



**HAL**  
open science

# Étude de la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondriale

Zahra Al Amir Dache

► **To cite this version:**

Zahra Al Amir Dache. Étude de la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondriale. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2019. Français. NNT: 2019MONTT059. tel-02901606

**HAL Id: tel-02901606**

**<https://theses.hal.science/tel-02901606>**

Submitted on 17 Jul 2020

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

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

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé – CBS2

Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier (IRCM) – INSERM U1194

## Étude de la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondriale

Présentée par Zahra AL AMIR DACHE

Le 20 Novembre 2019

Sous la direction de Alain THIERRY  
Et Corinne PREVOSTEL

Devant le jury composé de

Mr. Gregory LAVIEU, CR, Centre de recherche de l'Institut Curie, Paris	Rapporteur
Mr. Alain BRISSON, Pr, Institut de chimie & biologie des membranes & des nano-objets, Bordeaux	Rapporteur
Mme. Marie-Luce VIGNAIS, CR, Institut de médecine régénératrice et de biothérapie de Montpellier, Montpellier	Examinatrice
Mme. Mona DIAB ASSAF, Pr, Université Libanaise, Liban	Présidente
Mr. Alain THIERRY, DR, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Montpellier	Directeur
Mme. Corinne PREVOSTEL, CR, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, Montpellier	Co-Directrice



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER



## Résumé:

Le plasma transporte des cellules sanguines avec un mélange de composés, y compris les nutriments, déchets, anticorps, et messagers chimiques... dans tout l'organisme. Des facteurs non solubles tels que l'ADN circulant et les vésicules extracellulaires ont récemment été ajoutés à la liste de ces composants et ont fait l'objet d'études approfondies en raison de leur rôle dans la communication intercellulaire. Or, l'ADN circulant (ADNcir) est composé de fragments d'ADN libres ou associés à d'autres particules, libérés par tous les types cellulaires. Cet ADN est non seulement de l'ADN génomique mais aussi de l'ADN mitochondrial extrachromosomique. De nombreux travaux réalisés au cours des dernières années indiquent que l'analyse quantitative et qualitative de l'ADNcir représente une avancée dans les applications cliniques en tant que biomarqueur non invasif de diagnostic, de pronostic et de suivi thérapeutique. Cependant, malgré l'avenir prometteur de cet ADNcir dans les applications cliniques, notamment en oncologie, les connaissances sur ses origines, sa composition et ses fonctions qui pourraient pourtant permettre d'optimiser considérablement sa valeur diagnostique, font encore défaut.

Le principal objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser les propriétés structurales de l'ADN extracellulaire d'origine mitochondrial. En examinant l'intégrité de cet ADN, ainsi que la taille et la densité des structures associées, ce travail a révélé la présence de particules denses d'une taille supérieure à 0,2  $\mu\text{m}$  contenant des génomes mitochondriaux complets et non fragmentés. Nous avons caractérisé ces structures notamment par microscopie électronique et cytométrie en flux et nous avons identifié des mitochondries intactes dans le milieu extracellulaire *in vitro* et *ex-vivo* (dans des échantillons de plasma d'individus sains). Une consommation d'oxygène par ces mitochondries a été détectée par la technique du Seahorse, suggérant qu'au moins une partie de ces mitochondries extracellulaires intactes pourraient être fonctionnelles.

Par ailleurs, j'ai participé à d'autres travaux réalisées dans l'équipe, dont (1) une étude visant à évaluer l'influence des paramètres pré-analytiques et démographiques sur la quantification d'ADNcir d'origine nucléaire et mitochondrial sur une cohorte composée de 104 individus sains et 118 patients atteints de cancer colorectal métastatique, (2) une étude dont l'objectif était d'évaluer l'influence de l'hypoxie sur le relargage de l'ADN circulant *in vitro* et *in vivo*, et (3) une étude visant à évaluer le potentiel de l'analyse de l'ADN circulant dans le dépistage et la détection précoce du cancer.

Ce manuscrit présente une synthèse récente de la littérature sur l'ADNcir, ses différents mécanismes de relargage, qui vont de pair avec la caractérisation structurale de cet ADN, ses aspects fonctionnels et ses différentes applications en cliniques. De plus, cette thèse apporte des connaissances nouvelles sur la structure de l'ADN mitochondrial extracellulaire tout en ouvrant de nouvelles pistes de réflexion notamment sur l'impact que pourrait avoir la présence de ces structures circulantes sur la communication cellulaire, l'inflammation et des applications en clinique.



## Abstract:

Plasma transports blood cells with a mixture of compounds, including nutrients, waste, antibodies, and chemical messengers...throughout the body. Non-soluble factors such as circulating DNA and extracellular vesicles have recently been added to the list of these components and have been the subject of extensive research due to their role in intercellular communication. Circulating DNA (cirDNA) is composed of cell-free and particle-associated DNA fragments, which can be released by all cell types. CirDNA is derived not only from genomic DNA but also from extrachromosomal mitochondrial DNA. Numerous studies carried out lately indicate that the quantitative and qualitative analysis of cirDNA represents a breakthrough in clinical applications as a non-invasive biomarker for diagnosis, prognosis and therapeutic follow-up. However, despite the promising future of cirDNA in clinical applications, particularly in oncology, knowledge regarding its origins, composition and functions, that could considerably optimize its diagnostic value, is still lacking.

The main goal of my thesis was to identify and characterize the structural properties of extracellular DNA of mitochondrial origin. By examining the integrity of this DNA, as well as the size and density of associated structures, this work revealed the presence of dense particles larger than 0.2  $\mu\text{m}$  containing whole mitochondrial genomes. We characterized these structures by electron microscopy and flow cytometry and identified intact mitochondria in the extracellular medium *in vitro* and *ex vivo* (in plasma samples from healthy individuals). Oxygen consumption by these mitochondria was detected by the Seahorse technology, suggesting that at least some of these intact extracellular mitochondria may be functional.

In addition, I contributed to other studies carried out in the team, such as studies aiming at evaluating (1) the influence of pre-analytical and demographic parameters on the quantification of nuclear and mitochondrial cirDNA on a cohort of 104 healthy individuals and 118 patients with metastatic colorectal cancer, (2) the influence of hypoxia on the release of cirDNA *in vitro* and *in vivo*, and (3) the potential of cirDNA analysis in the early detection and screening of cancer.

This manuscript present a recent review on cirDNA and its different mechanisms of release, which go hand in hand with the structural characterization of this DNA, its functional aspects and its clinical applications. In addition, this thesis provides new knowledge on the structure of extracellular mitochondrial DNA and opens up new avenues for reflection, particularly on the potential impact that could have those circulating mitochondria on cell-cell communication, inflammation and clinical applications.

*“It’s the one thing you can control. You are responsible for how people remember you-or don’t. So don’t take it lightly”*

*Kobe Bryant*

## Remerciements :

*Aujourd'hui, après ces trois années de thèse, je suis convaincue que ce travail est très loin d'être individuel. C'est l'occasion de repenser à toutes les personnes qui m'ont permis d'en arriver là et de réaliser ce modeste travail, par leurs conseils, leur intérêt manifesté à l'égard de mon projet et surtout leur bonne humeur et soutien.*

*Je souhaite dans un premier temps remercier les membres de mon jury de thèse.*

**A monsieur le docteur Gregory LAVIEU**, Je suis très honorée que vous ayez accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que rapporteur. C'est également avec plaisir que je vous remercie pour les remarques judicieuses et les suggestions que vous m'avez adressées dans votre rapport et durant la thèse et qui ont permis d'améliorer énormément mon manuscrit.

**A monsieur le professeur Alain BRISSON**, Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail et de faire partie de mon jury. Je tiens également à vous remercier pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ma thèse ainsi que pour les remarques constructives et les critiques m'ayant permis de le perfectionner et de l'affiner.

**A Mme le docteur Marie-Luce VIGNAIS**, je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail de thèse en vous engageant en tant qu'examinatrice. Je vous remercie pour le temps consacré à la lecture de ce travail ainsi que pour les critiques que vous m'avez adressées.

**A Mme le professeur Mona DIAB ASSAF**, je tiens à vous remercier, non seulement pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse en tant qu'examinatrice de ce travail, mais aussi pour toutes les opportunités que vous m'avez accordées durant mon master en Cancérologie à l'université libanaise.

**A monsieur le professeur Christian JAY-ALLEMAND**, je vous exprime mes remerciements pour votre disponibilité et accompagnement pendant les trois années de ma thèse, en étant membre de mon comité, et également pour l'honneur que vous me faites en participant à mon jury et en acceptant d'examiner mes travaux.

*A mes directeurs de thèse, ce fut un plaisir et un grand honneur de travailler sous votre direction.*

***Monsieur Alain THIERRY,** Je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour votre encadrement, votre garantie d'excellentes conditions de travail, et vos multiples conseils tout au long des années d'étude, qui m'ont permis de pouvoir être fière aujourd'hui du travail réalisé. Je suis reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée dès le début, et dont j'espère avoir été à la hauteur. Merci aussi pour vos critiques constructives tout en disant de temps de temps que nous faisons du bon boulot. Vous m'avez beaucoup apporté aussi bien au niveau scientifique que personnel. Je vous souhaite le meilleur pour votre nouvelle direction d'équipe et pour tous vos futurs projets.*

***Mme Corinne PREVOSTEL,** Je tiens à te remercier énormément pour ta disponibilité (même quand j'envoyais des messages à minuit), la patience dont tu as fait preuve, pour tes qualités humaines et surtout ta gentillesse. J'ai beaucoup apprécié travailler à tes côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je garde toujours beaucoup de plaisir à discuter avec toi et à bénéficier de tes précieux conseils. Merci pour ton encouragement non-stop. Je ne sais pas trop m'exprimer mais je te promets d'agir comme toi envers les étudiants que je pourrai guider, si un jour l'occasion m'en est donnée.*

***Aux membres de mes comités de thèse, Mme Julie PANNEQUIN, Monsieur Christian JAY-ALLEMAND et Monsieur Tamim SALEHZADA,** merci pour vos disponibilités, vos conseils, vos questions et lumières apportés à ce travail de thèse.*

*A monsieur Claude SARDET, je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de l'IRCM.*

*A monsieur Marc YCHOU, Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe « Recherche intégrée pour une médecine personnalisée en oncologie digestive ».*

*Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe, **Marc, Evelyne, Caroline, Philippe, Antoine, Thibault**, pour la très bonne ambiance, pour les intéressantes discussions durant les lab-meeting, pour vos aides et disponibilités sans faille et surtout votre bonne humeur.*

*Plus spécialement, à **Laurence**, je ne te remercie pas juste pour ton immense aide scientifique et technique et ta disponibilité en tout instant mais pour tous les moments précieux qu'on a passés. Je te considère plus qu'un collègue de travail, mais plutôt ma grande sœur 😊*

*A **Jean-Daniel**, merci pour nous avoir supporté chaque jour à midi avec nos conversations qui ne servent à rien... Merci pour tes critiques et remarques qui sont parfois déprimantes mais assez constructives ;). J'ai vraiment trop apprécié ta présence dans l'équipe.*

*A **Ekaterina** et **Andrei**, merci pour tous les beaux moments qu'on a passé.*

*A **Amabelle**, merci de m'avoir appris comment relativiser dans la vie et de connaître bien mes priorités.*

*Enfin, les trois collègues qui sont devenues plus qu'amis, **Cynthia, Brice, Romain** (équipe Pookie). Franchement c'est dur de m'exprimer, mais sans vous, ça aurait été trop difficile de réaliser cette thèse. Merci pour tous les beaux souvenirs que nous avons partagés au labo et à l'extérieur et pour tous les rires aux éclats...*

*Merci également aux ex-membres de l'équipe ; **Geoffroy, Benoit, Baptiste, Alexandre, Barbara, Julien, Simon, Audrey, Nico, Safia, Hann, Laura**, pour tous les moments merveilleux qu'on a passés ensemble.*

*Je tiens à remercier monsieur **Peter Gahan**, pour sa disponibilité au début de ma thèse et pour ses discussions passionnantes.*

*Même si pendant la thèse, on passe par des moments compliqués, c'est avant tout une merveilleuse aventure humaine qui m'a permis de rencontrer de nombreuses personnalités.*

*Je commence par les gens du couloir N1F3. Tout d'abord, aux deux collègues qui sont devenus plus qu'amis, **Yannick et Julie**, un grand merci pour tous les souvenirs inoubliables qu'on a vécu ensemble et qui j'espère seront encore nombreux. Merci pour votre amitié et votre soutien.*

*Merci à **Nabiya, Miriam, Vera, Yasser, Yezza, Leslie**. Merci aussi aux gens de la salle de culture que je croisais chaque jour (surtout **Cathy** que j'ai trop embêtée avec mes centrifugations).*

*Merci à tous les doctorants et les post-doc avec qui j'ai passé des moments inoubliables, **Emilia, Adrien, Sara B, Gabriel, Maeva, Céléstine, Tristan, Valomanda, Hadjer, Alice, Diane, Habib, Valentin, Antoine, Madi, Mélanie, Jaime, Imène, Mehdi, Ambre, Ander, Bilguun, Guillaume, Carlo, Jordi, Ghita, Romain R, Timothée, Benjamin**.*

*Je n'oublie pas les anciens...Ceux qui étaient là à mes débuts et qui ont grandement participé à mon intégration dans le cercle des thésards, Merci à **Benoit B, Laetitia, Nour S, Amanda, Rana, Mona, Emile, Racha, Joelle A, Hanane, Leila, Sarah C, Elodie, Augusto, Khalil, Romain L**.*

*Merci à l'ensemble de l'IRCM, et surtout le personnel de la gestion (**Sandrine**) et de l'administration (**Daniela**).*

*J'en arrive au chapitre le plus personnel. Je tiens tout d'abord à remercier mes amis « hors labo », sans exception, qui me permettent de m'évader un peu du monde scientifique et dont la présence m'est indispensable. C'est dur les remerciements....*

*Les filles, **Joelle<sup>2</sup> (Jovon et Jowel), Jara, Diala, Rita, Rana** et les mecs, **Laza, Willi, Toto, Jihad, Jamal et Ziad**.*

*On a vécu 4 ans magnifiques, vous étiez toujours présents dans les bons moments comme dans les coups durs. Je pourrais écrire des pages tellement on a vécu de moments ensemble. Vous étiez ma famille à Montpellier et vous le resterez toujours sûrement.*

*Je veux remercier aussi tous les libanais que j'ai connu à Montpellier, et avec qui j'ai passé de très beaux moments et soirées ; **Ayman, Mekhtar, Imad, Jacinthe, Baraa, Lara, Batoul, Diala, Adel, Amanie et Hassan**.*

**A ma grande famille,**

Je tiens à remercier mes amis, **Lina, Dina, Hani S, Hani K, Faysal, Hadeel, Sarah, Aya, Maya, Maro, Fifi, Ghadir, Reina, Nano, Lulu...** Et spécialement à mes deux amies d'enfance, plutôt mes sœurs, **Maryam et Farah**. Merci à tous qui, malgré les différents continents où nous nous trouvions, étaient toujours à mes côtés en train de me soutenir et supporter jusqu'à la fin. Même si on ne se voyait que quelques fois par ans, et on ne se parlait pas tous les jours, vous étiez toujours là quand j'en avais besoin.

Je remercie aussi **3amo Miguel**, pour tous les bons moments qu'on a passés et les bon restos qu'on a fait ensemble 😊 et surtout pour sa présence le jour de ma soutenance.

Je tiens à remercier tous les membres de la Famille « **Amir dache** » et « **Skaff** » sans aucune exception, et surtout ma tante, qui nous a quitté en 2017... Je vous aime tous.

Et finalement, aux personnes sans lesquelles je n'en serais pas là aujourd'hui et à qui je dois tout. **Maman, papa, ma sœur et mon frère**, à qui je dédie ce travail. Vous étiez, êtes et serez toujours ma force dans la vie. Merci pour tout. Mon amour pour vous est sans faille.

Et Finalement, à quelqu'un qui attendait le jour de ma soutenance avec impatience, mais malheureusement m'a quitté avant...quelqu'un qui m'a laissé les plus belles valeurs et surtout, tout son amour. A ma très chère **grand-mère**, tu es toujours là, dans mes pensées. Je ne t'oublierai jamais.

Et à tous ceux que j'ai oubliés, j'espère qu'ils ne m'en tiendront pas rigueur...

# Table des matières

Résumé:.....	3
Abstract: .....	4
Remerciements : .....	6
Liste des abréviations:.....	13
Liste des Figures: .....	17
Liste des tableaux:.....	19
Introduction.....	20
<b>I. Histoire et définition de l'ADN extracellulaire .....</b>	<b>20</b>
i. Découverte de l'ADN extracellulaire.....	20
ii. Qu'est-ce que l'ADN extracellulaire et où le trouve-t-on ?.....	23
<b>II. Origine et structure de l'ADN extracellulaire .....</b>	<b>24</b>
i. Origine endogène .....	24
ii. Origine exogène.....	42
iii. Origine tissulaire.....	43
iv. Profil de taille de l'ADN circulant .....	45
<b>III. Aspects fonctionnels de l'ADN circulant .....</b>	<b>49</b>
i. Rôle dans le transfert horizontal :.....	49
ii. Génométastase :.....	50
iii. Immunité et inflammation : .....	51
<b>IV. Applications cliniques de l'analyse des ADN circulants .....</b>	<b>54</b>
i. Les applications cliniques de l'analyse de l'ADN circulants en oncologie .....	54
<b>V. Le cas de l'ADN mitochondrial .....</b>	<b>61</b>
i. La mitochondrie.....	61
ii. Caractéristiques du génome mitochondrial .....	62
iii. Les altérations génétiques du génome mitochondrial.....	65
iv. L'ADN mitochondrial circulant .....	67
Objectifs de la thèse.....	74
Résultats.....	76
<b>Etude de la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondrial.....</b>	<b>76</b>
I. Rationnel scientifique.....	76
II. Résumé.....	77
III. Matériels et Méthodes : .....	79
IV. Analyse critique de la méthodologie et des résultats : .....	117



Conclusions.....	137
Discussion.....	139
<b>I. D’où proviennent ces mitochondries ?</b> .....	140
<b>II. Quels impacts en physiologie et pathologie?</b> .....	144
i. Un rôle dans l’homéostasie ?.....	144
ii. Un rôle dans l’inflammation ?.....	144
iii. Un rôle dans la communication intercellulaire .....	147
<b>III. Conséquences cliniques ?</b> .....	148
i. La transfusion sanguine.....	148
ii. Un(e) futur(e) agent et/ou cible thérapeutique.....	148
iii. Un biomarqueur potentiel en oncologie ?.....	149
Perspectives.....	151
<b>I. Identifier le mécanisme de relargage des mitochondries dans le milieu extracellulaire</b>	151
<b>II. Etudier la possibilité du transfert intercellulaire de ces mitochondries.....</b>	151
<b>III. Evaluer le potentiel clinique.....</b>	152
Autres Contributions : .....	153
<b>I. Quantification de l'ADN circulant chez l'homme.....</b>	153
i. Rationnel Scientifique : .....	153
ii. Résumé :.....	154
iii. Contributions : .....	154
<b>II. L’hypoxie module la libération de l’ADN circulant d’origines nucléaire et mitochondriale</b> 171	
i. Rationnel Scientifique .....	171
ii. Résumé.....	172
iii. Contribution.....	172
<b>III. Progrès récents dans les applications cliniques de l’ADN circulant en oncologie.....</b>	184
i. Résumé :.....	184
ii. Contributions : .....	185
Références :.....	198

# Liste des abréviations:

Ab: Apototic bodies

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADNcir: ADN circulant

ADNcirM : ADN circulant mitochondrial

ADNcirN : ADN circulant nucléaire

ADNct: ADN circulant tumoral

ADNmt: ADN mitochondrial

AFM: Atomic force microscopy

AIM2: Absent in melanoma 2

Apaf-1: Apoptotic protease activating factor-1

ARN: Acides ribonucléiques

ARNr: ARN ribosomique

ARNt: ARN de transfert

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

ATP: Adenosine triphosphate

Atp8b1: Phospholipid-transporting ATPase IC ;

BM-hMSC: Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells

CAD: Caspase-activated DNase

CAF: Cancer-associated fibroblast

CARD: Caspase activation and recruitment domain

CAP : Chloeamphénicol

ccfDNA: Cell-free DNA

ccf-mtDNA: Cell-free mitochondrial DNA

CD1d: Cluster of differentiation 1d

cGAS: GMP-AMP synthase cyclique

ch : Chanel

cirDNA: Circulating DNA

CLR: C-type lectin receptors

CRC: Colorectal cancer

CSM: Cellules souches mésenchymateuses  
Cu<sup>2+</sup>: ion cuivreCupric ion  
Da: Dalton  
DAMP: Damage-associated molecular pattern  
D-Loop: Displacement Loop  
DNA: Deoxyribonucleic acid  
DNase I: Deoxyribonuclease I  
EF : Efrapeptine  
EV: Extracellular vesicles  
FPR: Formyl peptide recpetor,  
g: Times gravity  
GBM: Glioblastomas  
GPR91: G-Protein Coupled Receptor 91  
HMGB1: high-mobility group box 1  
HPV: Human papillomavirus  
HSV: Herpes Simplex Virus  
HTR: Hormonal-therapy resistant  
ICAD: Inhibitor of CAD  
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule  
IFN: Interferons  
IM: Inner membrane  
IMS: Intermembrane space  
IRF: Interferon-regulatory factor  
Kb: kilo paire de base  
LED: Lupus érythémateux disséminé  
Leu: Leucine  
MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
ml : millilitre  
MLKL: Lineage kinase domain-like pseudo-kinase  
MPTP: Mitochondrial permeability transition pore  
MRD: Minimal residual disease

MVE: Multivesicular endosome

NET: Neutrophil extracellular traps

NFκB: Nuclear factor-kappa B

ng: Nanogramme

NLR: NOD-like receptors

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

nm: Nanomètre

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors

NOD-SCID: Non obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

O<sub>2</sub>: Oxygen

OM: Outer Membrane

OS: Overall survival

OXPHOS: Oxidative phosphorylation

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

pb: paire de base

PRR: Pattern recognition receptors

PSA: Prostate-specific antigen

q-PCR: Quantitative polymerase chain reaction

RAGE: Receptor for advanced glycation endproducts.

RIG: Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors

RIP3: Receptor-interacting protein kinase 3

RLR: RIG-I-like receptor

ROC: Receiver operating characteristic curve

ROS: Reactive oxygen species

sPLA2-IIA: IIA secretory phospholipase A2

STING: Stimulator of interferon genes;

TFAM: Transcription factor A, mitochondrial

TIM23: Translocase of the inner membrane 23

TLR: Toll-like receptors

TMPD: N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride

TNFR: Tumor necrosis factor receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$

TNM: Tumor, Node, Metastasis

TOM22: Translocase of the outer membrane 22

VCAM: Vascular cell adhesion molecule

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

WT: Wild Type

zVADfmk: N-Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me) fluoromethyl ketone

# Liste des Figures:

<b>Figure 1 :</b> Chronologie des découvertes principales concernant l'ADN extracellulaire. ....	21
<b>Figure 2:</b> l'évolution du nombres de publications «cell free DNA» «circulating DNA» «extracellular DNA». ....	22
<b>Figure 3:</b> l'ADN extracellulaire. ....	23
<b>Figure 4:</b> Les voies de signalisation de l'apoptose (extrinsèque et intrinsèque). ....	25
<b>Figure 5:</b> Fragmentation de l'ADN par CAD durant l'apoptose. Ref 22. ....	26
<b>Figure 6:</b> La nécrose est une source d'ADN extracellulaire. Ref 27. ....	29
<b>Figure 7:</b> les deux voies de la nérose. Ref 56. ....	30
<b>Figure 8:</b> Représentation schématique de la formation des virtosomes. Ref 75. ....	33
<b>Figure 9:</b> La sécrétion active de l'ADN extracellulaire. Ref 29. ....	34
<b>Figure 10:</b> Les différents types de vésicules extracellulaires. Ref.119.....	37
<b>Figure 11:</b> Les structures majeures de l'ADN circulant.....	42
<b>Figure 12:</b> Identification des tissus source de l'ADNcir par déconvolution du méthylome basé sur un atlas complet de méthylation. Ref 156. ....	44
<b>Figure 13:</b> L'ADN circulant d'origine tumorale est plus fragmenté que l'ADN circulant d'origine non tumorale chez des modèles murins xénotransplantés par une lignée tumorale humaine de CRC (SW620) Ref 163. ....	47
<b>Figure 14:</b> Profil de taille de l'ADNcir extrait d'un patient cancéreux. Ref 167. ....	48
<b>Figure 15:</b> les PRRs spécifiques aux acides nucléiques. Ref 194.....	53
<b>Figure 16:</b> Origines cellulaires distinctes de l'ADN circulant dans le sang des patients atteints de cancer. Ref 16.....	55
<b>Figure 17:</b> les différentes applications cliniques de l'analyse de l'ADN circulant en oncologie. Adaptée de la ref 215. ....	59
<b>Figure 18:</b> Structure d'une mitochondrie. ....	62
<b>Figure 19:</b> L'ADN mitochondrial.....	63
<b>Figure 20:</b> Guideline pour l'analyse de l'ADN circulant d'origine nucléaire. Ref 348 .....	118
<b>Figure 21:</b> Structure d'un nucléosome/chromatosome et tailles d'ADN correspondantes (pb). .....	119
<b>Figure 22:</b> Estimation de la distribution de taille des fragments d'ADN circulant d'origine mitochondriale. ....	121

<b>Figure 23:</b> Isolement du plasma par Ficoll. ....	123
<b>Figure 24:</b> Stratégie du « gating » en cytométrie de flux.....	128
<b>Figure 25:</b> Protocole de centrifugation pour obtenir le culot de mitochondries extracellulaires, à partir du milieu de culture. ....	129
<b>Figure 26:</b> OCR des mitochondries intracellulaires isolées à partir des cellules DLD-1.....	131
<b>Figure 27:</b> OCR du culot du surnageant de milieu de culture des DLD-1. ....	132
<b>Figure 28:</b> OCR du culot obtenu à partir du plasma. ....	132
<b>Figure 29:</b> OCR du culot du surnageant du milieu de culture des DLD-1 à 50% et 80% de confluence. ....	133
<b>Figure 30:</b> le test « coupling assay » réalisé pour les mitochondries intracellulaires isolées, le culot du surnageant du milieu de culture, et le culot du plasma. ....	134
<b>Figure 31:</b> le test « Electron Flow Assay » réalisé pour les mitochondries intracellulaires isolées, le culot du surnageant du milieu de culture, et le culot du plasma. ....	134
<b>Figure 32:</b> La présence des mitochondries extracellulaires dans la circulation. ....	138
<b>Figure 33:</b> Microscopie électronique des débris non cellulaires libérés dans le milieu extracellulaire pendant la mort cellulaire par l'apoptose et la nécroptose. Ref 368. ....	141
<b>Figure 34:</b> Schéma d'une hernie mitochondriale apoptotique. Ref 370. ....	142
<b>Figure 35:</b> Les DAMPs d'origine mitochondriale. Adapté des Ref 377,378. ....	145

## Liste des tableaux:

**Tableau 1:** Les études décrivant la présence d'ADN dans les vésicules extracellulaire. .... 39

**Tableau 2 :** Comparaison entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial..... 64



# Introduction

## I. Histoire et définition de l'ADN extracellulaire

### i. Découverte de l'ADN extracellulaire

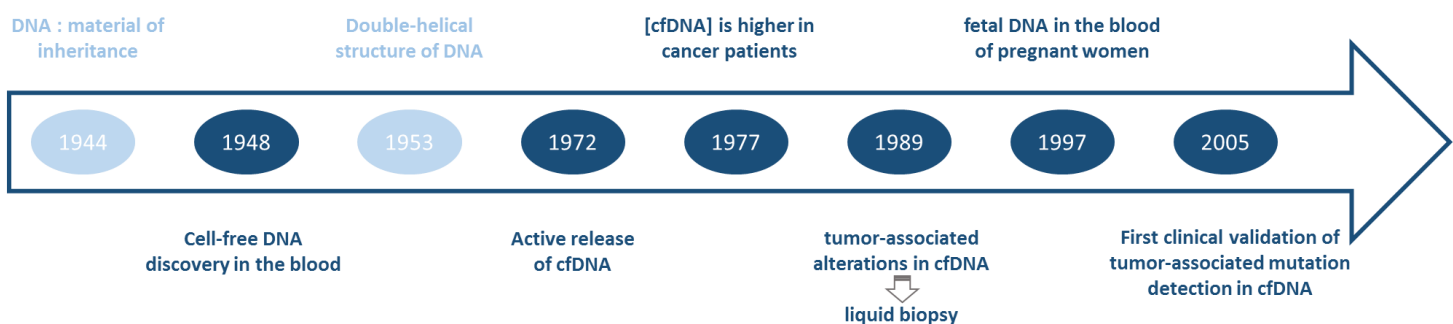
En 1948, quelques années après la démonstration du rôle de l'ADN en tant que support de l'hérédité génétique, la présence d'acides nucléiques libres dans la circulation sanguine a été mise en évidence par Mandel et Mettals(1). Ces auteurs ont en effet été en mesure de détecter l'ADN et l'ARN dans le plasma d'individus sains et de patients présentant différentes pathologies. Cependant, cette découverte remarquable qui a même précédé celle de l'élucidation de la structure à double hélice de l'ADN par Watson et Crick, est passée inaperçue. Il aura fallu attendre une vingtaine d'années pour que l'ADN circulant suscite à nouveau de l'intérêt : en 1965, Bendich *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle l'ADN circulant pouvait être un facteur impliqué dans l'oncogenèse(2) ; en 1966, Tan *et al.* ont mis en évidence des taux élevés d'ADN circulant dans le sérum de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED), capable de se complexer avec les anticorps anti-ADN double brin retrouvés chez ces patients(3). Des taux élevés d'ADN circulant dans d'autres types de pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde, la glomérulonéphrite, la pancréatite, la lithiase biliaire, les maladies inflammatoires de l'intestin, la maladie de l'ulcère peptique, l'hépatite et l'oesophagite ont, depuis, été validés par plusieurs études(4).

En 1972, la libération spontanée d'ADN circulant par les cellules vivantes a été mise en évidence par M. Stroun et P. Anker dans les oreillettes de grenouilles(5). Dans le domaine de l'oncologie, Leon *et al.* ont démontré en 1977 que la moitié des patients ayant un cancer pancréatique ont une concentration en ADN circulant plus élevée que les individus sains et que cette concentration diminue à la suite d'une radiothérapie. De plus, ces auteurs ont établi un lien entre la quantité élevée d'ADN circulant et la présence de métastases laissant ainsi présager des applications cliniques prometteuses en cancérologie(6). En 1983, Shapiro *et al.* ont montré que la détection de l'ADN circulant pouvait avoir une valeur diagnostique ou pronostique en mettant en évidence une différence significative entre la quantité d'ADN circulant chez des patients atteints de maladie bénigne et chez ceux atteints de maladie maligne du tractus gastro-intestinal(7).

En 1989, M. Stroun et P. Anker ont démontré, que chez des patients cancéreux, l'ADN circulant est en partie libéré par les cellules tumorales puisqu'il présente des caractéristiques néoplasiques telles que l'instabilité de l'ADN double brin(8). Cette découverte importante dans le domaine de la cancérologie a été validée en 1994 par deux autres groupes (Vasioukhin *et al.* , Sorenson *et al.*) qui ont identifié des mutations d'oncogènes spécifiquement associées aux tumeurs, dans le plasma de patients atteints de syndrome myélodysplasique, de leucémie myéloïde aiguë ou de cancer du pancréas(9, 10). Ces observations ont été confirmées par la détection, dans le plasma et le sérum de patients cancéreux, d'altérations des microsatellites et de perte d'hétérozygotie, identiques à celles présentes dans la tumeur primaire(11, 12).

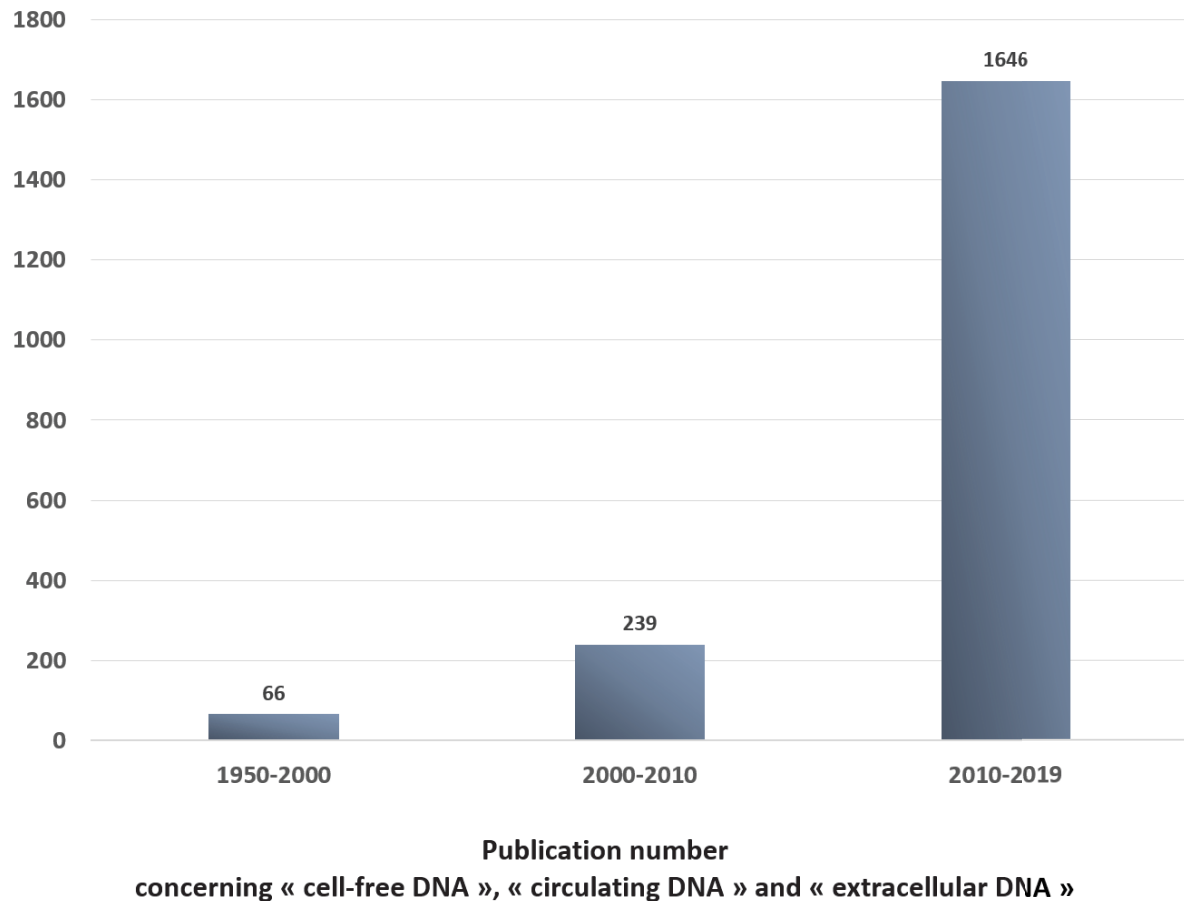
Toutes ces études ont permis de valider l'hypothèse qu'une partie de l'ADN circulant provient bien de la tumeur et ont ainsi donné naissance au concept de biopsie liquide. Par la suite, les travaux de Diehl *et al.*, en 2005, ont apporté la première validation clinique de la détection de mutations génétiques à partir de l'ADN circulant chez des patients atteints de cancer colorectal(13).

En 1997, l'utilité clinique de l'ADN circulant a été étendue à d'autres domaines, comme celui du diagnostic prénatal. Lo *et al.* ont en effet observé que les acides nucléiques d'origine fœtale pouvaient s'infiltrer dans la circulation sanguine maternelle (14).



**Figure 1** : Chronologie des découvertes principales concernant l'ADN extracellulaire.

Depuis, le nombre croissant de publications démontrant clairement l'intérêt de la recherche biomédicale pour l'ADN extracellulaire circulant valide le concept de l'utilité de ce biomarqueur pour le diagnostic, le pronostic et le suivi thérapeutique dans différentes pathologies (Figure 2).



**Figure 2:** l'évolution du nombres de publications «cell free DNA» «circulating DNA» «extracellular DNA».

## ii. Qu'est-ce que l'ADN extracellulaire et où le trouve-t-on ?

La désignation « ADN extracellulaire circulant » renvoie à de l'ADN extracellulaire retrouvé dans les fluides physiologiques circulants de l'homme. Cet ADN extracellulaire ou « cell-free DNA, cfDNA » désigne à la fois les fragments d'ADN libres ou associés à des structures moléculaires, libérés par la majorité des cellules. Ces molécules d'ADN proviennent non seulement de l'ADN chromosomique nucléaire mais aussi de l'ADN extrachromosomique mitochondrial. *In vivo*, et en particulier chez l'homme, l'ADN extracellulaire a été détecté dans différents milieux extracellulaires physiologiques, comme le sang, la lymphe, la bile, le lait, l'urine, la salive, la suspension muqueuse, le liquide spinal et le liquide amniotique. Cependant, cet ADN extracellulaire se retrouve aussi bien dans le règne animal que végétal (15).

*In vitro*, l'ADN extracellulaire est libéré par les lignées cellulaires, les cellules primaires, les organoïdes ou les cellules embryonnaires directement dans le milieu de culture.

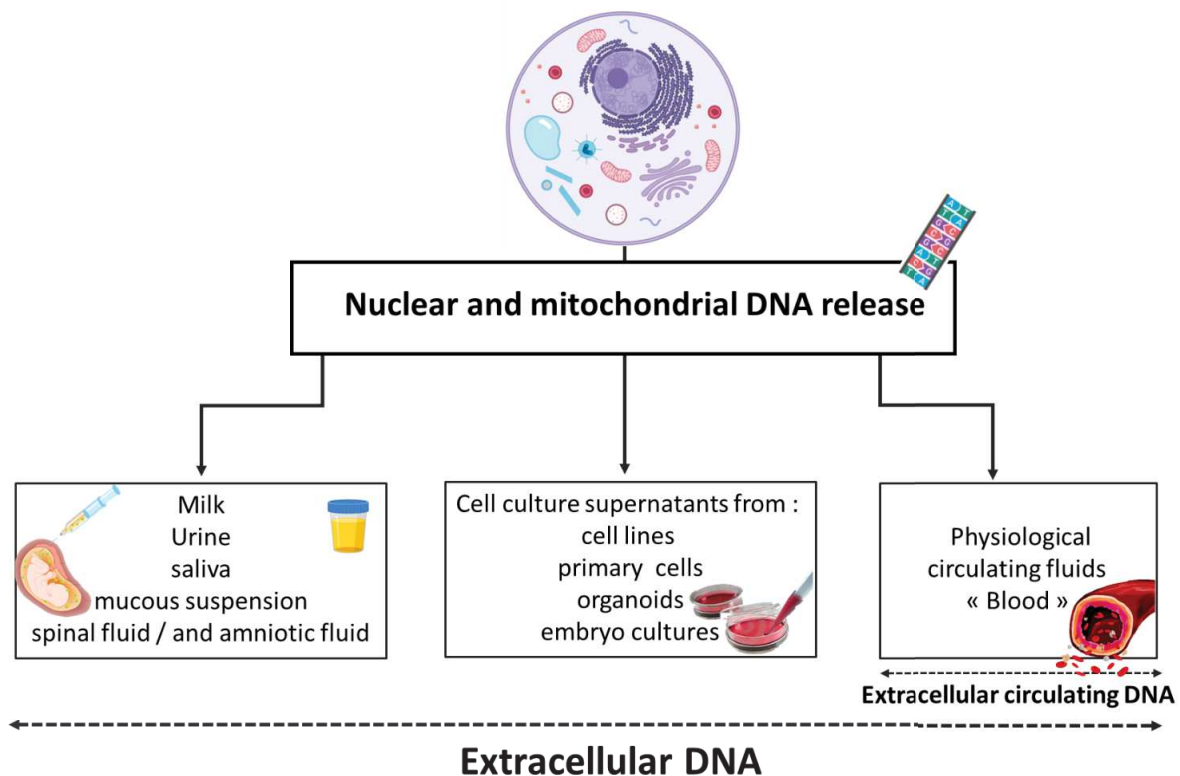


Figure 3: l'ADN extracellulaire.

## II. Origine et structure de l'ADN extracellulaire

L'ADN est fortement électrostatique et possède des propriétés d'auto-condensation et de complexation avec divers autres composés(16), qui peuvent le protéger de l'action des nucléases circulantes ainsi que du système immunitaire qui pourrait le considérer comme un signal de danger(17).

La caractérisation structurale de l'ADN extracellulaire est toujours en cours. Néanmoins, certaines structures ont clairement été identifiées, démontrant ainsi que cet ADN existe sous plusieurs "formes", telles que des structures vésiculaires (exosomes, microparticules, corps apoptotiques) ou macromoléculaires (nucléosomes, complexes virtosomes)(16), libres ou initialement associé à la membrane externe des cellules(18). Ces structures peuvent être considérées comme des signatures des mécanismes de libération responsables de la translocation de cet ADN depuis le compartiment intracellulaire vers le milieu extracellulaire(16).

Les mécanismes de relargage et les différentes structures qui y sont associées sont décrits dans ce chapitre.

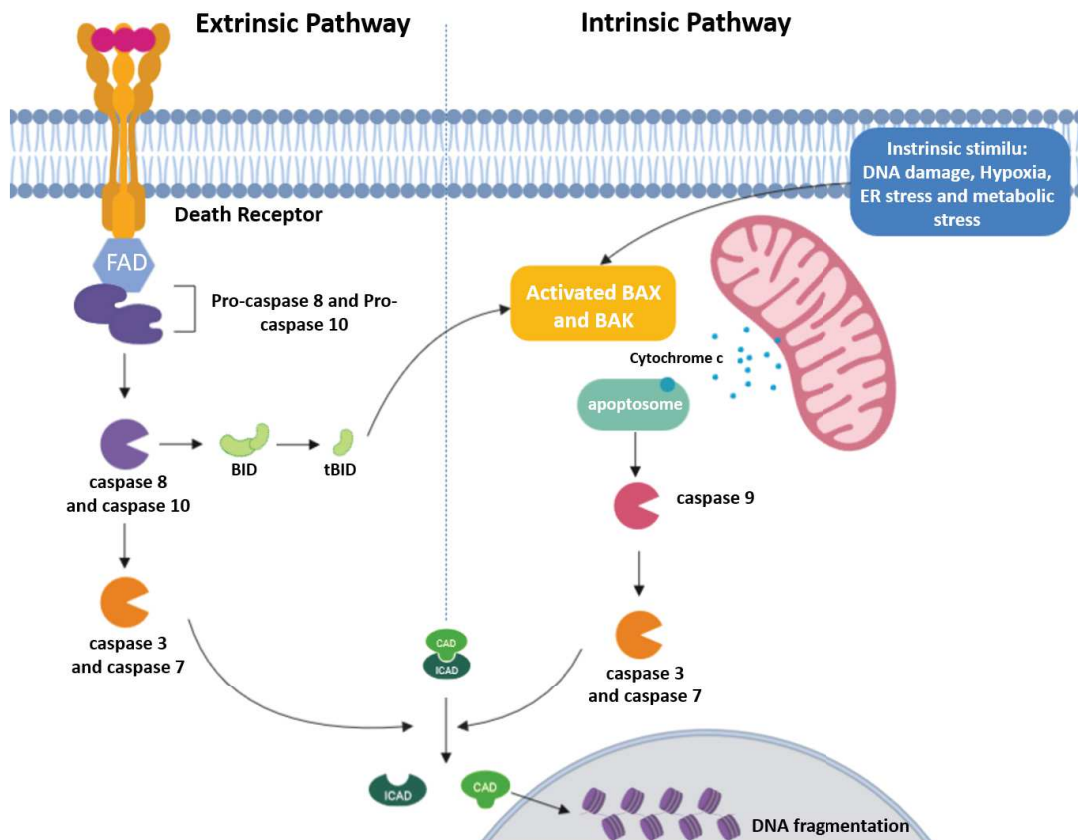
### i. Origine endogène

La présence de l'ADN circulant (ADNcir) dans le sang peut s'expliquer par une libération d'ADN lors des différents processus de mort cellulaire. Cependant, des processus actifs de sécrétion d'ADN libre ou intra-vésiculaires contribuent également à sa libération dans le milieu extracellulaire.

#### a. L'apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un mécanisme contrôlé d'élimination des cellules, impliqué dans divers processus, notamment le renouvellement des cellules, le maintien de l'homéostasie, le développement du système immunitaire, l'embryogenèse, la régression tumorale(19)...Ce processus peut être déclenché par des *stimuli* internes ou

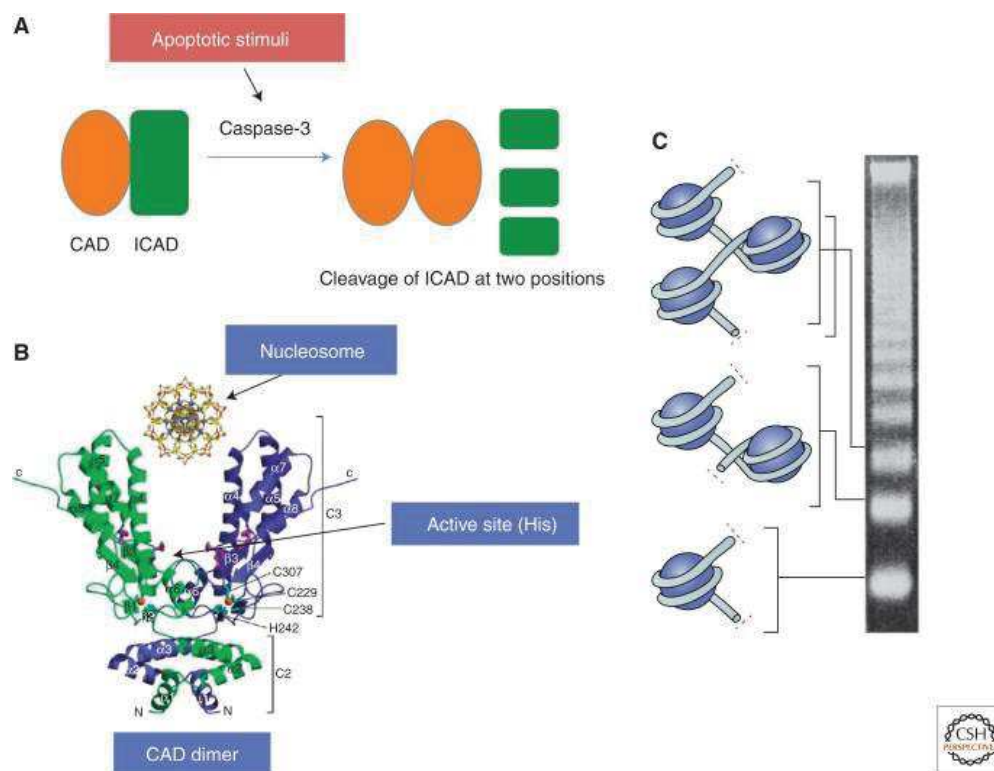
externes et alors peut être médié par deux voies distinctes : la voie extrinsèque impliquant des interactions avec les récepteurs transmembranaires et la voie intrinsèque initiée par des événements mitochondriaux (20) (Figure 4).



**Figure 4:** Les voies de signalisation de l'apoptose (extrinsèque et intrinsèque).

Durant l'apoptose, l'ADN chromosomal est d'abord coupé en fragments de 50 à 300 Kb, puis en mononucléosomes de 180 à 200 pb et ses multiples, via la CAD (caspase-activated DNase), qui est activée lors du clivage de son inhibiteur (ICAD) par la caspase-3(21, 22) (figure 5). Ensuite, les membranes des cellules apoptotiques vont s'invaginer pour former des cavités causant alors la fragmentation cellulaire et la génération des corps apoptotiques (Apoptotic bodies ou Abs). Ces corps, contenant des organites compactés avec ou sans fragments nucléaires, sont alors libérés et rapidement digérés par des cellules adjacentes et des phagocytes tels que les macrophages et les cellules dendritiques(19, 23). L'ADN présent dans

ces corps est complètement digéré en nucléotides par les nucléases des lysosomes(24). Cependant, certains Abs peuvent échapper à ce processus et passer dans la circulation sanguine(25). Or, compte tenu du fait que  $10^{11}$  à  $10^{12}$  cellules sont éliminées par jour via l'apoptose, ce qui correspond à 1 à 10 grammes d'ADN(25), une clairance incomplète de ces cellules apoptotiques peut conduire à une concentration très élevée en ADN dans le milieu extracellulaire.



**Figure 5:** Fragmentation de l'ADN par CAD durant l'apoptose. Ref 22.

**A.** Dans les cellules saines, la CAD est présente sous forme de complexe avec ICAD. Lorsque les cellules reçoivent des stimuli apoptotiques, la caspase-3 clive l'ICAD à deux positions, qui perd ensuite son affinité à la CAD. **B.** La CAD libérée de l'ICAD, forme un homodimère en forme de ciseaux, dans laquelle le site actif portant les résidus d'histidine est dans la fente. En raison de la structure du dimère CAD, juste l'ADN entre les nucléosomes a accès au site actif de l'enzyme. **C.** Ceci explique pourquoi l'ADN chromosomique est clivé en unités nucléosomiques pendant la mort cellulaire apoptotique.

D'ailleurs, de nombreuses études suggèrent que l'apoptose est une source majeure de l'ADN circulant(26, 27). Ainsi, les profils obtenus lors d'une électrophorèse(27–29) et après séquençage de l'ADNcir(30) sont comparables aux profils inter-nucléosomiques

caractéristiques de l'apoptose. De plus, un niveau de mort cellulaire accru et une clairance défectueuse de ces cellules ont été constatés dans de nombreuses pathologies humaines caractérisées par une concentration d'ADNc<sub>ir</sub> élevée, y compris des maladies auto-immunes, pulmonaires, cardiovasculaires, athéroscléroses, septicémies et chocs septiques, troubles neurologiques et cancers(31, 32).

### **b. La nécrose**

La nécrose est une mort cellulaire prématurée accidentelle, impliquant une perte du potentiel cellulaire de production et de régénération énergétique(33, 34). Elle se produit généralement en réponse à des altérations sévères des conditions physiologiques, comme l'hypoxie, l'ischémie, l'exposition aux toxines, à l'irradiation, et aux métabolites réactifs oxygénés, les changements extrêmes de température et le manque de nutriments(35, 36). Ce processus passif est radicalement différent de l'apoptose(35). Il s'accompagne d'un gonflement cellulaire intense, d'une dilatation ou d'une rupture de diverses organelles, y compris la mitochondrie, d'une perméabilité et d'une désintégration accrues de la membrane plasmique, d'une fragmentation aléatoire non spécifique de l'ADN nucléaire et finalement d'une libération du contenu cellulaire (35, 37, 38).

Il existe également d'autres formes de nécrose qui sont, quant à elles, programmées, telles que :

- la nécroptose, médiée par les récepteurs de mort cellulaire (TNFR (tumor necrosis factor receptor))(37) : Ce processus est un mode alternatif de mort cellulaire lorsque la voie extrinsèque de l'apoptose est bloquée par l'inhibition de la caspase 8(39). Il se caractérise par l'activation de RIP3 (Receptor-interacting protein kinase 3) qui à son tour entraîne la phosphorylation de MLKL (lineage kinase domain-like pseudokinase)(40). Ce dernier, suite à son activation, se transloque vers la membrane plasmique afin de perturber son intégrité(41, 42).
- La pyroptose, qui survient le plus souvent lors d'une infection par des pathogènes intracellulaires et qui nécessite l'activation de la caspase-1(37) : Cette dernière est activée par des complexes supramoléculaires cytosoliques appelés inflammasomes



contenant des récepteurs de type NOD (NLR) ou AIM2 (Absent in melanoma 2)(43), de la pro-caspase-1 et dans certains cas une protéine adaptateur ASC (type speck associée à l'apoptose contenant un domaine d'activation et de recrutement de Caspase CARD)(37, 44–46). La caspase-1 devient alors catalytiquement active et intervient dans la maturation et la sécrétion extracellulaire d'interleukine-1 beta et d'interleukine-18(46).

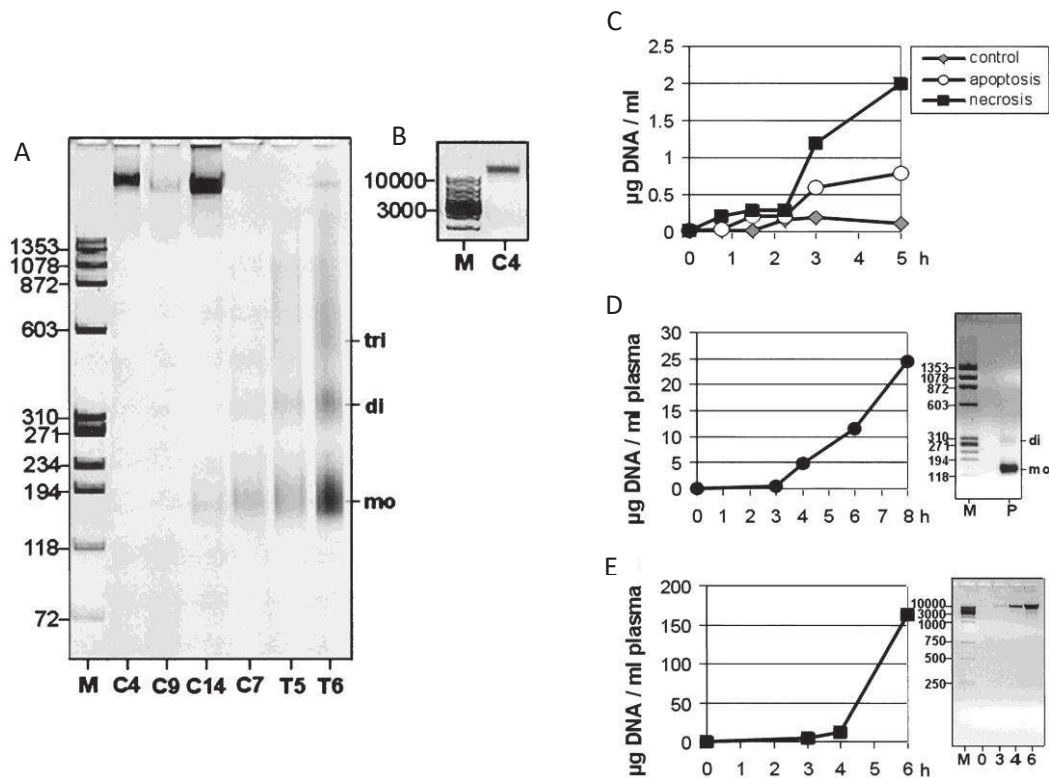
Même si les voies de signalisation de ce processus de mort cellulaire nécrotique sont distinctes, elles partagent toutes des caractéristiques moléculaires et morphologiques telles que la rupture membranaire et le relargage des molécules pro-inflammatoires(37).

