection of Kidney Transplant Injury by Assessment of Donor-Derived Cell-Free DNA via Massively Multiplex PCR. *Journal of Clinical Medicine* vol. 8, n° 1, p. 19. [<https://doi.org/10.3390/jcm8010019>]
- SILVA, M.A.L. da, MEDEIROS, Z., SOARES, C.R.P., *et al.* (2014) A comparison of four DNA extraction protocols for the analysis of urine from patients with visceral leishmaniasis. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* vol. 47, n° 2, p. 193-197. [<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0233-2013>]
- SINGH, N., FERNANDO, C., HILL, J.E., *et al.* (2022) Identifying the minimum concentrations of cell-free fetal DNA in maternal blood required for bovine fetal sexing using PCR. *Theriogenology* vol. 191, p. 192-199. [<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.015>]
- SMET, M.-E., SCOTT, F.P., MCLENNAN, A.C. (2020) Discordant fetal sex on NIPT and ultrasound. *Prenatal Diagnosis* vol. 40, n° 11, p. 1353-1365. [<https://doi.org/10.1002/pd.5676>]
- SMITH, G.C.S. (2018) Universal screening for foetal growth restriction. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* vol. 49, p. 16-28. [<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.02.008>]
- SMITH, S.A., TOBIAS, A.H. (2004) Feline arterial thromboembolism: an update. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* vol. 34, n° 5, p. 1245-1271. [<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2004.05.006>]
- SNYDER, T.M., KHUSH, K.K., VALANTINE, H.A., *et al.* (2011) Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 108, n° 15, p. 6229-6234. [<https://doi.org/10.1073/pnas.1013924108>]

- SOLTÉSZ, B., URBANCSEK, R., PÖS, O., *et al.* (2019) Quantification of peripheral whole blood, cell-free plasma and exosome encapsulated mitochondrial DNA copy numbers in patients with atrial fibrillation. *Journal of Biotechnology* vol. 299, p. 66-71. [<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.018>]
- SONG, L., PENG, X., LI, Y., *et al.* (2017) The SEPT9 gene methylation assay is capable of detecting colorectal adenoma in opportunistic screening. *Epigenomics* vol. 9, n° 5, p. 599-610. [<https://doi.org/10.2217/epi-2016-0146>]
- SORBER, L., ZWAENEPOEL, K., DESCHOOLMEESTER, V., *et al.* (2017) A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *The Journal of Molecular Diagnostics* vol. 19, n° 1, p. 162-168. [<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.009>]
- SOTO, Á.L., GONZÁLEZ, M.B., REYES, I.U., *et al.* (2020) Fetal sex discordance. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* vol. 59, n° 5, p. 652-655. [<https://doi.org/10.1016/j.tjog.2020.07.004>]
- STEWART, C.M., KOTHARI, P.D., MOULIERE, F., *et al.* (2018) The value of cell-free DNA for molecular pathology. *The Journal of Pathology* vol. 244, n° 5, p. 616-627. [<https://doi.org/10.1002/path.5048>]