En effet, la digestion anarchique de l'ADN par les cellules nécrotiques conduit à une libération de fragments d'ADN plus longs de plusieurs Kpb que ceux libérés lors de l'apoptose(16, 33). Ainsi, une étude réalisée en 2001, a mis en évidence la présence de ces gros fragments d'ADN dans le plasma de patients atteints de différents types de cancer, ce qui suggère que la nécrose peut être une source d'ADNcir (figure 6)(27).

Par la suite, plusieurs travaux ont démontré la présence de fragments d'ADN de taille moléculaire plus élevée chez les patients atteints de cancer que chez des individus sains(47–49). Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que la nécrose est un phénomène plus fréquent dans la tumeur que dans les tissus sains, peut-être, en raison d'une vascularisation insuffisante, ou en réponse au traitements(50).

D'autre part, des études ont démontré que la clairance des cellules nécrotiques par les macrophages est nécessaire pour la libération de leur ADN dans le milieu extracellulaire(51).

Néanmoins, d'après ces travaux, et vu que la nécrose n'est pas un événement fréquent dans des conditions physiologiques, ce mécanisme de libération ne peut pas être considéré comme une source majeure d'ADN circulant en particulier chez les individus sains.



**Figure 6:** La nécrose est une source d'ADN extracellulaire. Ref 27.

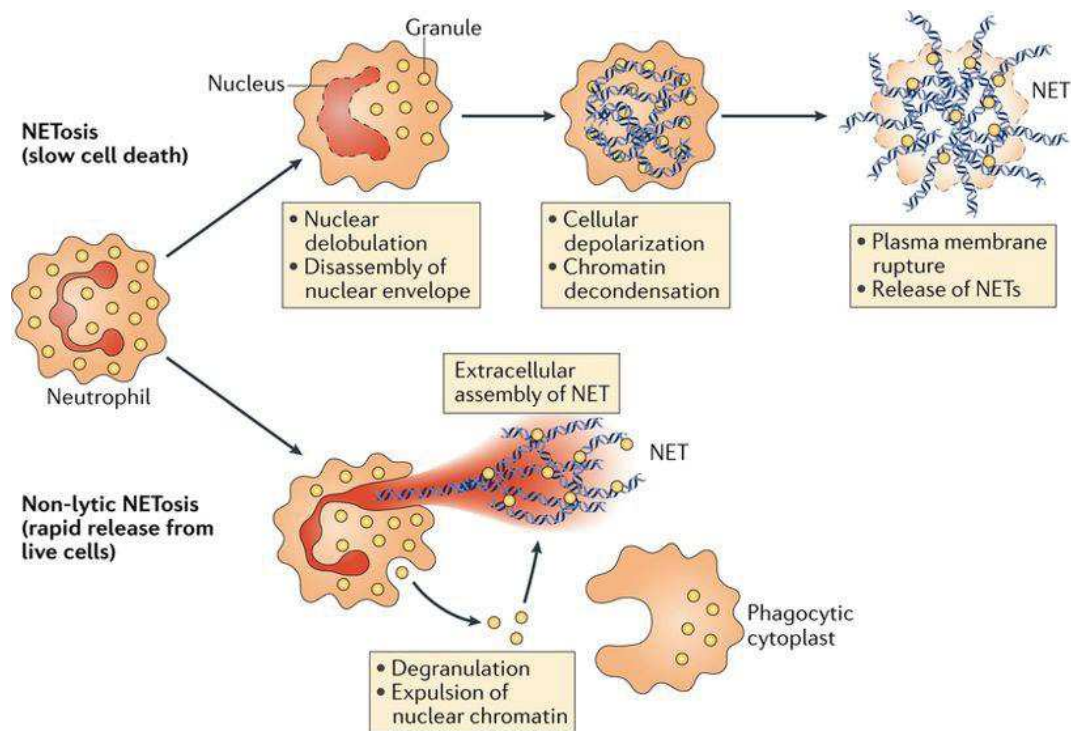
**A,** Distribution de la taille des fragments d'ADNcir purifié chez six patients cancéreux (C4/C9/C14/C7/T5/T6). Fragments d'ADN mononucléosomal (mo), dinucléosomal (di) et trinucleosomal (tri). M, marqueur de poids moléculaire en pb. **B,** Détermination de la taille de l'ADNcir du patient C4. **C,** Quantification de l'ADN dans le surnageant de cellules T Jurkat traitées par la staurosporine (apoptotique) ou par la staurosporine plus l'oligomycine (nécrotiques) par PCR en temps réel. **D,E,** la quantification de l'ADNcir chez des souris traitées avec des anticorps anti-CD95 (apoptose) et avec de l'acétaminophène (nécrose) respectivement, par PCR en temps réel (moyennes de trois animaux par point dans le temps). P, distribution de taille des fragments d'ADN plasmatique à 8 h après injection d'anticorps anti-CD95. 0, 3, 4 et 6, correspond à 0, 3, 4 et 6 h après injection d'acétaminophène, respectivement.

### c. La nétose:

La nétose ou « netosis » est un phénomène particulier aux neutrophiles, résultant de leur activation par des agents pathogènes ou dans des conditions spécifiques. Elle se caractérise par la libération des NETs « neutrophil extracellular traps », composés de fibres d'ADN extracellulaire empaquetés avec différentes protéines capables de capturer, neutraliser et inactiver les microorganismes(52, 53).

Le processus de nétose le plus fréquemment observé est la nétose tardive ou nétose suicidaire, nécessitant une décondensation de la chromatine, suivie d'une désintégration de

l'enveloppe nucléaire et d'un mélange d'acides nucléiques et de protéines agrégées(54). Après formation des NETs, la membrane plasmique du neutrophile se rompt et les NETs sont libérés (54). Par opposition, la nétose vitale est plus rapide et permet une libération de NET sans rupture de membrane et sans perte de fonctions vitales des neutrophiles(55, 56). Enfin, des NETs contenant de l'ADN mitochondrial peuvent aussi être libérés par les neutrophiles sans affecter leur durée de vie(57).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 7:** les deux voies de la nétose. Ref 56.

Les macrophages jouent un rôle important dans l'élimination de ces fragments d'ADN(58). Néanmoins, la DNase I des macrophages semble insuffisante pour dégrader complètement les NETs, ce qui suggère soit la participation d'autres mécanismes pour compléter la digestion, soit une dégradation incomplète, entraînant libération de fragments d'ADN partiellement digérés(32, 58).

Les NETs constituent donc, en partie, l'une des sources de l'ADN circulant, ce qui a été en particulier validé par des études démontrant les effets biologiques et physiopathologiques particuliers de ces NETs dans les maladies auto-immunes(59), le cancer(60), le sepsis(61), les

maladies de thrombose(62) et dans la réponse inflammatoire(63), des situations toutes associées à des niveaux élevés d'ADNcir. Par ailleurs, Il a été démontré qu'un exercice physique intense pouvait entraîner une sécrétion de niveaux élevés de NETs, une condition également associée à des niveaux élevés d'ADNcir élevés(64).

Ce phénomène n'est pas restreint aux neutrophiles puisqu'il a également été observé dans des éosinophiles et les mastocytes. Par conséquent, le terme plus généralisé 'ETosis' serait plus exact(65). Cependant, dans le cas des éosinophiles, les cellules restent fonctionnelles après relargage de leur « extracellular trap » qui ne contient que de l'ADN mitochondrial contrairement aux NET des neutrophiles qui peut contenir aussi bien de l'ADN nucléaire que mitochondrial. Cette sélection particulière de la nature de l'ADN indique que ce relargage est un processus actif et non pas une libération passive résultant de la mort cellulaire(66, 67).

#### **d. La sécrétion active d'ADN libre**

La libération d'ADN dans le milieu extracellulaire par des cellules vivantes est une hypothèse émise par plusieurs chercheurs. Léon *et al.* ont ainsi remarqué que, suite à une radiothérapie (un traitement qui inhibe la prolifération des cellules cancéreuses en induisant la nécrose et l'apoptose), la quantité d'ADN circulant diminue, ce qui indique la présence d'un autre mécanisme de relargage de l'ADNcir(6). Les premières preuves d'une sécrétion active d'ADN ont été apportées avec des lymphocytes stimulés par des phytomitogènes, en 1972 par Rogers *et al.*(68). Quelques années plus tard, Anker *et al.* ont démontré expérimentalement cette théorie remettant en question l'origine uniquement apoptotique/nécrotique de l'ADN extracellulaire(5, 69). Ces auteurs ont en effet observé que les lymphocytes humains(69) et des rats(70), les fibroblastes d'embryon de poussin(71–73) et les oreillettes du cœur des grenouilles(5) secrètent de l'ADN double brin, avec un poids moléculaire variant de  $3,5 \times 10^5$  à  $3,7 \times 10^6$  Da, dans leur milieu de culture. De même, ils ont constaté grâce à un marquage par la  $^3\text{H}$ -thymidine et la  $^3\text{H}$ -uridine(74), que cet ADN libéré est nouvellement synthétisé et qu'il est associé à des ARN. Plusieurs études ont ensuite été réalisées pour identifier la nature du complexe sécrété(75): (a) ces acides nucléiques résistent à l'activité de la nucléase avant traitement par la protéinase K et la lipase, ce qui indique qu'ils sont protégés par des lipides et des protéines. (b) La centrifugation en gradient de densité, l'effet de la

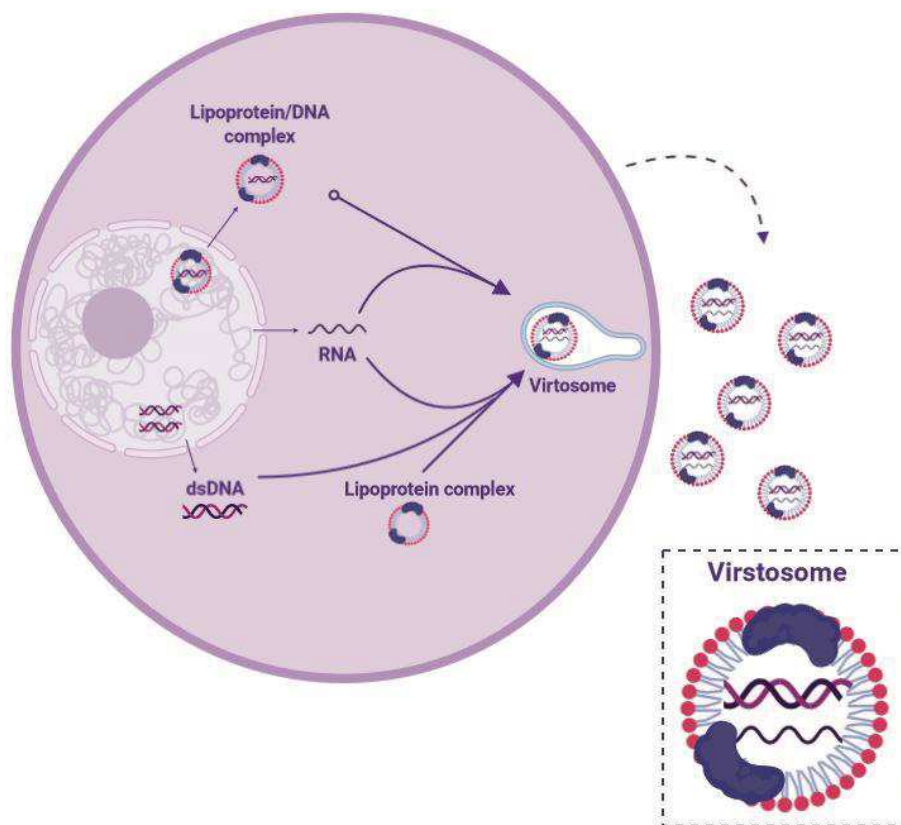
congélation/décongélation sur ce complexe et l'incorporation des précurseurs  $^3\text{H}$ -lysine et  $^3\text{H}$ -éthanolamine radioactives valident la présence d'un complexe lipoprotéique. Ce complexe protecteur de l'ADN/ARN, a été nommé « virtosome ».

De plus, Anker *et al.* ont clairement démontré que cette sécrétion est un processus actif indépendant d'une libération par les cellules mortes (5, 69, 75):

- La sécrétion d'ADN ne varie plus à partir d'une certaine concentration, quelle que soit la durée d'incubation.
- Si les cellules/organes sont remis en suspension dans de nouveaux milieux de culture plusieurs fois de suite, la quantité d'ADN isolé reste inchangée.
- Si les cellules/organes sont replacés dans leur milieu de culture originel, aucune augmentation de la quantité d'ADN libéré n'est observée.
- La mort cellulaire, n'a aucun effet sur le taux d'ADN prélevée du surnageant.
- Les cellules sécrétant l'ADN conservent leurs intégrités fonctionnelles, comme par exemple leur capacité à augmenter la synthèse d'ADN après stimulation.
- L'inhibition de l'activité respiratoire par un traitement au  $\text{Cu}^{2+}$  des cellules vivantes est associée à une inhibition de la libération des virtosomes. Des résultats similaires sont obtenus lorsque les oreillettes de grenouilles sont chauffées à  $50^\circ\text{C}$ .

L'ensemble de ces observations montre que ce mécanisme de sécrétion est précis, bien contrôlé, actif, impliqué dans l'homéostasie, et qu'il nécessite de l'énergie. De plus, ce phénomène de libération spontané de l'ADN a été observé sur des cellules en division et différenciées, indiquant une synthèse d'ADN indépendante de la mitose, qui peut se manifester pendant les phases G0 ou G1 du cycle cellulaire(75).

Gahan *et al.* ont noté que ces fractions d'ADN du virtosome partagent des caractéristiques communes(75) avec l'ADN métabolique mis en évidence par Pelc *et al.*(76, 77). Ce dernier est considéré comme des copies de gènes supplémentaires pour une production rapide d'ARNm (76).



**Figure 8:** Représentation schématique de la formation des virtosomes. Ref 75.

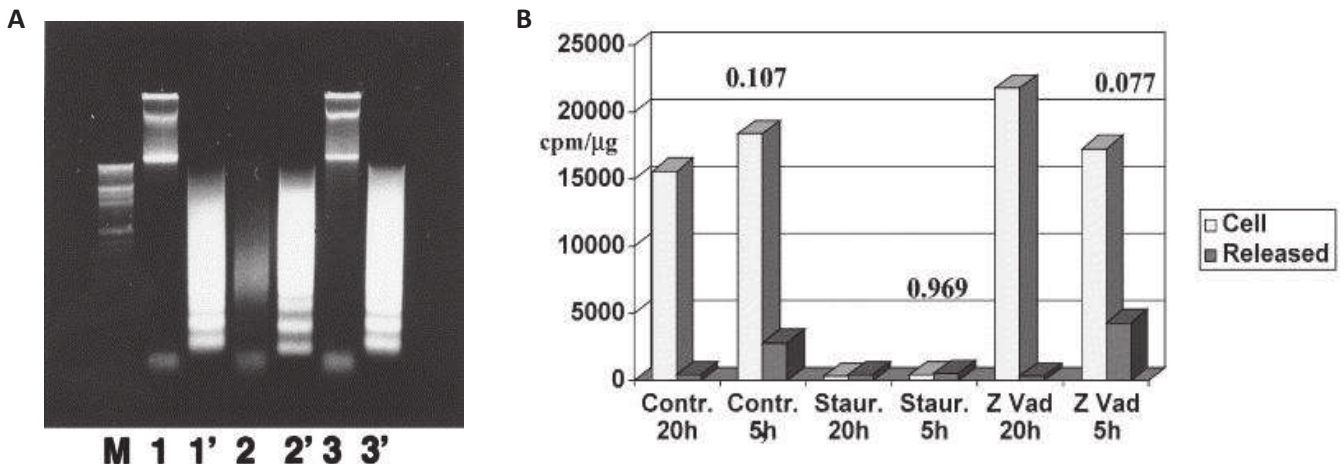
L'ADN nouvellement synthétisé est transposé dans le cytosol sous forme d'ADN libre ou associé à un complexe lipoprotéique. Dans le premier cas, l'ADN se lie à la lipoprotéine nouvellement synthétisée dans le cytosol. Enfin, l'ARN est ajouté au complexe lipoprotéine/ADN. La structure finale peut être libérée à l'extérieur de la cellule par exocytose.

Depuis, plusieurs travaux ont mis en évidence un rôle de ce nouveau complexe en tant que messager entre les cellules, capable de générer des modifications biologiques des cellules réceptrices telles que l'induction de réponses immunitaires(78) ou de transformation tumorale(79). Le virtosome constitue donc un composant important d'ADN dans la circulation.

D'autres travaux confortent cette hypothèse de sécrétion active d'ADN(29). Ainsi, lors d'expériences réalisées à partir de cellules HL60 en culture marquées avec <sup>3</sup>H-thymidine en présence de staurosporine, un réactif pro-apoptotique, ou du zVADfmk (N-Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(O-Me)fluoromethyl ketone), un réactif anti-apoptotique, la totalité de l'ADN extracellulaire présente une taille comparable à celle des fragments apoptotiques, quelle que soit la condition expérimentale(29). En revanche, l'ADN intracellulaire ne présente ces motifs apoptotiques que sous traitement par la staurosporine. En absence de traitement (condition



contrôle) ou lors d'un traitement avec un agent anti-apoptotique, l'ADN cellulaire a un poids moléculaire élevé (Figure 9A).



**Figure 9:** La sécrétion active de l'ADN extracellulaire. Ref 29.

**A.** Electrophorèse sur gel d'ADN intracellulaire et extracellulaire des cellules HL-60. M : marqueur de poids moléculaires. 1: ADN intracellulaire du contrôle, sans traitement. 1': l'ADN extracellulaire du contrôle, sans traitement. 2: ADN intracellulaire de la condition avec Staurosporine. 2': ADN extracellulaire de la condition avec Staurosporine. 3: ADN intracellulaire de la condition avec z-VAD. 3': ADN extracellulaire de la condition avec z-VAD.

**B.** Activité spécifique de l'ADN intracellulaire et extracellulaire des cellules HL-60 marquées à la  $^3\text{H}$ -thymidine. Les cellules ont été mises en présence de  $^3\text{H}$ -thymidine pendant 20h ; le milieu a été changé et les cellules ont été cultivées sans marquage pendant 5h. Contr : cellules contrôles, Staur : cellules + Staurosporine, Z Vad: cellules + z-VAD.

En condition contrôle ou sous traitement par le zVADfmk, l'incubation de ces cellules avec de la  $^3\text{H}$ -thymidine pendant 20h est associée à l'apparition de petites quantités d'ADN marqué nouvellement synthétisé dans le surnageant. De plus, ces cellules marquées ré-incubées en milieu frais sans marquage pendant 5h supplémentaire sont associées à une augmentation significative de l'ADN extracellulaire (Figure 9B). Cette augmentation de radioactivité indique que l'élimination de l'ADN extracellulaire non marqué après 20h de culture entraîne une libération d'ADN marqué nouvellement synthétisé dans le milieu(29). Il s'agirait donc d'un phénomène homéostatique dépendant de la concentration extracellulaire. En revanche, lors d'un traitement par la staurosporine, la synthèse de l'ADN est inhibée (ce qui s'accompagne

d'une quantité d'ADN marqué négligeable dans les cellules et le milieu de culture). D'autres expériences ont montré que la quantité d'ADN extracellulaire dosé après 20h dans le milieu est, à l'inverse, beaucoup plus élevée en conditions apoptotiques que dans les conditions contrôle ou anti-apoptotique. Ces expériences *in vitro*(29) confirment l'existence d'un mécanisme de relargage additionnel dépendant préférentiellement de la concentration d'ADN extracellulaire nouvellement synthétisé.

Parallèlement à ces observations, une étude publiée en 2016, suggère que la libération de l'ADN extracellulaire n'est pas une conséquence de l'apoptose ni de la nécrose, mais principalement le résultat d'une sécrétion active probablement d'un ADN non mitotique en association avec un complexe protéique(80).

### **Les vésicules extracellulaires :**

En plus des virtosomes, la présence de vésicules libérées par les cellules dans l'environnement extracellulaire a été mise en évidence. En raison de leur implication dans différents processus physiologiques et pathologiques, l'intérêt pour ces vésicules extracellulaires est en croissance exponentielle dans la communauté scientifique.

Les vésicules extracellulaires (Extracellular vesicles, EVs) sont des structures comportant une enveloppe composée d'une bicouche phospholipidique(81). Elles sont libérées par un processus conservé au cours de l'évolution par les cellules d'organismes allant des procaryotes aux eucaryotes supérieurs et aux plantes(82–84). Ces vésicules contiennent et exposent à la surface de leurs membranes des composants protéiques et lipidiques ainsi que des acides nucléiques issues de la cellule d'origine(85).

La sécrétion de ces vésicules a tout d'abord été décrite comme un moyen d'élimination des déchets cellulaires(83, 86). Par la suite, il est devenu de plus en plus évident que ces vésicules ont la capacité de transférer des informations vers d'autres cellules, influençant la biologie de la cellule réceptrice(87, 88). Ainsi, de nombreuses études démontrent un rôle clé de ces vésicules non seulement dans les processus physiologiques comme l'homéostasie, la maintenance des cellules souches, la réparation des tissus(86), la surveillance immunitaire(81, 89), mais également dans le développement et la progression de nombreuses pathologies(90) y compris le cancer(86, 91–93), les maladies auto-immunes(85), les maladies



neurodégénératives(94) et la propagation du VIH(95). De plus, l'intérêt suscité pour les vésicules extracellulaires a ouvert la voie à la perspective de les utiliser comme biomarqueurs pour suivre la progression de divers états pathologiques, par exemple pour évaluer le risque de progression tumorale et de métastase(96–99), pour caractériser certaines maladies inflammatoire(100). Enfin, certaines études visent à les utiliser comme vecteurs thérapeutiques pour l'administration ciblée de composés(101–105).

En fait, Les EVs sont considérés comme une famille hétérogène de vésicules qui se distinguent par leur taille, leur densité, leur mécanisme de formation, leur composition et leur fonction(81, 106–108). Elles peuvent être classées en deux catégories majeures :

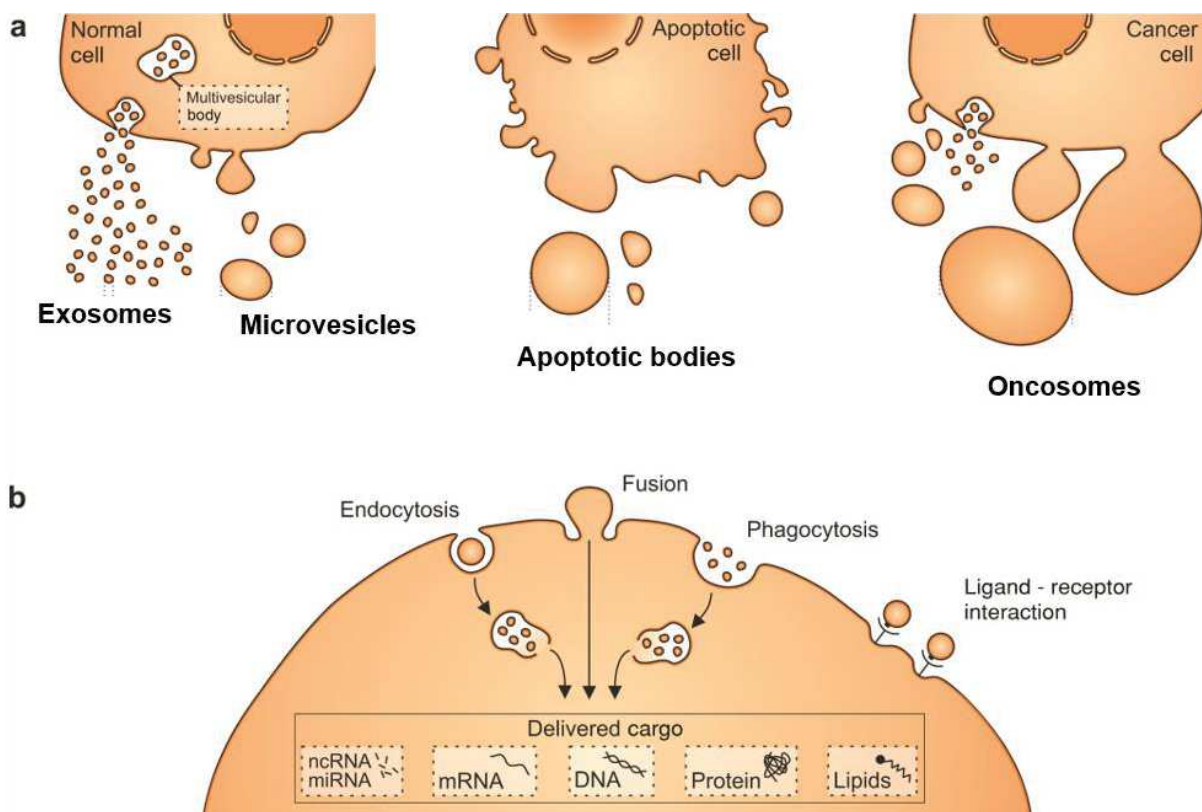
**(a) Exosomes**

**(b) Microvésicules**

**(a) Les exosomes :** Ce terme a été utilisé il y a trente ans, par Trams *et al.* pour désigner des vésicules de 40 à 1000 nm d'origine inconnue, libérées par diverses cellules(109). Deux autres études ont poursuivi ce travail en démontrant une libération de ces exosomes d'une taille de 40 à 100 nm dans le milieu extracellulaire lors de la différenciation des réticulocytes, par un mécanisme d'exocytose(110, 111). Depuis, l'étude de la sécrétion d'exosomes a été étendue à multiples types cellulaires, et cette population est devenue la population la plus étudiée parmi les EVs(112). Essentiellement, les exosomes sont considérés aujourd'hui comme vésicules intraluminales formées par le bourgeonnement interne de la membrane endosomique pendant la maturation des endosomes multivésiculaires (MVE), qui sont des intermédiaires dans le réseau endosomal, et sécrétées par fusion des MVE avec la membrane plasmique(106). Ces vésicules sont des EVs de taille comprise entre 50 à 150 nm(83).

**(b) Les microvésicules:** l'origine plaquettaire de ces vésicules a initialement conduit à attribuer à ces dernières le terme de « platelet dust ou poussière de plaquette »(113). Par la suite, une sécrétion de ces vésicules a été identifiée dans d'autres types de cellules(83). Cette population d'EVs possède une taille qui varie de 50 à 1000 nm(83). Elle est produite par bourgeonnement et fission externe de la membrane plasmique(106). Dans le cancer, ces microvésicules sont appelées oncosomes, ont une taille supérieure à 1 micron, et contiennent du matériel oncogénique(114).

Plusieurs études ont été menées afin de caractériser le contenu moléculaire de chaque population de vésicules extracellulaires (107, 112, 115–118). Cependant, l'état actuel de la littérature ne permet pas d'attribuer un marqueur unique à ses sous-types de vésicules et de les discriminer entre elles. En effet, il a été prouvé que la biogenèse des vésicules extracellulaires est fonction de chaque type de cellule et de son état physiologique, leur pouvant varier en terme de lipides, protéines et acides nucléiques(89, 104, 114, 119).



**Figure 10:** Les différents types de vésicules extracellulaires. Ref.119

**a.** Les EV sont produites par tous types cellulaires. L'apoptose déclenche la libération des corps apoptotiques. Certaines cellules cancéreuses génèrent des oncosomes. **b.** Les EV peuvent être prises en charge par différents mécanismes, notamment l'endocytose, la fusion membranaire ou la phagocytose. Les interactions ligand-récepteurs à la surface des cellules peuvent également avoir des effets biologiques et aider à cibler les vésicules vers des types cellulaires spécifiques.

### **A propos de la composition de ces vésicules en ADN :**

Malgré les études approfondies sur le contenu des vésicules extracellulaires en ARN, la présence d'ADN dans ces EVs a été moins explorée(89). Néanmoins, un nombre croissant de travaux a signalé la présence d'ADN chromosomal simple brin(120, 121) et ou double brin(122–125), d'ADN mitochondrial (126–128) dans les vésicules extracellulaires provenant de diverses origines cellulaires. De même, cet ADN détecté est soit intra-vésiculaire(120–124, 128–130) soit extra-vésiculaire(122, 127, 131, 132) (associé à la surface externe des EVs) (Tableau 1). Il a également été démontré que différents sous-groupes de vésicules extracellulaires secrétées par un type cellulaire particulier, transportaient des contenus d'ADN variables (123).

Ces études multiples ont suscité un intérêt considérable pour les vésicules extracellulaires contenant d'ADN, en tant que médiateurs de communication intercellulaire et mécanisme de transfert horizontal de gènes(124, 128, 130, 131). Cependant, la vraie signification biologique de la présence de ces vésicules n'est pas encore totalement élucidée(89).

De plus, la majorité de ces études ont montré que l'ADN présent dans ces EVs reflète l'état génétique de la cellule parentale(120–122, 125), ce qui illustre un potentiel significatif en tant que biomarqueur en clinique(89).

Finalement, au cours de ces dernières années, Takahashi *et al.* ont montré que l'inhibition de la sécrétion des EVs par les cellules normales entraînait une accumulation de fragments d'ADN nucléaire et provoquait ainsi le vieillissement cellulaire et l'apoptose. Ces observations suggèrent que les fragments d'ADN nocifs accumulés dans le cytoplasme sont libérée dans le milieu extracellulaire via ces vésicules ce qui contribue ainsi à l'homéostasie et la préservation des cellules(133).

**Tableau 1:** Les études décrivant la présence d'ADN dans les vésicules extracellulaire.

Type d'EVs	Type d'échantillon	Localisation d'ADN	Caractéristiques d'ADN	Reference
EV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule de cancer de la prostate (LNCaP / PC-3 / RC92a/hTERT)</li> <li>Plasma de Patient atteints de cancer de prostate</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>Double brin</li> </ul>	Lazaro-Ibanez <i>et al.</i> (123)
EV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasma de patients males atteints de coronaropathie</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>SRY gene</li> </ul>	Cai J <i>et al.</i> (129)
EV	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule mésenchymateuse stromale dérivée de la moelle osseuse humaine (BM-hMSC)</li> </ul>	Intravésiculaire (minorité) Extravésiculaire (majorité)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Non Associé avec des histones</li> <li>séquence uniformément réparties sur la quasi-totalité du génome humain.</li> </ul>	Fischer <i>et al.</i> (131)
Microvésicule / Exosome	<ul style="list-style-type: none"> <li>Lignée cellulaire cardiomyocytaire (HL-1)</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>343 séquences d'ADN chromosomiques différentes</li> </ul>	Waldenstorn <i>et al.</i> (130)
Oncosome	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule du cancer de prostate (U2OS / PC3 / U87)</li> <li>Plasma de Patient atteints de cancer de prostate</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>Double brin et simple brin</li> <li>2 million base pair</li> <li>Associé avec des histones</li> </ul>	Vagner <i>et al.</i> (120)
Microvésicule	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule de glioblastome (GBM)</li> <li>Cellule de médulloblastome (D458 / D384 / D425)</li> <li>Cellule de tumeur rhabdoïde (NS224)</li> <li>cellule de mélanome malin (Yumel 0106)</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN simple brin</li> <li>ADN génomique amplifié</li> <li>ADNc</li> </ul>	Balaj <i>et al.</i> (121)
Exosome	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule de leucémie myéloïde chronique humaine (K-562)</li> <li>Cellule de carcinome colorectal humain (HCT116)</li> </ul>	Intravésiculaire Extravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>Double brin</li> <li>Intravésiculaire : 100 Pb à 2.5 Kbp</li> </ul>	Thakur <i>et al.</i> (122)

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule de mélanome murin (B16-F10)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>Extravésiculaire : &gt;2.5 Kbp</li> </ul>	
<b>Exosome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellules de glioblastome humain (U87MG)</li> <li>Cellules d'astrocytes primaires</li> </ul>	<p>Intravésiculaire (minorité)</p> <p>Extravésiculaire (majorité)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN mitochondrial</li> </ul>	Guescini <i>et al.</i> (126)
<b>Exosome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Variante tumorigène de la lignée de cellules épithéliales intestinales (RAS-3)</li> <li>Cellule de Tumeur primitive spontanée du cerveau de type glioblastome (PBT)</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>Double brin</li> <li>Fragments couvrant tout le génome</li> </ul>	Tae Hoon Lee <i>et al.</i> (124)
<b>Exosome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sérum de patient atteint de cancer pancréatique</li> <li>Lignée cellulaire pancréatique (Panc-1 / T3M-4)</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>Double brin</li> <li>Fragments couvrant tous les chromosomes</li> <li>&gt;10-kb fragments</li> </ul>	Kahlert <i>et al.</i> (125)
<b>Exosome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cellule de lymphome humain à cellules T Jurkat</li> <li>Cellule de lymphome histiocytaire humain U937</li> <li>cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaCa</li> </ul>	Extravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN génomique</li> <li>ADN mitochondrial</li> </ul>	Németh <i>et al.</i> (127)
<b>Exosome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Plasme de Patients atteints de cancer du sein métastatique hormono-résistant (HTR)</li> <li>fibroblaste associé au cancer (CAF)</li> </ul>	Intravésiculaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>ADN mitochondrial</li> <li>Génomes complets</li> </ul>	Sansone <i>et al.</i> (128)

### **e. La maturation des érythrocytes et des plaquettes**

L'ADN circulant pourrait provenir de la formation et de la maturation des cellules sanguines telles que les plaquettes et les érythrocytes(25).

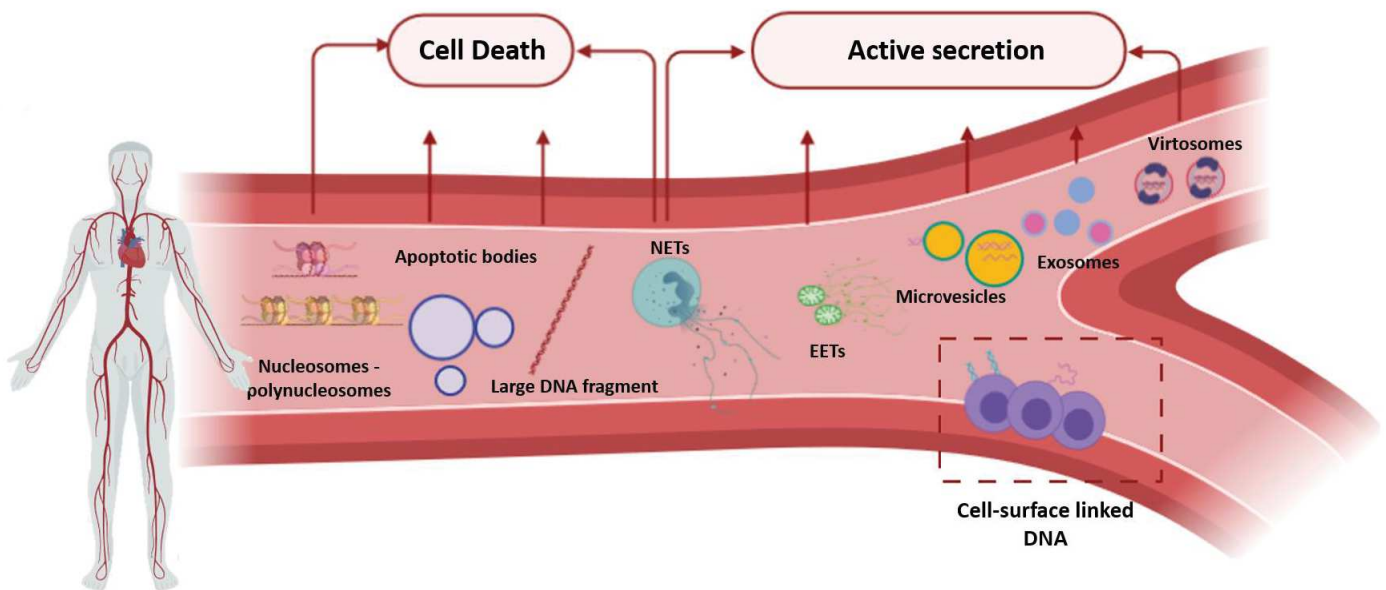
Au cours de la maturation des érythrocytes ou l'érythropoïèse(134) qui a lieu dans la moelle osseuse, la cellule souche hématopoïétique multipotente subit deux phases (135, 136):

- Une phase d'engagement et de prolifération pour étendre et activer les programmes de différenciation vers le proérythroblaste.
- Une phase de maturation au cours de laquelle le pro-érythroblaste possède une capacité proliférative réduite et génère, en séquence, des érythroblastes basophiles, polychromatophiles et orthochromatiques.

Durant cette dernière phase, une série de différenciations caractérisées par plusieurs changements tels qu'une diminution de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, une production d'hémoglobine, et une polarisation du noyau. L'érythroblaste orthochromatique est ensuite divisé en deux structures filles, le réticulocyte, qui contient la majeure partie du cytoplasme, et le pyrénocyte, qui contient le noyau condensé enfermé dans une fine couche cytoplasmique. Cette séparation est appelée énucléation et est favorisée par l'interaction entre les érythroblastes et le macrophage dans la niche érythroïde. Le pyrénocyte expose alors la phosphatidylsérine à sa surface qui agit comme un signal « eat-me » activant les macrophages et provoquant ainsi sa phagocytose(137). En échappant à ce processus, , en raison d'une absorption incomplète par les macrophages, on peut imaginer que les pyrénocytes libèrent des fragments d'ADN de leur contenu nucléaire dans la circulation(32).

Concernant la maturation des plaquettes, qui résulte de la fragmentation cytoplasmique du mégacaryocyte(138), dérivée de la cellule souche hématopoïétique, ce processus se produit par une réplication endomitotique synchrone, où le volume cytoplasmique augmente et le nombre des chromosomes augmente sans division cellulaire. La cellule peut atteindre un niveau de polyploïdie de 4N à 128N. Elle devient alors granulaire et commence à produire de longues extensions tubulaires du cytoplasme appelées pro-plaquettes (139, 140). Les plaquettes sont ainsi libérées de ces pro-plaquettes dans les sinusoides vasculaires de la

moelle osseuse(138, 141). Une élimination incomplète des noyaux du mégacaryocyte pourrait être à l'origine de l'ADN circulant(25).



**Figure 11:** Les structures majeures de l'ADN circulant.

NETs : neutrophil extracellular traps, EETs : eosinophil extracellular traps.

## ii. Origine exogène

L'ADN provenant de sources exogènes constitue une partie mineure de l'ADN extracellulaire dans la circulation(25).

Dans les années 1980, la présence d'une source exogène d'ADN circulant est une hypothèse qui a été exclue par Raptis *et al.*(142). Cependant, plusieurs études ont démontré par la suite que l'ADNcir peut provenir de sources exogènes, par exemple, par la digestion alimentaire, l'inhalation, la transplantation, la transfusion, l'infection et/ou l'infestation.

Ainsi, l'ADNcir plasmatique du virus d'Epstein-Barr est détecté dans 96% des carcinomes du nasopharynx(143), et de l'HPV (Human papillomavirus) dans 50% des cancers cervicaux(144). D'autre part, Wichmann *et al.*, ont détecté de l'ADN du parasite *Schistosome* dans le plasma humain, fournissant ainsi une nouvelle stratégie de diagnostic de la schistosomiase(145). Par ailleurs, une étude a mis en évidence la présence de longs fragments d'ADN issus de

l'alimentation qui, par un mécanisme encore inconnu, auraient été protégés de la dégradation et auraient pénétré dans le système circulatoire humain(146).

Enfin, une étude de l'équipe de Lo, a mis en évidence la présence d'ADN d'origine du donneur dans le plasma de receveurs de greffe de moelle osseuse. Cette étude est détaillée dans la partie II.iii (147).

### **iii. Origine tissulaire**

Comme indiqué dans les parties précédentes, tous les types cellulaires ont le potentiel de relarguer de l'ADN dans la circulation par l'un des mécanismes cités dans la partie II, voire par d'autres mécanismes non encore élucidés à ce jour.

L'équipe de Lo pensait que l'ADN circulant pourrait être d'origine hématopoïétique étant donné que les cellules sanguines sont les types cellulaires contenus dans le sang(147). Pour tester cette hypothèse, ils ont utilisé un modèle de transplantation de moelle osseuse entre individus de sexes différents (sex-mismatched). Ils ont ainsi mis en évidence une contribution plus importante des cellules hématopoïétiques que des cellules non hématopoïétiques pour l'ADNcir. En se basant sur le même principe, Tug et ses collaborateurs(148) ont également montré que les cellules de la lignée hématopoïétique sont la principale source d'ADN circulant induit lors d'un exercice physique.

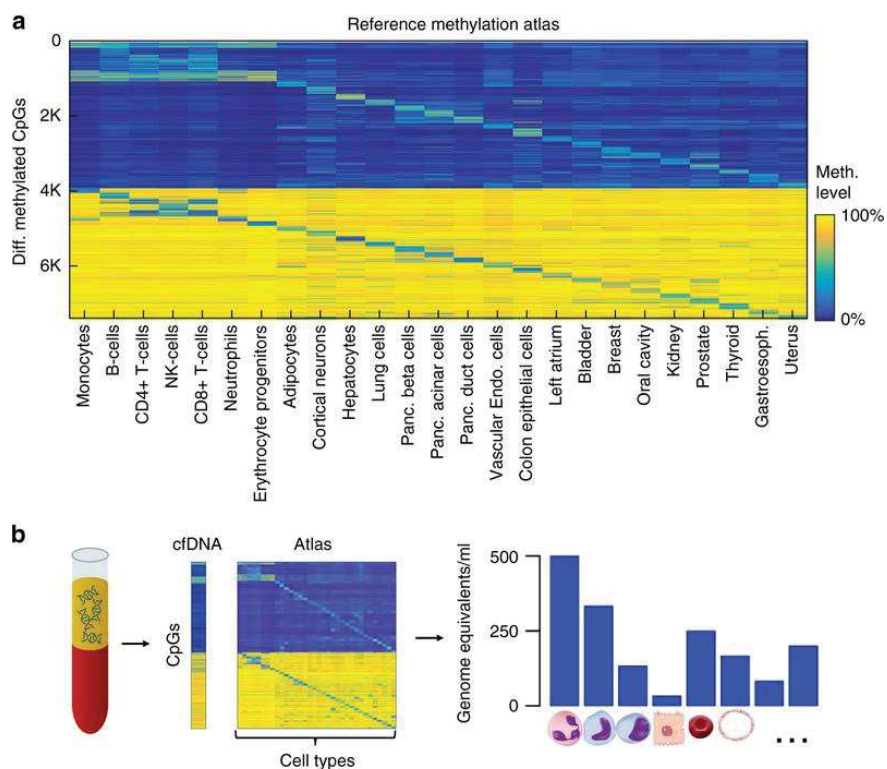
D'autre part, afin de bien tracer les sources tissulaires, de nouvelles approches d'analyse de l'ADN circulant ont été proposées. Premièrement, le profil de méthylation, essentiel pour la régulation génique spécifique(149), diffère selon les tissus et les types cellulaires(150, 151). Par exemple, il a été démontré récemment que l'ADN circulant pourrait contenir des preuves de signatures de méthylation des cellules donnant naissance à ces fragments et donc de leur tissu d'origine(152–154).

Dans une étude de Sun *et al.*(155), la déconvolution des données de séquençage de l'ADN circulant basée sur les profils disponibles de méthylation à haute résolution de différents tissus, a été mise au point. Cette approche a permis de produire un " tissue map " de l'ADN circulant et de révéler la contribution des différents tissus dans le pool de cet ADN circulant. Cette méthode, testée chez des femmes enceintes, des patients atteints de carcinome



hépatocellulaire et des sujets ayant subi une greffe de moelle osseuse ou de foie, montre que, chez la plupart des sujets, les globules blancs sont les principaux contributeurs de ce pool (>70%).

Une autre approche par Moss *et al.*(156), basée sur la conception d'un atlas de méthylation de référence de 25 tissus et types cellulaires humaines, a permis d'étudier les contributeurs non seulement tissulaires mais aussi cellulaires de l'ADN circulant. Les résultats de cette étude montrent que l'ADN circulant dans le plasma de donneurs sains provient pour 55% de globules blancs, 30% de progéniteurs érythrocytaires, 10% de cellules endothéliales vasculaires et 1% d'hépatocytes (figure 12).



**Figure 12:** Identification des tissus source de l'ADNcir par déconvolution du méthylome basé sur un atlas complet de méthylation. Ref 156.

**a**, Atlas de méthylation établi à partir de 25 tissus et types cellulaires sur ~8000 CpG. Pour chaque type de cellule, les 100 sites CpG les plus hyperméthylés (en haut) et les 100 sites CpG les plus sous-méthylés (en bas) sont sélectionnés, soit un total de 5000 CpG individuels discriminants pour les tissus. Des CpG voisins (jusqu'à 50 pb) ainsi que des 500 CpG qui sont méthylés de façon différentielle dans différentes cellules de même tissu sont ensuite ajoutés.

**b**, l'ADN est extrait du plasma et analysé selon un réseau de méthylation. Il est ensuite déconvolué à l'aide de l'atlas de méthylation de référence pour quantifier la contribution de chaque type de cellule à l'échantillon d'ADNcir.

De plus, le positionnement des nucléosomes varie selon les types cellulaires. En effet, ces empreintes nucléomiques peuvent être détectées dans l'ADN circulant et renseignent sur l'origine cellulaire de cet ADN dans des situations physiologiques et pathologiques(157). Ainsi, chez les individus sains, l'espacement des nucléosomes calculé dans l'ADN circulant est fortement corrélé aux caractéristiques épigénétiques des cellules lymphoïdes et myéloïdes(157). Tous ces travaux suggèrent que, dans des conditions physiologiques, les cellules hématopoïétiques sont une source majeure d'ADN circulant.

En revanche, dans des conditions pathologiques, les cellules affectées sont capables de libérer une quantité importante de leur ADN dans la circulation. En s'appuyant sur les approches techniques pré-citées, les échantillons de plasma de patients présentant diverses pathologies, révèlent une composante élevée d'ADN circulant provenant de tissus ou de lignées cellulaires non hématopoïétiques, correspondant souvent à l'origine anatomique de la maladie. Citons à titre d'exemple, le cancer, le diabète de type 1, traumatisme, pancréatite, septicémie(156–158).

L'étude de la contribution tissulaire dans le cas du cancer est développée dans la partie III.iii.

#### **iv. Profil de taille de l'ADN circulant**

Les nombreux mécanismes de relargage de l'ADN circulant, déjà évoqués dans la partie précédente, peuvent donner naissance à des fragments de différentes tailles dans la circulation. Par exemple, les individus sains et les patients cancéreux présentent une hétérogénéité dans la distribution des tailles de l'ADN circulant. Dans la littérature et en particulier dans le domaine de l'étude de la structure de l'ADN circulant, la caractérisation d'une taille de 170 à 200 pb, correspondant à un mono-nucléosome, est restée un postulat pendant longtemps(16, 159, 160), suggérant que l'apoptose serait la source majeure du pool d'ADN circulant. Néanmoins, d'autres études ont décrit des résultats discordants vis-à-vis de ce concept, tout en démontrant une abondance de fragments de plusieurs Kb(27, 161).

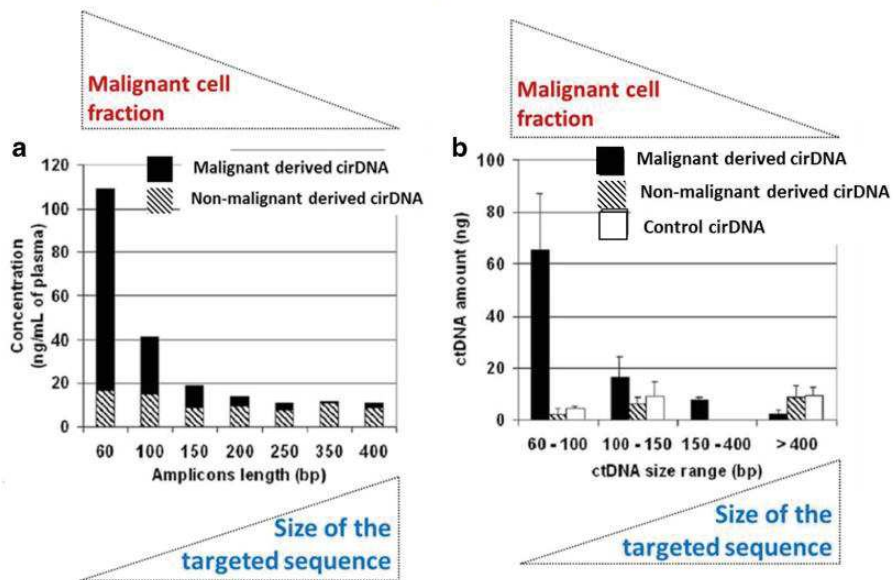
Parallèlement à ces données, l'équipe de Thierry a analysé, dans deux études distinctes, la distribution du profil de taille de l'ADN circulant chez des patients atteints d'un cancer

colorectal (CRC) et chez des individus sains, soit en utilisant la q-PCR et des couples d'amorces capables d'amplifier des fragments du gène KRAS sauvage de différentes tailles, soit en utilisant la microscopie à force atomique AFM(162, 163). Les deux études ont démontré la présence d'une quantité importante d'ADN circulant de taille inférieure à 150 pb chez les individus sains et les patients atteints de CRC, tandis qu'une quantité significative de fragments d'ADN supérieure à 300 pb n'a été détectée que chez les individus sains. L'amplification d'amplicons de petite taille ( $\approx 60$  bp), par q-PCR, permettait donc une quantification plus élevée d'ADN circulant. De la même manière, les travaux de Chan *et al.*(164), et Diehl *et al.*(13) ont démontré la présence significative de fragments d'ADN circulant d'une taille inférieure à 180 pb chez les individus sains et les patients atteints de cancer, respectivement.

L'étude de la fragmentation de l'ADN circulant chez les patients atteints de cancer comparée à celle de l'ADN circulant retrouvé chez les individus sains révèle toutefois des données discordantes. Ainsi, une fragmentation moins importante chez des patients atteints de cancer que chez des individus sains a été décrite dans plusieurs études(48, 165), alors que, d'autres travaux indiquent des niveaux équivalents(166).

Finalement certains travaux, dont ceux de l'équipe de Thierry montrent que l'ADN circulant d'origine tumorale est plus fragmenté que l'ADN circulant d'origine non tumorale (Figure 13) (163). L'ensemble de ces observations indique que l'étude en profondeur de la distribution de la taille de l'ADN circulant pourrait permettre de discriminer l'ADN tumoral de l'ADN non tumoral.

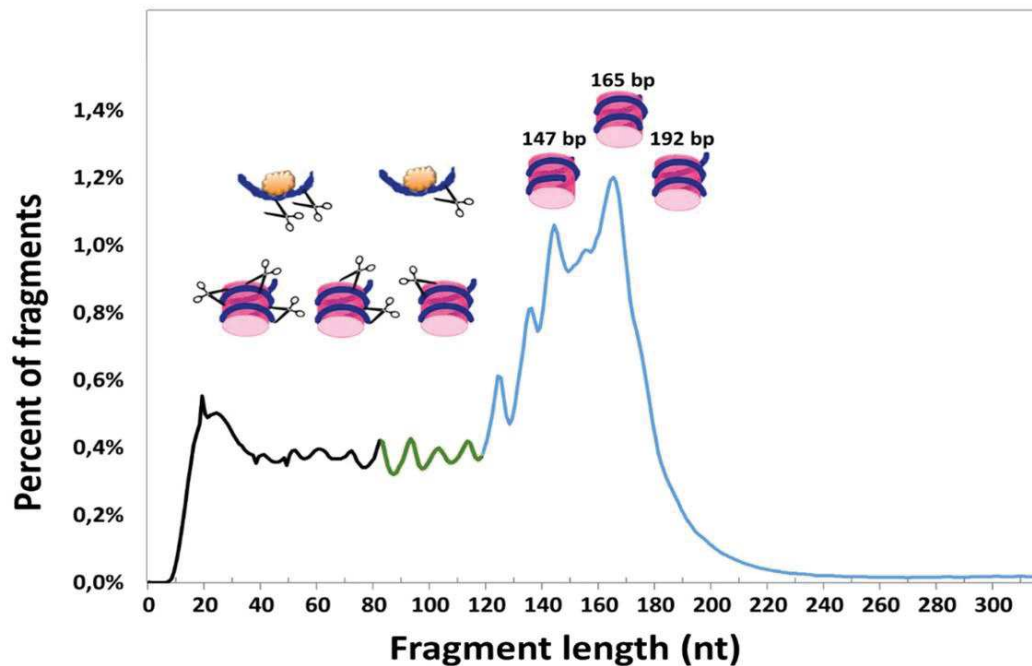
Murine plasma samples from xenografted mice with human *KRAS* mutant mCRC cell line (SW620)



**Figure 13:** L'ADN circulant d'origine tumorale est plus fragmenté que l'ADN circulant d'origine non tumorale chez des modèles murins xénotransplantés par une lignée tumorale humaine de CRC (SW620) Ref 163.

**a.** les concentrations moyennes d'ADN circulant tumoral (barres noires) et non tumoral (barres hachurées) sont quantifiées par q-PCR en amplifiant des séquences WT *KRAS* exon 2 de taille croissante : 60, 100, 150, 200, 250, 350 et 400 bp ; la hauteur de la barre correspond à la somme des concentrations d'ADN circulant tumoral et non tumoral. **b.** La distribution de la taille des fragments d'ADN circulant d'origine tumorale et non tumorale chez des souris xénotransplantées et de l'ADN circulant contrôle chez des souris non greffées.

De plus, une nouvelle étude de Sanchez *et al.* a examiné le profil de taille de l'ADN circulant extrait à partir de plasma de patients cancéreux en se basant sur deux approches techniques, la q-PCR et la SSP-S (Whole-genome sequencing of single-stranded DNA library preparation), et a comparé ce profil avec celui obtenu par la technique DSP-S (Whole-genome sequencing of double-stranded DNA library preparation)(167). L'analyse des données révèle que la plupart des ADNcir détectables dans le sang ont une empreinte nucléosomique (~10-bp de périodicité), indiquant ainsi que le nucléosome est la structure la plus stabilisante de l'ADN dans la circulation. Cette étude suggère aussi que les molécules d'ADN de la chromatine, sont dynamiquement dégradées dans le sang au niveau intra ou inter-nucléosomique ou même entre les fragments d'ADN liés aux facteurs de transcription (Figure 14).



**Figure 14:** Profil de taille de l'ADNcir extrait d'un patient cancéreux. Ref 167.

Trois fractions du profil de taille peuvent être distinguées : Courbe bleue, fragments d'ADN provenant de l'ADNcir dans un mononucléosome sans aucune coupure intranucléosomale; courbe verte, fragments d'ADN provenant de l'ADNcir dans un mononucléosome présentant des coupures par nucléase, ou de l'ADNcir associé à des facteurs de transcription sans coupure; et courbe noire, fragments d'ADN provenant de l'ADNcir dans un mononucléosome avec plus de coupure ou associés avec des facteurs de transcription avec coupure.

Ces discordances dans la littérature pourraient être dues aux variations de procédures pré-analytiques et analytiques utilisées dans chacune de ces études. Ces procédures méritent donc d'être optimisées pour une meilleure analyse de la fragmentation de l'ADN, une caractérisation optimale de ses différentes origines, et ainsi une amélioration de sa détection et son étude.

### III. Aspects fonctionnels de l'ADN circulant

L'ADN extracellulaire peut être considéré comme une molécule résiduelle que ce soit dans des conditions physiologiques ou même pathologiques. Cependant, une pléthore de recherches a mis en évidence plusieurs rôles actifs de cet ADN. Ces rôles sont décrits dans cette partie :

#### i. Rôle dans le transfert horizontal :

Le transfert horizontal consiste en une intégration de l'ADN de la cellule d'origine dans le génome de la cellule réceptrice.

En 1868, Darwin a proposé la théorie de la Pangenèse pour expliquer la variation dans le développement de l'hérédité de tous les organismes vivants par l'existence de 'gemmules'(16, 168). Ces dernières correspondent à des particules minuscules, excrétées par toutes les cellules, capables de circuler dans tout le corps et finalement d'atteindre les cellules germinales afin de transmettre des caractères à la descendance.

Après la découverte de la présence d'ADN circulant chez tous les végétaux et les animaux testés, y compris l'homme (1), des études d'hybridation de greffons ont démontré que le transport d'ADN extracellulaire entre greffons peut être à l'origine de modifications héréditaires(169, 170) ce qui établit un lien direct entre les gemmules décrites par Darwin et l'ADN circulant dans les fluides biologiques.

De nombreux travaux publiés par la suite montrent que l'ADN extracellulaire peut être, dans certaines conditions expérimentales, absorbé par d'autres cellules(17, 171, 172). Après internalisation cellulaire, cet ADN est fortement dégradé, mais il a été démontré qu'une petite proportion peut être intégrée dans le génome de la cellule réceptrice(17, 173), et induire ainsi une transformation génique de ces derniers(17).

Récemment, Mitra et ses collaborateurs ont montré que l'ADN circulant provenant de patients cancéreux pouvait, après ajout à différents types cellulaires en culture, être absorbé par les cellules, être transloqué dans les noyaux en quelques minutes et induire l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (174). De plus, cette équipe a démontré que la toxicité induite par la chimiothérapie peut être attribuée à ces résultats. En effet, la mort cellulaire provoquée par la chimiothérapie déclenche une libération d'ADN circulant et entraîne dans des cellules

adjacentes ou à distance, d'autres séries de dommages à l'ADN, d'apoptose et d'inflammation, amplifiant ainsi les effets toxiques de la chimiothérapie(175).

Par ailleurs, un rôle dans ce transfert horizontal par les vésicules extracellulaires, a été solidement démontré au cours de deux dernières décennies(87, 89). L'étude de Waldenström *et al.* a ainsi montré un transfert d'ADN des EVs libérées par les cardiomyocytes, vers le cytosol et le noyau des fibroblastes affectant ainsi leur expression génique.(130)

Enfin, l'ADN extracellulaire pourrait participer à la communication intercellulaire et influencer le comportement et les fonctions des cellules receveuses. Citons à titre d'exemple, les travaux de M. Stroun *et al.* qui ont montré que, les vésicules sécrétées par les lymphocytes T humains stimulés par le virus de l'herpès (Herpès Simplex Virus ou HSV) et le virus de la poliomyélite (Poliovirus) coopèrent avec les Lymphocytes B *in vitro*, en leur transmettant l'information génétique nécessaire pour coder l'anticorps dirigé contre les antigènes viraux(176). De plus, ces auteurs ont démontré *in vivo*, que des souris immuno-déprimées nude, injectées par ces particules, sont capables de produire des anticorps humains anti-HSV et anti-poliovirus(177).

## **ii. Génométastase :**

Plusieurs études ont montré que le phénomène de transfert horizontal décrit ci-dessus est impliqué dans la transformation tumorale de cellules normales et dans le développement de métastases. Ce phénomène a été décrit pour la première fois par Bendich *et al.*(2), en 1965. Ces auteurs avaient en effet montré que l'injection d'ADN tumoral dans le sang de souris était à l'origine d'un développement tumoral.

Cette observation a, depuis, été clairement confirmée et a mené à la théorie actuelle de génométastase(16), selon laquelle la formation de métastases se produit par la transfection de cellules saines à distance par l'ADN circulant issu de la tumeur primaire.

Anker et ses collaborateurs ont également montré, que les cellules tumorales du colon (SW480) contenant une mutation *KRAS*, peuvent libérer de l'ADN contenant cet oncogène muté dans le milieu de culture(79) et que des fibroblastes murins NIH3T3 exposés à ce milieu de culture sont non seulement transformés mais portent en plus la mutation *KRAS* issue de la lignée SW480 d'origine. Garcia Olmo *et al.*(178) ont observé le même phénomène, en utilisant du plasma de patient atteint de cancer colorectal porteur d'une mutation *KRAS*. Les cellules



NIH3T3, traitées avec ce plasma, deviennent, là-encore, tumorales et présentent la mutation. De plus, l'injection de ces cellules traitées chez des souris immuno-déprimées NOD-SCID, entraîne le développement de tumeurs porteuses de la mutation *KRAS*.

D'autre part, ces effets peuvent être facilités par l'internalisation intracellulaire des vésicules extracellulaires, dont la sécrétion est nettement plus élevée dans le cas d'un cancer(124, 179). Il a ainsi été démontré que ces vésicules sont impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses, le développement des résistances aux traitements, la reprogrammation de l'activité métabolique et le potentiel métastatique(180).

Enfin, les NETs relargués par les neutrophiles dans les cancers peuvent, outre leur rôle majeur dans la défense antibactérienne, influencer le microenvironnement tumoral, favoriser la croissance du cancer et contribuer à l'établissement d'une niche pré-métastatique(181–185).

### **iii. Immunité et inflammation :**

Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les infections(186). Ce système est capable de reconnaître les motifs moléculaires des pathogènes (PAMPs, Pathogen-associated molecular pattern), tels que des composants structurels microbiens comme le lipopolysaccharide, des acides nucléiques comme l'ADN CpG hypométhylé, et des protéines microbiennes comme la flagelline bactérienne, à travers un groupe hétérogène de récepteurs de forme PRR (Pattern recognition receptors) (187) tel que (188) :

- Toll-like receptors (TLR)
- Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NOD-like receptors, NLRs)
- C-type lectin receptors (CLR)
- Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors (RIG-I-like receptors, RLRs)

Après fixation du ligand, l'activation de ces PRR, stimule différentes voies de signalisation pour aboutir à l'activation du facteur nucléaire  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) et des facteurs régulateurs de l'interféron (IRF). Ces transducteurs vont, à leur tour, stimuler l'expression des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, des



interférons de type I (IFN) et des molécules co-stimulantes(187, 189, 190). L'état pro-inflammatoire qui en résulte est nécessaire à la création d'un environnement antimicrobien robuste et à l'activation adéquate de la réponse immunitaire adaptative.

En absence d'infection, le corps humain utilise également ce système pour déclencher des réponses similaires destinées à faire face à des lésions cellulaires et/ou du stress, tout en détectant des motifs moléculaires associés aux stress (DAMPs, Damage-associated molecular patterns). Les DAMPs sont des molécules endogènes d'origine intracellulaires (compartiments cellulaires) ou extracellulaires (matrices extracellulaires), qui sont libérés en réponse aux facteurs de stress(191). Ces molécules du soi présentent souvent des similitudes structurelles avec les PAMP et leur reconnaissance sert à alerter l'hôte d'un dysfonctionnement cellulaire et tissulaire(192, 193).

L'ADN extracellulaire libéré par les cellules, est dans certains cas, capable de stimuler le système immunitaire(194–196). Sa structure particulière en double hélice, les motifs particuliers de certaines de ses séquences et ses interactions moléculaires sont les trois éléments à l'origine de sa reconnaissance par les récepteur PRRs comme DAMPs(16, 195). Cette liste de récepteurs comprend, de manière non exhaustive, les TLR9 et les capteurs d'ADN cytosolique cGAS (GMP-AMP synthase cyclique) et AIM2 qui sont majoritairement des récepteurs intracellulaires(194).

Normalement, la DNase participe à la dégradation de l'ADN circulant qui n'est pas éliminé d'une façon efficace(16). Cependant, dans des conditions pathologiques particulières, l'ADN circulant n'est pas totalement dégradé par les nucléases et peut alors se complexer avec d'autres protéines (histones(197), anticorps anti-ADN(198), HMGB1(199) (high-mobility group box 1)(195, 196)) afin d'atteindre ces récepteurs intracellulaires impliqués dans sa reconnaissance.

Il a été montré que les souris déficientes en DNase étaient particulièrement sensibles au développement de pathologies auto-immunes(200) et que les patients atteints de LED présentent une activité de la DNase 1 plus faible que dans le groupe control(201).

Finalement, les vésicules extracellulaires peuvent aussi servir à protéger cet ADN de l'effet des nucléases afin de les transporter vers les cellules immunitaires qui les internalisent par endocytose ou par d'autres mécanismes(202).

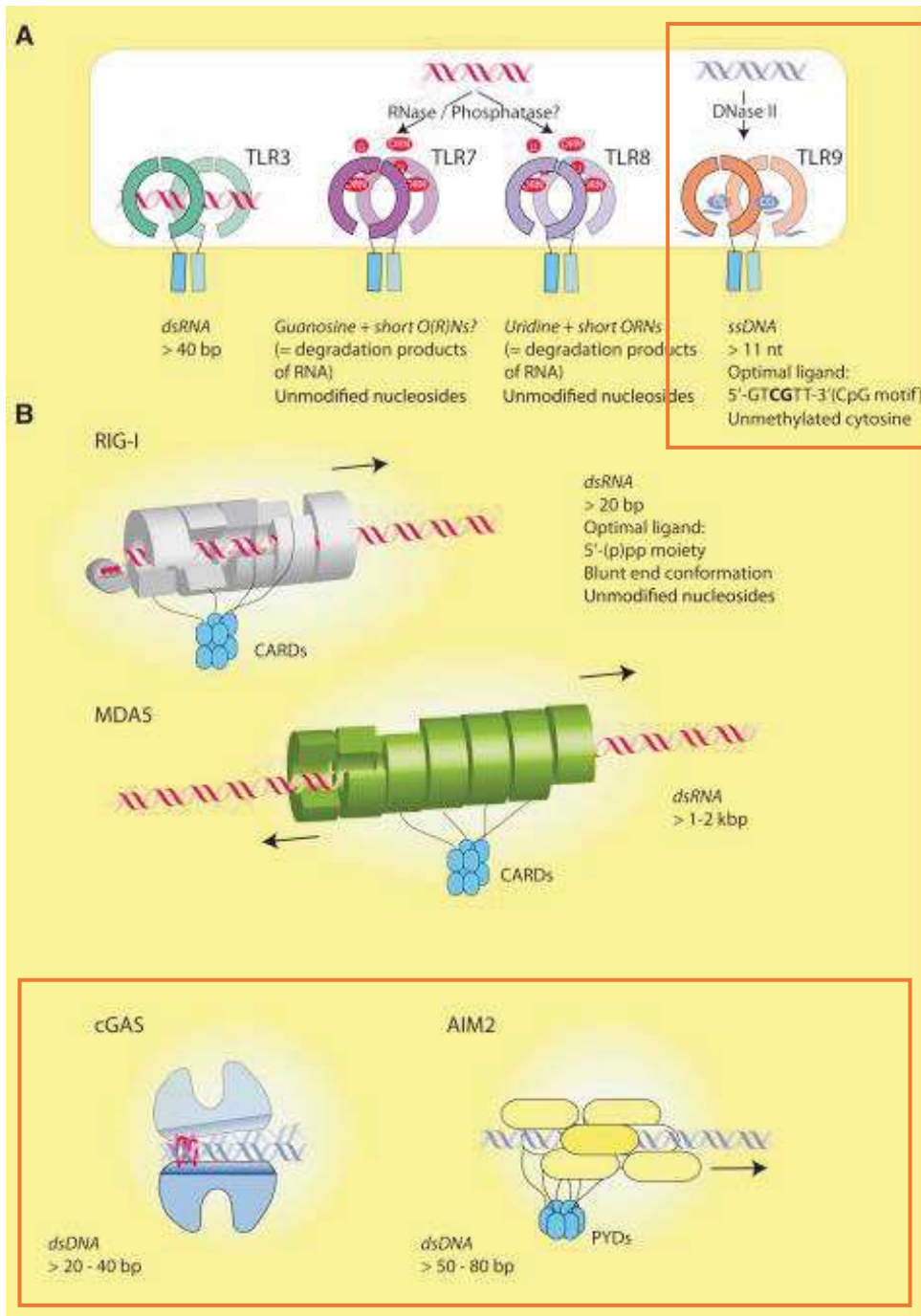


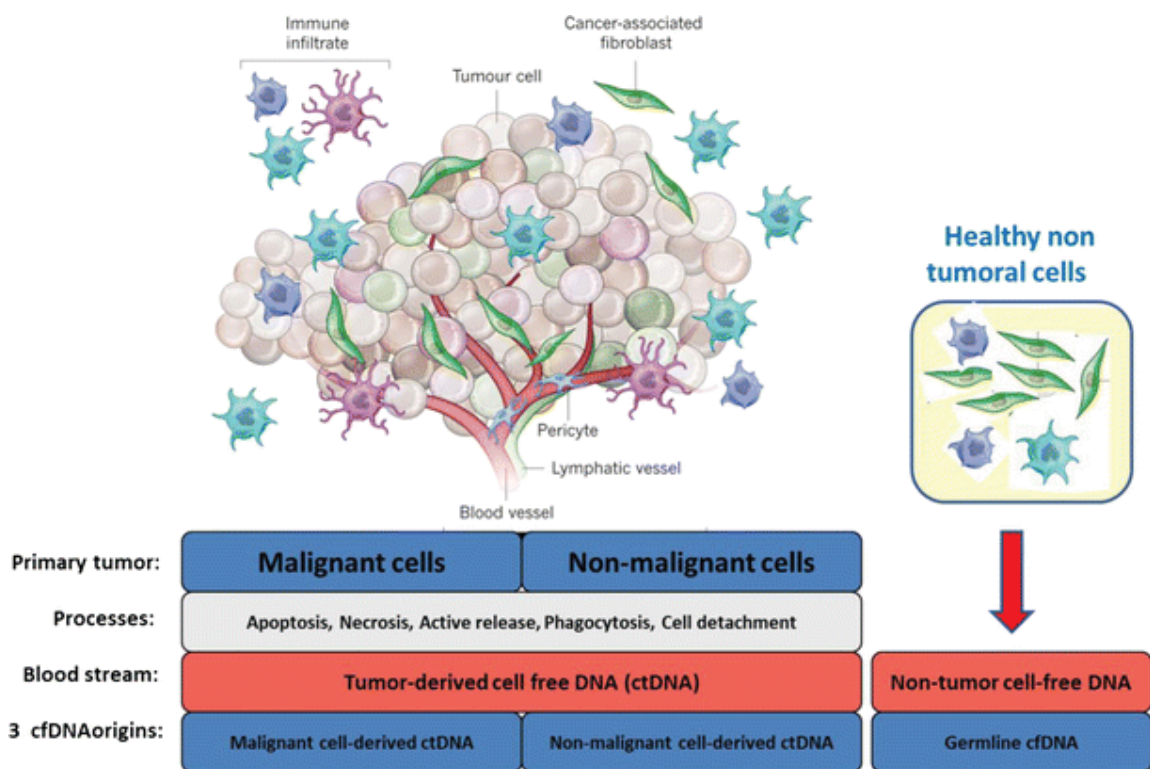
Figure 15: les PRRs spécifiques aux acides nucléiques. Ref 194.

## **IV. Applications cliniques de l'analyse des ADN circulants**

La découverte selon laquelle l'ADN est présent en quantités plus élevées dans le sang des patients atteints de lupus érythémateux ou de cancer par rapport aux individus sains a ouvert la voie à de nouvelles perspectives de diagnostic et de pronostic au cours des dernières décennies. De nombreuses études démontrent le potentiel de l'ADN circulant, en particulier d'origine nucléaire, comme biomarqueur dans de multiples pathologies et états physiologiques particuliers. A titre d'exemple, on peut citer, le domaine des transplantations d'organes(203), de l'infectiologie(204), de la cardiologie(205, 206), du diagnostic pré-natal (14)et pré-implantatoire(207) et du cancer. Compte tenu du contexte dans lequel s'est déroulé mon travail de thèse, seul le potentiel de la découverte des ADN circulants dans le domaine de l'oncologie sera développé ci-après.

### **i. Les applications cliniques de l'analyse de l'ADN circulants en oncologie**

En plus des cellules saines, les cellules tumorales libèrent des quantités importantes d'ADN dans la circulation sanguine. Les cellules du microenvironnement en contact avec la tumeur participent aussi au relargage de cet ADN (Figure 16) (208). L'ADN d'origine tumorale (ADNct) diffère de l'ADN des cellules saines par sa concentration, sa stabilité, son intégrité et ses caractéristiques génétiques telles que la présence de mutations somatiques, de variations du nombre de copies et de modifications épigénétiques présentes dans le tissu tumoral(209, 210). Par conséquent, l'analyse de l'ADN circulant permet de caractériser tous types de cancers, à des stades plus ou moins avancés, *via* une procédure non invasive, simple et de faible coût. Des travaux sont ainsi menés pour évaluer l'intérêt de l'analyse de l'ADN circulant dans le dépistage, le diagnostic, et le pronostic. D'autres études s'intéressent également au potentiel de cette analyse dans le choix des traitements, la surveillance de la réponse aux traitements, la détection des mécanismes de résistance, la recherche de la maladie minimale résiduelle et la prédiction des rechutes.



**Figure 16:** Origines cellulaires distinctes de l'ADN circulant dans le sang des patients atteints de cancer. Ref 16.

### a. Le dépistage précoce et le diagnostic

Un dépistage précoce du cancer, avant l'apparition de signes cliniques, augmenterait l'efficacité du traitement, la survie globale des patients et pourrait par conséquent réduire la mortalité liée au cancer.

La détection du cancer par recherche de l'ADN circulant tumoral a fait l'objet d'une grande attention ces dernières années suite aux nombreuses études qui se sont concentrées sur l'analyse quantitative de l'ADN dans la circulation. En fait, ces études ont révélé des différences significatives entre les quantités d'ADN plasmatique dosées chez des individus sains et celles dosées chez des patients atteints de maladies bénignes et des patients cancéreux(211–213).

D'autres études ont également montré que des mutations associées au cancer peuvent être détectées dans le pool d'ADN circulant à un stade précoce de la maladie (214–218), avant l'apparition de symptômes (219, 220), et jusqu'à 2 ans avant le diagnostic de cancer(221, 222).

Ces observations ont été à l'origine de nouvelles investigations pour faire de ce paramètre un outil performant pour le dépistage précoce et le diagnostic de la maladie.

### **b. Le pronostic et le suivi des patients**

La concentration en ADN circulant a été corrélée à la taille de la tumeur et au stade tumoral (217, 223–225). Cette valeur pronostique est illustrée par plusieurs travaux selon diverses approches technologiques(226, 227).

Une étude examinant la survie globale (OS) sur une cohorte de patients atteints de cancer colorectal métastatique, a, par exemple, été réalisée par l'équipe de Thierry(228). Cette étude a montré que les patients présentant une concentration élevée en ADNcir total ont une survie globale moins longue que ceux ayant une concentration en ADNcir total faible. De même, l'analyse multivariée menée sur l'ensemble de la cohorte, a prouvé que la concentration en ADNcir totale ainsi que le statut mutationnel BRAF muté étaient des facteurs pronostiques puissants et indépendants.

De la même manière, plusieurs travaux ont révélé une diminution du taux de survie quand la concentration en ADN circulant tumorale augmente et inversement, ceci dans plusieurs types de cancer (217), tels que le cancer du sein(229)(210), le cancer du poumon (230) le cancer de la prostate(231) et le cancer colorectal(232). Enfin, plusieurs études ont montré que l'intégrité de l'ADNcir (fragmentation) pourrait servir de marqueur de pronostic dans le cancer colorectal(222, 231), le cancer du sein (234, 235) ou le cancer nasopharyngé(236).

### **c. La localisation de la tumeur**

L'évaluation de l'ADN circulant et de sa concentration, permet de génotyper et de surveiller le cancer. Cependant, elle n'informe pas sur l'origine tissulaire, qui est souvent essentielle pour localiser la tumeur en particulier dans les cancers primaires dont l'origine est inconnue, et dans le cadre d'un diagnostic précoce(237). En fait, les nouvelles approches de la caractérisation de l'ADNcir, présentés dans la partie II.iii., permettent d'identifier leur source. L'étude de Sun *et al.*(155), a, par exemple, montré un pourcentage de contribution des cellules

hépatiques dans l'ADNcir du plasma, plus élevé chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire que chez des individus sains.

De la même manière, l'étude de Moss a permis(156), chez des patients atteints d'un cancer du côlon métastatique, d'un cancer du poumon ou d'un cancer du sein, de détecter correctement l'origine de cet ADN. Cette étude a également permis de vérifier que cette approche pouvait identifier l'origine d'un tissu cancéreux en absence d'une tumeur primaire détectable, dans le plasma de 4 patients dans cette situation. Finalement, le positionnement nucléosomique spécifique de l'ADNcir et sa comparaison avec les données d'expression de certaines lignées humaines et de tissus primaires, a démontré chez 5 patients présentant différents types de cancers que les lignées ou les tissus les mieux classifiés sont en harmonie avec le type de cancer(157). Cependant, toutes ces approches doivent être largement validées pour devenir utiles en pratique en clinique(215).

#### **d. Le choix du traitement**

Dans le cadre de la médecine personnalisée, l'évaluation du profil mutationnel des patients atteints du cancer précédant l'instauration de la thérapie ciblée, est en fort besoin compte tenu du fait que ces traitements ne sont efficaces que si la tumeur contient ou ne contient pas certaines altérations moléculaires (238).

Actuellement, la procédure de référence (« Gold standard ») pour ce profilage moléculaire destiné à la sélection du traitement, est l'analyse du tissu tumoral ou la biopsie solide. Cependant, ce processus est invasif, douloureux et coûteux pour les patients, et comporte certains risques tels que des dommages aux tissus de proximité. D'autre part, certaines tumeurs telles que les tumeurs pancréatiques sont difficilement accessibles et, par conséquent, une répétition d'échantillonnage des tumeurs pour le suivi du pronostic est difficilement réalisable en pratique(239). Enfin, cette analyse ne concerne qu'une seule partie de la masse tumorale et est confrontée à l'hétérogénéité clonale intra- et inter-tumorale, c'est à dire au sein même de la tumeur ou entre tumeurs primaires et métastases appariées(240–242). Pour toutes ces raisons, une analyse non invasive permettant de palier aux complexités de la biopsie tissulaire traditionnelles apparaît aujourd'hui incontournable (211, 243).

Comme mentionné précédemment, l'ADNcir est le miroir du profil moléculaire de la tumeur. Par conséquent, l'étude de l'ADNcir permet la caractérisation de toute la tumeur par une procédure non invasive, simple et de faible coût.

Cependant, afin de valider le concept selon lequel l'analyse de l'ADNcir est un biomarqueur fiable et performant pour caractériser le profil mutationnel des patients cancéreux, il fallait démontrer une concordance élevée avec les résultats obtenus à partir de biopsies tissulaires(215). Diverses méthodes, ciblant les mutations *KRAS* dans le cancer colorectal(244), les mutations *EGFR* dans le cancer du poumon(245), les mutations *BRAF V600*(246) dans le mélanome ou d'autres mutations associées à d'autres types de cancers(247–249) ont permis d'établir cette concordance.

#### **e. Le suivi de la réponse au traitement**

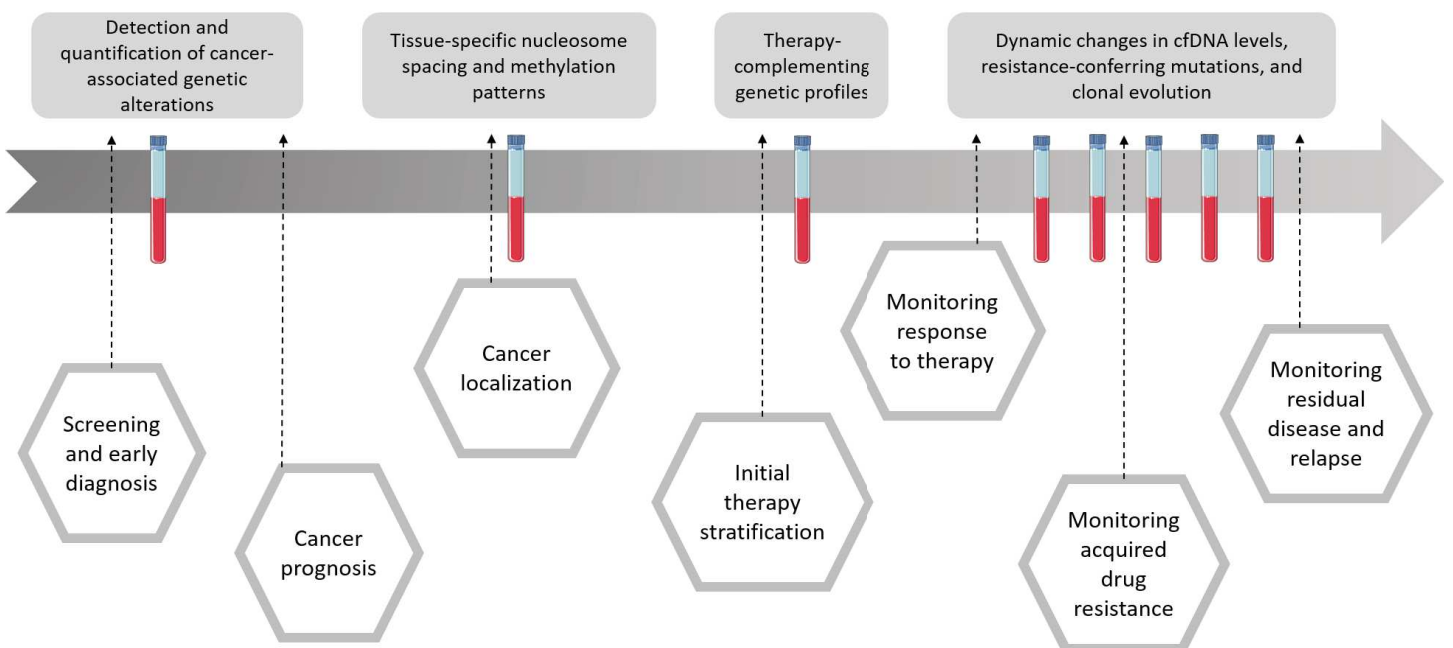
Le concept de la médecine de précision est dépendant de l'évolution génomique pendant le traitement. La tumeur est en effet constituée d'une population de clones, qui évoluent au fil du temps, en raison de l'apparition *de novo* de nouvelles mutations ou sous une pression de sélection clonale générée par les différentes thérapies ciblées(250). Souvent, cette évolution entraîne progressivement le développement d'une résistance et conduit par conséquent à un échec thérapeutique(251, 252).

Dans ce contexte, la courte demi-vie de l'ADNcir en fait un biomarqueur bien adapté au suivi de la réponse au traitement(239). Le suivi de la réponse des patients au traitement est en effet bien corrélé au taux de l'ADNct: une faible quantité d'ADNct est associée à une bonne efficacité de traitement(253–258), alors qu'une forte quantité d'ADNct est associée à une faible réponse et une résistance au traitement(210, 223, 259–261). De plus, plusieurs travaux publiés démontrent que l'analyse de l'ADNcir pendant le traitement permet d'identifier de nouvelles mutations conférant une résistance thérapeutique en particulier dans le cancer colorectal (262) (263) et dans le cancer du sein (264).



## f. La surveillance de la maladie minimale résiduelle et de la récursive

De nombreuses études ont été réalisées dans le cadre de la prise en charge du cancer, sur le suivi des patients après résection tumorale, afin de détecter la maladie minimale résiduelle MRD, et donc de surveiller les rechutes précoces. A l'heure actuelle, l'identification des MRD post-chirurgicales, est basée sur la classification TNM qui ne fournit qu'une estimation approximative du risque de récursive(239). Dans ce contexte, le profil de l'ADNcir, en particulier d'origine tumorale, a un potentiel prometteur. Plusieurs travaux ont utilisé l'ADNct pour estimer la survie sans récursive, dans le cas du cancer du sein (229), du mélanome(265), du colon(266, 267), de l'ovaire(223), de la vessie (261)et du poumon(268). Diehl *et al.* ont en particulier prouvé dans une étude menée chez des patients atteints de cancer colorectal de stade II à IV, que le niveau de l'ADN circulant d'origine tumorale diminue de 99% en 24h dans le cas d'une résection chirurgicale complète de la tumeur(269) alors, qu'une résection incomplète est associée à une variation légère voire une augmentation significative des taux d'ADNct. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude réalisée sur le cancer du poumon localisé de stades I à III (270).



**Figure 17:** les différentes applications cliniques de l'analyse de l'ADN circulant en oncologie. Adaptée de la ref 215.



L'ensemble de ces résultats démontrent que L'ADNct reflète sa diversité génétique et que son analyse représente évidemment une percée dans les applications cliniques, y compris le diagnostic, la médecine prédictive, préventive et personnalisée. Cependant, malgré toute l'attention portée par les chercheurs et les cliniciens, et les multiples travaux réalisés au cours des vingt dernières années, l'analyse de l'ADNcir n'a pas encore été traduite en pratique clinique dans bien des domaines et son application est loin d'être routinière due à l'hétérogénéité des résultats publiés.

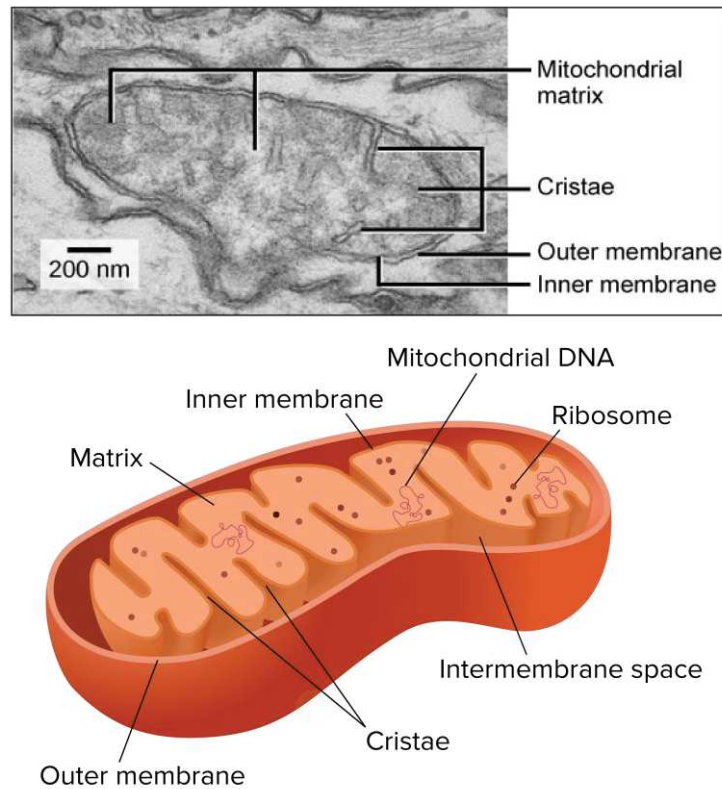
## v. Le cas de l'ADN mitochondrial

### i. La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites intracellulaires, évolués à partir d'une alpha-protéobactérie internalisée par un progéniteur eucaryote suite à un événement endosymbiotique qui s'est produit il y a environ 1,5 milliard d'années(271, 272). Les mitochondries sont souvent désignées comme la centrale énergétique de la cellule puisqu'elles contrôlent pratiquement tous les aspects fonctionnels de la cellule en fournissant un apport continu d'adénosine triphosphate (ATP)(273). De même, elles modulent la signalisation du calcium et son homéostasie, influencent et contrôlent les niveaux des espèces réactives d'oxygène (ROS) et stimulent des réponses immunitaires (273–275). Cependant, les mitochondries peuvent passer rapidement du contrôle de la fonction cellulaire normale à l'activation de la mort cellulaire puisque ces organites jouent également un rôle central dans la nécrose et l'apoptose (274, 275).

Les mitochondries des eucaryotes conservent au moins quatre particularités de la mitochondrie ancestrale bactérienne :

- La présence et la composition en phospholipides, de la double membrane mitochondriale, externe (OM) et interne (IM), séparées et fonctionnellement distinctes, entourant l'espace inter-membranaire (IMS) et les compartiments de la matrice(276–278).
- La conservation d'un génome circulaire propre d'environ 16Kb, avec des motifs CpG hypométhylés, bien qu'au cours de l'évolution, la plupart du matériel génomique bactérien ait été perdu ou transféré au génome nucléaire(277, 279).
- La réplication autonome de l'ADN mitochondriale de manière, indépendante de la division cellulaire (277, 279).
- La traduction des protéines mitochondriales qui débute par l'acide aminé méthionine formylée, une modification N-terminale absente dans les protéines codées par l'ADN nucléaire(277).



**Figure 18:** Structure d'une mitochondrie.

Les mitochondries sont entourées d'une double membrane, composée des membranes mitochondriales internes et externes séparées par un espace intermembranaire. La membrane interne forme de nombreuses invagination dans la matrice de l'organe appelées crêtes (cristae).

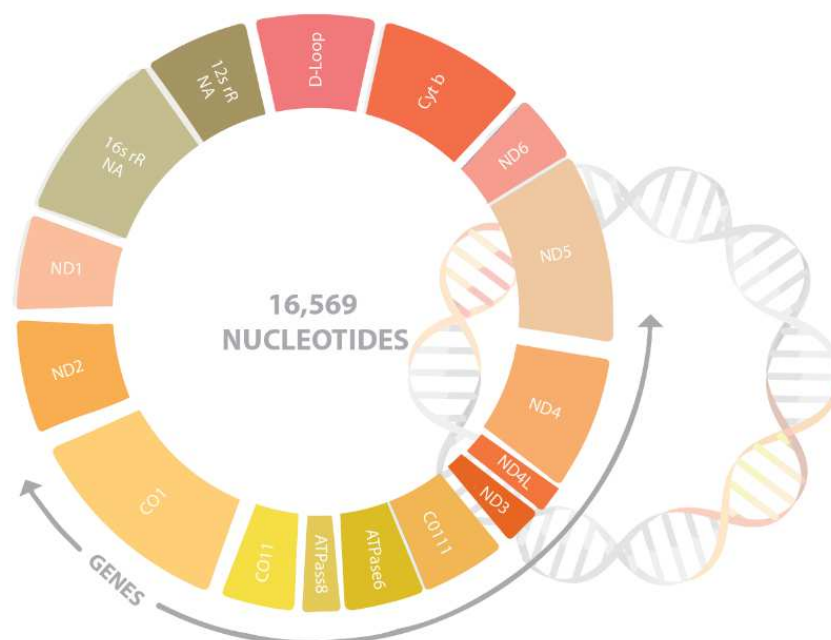
<https://www.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-cells/hs-prokaryotes-and-eukaryotes/a/chloroplasts-and-mitochondria>

## ii. Caractéristiques du génome mitochondrial

Chaque cellule humaine renferme plus de cent mitochondries, à l'intérieur desquelles coexistent environ 2 à 10 copies d'ADN mitochondrial (ADNmt)(280). Cet ADN est circulaire, avec des motifs CpG hypométhylés, en double brin; un brin lourd riche en purines et un brin léger riche en pyrimidines(281). Le génome mitochondrial comporte 16,569 paires de bases, comprenant 37 gènes qui codent pour 13 polypeptides essentiels impliqués dans la phosphorylation oxydative, ainsi que pour 22 ARNt et 2 ARNr nécessaires à la synthèse de ces polypeptides dans la mitochondrie(281, 282) (figure 19). Les sous-unités protéiques

mitochondriales restantes qui composent les complexes de la chaîne respiratoire, ainsi que celles qui sont nécessaires à l'entretien de l'ADNmt, sont codées par le génome nucléaire et synthétisées avec des ribosomes cytoplasmiques(281, 282). En conséquence, la mitochondrie est sous le double contrôle génétique de l'ADN nucléaire et du génome mitochondrial.

L'ADN mitochondrial comporte une seule région non codante ; la région D-Loop (Displacement Loop) formée de 1,124 pb en position nucléotidique 16,024-576(283). Cette région est un site essentiel pour la réplication et la transcription du génome mitochondrial: elle contient le point d'origine de la réplication de l'ADNmt, les sites de fixation de la majorité des promoteurs de la transcription ainsi que certains facteurs de transcription(283).



**Figure 19:** L'ADN mitochondrial.

<https://www.fulgentgenetics.com/products/sequencing/mitochondria.html>

Par ailleurs, l'ADN mitochondrial présente la particularité de ne pas être complexé avec des histones. Il est compacté au sein d'un macro-complexe nucléoprotéique d'environ 100nm, appelé nucléoïde, qui contient plusieurs copies d'ADN mitochondrial(284, 285). TFAM (transcription factor A, mitochondrial) constitue la protéine nucléoïdique la plus abondante chez les mammifères, qui, en plus de son rôle de compactage de l'ADN, joue un rôle important dans la transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial(286–288).

De plus, l'ADN mitochondrial possède des gènes polycistroniques sans introns contrairement à l'ADN nucléaire(281, 282). Enfin, la génétique mitochondriale présente des caractéristiques différentes de la génétique mendélienne ; l'héritage des mutations est maternel, l'ADN mitochondrial est polypléïde, chaque cellule contient des centaines ou des milliers de nucléoïdes, et finalement les mécanismes de réplication et de transcription mitochondriales sont distincts de ceux du génome nucléaire. Les différences entre génomes nucléaires et mitochondriaux sont listées dans le tableau 2(282).

**Tableau 2 : Comparaison entre le génome nucléaire et le génome mitochondrial.**

<b>Propriétés</b>	<b>Génome nucléaire</b>	<b>Génome mitochondriale</b>
<b>Taille</b>	~3.3 x 10 <sup>9</sup> pb	16,569 pb
<b>Nombre de copies</b>	23 dans cellule haploïde et 46 dans cellule diploïde	Plusieurs milliers d'exemplaires par cellule (polypléïdie)
<b>Nombre des gènes codés</b>	~20,000–30,000	37
<b>Introns</b>	Fréquemment trouvé dans les gènes	Absent
<b>% de l'ADN codant</b>	~3%	~93%
<b>Protéines associés</b>	Histones et autres protéines associées aux nucléosomes	Pas d'histones ; mais associées à plusieurs protéines du nucléoïde.
<b>Mode d'héritage</b>	Héritage mendélien pour les autosomes et le chromosome X ; héritage paternel pour le chromosome Y	Exclusivement maternelle
<b>Réplication</b>	Mécanisme à couplage de brins ADN polymérasés $\alpha$ et $\delta$	Modèles à couplage de brins et à déplacement de brins ; ADN polymérase $\gamma$
<b>Transcription</b>	transcription individuelle	transcription sous forme de grands polycistrons.

### iii. Les altérations génétiques du génome mitochondrial

L'ADNmt est considéré comme « *hot spot* » de mutations qui sont largement fonction de la nature et de la dynamique de l'organisation intra-mitochondriale, de la mobilité et du cloisonnement de la mitochondrie elle-même.

Les premières mutations pathogènes de l'ADN mitochondrial ont été identifiées en 1988(289, 290). Au cours des 25 dernières années, d'autres mutations ont été mises en évidence grâce aux progrès du séquençage et des technologies de biologie cellulaire. Ainsi, plus de 250 mutations, y compris des mutations ponctuelles et des réarrangements, provoquant une grande variété de pathologies avec une hétérogénéité de phénotypes ont été identifiées(291, 292). Ces mutations peuvent exister dans un état homoplasmique (toutes les molécules d'ADNmt sont de type sauvage ou mutées) ou hétéroplasmiques, ce qui signifie qu'ADN sauvage et muté peuvent coexister dans une même cellule(282, 293). Cependant, la majorité de ces mutations hétéroplasmiques sont récessives, ce qui implique que des taux élevés d'ADNmt muté sont nécessaires pour qu'un phénotype se manifeste dans les cellules. Pour des raisons encore inconnues, cet " effet de seuil " est variable selon le type de mutation(293).

Le mode de transmission des mutations de l'ADN mitochondrial est strictement maternel(294).

Dans le cas des mutations homoplasmiques, la transmission se fait à tous les descendants maternels(282). Par contre, seuls quelques-uns développeront la pathologie associée, ce qui suggère l'implication de facteurs génétiques nucléaires(295), et de facteurs environnementaux(296) pouvant moduler l'expression du phénotype associé à la maladie.

Dans le cas des mutations hétéroplasmiques, la transmission est plus complexe et associée à un phénomène de ségrégation, le « *bottleneck génétique* », où seule une petite fraction de toutes les copies d'ADNmt dans la cellule germinale primordiale est transmise à l'ovocyte(297). Un autre mécanisme de protection, la sélection purificatrice, peut également agir sur l'ADN mitochondrial, la mitochondrie ou la cellule elle-même(298). Ces mécanismes pourraient limiter la propagation de mutations délétères de l'ADNmt dans les lignages maternels.

L'ADN mitochondrial est également connu pour avoir un taux de mutation acquis plus élevé que l'ADN nucléaire ce qui est dû à de multiples facteurs (280):

- La présence de systèmes de réparation de l'ADNmt moins développés et moins performants que ceux de l'ADN nucléaire.
- L'absence d'histones protectrices.
- La proximité du génome mitochondrial à la membrane mitochondriale interne où les ROS sont régulièrement générés. Les ROS pourraient en effet provoquer des lésions oxydatives de bases nucléotidiques et provoquer ainsi des mutations somatiques. Ces mutations entraîneraient ensuite une altération de la fonction de la chaîne respiratoire, et par voie de conséquence, une production accrue de ROS et l'accumulation subséquente d'autres mutations(299).

Plusieurs études ont démontré que l'acquisition de ces mutations au cours de la vie peuvent être associées au vieillissement, aux maladies dégénératives et à la tumorigenèse(282, 291, 298, 300, 301). Ainsi, plusieurs aberrations du génome mitochondrial ont été signalées dans les tumeurs solides du sein, du côlon, de l'estomac, du foie, du rein, de la vessie, de la tête/cou et du poumon(302).

#### **iv. L'ADN mitochondrial circulant**

Comme l'ADN nucléaire, l'ADNmt peut être libéré dans la circulation sanguine et détecté sous forme d'ADNmt circulant (ADNcirM) dans le plasma(303). Ce phénomène a été signalé pour la première fois dans une étude démontrant la présence d'une substitution connue A - G dans le gène mitochondrial tRNA Leu(UUR) (mt3243) dans le plasma et le sérum des patients atteints de diabète sucré de type 2 (304).

##### **i. L'ADN mitochondrial circulant en oncologie**

Quoi qu'il en soit, dans certaines pathologies y compris le cancer, il est intéressant de noter que le niveau de l'ADN circulant d'origine mitochondriale et ses caractéristiques ne sont pas toujours corrélés à ceux d'origine nucléaire. Son étude devrait donc apporter des informations physiopathologiques uniques(305, 306).

Cependant, les études actuelles concernant l'ADN circulant d'origine mitochondriale montrent des résultats très variables et par conséquent encore peu exploitables en clinique et surtout en oncologie. Plusieurs travaux ont signalé un taux significativement plus élevé de cet ADNcir chez des patientes atteintes de cancer du sein(307), gastrique(308), testiculaire(309), urologique(310) et de la tête et du cou(311), que des individus sains ou ayant des lésions bénignes. En revanche, d'autres études ont indiqué une diminution de la quantité d'ADNmt dans le sang de patients atteints du Sarcome d'Ewing(312), ou de cancer colorectal métastatique(313) par rapport à celui de patients sains.

D'autre part, Mehra *et al.* révèlent dans leur étude qu'un taux plasmatique élevé d'ADNmt est associé à une diminution de la survie dans le cancer de prostate(305). Des résultats similaires ont été publiés par Chen *et al.* pour des cancers du poumons à un stade avancé(314).

Par ailleurs, une étude de Xia *et al.* indique que la concentration en ADNmt, dans le sang de patientes atteintes d'un cancer du sein, est significativement plus faible au stade I qu'à des stades plus avancés(315). En revanche, une étude visant à déterminer les changements dans les concentrations plasmatique d'ADNmt avant et après le traitement par l'erlotinib chez des patients présentant un adénocarcinome du poumon, ne montre aucune corrélation,



suggérant ainsi un faible potentiel clinique de l'analyse de l'ADN mitochondrial circulant chez les patients atteints de cancer du poumon(316). De manière intéressante, Ellinger *et al.* ont observé une augmentation significative des fragments courts d'ADNmt (79 bp) chez les patients présentant une progression du taux de PSA (prostate-specific antigen) à la suite d'une prostatectomie radicale(317).

Bien que contradictoires pour certaines, toutes ces études suggèrent cependant une valeur potentielle de l'ADN circulant mitochondrial comme marqueur de diagnostic, pronostic et suivi du cancer.

## **ii. Origine de l'ADN mitochondrial circulant**

La sécrétion de l'ADN mitochondrial dans le milieu extracellulaire peut être médiée par les différents mécanismes de relargage décrits dans la partie II. Ces mécanismes, y compris la mort cellulaire et la sécrétion active, peuvent en effet permettre une libération d'ADN mitochondrial circulant.

Dans un premier temps, l'ADN mitochondrial peut être libéré de l'organelle, dans le cytoplasme. Une perte d'intégrité de la membrane externe mitochondriale et une ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPT) de la membrane mitochondriale interne sont des caractéristiques de la mort cellulaire(318), en particulier l'apoptose, qui peuvent entraîner la fuite de l'ADN mitochondrial dans le cytosol. Un défaut dans l'autophagie ou la mitophagie, un mécanisme de control de qualité qui élimine les mitochondries défectueuses ou qui régule leur nombre(319), peut également aboutir à la translocation cytosolique de l'ADN mitochondrial(320).

Dans le milieu extracellulaire, une clairance incomplète des cellules apoptotiques peut aboutir à la libération d'ADN mitochondrial dans la circulation. De même, il a été démontré que les cellules endommagées, suite à un traumatisme ou une infection, peuvent entrer en nécrose(321), et relarguer massivement des composants intracellulaires, y compris des molécules d'ADN mitochondrial. En plus de cette libération non sélective consécutive à une mort cellulaire non contrôlée, plusieurs études ont suggéré la nécroptose comme mécanisme de libération des composants mitochondriaux(322) y compris de mitochondries intactes(323),

qui peuvent agir comme de véritables signaux de danger en déclenchant une réponse inflammatoire.

Concernant la sécrétion active, des travaux ont montré que les plaquettes, lorsqu'elles sont activées, libèrent des mitochondries respirantes intactes ou même encapsulées dans des microparticules, qui serviront comme substrat du sPLA2-IIA (Phospholipase A2 sécrétoire du groupe II) favorisant ainsi l'inflammation(324). Comme mentionné dans la partie II.i.c., les neutrophiles et les éosinophiles(57, 66), relarguent par un processus actif, des pièges extracellulaires d'origine mitochondriale, capables de se lier aux bactéries et de les tuer. De plus, Ingelsson *et al.*, ont montré que, lors d'un traitement par des oligodésoxynucléotides CpG et non-CpG, les lymphocytes (cellules B, cellules T, cellules NK), les monocytes et les neutrophiles libèrent activement et indépendamment de la mort cellulaire, de l'ADN mitochondrial sous forme de longs filaments élastiques appelés web, non associés avec des protéines anti-pathogéniques, mais qui agissent comme des messagers anti-viraux(325).

Enfin, la présence d'ADN mitochondriale a été observée dans les vésicules extracellulaires. Une étude de Sansone *et al.* a ainsi mis en évidence la présence du génome mitochondrial total dans les exosomes et un rôle potentiel dans le transfert horizontal induisant une résistance au traitement en oncologie(128).

Cependant, une étude plus ancienne de Chiu *et al.*, basée sur des approches de filtrations et de centrifugations, indique que l'ADN mitochondrial dans le plasma pourrait également se trouver sous forme d'ADN libre ou associé à des particules, probablement des fragments de la membrane interne et externe des mitochondries(303).

### **iii. Profil de taille de l'ADN mitochondrial circulant**

Etant donné l'absence d'histones protectrices sur l'ADN mitochondrial, il a été suggéré que l'ADN mitochondrial circulant serait plus fragmenté que l'ADN d'origine nucléaire. Plusieurs études ont confirmé cette hypothèse, en évaluant la taille de l'ADN circulant de 40 à 300 pb(215). L'étude d'Ellinger *et al.*(309), sur le cancer de cellules germinales testiculaires, a montré un taux plus élevé d'ADN circulant mitochondrial (79 pb et 220 bp) chez les patients cancéreux que chez les individus sains. En ciblant des fragments de petite taille (79 pb), l'information diagnostique (l'analyse de la courbe caractéristique de l'opérateur récepteur

(ROC) était relativement plus élevée que celle obtenue en ciblant des fragments plus longs de 220 pb, suggérant ainsi un intérêt diagnostique de la détection des fragments courts d'ADNmt.

Quelques années plus tard, l'équipe de Lo a utilisé le séquençage de nouvelle génération, pour démontrer que le pic caractéristique de l'ADN d'origine nucléaire à 166 pb, n'était pas observable pour l'ADN mitochondrial dans le plasma(326). De même, la distribution de taille globale de cet ADN mitochondrial était plus courte que celle de l'ADN nucléaire (140 pb). En fait, cette technique utilisée pour la détermination du profilage de taille de l'ADN est limitée par le taux de récupération des fragments courts inférieurs à 100 pb. Pour pallier à ces limitations, les travaux de *Zhang et al.*(327), ont optimisé les protocoles d'isolement et de préparation des librairies de séquençage pour conserver les fragments courts d'ADN. Ils ont ainsi observé que la longueur moyenne de l'ADN circulant d'origine mitochondrial est beaucoup plus faible que celle initialement définie, avec un pic à 42 pb. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de *Burnham et al.*(328), qui ont observé des fragments d'ADNmt de 40 à 60 pb dans le plasma du receveur ayant subi une transplantation pulmonaire.

Toutefois, une étude publiée en 2018, a mis en évidence la présence du génome mitochondrial complet dans le plasma des individus sains, suggérant que la nature circulaire de cet ADN retarde sa dégradation par les nucléases circulantes(329).

#### **iv. Origine tissulaire de l'ADN mitochondrial circulant**

Alors qu'il est clairement établi que l'ADN d'origine nucléaire provient de différents types de cellules et de tissus, mais dont la majorité concerne les cellules hématopoïétiques dans des conditions physiologiques, rares sont les études menées pour préciser l'origine cellulaire ou tissulaire de l'ADN mitochondrial circulant. Pourtant, l'ADN mitochondrial peut varier d'une cellule à l'autre et d'un tissu à l'autre chez un même individu(330). De fait, la distribution de cette hétéroplasmie dans l'ADN circulant mitochondrial pourrait renseigner sur les origines tissulaires. En se basant sur ce postulat, l'étude de *Zhang et al.*(327), a mis en évidence une hétérogénéité des tissus contribuant à l'ADN mitochondrial circulant chez 3 individus. Les auteurs ont en effet observé, à des sites hétéroplasmiques, des différences de fréquences alléliques mineures, entre le plasma et les leucocytes, ce qui indique une origine tissulaire mixte de l'ADNmt.

L'ensemble de ces observations suggère donc qu'il devrait être possible de caractériser l'hétérogénéité d'origine de l'ADNmt circulant y compris dans des conditions pathologiques.

#### **v. Les aspects fonctionnels de l'ADN circulant d'origine mitochondriale**

Comme l'ADN circulant nucléaire, plusieurs observations indiquent que l'ADN circulant mitochondrial peut jouer un rôle fonctionnel dans les cellules receveuses :

Dans le cas du transfert horizontal, l'étude de Sansone *et al.*(128) a montré que l'ADN mitochondrial présent dans les vésicules extracellulaires peut être transféré aux cellules dont le métabolisme est endommagé et peut ainsi restaurer leur activité métabolique. Par ailleurs, dans le cancer du sein dépendant d'OXPHOS (Phosphorylation oxydative), ces auteurs ont observé que cet ADN peut également se comporter comme un signal oncogénique favorisant la sortie de la dormance des cellules souches et induire ainsi une résistance au traitement endocrinien et une progression métastatique(128).

Dans le cas de l'inflammation, l'ADN mitochondrial présente, comme indiqué dans la partie (V.i.), des signatures moléculaires et structurales similaires à celles de l'ADN bactérien (structure circulaire avec des îlots CpG déméthylés). Lors de sa libération dans le milieu extracellulaire, cet ADN, considéré comme DAMPs, pourrait déclencher une réponse inflammatoire. En effet, les travaux de Zhang *et al.*(331), ont montré que l'ADN mitochondrial relargué par des tissus endommagés, est capable d'activer des neutrophiles en se liant au TLR9 et d'induire un phénotype inflammatoire via la voie MAPK p38. Ces résultats ont été observés dans d'autres conditions, notamment lors d'un dysfonctionnement vasculaire chez des rats spontanément hypertendus(332).