- STROUN, M., ANKER, P., MAURICE, P., *et al.* (1989) Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* vol. 46, n° 5, p. 318-322. [<https://doi.org/10.1159/000226740>]
- SYMONDS, E.L., PEDERSEN, S.K., YEO, B., *et al.* (2022) Assessment of tumor burden and response to therapy in patients with colorectal cancer using a quantitative ctDNA test for methylated BCAT1/IKZF1. *Molecular Oncology* vol. 16, n° 10, p. 2031-2041. [<https://doi.org/10.1002/1878-0261.13178>]
- SZABÓ, C. (2005) Mechanisms of cell necrosis. *Critical Care Medicine* vol. 33, n° 12, p. 530-534. [<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000187002.88999.CF>]
- TAGAWA, M., SHIMBO, G., INOKUMA, H., *et al.* (2019) Quantification of plasma cell-free DNA levels in dogs with various tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* vol. 31, n° 6, p. 836-843. [<https://doi.org/10.1177/1040638719880245>]
- TAGAWA, M., TAMBO, N., MAEZAWA, M., *et al.* (2020) Quantitative analysis of the BRAF V595E mutation in plasma cell-free DNA from dogs with urothelial carcinoma. *PLoS One* vol. 15, n° 4, p. e0232365. [<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232365>]
- THERMOFISHER SCIENTIFIC (2023) MagMAX Cell-Free DNA (cfDNA) Isolation. [<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/automated-purification-extraction/automated-magmax-kits-nucleic-acid-extraction/cell-free-dna-cfdna-isolation.html>] (consulté le 18/09/2023).
- THIAM, H.R., WONG, S.L., WAGNER, D.D., *et al.* (2020) Cellular Mechanisms of NETosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* vol. 36, p. 191-218. [<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-020520-111016>]
- THURIK, F.F., LAMAIN-DE RUITER, M., JAVADI, A., *et al.* (2016) Absolute first trimester cell-free DNA levels and their associations with adverse pregnancy outcomes. *Prenatal Diagnosis* vol. 36, n° 12, p. 1104-1111. [<https://doi.org/10.1002/pd.4940>]
- TIE, J., WANG, Y., TOMASETTI, C., *et al.* (2016) Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine* vol. 8, n° 346, p. 346ra92. [<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf6219>]
- TORIBIO, L., SANTIVANEZ, S., SCOTT, A.L., *et al.* (2020) Diagnostic urinary cfDNA detected in human cystic echinococcosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* vol. 239, p. 111314. [<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111314>]
- TROIA, R., GIUNTI, M., CALIPA, S., *et al.* (2018) Cell-Free DNA, High-Mobility Group Box-1, and Procalcitonin Concentrations in Dogs With Gastric Dilatation–Volvulus Syndrome. *Frontiers in Veterinary Science* vol. 5, p. 67. [<https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00067>]
- TRUSZEWSKA, A., FORONCEWICZ, B., PĄCZEK, L. (2017) The role and diagnostic value of cell-free DNA in systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Rheumatology* vol. 35, n° 2, p. 330-336.