Parallèlement à ces observations, plusieurs études montrent que les mitochondries entières ont la capacité de se transférer d'une cellule à une autre :

En effet, l'origine non eucaryote de ces organites provenant des bactéries libres qui se sont incorporées à une cellule archéale(333) par endocytose pourrait faciliter leur capacité à se transférer d'une cellule à une autre(334, 335).

Jusqu'à présent, plusieurs études ont montré un transfert naturel des mitochondries dans différents types cellulaires *in vitro* et *in vivo*(336–338). La majorité des travaux indique que le transport intercellulaire des mitochondries est une composante importante dans la

communication intercellulaire nécessaire au développement et au maintien de l'homéostasie chez les organismes multicellulaires tout en induisant différentes réponses cellulaires depuis le sauvetage cellulaire (337, 339, 340) jusqu'à la promotion de l'inflammation(338, 341). Ces travaux démontrent également que les mitochondries peuvent se transférer d'une cellule à une autre par des structures intercellulaires telles que les nanotubes à effet tunnel (TNT) et des organites cellulaires sécrétés, comme les microvésicules(342).

Inspirés par l'origine symbiotique des mitochondries et par la capacité de la cellule à transférer ces organites à des voisins endommagés, de nombreux chercheurs ont élaboré des procédures permettant d'imiter le transfert naturel et de stimuler un transfert artificiel des mitochondries d'une cellule à une autre.

La co-incubation a été la première approche proposée par Clark et Shay en 1982(343), dans laquelle la résistance aux antibiotiques chloramphénicol (CAP) et éfrapeptine (EF) contenue dans l'ADN des mitochondries purifiées a été transférée à des cellules sensibles par endocytose. Les cellules résultantes, sont résistantes de façon stable aux antibiotiques(343). Les observations de Clark et Shay concernant le mécanisme de transfert mitochondrial ont ouvert la voie à de nouvelles avancées dans ce domaine.

Quelques années plus tard, King et Attardi ont mis au point une technique de transfert artificiel utilisant la micro-injection (344, 345); ils ont injecté des mitochondries exogènes isolées de cellules résistantes à la CAP dans des cellules humaines sensibles à cet antibiotique et partiellement déplétées en ADN mitochondrial par un traitement au bromure d'éthidium(344). Cette étude a démontré que l'injection d'une seule mitochondrie peut très rapidement repeupler une cellule appauvrie en ses mitochondries endogènes en seulement six à dix semaines(344).

D'autres techniques permettant de transférer directement et quantitativement des mitochondries isolées à partir d'un type cellulaire vers un autre type cellulaire ont depuis été mises au point(334). C'est par exemple le cas du protocole MitoCeption qui consiste à ajouter deux étapes supplémentaires à la procédure de Co-incubation : une centrifugation et un choc thermique(346). Le transfert d'une quantité infime de mitochondries de cellules souches/stromales mésenchymateuses (CSM) vers des cellules cancéreuses (OXPHOS) par

MitoCeption se traduit par exemple par une augmentation de l'activité de phosphorylation oxydative qui favorise la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses(346).

# Objectifs de la thèse

L'analyse de l'ADN circulant représente évidemment une avancée en clinique, en particulier pour le diagnostic, la médecine prédictive, préventive et personnalisée. Cependant, malgré toute l'attention portée par les chercheurs et les cliniciens à ce nouveau biomarqueur, et malgré les nombreux travaux réalisés au cours des vingt dernières années, l'analyse de l'ADN circulant n'a pas encore été mis en pratique dans bien des domaines cliniques et son utilisation est encore loin d'être routinière.

Ceci peut s'expliquer par :

- **Un manque de connaissance de l'origine et la structure de l'ADN circulant.**
- **Un biais relatif à une variabilité des paramètres démographiques**
- Un biais relatif à la sélection de groupes de patients non homogènes.
- Un biais pré-analytique et analytique de traitement des échantillons dû à l'absence de procédures standardisés.

De fait, il est essentiel d'harmoniser les paramètres d'analyse afin d'optimiser la valeur diagnostique de ce nouveau biomarqueur potentiel.

## Objectif principal

Malgré l'identification de certaines structures, les propriétés structurales de l'ADN circulant ne sont pas clairement définies, en particulier celles de l'ADN mitochondrial. De plus, alors que de nombreuses études ont été consacrées à l'ADN nucléaire, l'ADN circulant d'origine mitochondrial est beaucoup moins bien décrit. Or, ces deux types d'ADN circulant présentent des structures de stabilisation différentes qui pourraient révéler des caractéristiques particulières. Dans ce contexte, l'objectif principal de ma thèse a été d'identifier et de caractériser la (ou les) structure(s) de l'ADN circulant d'origine mitochondriale.

## Autres contributions

J'ai également contribué à d'autres travaux :

- Une étude visant à identifier et à mieux contrôler différents facteurs de variabilité interindividuels pouvant conduire à des erreurs d'interprétation, tels que l'âge et le sexe.
- Une étude destinée à analyser l'influence de l'hypoxie sur le relargage d'ADN extracellulaire *in vitro* et *in vivo*.
- Une étude destinée à évaluer le potentiel de l'analyse de l'ADN circulant dans le dépistage et la détection précoce du cancer. Les résultats ne sont pas présentés dans ce manuscrit.
- L'organisation du congrès du CNAPS (Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum) qui a eu lieu à Montpellier du 20 au 22 septembre 2017, et la rédaction d'une revue répertoriant les travaux initiaux ou non-publiés présentés lors de ce congrès.



# Résultats

## Etude de la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondrial

### I. Rationnel scientifique

Malgré l'avenir prometteur de l'ADN circulant en clinique, les connaissances concernant son origine, sa composition et sa fonction sont encore très limitées. Comme déjà mentionné dans la partie introduction, certaines formes de l'ADN circulant ont été identifiées et décrites dans la littérature mais ces données concernent essentiellement l'ADN d'origine nucléaire. En revanche, la structure de l'ADN circulant d'origine mitochondrial est encore inconnue. On s'attend pourtant à des différences très importantes entre ADN nucléaire et ADN mitochondrial circulants, compte tenu de la forme circulaire du génome mitochondrial, de l'absence d'histones protectrices et donc d'une sensibilité vis à vis de la dégradation potentiellement plus forte que celle de l'ADN nucléaire. Cependant, nous avons récemment estimé que 50,000 fois plus de copies de génome mitochondrial que de génome nucléaire sont présentes dans le plasma d'individus sains et nous avons démontré que l'ADN circulant mitochondrial est suffisamment stable pour être détecté et quantifié. Ces observations suggéraient donc la présence de structures stables capables de protéger efficacement ces molécules d'ADN mitochondrial.

L'objectif principal de ma thèse a donc été d'identifier et de caractériser ces structures.

## II. Résumé

Bien que les mitochondries soient considérées comme les unités génératrices d'énergie de la cellule compte tenu de leur rôle clé dans le métabolisme énergétique et la signalisation cellulaire, des composants mitochondriaux peuvent se retrouver dans l'espace extracellulaire, sous forme libre ou encapsulés dans des vésicules. Récemment, Des mitochondries intactes ont même été signalées comme étant libérées par les plaquettes mais ceci, exclusivement dans des conditions très particulières. Mon travail de thèse démontre que le plasma extrait du sang des patients sains dont les plaquettes ont été inactivées, contient non seulement des mitochondries entières et que ces mitochondries sont fonctionnelles. De plus, nous montrons que les cellules normales immortalisées et les cellules tumorales en culture sont capables de sécréter leurs mitochondries. Grâce à une approche expérimentale basée sur une série de centrifugations différentielles et/ou de filtrations suivie d'une analyse par PCR nous avons détecté, dans le milieu extracellulaire, la présence du génome mitochondrial entier dans des particules d'une taille supérieure à 0,2  $\mu\text{m}$  et contenant des protéines spécifiques des membranes mitochondriales internes et externes. Nous identifions ces particules comme étant des mitochondries intactes grâce à la cytométrie en flux, la microscopie à fluorescence et la microscopie électronique. L'analyse de la consommation d'oxygène a, de plus, révélé que ces mitochondries sont capables de respirer ce qui indique une préservation de leurs propriétés fonctionnelles. Ces travaux démontrent donc pour la première fois, dans des conditions physiologiques, la présence de mitochondries circulantes et compétentes sur le plan respiratoire. Etant donné le rôle potentiel des mitochondries dans les mécanismes de communication intercellulaire et les processus inflammatoires, nos observations suggèrent que ces organelles circulantes pourraient jouer un rôle essentiel dans le maintien de

l'homéostasie et dans la pathologie, ce qui pourrait ouvrir la voie à de nouvelles perspectives de prise en charge des patients.

### III. Matériels et Méthodes :

#### **Isolement du plasma :**

Les échantillons de sang prélevés à partir d'individus sains ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang (E.F.S) de Montpellier, France (Convention EFS-PM N° 21PLER2015-0013). Ces échantillons ont été traités directement, dans un délai de deux heures maximum après prélèvement.

Des échantillons de sang de patients atteints de cancer colorectal métastatique (mCRC) (n=50) proviennent d'une étude clinique visant à comparer la détection des mutations KRAS exon 2 et BRAF V600E par analyse de l'ADN circulant à la détection conventionnelle par analyse des tissus tumoraux (biopsie solide). Ces échantillons de sang ont été traités dans un délai de 4 heures après prélèvement.

Le plasma a été extrait selon divers protocoles, en fonction des expériences.

#### Pour les individus sains :

##### *- Isolement du plasma par Ficoll :*

Du sang frais a été recueilli dans des tubes EDTA. Le plasma a été isolé par centrifugation à gradient de densité Ficoll à 400g pendant 30 minutes à 18°C (Ficoll® paque plus GE Healthcare, Fisher Scientific, Illkirch, France).

##### *- Isolement du plasma par centrifugation :*

Du sang frais a été recueilli dans des tubes EDTA. Le plasma a été isolé par une seule centrifugation à 1,200g pendant 10 minutes à 4°C.

##### *- Isolement du plasma sans activation des plaquettes :*

Du sang frais a été prélevé dans un BD Vacutainer™ Tubes CTAD (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Le plasma a été isolé par des centrifugations différentielles, toutes effectuées pendant 10 minutes à température ambiante sans frein : deux centrifugations successives à 200 g, puis une troisième à 300 g. Un tampon ACD-A préchauffé (37°C) (0.1M de citrate trisodique, 0.11M de glucose et 0.08M d'acide citrique) et de Prostaglandine E1 (1µM) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier Cedex) ont ensuite été ajoutés au plasma, qui a alors été centrifugé à 1,100g et finalement à 2,500g.

#### Pour les patients mCRC :

Le sang a été recueilli dans des tubes EDTA et le plasma a été isolé par une seule centrifugation à 1,200 g pendant 10 minutes à 4°C.

### **Lignées cellulaires :**

Les lignées de cellules cancéreuses du côlon humain (DLD-1/SW620) ont été obtenues auprès de l'ATCC (« the American type culture collection ») et une lignée cellulaire immortalisée normale (CCD-18Co) a été obtenue auprès du laboratoire d'Andrei Turtoi (IRCM, Montpellier, France). Les cellules SW620 et CCD-18Co ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 et les cellules DLD-1 dans du milieu DMEM (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France), tous deux complétés en 10% de sérum de veau foetal (Eurobio, les Ulis, France) et 1X streptomycin/penicillin (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France). Les cellules ont toutes été cultivées à 37°C dans une atmosphère de CO<sub>2</sub> à 5%.

1,5 million de cellules ont étéensemencées dans un flacon T-75 avec 10 ml de milieu approprié. Les cellules ont été incubées pendant 24h ou 60h. Pour la condition « 60h », les milieux de culture ont été remplacés par du milieu frais dans les 24 heures précédant les expériences. Les surnageant de milieu culture ont été centrifugés à 600 g pendant 10 minutes à 4°C, afin de précipiter à la fois les cellules non adhérentes et les débris cellulaires, et ont été traités par divers protocoles, en fonction des expériences.

### **Quantification de l'ADN circulant d'origine nucléaire et mitochondrial chez les individus sains et les patients atteints de cancer :**

Le NcfDNA et le McfDNA, chez des individus sains (figure 1A-C) et chez des patients atteints de mCRC (figure S 1A-B), ont été quantifiés à partir du plasma obtenu après la première étape de centrifugation à 1,200 g pendant 10 minutes à 4°C et une seconde étape de centrifugation à 16,000 g pendant 10 minutes à 4°C. Après cette centrifugation, l'ADN circulant total a été extrait du surnageant et analysé par q-PCR.

### **Étude cinétique de la stabilité de l'ADN extracellulaire :**

Le milieu de culture des cellules SW620 a été prélevé, centrifugé à 1,200 g, puis à 16,000 g pendant 10 minutes à 4 °C, puis incubé à 37 °C dans 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 4 jours. Un aliquot de milieu de culture cellulaire a été prélevé chaque jour pour l'extraction de l'ADN. Le NcfDNA et le McfDNA ont été quantifiés par q-PCR à l'aide d'amorces spécifiques ((KRAS F2 et KRAS R1 pour NcfDNA, MIT MT-CO3 F et MIT MT-CO3 R2 pour McfDNA) (tableau S 2).

### **Extraction de l'ADN extracellulaire :**

L'ADN extracellulaire a été extrait à l'aide du kit « Qiagen Blood Mini Kit » (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant, excepté le fait que l'extraction a été réalisée à partir de 1 mL de plasma chargé séquentiellement sur une seule et même colonne et que l'ADN a été élué avec 130 µL de tampon d'éluion. L'extrait d'ADN a été conservé à -20°C pour les analyses ultérieures. Les cycles de congélation/décongélation ont été évités afin de réduire la fragmentation de l'ADN.

### **Analyse Q-PCR :**

L'ADN extracellulaire a été quantifié par q-PCR selon une conception innovante d'amplicons courts (60-100 bp ± 10bp) et longs (300bp ± 10bp) ciblant les séquences sauvages de gènes spécifiques : le gène nucléaire KRAS et le gène mitochondrial Cytochrome oxydase III, MT-CO3 (Tableau S 1). La quantification des amplicons courts et longs fournit une estimation des concentrations d'ADN extracellulaire total d'origine nucléaire (NcfDNA) et mitochondrial (McfDNA) respectivement. Les amplifications par q-PCR ont été réalisées en *triplicats* dans un volume réactionnel final de 25µL et contrôlées par le logiciel CFX manager d'un système de détection par PCR en temps réel (Bio-Rad) CFX96 touch™. Chaque mélange réactionnel de PCR était composé de 12.5µL de SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), 2.5µL d'eau (nuclease free de Qiagen), 2.5µL d'amorces sens et 2.5µL anti-sens (3 pmol/µL) et 5µL d'échantillon. Les conditions de cycles thermiques étaient les suivantes : 95°C (3:00) + [95°C (0:10) + 60°C (0:30)] × 40 cycles. Les courbes de fusion ont été étudiées en augmentant la température de 60°C à 90°C avec une lecture tous les 0.2°C. Chaque q-PCR a été effectuée avec 1.8ng/µL d'ADN génomique extrait de la lignée cellulaire DiFi (ATCC) pour la courbe étalon et sans ADN comme control négatif. L'amplification Q-PCR a été validée par différenciation de la courbe de fusion.

### **Quantification de l'ADN et calcul du nombre de copies :**

**Quantification du NcfDNA :** un extrait d'ADN génomique de cellules colorectales humaines (de type KRAS sauvage) a été utilisé pour la gamme étalon du NcfDNA. La concentration et la pureté initiales de la solution d'ADN génomique ont été déterminées en mesurant la densité optique à  $\lambda=260$  nm, 230 nm et 280 nm, avec un BioPhotomètre Eppendorf® D30. La concentration initiale d'ADN génomique a été ajustée à 1,800 pg/µl pour le premier point de

dilution, selon la mesure de la densité optique à  $\lambda=260$  nm. Une courbe étalon de q-PCR a été obtenue avec 6 dilutions successives de la solution initiale (à 1,800, 180, 45, 20, 10 et 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La courbe standard a été utilisée pour déterminer la concentration de NcfDNA par millilitre de plasma et de surnageant du milieu de culture. Le nombre de copies de NcfDNA a été calculé grâce l'équation suivante :

$$Q_{nuclear} = \left( \frac{c}{3,3} \right) * \left( \frac{V_{elution}}{V_{plasma}} \right)$$

$Q_{nuclear}$  est le nombre de copies de NcfDNA par millilitre ; 'c' est la concentration massique d'ADN ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) déterminée par une q-PCR ciblant la séquence génique nucléaire du gène KRAS et 3,3pg est la masse du génome haploïde humain.  $V_{elution}$  est le volume d'élution de l'extrait d'ADN ( $\mu\text{l}$ ) et le  $V_{plasma}$  est le volume initial du plasma utilisé pour l'extraction (ml).

**Quantification du McfDNA :** un vecteur ORF humain de 3382 pb avec un insert MT-CO3 de 786 pb a été obtenu auprès d'ABM (numéro d'accès YP\_003024032) et utilisé pour la quantification de McfDNA.

Les tests sur les solutions de vecteurs, les ajustements de concentration de départ et les courbes étalons de q-PCR ont été effectués de la même manière que pour le NcfDNA.

La courbe standard a été utilisée pour déterminer la concentration de McfDNA par millilitre de plasma et de surnageant du milieu cellulaire. Le nombre de copies de McfDNA a été calculé grâce à l'équation suivante:

$$Q_{mito} = \left( \frac{c * N_A}{2 * MW * L_{vector}} \right) * \left( \frac{V_{elution}}{V_{plasma}} \right)$$

$Q_{mitochondrial}$  est le nombre de copies McfDNA par millilitre, 'c' est la concentration massique du McfDNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) déterminée par q-PCR ciblant la séquence génétique mitochondriale MT-CO3.  $N_A$  est le nombre d'Avogadro ( $6,02 * 10^{23}$  molécules par mole),  $L_{vector}$  est la longueur du plasmide (en nucléotides) et MW est le poids moléculaire d'un nucléotide ( $\text{g}/\text{mol}$ ) ;  $V_{elution}$  est le volume d'élution de l'extrait d'ADN ( $\mu\text{l}$ ) et  $V_{plasma}$  est le volume initial du plasma utilisé pour l'extraction (ml).

### **Calcul de l'indice d'intégrité de l'ADN :**

Le degré de fragmentation de l'ADN extracellulaire a été évalué en ciblant simultanément les séquences KRAS et MT-CO3 de chaque échantillon d'ADN plasmatique et en calculant l'indice d'intégrité de l'ADN (DII). Le DII a été déterminé en calculant le rapport de la concentration déterminée à l'aide du jeu d'amorces amplifiant une séquence longue (KRAS F2/R1 et MT-CO3 F/R2) sur la concentration déterminée à l'aide du jeu d'amorces amplifiant une séquence courte (KRAS F1/R1 et MT-CO3 F/R1) (tableau S 2).

### **Pourcentage de fragments de McfDNA courts et longs :**

L'ADN circulant a été extrait d'un pool de plasma de 80 individuels sains, avec le kit Maxwell RSC ccfDNA (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Afin d'obtenir un extrait d'ADN fortement concentré, les extraits ont été soumis à une seconde extraction selon la même méthode, suivie d'une extraction de l'ADN par le kit Qiamp DNA blood Mini Kit, dans un volume final de 30µL. Les échantillons ont ensuite été analysés sur gel d'agarose à 2% et les fractions d'ADN de fragments courts (<500 pb) et longs (>500 pb) ont été extraites du gel avec un kit d'extraction QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen). La quantité d'ADN mitochondrial a ensuite été évaluée par q-PCR à l'aide de des amorces spécifiques des mitochondries (MT-CO3 F/R1) (tableau S 2).

### **Bibliothèque de préparation pour le séquençage du génome entier :**

Des bibliothèques à simple brin doublement indexées ont été préparées à partir de 1-11 ng d'ADN humain en utilisant le TL137 comme oligo-linker. Afin de permettre un séquençage à partir de bibliothèques simple brin, des adaptateurs bicaténaires personnalisés, identiques à ceux utilisés dans la méthode monocaténaire, ont été générés par hybridation d'un oligo court SLP4. Les ligations ont été réalisées avec un kit « NEBNext Quick Ligation Module kit » (New England Biolabs) avec 0.04µM de chaque adaptateur hybridé dans un volume total de 50µl, incubé pendant 30min à 20°C. Les adaptateurs ont été rallongés en ajoutant 50µl de OneTaq 1x Master Mix (New England Biolabs) au mélange de ligation et en incubant pendant 20min à 60°C. Tous les oligos ont été synthétisés par Eurogentec (Kaneka Eurogentec, Seraing, Belgique). Les bibliothèques simple brins ont été quantifiées par qPCR, avec une fraction diluée, dans un LightCycler 2 (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Les échantillons ont ensuite été amplifiés à l'aide de la Taq polymérase et d'un nombre optimal de cycles pour



chaque échantillon afin d'éviter la phase de plateau, tel que calculé à partir du Ct du qPCR dilué. Les échantillons amplifiés ont ensuite été purifiés par deux séries de billes de Macherey-Nagel NGS à un volume de 1.3x, pour retenir des inserts plus courts, et ont été élués par 30µL d'EBT. Les bibliothèques purifiées ont ensuite été visualisées par bioanalyseur 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) et quantifiées par qPCR, Qubit 2 Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY) et Bioanalyzer 2100. Les bibliothèques ont ensuite été mélangées en quantités équimolaires et séquencées sur une plate-forme Illumina MiSeq à l'aide de deux kits MiSeq v3 150 (2x75), avec l'amorce de séquençage CL72 remplaçant la première amorce de séquençage en lecture.

### **Analyse des séquences :**

Les séquences d'adaptateurs ont été supprimées avec cutadapt 1.3 et les lectures ont été alignées sur la référence du génome humain (hg19) avec BWA aln en utilisant les paramètres par défaut et filtrées avec SAMtools 1.5. La suppression des doublons et la génération d'histogrammes ont été effectuées avec MarkDuplicates et CollectInsertSizeMetrics, respectivement, à partir des outils Picard 1.88.

### **Centrifugation différentielle et filtration différentielle du plasma et des milieux de culture cellulaire :**

Le schéma et les détails sont présentés dans la figure S 5.

### **Isolement des mitochondries intracellulaires :**

Des mitochondries de cellules cultivées ont été isolées et utilisées en tant que contrôles positifs. Les cellules ont été grattées, lavées par du PBS et centrifugées à 1,300 rpm pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 1 mL de MIB (0,2 M de saccharose, 0,01 M de tris, 0,001 M d'EGTA, 1X d'inhibiteur de protéase) et lysées en douceur avec un homogénéisateur IKA T18 Basic Dispers (Ultraturrax) à vitesse 2 pendant 10 s jusqu'à obtenir 80 à 90 % de noyaux intacts. Les cellules lysées ont ensuite été centrifugées à 600 g à 4°C pendant 10 minutes pour éliminer les débris et les noyaux cellulaires, afin de récupérer le surnageant contenant à la fois du cytoplasme et des mitochondries. Le culot de noyaux intacts a été lavé deux fois dans 1 ml de MIB puis re-centrifugé à 600 g pendant 10 minutes à 4°C, pour être utilisé comme témoin négatif dans les

expériences de cytométrie de flux, tandis que les surnageants résultants étaient mélangés avec les précédents surnageants pour en isoler les mitochondries. Dans ce but, les 3ml de surnageant ont été centrifugés à 600g à 4°C pendant 10 min pour éliminer les éventuels noyaux contaminants et les débris cellulaires. Le surnageant ainsi obtenu a ensuite été centrifugé à 8,000 g pendant 10 minutes à 4 °C, pour sédimenter les mitochondries. Le surnageant a été centrifugé de nouveau à 8,000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les culots issus de cette dernière centrifugation ont été mélangés, remis en suspension en douceur dans 500 uL de MIB, transférées dans des tubes de 1,5 mL et centrifugées de nouveau à 8,000 g pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant final a été soigneusement jeté pour recueillir les mitochondries contenues dans le culot.

#### **Isolement des mitochondries extracellulaires :**

Les mitochondries présentes dans le plasma extrait par gradient de Ficoll ont été isolées par centrifugation séquentielle à 400g, 1,200g et 2,000g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer toute cellule sanguine ou plaquettes contaminantes. Le surnageant ainsi obtenu a été centrifugé à 16,000 g pour recueillir le culot de mitochondries extracellulaires.

Les mitochondries dans le plasma obtenu sans activation des plaquettes ont été sédimentées par centrifugation en une seule étape à 16,000 g pendant 10 minutes à 4°C, après la série de centrifugation (2 fois à 200 g, à 300, puis à 1,100g et finalement à 2,500g.

Les mitochondries dans le surnageant du milieu cellulaire ont été isolées par centrifugation séquentielle à 600 g et 1,200 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer toute cellule contaminante. Le culot de mitochondries extracellulaires a été isolé avec une centrifugation ultérieure à 16,000g.

Il est à noter que le culot des mitochondries extracellulaires a également été récupéré par une centrifugation à 8,000 g au lieu de 16,000 g pour protéger la membrane mitochondriale.

#### **Amplification du génome mitochondrial :**

L'ADN du milieu de culture et de deux pools de plasma différents (un pool de 54 ml et un pool de 45 ml) (sans activation plaquettaire), extrait du culot à 8,000g (40 flasks T-75/lignée cellulaire), a été sélectivement amplifié avec le kit d'ADN mitochondrial Repli g (Qiagen), selon les recommandations du fabricant. Le génome mitochondrial amplifié a ensuite été amplifié par PCR (long range) dans un volume total de 50µL avec un Mastercycler® nexus eco thermal

cycler (Eppendorf). Chaque mélange réactionnel PCR était composé de 30,5µL d'eau nuclease free (Qiagen), 5µL de 10× LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> plus), 8µL de dNTPs (2,5mM chacun), 5µL d'amorces mixtes sens et anti-sens (10µM chacun), 1µL d'échantillon (masse ADN entre 10 et 100ng calculée avec un kit Qubit) et 0,5µL de TAKARA LA Taq (5 U/µl) (Ozyme, Saint-Quentin Yvelines, France). Les conditions de cycle thermique étaient les suivantes : 95 °C (2:00) + [95 °C (0:15) + 68 °C (10:00)] × 30 cycles + 68 °C (20:00) + 4 °C (∞). PCR amplifications ont été réalisés avec cinq paires d'amorces chevauchantes. (Mito1/Mito1/Mito2/Mito3/hmt1/hmt1/mt2) (Integrated DNA Technologies, Louvain, Belgique). Tous les produits amplifiés par PCR ont été chargés sur un gel d'agarose à 0,8% pour vérifier la taille des amplicons par rapport à l'échelle 1Kb plus ADN (Thermo Fischer).

### **Marquage des mitochondries :**

Les culots à 16,000 g provenant à la fois du plasma sans activation des plaquettes (pool de 36 ml de sang) et du milieu cellulaire (2 flasks T-75/ lignée cellulaire) ont été marqués avec 200nM MitoTracker® Green FM (Thermofisher) pendant 45 min, lavés deux fois avec du PBS 1X et remis en suspension dans 10µl de PBS pour visualisation au microscope ApoTome (caméra ZEISS Axio 2). Les images ont été éditées avec le logiciel ZEN. En parallèle, des culots de milieu de culture cellulaire (8 flasks de T-75/lignée cellulaire), des culots de plasma isolés par Ficoll et des culots (contrôles positifs et négatifs) ont été remis en suspension dans 150 µl de PBS et analysés par cytométrie en flux Gallios (Beckman Coulter). Des mitochondries isolées à partir de cellules en culture ont été utilisées comme control positif de la spécificité du MitoTracker® et pour délimiter à la fois le « gating » et ajuster les voltages appropriés pour la cytométrie en flux. Toutes les évènements ont été recueillis selon la taille (FSC) et la granularité (SSC) en mode logarithmique. Les voltages ont été ajustés pour tenir compte des particules submicroniques et le débit a été réglé sur " faible ". Les doublets ont été exclus en traçant la zone FSC-A par rapport à la zone FSC-H, toutes deux en mode logarithmique. Les évènements rassemblés dans le « gating » nouvellement créé ont été considérés comme singulets. Suite à la confirmation que tous les évènements enregistrés dans le « gating » de ce point de contrôle étaient marqués positivement par le MitoTracker, ce « gating » a été appliqué à tous les échantillons. Des histogrammes ont été créés pour les échantillons marqués et non marqués. Les résultats ont été analysés avec le logiciel d'analyse Kaluza 1.5.

**Western Blot :**

Les culots à 8,000 g obtenus à partir du plasma (pool de 45ml) et du surnageant de milieu cellulaire (100 flasks t-75/ligne cellulaire) ont été remis en suspension dans 50µl de tampon Laemli 1X, migrées sur un gel Acrylamide/Bis-Acrylamide à 12% et transférés sur membranes de nitrocellulose (GE Healthcare). Les membranes ont été bloquées dans du lait à 10 % dans 1X PBS-tween pendant 1h, puis incubées soit avec 1/500 d'anticorps primaire murin anti-TOM22 (Sigma, St. Quentin Fallavier Cedex) soit avec 1/1,000 d'anticorps primaire murin anti-TOM23 (BD Transduction Laboratoire, France) sur la nuit à 4°C, et enfin avec 1/10,000 d'anticorps secondaires de lapin anti-souris (Merck, Île-de-France, France) pendant 1h à température ambiante. Les « immunoblots » ont été visualisés par ECL (Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France).

**Microscopie électronique :**

Les culots de 8,000 g obtenus à partir de de milieu de culture (30 flasks T-75/ligne cellulaire) ou de plasma préparé sans activation des plaquettes (pool de 45 ml) ont été incubés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon PHEM (1X, pH 7,4) toute une nuit à 4°C, lavés dans PHEM puis fixés dans 0,5% d'acide osmic 2h dans l'obscurité à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été lavés deux fois dans un tampon PHEM, déshydratés dans des solutions de 30 à 100 % d'éthanol et finalement inclus dans EmBed 812 à l'aide d'un processeur automatique pour microscopie électronique à micro-ondes (Leica EM AMW). Des sections de 70 nm (Leica-Reichert Ultracut E), prélevées à différents niveaux de chaque bloc, ont été contre-colorées, avec 1,5% d'acétate d'uranyle dans 70% d'éthanol et de citrate de plomb, et observées avec un microscope électronique à transmission Tecnai F20 à 200KV.

**Activité métabolique :**

La fonction bioénergétique mitochondriale a été étudiée par mesure du taux de consommation d'oxygène OCR, avec un analyseur de flux extracellulaire Seahorse XF-96 (Agilent). Nous avons effectué le test de flux d'électrons qui permet l'évaluation fonctionnelle de complexes mitochondriaux sélectionnés ensemble dans la même période. Après isolement, 64 µg de mitochondries de cellules DLD-1 fraîchement isolées (control positif) et 128 µg de culots de surnageant de DLD-1 et de mélange de plasma préparé sans activation plaquettaire

ont été déposés dans chaque puits dans un volume de 25  $\mu\text{L}$  contenant MAS 1X (70 mM saccharose, 220 mM mannitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM HEPES, 1 mM EGTA et 0.2 % de BSA sans acide gras, pH 7,2) complété avec 10 mM de pyruvate, 2 mM de malate et 4  $\mu\text{M}$  de FCCP. A noter que le pyruvate et le malate stimulent la respiration par l'intermédiaire du complexe I et la FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone) découple la fonction mitochondriale. La plaque XF a ensuite été centrifugée pendant 20 minutes à 2,000 g à 4°C. Après centrifugation, 155  $\mu\text{L}$  de substrat de flux d'électrons contenant 1xMAS ont été ajoutés à chaque puits, et la plaque a été chauffée dans un incubateur sans  $\text{CO}_2$  à 37°C pendant 5-10 minutes. Des réactifs 10 fois plus concentrés ont été chargés dans les pores de la cartouche, à l'aide de la plaque "d'aide au chargement" : pore A, 50  $\mu\text{L}$  de 20  $\mu\text{M}$  de roténone, un inhibiteur du complexe I (2  $\mu\text{M}$  final) ; pore B, 55  $\mu\text{L}$  de 100 mM de succinate, un activateur du complexe II (10 mM final) ; pore C, 60  $\mu\text{L}$  de 40  $\mu\text{M}$  d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III (4  $\mu\text{M}$  final) ; pore D, 65  $\mu\text{L}$  de 100 mM d'ascorbate plus 1 mM de TMPD, activateur du complexe IV (10 mM et 100  $\mu\text{M}$  final respectivement). Après étalonnage de la cartouche par la machine XF, la plaque XF a été introduite et le dosage a continué en utilisant le protocole d'Agilent adapté aux mitochondries isolées.

#### **Analyse statistique :**

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel GraphPad Prism (version 7.01). Une probabilité de  $\leq 0,05$  a été jugée statistiquement significative par le test t de Student : \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

# Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria

Zahra Al Amir Dache<sup>1</sup> | Amaëlle Otandault<sup>1</sup> | Rita Tanos<sup>1</sup> | Brice Pastor<sup>1</sup> | Romain Meddeb<sup>1</sup> | Cynthia Sanchez<sup>1</sup> | Giuseppe Arena<sup>2</sup> | Laurence Lasorsa<sup>1</sup> | Andrew Bennett<sup>3</sup> | Thierry Grange<sup>3</sup> | Safia El Messaoudi<sup>1</sup> | Thibault Mazard<sup>1</sup> | Corinne Prevostel<sup>1</sup> | Alain R. Thierry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, France

<sup>2</sup>Gustave Roussy Cancer Campus, INSERM U1030, Villejuif 94805, France

<sup>3</sup>Institut Jacques Monod, Université Paris Diderot, Paris, France

## Correspondence

Alain R. Thierry, IRCM, INSERM, U1194, 208 rue des Apothicaires, Montpellier Cedex 5, 34298, France.  
Email: alain.thierry@inserm.fr

## Funding information

SIRIC Montpellier Grant, Grant/Award Number: INCa-DGOS-Inserm 6045; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

## Abstract

Mitochondria are considered as the power-generating units of the cell due to their key role in energy metabolism and cell signaling. However, mitochondrial components could be found in the extracellular space, as fragments or encapsulated in vesicles. In addition, this intact organelle has been recently reported to be released by platelets exclusively in specific conditions. Here, we demonstrate for the first time, that blood preparation with resting platelets, contains whole functional mitochondria in normal physiological state. Likewise, we show, that normal and tumor cultured cells are able to secrete their mitochondria. Using serial centrifugation or filtration followed by polymerase chain reaction-based methods, and Whole Genome Sequencing, we detect extracellular full-length mitochondrial DNA in particles over 0.22  $\mu\text{m}$  holding specific mitochondrial membrane proteins. We identify these particles as intact cell-free mitochondria using fluorescence-activated cell sorting analysis, fluorescence microscopy, and transmission electron microscopy. Oxygen consumption analysis revealed that these mitochondria are respiratory competent. In view of previously described mitochondrial potential in intercellular transfer, this discovery could greatly widen the scope of cell-cell communication biology. Further steps should be developed to investigate the potential role of mitochondria as a signaling organelle outside the cell and to determine whether these circulating units could be relevant for early detection and prognosis of various diseases.

## KEY WORDS

blood, circulating DNA, mitochondria, mitochondrial genome, respiratory competent

**Abbreviations:** 16gP, 16 000g pellet; ACD-A, anticoagulant citrate dextrose solution A; bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; cfDNA, cell-free deoxyribonucleic acid; CCM, centrifuged cell culture media; CTAD, citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole; DAMPs, damage associated molecular patterns; DII, DNA integrity index; DNA, deoxyribonucleic acid; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EM, electron microscopy; F, filtrated; FACS, fluorescence-activated cell sorting (FACS); FCCP, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone; FSC, forward scatter; HEPES, 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl] ethanesulfonic acid; HS, high speed; IM, isolated mitochondria; Kbp, kilo base pair; LR, long range; LS, low speed; MAS, mitochondrial assay solution; McfDNA, mitochondrial cell-free deoxyribonucleic acid; MIB, mitochondrial isolation buffer; NcfDNA, nuclear cell-free deoxyribonucleic acid; NF, non filtrated; OCR, oxygen consumption rate; PBS, phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PPAP, protocol precluding activation of platelets; Q-PCR, quantitative polymerase chain reaction; ROS, reactive oxygen species; SSC, side scatter; TFAM, transcription factor A, mitochondrial; TIM 23, translocase of inner membrane 23; TMPD, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine; TOM 22, translocase of outer membrane 22; WGS, whole genome sequencing.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2020 INSERM. The FASEB Journal published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of Federation of American Societies for Experimental Biology



## 1 | INTRODUCTION

The presence of mitochondria in unicellular to mammalian organisms originates from an ancient symbiosis between primitive eukaryotic cells and free-living aerobic prokaryotes.<sup>1,2</sup> Mitochondria are crucial organelles for central cell functions,<sup>3</sup> and they are the principal nutrient-up-taking and energy-producing cell organelle; they also take part in calcium signaling, reactive oxygen species (ROS) production, cell death, and diverse cell signaling events.<sup>4-7</sup> Mitochondria have retained many of their ancestral bacterial features including length, proteome, double membrane, and circular genome.<sup>8</sup>

Cell-derived mitochondrial components, including mitochondrial DNA, have been found in the extracellular space.<sup>9,10</sup> Those deoxyribonucleic acid (DNA) fragments were found in the physiological circulating fluid of healthy subjects and patients with various diseases.<sup>11</sup> Lately, mitochondrial cell-free DNA (McfDNA) has emerged as an attractive circulating biomarker due to its potential role in diagnostic applications in multiple diseases (eg, Diabetes, acute myocardial infarction, cancer...),<sup>12-14</sup> and in physio-pathological conditions (eg, trauma).<sup>15</sup> Despite the promising future of McfDNA in clinical applications, knowledge regarding its origin, composition, and function is still lacking. In addition, the structure of McfDNA is currently unknown. In contrast, the structure of circulating DNA of nuclear origin is being characterized<sup>16</sup> and mono and di-nucleosomes and, to a lesser extent, transcription factors are found as stabilized cell-free DNA (cfDNA)-associated structures in the blood-stream.<sup>17,18</sup> It is expected that there are important configuration differences between nuclear and mitochondrial circulating DNA, since mitochondrial DNA is a small circular genome, without protective histones, and thus is more sensitive to degradation in the circulation. However, by revealing recently that there are approximately 50 000-fold more copies of the mitochondrial genome than the nuclear genome in the plasma of healthy individuals,<sup>19</sup> we confirmed that McfDNA is sufficiently stable to be detected and quantified,<sup>12,20</sup> implying the presence of stable structures protecting these DNA molecules.

The present study aims at identifying the structures containing mitochondrial DNA in peripheral blood. By examining McfDNA integrity, and associated structure size and density, we revealed the presence of stable particles with full-length mitochondrial genomes. We characterized the structures by fluorescence and electron microscopy (EM), flow cytometry, and we identified the presence of intact mitochondria in the circulation. Oxygen consumption assays suggested the functional viability of at least some of these extracellular mitochondria. Our work demonstrates for the first time the presence in blood of circulating cell-free respiratory competent mitochondria. Overall, in view of the potential roles of mitochondria in cell to cell communication, immune response, and inflammation, our discovery has

broad implications in homeostasis and disease, and paves the way for new paths toward the treatment and prevention of diseases.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Plasma isolation

Blood samples from healthy volunteers were provided by the "Etablissement Français du Sang (E.F.S)," the blood transfusion center of Montpellier, France (Convention EFS-PM N° 21PLER2015-0013). Blood samples from 50 mCRC patients were provided by a clinical study comparing the detection of *KRAS* exon 2 and *BRAF* V600E mutations by cfDNA analysis to conventional detection by tumor tissue analysis. All blood samples were processed within 4 hours after collection. Plasma was extracted by various protocols, depending on the experiments.

#### 2.1.1 | For healthy individuals

##### *Plasma isolation using Ficoll*

Fresh blood was collected in EDTA tubes. Plasma was isolated by a Ficoll density-gradient centrifugation, performed at 400 g for 30 minutes at 18°C (Ficoll paque plus GE Healthcare, Fisher Scientific, Illkirch, France).

##### *Plasma isolation by centrifugation*

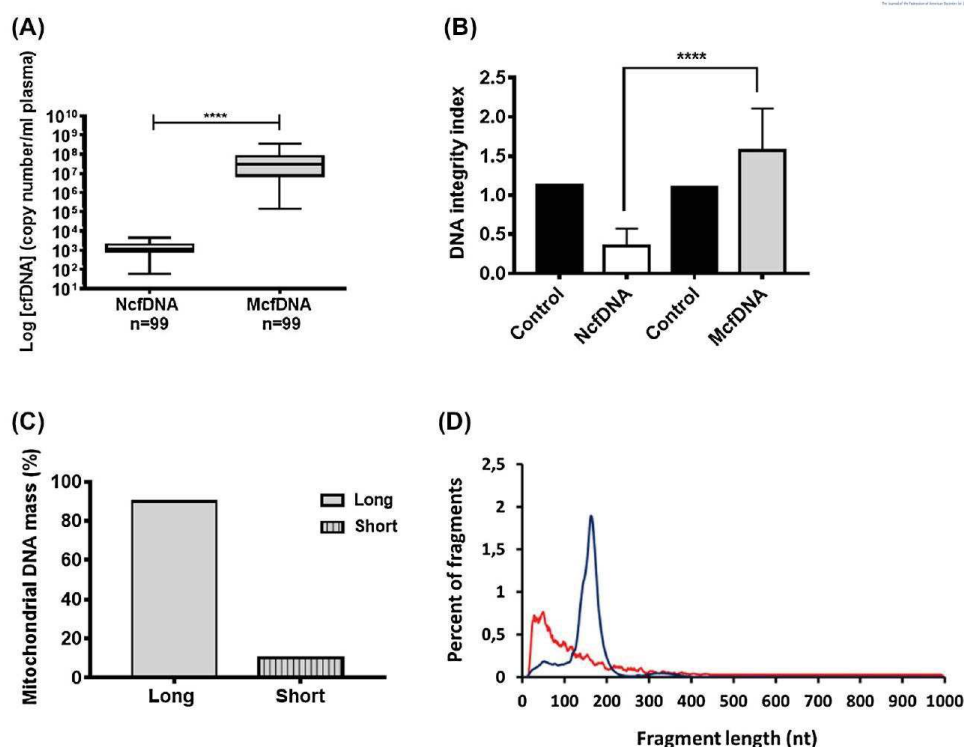
Fresh blood was collected in EDTA tubes. Plasma was isolated by a single centrifugation, performed at 1200 g for 10 minutes at 4°C.<sup>21</sup>

##### *Plasma isolation without platelet activation*

Fresh blood was collected in a BD Vacutainer citrate-theophylline-adenosine-dipyridamole (CTAD) tubes (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Plasma was isolated via differential centrifugations, all performed for 10 minutes at room temperature without a break: two successive centrifugations were first performed at 200 g and were followed by a third centrifugation at 300 g. Preheated (37°C) anticoagulant Citrate Dextrose Solution A (ACD-A) buffer (0.1 M Trisodium citrate, 0.11 M Glucose and 0.08 M citric acid) and Prostaglandin E1 (1 µM) (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier Cedex) were then added to the plasma, which was further centrifuged at 1100 g and finally at 2500 g.

#### 2.1.2 | For mCRC patients

Blood was collected in Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes, and plasma was isolated by a single centrifugation, performed at 1200 g for 10 minutes at 4°C.



**FIGURE 1** Plasma of healthy individuals contain a population of cell-free mitochondrial DNA that is well preserved and not fragmented. A, NcfDNA and McfDNA quantification in plasma samples of 99 healthy individuals. McfDNA copy number is significantly higher than that of NcfDNA ( $P < .0001$ ). The lines inside the boxes and the upper and lower limits of the boxes indicate the median, 75th and 25th percentiles, respectively. The upper and lower horizontal bars indicate the maximum and minimum values, respectively. B, NcfDNA and McfDNA integrity index calculated for plasma samples of 13 healthy individuals, demonstrating that almost all the quantified McfDNA have a main size above 300 bp, and are less fragmented than NcfDNA ( $P < .0001$ ). C, Size fractionation following agarose gel electrophoresis of a pool of cfDNA extracts obtained from 80 healthy individuals' plasma. McfDNA fragments were quantified by q-PCR from extracts of the excised agarose gel slices above (Long) and below (Short) 500 bp. D, DNA fragment size profile at single base resolution obtained by paired-end massively parallel WGS of cfDNA extracted from a healthy individual's plasma. (Blue for NcfDNA and red for McfDNA)

## 2.2 | Cell lines

Human colon cancer cell lines (DLD-1/SW620) were obtained from the American type culture collection (ATCC) and a normal immortalized cell line (CCD-18Co) was obtained from Andrei Turtoi's laboratory (IRCM, Montpellier, France). SW620 and CCD-18Co cells were grown in RPMI 1640 and DLD-1 cells in DMEM (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France), both supplemented with 10% fetal bovine serum (Eurobio, les Ulis, France) and 1X streptomycin/penicillin (Gibco, Fisher Scientific, Illkirch, France). Cell culture, for all cell lines, was performed at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

1.5 million cells were seeded in a T-75 flask with 10 mL of appropriate supplemented medium. Cells were incubated for either 24 hours or 60 hours. Culture media were replaced with fresh medium 24 hours before experiments. Collected media from cultured cells were centrifuged at 600 g for 10

minutes at 4°C, to precipitate both floating cells and cells debris, and were further processed by various protocols, depending on the experiments.

## 2.3 | Quantification of nuclear cell-free DNA (NcfDNA) and mitochondrial cell free DNA (McfDNA) in healthy individuals and cancer patients

NcfDNA and McfDNA in healthy individuals (Figures 1A,B and S2A), and in mCRC patients (Figures S1 and S2B) were quantified from a plasma supernatant obtained following the first centrifugation step mentioned before at 1200 g for 10 minutes at 4°C and a second centrifugation step at 16 000 g for 10 minutes at 4°C. Following this centrifugation, total cfDNA was extracted from supernatant and analyzed with quantitative polymerase chain reaction (q-PCR).



## 2.4 | Kinetic study of cfDNA stability

First, SW620 and DLD-1 culture medium was removed after 24 hours of culture, centrifuged at 1200 g, and then at 16 000 g for 10 minutes, both at 4°C, and further incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 4 days. An aliquot of cell culture supernatant (400 µL) was withdrawn every day for DNA extraction. NcfDNA and McfDNA were quantified by q-PCR using specific primers (*KRAS* F2 and *KRAS* R1 for NcfDNA, MIT MT-CO3 F, and MIT MT-CO3 R2 for McfDNA) (Table S1).

## 2.5 | cfDNA extraction

Cell-free DNA was extracted with a Qiagen Blood Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations, except that extraction was performed with 1 mL of plasma sequentially loaded on a single column and that the cfDNA was eluted with 130 µL of elution buffer. The cfDNA was stored at -20°C for further analysis. Freeze-thawing was avoided to reduce cfDNA fragmentation.

## 2.6 | Q-PCR analysis

Cell-free DNA was quantified by q-PCR according to an innovative design of short (60–100 bp ± 10 bp) and long (300 bp ± 10 bp) amplicons targeting the wild-type sequences of specific genes: the *KRAS* nuclear gene and the mitochondrial Cytochrome oxidase III gene, MT-CO3 (Table S1). Quantification of the short and long amplicons provides an estimation of the concentrations of the total NcfDNA and McfDNA. Q-PCR amplifications were performed in triplicate in a 25 µL final reaction volume controlled by the CFX manager software of a CFX96 touch Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). Each polymerase chain reaction (PCR) reaction mixture was composed of 12.5 µL of SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), 2.5 µL of nuclease-free water (Qiagen), 2.5 µL of forward and 2.5 µL reverse primers (3 pmol/µL), and 5 µL of template. Thermal cycling conditions were as follows: 95°C (3:00) + [95°C (0:10) + 60°C (0:30)] × 40 cycles. Melting curves were investigated by increasing the temperature from 60°C to 90°C, reading the plate every 0.2°C. Each q-PCR run was performed with 1.8 ng/µL of genomic DNA extracted from the DiFi cell line (ATCC) for the standard curve and without DNA as the control condition. Q-PCR amplification was validated by melt curve differentiation.

## 2.7 | cfDNA calibration assay and copy number calculation

### 2.7.1 | NcfDNA quantification

A genomic DNA extract from human wild-type *KRAS* colorectal cells was used for the NcfDNA calibration assay. Initial genomic DNA solution concentration and purity were determined by measuring optical density at λ = 260, 230, and 280 nm, with an Eppendorf BioPhotometer D30. Starting genomic DNA concentration was adjusted to 1800 pg/µL for the first dilution point, according to optical density measurement at λ = 260 nm. A q-PCR standard curve was obtained by six successive dilutions of the vector solution (to 1800, 180, 45, 20, 10, and 5 pg/µL). The standard curve was used to determine the NcfDNA concentration per milliliter of plasma and cell media supernatant. The NcfDNA copy number was calculated as follows:

$$Q_{\text{nuclear}} = \left( \frac{c}{3.3} \right) \times \left( \frac{V_{\text{elution}}}{V_{\text{plasma}}} \right)$$

$Q_{\text{nuclear}}$  is the NcfDNA copy number per milliliter;  $c$  is the NcfDNA mass concentration (pg/µL) determined by a q-PCR targeting the nuclear *KRAS* gene sequence and 3.3 pg is the human haploid genome mass.  $V_{\text{elution}}$  is the volume of cfDNA extract (µL) and  $V_{\text{plasma}}$  is the starting volume of plasma used for the extraction (mL).

### 2.7.2 | McfDNA quantification

A 3382-bp human ORF vector with a 786-bp MT-CO3 insert was obtained from ABM (accession no.YP\_003024032) and used for the McfDNA calibration assay.

Initial vector solution testing, starting concentration adjustments and q-PCR standard curves were performed as for NcfDNA above.

The standard curve was used to determine the McfDNA concentration per milliliter of plasma and of cell media supernatant. The McfDNA copy number was calculated as follows:

$$Q_{\text{mito}} = \left( \frac{c \times N_A}{2 \times MW \times L_{\text{vector}}} \right) \times \left( \frac{V_{\text{elution}}}{V_{\text{plasma}}} \right)$$

$Q_{\text{mitochondrial}}$  is the McfDNA copy number per milliliter, “ $c$ ” is the McfDNA mass concentration (g/µL) determined by q-PCR targeting the mitochondrial *MT-CO3* gene sequence.  $N_A$  is Avogadro's number ( $6.02 \times 10^{23}$  molecules per mol),  $L_{\text{vector}}$  is the plasmid length (nucleotides), and  $MW$  is the molecular weight of one nucleotide (g/mol);  $V_{\text{elution}}$  is the elution volume of cfDNA extract (µL) and

$V_{\text{plasma}}$  is the starting volume of plasma used for the extraction (mL).

## 2.8 | DNA integrity index calculation

The degree of cfDNA fragmentation was assessed simultaneously by targeting *KRAS* and *MT-CO3* sequences from each plasma DNA sample and calculating the DII (DNA integrity index). The DII was determined by calculating the ratio of the concentration determined using the primer set amplifying a large target (*KRAS* F2/R1 and *MT-CO3* F/R2) to the concentration determined using the primer set amplifying a short target (*KRAS* F1/R1 and *MT-CO3* F/R1) (Table S1).

## 2.9 | Examination of the percentage of McfDNA short and long fragments

Cell-free DNA was extracted from a pool of 80 healthy individual's plasma, with the Maxwell RSC ccfDNA plasma kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). To obtain highly concentrated cfDNA, extracts were subjected to a second extraction with the same method followed by a Qiampl DNA blood Mini Kit extraction resulting in a final volume of 30  $\mu\text{L}$ . The samples were then electrophoresed on a 2% agarose gel and DNA fractions of short (<500 bp) and long (>500 bp) fragments were extracted from the gel with a QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen). The quantity of mitochondrial DNA fragments was then assessed with q-PCR by using mitochondrial specific primer (*MT-CO3* F/R1) (Table S1).

## 2.10 | Library preparation for whole genome sequencing

Dual-indexed single-stranded libraries were prepared from 1 to 11 ng human DNA using TL137 as a linker oligo.<sup>22</sup> To allow sequencing with single-stranded libraries, custom double-stranded adapters were generated, identical to those used in the single-stranded method, by annealing a short oligo SLP4.<sup>23</sup> Ligations were performed with an NEBNext Quick Ligation Module kit (New England Biolabs) with 0.04  $\mu\text{M}$  of each annealed adapter in a 50  $\mu\text{L}$  total volume, incubated for 30 minutes at 20°C. Adapters were elongated by adding 50  $\mu\text{L}$  OneTaq 1 $\times$  Master Mix (New England Biolabs) to the ligation mixture and incubating for 20 minutes at 60°C. All oligos were purchased from Eurogentec (Kaneka Eurogentec, Seraing, Belgium). Single-stranded libraries were quantified via q-PCR, with a diluted fraction, in a LightCycler 2 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Samples were then amplified using Taq polymerase and an optimal number of cycles for each sample to avoid plateau phase, as calculated

from the Ct of the diluted q-PCR. Amplified samples were then purified by two rounds of Macherey-Nagel NGS beads at 1.3 $\times$  volume, to retain shorter inserts, and eluted in 30  $\mu\text{L}$  EBT. Purified libraries were then visualized on a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA) and quantified via q-PCR, Qubit 2 Fluorometer (Life Technologies, Grand Island, NY), and Bioanalyzer 2100. Libraries were then pooled in equimolar amounts and sequenced on an Illumina MiSeq platform using two MiSeq v3 150 (2  $\times$  75) kits, with sequencing primer CL72 replacing the first read sequencing primer.

## 2.11 | Sequence analysis

Adapter sequences were removed with cutadapt 1.3<sup>24</sup> and reads were aligned to the human genome reference (hg19) with BWA aln<sup>25</sup> using the default parameters and filtered for mapping quality 20 with SAMtools 1.5.<sup>26</sup> Duplicate removal and histogram generation was performed with MarkDuplicates and CollectInsertSizeMetrics, respectively, from Picard tools 1.88.

## 2.12 | Differential centrifugation and filtration of plasma and cell media

Schematic view and details are presented in Figure S6.

## 2.13 | Isolation of intracellular mitochondria

Mitochondria from cultured cells were isolated as a positive control. Cells were scraped from culture dishes, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and centrifuged at 1300 rpm for 5 minutes at room temperature. Pelleted cells were re-suspended in 1 mL of mitochondrial isolation buffer (MIB) (0.2 M sucrose, 0.01 M tris, 0.001 M EGTA, 1X protease inhibitor) and gently lysed using an IKA T18 Basic Dispersers Homogenizer (Ultraturax) at speed 2 for 10 seconds until obtaining 80%-90% intact nuclei. Lysed cells were then centrifuged at 600 g at 4°C for 10 minutes to remove cell debris and nuclei, to recover supernatant containing both cytoplasm and mitochondria. Pelleted intact nuclei were washed twice in 1ml MIB and centrifuged again at 600 g for 10 minutes at 4°C, to be used as a negative control in experiments with flow cytometry, while the resulting supernatants were pooled together with the previous supernatants to further isolate mitochondria. For this, the 3 mL of supernatant were centrifuged at 600 g at 4°C for 10 minutes to eliminate contaminating nuclei and cell debris. The resulting supernatant was then further centrifuged at 8000 g for 10 minutes at 4°C to pellet mitochondria. The supernatant was collected again and



centrifuged again at 8000 *g* for 10 minutes at 4°C. These pellets were pooled together and gently resuspended in 500  $\mu$ L MIB, transferred to 1.5 mL tubes and centrifuged again at 8000 *g* for 10 minutes at 4°C. The final supernatant was carefully discarded to collect the pelleted mitochondria.

## 2.14 | Isolation of extracellular mitochondria

Mitochondria in the plasma, extracted by Ficoll gradient, were isolated by sequential centrifugations at 600 *g*, then 1200 *g* and finally 2000 *g* for 10 minutes at 4°C to remove any contaminating blood cells or platelets. The resulting supernatant was centrifuged at 16 000 *g* to collect the extracellular mitochondria pellet.

Mitochondria in the plasma obtained without platelet activation were pelleted by a one-step centrifugation at 16 000 *g* for 10 minutes at 4°C.

Mitochondria in the cell media supernatant were isolated by sequential centrifugations at 600 *g*, then 1200 *g* for 10 minutes at 4°C to remove any contaminating cells. The pellet of extracellular mitochondria was collected from a subsequent centrifugation at 16 000 *g*.

Note that an extracellular mitochondrial pellet was also recovered from a centrifugation at 8000 *g* instead of 16 000 *g* to protect the mitochondrial membrane.

## 2.15 | Amplification of the mitochondrial genome

The DNA extracted from cell media pellets (40 flask T-75/cell line), and from two different plasma pools (without platelet activation) pellets was selectively amplified with the Repli-g mitochondrial DNA kit (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations. The amplified mitochondrial genome was then amplified by long range (LR) PCR performed in a 50  $\mu$ L total volume in a Mastercycler nexus eco thermal cycler (Eppendorf). Each PCR reaction mixture was composed of 30.5  $\mu$ L of free water (Qiagen), 5  $\mu$ L of 10 $\times$  LA PCR Buffer II (Mg<sup>2+</sup> plus), 8  $\mu$ L of dNTPs (2.5 mM each), 5  $\mu$ L of mixed forward and reverse primers (10  $\mu$ M each), 1  $\mu$ L of template (DNA mass between 10 and 100 ng, calculated with a Qubit broad range kit), and 0.5  $\mu$ L of TAKARA LA Taq (5 U/ $\mu$ L) (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). Thermal cycling conditions were as follows: 95°C (2:00) + [95°C (0:15) + 68°C (10:00)]  $\times$  30 cycles + 68°C (20:00) + 4°C ( $\infty$ ). PCR amplifications were performed with five pairs of overlapping primers (Mito1/Mito2/Mito3/hmt1/hmt2) (Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium). All PCR amplified products were loaded on a 0.8% agarose gel to check the size of amplicons with reference to the 1Kb plus DNA ladder (Thermo Fischer).

## 2.16 | Mitochondrion staining

The 16 000 *g* pellets (16gP) from both, the plasma without platelet activation (pool from 5 healthy individuals) and from the cell media (2 flask T-75/ cell line), were stained with 200 nM MitoTracker Green FM (Thermofisher) for 45 minutes, washed twice with PBS, and resuspended in 10  $\mu$ L of PBS to be visualized by ApoTome microscopy (ZEISS Axio Imager 2). Images were edited with ZEN Software. In parallel, cell culture media pellets (8 T-75 flask/cell line), Ficoll-isolated plasma pellet and positive and negative controls were resuspended in 150  $\mu$ L of PBS and analyzed by Gallios flow cytometry (Beckman Coulter). Mitochondria isolated from cultured cells were used as a positive control for the MitoTracker specificity and as a standard to delineate both the appropriate gate and voltages for the flow cytometry. All sample plots were collected according to size (Forward scatter FSC) and granularity (side scatter SSC) in logarithmic mode. Voltages were adjusted for submicron particles and the flow rate was set at "low." Doublets were excluded by plotting FSC-Area vs FSC-Height, both in logarithmic mode. Collected events in the newly created gate were gated as singlet. Following confirmation that all events recorded in this gate were MitoTracker Green positive, the gate was applied to all samples. Plot histograms were created for both unstained and stained samples. Results were analyzed with Kaluza analysis 1.5 software.

## 2.17 | Western blot

Pellets obtained at 8000 *g* from both the plasma (pool of 5 healthy individuals) and the cell media supernatant (100 flask T-75/cell line) were resuspended in 50  $\mu$ L of 1X Laemli buffer, loaded on a 12% Acrylamide/Bis-Acrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked in 10% milk in 1X PBS-tween for 1h. Blotting was performed with either 1/500 diluted primary mouse anti-TOM22 (Sigma, St. Quentin Fallavier Cedex) or with 1/1000 diluted primary mouse anti-TIM23 (BD Transduction Laboratoire, France) antibodies over-night at 4°C and further with 1/10 000 diluted HRP-conjugated secondary Rabbit anti-mouse antibodies (Merck, Île-de-France, France) for 1h at room temperature. Immunoblots were visualized by ECL (Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, France).

## 2.18 | Electron microscopy

The 8000 *g* pellets from either cell media (30 flask T-75/cell line) or plasma prepared without platelet activation (pool from 3 healthy individuals) were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in PHEM buffer (1X, pH 7.4) overnight at

4°C, washed in PHEM and post-fixed in 0.5% osmic acid for 2 hours in the dark at room temperature. Samples were then washed twice in PHEM buffer, dehydrated in a graded series from 30% to 100% ethanol solutions and finally embedded in EmBed 812 using an Automated Microwave Tissue Processor for Electronic Microscopy (Leica EM AMW). 70nm sections (Leica-Reichert Ultracut E), collected at different levels of each block, were counterstained, with 1.5% uranyl acetate in 70% Ethanol and lead citrate, and observed with a Tecnai F20 transmission electron microscope at 200 kV.

### 2.19 | Metabolic activity

Mitochondrial bioenergetics function was determined by oxygen consumption rate (OCR), with a Seahorse XF-96 extracellular flux analyzer (Agilent). We performed the electron flow assay that allows the functional assessment of selected mitochondrial complexes together in the same period. After isolation, 64 µg of freshly isolated DLD-1 mitochondria (positive control), and 64 µg of DLD-1 cell media pellet and plasma pool pellet prepared without platelets activation, were plated in each well in a volume of 25 µL containing MAS 1× (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA, and 0.2% fatty acid-free BSA, pH 7.2) supplemented with 10 mM pyruvate, 2 mM malate and 4 µM Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP). Note, pyruvate and malate drive respiration via complex I, and FCCP uncouples the mitochondrial function. The XF plate was then centrifuged for 20 minutes at 2000 g at 4°C. After centrifugation, 155 µL of electron flow substrate-containing 1×MAS was added to each well, and the plate was warmed up in a 37°C non-CO<sub>2</sub> incubator for 5-10 minutes. About 10-fold concentrated compounds were loaded in the ports of the cartridge, using the “loading helper” plate: port A,

20 µL of 20 µM rotenone, a complex I inhibitor (2 µM final); port B, 22 µL of 100 mM succinate, a complex II activator (10 mM final); port C, 24 µL of 40 µM Antimycin A, a complex III inhibitor (4 µM final); port D, 26 µL of 100 mM ascorbate plus 1 mM TMPD, complex IV activator (10 mM and 100 µM final, respectively). After calibration of the cartridge by the XF machine, the XF plate was introduced and the assay continued using Agilent’s protocol for isolated mitochondria (IM).

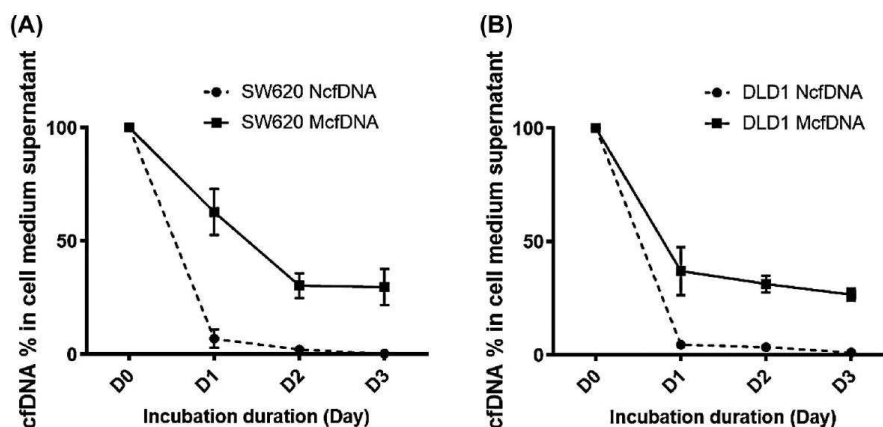
### 2.20 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism software (version 7.01). A probability of ≤.05 was considered to be statistically significant by Student’s *t* test: \**P* ≤ .05, \*\**P* ≤ .01, \*\*\**P* ≤ .001, \*\*\*\**P* ≤ .0001.

## 3 | RESULTS

### 3.1 | Mitochondrial cell-free DNA size distribution and stability

Mitochondrial cell-free DNA is sufficiently stable to be detected and quantified in plasma (Figures 1A, S1A, S2). However, mitochondrial DNA (16 kilo base pairs [kbp]) was thought to be more susceptible to degradation and less stable than nuclear DNA because of its lack of histones. In our initial investigation, we found, to our surprise, that McfDNA fragments over 300 base pairs (bp) are actually more stable than NcfDNA fragments (>300 bp), in fetal bovine serum supplemented culture medium (Figure 2). To establish mitochondrial genome cell-free DNA integrity, we determined the DNA integrity index (DII), we previously used for the study of NcfDNA fragmentation,<sup>27</sup> and data revealed that all



**FIGURE 2** Kinetic study of NcfDNA and McfDNA stability in cell culture media. The evaluation of the stability of cfDNA (NcfDNA and McfDNA) derived from SW620 (A) and DLD-1 (B) cell culture media over time independently of the cells. NcfDNA and McfDNA concentration was measured using q-PCR, by amplifying an amplicon of 305 bp and 296 bp, respectively. (D: day)



or most McfDNA fragments are over 300 bp, in contrast to NcfDNA (Figures 1B and S1B). We next examined a plasma DNA extract pool, from 80 healthy humans, by agarose gel electrophoresis and q-PCR. Approximately 10% only of the McfDNA mass in healthy samples, were composed of fragments below 500 bp (Figure 1C).

Whole Genome Sequencing of healthy plasma revealed a wide-size ranging population of short mitochondrial DNA fragments mainly decreasing in abundance from 30 to 300 nucleotides. In contrast, NcfDNA had a more homogenous distribution, conventionally peaking at 167 bp, corresponding to mono-nucleosomes (Figure 1D).<sup>17,28</sup> Paired-end sequencing enables high-resolution measurement of DNA size but has a practical upper limit of read-out at ~1000 bp. Since no McfDNA was detected between 500 bp and 1000 bp, Whole Genome Sequencing only detected the minor fraction formerly revealed by gel electrophoresis (Figure 1C).

Data suggest that McfDNA contain at least two populations: one minor composed of highly degraded fragments from 30 to 300 bp, and one major composed of DNA of length higher than 1000 bp. Intimate examination of the whole genome sequencing (WGS) resulting reads indicates that  $\approx 63\%$  of the McfDNA fragments below 300 bp ranged between 67 and 300 bp. When combining WGS data and Q-PCR based measurement of the fractionation assay, we could determine that only 5% of the total mass of McfDNA are below 67 bp. We therefore set out to characterize the structural elements that stabilize mitochondrial DNA over 1000 bp in the circulation.

### 3.2 | Plasma and cell culture media contain McfDNA in dense structures larger than 0.22 $\mu\text{m}$

We next used differential centrifugation of plasma to separate the different structures associated with cell-free nuclear and mitochondrial DNAs. First, we isolated the plasma from whole blood at 400 *g* on a ficoll gradient. This was followed by incremental centrifugations at 16, 40, and 200 000 *g* to remove the large organelles and remaining membrane debris, the micro-vesicles and finally the exosomes, respectively (Figure S6). Q-PCR of the resulting supernatant revealed, surprisingly, that McfDNA is packed in denser structures than NcfDNA (Figure 3A-C).

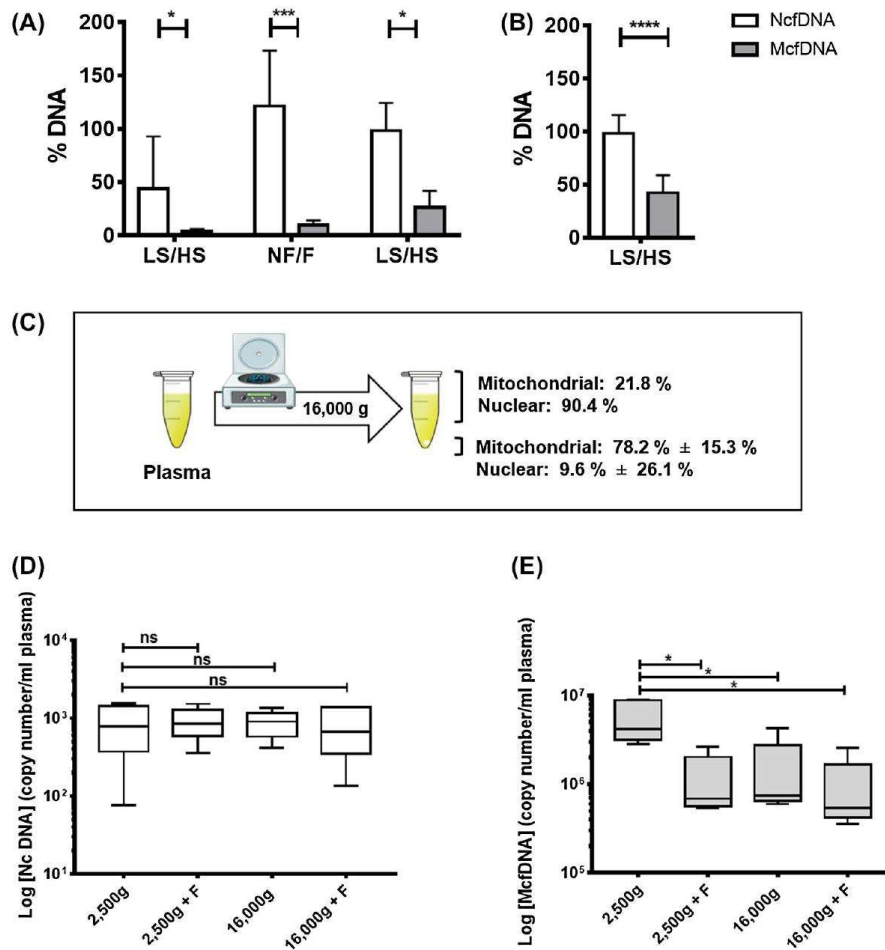
We therefore sought to further confirm our surprising result, that 16 000 *g* centrifugation precipitated large amounts of mitochondrial DNA but very little nuclear DNA, by performing a refined plasma isolation protocol that precludes platelet activation, based on sequential centrifugations at increasing strengths:  $2 \times 200$  *g*, 300 *g*, 1100 *g*, 2500 *g*, and 16 000 *g*, each for 10 minutes at 20°C

with no break in-between. Note, this protocol excludes blood cells from the final plasma preparation without activating or degrading them in the process<sup>29,30</sup> (Figure 3A) and this sequence (series) of centrifugations was used in all the following work described here. Notably, in the final plasma preparation, the nuclear DNA passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter whereas the mitochondrial DNA did not (Figures 3A,D,E and S3A-C). No statistically significant variation in NcfDNA content occurs, in contrast to McfDNA contents showing up to 7-fold difference when using these various procedures (Figure 3D,E); this demonstrated that mitochondrial DNA detected in plasma are included in cell-free structures and that plasma preparation is devoid of nucleated blood cells.

Next, we sought to completely eliminate the possibility that mitochondria or free mitochondrial DNA is actively released into the plasma by platelets, during handling of the blood samples. Therefore, we repeated all the above analysis on culture media supernatants from various cancer and normal cell lines, DLD-1, SW620, and CCD-18CO, and again here the McfDNA was sedimented at 16 000 *g* (Figures 3B and S4A-C), and was retained on 0.22  $\mu\text{m}$  filters (Figure S3D,E).  $73\% \pm 11\%$  and  $78\% \pm 15\%$  of the McfDNA precipitated into the pellet from the cell culture supernatant and plasma, respectively (Figures 3C, S4C and Table S2). It has to be noted that mitochondria are between 0.4 and 1.5 microns in diameter and the conventional speed used for their sedimentation is between 7000 and 20 000 *g*. Mitochondrial DNA in the 16gP of cell culture media was not degraded by DNase I treatment, in contrast to nuclear DNA (Figure S4D). Overall, these experiments demonstrate that plasma and cell culture media contain McfDNA in dense and stable structures above 0.22  $\mu\text{m}$ , excluding platelets as its source.

### 3.3 | Both plasma and cell culture media contain structures with full-length mitochondrial genomes

We next investigated the integrity of the mitochondrial DNA in the 16gP of two different plasma pools and in DLD-1 and SW620 culture media. After Highly Uniform Whole Mitochondrial Genome Amplification of the DNA extracts, we used long-range PCR with five mitochondria-specific primer sets (Figure 4A).<sup>31</sup> While no signal was detected in the negative controls, agarose gel electrophoresis sizing clearly revealed the expected mitochondrial amplicons from the cell media and plasma 16gP, thus demonstrating the presence of intact full-length mitochondrial DNA in cell culture media and in healthy individuals plasma (Figure 4B), consistent with the high integrity index of plasma mitochondrial DNA in Figure 1B.



**FIGURE 3** Plasma of healthy individuals and cell culture media contain structures enclosing mitochondrial cell-free DNA. A, cfDNA content following three different subsequent treatments of plasma: (i) by high-speed centrifugation, (ii) by filtration (0.22  $\mu$ M) in Ficoll isolated plasma, and (iii) by high-speed centrifugation in plasma isolated by a protocol precluding activation of platelets (PPAP). LS and HS, low and high-speed centrifugation at 16 000 g; NF and F, nonfiltered and filtered plasma (Figure S4);  $n = 8$   $P = .0630$ ,  $n = 7$   $P = .0009$ , and  $n = 4$   $P = .0173$ , respectively. B, Decrease of the cfDNA content in the DLD-1/SW620/CCD-18Co cell culture media after an initial low-speed (LS, 600 g) and a subsequent high-speed centrifugation (HS, 16 000 g). (Methods and Figure S4).  $n = 28$ .  $P < .0001$ . C, Proportion of NcfDNA and McfDNA plasma contents after treatment of PPAP plasma (Table S2).  $n = 4$ . D, NcfDNA copy number in healthy individuals' plasma prepared under PPAP and subsequently filtered and/or centrifuged at either 2500 or 16 000 g ( $n = 5$ ). E, McfDNA copy number in healthy individuals' plasma prepared under PPAP and subsequently filtered and/or centrifuged at either 2500 or 16 000 g.  $n = 5$ ,  $P = .0111$ ,  $P = .0114$ ,  $P = .0115$ , respectively

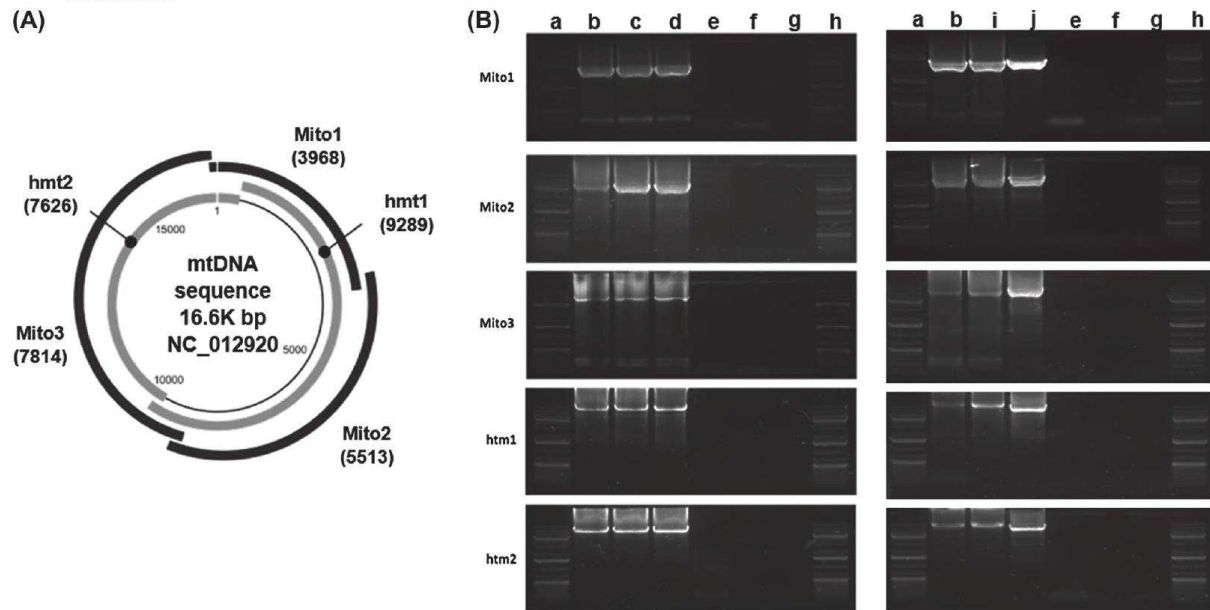
### 3.4 | Both plasma and cell culture media contain structurally intact mitochondria

To test for the presence of structurally intact mitochondria or material derived from mitochondria in plasma, we used the specific live mitochondrial marker, Mitotracker green, on the 16gP derived from cell cultures media and the plasma of five healthy individuals. Positively labeled mitochondria were specifically observed by Fluorescence microscopy in all biological sources (Figure 6A-C). In addition, Flow cytometry analysis was performed on the Mitotracker green-stained preparations. Nuclei (Figures 5B and S5B) and mitochondria (Figures 5A

and S5A), purified from the DLD-1 and SW620 cells, were included as negative and positive control, respectively.

The 16gP from fresh cell media was also used as a negative control (Figures 5C and S5C). Similarly to the positive control, fluorescence signals were detected in the 16gP of both cell culture media (Figures 5D,E and S5D,E) and plasma (Figures 5F and S5F-I), indicating the presence of mitochondria. In addition, immunoblotting revealed the presence of the outer and inner membrane mitochondrial transport proteins, Translocase of outer membrane 22 (TOM 22) and Translocase of inner membrane 23 (TIM 23), in the 16gP from the DLD-1, SW620, and CCD-18Co cell culture media and the plasma supernatants (Figure 5G,H).





**FIGURE 4** Plasma of healthy individuals and cell culture media contain structures enclosing whole intact mitochondrial genome. A, Adapted schematic view of the Long-range (LR) PCR amplification strategy for testing mitochondrial genome integrity. Overlapping amplicons amplify the whole mitochondrial genome by using the two htm1 and htm2 sequences or the three mito1, mito2, and mito3 sequences. B, Agarose gel analysis of LR-PCR amplified mitochondrial DNA demonstrating the presence of a preserved cell free mitochondrial genome in cell culture media and plasma pellet. Extracted DNA from isolated mitochondria from SW620 cells (lane b, positive control), the 16 000 g pellet (16gP) from the SW620 cells culture medium (lane c), the 16gP from the DLD-1 cells culture medium (lane d), a mouse genomic DNA (lane e, negative control), the Repli-g mitochondrial DNA kit's Water (lane f, negative control), the PCR water (lane g, negative control), the 16gP from two different plasma pools (lane i, j), were amplified using the repli-g mitochondrial DNA kit and the 5 sets of primers for the Mito1 (3968 bp), Mito2 (5513 bp), Mito3 (7814 bp) htm1 (9289 bp), and htm2 (7626 bp) amplicons. PCR-products analysis on a 0.8% agarose gel reveals the expected amplicons in the 16gP from cell culture media and from plasma, demonstrating the presence of a whole mitochondrial genome. No signal was detected in negative control. (Lanes a. Lane h, 1kbp DNA ladder)

To validate the presence of free intact mitochondria, we examined the pellet obtained from the cell culture media of DLD-1 and SW620, and from isolated plasma without platelet activation, by EM. Structures with a double membrane and a similar size to mitochondria were detected in all the samples (Figure 6D-F). The 16gP contained structures with all the morphological characteristics of mitochondria, including the inner and outer membranes and the corresponding intermembrane space and matrix. It has to be noted that not all these structures match perfectly the conventional morphology of mitochondria inside a cell. This is expected due to the various morphological alterations that mitochondria may undergo especially in different pathological conditions.<sup>32</sup>

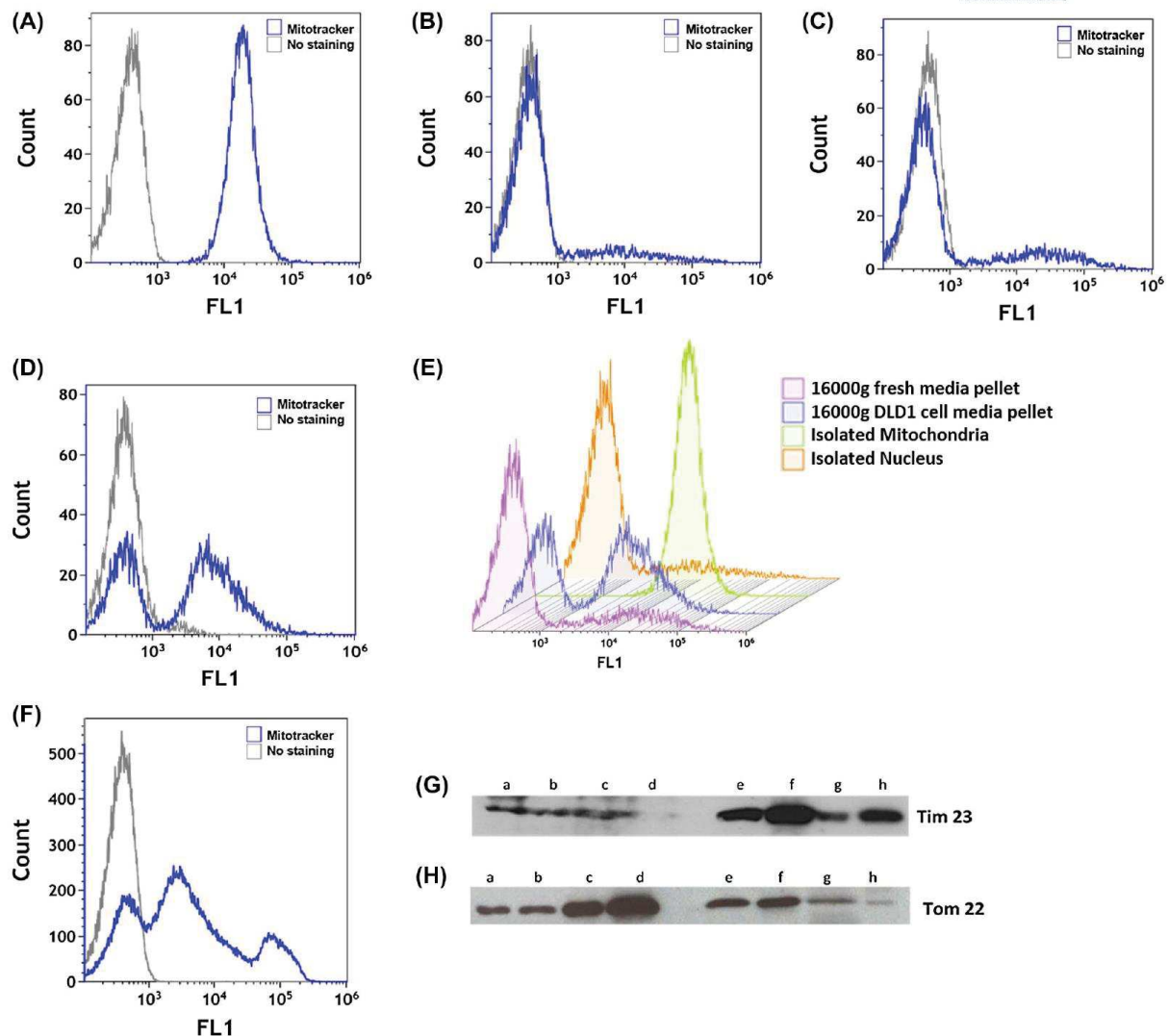
### 3.5 | Both plasma and cell culture media contain respiratory competent mitochondria

To determine whether these mitochondria are functional, we evaluated the metabolic activity by measuring OCR with the Seahorse XF extracellular flux analyzer technology

(Agilent). The electron flow assay clearly indicated that the pellets isolated from DLD-1 culture media, as well as from plasma pool of healthy individuals, consume oxygen and are sensitive to complex I inhibition by rotenone and to complex IV stimulation by ascorbate and N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD), suggesting that the extracellular mitochondria remain competent for respiration (Figure 7).

## 4 | DISCUSSION

To sum up, we report here that blood contains intact cell-free full-length mitochondrial DNA in dense and biologically stable structures over 0.22  $\mu\text{m}$  in diameter and that these structures have specific mitochondrial proteins, double membranes and a morphology resembling that of mitochondria. We further demonstrate that these structurally intact cell-free mitochondria in the blood circulation are respiratory competent. We estimate that there are between 200 000 and 3.7 million cell-free intact mitochondria per mL

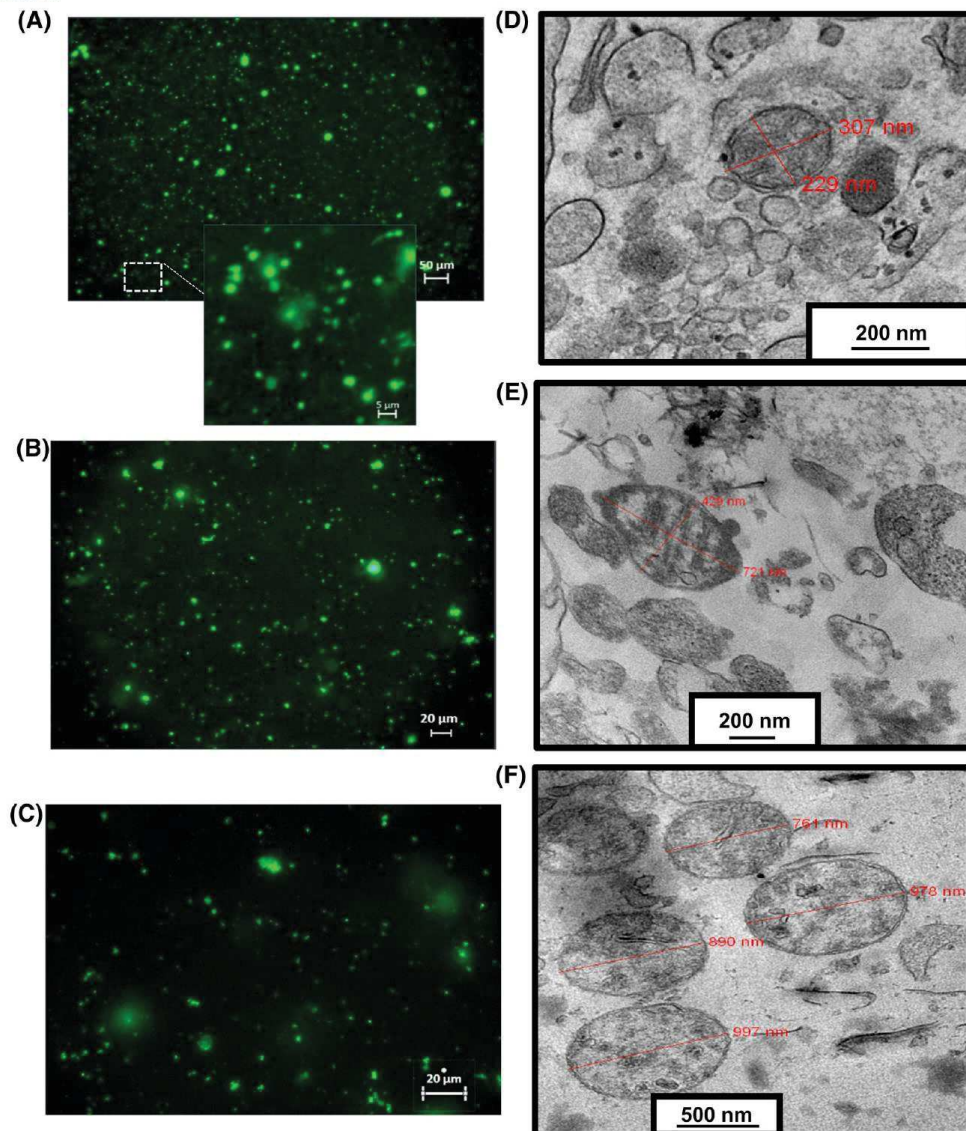


**FIGURE 5** Both plasma of healthy individuals and cell culture media contain cell free mitochondrial material. Flow cytometry analysis of preparations stained with mitochondrial specific dye MitoTracker Green of A, Isolated mitochondria (IM) from DLD-1 cells (positive control); B and C, two negative controls: isolated nucleus and 16gP obtained from fresh cell media and; D, the 16gP isolated from DLD-1 centrifuged cell culture media (CCCM); E, the four previous samples; and F, the 16gP isolated from the plasma of a healthy donor. Results were analyzed with Kaluza analysis 1.5 software. Immunoblotting of membranes by labeling the inner (Tim 23) and outer (Tom 22) mitochondrial membrane proteins; G, Tim 23 (lane a: 16gP from PPAP plasma; lane b: 16gP from CCD-18Co CCCM; lane c: 16gP from SW620 CCCM; lane d: 16gP from DLD-1 CCCM; lane e: IM from CCD-18Co cells; lane f: IM from SW620 cells; lane g: IM from DLD-1 cells; lane h: IM from DLD-1 cells); H, Tom 22 (lane a: IM from DLD-1 cells; lane b: IM from CCD-18Co cells; lane c: IM from SW620 cells; lane d: IM from SW620 cells; lane e: 16gP from DLD-1 CCCM; lane f: 16gP from CCD-18 Co CCCM; lane g: 16gP from SW620 CCCM; lane h: 16gP from PPAP plasma)

of plasma, based on the McfDNA copy number that was either pelleted at 16 000 g or filtered (Table S3). While several studies reported extracellular mitochondria in specific conditions resulting in platelet activation,<sup>33</sup> or encapsulated within microvesicles,<sup>34</sup> it is remarkable how the presence of intact cell-free mitochondria was unnoticed in normal physiological state. This could be explained by the high dilution of

these organelles in the plasma and cell culture media. Note, our finding first corroborate previous collateral observations of plasma filtrates suggesting existence of particles containing mitochondrial DNA in the circulation.<sup>10</sup> Intact full mitochondrial genomes were also observed in the cell free DNA fraction of both healthy individuals and patients with mitochondrial disease. However, it was assumed that the circular





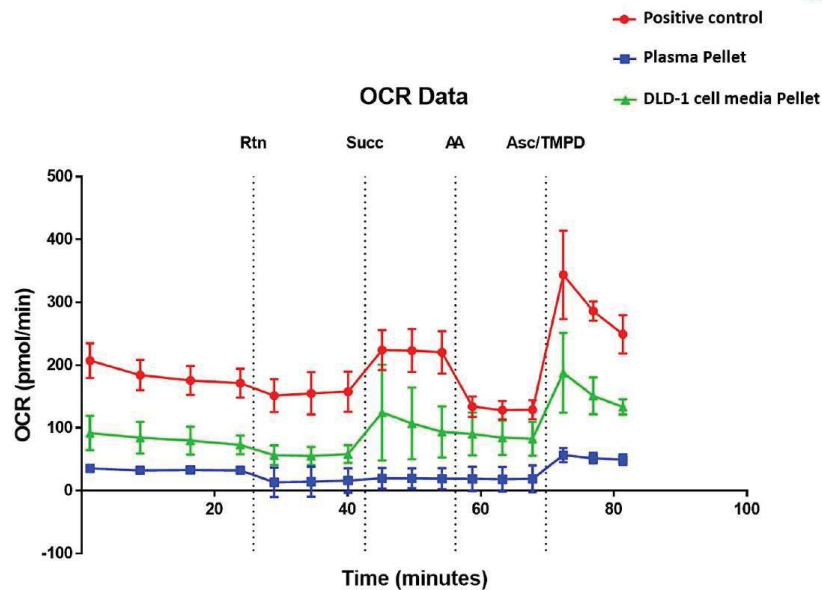
**FIGURE 6** Both plasma of healthy individuals and cell culture media contain structurally intact mitochondria. Fluorescence microscopy images of the MitoTracker Green stained 16gP from PPAP plasma A, SW620 CCCM B, and DLD-1 CCCM C, Electron microscopy images of the 16gP from of a PPAP plasma D, SW620 CCCM E, and DLD-1 CCCM F.

nature of mitochondrial DNA delays its degradation by circulating nucleases, so the presence of intact mitochondria was not suspected and the structural characteristics associated with McfDNA were not investigated.<sup>35</sup>

In addition to observe by fractionation that a great part of mitochondrial DNA is associated to high size structures, we initially found striking differences between McfDNA and NcfDNA in respect to stability and size distribution. McfDNA is composed of, at least, two size-populations: one minor composed of fragments from 30 to 300 bp and one major composed of DNA of size higher than 1000 bp. We hypothesize, based on the exponential increase of McfDNA

from 300 to 30 nucleotides, that the minor population represent DNA fragments in a dynamic degradation process.

All cell-free mitochondria in human plasma or cell culture media supernatant as observed by EM were not surrounded by a bi- or multi-layer phospholipid membrane. A few studies suggested that mitochondrial DNA could be encapsulated in extracellular vesicles such as exosomes and microvesicles, and act as efficient messengers in many biological systems.<sup>34</sup> One can speculate that the previously described biological effect of cell-free mitochondrial DNA enriched micro-particles could, as well, be performed by cell-free intact mitochondria as their presence in blood was not known before the study



**FIGURE 7** Both plasma of healthy individuals and cell culture media contain respiratory competent mitochondria. The electron flow experiment was performed using a seahorse XF96 instrument. Like the positive control (Isolated mitochondria from DLD-1), OCR was detectable in both 16gP from DLD-1 cell media and plasma pool, in the presence of pyruvate and malate that drive respiration via complex I. There was a decrease in OCR when rotenone was injected, indicating an inhibition of complex I-driven respiration. When complex II-driven respiration was initiated, by sequential addition of succinate, a slight increase in OCR was observed, indicating that complex II may be functional. The inhibition of complex III (antimycin A) and the stimulation of complex IV (ascorbate + TMPD), led to a detectable activity of cytochrome C/complex IV in all the samples. Each value shown was from a minimum of three replicates. The data are presented as mean (symbol)  $\pm$  SD (line). The four injections are shown as dashed lines.

of Boudreau et al. and Puhm et al. on activated platelet and monocyte preparation.<sup>33,36</sup>

We believe that circulating cell-free intact mitochondria have crucial biological and physiological roles because mitochondria are already known as systemic messengers in cell-cell communication by transferring hereditary and nonhereditary constituents. Mitochondria were recently discovered to translocate from one cell to the other.<sup>37</sup> Indeed intercellular mitochondria trafficking was observed in vitro and in vivo, both in physiological and pathophysiological conditions including tissue injury and cancer.<sup>38</sup> In particular, the mitochondria transfer between differentiated and mesenchymal stem cells was observed in cardiomyocytes and endothelial cells as a means to rescue injured tissues.<sup>39</sup> Similarly, mitochondria are able to be internalized by different types of cells, by macro pinocytosis which is an endocytic pathway specific for large vesicles.<sup>40</sup> Clinical transplantation of mitochondria between cells is an active area of research but the specific mechanisms and critical factors involved in natural mitochondria transfer between the donor cells and recipient cells remain to be fully characterized.<sup>41</sup>

We speculate that mitochondrial clearance and degradation occurs principally by phagocytosis. This study is the first showing free structurally intact mitochondria in plasma, but it is not yet known how they are degraded there, in

contrast to intracellular mitophagy, which is well described.<sup>42</sup> Presumably, mitochondria are degraded in plasma, and their content is released in the blood stream. Furthermore, it has been demonstrated that those organelles harbor many damage associated molecular patterns (DAMPs) including DNA, lipids, and metabolites, which are capable of activating immune cells and inducing an inflammatory response.<sup>43,44</sup> Our data demonstrate the presence of quintessential ancient symbiotic energy-providing component of all eukaryotic cells, the mitochondrion, as a previously unappreciated constituent of a critical organ, the blood. Further investigations are warranted to evaluate the impact and the potential implications of this discovery in the field of cell-cell communication, inflammation, and clinical applications.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank P. Blache, T. Salehzada, and C. Jay-Allemand for helpful comments. We are grateful to J. Venables (Science Sense) for help in editing the manuscript. We are grateful to the MRI platform (Montpellier Bio campus) for access to imaging facilities, and to METAMONTP platform for access to seahorse technology (M-L. Vignais). We thank B. Chabi (INRA, UMR 0866 DMEM Dynamique Musculaire et Métabolisme, Centre de recherche de Montpellier, Montpellier, France) for her contribution to the



oxygraph experiment. We thank A. Turtoi for providing us CCD-18Co cell line and reagents. ART is supported by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

### CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Z. Al Amir Dache, C. Prevostel, and A.R. Thierry designed the study, developed the methodology, analyzed the data and prepared the manuscript. Z. Al Amir Dache, A. Otandault, R. Tanos, B. Pastor, R. Meddeb, C. Sanchez, G. Arena, L. Lasorsa, A. Bennett, T. Grange, and S. El Messaoudi realized the experiments. All of the authors (Z. Al Amir Dache, A. Otandault, R. Tanos, B. Pastor, R. Meddeb, C. Sanchez, G. Arena, L. Lasorsa, A. Bennett, T. Grange, S. El Messaoudi, T. Mazard, C. Prevostel, and A.R. Thierry) discussed the results and approved the manuscript.

### MATERIALS AND CORRESPONDENCE

The published article includes all data generated or analyzed during this study. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact: alain.thierry@inserm.fr.

### REFERENCES

1. Roberts RG. Mitochondria—a billion years of cohabitation. *PLoS Biol.* 2017;15:e2002338.
2. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature.* 2010;467:929-934.
3. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell.* 2012;148:1145-1159.
4. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:566-578.
5. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis. *Annu Rev Genet.* 2009;43:95-118.
6. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci.* 2012;125:807-815.
7. Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, et al. Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the american heart association. *Circ Res.* 2016;118:1960-1991.
8. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature.* 2014;505:335-343.
9. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35:347-376.
10. Chiu RWK, Chan LYS, Lam NYL, et al. Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin Chem.* 2003;49:719-726.
11. Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges. *Mitochondrial DNA.* 2012;23:329-332.
12. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer.* 2009;8:105.
13. Malik AN, Parsade CK, Ajaz S, et al. Altered circulating mitochondrial DNA and increased inflammation in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2015;110:257-265.
14. Sudakov NP, Popkova TP, Katyshev AI, et al. Level of blood cell-free circulating mitochondrial DNA as a novel biomarker of acute myocardial ischemia. *Biochemistry (Moscow).* 2015;80:1387-1392.
15. Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 MAP kinase. *Shock.* 2010;34:55-59.
16. Otandault A, Anker P, Al Amir Dache Z, et al. Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Ann Oncol.* 2019;30:374-384.
17. Sanchez C, Snyder MW, Tanos R, Shendure J, Thierry AR. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *npj Genomic Med.* 2018;3:31.
18. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell.* 2016;164:57-68.
19. Meddeb R, Dache ZAA, Thezenas S, et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Sci Rep.* 2019;9:5220.
20. Fliss MS. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science.* 2000;287:2017-2019.
21. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clin Chem.* 2019;65:623-633.
22. Gansauge M-T, Gerber T, Glocke I, et al. Single-stranded DNA library preparation from highly degraded DNA using T4 DNA ligase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:e79.
23. Bennett EA, Massilani D, Lizzo G, Daligault J, Geigl E-M, Grange T. Library construction for ancient genomics: single strand or double strand? *Biotechniques.* 2014;56:289-290, 292-296, 298.
24. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.J.* 2011;17:10-12.
25. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25:1754-1760.
26. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078-2079.
27. Moulriere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS ONE.* 2011;6:e23418.
28. Zhang R, Nakahira K, Guo X, Choi AMK, Gu Z. Very short mitochondrial DNA fragments and heteroplasmy in human plasma. *Sci Rep.* 2016;6:36097.
29. Rigotherier C, Daculsi R, Lepreux S, et al. CD154 induces matrix metalloproteinase-9 secretion in human podocytes. *J Cell Biochem.* 2016;117:2737-2747.
30. Coumans FAW, Brisson AR, Buzas EI, et al. Methodological guidelines to study extracellular vesicles. *Circ Res.* 2017;120:1632-1648.
31. Dames S, Eilbeck K, Mao R. A high-throughput next-generation sequencing assay for the mitochondrial genome. *Methods Mol Biol (Clifton, N.J.).* 2015;1264:77-88.
32. Wiemerslage L, Ismael S, Lee D. Early alterations of mitochondrial morphology in dopaminergic neurons from Parkinson's disease-like pathology and time-dependent neuroprotection with D2 receptor activation. *Mitochondrion.* 2016;30:138-147.
33. Boudreau LH, Duchez A-C, Cloutier N, et al. Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood.* 2014;124:2173-2183.
34. Sansone P, Savini C, Kurelac I, et al. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy

- in hormonal therapy-resistant breast cancer. *PNAS*. 2017;114:E9066-E9075.
35. Newell C, Hume S, Greenway SC, Podemski L, Shearer J, Khan A. Plasma-derived cell-free mitochondrial DNA: a novel non-invasive methodology to identify mitochondrial DNA haplogroups in humans. *Mol Genet Metab*. 2018;125:332-337.
36. Florian P, Taras A, Ulrike R, et al. Mitochondria are a subset of extracellular vesicles released by activated monocytes and induce type I IFN and TNF responses in endothelial cells. *Circ Res*. 2019;125:43-52.
37. Torralba D, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Mitochondria know no boundaries: mechanisms and functions of intercellular mitochondrial transfer. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:107.
38. Rodríguez A-M, Nakhle J, Griessinger E, Vignais M-L. Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. *Cell Cycle*. 2018;17:712-721.
39. Mahrouf-Yorgov M, Augeul L, Da Silva CC, et al. Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death Differ*. 2017;24:1224-1238.
40. Patel D, Rorbach J, Downes K, Szukszto MJ, Pekalski ML, Minczuk M. Macropinocytic entry of isolated mitochondria in epidermal growth factor-activated human osteosarcoma cells. *Sci Rep*. 2017;7:12886.
41. Wang J, Li H, Yao Y, et al. Stem cell-derived mitochondria transplantation: a novel strategy and the challenges for the treatment of tissue injury. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9:106.
42. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He Y-W. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol*. 2009;182:4046-4055.
43. Grazioli S, Pugin J. Mitochondrial damage-associated molecular patterns: from inflammatory signaling to human diseases. *Front Immunol*. 2018;9:832.
44. Rodríguez-Nuevo A, Zorzano A. The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell Stress*. 2019;3:195-207.

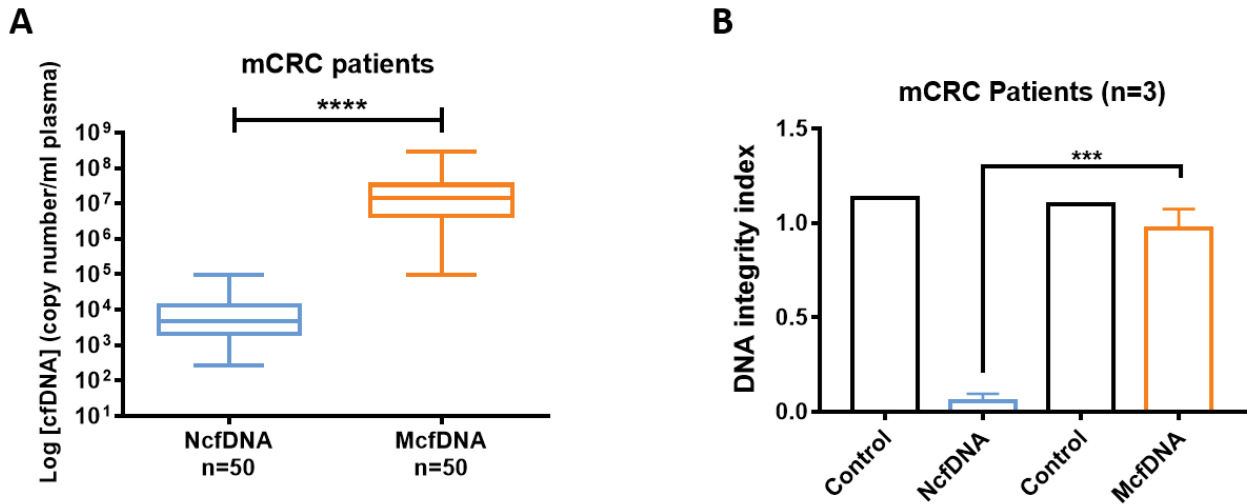
### SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Al Amir Dache Z, Otandault A, Tanos R, et al. Blood contains circulating cell free respiratory competent mitochondria. *The FASEB Journal*. 2020;00:1–15. <https://doi.org/10.1096/fj.201901917RR>

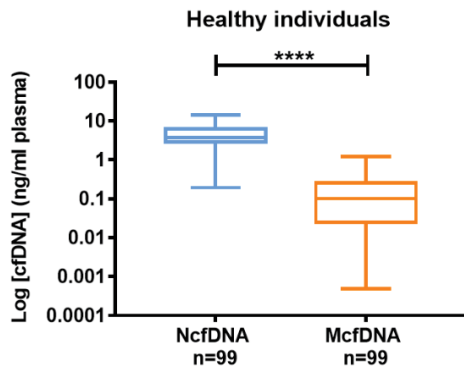
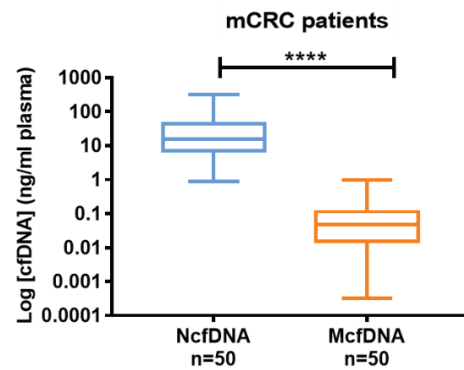
## Supplemental Information

- **Figure S1-6**
- **Table S1-3**



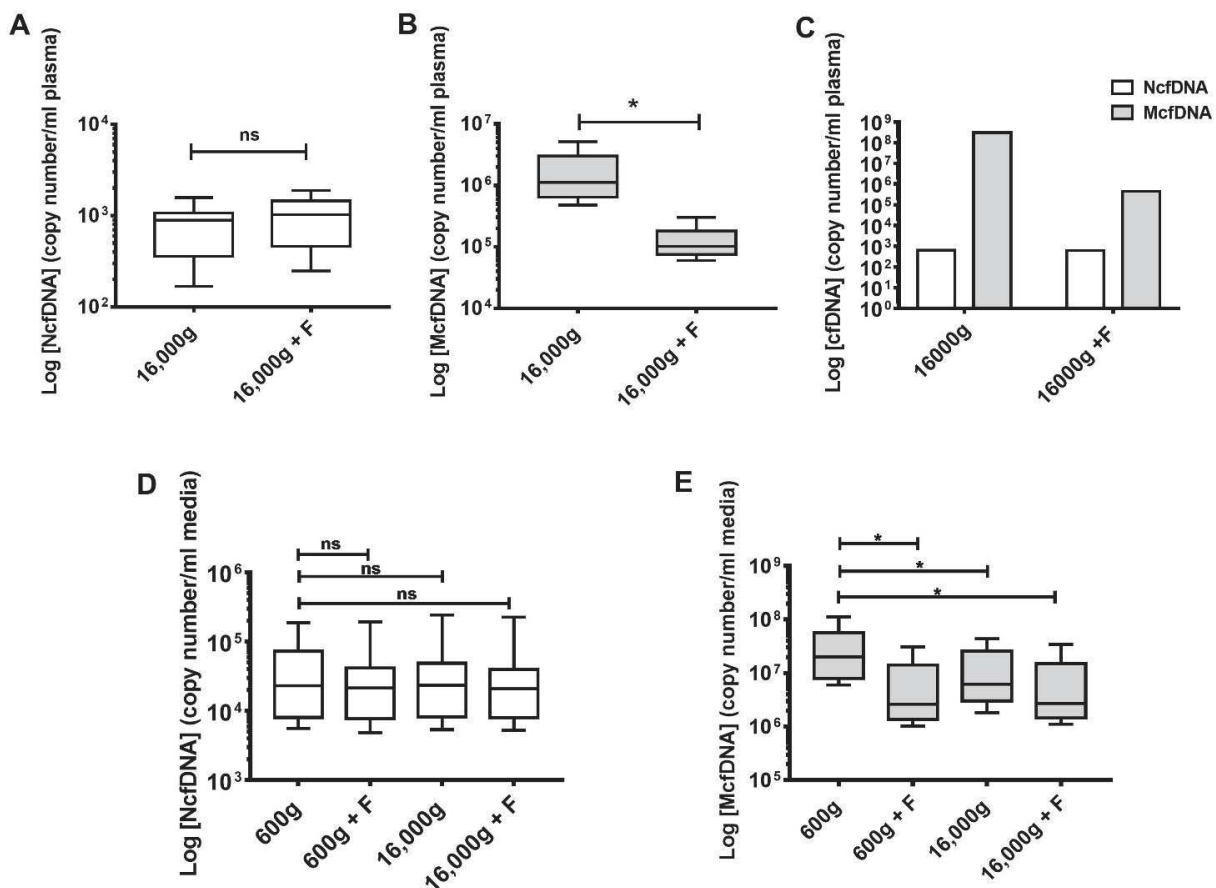
**Figure S 1: Respective concentration and fragmentation index of N- and McdDNA in mCRC patient plasma.**

**(A)** Quantification of circulating DNA from nuclear (NcfDNA) and mitochondrial (McdDNA) origin, in 50 patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) as expressed in copy number/ml, demonstrating significantly more mitochondrial than nuclear genome copies.  $p < 0.0001$ . **(B)** Integrity index of NcfDNA and McdDNA examined in 3 plasma samples from mCRC patients, demonstrating that McdDNA is significantly less fragmented than NcfDNA.  $p = 0.0001$ .