- TUG, S., HELMIG, S., MENKE, J., *et al.* (2014) Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cellular Immunology* vol. 292, n° 1, p. 32-39. [<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.08.002>]
- ULLAH, H., QADEER, A., GIRI, B.R. (2020) Detection of circulating cell-free DNA to diagnose *Schistosoma japonicum* infection. *Acta Tropica* vol. 211, p. 105604. [<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105604>]
- UNDERHILL, H.R., KITZMAN, J.O., HELLWIG, S., *et al.* (2016) Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS Genetics* vol. 12, n° 7, p. e1006162. [<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006162>]
- UNGERER, V., BRONKHORST, A.J., HOLDENRIEDER, S. (2020) Preanalytical variables that affect the outcome of cell-free DNA measurements. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* vol. 57, n° 7, p. 484-507. [<https://doi.org/10.1080/10408363.2020.1750558>]
- USMANI-BROWN, S., LEBASTCHI, J., STECK, A.K., *et al.* (2014) Analysis of  $\beta$ -cell death in type 1 diabetes by droplet digital PCR. *Endocrinology* vol. 155, n° 9, p. 3694-3698. [<https://doi.org/10.1210/en.2014-1150>]
- UZUELLI, J.A., DIAS-JUNIOR, C.A.C., IZIDORO-TOLEDO, T.C., *et al.* (2009) Circulating cell-free DNA levels in plasma increase with severity in experimental acute pulmonary thromboembolism. *Clinica Chimica Acta* vol. 409, n° 1, p. 112-116. [<https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.09.011>]
- VAN DEN OEVER, J.M.E., BIJLSMA, E.K., FEENSTRA, I., *et al.* (2015) Noninvasive prenatal diagnosis of Huntington disease: detection of the paternally inherited expanded CAG repeat in maternal plasma. *Prenatal Diagnosis* vol. 35, n° 10, p. 945-949. [<https://doi.org/10.1002/pd.4593>]
- VAN BOECKEL, S.R., DAVIDSON, D.J., NORMAN, J.E., *et al.* (2018) Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth. *Reproduction* vol. 155, n° 3, p. R137-R145. [<https://doi.org/10.1530/REP-17-0619>]
- VAN BOECKEL, S.R., MACPHERSON, H., NORMAN, J.E., *et al.* (2020) Inflammation-mediated generation and inflammatory potential of human placental cell-free fetal DNA. *Placenta* vol. 93, p. 49-55. [<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.02.016>]
- VANGUILDER, H.D., VRANA, K.E., FREEMAN, W.M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques* vol. 44, n° 5, p. 619-626. [<https://doi.org/10.2144/000112776>]
- VASILYEVA, I., BESPALOV, V., BARANOVA, A., *et al.* (2020) Differential Dynamics of the Levels of Low Molecular Weight DNA Fragments in the Plasma of Patients With Ischemic and Hemorrhagic Strokes. *Basic and Clinical Neuroscience* vol. 11, n° 6, p. 805-810. [<https://doi.org/10.32598/bcn.11.6.1639.1>]
- VELAND, N., ESPINOSA, D., VALENCIA, B.M., *et al.* (2011) Polymerase Chain Reaction Detection of *Leishmania* kDNA from the Urine of Peruvian Patients with Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* vol. 84, n° 4, p. 556-561. [<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0556>]
- VIDAL (2013a) Les fausses couches. In VIDAL. [<https://www.vidal.fr/sante/grossesse/conception-suivi-grossesse/fausses-couches.html>] (consulté le 21/06/2023).
- VIDAL (2013b) Les causes des fausses couches. In Vidal. [<https://www.vidal.fr/sante/grossesse/conception-suivi-grossesse/fausses-couches/causes.html>] (consulté le 21/06/2023).
- VON MEIJENFELDT, F.A., BURLAGE, L.C., BOS, S., *et al.* (2018) Elevated Plasma Levels of Cell-Free DNA During Liver Transplantation Are Associated With Activation of Coagulation. *Liver Transplantation* vol. 24, n° 12, p. 1716-1725. [<https://doi.org/10.1002/lt.25329>]
- VYMETALKOVA, V., CERVENA, K., BARTU, L., *et al.* (2018) Circulating Cell-Free DNA and Colorectal Cancer: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19, n° 11, p. 3356. [<https://doi.org/10.3390/ijms19113356>]
- WALKER, N.J., RASHID, M., YU, S., *et al.* (2022) Hydroxymethylation profile of cell-free DNA is a biomarker for early colorectal cancer. *Scientific Reports* vol. 12, n° 1, p. 16566. [<https://doi.org/10.1038/s41598-022-20975-1>]

- WALLNER, M., HERBST, A., BEHRENS, A., *et al.* (2006) Methylation of Serum DNA Is an Independent Prognostic Marker in Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* vol. 12, n° 24, p. 7347-7352. [<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1264>]
- WANG, F., MIAO, H.-B., PEI, Z.-H., *et al.* (2022) Serological, fragmentomic, and epigenetic characteristics of cell-free DNA in patients with lupus nephritis. *Frontiers in Immunology* vol. 13, p. 1001690. [<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1001690>]
- WANG, J.-Y., HSIEH, J.-S., CHANG, M.-Y., *et al.* (2004) Molecular Detection of APC, K-ras, and p53 Mutations in the Serum of Colorectal Cancer Patients as Circulating Biomarkers. *World Journal of Surgery* vol. 28, n° 7, p. 721-726. [<https://doi.org/10.1007/s00268-004-7366-8>]
- WANG, R., ZHU, Y., LIU, Z., *et al.* (2021) Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke. *Blood* vol. 138, n° 1, p. 91-103. [<https://doi.org/10.1182/blood.2020008913>]
- WANG, Y., LI, S., WANG, W., *et al.* (2020) Cell-free DNA screening for sex chromosome aneuploidies by non-invasive prenatal testing in maternal plasma. *Molecular Cytogenetics* vol. 13, p. 10. [<https://doi.org/10.1186/s13039-020-0478-5>]
- WATSON, D., YANG, J.Y.C., SARWAL, R.D., *et al.* (2019) A Novel Multi-Biomarker Assay for Non-Invasive Quantitative Monitoring of Kidney Injury. *Journal of Clinical Medicine* vol. 8, n° 4, p. 499. [<https://doi.org/10.3390/jcm8040499>]
- WEERAKOON, K.G., GORDON, C.A., WILLIAMS, G.M., *et al.* (2017) Droplet Digital PCR Diagnosis of Human Schistosomiasis: Parasite Cell-Free DNA Detection in Diverse Clinical Samples. *The Journal of Infectious Diseases* vol. 216, n° 12, p. 1611-1622. [<https://doi.org/10.1093/infdis/jix521>]
- WEERAKOON, K.G., MCMANUS, D.P. (2016) Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends in Parasitology* vol. 32, n° 5, p. 378-391. [<https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.01.006>]
- WICHMANN, D., PANNING, M., QUACK, T., *et al.* (2009) Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. *PLoS Neglected Tropical Diseases* vol. 3, n° 4, p. e422. [<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000422>]
- WIERSMA, M., VAN MARION, D.M.S., BOUMAN, E.J., *et al.* (2020) Cell-Free Circulating Mitochondrial DNA: A Potential Blood-Based Marker for Atrial Fibrillation. *Cells* vol. 9, n° 5, p. 1159. [<https://doi.org/10.3390/cells9051159>]
- WILSON, I.J., BURCHELL, R.K., WORTH, A.J., *et al.* (2018) Kinetics of Plasma Cell-Free DNA and Creatine Kinase in a Canine Model of Tissue Injury. *Journal of Veterinary Internal Medicine* vol. 32, n° 1, p. 157-164. [<https://doi.org/10.1111/jvim.14901>]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2023) Meningitis. In *World Health Organization*. [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/meningitis>] (consulté le 18/08/2023).
- WORM ØRNTOFT, M.-B. (2018) Review of Blood-Based Colorectal Cancer Screening: How Far Are Circulating Cell-Free DNA Methylation Markers From Clinical Implementation? *Clinical Colorectal Cancer* vol. 17, n° 2, p. e415-e433. [<https://doi.org/10.1016/j.clcc.2018.02.012>]
- WU, D., ZHOU, G., JIN, P., *et al.* (2016) Detection of Colorectal Cancer Using a Simplified SEPT9 Gene Methylation Assay Is a Reliable Method for Opportunistic Screening. *The Journal of Molecular Diagnostics* vol. 18, n° 4, p. 535-545. [<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.02.005>]
- WU, J., LIANG, H., LI, Y., *et al.* (2020) Cationic Block Copolymer Nanoparticles with Tunable DNA Affinity for Treating Rheumatoid Arthritis. *Advanced Functional Materials* vol. 30, n° 27, p. 2000391. [<https://doi.org/10.1002/adfm.202000391>]
- WU, X., ZHANG, Y., HU, T., *et al.* (2021) A novel cell-free DNA methylation-based model improves the early detection of colorectal cancer. *Molecular Oncology* vol. 15, n° 10, p. 2702-2714. [<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12942>]
- XIAO, Z., WU, W., WU, C., *et al.* (2021) 5-Hydroxymethylcytosine signature in circulating cell-free DNA as a potential diagnostic factor for early-stage colorectal cancer and precancerous adenoma. *Molecular Oncology* vol. 15, n° 1, p. 138-150. [<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12833>]
- XU, J.-M., LIU, X.-J., GE, F.-J., *et al.* (2014) KRAS mutations in tumor tissue and plasma by different assays predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of*