**A****B**

**Figure S 2: Respective concentration of N- and McfDNA in healthy individuals and mCRC patient plasma in ng/ml.**

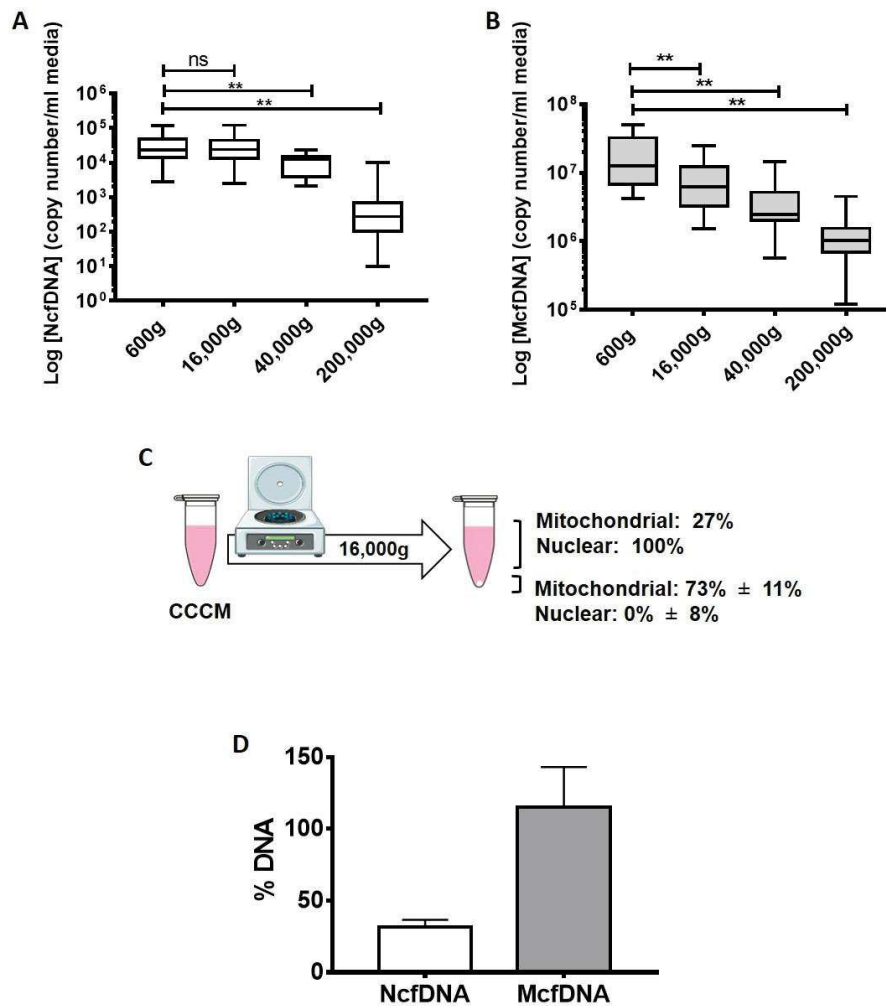
Quantification of circulating DNA from nuclear (NcfDNA) and mitochondrial (McfDNA) origin, in 99 plasma samples of healthy individuals **(A)** and in 50 patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) **(B)** as expressed in ng/ml.  $p < 0.0001$ .



**Figure S 3: Filtration step demonstrating that structures associated with McfDNA are larger than 0,22  $\mu$ m in both plasma and cell media supernatant.**

Copy number of either **(A)** NcfDNA or **(B)** McfDNA in filtered or non-filtered (0.22 $\mu$ m) plasma of healthy individuals, extracted by ficoll, and quantified by q-PCR. The copy number of NcfDNA was not affected by filtration while the copy number of McfDNA was significantly decreased. F= Filtration, NcfDNA,  $p=0.3185$ , McfDNA,  $p=0.0121$ ,  $n=9$ . **(C)** Filtration process performed on plasma extracted by a different protocol (two centrifugation steps at 1,200g then 16,000g), that validate the results obtained in A and B. Copy number of either **(D)** NcfDNA or **(E)** McfDNA in DLD-1/SW620/CCD-18Co culture medium processed by 4 different protocols (one centrifugation at 600 g without or with 0.22  $\mu$ m filtration/ two centrifugation steps at 600g and 16,000g without or with 0.22  $\mu$ m filtration). A significant decrease of the copy number of McfDNA upon filtration or 16,000g centrifugation is observed in cell culture media.  $n=8$ . Probabilities: between 600g and 600g + F,  $p=0.0275$ ; between 600g and 16,000g,  $p=0.0313$ ; between 600g and 16,000g + F,  $p=0.0256$ . Results are similar to those from plasma (Figure 3A-D-E).

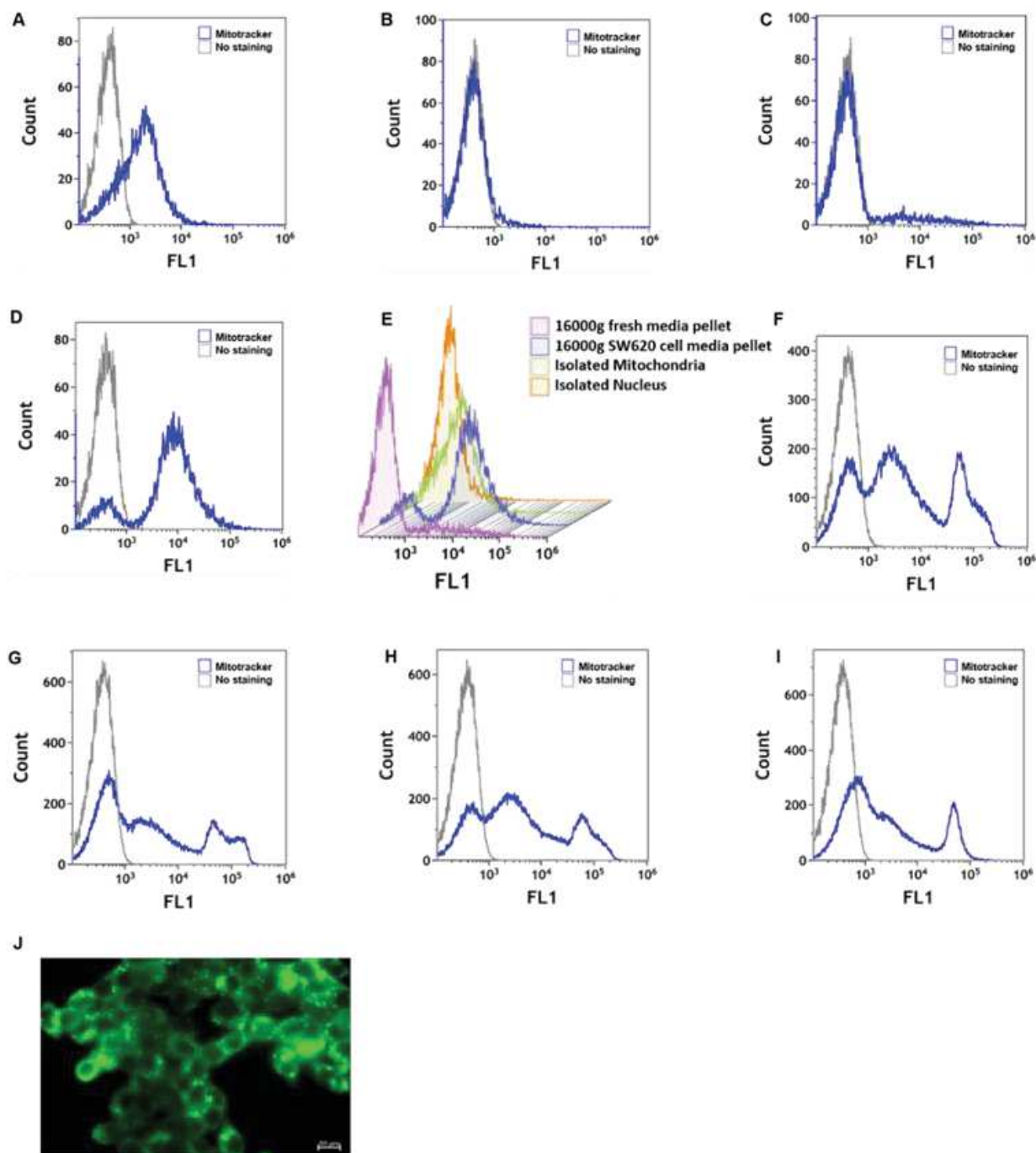




**Figure S 4: Cell free McfDNA containing structures are stable and pelleted by 16 000g centrifugations of cell culture media.**

Copy number of either **(A)** NcfDNA or **(B)** McfDNA in DLD1, SW620 or CCD-18Co cell culture medium quantified by q-PCR after each centrifugation step (600g/16,000g/40,000 g/200,000g). We found that (i), most of the McfDNA from cell culture media is pelleted after the 16,000g centrifugation; (ii) an augmentation of the decrease of the copy number of both NcfDNA and McfDNA with serial centrifugation steps suggesting the presence of distinct structures of cfDNA in the cell culture media; and (iii), NcfDNA and McfDNA were both detected in the supernatant collected after the 200,000 g centrifugation, suggesting the presence of vesicle-free NcfDNA and McfDNA. n=14. NcfDNA: *Between 600g and 16,000g, p=0.4817; between 600g and 40,000g, p=0.0044; between 600g and 200,000g, p=0.0015. McfDNA: Between 600g and 16,000g, p=0.0034; between 600g and 40,000g, p=0.0023; between 600g and 200,000g, p=0.0013.* **(C)** Schematic view of the proportion of mitochondrial and nuclear cfDNA in the cell-culture media supernatant after an initial centrifugation at 600g for 10min and a second at 16,000g for 10 min. Values are determined as described in table S1. (CCCM, Centrifuged cell culture media). **(D)** The 16gP from cell media supernatant (50 flask T-

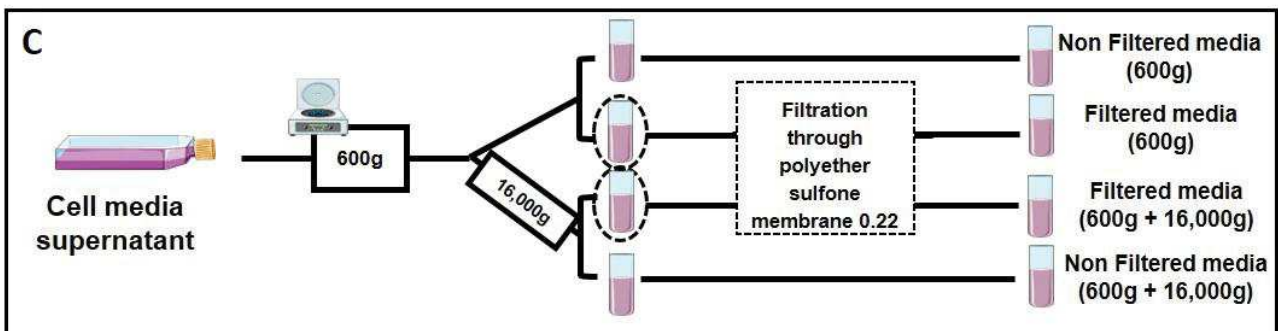
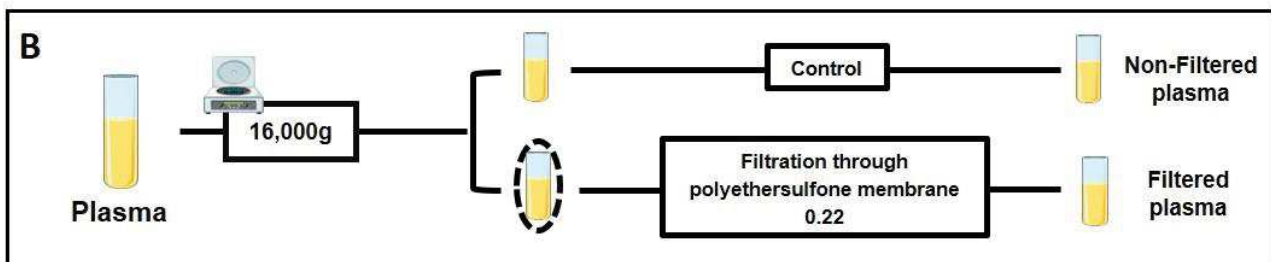
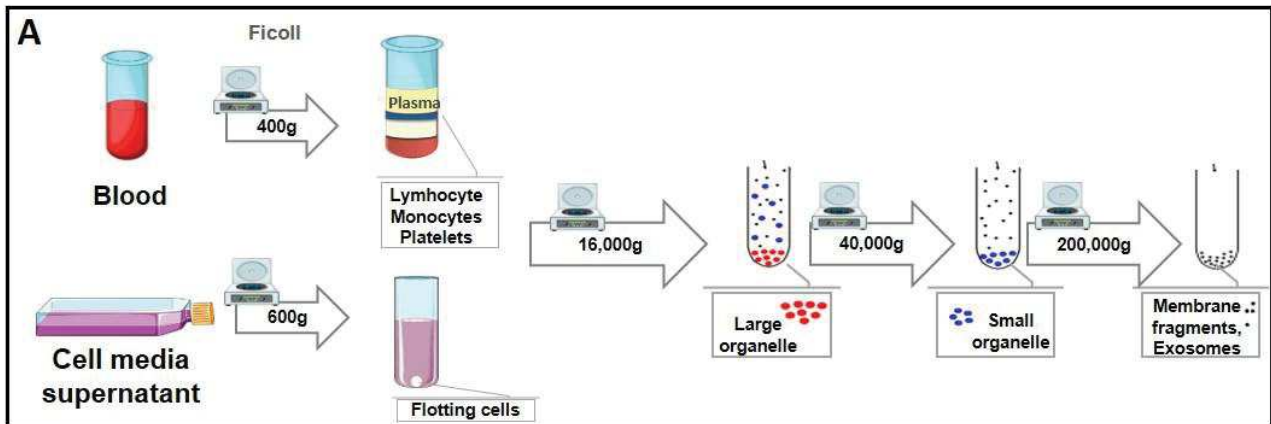
75/cell line) was treated, or not, with 1 U of DNase I (Thermo Fischer, Illkirch , France) for 30min at 37°C. After DNase I inactivation with 2.5mM EDTA for 10min at 65°C, DNA was extracted and quantified by q-PCR analysis. The NcfDNA significantly decreased with DNase I treatment whereas McfDNA was unaffected by DNase I treatment.



**Figure S 5: Flow cytometry analysis of mitoTracker Green staining.**

Blue histograms were obtained from MitoTracker-stained samples, and grey histograms, from non-stained samples. Mitochondria singlets were selected using the gating procedure described in Methods section. Figure parts highlight (A) MitoTracker Green-positive isolated mitochondria from SW620 cells (positive control); (B) MitoTracker Green-negative SW620 nucleus (negative control); (C) MitoTracker Green-negative isolated 16gP from fresh RPMI medium (negative control) (D) MitoTracker Green-positive isolated 16gP from the SW620 cell culture medium. (E) Plots of the blue histograms from the four MitoTracker Green-

stained samples (A-B-C-D): (purple, 16gP from fresh media; blue, the 16gP from the SW620 cell culture medium; green, mitochondria isolated from SW620 cells; and orange, isolated nucleus from SW620 cells). The overlay of histograms of the positive control and of the 16gP from the SW620 culture medium clearly demonstrates the presence of mitochondria in the SW620 cell culture medium pellet. Analysis of MitoTracker Green-stained 16gP from ficoll extracted plasma of other healthy donors #2 (**F**), #3 (**G**), #4 (**H**) and #5 (**I**). We confirmed the presence of mitochondria in the plasma 16gP in all four donor's plasma. (**J**) Fluorescence microscopy images of the MitoTracker Green stained cells without fixation



**D**

Centrifugation speed (g) for cell-free mitochondria isolation	SP	-	-	-	1,200	-	16,000
		400	-	-	-	-	16,000
	FP	400	600	-	1,200	2,000	16,000
		200	200	300	1,100	2,500	16,000
		200	200	300	1,100	2,500	8,000
	CCCM	600	600	-	1,200	-	16,000
		600	600	-	1,200	-	8,000

**E**

Differential Centrifugation Speed (g)	FP	400	16,000	40,000	200,000
	CCCM	600	16,000	40,000	200,000

**Figure S 6: Schematic view of the protocols used in this study.**

**(A)** Differential centrifugations of plasma extracted by Ficoll and cell media supernatant. The plasma was isolated at 400g with Ficoll gradient, and the cell culture media was centrifuged at 600g. Both were centrifuged after, at 16,000g for 10min at 4°C, (Microstar centrifuge, vwr), and then further centrifuged at 40,000g for 1 h at 4°C and finally at 200,000g for 2 h at 4°C (Beckman MLA-130 Ultracentrifuge Rotor). After each centrifugation step, the cfDNA was extracted from supernatants for q-PCR analysis. **(B)** Filtration of plasma isolated by Ficoll, or by 1,200g centrifugation. After isolation, plasma was centrifuged at 16,000g for 10 min at 4°C and aliquoted in 2 equal volumes for each individual; one was considered as a control with no additional treatment and the other aliquot was filtered with a 0.22 µM filter (Sartorius Minisart high flow, Fisher Scientific, Illkirch, France). The cfDNA was extracted and then analyzed by q-PCR. **(C)** Filtration of the 600g centrifuged cell culture media and the isolated plasma without platelet activation. They were both aliquoted in 4 equal volumes; the first was considered as a control, the second was filtered with a 0.22 µM filter, the third was centrifuged at 16,000g for 10 min at 4°C and the fourth aliquot was centrifuged at 16,000g for 10min at 4°C and further filtered with a 0.22 µM filter. The cfDNA was extracted and then analyzed by q-PCR. **(D)** Table summarizing the different centrifugation protocols used in this study for isolating and characterizing cell free mitochondria. SP, Standard protocol for plasma isolation in EDTA tube by double centrifugation; FP, Plasma extracted by Ficoll gradient; PPAP, protocol precluding activation of platelet; CCCM, centrifuged cell culture media. **(E)**, Protocols using differential centrifugation speeds up to 200,000g.

**Table S 1: Primers used in PCR analysis.**

\* 5' amino-C6 modification, F: Forward, R: Reverse.

Primer	Sequence 5' → 3'	Amplicon size (bp)
MIT MT-CO3 F	GACCCACCAATCACATGC	
MIT MT-CO3 R1	TGAGAGGGCCCCTGTTAG	67
MIT MT-CO3 R2	CTCAGAAAAATCCTGCGAAGA	296
KRAS F1	CCTTGGGTTTCAAGTTATATG	67
KRAS F2	GCCTGCTGAAAATGACTGA	305
KRAS R1	CCCTGACATACTCCCAAGGA	
Mito1 F	*ACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCC	3,968
Mito1 R	*TGAGATTGTTTGGGCTACTGCTCGCAGTGC	
Mito2 F	*TACTCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAATC	5,513
Mito2 R	*GCTTGGATTAAGGCGACAGCGATTTCTAGGATAGT	
Mito3 F	*TCATTTTTATTGCCACAATAACCTCCTCGGACTC	7,814
Mito3 R	*CGTGATGTCTTATTTAAGGGGAACGTGTGGGCTAT	
hmt 1 F	*AACCAAACCCCAAAGACACC	9,289
hmt 1 R	*GCCAATAATGACGTGAAGTCC	
hmt 2 F	*TCCCCTCCTAAACACATCC	7,626
hmt 2 R	*TTTATGGGGTGATGTGAGCC	

**Table S 2: Estimation of M- and NcfDNA copy number variation in plasma and in centrifuged cell culture media after 16,000g centrifugation.**

	DNA copy number/ml of supernatant				DNA Copy number variation in the supernatant (%)		
	Nuclear		Mitochondrial		Nuclear	Mitochondrial	
	2500g	16 000g	2500g	16 000g			
Healthy donor (1)	664	901	2 820 000	750 000	136	27	
Healthy donor (2)	1 553	1 350	9 060 000	4 320 000	87	48	
Healthy donor (3)	1 295	983	3 540 000	600 000	76	17	
Healthy donor (4)	789	741	8 640 000	1 200 000	94	14	
					98	26	Mean
					90	22	Median
					26	15	SD
	DNA copy number/ml of supernatant				DNA Copy number variation in the supernatant (%)		
	Nuclear		Mitochondrial		Nuclear	Mitochondrial	
	600g	16 000g	600g	16 000g			
DLD1 (1)	13 761	13 855	6 000 000	3 300 000	97	27	
DLD1 (2)	19 745	19 994	9 900 000	4 200 000	99	47	
DLD1 (3)	17 900	17 312	12 810 000	3 468 000	101	55	
DLD1 (4)	26 133	25 764	11 130 000	5 190 000	101	42	
SW620 (1)	26 494	26 803	30 330 000	8 310 000	101	26	
SW620 (2)	32 270	32 521	35 400 000	9 090 000	100	27	
SW620 (3)	119 588	121 176	46 530 000	12 240 000	101	27	
SW620 (4)	105 848	106 376	45 960 000	12 300 000	101	26	
CCD-18co (1)	5 599	5 348	8 310 000	1 830 000	72	36	
CCD-18co (2)	6 158	6 312	7 860 000	2 931 000	90	20	
CCD-18co (3)	4 227	3 048	7 320 000	2 670 000	96	22	
CCD-18co (4)	2 809	2 539	7 680 000	1 530 000	103	37	
					97	33	Mean
					101	27	Median
					8	11	SD



**Table S 3: Estimation of the cell free mitochondria number in plasma based on mitochondrial DNA copy number as assessed by Q-PCR of centrifuged and filtrated plasma.**

Estimations were made on filtrates and 16,000g pellets, and were based on one of two assumptions: namely 2 or 10 mitochondrial genome copies per mitochondria. Note, 16,000g centrifugation and 0.22µm filtration gave similar cell-free mitochondria numbers in plasma. The lowest and the highest concentration were 207,000 and 3,720,000/mL in the four healthy individual plasma samples when taking into consideration both filtration and centrifugation protocols, and both assumptions.

Centrifuged plasma	mtDNA copy number/ml of supernatant		mtDNA copy number/ml in the 16,000g pellet	Mitochondria number /ml plasma (10copies/mitochondria)	Mitochondria number /ml plasma (2copies/mitochondria)	
	2,500g	16,000g				
Healthy donor (1)	2,820,000	750,000	2,070,000	207,000	1,035,000	
Healthy donor (2)	9,060,000	4,320,000	4,740,000	474,000	2,370,000	
Healthy donor (3)	3,540,000	600,000	2,940,000	294,000	1,470,000	
Healthy donor (4)	8,640,000	1,200,000	7,440,000	744,000	3,720,000	
				429,750	2,148,750	<b>Mean</b>
				384,000	1,920,000	<b>Median</b>
				237,176	1,185,878	<b>SD</b>

Filtrated plasma	mtDNA copy number/ml of supernatant		mtDNA copy number/ml in the pellet at 16000g	Mitochondria number /ml plasma (10copies/mitochondria)	Mitochondria number /ml plasma (2copies/mitochondria)	
	2,500g	2,500g +F				
Healthy donor (1)	2,820,000	690,000	2,130,000	213,000	1,065,000	
Healthy donor (2)	9,060,000	2,670,000	6,390,000	639,000	3,195,000	
Healthy donor (3)	3,540,000	600,000	2,940,000	294,000	1,470,000	
Healthy donor (4)	8,640,000	1,380,000	7,260,000	726,000	3,630,000	
				447,000	2,235,000	<b>Mean</b>
				363,000	1,815,000	<b>Median</b>
				252,393	1,261,963	<b>SD</b>

## IV. Analyse critique de la méthodologie et des résultats :

L'analyse critique de la méthodologie et des résultats est réalisée selon l'ordre chronologique dans lequel ont été réalisées les expériences.

### A. Etude des profils de taille de l'ADN circulant d'origines mitochondriale et nucléaire

#### Techniques utilisées :

- Q-PCR
- Whole genome sequencing (WGS) (en collaboration avec l'Institut Jacques Monot, Paris)

#### Figures 1 et S1 :

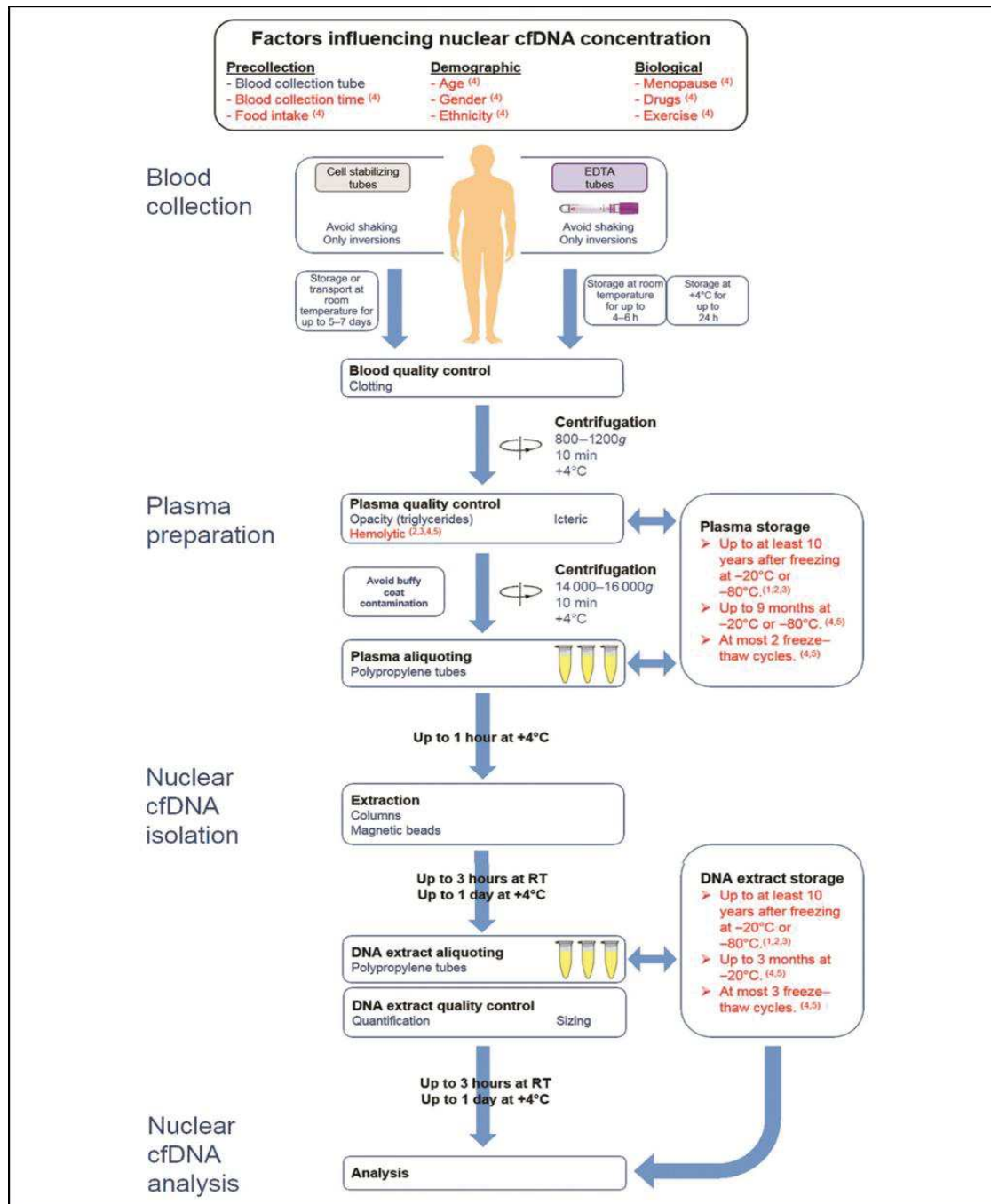
Les expériences ont été réalisées sur du plasma isolé à partir de sang d'individus sains et de patients atteints de cancer colorectal métastatique (mCRC).

Le protocole de traitement des échantillons a été choisi sur la base de travaux antérieurement menés au sein de l'équipe et ayant établi les conditions pré-analytiques optimales pour l'étude de l'ADN circulant(347, 348).

Le protocole préconise (347, 348):

- D'utiliser des tubes EDTA pour le prélèvement du sang.
- D'utiliser du plasma, et non pas du sérum, comme matrice.
- D'éviter l'agitation des échantillons de sang.
- De conserver le sang à température ambiante sur une période inférieure à 4h.
- D'isoler le plasma par deux centrifugation à 1200 g et ensuite à 16000 g pendant 10 min à 4°C. La deuxième étape peut être réalisée avant ou après stockage de l'échantillon de plasma à - 20 °C ou - 80 °C.
- De limiter à deux le nombre de cycles de congélation/décongélation des échantillons de plasma.
- D'utiliser le Qiagen Blood Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France) pour extraire le plasma.
- De limiter à trois le nombre de cycles de congélation-décongélation des extraits d'ADN.
- D'utiliser des extraits d'ADN circulant dans un délai de trois mois de stockage à - 20°C.

Les conditions pré-analytiques et le traitement des échantillons de sang sont détaillés dans le schéma ci-dessous. (Figure 20)



**Fig. 1. Guideline for nuclear cfDNA analysis.**

In red, specific application requirements: (1) detection of a specific normal sequence; (2) detection of genetic alterations; (3) detection of epigenetic alterations; (4) quantification; (5) determination of fragmentation level.

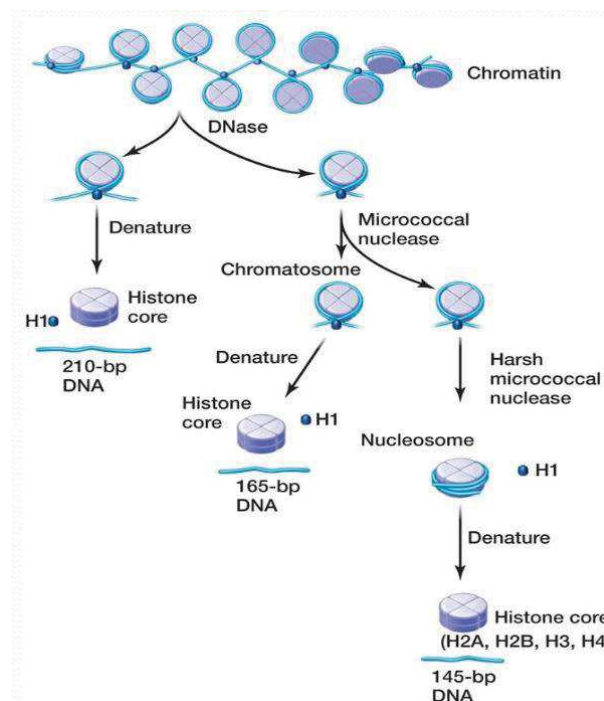
**Figure 20: Guideline pour l'analyse de l'ADN circulant d'origine nucléaire. Ref 348**

Figures 1 A, et sup 1A : Quantification par q-PCR (nombre de copies/ml de plasma) de l'ADN circulant nucléaire et mitochondrial chez des individus sains et des patients mCRC, respectivement.

Cette quantification a été réalisée comme décrit dans la partie « matériel et méthodes » (pages 81,82) à l'aide d'amorces permettant d'amplifier des séquences de 67 pb et qui permettent donc une détection sélective de fragments de taille supérieure ou égale à 67 pb.

Figure 1C, et sup 1B : Indice d'intégrité calculé pour l'ADN circulant d'origines nucléaire et mitochondriale extrait du plasma de 13 individus sains et de 3 patients mCRC, respectivement. L'indice est inversement corrélé avec le degré de fragmentation de l'ADN en accord avec la référence(163).

Cet indice est le rapport de la concentration d'ADNcir obtenue en amplifiant une séquence de  $\approx 300$  pb (296 pour l'ADN mitochondrial, et 305 pour l'ADN nucléaire) sur la concentration d'ADN obtenue en amplifiant une séquence de 67 pb (ADN mitochondrial et ADN nucléaire). Ces tailles d'amplicons ont été choisies sur la base de données démontrant que le NcfDNA est principalement composé d'ADN associé à un mono-nucléosome ou chromatosome dans lequel les fragments d'ADN varient entre 80 et 220 pb(157, 167) (Figure 21).



**Figure 21:** Structure d'un nucléosome/chromatosome et tailles d'ADN correspondantes (pb).

[https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/lecture\\_3\\_molecular\\_biology\\_chromatin\\_organization.pdf](https://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/lecture_3_molecular_biology_chromatin_organization.pdf)

Le DII moyen de l'ADNcir nucléaire est de 0.35, ce qui indique qu'environ 35% des fragments ont une taille supérieure à 300 pb. Par conséquent, 65 % des fragments ont une taille comprise entre 67 et 300 pb. En revanche, le DII moyen de l'ADNcir mitochondrial est supérieur à 1, ce qui indique que la majorité des fragments détectés sur la cohorte de 99 individus sains et 55 patients mCRC ont une taille supérieure à 296 pb. Les données présentées dans la figure 1 démontrent que le McfDNA est moins sensible à la fragmentation que le NcfDNA.

*Figure 1D* : Quantification par q-PCR des fragments McfDNA inférieurs et supérieurs à 500 pb, isolés sur gel d'agarose (extrait d'un pool de 80 échantillons de plasma d'individus sains).

La répartition est la suivante :

- ≈ 90% des McfDNA ont une taille supérieure à 500bp.
- ≈ 10% des McfDNA ont une taille inférieure à 500bp.

Puisque l'amplification par q-PCR a été réalisée à l'aide d'un ensemble d'amorces ciblant une séquence de 67 bp, les 10 % restants de McfDNA ont une taille comprise entre 67bp et 500bp. Les résultats de la figure 1D sont en accord avec ceux de la figure 1C, ce qui indique que les fragments de McfDNA ont majoritairement une taille supérieure à 500 pb.

L'une des limitations de ces expériences est liée à la taille de l'amplicon de 67 pb. En effet, les 100% considérés dans ces expériences ne correspondent qu'aux fragments d'ADN d'une taille supérieure ou égale à 67 pb, mais ne prennent pas en compte les fragments inférieurs à 67pb, dont la quantité pourrait ne pas être négligeable.

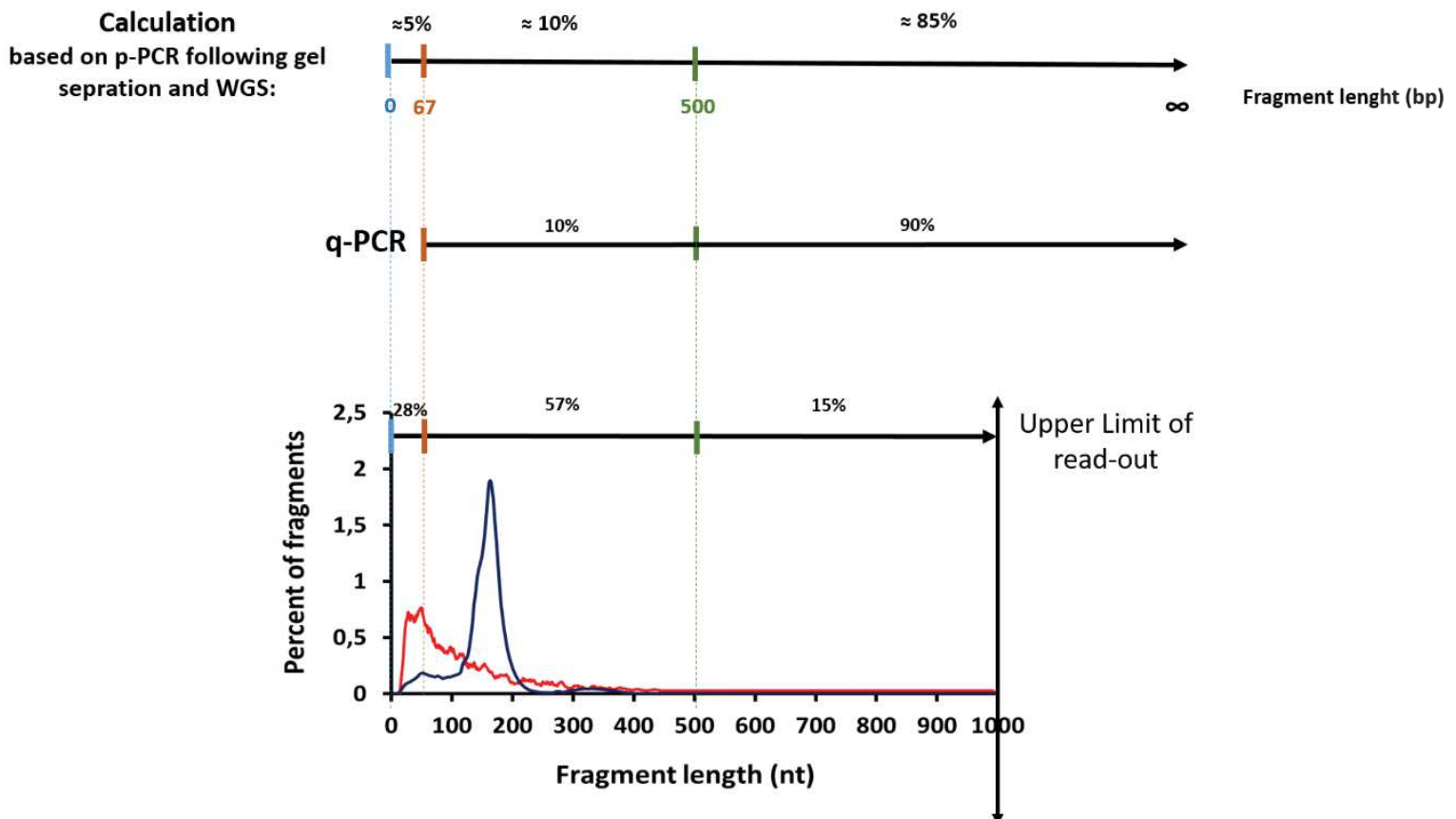
*Figure 1E*: Profil de taille obtenu dans des extraits de plasma d'individus sains, par la technique de "paired end massive parallel Whole Genome Sequencing" ou WGS (résolution à la base près), basée sur la préparation de bibliothèques d'ADN simple brin.

Les résultats montrent clairement un pic majeur de 167 pb pour la population de fragments de NcfDNA, ce qui correspond à la taille de l'ADN associé à un chromosome, comme récemment décrit (157, 167). En revanche, la répartition de la population de McfDNA n'est pas homogène, les tailles des fragments s'étalant entre 30 et 300 pb.

La limite supérieure de lecture de ce type de séquençage est de 1000 pb, ce qui signifie que tous les fragments de NcfDNA et de McfDNA supérieurs à 1000 pb ne sont pas détectés ici. Etant donné que 1) aucun fragment de McfDNA n'a été détecté entre 300 et 1000 pb par

WGS ; 2) la DII (Fig. 1C) et la migration sur gel d'agarose (Fig. 1D) ont révélé qu'au moins 90% des fragments d'ADN mitochondrial (>67 bp) ont une taille supérieure à 300bp et 500bp, nous pouvons en conclure que ces fragments de McfDNA ont une taille supérieure à 1000 pb. Les données de la figure 1 suggèrent cependant que le McfDNA est composé d'au moins deux populations: une population minoritaire composée de fragments dégradés de 30 à 300 pb et une population majoritaire composée de fragments d'une taille supérieure à 1000 pb. L'étude précise des résultats du WGS en comparaison avec les résultats de q-PCR permet de calculer le pourcentage des différentes tailles de population :

- Fragments inférieurs à 67 pb  $\approx$  5 %
- Fragments de 67 à 500 bp  $\approx$  10%.
- Fragments de plus de 500 pb  $\approx$  85 %.



**Figure 22:** Estimation de la distribution de taille des fragments d'ADN circulant d'origine mitochondriale.

Figure 1B : Étude cinétique de la stabilité de l'ADNcir d'origines nucléaire et mitochondriale dans le milieu de culture cellulaire incubé à 37°C.

Le surnageant du milieu de culture des cellules SW620 a été traité de la même façon que le sang, par deux centrifugations à 1200 et 16000g pendant 10 min à 4°C, séparées par une étape de congélation. Après incubation de ce milieu de culture à 37°C, l'ADN extracellulaire a été quantifié par q-PCR en utilisant les amorces amplifiant une séquence de ≈300 pb. Les résultats montrent très clairement une diminution de ≈80% des fragments d'origine nucléaire dont la taille est supérieure à 300 pb à partir du deuxième jour d'incubation. En revanche, la concentration des fragments d'origine mitochondriale diminue de presque ≈40% à partir du deuxième jour d'incubation et reste stable jusqu'à la fin, confirmant ainsi que l'ADN d'origine mitochondriale est plus stable que l'ADN d'origine nucléaire.

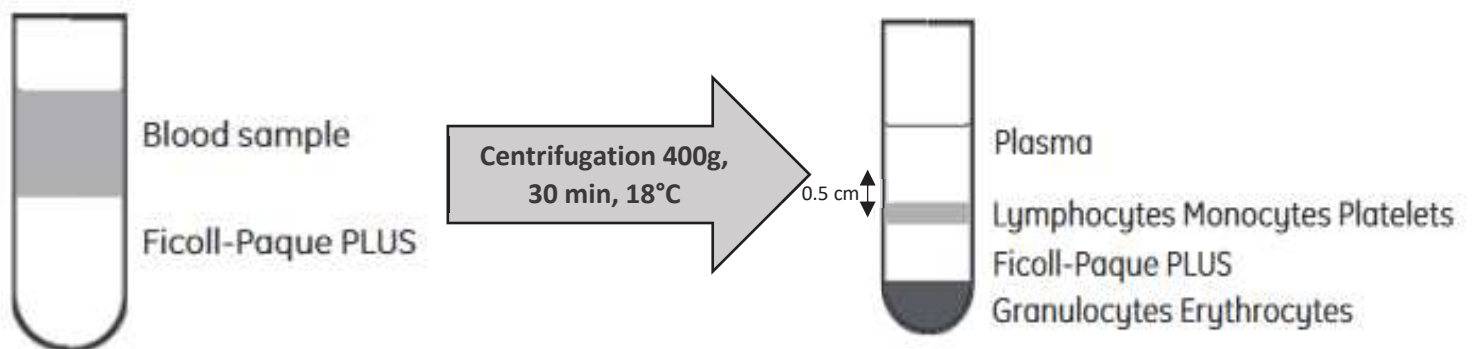
L'étude de cette stabilité a été réalisée *in vitro*, dans un milieu de culture maintenu à 37°C en présence de sérum. Cette étude ne permet en rien de présager de la stabilité de l'ADN circulant mitochondrial *in vivo*.

## **B. Etude de la stabilité de l'ADNcir mitochondrial**

Figure 2, S2, S3 :

Une étude préliminaire de l'effet des centrifugations différentielles sur la quantité d'ADN d'origines nucléaire et mitochondriale dans le plasma a été menée à partir d'échantillons de sang d'individus sains prélevés dans des tubes EDTA, dont le plasma a été isolé par gradient de « Ficoll-paque plus ». Cette méthode d'isolement du plasma a été choisie afin d'éviter toute contamination par les cellules PBMC et les plaquettes. Ce protocole préconise une centrifugation initiale à faible vitesse (400g à 18-20°C pendant 30 min (Figure 23)), ce qui permet d'éviter la lyse des PBMC et des plaquettes qui pourrait avoir lieu à des centrifugations de plus grande vitesse. Le plasma récupéré après cette étape correspond à la couche prélevée à partir de 0,5 cm au-dessus de la couche leucocytaire.





**Figure 23:** Isolement du plasma par Ficoll.

Les structures contenues dans le plasma ainsi isolé ont été séparées en fonction de leur taille et de leur densité par centrifugations différentielles :

- 16000g, pendant 10 min à 4°C, à l'aide de Microstar centrifuge vwr.
- 40000g pendant 1 h à 4°C, à l'aide de Beckman MLA-130 Ultracentrifuge Rotor.
- 200000g pendant 2 h à 4°C, à l'aide de Beckman MLA-130 Ultracentrifuge Rotor.

La majorité des publications recommandent une centrifugation de 10000g à 20000g pour isoler les vésicules extracellulaires de grande taille et de 100000g à 200000g pour isoler les vésicules extracellulaires de petite taille (118, 349–353). Etant donné que le protocole d'isolement du plasma standardisé par l'équipe comporte une étape de centrifugation à 16000g, j'ai décidé de conserver cette étape. Cependant, j'ai décidé d'ajouter une étape intermédiaire de centrifugation à 40000g, pour sédimenter les vésicules de taille moyenne, suivie d'une étape de centrifugation à vitesse maximale pour co-sédimer les vésicules de petite taille avec les débris membranaires et les agrégats de protéines et de lipoprotéines. Après chaque centrifugation, j'ai quantifié l'ADN par q-PCR, en amplifiant des séquences d'ADN nucléaire et mitochondrial de 67 pb. Nous avons alors remarqué une diminution de la quantité d'ADN d'origine nucléaire et mitochondriale consécutive à chaque centrifugation, ce qui suggère une hétérogénéité de structure. Par ailleurs, après la dernière centrifugation à 200000g qui doit théoriquement sédimenter toutes les vésicules, une quantité d'ADN



nucléaire et mitochondrial persistait dans le surnageant, suggérant la présence de fragments d'ADN nucléaire et mitochondrial probablement non encapsulé par des vésicules.

Les résultats obtenus montrent que la diminution de la quantité d'ADNcir mitochondrial est significativement plus importante que la diminution la quantité d'ADNcir nucléaire entre les deux premières centrifugations à 400g et 16000g, ce qui indique qu'à 16000g, les structures qui sédimentent contiennent majoritairement de l'ADN mitochondrial.

En s'appuyant sur l'article de *Chiu et al(303)*, qui a étudié l'effet de la filtration sur la quantification de l'ADN circulant d'origine nucléaire et mitochondrial en utilisant différentes tailles de pore (5/0,45/0,22 $\mu$ m), nous avons décidé d'utiliser des filtres de taille 0,22  $\mu$ m. Comme ceux de *Chiu et al*, nos résultats ne montrent pas de variation de la quantité d'ADN nucléaire avant et après filtration à 0,22  $\mu$ m alors que la quantité d'ADN d'origine mitochondriale diminue significativement après filtration. Ces observations indiquent la présence de structures de taille supérieure à 0,22  $\mu$ m contenant principalement de l'ADN mitochondrial, dans le plasma.

### Figure 3 :

Bien que les résultats de la figure 1 démontrent que l'ADNcir d'origine mitochondriale est plus stable et moins fragmenté que l'ADNcir nucléaire, ces observations n'apportent pas d'évidences quant à son intégrité. Nous avons donc décidé de vérifier si l'ADN mitochondrial présent dans le culot contenait ou non le génome mitochondrial entier. Dans ce but, j'ai amplifié l'intégralité du génome mitochondrial par PCR classique, en utilisant 2 stratégies permettant de couvrir le génome mitochondrial circulaire complet de 16,6 kb. La première utilisait 3 couples d'amorces, et la deuxième, 2 couples d'amorces, les 5 amplicons étant chevauchants. Cette stratégie, développée par Dames et al(354), a été utilisée en partie par *Sansone et al(128)*, afin de démontrer la présence du génome mitochondrial entier dans les exosomes.

### **C. Etude des structures contenant l'ADNcir mitochondrial**

Les candidats possibles étaient :

- Des plaquettes qui, anucléaires, pouvaient être à l'origine d'une purification incomplète par gradient de ficoll. En effet, nous ne pouvons pas être sûrs à 100% de l'absence de plaquettes après purification par gradient de ficoll.
- Des mitochondries relarguées par des plaquettes activées. L'étude de Boudreau *et al.* a en effet démontré que les plaquettes activées sont capables de libérer des microvésicules contenant des mitochondries et du matériel mitochondrial, y compris des mitochondries intactes.
- Des vésicules contenant de l'ADN mitochondrial.
- Des mitochondries intactes(324).

Afin de s'affranchir de toute contamination due aux plaquettes (ou à leur activation), nous avons décidé de répéter les expériences ci-dessus *in vitro* à partir de surnageant de culture de différentes lignées cellulaires (DLD1/SW620/CCD-18CO). Le sérum utilisé pour le milieu de culture est en effet déjà filtré à 0,22 µm par le fournisseur. Un milieu de culture frais contenant du sérum a été testé comme contrôle négatif.

Les vitesses des centrifugations utilisées ici étaient les suivantes : 600g pour sédimenter les cellules non adhérentes et les noyaux, puis 16000g, 40000g et 200000g. Nous avons obtenu des résultats similaires à ceux observés avec le plasma isolé par Ficoll, ce qui démontrait non seulement que des cellules tumorales et des cellules immortalisées sont capables de relarguer de l'ADN mitochondrial associé à des structures denses dans leur milieu de culture, mais également, que ces structures ne sont pas des plaquettes.

Pour confirmer ces résultats sur du plasma tout en éliminant la possibilité d'une contamination par des mitochondries libérées par des plaquettes activées, nous nous sommes appuyés sur des protocoles recommandés dans la littérature (104, 355, 356). En combinant ces protocoles, nous avons décidé de traiter les échantillons de sang selon les étapes suivantes:

- Prélèvement du sang dans des tubes BD Vacutainer® CTAD.
- Conservation du sang à température ambiante sur une période inférieure à 2h.
- Centrifugation à faible vitesse sans frein, à température ambiante, pendant 10 min à 200g, 200g, 300g, pour éliminer les cellules PBMC sans lyse.
- Addition de tampon ACD-A en présence de prostaglandine E1 pour inhiber l'activation des plaquettes.

- Centrifugation sans frein, à température ambiante, pendant 10 min à 1100g et 2500g, pour éliminer les plaquettes et les cellules apoptotiques.

Les expériences de centrifugation et de filtration précédemment décrites ont été combinées au protocole d'isolement du plasma et ont abouti à des résultats similaires aux précédents (Fig 2, S2). Nous pouvons donc clairement conclure à la présence, dans le plasma, de structures d'une taille supérieure à 0,22  $\mu\text{m}$ , capables de sédimenter à 16000g, tout en excluant l'hypothèse d'une contamination par des plaquettes ou des plaquettes activées.

Figure 3 : un traitement par la DNase I a été classiquement utilisé dans des travaux concernant les vésicules extracellulaires afin d'éliminer l'ADN pouvant potentiellement adhérer sur ces vésicules et afin de confirmer ainsi la présence d'ADNcir mitochondrial à l'intérieur des structures(122, 357).

Dans cette expérience, nous aurions pu vérifier l'activité de la DNase I par la digestion d'une quantité équivalente d'ADN cellulaire ou synthétique. Cependant, le but de cette expérience était de comparer le taux d'ADN nucléaire et mitochondrial avant et après traitement par la DNase I. D'ailleurs, la quantité d'ADN nucléaire était diminuée après traitement, ce qui valide bien l'activité de la DNase I.

#### **D. Caractérisation des structures supérieures à 0,22 $\mu\text{m}$ contenant l'ADNcir mitochondrial**

Pour caractériser structurellement le culot obtenu à 16000g, des centrifugations additionnelles ont complété le protocole, afin d'éliminer au maximum les débris cellulaires, les noyaux, les corps apoptotiques (et les plaquettes en cas de plasma isolé par Ficoll) :

Pour le milieu de culture (après centrifugation à 600g, 10 min, 4°C):

- 600g, 10 min, 4°C
- 1200g, 10 min, 4°C

Pour le plasma par ficoll (après centrifugation à 400g, 30 min, RT):

- 600g, 10 min, 4°C
- 1200g, 10 min, 4°C
- 2000g, 10 min, 4°C

Le culot 16000g a été marqué par du Mitotracker green FM (Thermofisher), spécifique des mitochondries actives. Cette étape est délicate et a nécessité plusieurs expériences de mise au point pour établir le protocole décrit dans l'article : utilisation d'une concentration de 200nM de mitotracker, pendant 45 min sans fixation du culot (à des concentrations plus élevées, le mitotracker green aurait tendance à marquer d'autres structures cellulaires).

Les vésicules marquées ont été observées en microscopie à épi-fluorescence (ZEISS Axio Imager 2). Après agrandissement des images, nous avons mesuré ces vésicules marquées dont le diamètre a été estimé à 0,5 microns, soit l'équivalent de la taille d'une mitochondrie. Ces résultats étaient encourageants, mais nous ne pouvions pas définitivement affirmer qu'il s'agissait bien de mitochondries, compte tenu de la faible résolution de la microscopie à fluorescence et de l'imprécision de la mesure. Les tailles mesurées étaient hétérogènes, ce qui pouvait être dû à la formation d'agrégats lors de la centrifugation.