- Experimental & Clinical Cancer Research* vol. 33, n° 1, p. 104. [https://doi.org/10.1186/s13046-014-0104-7]
- YANG, J.Y.C., SARWAL, R.D., SIGDEL, T.K., *et al.* (2020) A Urine Score for Non-Invasive Accurate Diagnosis and Prediction of Kidney Transplant Rejection. *Science Translational Medicine* vol. 12, n° 535, p. 2501. [https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba2501]
- YANG, J.Y.C., VERLEDEN, S.E., ZARINSEFAT, A., *et al.* (2019) Cell-Free DNA and CXCL10 Derived from Bronchoalveolar Lavage Predict Lung Transplant Survival. *Journal of Clinical Medicine* vol. 8, n° 2, p. 241. [https://doi.org/10.3390/jcm8020241]
- YANG, Y., ZENG, C., LU, X., *et al.* (2019) 5-Hydroxymethylcytosines in Circulating Cell-Free DNA Reveal Vascular Complications of Type 2 Diabetes. *Clinical Chemistry* vol. 65, n° 11, p. 1414-1425. [https://doi.org/10.1373/clinchem.2019.305508]
- YARON, Y., PAUTA, M., BADENAS, C., *et al.* (2020) Maternal plasma genome-wide cell-free DNA can detect fetal aneuploidy in early and recurrent pregnancy loss and can be used to direct further workup. *Human Reproduction* vol. 35, n° 5, p. 1222-1229. [https://doi.org/10.1093/humrep/deaa073]
- YOKOKAWA, T., MISAKA, T., KIMISHIMA, Y., *et al.* (2020) Clinical Significance of Circulating Cardiomyocyte-Specific Cell-Free DNA in Patients With Heart Failure: A Proof-of-Concept Study. *Canadian Journal of Cardiology* vol. 36, n° 6, p. 931-935. [https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.10.016]
- YOON, K.-A., PARK, S., LEE, S.H., *et al.* (2009) Comparison of Circulating Plasma DNA Levels between Lung Cancer Patients and Healthy Controls. *The Journal of Molecular Diagnostics* vol. 11, n° 3, p. 182-185. [https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.080098]
- YÖRÜKER, E.E., ÖZGÜR, E., KESKIN, M., *et al.* (2015) Assessment of circulating serum DNA integrity in colorectal cancer patients. *Anticancer Research* vol. 35, n° 4, p. 2435-2440.
- ZACHER, L.A., BERG, J., SHAW, S.P., *et al.* (2010) Association between outcome and changes in plasma lactate concentration during presurgical treatment in dogs with gastric dilatation-volvulus: 64 cases (2002–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* vol. 236, n° 8, p. 892-897. [https://doi.org/10.2460/javma.236.8.892]
- ZARAVINOS, A., TZORAS, S., APOSTOLAKIS, S., *et al.* (2011) Levosimendan reduces plasma cell-free DNA levels in patients with ischemic cardiomyopathy. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* vol. 31, n° 2, p. 180-187. [https://doi.org/10.1007/s11239-010-0527-8]
- ZHANG, H., ZHENG, C., LI, X., *et al.* (2020) Diagnostic Performance of Donor-Derived Plasma Cell-Free DNA Fraction for Antibody-Mediated Rejection in Post Renal Transplant Recipients: A Prospective Observational Study. *Frontiers in Immunology* vol. 11, p. 342. [https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00342]
- ZHANG, K., LIN, G., HAN, Y., *et al.* (2017) Circulating unmethylated insulin DNA as a potential non-invasive biomarker of beta cell death in type 1 Diabetes: a review and future prospect. *Clinical Epigenetics* vol. 9, n° 1, p. 44. [https://doi.org/10.1186/s13148-017-0343-5]
- ZHANG, S., LU, X., SHU, X., *et al.* (2014) Elevated plasma cfDNA may be associated with active lupus nephritis and partially attributed to abnormal regulation of neutrophil extracellular traps (NETs) in patients with systemic lupus erythematosus. *Internal Medicine* vol. 53, n° 24, p. 2763-2771. [https://doi.org/10.2169/internalmedicine.53.2570]
- ZHAO, Y., GONGSANG, Q., JI, J., *et al.* (2021) Characterizing dynamic changes of plasma cell-free *Echinococcus granulosus* DNA before and after cystic echinococcosis treatment initiation. *Genomics* vol. 113, n° 2, p. 576-582. [https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.12.035]
- ZOU, J., DUFFY, B., SLADE, M., *et al.* (2017) Rapid detection of donor cell free DNA in lung transplant recipients with rejections using donor-recipient HLA mismatch. *Human Immunology* vol. 78, n° 4, p. 342-349. [https://doi.org/10.1016/j.humimm.2017.03.002]





# Annexe 1 : Kits d'extraction des cfDNA

Le tableau suivant présente les différents kits utilisés dans les études citées dans cette thèse, lorsque les caractéristiques de ceux-ci sont mises à disposition par les laboratoires. Le symbole « / » signifie que les informations sont manquantes ou non fournies.

Laboratoire	Kit	Technique utilisée	Nature de l'échantillon	Volume d'échantillon	Rendement	Applications (non exhaustives)	Référence
Analytik Jena	PME free-circulating DNA Extraction Kit	Polymer Mediated Enrichment	Sérum	Jusqu'à 5 mL	/	/	(Analytik Jena, 2014)
			Plasma	Jusqu'à 5 mL			
			Urines	Jusqu'à 10 mL			
			Autres liquides biologiques	Jusqu'à 5 mL			
Applied Biosystems	BloodPrep™ Chemistry	Fibres de verre	Sang total	Jusqu'à 150 µL	2 à 8 µg pour 150 µL	/	(Applied Biosystems, 2003)
Bioo Scientific	NextPrep-Mag™ cfDNA Isolation Kit	Billes magnétiques	Plasma	1 à 5 mL	/	PCR NGS	(Bioo Scientific, 2017)
Cytiva	Sera-Xtracta™ Cell-Free DNA Kit	Billes magnétiques	Sérum	0,5 à 4 mL	/	PCR ddPCR NGS Génotypage	(Cytiva, 2020)
			Plasma				
			Urines	4 mL			
EpiGentek	EpiQuick™ Circulating Cell-Free DNA Isolation Kit	Billes magnétiques	Sérum	100 à 500 µL	/	QPCR NGS	(EpiGentek, 2022a)
			Plasma				
EpiGentek	FitAmp™ Plasma/Serum DNA Isolation Kit	Colonne de centrifugation	Sérum	500 µL	8- 20 µl	NGS Génotypage DPNI	(EpiGentek, 2022b)
			Plasma				
			Autres liquides biologiques				

Laboratoire	Kit	Technique utilisée	Nature de l'échantillon	Volume d'échantillon	Rendement	Applications (non exhaustives)	Référence
<b>Macherey-Nagel</b>	NucleoSpin® Blood Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sang total	5 à 200 µL	4 à 6 µg	PCR Southern Blot Réactions enzymatiques	(Macherey-Nagel, 2022)
			Sérum				
			Plasma				
			Autres liquides biologiques				
<b>Magen</b>	HiPure Circulating Nucleic acid Mini Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sérum	1 mL	/	qPCR Détection de SNP	(Magen, 2023)
			Plasma				
			Autres liquides biologiques				
<b>MGI</b>	MGIEasy Circulating DNA Isolation	Billes magnétiques	Plasma	300 µL	/	PCR NGS	(MGI Tech, 2023)
<b>Norgen</b>	Plasma/ Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Kit	Colonne de centrifugation (matrice de résine)	Sérum	200 µL	Variable	PCR qPCR NGS Southern Blot	(Norgen, 2023)
			Plasma				
<b>Promega</b>	Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit	Billes magnétiques	Plasma	0,2 à 1,0 mL	10 à 30 ng pour 1 mL	PCR	(Promega, 2021)
<b>Qiagen</b>	QIAamp® Circulating Nucleic Acid	Colonne de centrifugation à membrane de silice	Sérum	1 à 5 mL	Variable	PCR qPCR	(Qiagen, 2019)
			Plasma	1 à 5 mL			
			Urines	1 à 4 mL			
<b>Qiagen</b>	QIAamp® DNA Blood Midi Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sang total	0,3 à 2 mL	20 à 60 µg	PCR Southern blot	(Qiagen, 2023a)
			Sérum				
			Plasma				

Laboratoire	Kit	Technique utilisée	Nature de l'échantillon	Volume d'échantillon	Rendement	Applications (non exhaustives)	Référence
			Autres liquides biologiques				
<b>Qiagen</b>	QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sang total	1 à 200 µL	4 à 12 µg	PCR Southern blot	(Qiagen, 2023a)
			Sérum				
			Plasma				
			Autres liquides biologiques				
<b>Qiagen</b>	QIAamp® MinElute Virus Kit	Colonne de centrifugation à membrane de silice	Sérum	200 à 500 µL	Variable	PCR	(Qiagen, 2023b)
			Plasma				
<b>Qiagen</b>	QIAamp® UltraSens Virus Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sérum	1 mL	> 85 %	PCR qPCR Blot	(Qiagen, 2023c)
			Plasma				
<b>Qiagen</b>	QIAamp® DSP Virus Kit	Colonne de centrifugation (membrane de silice)	Sérum	500 µL	Variable	PCR qPCR	(Qiagen, 2023d)
			Plasma				
<b>Roche</b>	High Pure Viral Nucleic Acid Kit	Fibres de verre	Sang total	200 µL	/	PCR	(Roche, 2020)
			Sérum				
			Plasma				
<b>Thermofisher</b>	MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit	Billes magnétiques	Sérum	0,1 à 10 mL	/	qPCR ddPCR NGS	(ThermoFisher Scientific, 2023)
			Plasma	0,5 à 10 mL			
			Urines	10 mL			