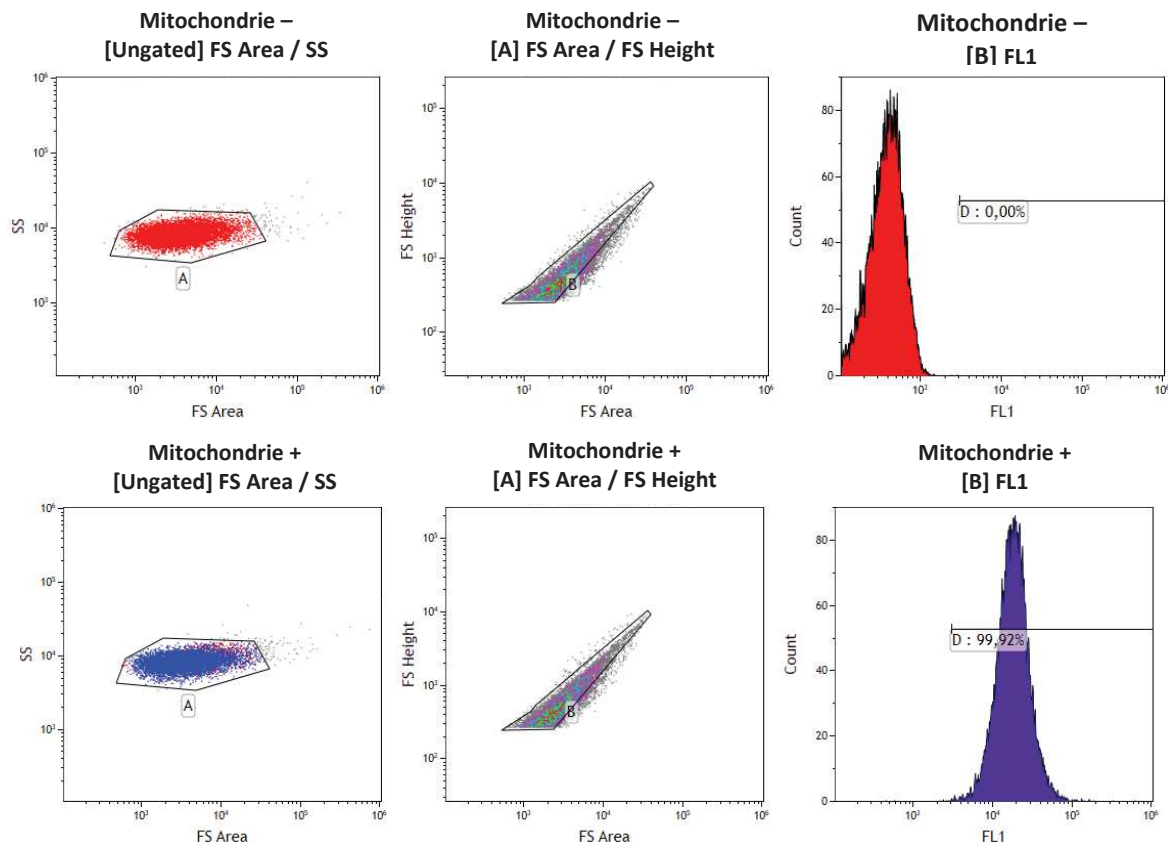
Afin d'affiner ces résultats, j'ai poursuivi cette analyse en quantifiant la fluorescence du mitotracker par cytométrie de flux Gallios (Beckman Coulter). 3 contrôles ont été utilisés pour confirmer la spécificité de ce marquage :

- Un contrôle positif : des mitochondries isolées à partir de cellules, selon un protocole ajusté de *Frezza et al (page 85,86)(358)*.
- Un contrôle négatif : le culot résultant de la centrifugation à 600g, après lyse cellulaire qui contient essentiellement des noyaux.
- Un contrôle négatif : le culot résultant de la centrifugation à 16000g du milieu de culture complet frais.

Techniquement, le réglage des paramètres de cytométrie a été effectué à l'aide du contrôle positif (mitochondries isolées à partir de cellules et marquées ou non marquées au MitoTracker). Tous les événements ont été recueillis selon la taille (FSC) et la granularité (SSC) en mode logarithmique. Les voltages ont été ajustés afin de tenir compte des particules submicroniques (mode : submicron, disponible sur le Gallios Beckman Coulter) et le débit a été réglé sur " faible " (mode : Low)(359–361).

Pour positionner les mitochondries isolées sur l'axe de l'intensité de fluorescence du MitoTracker, j'ai utilisé des mitochondries non marquées. Sur cet échantillon, j'ai établi une fenêtre FSC et SSC, puis j'ai procédé à l'élimination des doublets (deux mitochondries passant par le laser au même moment) en traçant la zone FSC-A par rapport à la zone FSC-H, les deux en mode logarithmique. Les événements rassemblés dans la fenêtre nouvellement créée (B)

ont été clôturés en tant que singulets. Ensuite j'ai analysé le signal sous forme d'histogramme et j'ai pu positionner mon « gating » de fluorescence négative et positive. Ayant confirmé que tous les événements enregistrés dans ce point de contrôle étaient positifs au MitoTracker, j'ai appliqué ce « gating » à tous les échantillons. Des histogrammes ont été créés pour les échantillons marqués et non marqués. Les résultats ont été analysés avec le logiciel d'analyse Kaluza 1.5.



**Figure 24:** Stratégie du « gating » en cytométrie de flux.

L'une des limitations relatives à ces expériences est liée aux paramètres de diffusion de la lumière (FSC/SSC) pour le gating(104, 362). En effet, la cytométrie en flux conventionnelle possède un seuil de détection de presque 500 nm, suggérant la présence d'une partie de particules non détectables(363).

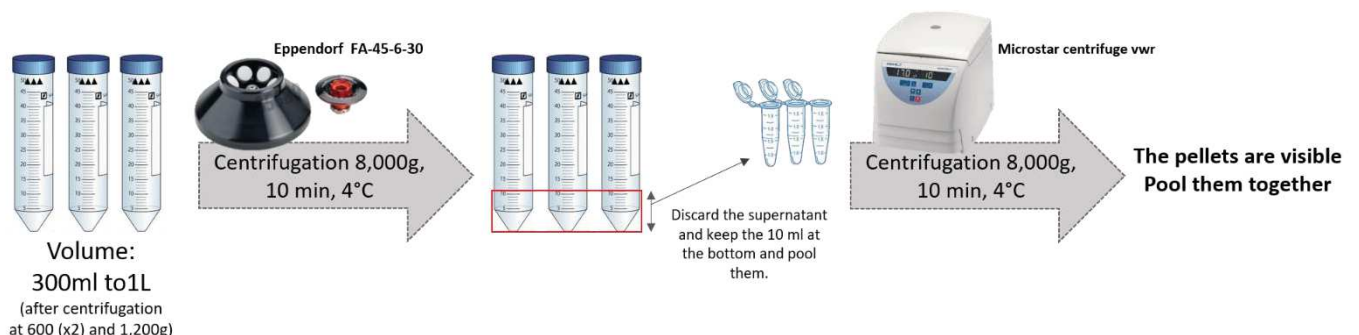
Une expérience control supplémentaire pour confirmer l'absence des doublets ou des agrégats, aurait pu consister à réaliser des dilutions en série. Dans ce cas, seul le nombre d'évènement mais pas l'intensité du signal, aurait dû diminuer avec la dilution(104).

De plus, concernant la fluorescence, et surtout parce que le « gating » contient des particules en submicrons, il y a un risque de prendre en compte des débris mitochondriaux marqués par le MitoTracker et non pas exclusivement des mitochondries intactes.

Finalement, les culots obtenus à 16000g pour tous les échantillons de plasma présentait deux pics de fluorescences (Figure 4 et S4 de l'article), indiquant la présence d'au moins deux populations de mitochondries. Ceci est attendu, puisque ce culot contient a priori des mitochondries de tailles et même de formes différentes, issues d'un relargage par différents types cellulaires.

A ce stade, afin de mieux préserver les mitochondries, nous avons répété les expériences précédentes en utilisant une centrifugation de 8000g au lieu de 16000g. Les résultats obtenus étant comparables, nous avons décidé de mener les expériences suivantes (western blot et microscopie électronique) à partir de mitochondries extracellulaires isolées à 8000g.

Cependant, un gros volume était nécessaire pour réaliser ces expériences, ce qui a imposé de nouvelles contraintes expérimentales étant donné le volume du surnageant du milieu de culture (Volume variant de 300 ml à 1L) à centrifuger à 8000g :



**Figure 25:** Protocole de centrifugation pour obtenir le culot de mitochondries extracellulaires, à partir du milieu de culture.

Pour le plasma, uniquement le Microstar centrifuge vwr est utilisé.

Pour confirmer que les mitochondries isolées à 8000g sont bien des mitochondries intactes, nous avons utilisé deux types de techniques :

- Le Western blot ciblant une protéine de la membrane externe (TOM22) et de la membrane interne (TIM23) : l'obtention d'un signal détectable a nécessité un très grand volume de sang (pool de 45 ml) et de surnageant de culture (1L de milieu) par puits.

- La microscopie électronique : les structures observées correspondent à des vésicules à double membranes, d'une taille comprise entre 0,25 et 1,4 microns. Ces mitochondries n'ont pas la morphologie classique d'une mitochondrie intracellulaire, mais il faut prendre en considération l'effet du milieu extracellulaire (plasma ou milieu de culture) et en particulier, la concentration en calcium différente de celle du milieu intracellulaire(364, 365). De plus, l'étude de *Boudreau et al*, décrivant la libération de mitochondries par les plaquettes activées montre des photos similaires aux nôtres(324).

Bien que toutes les approches décrites ci-dessus présentent des limitations, leur combinaison permet de conclure à la présence de mitochondries intactes circulantes.

### **E. Etudes des propriétés fonctionnelles des mitochondries circulantes.**

Les premières expériences de métabolique réalisées ont été menées à l'aide d'un oxygraphe Oroboros qui permet de mesurer la respiration suite à l'injection de stimulateurs et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire. Cette approche ne nous a pas permis d'observer de variation significative de la concentration d'O<sub>2</sub>. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que cette technique a été développée pour des mitochondries purifiées extraites à partir d'un grand nombre de cellules et est donc adaptée à une forte concentration de mitochondries. Dans nos expériences, nous étions limités par la concentration très faible en mitochondries dans le surnageant de culture cellulaire ou dans le plasma. C'est la raison pour laquelle nous avons décidé d'utiliser la technologie « seahorse », qui permet d'analyser de très faibles quantités de mitochondries isolées (0,4–4 µg de protéines mitochondriales par puits). Cette technique est basée sur deux types de tests :

- le « coupling assay » qui détermine le degré de couplage entre la chaîne de transport d'électrons et la machine de phosphorylation oxydative (OXPHOS) ;
- l'« electron flow assay » qui permet de suivre et d'interroger chaque complexe de la chaîne de transport d'électrons.

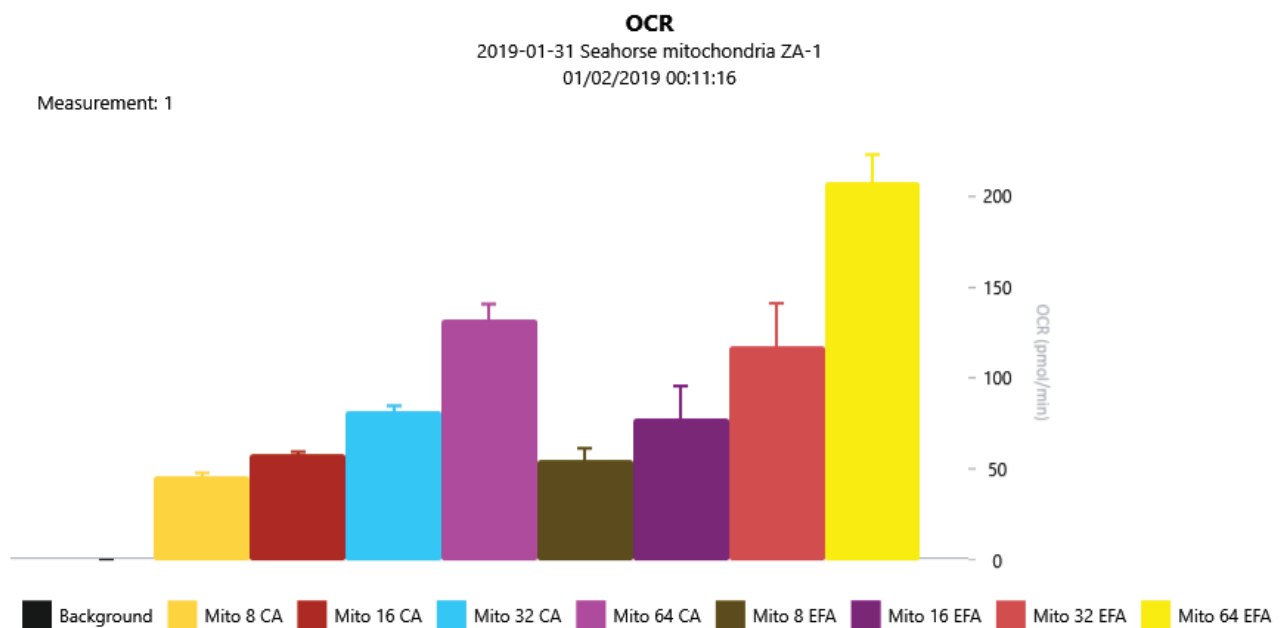
Toutes les expériences ont été réalisées directement après isolement des culots sans aucune congélation compte tenu des contradictions relevées dans la littérature concernant l'effet de la congélation sur l'intégrité et la fonction respiratoire des mitochondries. A cette contrainte s'ajoutait le temps considérable nécessaire pour traiter le grand volume de plasma et de milieu de culture. Une étape de purification (immunoprécipitation, gradient de sucrose) entre



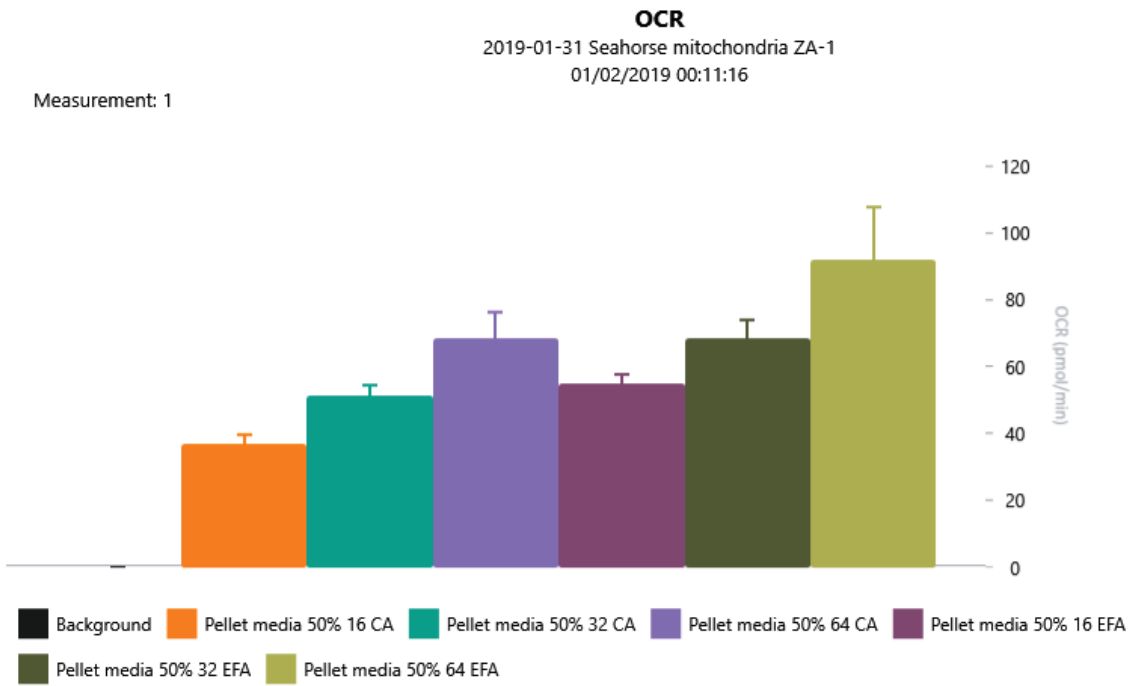
l'isolement et la réalisation des mesures au « seahorse », pouvait être considérée comme bénéfique, mais n'est pas possible pour ce type d'étude étant donné la durée de la procédure expérimentale qui doit être menée sans interruption. La mise au point du protocole a débuté par des tests de concentrations de mitochondries isolées à partir de cellules DLD-1 (8/16/32/64µg), de culots de surnageant de culture (16/32/64µg) et de culot du plasma (32/64µg). Les résultats obtenus étaient encourageants puisque nous avons observé une corrélation entre augmentation de l'OCR (oxygen consumption rate) et l'augmentation de la concentration des échantillons dans les puits aussi bien pour le « Coupling Assay » que pour l'« electron Flow Assay ».

Ces résultats, non inclus dans l'article, sont présentés ci-dessous :

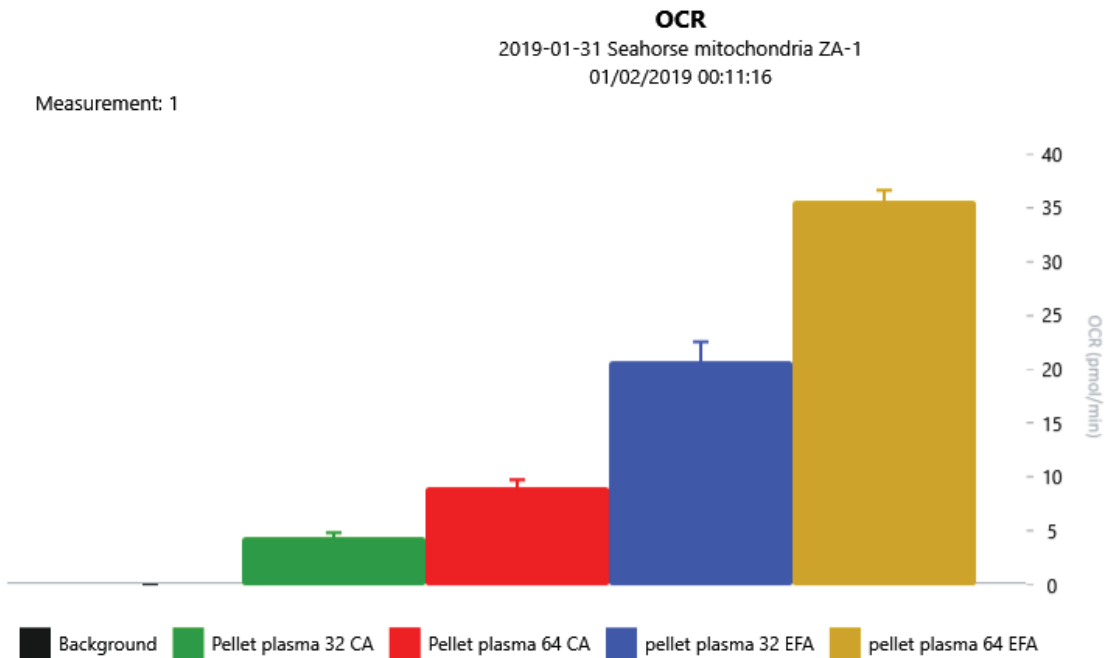
CA : Coupling Assay  
EFA : electron flow assay



**Figure 26:** OCR des mitochondries intracellulaires isolées à partir des cellules DLD-1.



**Figure 27:** OCR du culot du surnageant de milieu de culture des DLD-1.

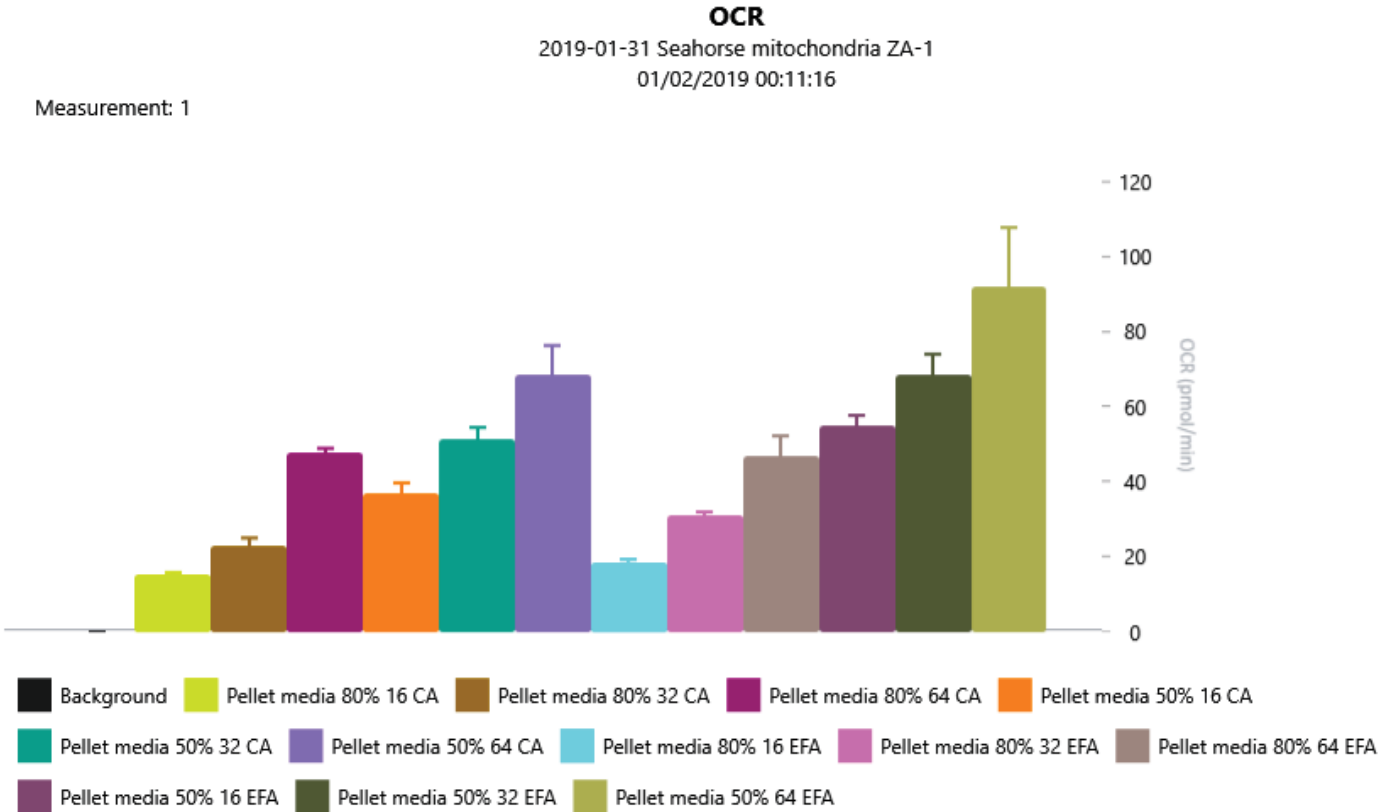


**Figure 28:** OCR du culot obtenu à partir du plasma.

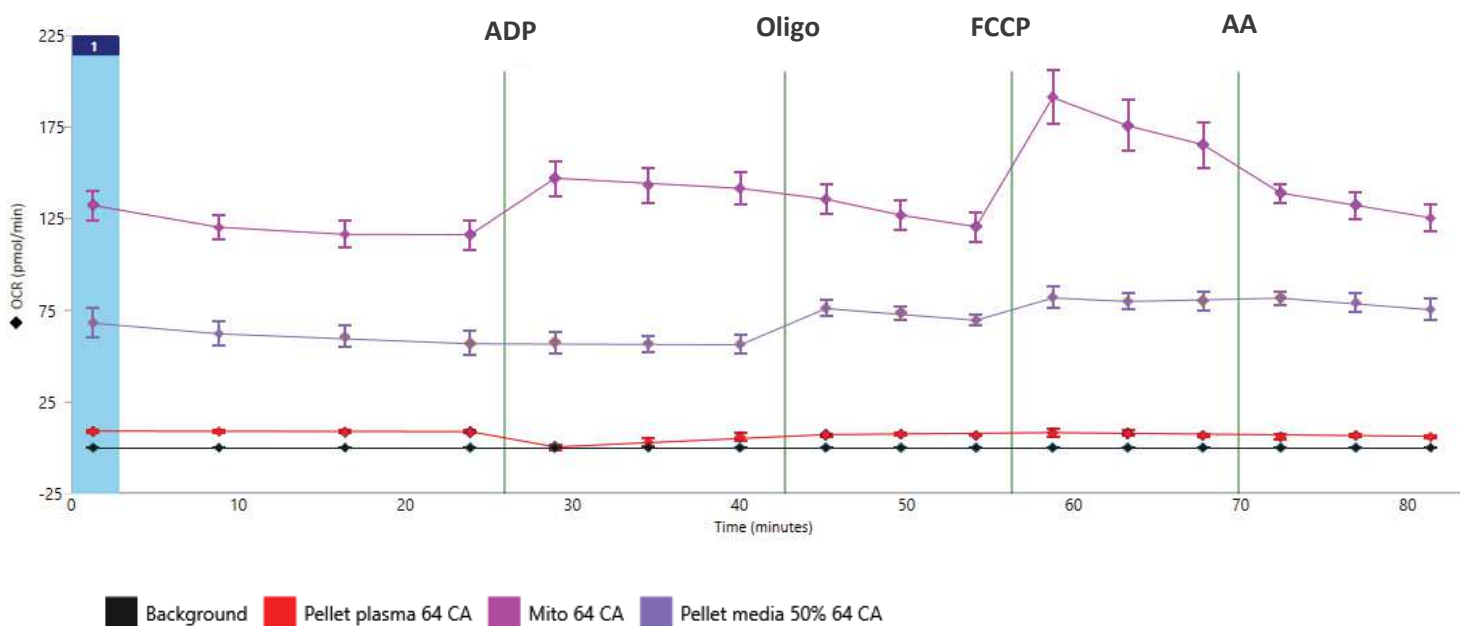
Il faut noter que le culot de plasma présente une respiration très faible par rapport aux autres culots.

Par ailleurs, l'influence de la confluence des cellules sur la respiration des mitochondries relarguées dans le milieu de culture a été testée et nous avons noté une consommation d'oxygène plus importante dans le surnageant de culture de cellules 50-60% confluentes que dans le surnageant de culture de cellules 80-90% confluentes (Figure 29).

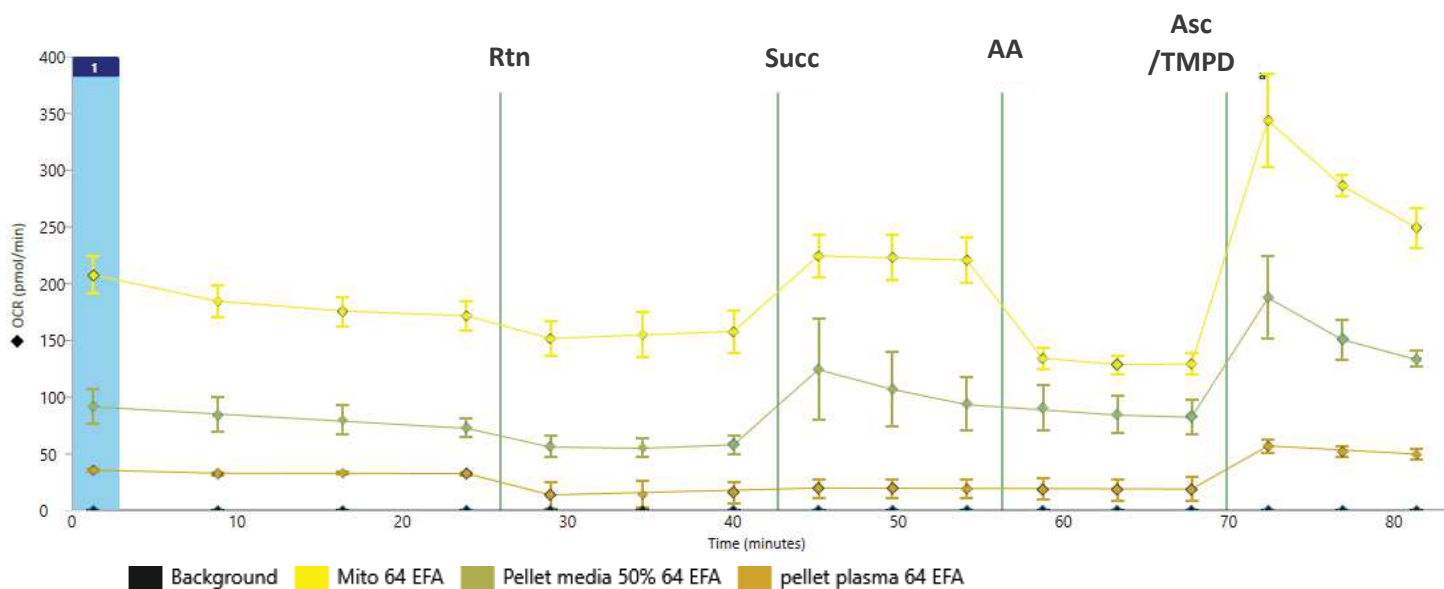
Cependant, le profil des courbes obtenu suite à l'addition séquentielle des réactifs dans le test « EFA » était comparable au profil détaillé dans le protocole du fournisseur, y compris dans le cas des mitochondries isolées (Résultats publiés dans l'article, Figure 31).



**Figure 29:** OCR du culot du surnageant du milieu de culture des DLD-1 à 50% et 80% de confluence.



**Figure 30:** le test « coupling assay » réalisé pour les mitochondries intracellulaires isolées, le culot du surnageant du milieu de culture, et le culot du plasma.



**Figure 31:** le test « Electron Flow Assay » réalisé pour les mitochondries intracellulaires isolées, le culot du surnageant du milieu de culture, et le culot du plasma.

Pour le « coupling assay », il faut ajouter, dans le milieu initial, du succinate et de la roténone, permettant à la mitochondrie de fonctionner dans un état couplé. Les résultats présentés ci-dessus ne sont pas significatifs, mais on peut remarquer, à l'état initial, avant injection des substrats, une consommation d'oxygène non négligeable dans le culot des mitochondries isolées et dans le culot de surnageant à 64 µg mais pas dans le culot du plasma où cette consommation d'O<sub>2</sub> reste sous le seuil de détection (Figure 30). En revanche, pour l'« electron flow assay », il faut ajouter, dans le milieu initial, du pyruvate, du malate et du FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone), des composés avec lesquels la mitochondrie fonctionne dans un état découplé, d'où l'augmentation de l'OCR initial dans ce test par rapport au premier.

Compte tenu de ces résultats, nous avons décidé de multiplier par 2 et par 4, la concentration des échantillons dans les puits. Les résultats ont montré une augmentation de l'OCR proportionnelle à la concentration de l'échantillon dans le test « electron flow assay ».

En revanche, pour ce qui concerne le « coupling assay », nous avons remarqué une diminution significative de l'OCR y compris dans le contrôle positive (mito), en augmentant la concentration initiale des échantillons par rapport au premier test. Notre hypothèse est que ce test nécessite peut-être une quantité plus faible mais plus pure de mitochondries. Une autre hypothèse est que la majorité des mitochondries ne sont peut-être pas « couplables ». Etant donné que nous avons multiplié la quantité de mitochondries isolées d'un facteur d'au moins 10 par rapport à la quantité recommandée, nous avons décidé d'augmenter la concentration des substrats et réactifs d'un facteur 3 et 6, afin de déterminer si nous pouvions améliorer le signal. Malheureusement, les résultats étaient non concluants, et s'accompagnaient de variations énormes dans les quintuplicats de chaque condition.

Finalement, nous pouvons juste conclure qu'une partie des mitochondries extracellulaires est capable de consommer de l'oxygène après libération dans le milieu extracellulaire et que ces mitochondries sont sensibles seulement à quelques inhibiteurs ou stimulateurs. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour mieux caractériser le métabolisme de ces mitochondries et leur niveau de respiration et pour préciser quels sont les complexes fonctionnels et non fonctionnels.

## **F. Estimation du nombre de mitochondries circulantes.**

### Tableau S3 :

Cette estimation de mitochondries dans le plasma est basée sur le nombre de copies d'ADN mitochondrial qui est soit filtré soit sédimenté à 16000g, en considérant qu'une mitochondrie contient 2 à 10 copies de génome(280). Cette estimation n'est pas précise, car nous ne pouvons pas affirmer que la partie purifiée par chacune de ces étapes est l'équivalent de 100% des mitochondries.

De plus, il est possible que d'autres structures soient associées avec ce type d'ADN, comme par exemple, les microvésicules ou même des débris mitochondriaux.

Enfin, la quantité d'ADN mitochondrial entre mitochondries de différents types cellulaires est très variable, ce qui constitue un biais dans le calcul, en particulier pour le culot du plasma.

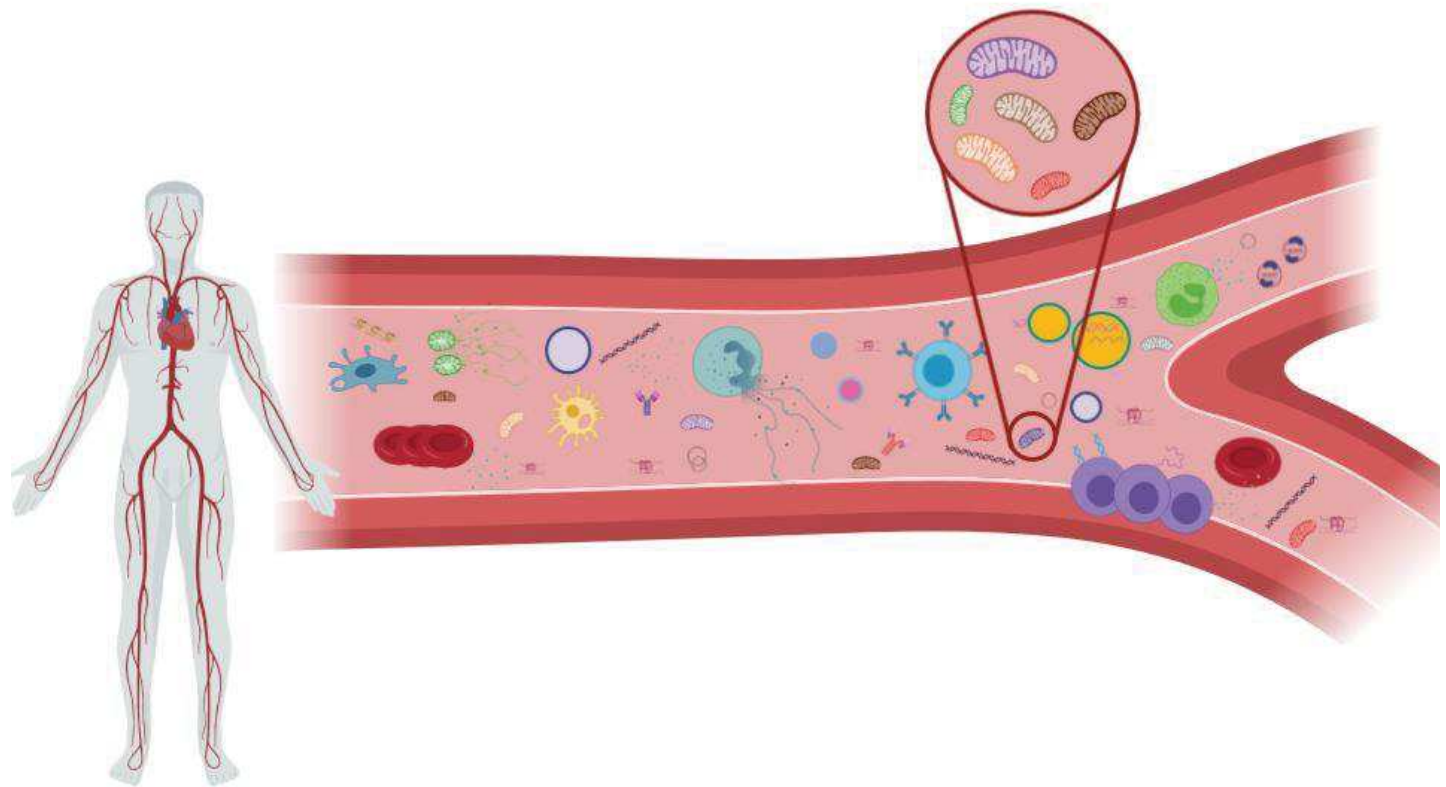
Pour contourner ce problème, des expériences sont en cours afin de définir une méthode de quantification plus fine des mitochondries intactes circulantes.

# Conclusions

La présence dans le sang de mitochondries extracellulaires circulantes, intactes et fonctionnelles sur le plan respiratoire est confirmée par nombreuses observations :

- L'ADN mitochondrial est moins fragmenté et plus stable à l'extérieur de la cellule que l'ADN nucléaire, ce qui suggère son association avec des structures protectrices.
- Contrairement à l'ADN nucléaire extracellulaire, l'ADN mitochondrial extracellulaire est majoritairement associé à des structures denses de poids moléculaire élevé.
- 78% de l'ADN mitochondrial extracellulaire est associé à des structures denses qui lui confèrent une résistance à un traitement par la DNase I.
- L'ADN mitochondrial extracellulaire, associé aux structures denses, correspond à un génome mitochondrial entier et non fragmenté, comme l'indique le calcul de l'indice d'intégrité de l'ADN, le séquençage du génome entier, et l'amplification de cet ADN à l'aide d'amorces chevauchantes recouvrant l'intégralité du génome mitochondrial.
- Les structures associées à l'ADN mitochondrial circulant contiennent des protéines spécifiques des membranes internes et externes des mitochondries comme le montrent les Western blot utilisant des anticorps dirigés contre TIM23 et TOM22. De plus, ces structures sont marquées par le Mitotracker green, un marqueur spécifique des mitochondries actives observées en microscopie à fluorescence et détectées par cytométrie en flux.
- Les structures présentes dans le plasma et les milieux de culture cellulaire présentent une morphologie similaire à celle des mitochondries, comme le montrent les observations en microscopie électronique.
- Les mitochondries extracellulaires extraites au cours de notre étude ne résultent ni d'une contamination par des cellules sanguines ni d'une activation des plaquettes, le protocole éliminant et inhibant l'activation des plaquettes. L'obtention de résultats similaires dans le surnageant des milieux de culture cellulaires confirme les résultats.
- Les mitochondries extracellulaires circulantes sont respirantes comme l'indiquent la consommation d'O<sub>2</sub> mesurée par la technique du Seahorse.





**Figure 32:** La présence des mitochondries extracellulaires dans la circulation.

# Discussion

Mon travail de thèse démontre pour la première fois la présence de mitochondries intactes et fonctionnelles dans la circulation sanguine dans des conditions physiologiques. Des travaux antérieurs avaient suggéraient la présence de mitochondries intactes et circulantes, mais uniquement dans des conditions particulières non physiologiques. Ainsi, Bodreaux *et al.* avaient montré que les plaquettes activées, peuvent libérer des mitochondries dans la circulation sanguine(324). Par ailleurs, une étude récente publiée par Pulm *et al.* suggérait que les mitochondries constituent un sous-ensemble des vésicules extracellulaires pouvant être relarguées par les monocytes activés (366). Ces travaux n'ont cependant pas mis en évidence de mitochondries extracellulaires circulantes dans des conditions physiologiques.

*In vitro*, nous montrons que des cellules tumorales et non tumorales immortalisées sont capables de relarguer des mitochondries dans le milieu extracellulaire.

*Ex vivo*, dans des conditions physiologiques et sans aucune stimulation des cellules sanguines, voire même en inhibant l'activation des plaquettes, nous mettons en évidence la présence de mitochondries libres, intactes et fonctionnelles dans le sang.

## I. D'où proviennent ces mitochondries ?

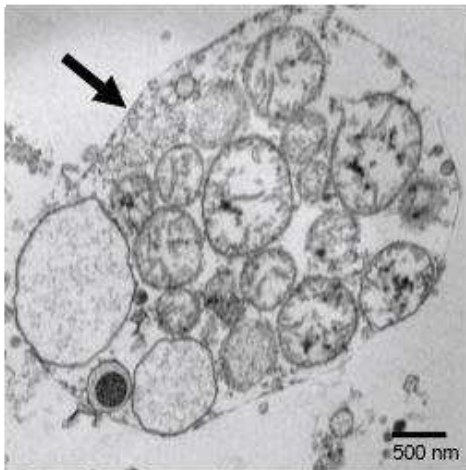
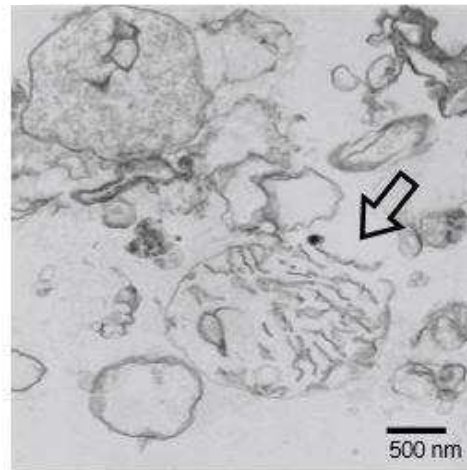
Comme l'ADN extracellulaire, les mitochondries peuvent être présentes dans le milieu extracellulaire suite aux différents mécanismes de mort cellulaire, à la sécrétion active ou même éventuellement à d'autres événements encore inconnus. Chacune de ces hypothèses est discutée ci-après.

### Les mitochondries sont-elles relarguées au cours de l'apoptose ?

Au cours de nos expériences *in vitro*, le surnageant de culture est récupéré après 24h, lorsque les cellules sont en phase exponentielle, ce qui, théoriquement, limite la présence de cellules apoptotiques.

Néanmoins, nous savons que l'apoptose, aboutit à la formation de corps apoptotiques (Ab) contenant de l'ADN nucléaire fragmenté et des organites (partie II.i.a). Dans notre étude, le protocole d'isolement des mitochondries extracellulaires impose des centrifugations successives du surnageant de culture à 600g (x2), 1,200g et 2,500g, afin d'éliminer toute contamination par les cellules non adhérentes (donc mortes ou engagées dans l'apoptose), des noyaux ou même les corps apoptotiques. La présence de corps apoptotiques en fin d'expérience est peu probable y compris si certaines cellules sont en apoptose. D'ailleurs, les expériences basées sur la centrifugation et la filtration indiquent que le facteur de diminution, après la deuxième centrifugation à 16,000g ou la filtration avec des filtres de 0.22 microns, est beaucoup plus important pour l'ADN d'origine mitochondriale que pour l'ADN d'origine nucléaire. Or les corps apoptotiques contiennent non seulement des mitochondries mais aussi de l'ADN nucléaire(367). Si l'ADN mitochondrial détecté provenait majoritairement des corps apoptotiques, nous aurions constaté une diminution équivalente à celle de l'ADN nucléaire. Nous pouvons donc en conclure que les mitochondries isolées via notre protocole ne sont pas présentes dans des corps apoptotiques.

De plus, suite au déclenchement de l'apoptose, il a été montré par Zhu *et al.* que les mitochondries extracellulaires étaient endommagées (gonflées, fragmentées et perte de la structure des crêtes) et souvent contenues dans les vésicules membranaires (368)(Figure 33).

**A****B**

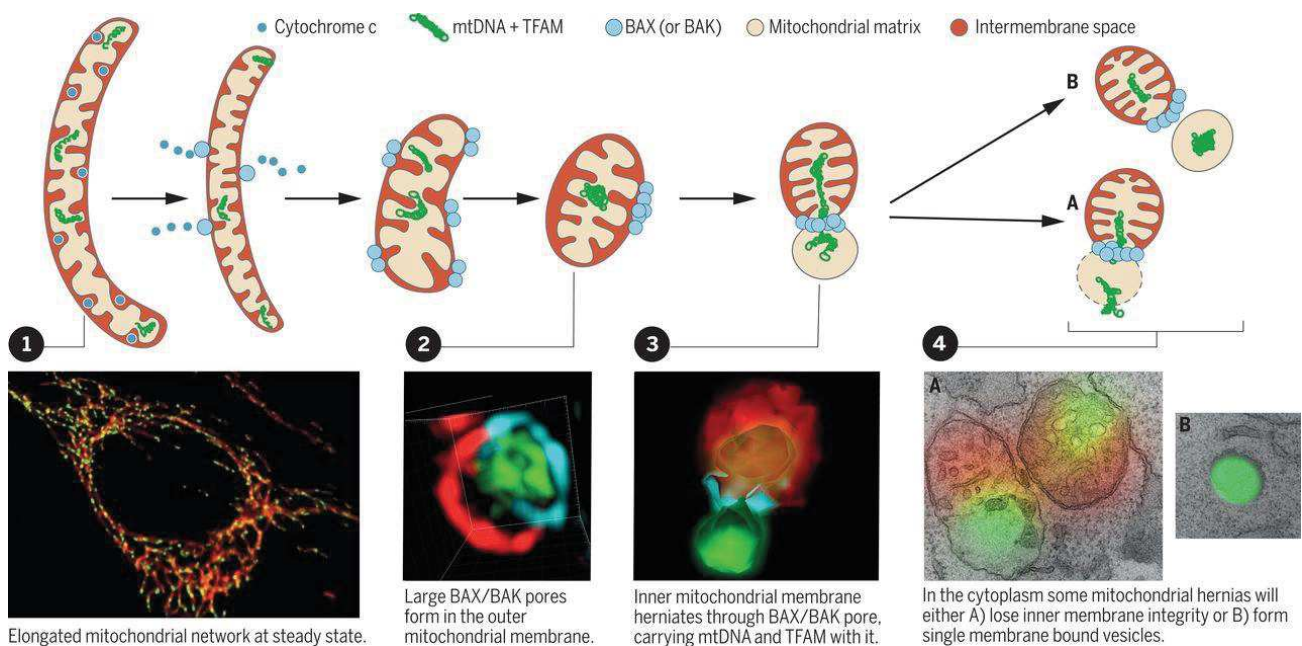
**Figure 33:** Microscopie électronique des débris non cellulaires libérés dans le milieu extracellulaire pendant la mort cellulaire par l'apoptose et la nécroptose. Ref 368.

**A.** Les mitochondries libérées par l'apoptose sont souvent contenues dans des vésicules liées à la membrane (flèches plein) tandis que **B.** les mitochondries libérées par la nécroptose ne sont pas liées à la membrane et présentent une dégradation et une rupture de la membrane mitochondriale (flèches creux).

Par ailleurs, lors de l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose médiée par les mitochondries (19), ou même dans certains cas de la voie extrinsèque(369), il a été proposé que les mitochondries libèrent des facteurs pro-apoptotiques, comme le cytochrome C, dans le cytosol, suite à la perméabilisation de la membrane externe, la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial, et la perte d'intégrité de la membrane externe mitochondriale(19, 367). De plus, des études récentes ont montré qu'après perte du cytochrome C, le réseau mitochondrial se rompt et des macropores apparaissent dans la membrane externe, permettant à la membrane interne qui transporte les composants de la matrice mitochondriale de passer dans le cytosol(370)(Figure 34).

Dans notre étude, la microscopie électronique, nous a permis de détecter des vésicules composées de doubles membranes (Figure 5 de l'article), ce qui suggère bien que les mitochondries que nous avons isolées ne proviennent pas de cellules apoptotiques (figure 33 et figure 34).

Enfin, d'un point de vue mécanistique, et grâce à nos expériences de respiration mitochondriale par les techniques du seahorse et de l'électron flow assay (Figure 6 de l'article), nous démontrons l'existence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle dans des mitochondries intactes. En effet, l'augmentation du taux de respiration sous traitement par le TMPD/Ascorbate sans ajout de cytochrome C exogène est un indicateur de la fonctionnalité biologique des mitochondries isolées *via* notre protocole (371).



**Figure 34:** Schéma d'une hernie mitochondriale apoptotique. Ref 370.

### Les mitochondries sont-elles relarguées après nécrose?

Lors d'une nécrose, (phénomène peu fréquent en physiologie), les mitochondries sont sujettes à un dysfonctionnement dû à une ouverture prolongée des MPTP (pores de transition de perméabilité mitochondriale), ce qui entraîne une dépolariation de la membrane interne, une perte de production d'ATP, un gonflement de l'organelle, pour, *in fine*, provoquer une rupture de la membrane externe(372). D'après Zhu *et al.*, la nécroptose est associée à la

présence de mitochondries extracellulaires endommagées sans structures membranaires(368) (figure 33). Or, nous n'avons pas observé ce type de structure, ce qui suggère que la nécrose n'est probablement pas à l'origine du relargage des mitochondries intactes et fonctionnelles isolées *via* notre protocole.

De plus, comme dans le cas de l'apoptose, le cytochrome C est relargué durant la nécrose (373, 374). De fait, nous n'aurions donc pas pu observer de transfert d'électrons dans nos essais en cas de contribution de la nécrose.

Enfin, l'étude de Maeda *et al.* a mis en évidence un relargage de mitochondries lors de la necroptose(323). Toutefois, aucun test de respiration et même de western blot ciblant une protéine de la membrane externe n'a été réalisé pour déterminer si les mitochondries isolées dans cette étude étaient intactes ou non.

### **Les mitochondries sont-elles relarguées par sécrétion active ?**

Plusieurs études ont démontré que des vésicules extracellulaires peuvent contenir de l'ADN mitochondrial. L'une d'entre elles a, en particulier, mis en évidence la présence d'un génome mitochondrial entier dans les exosomes(128). Cependant, cette hypothèse peut être exclue dans le cas de notre étude, puisque nous observons un marquage positif au mitotracker green qui ne s'accumule que dans des mitochondries actives. De plus, nous avons détecté la présence de protéines appartenant aux membranes externes et internes des mitochondries, indiquant que les organites isolés ne sont pas des vésicules extracellulaires, mais bien des mitochondries fonctionnelles.

Cependant, certains travaux ont montré que des vésicules extracellulaires peuvent également contenir des mitochondries entières intactes(338). Il semble ce ne soit pas notre cas, qu'une seule double membrane, sans autre forme d'enveloppe, a été observée en microscopie électronique.

L'hypothèse que nous privilégions est donc celle d'une libération active de mitochondries intactes et fonctionnelles dans le milieu extracellulaire mais dont le mécanisme reste encore à élucider. Cette hypothèse est en accord avec les deux études démontrant une sécrétion

active de mitochondries intactes non encapsulées par les cellules sanguines activées (plaquettes et monocytes)(324, 366), bien que le mécanisme de relargage soit, là encore, inconnu.

Le fait que nous soyons parmi les premiers à révéler la présence de mitochondries dans la circulation sanguine est probablement dû aux difficultés techniques qu'il a fallu contourner pour isoler ces mitochondries. En effet, ces mitochondries sont peu représentées dans la circulation sanguine ou dans le surnageant de milieu de culture, ce qui a nécessité à la fois des volumes importants de plasma ou de milieu de culture et des techniques sensibles pour de détection, comme la q-PCR.

Citons à titre d'exemples l'utilisation de 90 ml de sang et de 1 litre de surnageant de milieu de culture pour les Western Blot et l'utilisation de 240 ml de sang et de 700 ml de milieu de culture centrifugé pour le Seahorse.

## **II. Quels impacts en physiologie et pathologie?**

### **i. Un rôle dans l'homéostasie ?**

La sécrétion extracellulaire des mitochondries pourrait être un mécanisme associé ou pas, à l'autophagie et/ou à la mitophagie, capable d'aider les cellules à éliminer leurs organites endommagés et ainsi à maintenir l'homéostasie.

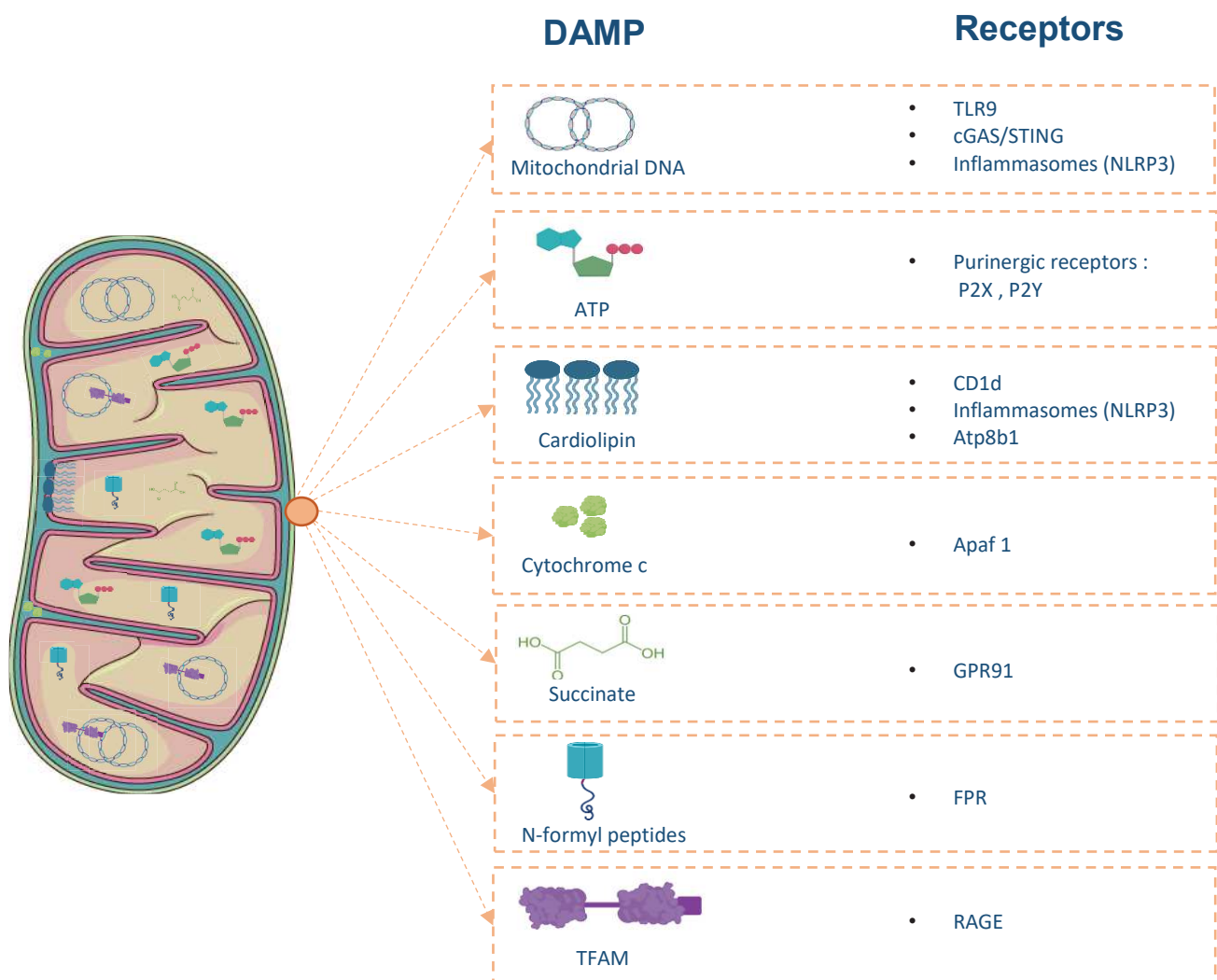
En accord avec cette hypothèse, une étude menée par l'équipe de Luis A. Ortiz(375) indique que les cellules souches mésenchymateuses subissent une mitophagie en déchargeant leurs mitochondries dépolarisées par l'intermédiaire des microvésicules vers la membrane plasmique, ces microvésicules étant ensuite englouties par les macrophages qui les réutilisent pour augmenter leurs capacités bioénergétiques.