# PRÉSENTATION ET UTILISATION EN MÉDECINE VÉTÉRINAIRE DE L'ADN LIBRE CIRCULANT : UNE ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

---

**AUTEUR : Camille DE CASTRO**

## **RÉSUMÉ :**

Les ADN libres circulant, ou *cell-free DNA* en anglais, sont des fragments d'ADN extracellulaires retrouvés dans les liquides biologiques d'un organisme vivant, et pouvant être isolés à partir de leur prélèvement, peu invasif et répétable. Découverts il y a bientôt soixante ans, les *cell-free DNA* ont fait l'objet de nombreuses recherches, principalement afin d'évaluer leur potentiel en tant qu'outil d'aide au diagnostic, au pronostic et au monitoring thérapeutique, mais aussi en tant que potentiel cible thérapeutique. Sans être exhaustif, ce travail a pour but d'établir un bilan des connaissances au sujet des *cell-free DNA* aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire, afin de présenter leurs différentes applications.

À travers cette étude bibliographique, les *cell-free DNA* se démarquent comme des biomarqueurs prometteurs à la fois diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques, dont l'utilisation peut se faire dans de nombreux domaines de la médecine. Des tests diagnostiques basés sur ces molécules ont déjà été commercialisés en médecine humaine, notamment dans un contexte de transplantation d'organe. À l'heure actuelle, les études en médecine vétérinaire sont, pour le moment, moins nombreuses et moins variées qu'en médecine humaine, et des recherches supplémentaires sont nécessaires afin d'aboutir à la validation clinique des données établies dans la littérature aussi bien chez l'homme que chez les animaux domestiques. Toutefois, si l'engouement suscité par les *cell-free DNA* continue de croître comme il le fait actuellement, il est raisonnable d'espérer que ces molécules fassent un jour partie des biomarqueurs à disposition des vétérinaires praticiens.

**MOTS CLÉS :** ADN LIBRE CIRCULANT / BIOMARQUEUR / BIOPSIE LIQUIDE / DIAGNOSTIC / PRONOSTIC / MONITORING THÉRAPEUTIQUE

## **JURY :**

Président : Pr Sylvain BELLIER

Directeur de thèse : Dr Pierre DESHUIILLERS

Examinatrice : Dr Ghita BENCHEKROUN

# **PRESENTATION AND USE IN VETERINARY MEDICINE OF CELL-FREE DNA: A BIBLIOGRAPHIC STUDY**

---

**AUTHOR:** Camille DE CASTRO

## **SUMMARY:**

Cell-free DNA are extracellular DNA fragments that can be found in the biological fluids of living organisms and obtained from the sampling of said fluids, in a minimally invasive and reproducible way. Ever since their discovery almost sixty years ago, cell-free DNA have been the subject of numerous research papers in order to assess their potential as a diagnosis, prognosis and therapy monitoring biomarker. Without being exhaustive, this work aims to review the available knowledge about cell-free DNA, in human health as well as in veterinary medicine, in order to give an overview of their various fields of applications.

Through this bibliographical study, cell-free DNA stand out as promising biomarkers in terms of diagnosis, prognosis and therapy monitoring, that can be used in many fields of human medicine. Diagnosis tests based on these molecules are already available on the market, most especially in the context of organ transplantation. Currently, there is fewer and less varied research about cell-free DNA in veterinary medicine. Therefore, further research would be necessary in order to confirm what has already been established in humans and in domestic animal species. Taking into consideration the current, growing interest for cell-free DNA, it is quite reasonable to hope that these molecules will one day become available to veterinarians as routine biomarkers.

**KEYWORDS:** CELL-FREE DNA / BIOMARKER / LIQUID BIOPSY / DIAGNOSIS / PROGNOSIS / THERAPY MONITORING

## **JURY:**

Chairperson: Pr Sylvain BELLIER

Thesis Director: Dr Pierre DESHUIILLERS

Reviewer: Dr Ghita BENCHEKROUN