### **ii. Un rôle dans l'inflammation ?**

Il a été démontré que les mitochondries sont non seulement la source énergétique « power house » des cellules mais aussi celle de l'immunité(376). En effet, l'origine procaryotique des



mitochondries et les nombreux points communs qu'elles partagent avec les bactéries (partie V.i.) peuvent expliquer le renforcement de l'activité immunitaire par la mitochondrie(377). Les DAMPs libérés par les mitochondries comprennent non seulement des protéines, mais aussi de l'ADN, des lipides et des métabolites, qui présentent une capacité immunogène permettant d'alerter les cellules voisines et notamment celles du système immunitaire du dysfonctionnement mitochondrial(377). Ces molécules et leurs récepteurs spécifiques sont présentés dans la figure 35 (377, 378).



**Figure 35:** Les DAMPs d'origine mitochondriale. Adapté des Ref 377,378.

*STING*, stimulator of interferon genes; *ATP*, adenosine triphosphate; *Apaf-1*, apoptotic protease activating factor-1; *CD1d* cluster of differentiation 1d ; *Atp8b1*, Phospholipid-transporting ATPase IC ; *GPR91*, G-Protein Coupled Receptor 91 ; *FPR*, Formyl peptide receptor, *RAGE*, receptor for advanced glycation endproducts.

En plus de leur rôle dans l'inflammation stérile via des DAMPs, les mitochondries servent également de plateformes pour réguler la signalisation antivirale via leur protéine de signalisation antivirale (MAVS)(379) et pour contribuer à l'immunité antibactérienne via le récepteur NLRP3, par leur capacité à générer des ROS (380). De fait, il n'est pas impossible que des mitochondries extracellulaires intactes soient potentiellement capables d'activer les cellules immunitaires et d'induire alors une réaction inflammatoire. En accord avec cette hypothèse, l'étude de Boudreau a, par exemple, montré que les mitochondries secrétées par les plaquettes activées sont considérées comme des substrats endogènes de la phospholipase A2 IIA (sPLA2-IIA), qui est, elle-même, fortement active envers la membrane bactérienne(324). L'hydrolyse de la membrane mitochondriale par la sPLA2-IIA entraîne la libération de médiateurs inflammatoires tels que l'acide arachidonique, les lysophospholipides, et l'ADNmt, qui à leur tour interagissent avec les leucocytes et modulent leur activité. De plus, il a été suggéré que, indépendamment de l'activité de sPLA2-IIA, les mitochondries libres pourraient promouvoir l'inflammation par l'intermédiaire de ROS, d'ATP et des peptides N-formylés et de cardiolipides(324).

De manière similaire, l'étude de Puhm sur des monocytes activés par les lipopolysaccharides (LPS) a montré des effets pro-inflammatoires de ces monocytes sur les cellules endothéliales(366). Or, l'exposition des monocytes au LPS engendre une production élevée de ROS aboutissant à l'oxydation des ARN mitochondriaux et une association du TNF- $\alpha$  aux mitochondries. Après libération des mitochondries dans le milieu extracellulaire, cet ARN oxydé et le TNF- $\alpha$  interagissent avec les cellules endothéliales et stimulent la voie de signalisation du TNF- $\alpha$  et de l'IFN (interféron) de type I. Il en résulte une production des cytokines inflammatoires (interleukine 8) à l'expression de ICAM et VCAM (molécule 1 d'adhésion intercellulaire et molécule d'adhésion cellulaire vasculaire)(366).

### iii. Un rôle dans la communication intercellulaire

Outre les fonctions énergétiques et inflammatoires des mitochondries extracellulaires, il a été révélé récemment que des mitochondries entières, leur génome ou même leurs composants, peuvent traverser les membranes cellulaires et donc être transférés horizontalement d'une cellule à l'autre(381). Ce trafic semble exercer plusieurs fonctions biologiques telles que l'alerte d'un danger aux cellules destinataires(382), le rétablissement de leur profil bioénergétique(342), et dans le cas d'un cancer, une potentialisation du phénotype tumoral(383).

Ces mitochondries peuvent être transférées entre une grande diversité de types cellulaires. En particulier, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent être donneuses(342). Le transfert est médié par des structures spécialisées comme les « tunneling nanotubes (TNT) », les microvésicules et quelques autres mécanismes minoritaires (381).

La première preuve de ce type de transfert a été apportée par Spees *et al.*, en 2006(336). Dans cette étude, les auteurs ont montré que des mitochondries saines provenant des CSM peuvent être transférées vers des cellules réceptrices dépourvues d'ADN mitochondrial et donc de fonctions mitochondriales, afin de restaurer leur respiration aérobie(336). Depuis, la capacité de transfert mitochondrial et son rôle dans la réparation cellulaire ont été confirmés par plusieurs laboratoires, avec d'autres types cellulaires non seulement *in vitro*(384, 385) mais également *in vivo* sur des modèles murins(337–339). L'ensemble de ces travaux indiquent que les CSM transfèrent préférentiellement des mitochondries aux cellules endommagées et que ce processus permet de restaurer le métabolisme énergétique des cellules réceptrices et leur production en ATP et, donc de les protéger de la mort cellulaire(381).

De plus, ce transfert intercellulaire participe aux mécanismes de la différenciation/dédifférenciation cellulaire. En effet, Plotnikov *et al.* ont démontré que le transfert de certains composants cellulaires, dont les mitochondries, entre des cellules rénales et des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes, permet la différenciation de ces dernières(386). Inversement, Acquistapace *et al.* ont montré que les CSM ont la capacité, par transfert mitochondrial, de reprogrammer des cardiomyocytes complètement différenciés et de les convertir en cellules progénitrices(387).

Ce transfert mitochondrial semble également jouer un rôle important dans la tumorigenèse, où les cellules cancéreuses récupèrent des mitochondries fonctionnelles pour augmenter ou restaurer leur métabolisme. Les cellules sources majeures des mitochondries dans ce contexte sont les cellules stromales du microenvironnement ou les CSM, qui peuvent, par ce mécanisme, moduler le phénotype de la tumeur, en augmenter la chimiorésistance et favoriser la progression tumorale(388–390).

Enfin, plusieurs travaux ont confirmé le principe de la transformation mitochondriale, découverte en 1982, qui suggère que des mitochondries isolées peuvent être internalisées *in vitro* par simple co-incubation des mitochondries avec les cellules, en absence de réactifs de transfection, des suppléments de milieu particuliers ou encore d'autres types de procédures(343, 346, 391). Cette internalisation se ferait par macropinocytose(392, 393).

Toutes ces observations, suggèrent que les mitochondries libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules normales ou tumorales peuvent être internalisées par d'autres types cellulaires et modifier ainsi les fonctions biologiques des cellules receveuses.

### **III. Conséquences cliniques ?**

#### **i. La transfusion sanguine**

Compte tenu du rôle potentiel des mitochondries extracellulaires dans l'inflammation et la communication intercellulaire, leur présence dans la circulation pourrait permettre d'expliquer certaines réactions indésirables lors des transfusions sanguines(394). Boudreau *et al.* ont, par exemple, montré que les concentrés plaquettaires qui avaient été associés à des réactions transfusionnelles indésirables chez des receveurs humains contenaient des concentrations plus élevées de mitochondries extracellulaires(324).

#### **ii. Un(e) futur(e) agent et/ou cible thérapeutique ?**

La fonction des mitochondries peut être affectée au cours de nombreux processus pathologiques tels que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, le diabète,

l'infarctus aigu du myocarde ou encore le cancer... Dès lors que les mécanismes de sécrétion, de transfert et d'internalisation seront clairement élucidés, des stratégies thérapeutiques futures pourraient consister à mettre en œuvre des procédures capables d'améliorer le transfert artificiel de mitochondries fonctionnelles, ou de stimuler le transfert mitochondrial intercellulaire lorsqu'il est souhaitable. A l'inverse, lorsque le transfert de ces mitochondries contribue à la pathogenèse, des stratégies pourraient être envisagées pour bloquer ce mécanisme voir cibler la mitochondrie extracellulaire en tant que cible thérapeutique(342).

### **iii. Un biomarqueur potentiel en oncologie ?**

Une dérégulation de l'énergie cellulaire est clairement considérée comme l'une des caractéristiques de la cellule cancéreuse. Cette dérégulation est directement liée à un dysfonctionnement mitochondrial résultant d'altérations de l'ADN mitochondrial telles que des mutations et/ou une variation de nombre de copies, ou encore d'altérations du métabolisme énergétique dues à des dysfonctionnements enzymatiques(395).

De fait, les mitochondries libérées par les cellules tumorales dans le milieu extracellulaire et en particulier dans la circulation sanguine, peuvent refléter l'état des mitochondries intracellulaires de la tumeur et pourraient ainsi servir de biomarqueur du cancer aux niveaux qualitatif et quantitatif.

Des variations du nombre de mitochondries et du nombre de copies du génome mitochondrial ont d'ailleurs été observées, dans le cas de cancers. Ainsi, une diminution de nombre de copies d'ADN mitochondrial a été mise en évidence dans plusieurs types de cancers tels que le carcinome hépatocellulaire(396), le cancer gastrique(397) et le cancer du sein(398). A l'inverse, une augmentation de nombre de copies d'ADN mitochondrial a été observée dans d'autres types de cancers comme le cancer de la tête et du cou(311, 399) et le carcinome épidermoïde oesophagien(400).

Par ailleurs, des mutations germinales et somatiques du génome mitochondrial ont été identifiées lors de la croissance et de la progression tumorale (401–403).

Une dérégulation du métabolisme mitochondrial a également été observée dans les tumeurs. Ainsi, les travaux d'Otto Warburg montrent que, contrairement aux cellules normales, les cellules tumorales produisent leur énergie par un mécanisme glycolytique (glycolyse aérobie) conduisant à de grandes quantités d'acide lactique, y compris sous pression normale d'oxygène (404). Ce phénomène serait dû à une altération de la voie OXPHOS(404). Cependant, toutes les tumeurs ne partagent pas cette propriété(405), certaines études suggérant que la phosphorylation oxydative et la glycolyse seraient actives à divers niveaux dans les cellules tumorales(406, 407). Finalement, les nombreuses fonctions des mitochondries sont étroitement liées à leur morphologie. Or, compte tenu du fait que, ces fonctions sont altérées au cours de la tumorigenèse, un changement de morphologie mitochondriale est directement associé à cette pathologie(401, 408–410).

Ces changements au niveau de l'ADN mitochondrial ou de la mitochondrie elle-même, pourraient être détectés dans les mitochondries relarguées par les cellules tumorales dans le milieu extracellulaire, et pourraient potentiellement être utilisés comme marqueurs de diagnostic et de pronostic moléculaires.

# Perspectives

## I. Identifier le mécanisme de relargage des mitochondries dans le milieu extracellulaire

- Examiner l'implication de l'apoptose et la nécrose dans ce relargage, en utilisant des inducteurs et des inhibiteurs des voies de mort cellulaire et en évaluant ensuite leurs effets sur la quantité de mitochondries relarguées.
- Etudier le mécanisme de libération. Vu que les mitochondries ne sont pas encapsulées dans des vésicules, une sécrétion par bourgeonnement membranaire est peu probable. Il faudrait donc évaluer l'implication de différents processus d'exocytose à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

## II. Etudier la possibilité du transfert intercellulaire de ces mitochondries

- *In vitro*, utiliser un modèle de cellules transfectées (pour marquer les mitochondries intracellulaires). Récupérer le surnageant de ces cellules et centrifuger afin d'éliminer tous les débris cellulaires) et incuber ce surnageant avec différentes lignées cellulaires (de même ou de différentes espèces) puis évaluer le transfert et l'internalisation des mitochondries marquées en microscopie confocale et quantifier cette internalisation par cytométrie de flux.
- *In vivo*, confirmer les observations *in vitro*. Injecter des mitochondries marquées et isolées à partir du milieu de culture de cellules, à des modèles animaux afin de détecter leur internalisation dans des cellules.



### III. Evaluer le potentiel clinique

- Mettre au point un protocole permettant de quantifier les mitochondries extracellulaires. Une quantification fine de ces mitochondries permettrait en effet de comparer leur nombre entre individus sains et patients atteints de cancer colorectal et potentiellement d'identifier une valeur diagnostique.
- Détecter des mutations de l'ADN mitochondrial et en particulier celles associées au cancer colorectal. Des mutations somatiques dans la région D-loop, semblent, en particulier être de mauvais pronostic chez les patients atteints de CRC et un facteur de résistance à la chimiothérapie adjuvante à base de fluorouracil dans les CRC de stade III (405).

# Autres Contributions :

## I. Quantification de l'ADN circulant chez l'homme

Article publié dans Scientific Report, (2019).

### i. Rationnel Scientifique :

Les biomarqueurs biologiques peuvent être très dynamiques et leur performance diagnostique peut varier en fonction de paramètres intra et inter-individuels. Une analyse d'ADNcir efficace en clinique repose sur une quantification optimale de cet ADN et impose l'identification et le contrôle de divers paramètres intrinsèques ou extrinsèques au patient pouvant affecter la précision de sa mesure. Malgré un nombre croissant de recherches dans le domaine des ADNcir, peu d'études ont examiné l'incidence des paramètres pré-analytiques et démographiques en tant que sources de variabilité intra- et inter-individuelle dans la quantification d'ADNcir. Il en résulte un manque d'harmonisation entre les différents protocoles de traitement des échantillons et de procédure opérationnelle standardisée, empêchant ainsi la transposition des analyses en pratique clinique.

Des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe avaient défini certaines conditions pré-analytiques pour le traitement des échantillons tel que le choix du tube collecteur, le protocole d'isolement du plasma et d'extraction de l'ADNcir, ainsi que les conditions de stockage. Néanmoins, la majorité des études publiées se concentrent seulement sur quelques paramètres pré-analytiques pouvant affecter la quantification et la détection d'ADNcir d'origine nucléaire sans aborder la question de l'ADNcir d'origine mitochondriale. D'autre part, l'influence du temps écoulé entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon, l'aspect du plasma ou encore la prise de nourriture à des temps proches ou éloignés du prélèvement, sur la quantification des ADNcir d'origine nucléaire et mitochondrial, est encore mal connue. Enfin, les résultats publiés sur l'influence de certains paramètres dits « démographiques » comme l'âge et le sexe sur la quantification d'ADNcir sont très hétérogènes.

## **ii. Résumé :**

Ce travail est la première étude exhaustive sur l'influence de plusieurs paramètres pré-analytiques et démographiques pouvant être une source de variabilité dans la quantification de l'ADN circulant nucléaire et mitochondrial (ADNcirN et ADNcirM). Les données ont été obtenues sur un total de 222 sujets, dont 104 individus sains et 118 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (mCRC). Environ 50,000 et 3,000 fois plus de copies du génome mitochondrial que de copies du génome nucléaire ont été évaluées dans le plasma de sujets en bonne santé et de patients atteints de mCRC respectivement. Chez les individus sains, la concentration d'ADNcirN est significativement influencée par l'âge ( $p = 0,009$ ) et le sexe ( $p = 0,048$ ). L'analyse multivariée avec régression logistique a montré qu'un âge supérieur à 47 ans était un facteur prédictif d'une concentration plus élevée d'ADNcirN (OR = 2,41 ;  $p = 0,033$ ). La concentration de l'ADNcirM est indépendante de l'âge et du sexe chez les sujets en bonne santé. Chez les patients atteints de mCRC, les taux d'ADNcirN et d'ADNcirM étaient indépendants de l'âge, du sexe, du délai entre la prise de nourriture par rapport au temps du prélèvement sanguin et de l'aspect plasmatique, que ce soit en analyse univariée ou multivariée. Néanmoins, une étude ad hoc suggère que la ménopause et le temps écoulé entre le prélèvement sanguin et son analyse auraient tendance à influencer la quantification de l'ADN circulaire. De plus, des différences significativement élevées ont été observées entre les patients atteints de mCRC et les individus sains pour l'ADNcirN ( $p < 0,0001$ ), l'ADNcirM ( $p < 0,0001$ ) et le rapport ADNcirM et ADNcirN ( $p < 0,0001$ ). Finalement, les niveaux d'ADNcirN et d'ADNcirM ne varient pas de la même manière dans les cas de cancers vs un état physiologique normal, et également pour ce qui concerne les facteurs pré-analytiques et démographiques.

## **iii. Contributions :**

J'ai participé aux expériences de quantification de l'ADN circulant d'origine nucléaire et mitochondrial dans la cohorte des 222 sujets, à l'analyse statistique des résultats et à la discussion.

# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Quantifying circulating cell-free DNA in humans

Romain Meddeb<sup>1,2,3,4</sup>, Zahra Al Amir Dache<sup>1,2,3,4</sup>, Simon Thezenas<sup>1,2,3,4,5</sup>, Amaëlle Otandault<sup>1,2,3,4</sup>, Rita Tanos<sup>1,2,3,4</sup>, Brice Pastor<sup>1,2,3,4</sup>, Cynthia Sanchez<sup>1,2,3,4</sup>, Joelle Azzi<sup>1,2,3,4</sup>, Geoffroy Tusch<sup>1,2,3,4</sup>, Simon Azan<sup>1,2,3,4</sup>, Caroline Mollevi<sup>1,2,3,4,5</sup>, Antoine Adenis<sup>1,2,3,4,6</sup>, Safia El Messaoudi<sup>1,2,3,4</sup>, Philippe Blache<sup>1,2,3,4</sup> & Alain R. Thierry<sup>1,2,3,4</sup>

Received: 6 September 2018

Accepted: 9 January 2019

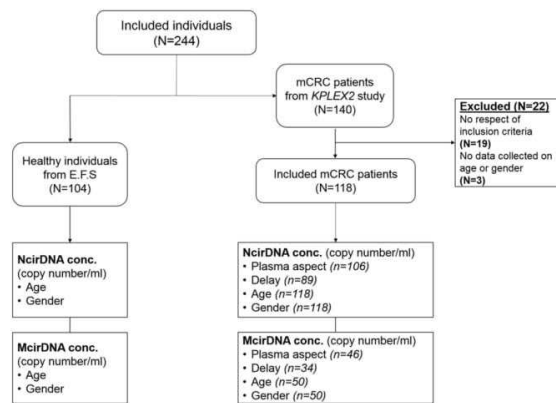
Published online: 26 March 2019

To our knowledge, this is the first comprehensive study on the influence of several pre-analytical and demographic parameters that could be a source of variability in the quantification of nuclear and mitochondrial circulating DNA (NcirDNA and McirDNA). We report data from a total of 222 subjects, 104 healthy individuals and 118 metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. Approximately 50,000 and 3,000-fold more mitochondrial than nuclear genome copies were found in the plasma of healthy individuals and mCRC patients, respectively. In healthy individuals, NcirDNA concentration was statistically influenced by age ( $p = 0.009$ ) and gender ( $p = 0.048$ ). Multivariate analysis with logistic regression specified that age over 47 years-old was predictive to have higher NcirDNA concentration (OR = 2.41;  $p = 0.033$ ). McirDNA concentration was independent of age and gender in healthy individuals. In mCRC patients, NcirDNA and McirDNA levels were independent of age, gender, delay between food intake and blood collection, and plasma aspect, either with univariate or multivariate analysis. Nonetheless, ad hoc study suggested that menopause and blood collection time might have tendency to influence cirDNA quantification. In addition, high significant statistical differences were found between mCRC patients and healthy individuals for NcirDNA ( $p < 0.0001$ ), McirDNA ( $p < 0.0001$ ) and McirDNA/NcirDNA ratio ( $p < 0.0001$ ). NcirDNA and McirDNA levels do not vary in the same way with regards to cancer vs healthy status, pre-analytical and demographic factors.

Since Mandel and Metais discovered the presence of nucleic acids in serum in the 1940s<sup>1</sup>, different studies have reported elevated levels of circulating DNA (cirDNA) in the blood of patients suffering from various diseases<sup>2–6</sup>, especially cancer<sup>7–10</sup>. Despite scant early consideration, interest in the feasibility of cirDNA analysis has increased exponentially, over the last decade, among researchers working on a large range of disorders. CirDNA was first clinically implemented in prenatal diagnosis of sex-determination and pregnancy-associated disorders by assaying fetal DNA in maternal plasma<sup>11–13</sup>. The main sources of cirDNA are cell death, either by necrosis or apoptosis, and active release by viable cells, including exocytosis and NETosis<sup>14,15</sup>. Note, cirDNA may derive from either nuclear (NcirDNA) or mitochondrial DNA (McirDNA). To date, research and development of cirDNA analysis has focused on the qualitative rather than the quantitative information provided. For example, cirDNA analysis is now clinically validated for detecting specific sequences or mutations to guide the oncologist toward the most appropriate treatment. CirDNA analysis is also performed for prenatal and embryo-culture genetic testing. There have been several years of intensive studies validating cirDNA quantitation in different clinical scenarios, including sepsis, transplant recipients and immune disorders. CirDNA quantification is also now taken into consideration in oncology as, it was recently shown that, the level of mutant cirDNA is useful for following-up cancer patients to detect minimal residual disease and to monitor response to therapy and disease recurrence. Although total cirDNA levels were first examined in the early phase of cirDNA research and development, it is now not considered as a single biomarker because of its lack of specificity. Nevertheless, all cirDNA analysis relies on the optimal quantification of total amount of cirDNA. Biological biomarkers should be highly dynamic, and their diagnostic performance may vary depending on internal and external changes. The clinical efficacy of cirDNA will require the identification and the control of various patient-related confounders that may

<sup>1</sup>IRCM, Institute of Research in Oncology of Montpellier, Montpellier, France. <sup>2</sup>INSERM, U1194, Montpellier, France. <sup>3</sup>University of Montpellier, Montpellier, France. <sup>4</sup>Regional Institute of Cancer of Montpellier, Montpellier, France. <sup>5</sup>Biometry Unit, Regional Institute of Cancer of Montpellier, Montpellier, France. <sup>6</sup>Digestive Oncology Department, Regional Institute of Cancer of Montpellier, Montpellier, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.R.T. (email: [alain.thierry@inserm.fr](mailto:alain.thierry@inserm.fr))





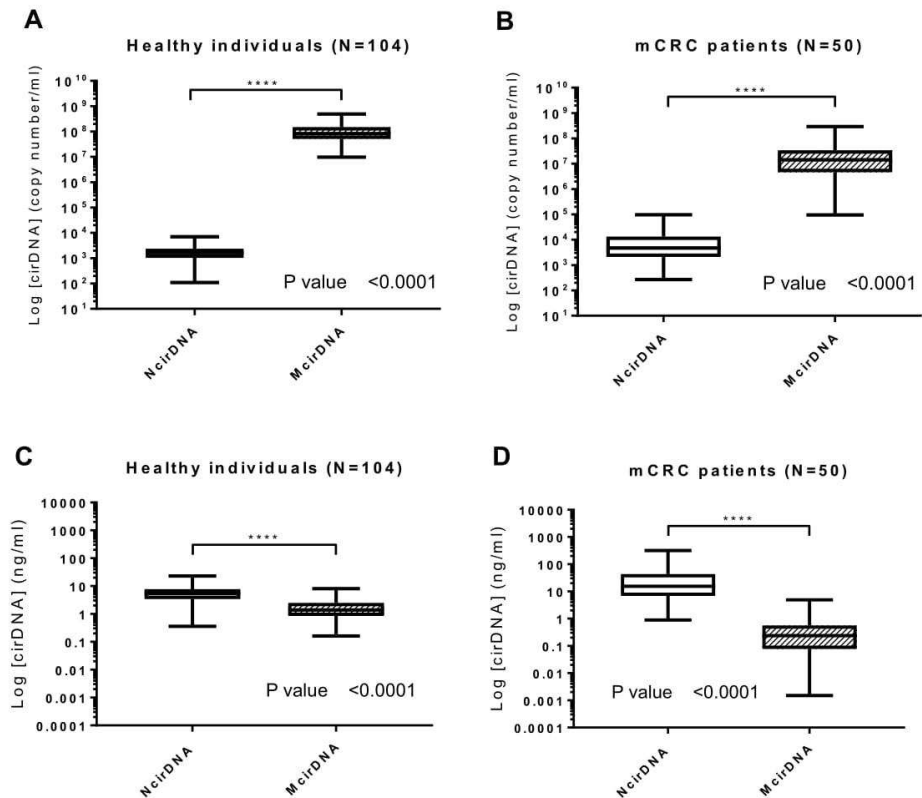
**Figure 1.** Flow chart of the study.

affect its measurement<sup>16</sup>. Human cellular aging is usually marked by senescence and cell death. Similarly, it often features a phenomenon, originally called “Inflamm-aging”, that induces a chronic or low-grade inflammatory state<sup>17–20</sup>. Indeed, it was demonstrated that tissue damage and a pro-inflammatory environment increase release of cirDNA into the blood stream<sup>14</sup>. Additionally, we may speculate that sex-based differences, such as genetic dissimilarity and steroid hormones levels, could cause differences in cirDNA concentration between men and women. Likewise, blood component concentrations may vary with the circadian clock and upon food intake and potentially influencing cirDNA concentration<sup>21</sup>. Despite outstanding research in the field of cirDNA, relatively few studies have examined the effect of pre-analytical and demographic parameters as sources of intra- and inter-individual variability in cirDNA levels. There is currently no single operating procedure and there are relatively few clinical guidelines in the literature<sup>22–25</sup>. This study aims first at defining a framework for cirDNA analysis, to harmonize NcirDNA and McirDNA quantification and to explore potential sources of variability that could cause interpretation errors. Previous studies already documented various pre-analytical limitations and specified conditions for cirDNA analysis, including specific collection tubes, and specific plasma isolation and extraction protocols, including storage condition variables and limits on the number of freeze-thaw cycles<sup>22–24,26</sup>. Here, we study the influence of various pre-analytical (plasma aspect, delay between blood collection and last food intake) and demographic variables such as age and gender in NcirDNA and McirDNA concentration determination, from plasma of 104 healthy donors and 118 mCRC patients (Fig. 1). In addition, we compared McirDNA and NcirDNA levels in healthy individuals and mCRC patients. Some others pre-analytical conditions such as blood collection tubes, blood collection time and blood stability were examined *ad hoc* study on healthy volunteers.

## Results

**Simultaneous quantification of NcirDNA and McirDNA.** We used serial dilutions of genomic DNA and of mitochondrial plasmid DNA to validate a reproducible, linear and sensitive assay to quantify, both nuclear and mitochondrial, circulating DNA (NcirDNA and McirDNA). The NcirDNA assay is based upon the qPCR detection of a sequence of the *KRAS* gene and it can detect one copy of nuclear *KRAS* gene per 6 microliters of plasma (1 nuclear Genome Equivalent per 12  $\mu$ L). The McirDNA assay can detect down to one copy of the mitochondrial *MT-CO3* gene per 1.7 microliter of plasma (1 mitochondrial Genome Equivalent per 1.7  $\mu$ L). Note, the targeted *MT-CO3* gene sequence was selected as being not mutated in the mitochondrial genome of cancer patients. Copy number calculation is performed by using a specific equation that eliminates bias in the nuclear or mitochondrial DNA calibration curves to allow simultaneous calculation of their real relative proportions. For example, in the cohort of 104 healthy individuals, we found a median NcirDNA and McirDNA plasma concentration of  $1.64 \times 10^3$  and  $8.32 \times 10^7$  copies/mL, respectively, corresponding to 5.43 and 1.36 ng/mL of plasma.

**Comparison between NcirDNA and McirDNA levels.** We compared NcirDNA and McirDNA concentration, in healthy individuals and mCRC patients groups, expressed either in copy number/ml and ng/ml of plasma. A supplementary table summarizes all quantification data and comparative tests in detail (Supplementary Table S1). There was a highly statistical difference between NcirDNA and McirDNA concentration expressed in copy number/ml, in healthy individuals (Fig. 2A; *Mann-Whitney U test*, *P value* < 0.0001) and equally in mCRC patients (Fig. 2B; *Mann-Whitney U test*, *P value* < 0.0001). We next compared McirDNA and NcirDNA concentration expressed in ng/ml, in healthy individuals and mCRC patients groups. Here, also, we observed a considerable statistical difference between NcirDNA and McirDNA concentrations in healthy individuals (Fig. 2C; *Mann-Whitney U test*, *P value* < 0.0001) and mCRC patients (Fig. 2D; *Mann-Whitney U test*, *P value* < 0.0001). McirDNA concentration is significantly higher than NcirDNA concentration when measured in units of copy number/ml, and conversely, the NcirDNA concentration was significantly higher than the McirDNA concentration when measured in ng/ml, either in healthy individuals and mCRC patients.



**Figure 2.** Respective values of NcircDNA and McircDNA plasma concentration. Boxplot analysis of circDNA concentrations from healthy individuals (N = 104) (A,C) and mCRC patients (N = 50) (B,D). Values are expressed either as copy number/ml (A,B) or as ng/ml (C,D). CircDNA concentration was determined as described in Materials and Methods. Boxplot represent median with min to max of values and Mann-Whitney U test was performed for comparison. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

**Effect of age and gender on circDNA concentrations in healthy individuals. NcircDNA. Age (n = 104):** We dichotomized the healthy individuals cohort in two groups around the median age, which was 47 (Table 1). The median NcircDNA copy number in the <47 years-old group (n = 52) and in the  $\geq 47$  years-old group (n = 52) were  $1.36 \times 10^3$  and  $1.73 \times 10^3$  copies/ml, respectively. A statistical difference was found between young and older healthy individuals groups (Fig. 3A; Mann-Whitney U test, P value = 0.009).

**Gender (n = 104):** The median NcircDNA copy number in the healthy male group (n = 62) and in the group of healthy females (n = 42) were  $1.69 \times 10^3$  and  $1.48 \times 10^3$  copies/ml, respectively. This difference in the NcircDNA copy number between healthy males and females was statistically significant (Fig. 3B; Mann-Whitney U test, P value = 0.048).

**Multivariate analysis:** Logistic regression analysis including age and gender specified that age over 47 years-old was predictive to have higher NcircDNA concentration (Fig. 3C; OR = 2.41, P = 0.033). Results of multivariate analysis and Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are summarized in Supplementary Table S2A.

**McirDNA. Age (n = 104):** The median McirDNA copy number in the <47 (n = 52) and in the  $\geq 47$  year-old group (n = 52) were  $7.77 \times 10^7$  and  $8.40 \times 10^7$  copies/ml, respectively. There was no statistical difference in the McirDNA copy number between these groups (Fig. 3D; Mann-Whitney U test, P value = 0.489).

**Gender (n = 104):** The median McirDNA copy number in the healthy male group (n = 62) and in the group of healthy women (n = 42) were  $8.03 \times 10^7$  and  $9.39 \times 10^7$  copies/ml, respectively. No statistical difference in McirDNA copy number was observed between healthy males and females (Fig. 3E; Mann-Whitney U test, P value = 0.485).

**Multivariate analysis:** Logistic regression analysis including age and gender confirmed no statistically significant difference between studied groups (Fig. 3F). Results of multivariate analysis and Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are summarized in Supplementary Table S2B.



Patient's characteristics					
Healthy individuals (N = 104)			mCRC patients (N = 118)		
<b>Age (years)</b>					
Mean	45		Mean	65	
Median	47		Median	65	
(min-max)	(18-69)		(min-max)	(22-91)	
<b>Gender</b>					
Males	62	59,6%	Males	68	57,6%
Females	42	40,4%	Females	50	42,4%
TOTAL	99		TOTAL	118	
<b>Males (N)</b>					
Mean age	45		Mean age	65	
Median age	47		Median age	65	
(min-max)	(19-69)		(min-max)	(34-88)	
<b>Females (N)</b>					
Mean age	44		Mean age	65	
Median age	45		Median age	67	
(min-max)	(18-63)		(min-max)	(22-91)	

**Table 1.** Characteristics of healthy individuals (N = 104) and mCRC patients (N = 118).

**Effect of various parameters on cirDNA concentrations in mCRC patients.** *NcirDNA. Plasma aspect (n = 106):* We first compared two groups, 27 abnormal plasmas (icteric and/or opaque plasmas) and 79 normal plasmas. There was no statistical difference in NcirDNA levels between abnormal plasmas and normal plasmas groups (Fig. 4A; *Mann-Whitney U test; P value = 0.266*). However, the median NcirDNA amount determined in abnormal plasmas group was slightly lower than in normal plasmas ( $3.62 \times 10^3$  vs  $5.22 \times 10^3$  copies/ml).

**Delay between blood collection time and last food intake (n = 89):** We then compared two groups, "1 h < delay < 5 h" (n = 69) and "other delays" (n = 20). There was no statistical difference in NcirDNA levels between "1 h < delay < 5 h" and "other delays" (Fig. 4B; *Mann-Whitney U test; P value = 0.220*). Nonetheless, the "1 h < delay < 5 h" group showed lower median NcirDNA amount than the group "other delays" ( $3.68 \times 10^3$  vs  $5.72 \times 10^3$  copies/ml).

**Age (n = 118):** We also dichotomized the mCRC cohort into two groups around the median age of 65 (Table 1). The median NcirDNA copy number in the <65 year-old group (n = 52) and in the ≥65 year-old group (n = 66) were  $4.73 \times 10^3$  and  $4.94 \times 10^3$  copies/ml, respectively. No statistical difference was found (Fig. 4C; *Mann-Whitney U test, P value = 0.757*). A comparative study using the same cut-off for both healthy and mCRC cohorts as the median age of all individuals tested here (N = 222, median age = 56 years) confirmed the statistical difference between young (N = 79) and older (N = 25) healthy individuals groups (*Mann-Whitney U test, P value = 0.0026*), and also the no statistical difference between young (N = 25) and older (N = 93) mCRC groups (*Mann-Whitney U test, P value = 0.913*) (Supplementary Fig. S1A,B).

**Gender (n = 118):** The median NcirDNA copy number in the mCRC males (n = 68) and in females (n = 50) mCRC patients were  $4.65 \times 10^3$  and  $5.40 \times 10^3$  copies/ml, respectively. No statistical difference was found (Fig. 4D; *Mann-Whitney U test, P value = 0.971*).

**Multivariate analysis:** Logistic regression analysis including all the parameters (plasma aspect, delay, age and gender) confirmed no statistical significant results (Fig. 4E). Results of multivariate analysis and Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are summarized in Supplementary Table S2C.

*McirDNA. Plasma aspect (n = 46):* We next compared the abnormal plasmas (n = 11) and normal plasmas (n = 35) groups. There was no statistical difference in McirDNA levels between abnormal and normal plasmas groups (Fig. 5A; *Mann-Whitney U test; P value = 0.263*). However, the median McirDNA amount determined in abnormal plasmas was slightly lower than in normal plasmas ( $6.64 \times 10^6$  vs  $1.19 \times 10^7$  copies/ml).

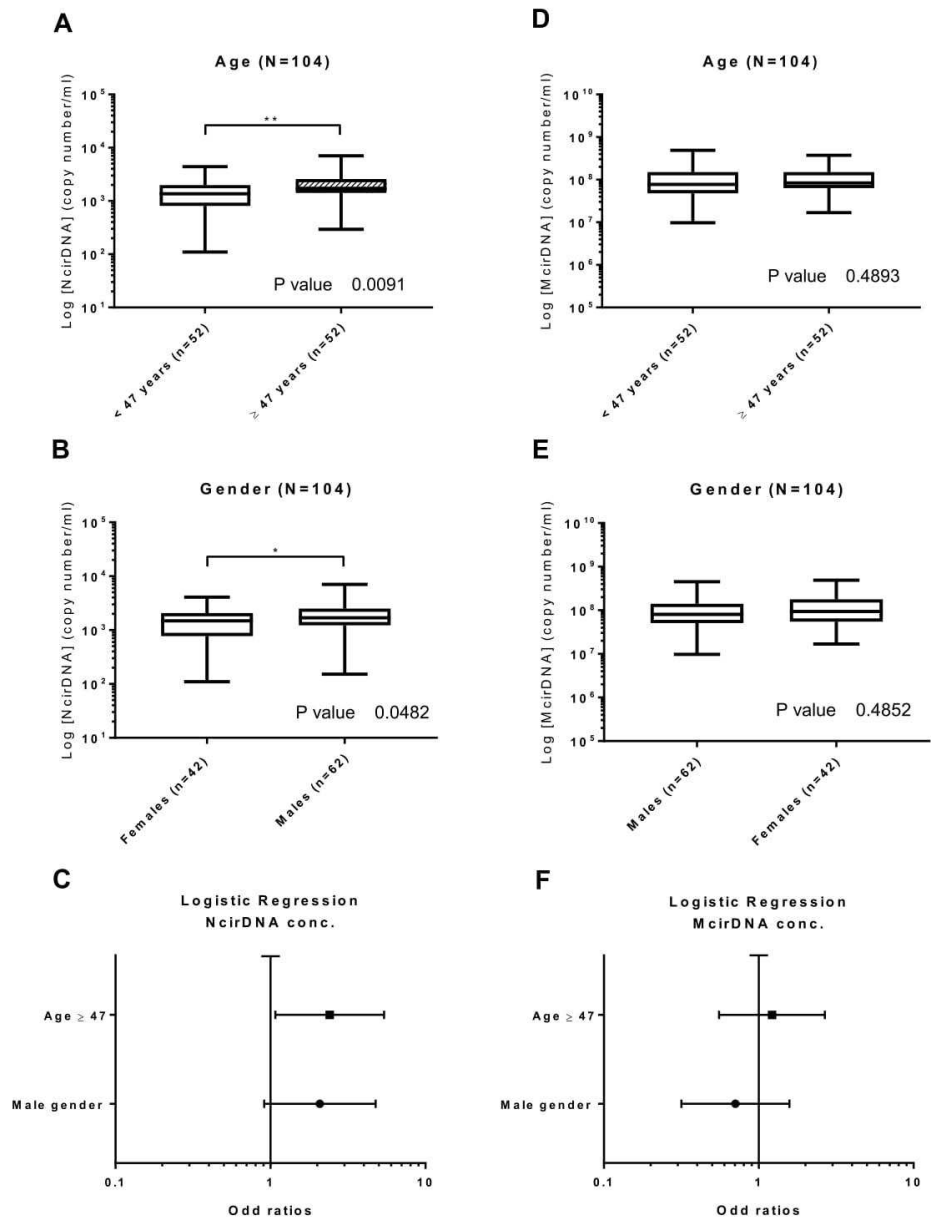
**Delay between day-time of blood draw and the last food intake (n = 34):** There was no statistical difference in McirDNA copy number between the "1 h < delay < 5 h" group (n = 25) and the "other delay" group (n = 9) (Fig. 5B; *Mann-Whitney U test; P value = 0.509*). The "1 h < delay < 5 h" group showed higher median McirDNA amount than the group "other delay" ( $1.68 \times 10^7$  vs  $1.19 \times 10^7$  copies/ml).

**Age (n = 50):** The median McirDNA copy number in the < 65 year-old (n = 23) and ≥ 65 year-old (n = 27) groups were  $1.12 \times 10^7$  and  $1.84 \times 10^7$  copies/ml, respectively. There was no statistical difference in the McirDNA copy number between the groups (Fig. 5C; *Mann-Whitney U test, P value = 0.240*).

**Gender (n = 50):** The median McirDNA copy number in the mCRC males group (n = 25) and in the group of mCRC women (n = 25) were  $1.19 \times 10^7$  and  $1.68 \times 10^7$  copies/ml, respectively. We did not find any statistical difference in the McirDNA copy number between mCRC males and females (Fig. 5D; *Mann-Whitney U test, P value = 0.261*).

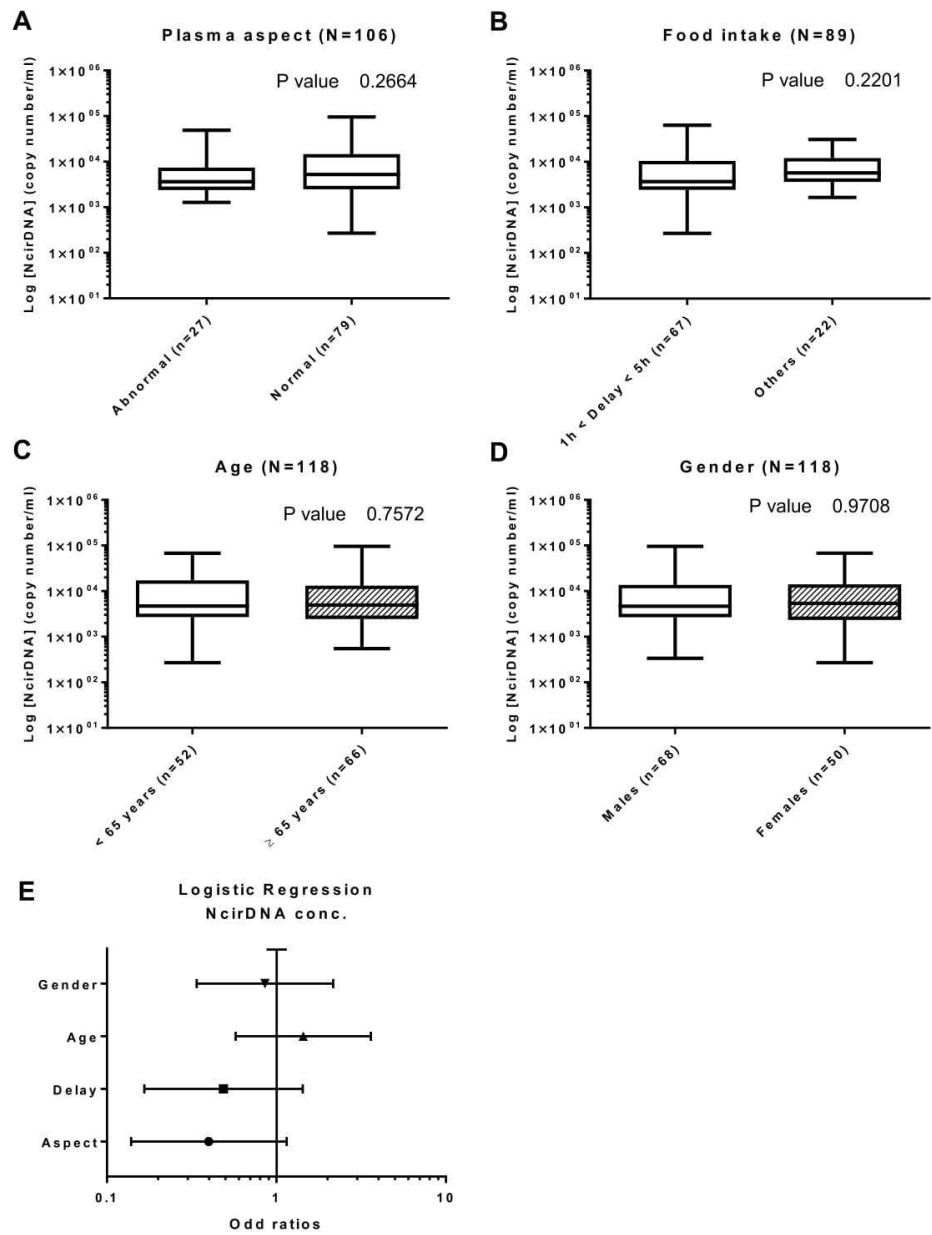
**Multivariate analysis:** Logistic regression analysis including all the parameters (plasma aspect, delay, age and gender) confirmed no statistically significant results (Fig. 5E). Results of multivariate analysis and Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are summarized in Supplementary Table S2D.





**Figure 3.** Influence of age and gender on cirDNA concentration in healthy individuals. Boxplot analysis of cirDNA concentration extracted from healthy individuals (N = 104), with regards to age (A,D) and gender (B,E). (C,F) Multivariate analysis representations. NcirDNA (A–C) and McirDNA (D–F) concentrations are expressed in copy number/ml of plasma. Boxplot represent median with min to max of values. Mann-Whitney U test was performed for univariate analysis and logistic regression was performed for multivariate analysis. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are represented. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

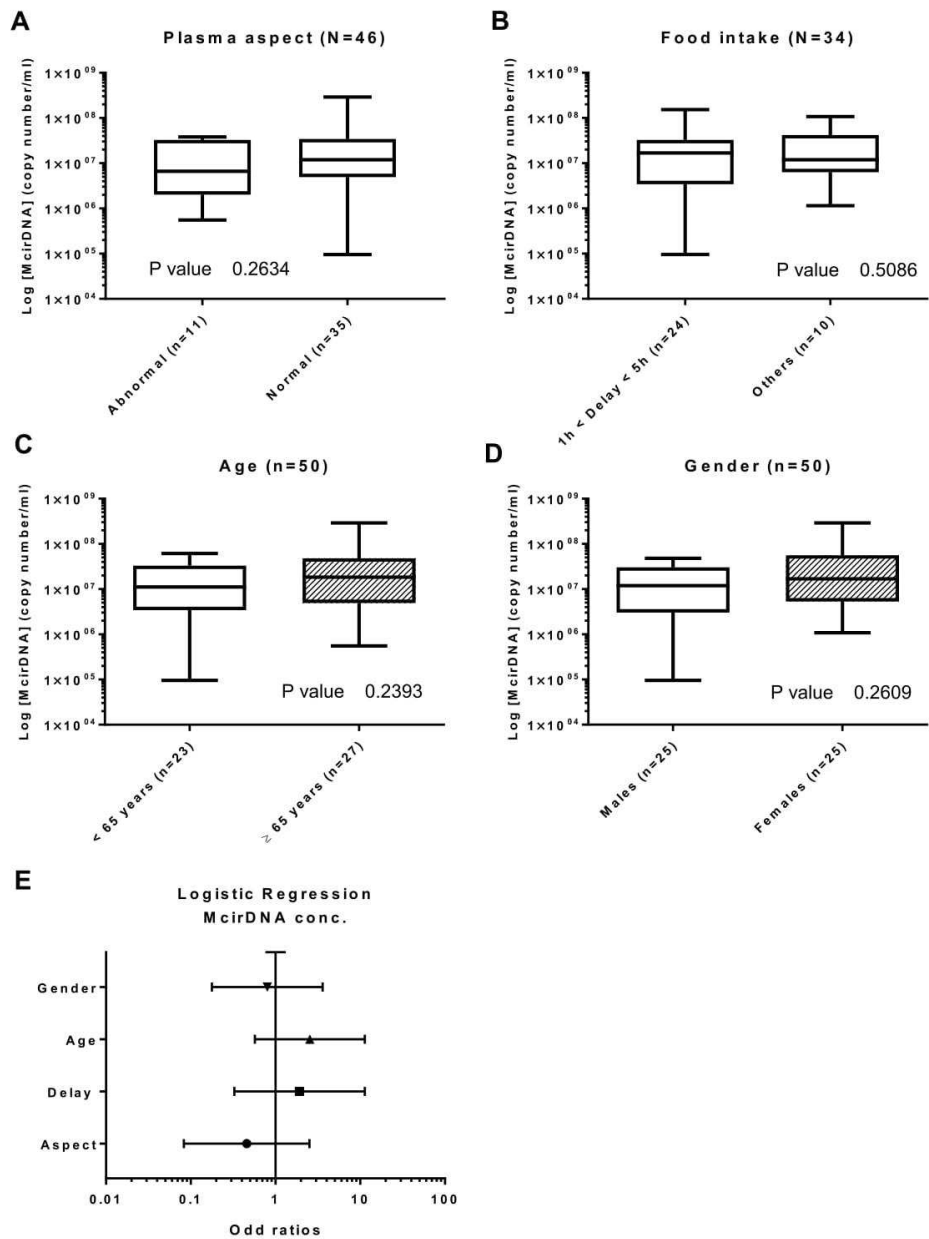
**Comparing cirDNA levels between mCRC patients and healthy individuals.** *NcirDNA.* We compared the median NcirDNA amount between healthy individuals (n = 104) and mCRC patients (n = 118). The median NcirDNA concentration in healthy individuals and mCRC patients was  $1.64 \times 10^3$  and  $4.73 \times 10^3$  copies/ml, respectively, revealing a significant difference between healthy individuals and mCRC patients (Fig. 6A; Mann-Whitney U test,  $P$  value < 0.0001).



**Figure 4.** Influence of various factors on NcirDNA concentration in mCRC patients. Boxplot analysis of NcirDNA concentration extracted from mCRC patients (N = 118), with regards to plasma aspect (A); delay between blood collection and last food intake (B); age (C) and gender (D). (E) Multivariate analysis representation. Boxplot represent median with min to max of values. Mann-Whitney U test was performed for univariate analysis and logistic regression was performed for multivariate analysis. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are presented. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

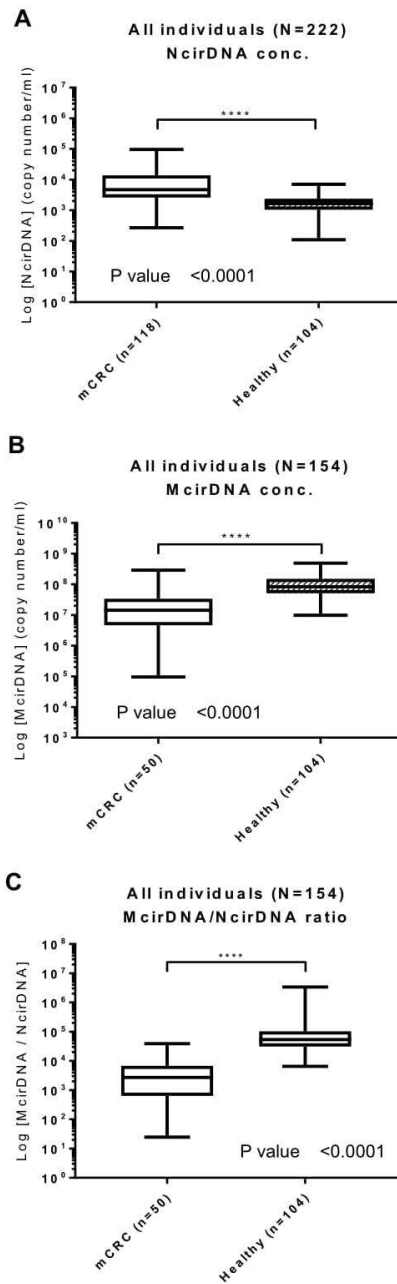
**McirDNA.** Next we compared the median McirDNA amount between healthy individuals (n = 104) and mCRC group (n = 50). The median McirDNA concentration in healthy individuals and mCRC patients was statistically different at  $8.32 \times 10^7$  and  $1.44 \times 10^7$  copies/ml, respectively (Fig. 6B; Mann-Whitney U test, P value < 0.0001).

**McirDNA/NcirDNA ratio.** Finally we compared the median McirDNA/NcirDNA ratio between healthy individuals (n = 104) and mCRC patients (n = 50). The median McirDNA/NcirDNA ratio in healthy individuals



**Figure 5.** Influence of various factors on McirDNA concentration in mCRC patients. Boxplot analysis of McirDNA concentration extracted from mCRC patients (N = 50), with regards to plasma aspect (A); delay between blood collection and last food intake (B); age (C) and gender (D). (E) Multivariate analysis representation. Boxplot represent median with min to max of values. Mann-Whitney U test was performed for univariate analysis and logistic regression was performed for multivariate analysis. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are presented. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

and mCRC patients were statistically different at  $5.41 \times 10^4$  and  $2.70 \times 10^3$  copies/ml, respectively (Fig. 6C; Mann-Whitney U test,  $P$  value  $< 0.0001$ ). The median McirDNA/NcirDNA ratio was 20-fold higher in the healthy individuals group than in the mCRC patients group. We did the same comparison using McirDNA and NcirDNA concentrations expressed in ng/ml and we obtained the same results (Supplementary Fig. S2, Mann-Whitney U test,  $P$  value  $< 0.0001$ ).



**Figure 6.** Biomarker capacity of respective NcirDNA and McirDNA concentration for discriminating healthy individuals and mCRC patients. The cohort was dichotomized in two populations (mCRC patients and healthy individuals). Boxplot analysis of the amount of NcirDNA (A) and McirDNA (B) extracted from plasma of all individuals (N = 222 and N = 154, respectively). (C) Boxplot analysis of the McirDNA/NcirDNA ratio of all individuals (N = 154). The boxplots represent medians with min to max of values and Mann-Whitney U test was performed for comparison. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

**CirDNA stability in whole blood samples of healthy volunteers.** NcirDNA concentration in blood collected in EDTA tubes increased by more than two-fold and three-fold respectively, at days 2 and 5 after blood collection (Supplementary Fig. S3A). In contrast, there was no difference between days 0, 2, 5 and 7 following



blood collection in Cell-Free DNA BCT® STRECK (BCT) tubes (Supplementary Fig. S3B). Note, median values at day 0 are similar in plasma from blood collected in EDTA or BCT tubes. In addition, The McirDNA concentration in blood collected in EDTA tubes approximately increased more than 12-fold and 27-fold respectively, at days 2 and 5 after blood collection (Supplementary Fig. S3C).

**Effect of the blood collection time on cirDNA levels in healthy volunteers.** *NcirDNA.* In EDTA tubes at 9.00 AM (fasted state), 12.00 PM (2 hours after breakfast), 3.00 PM (2 hours after lunch) and 6.00 PM, the median NcirDNA copy numbers were 1500, 480, 715 and 709 copies/ml respectively. An additional figure shows this in more detail (Supplementary Fig. S4A,E). Taking the four healthy individuals together, the median NcirDNA concentration strongly changed from the fasted state to three hours after breakfast. Median NcirDNA concentration was slightly higher at the earliest collection time in BCT tubes, over the same time-course of the day, at 874, 562, 728 and 313 copies/ml, respectively. An additional figure shows this in more detail (Supplementary Fig. S4B,F). Altogether our data from both collection methods showed that NcirDNA content in healthy individuals declined from 9.00 AM to 12.00 PM then plateaued up to the 6.00 PM collection time. An additional figure shows this in more detail (Supplementary Fig. S4C,D,G,H).

*McirDNA.* In EDTA tubes from healthy individuals, the median NcirDNA copy numbers were unchanged over the time course at 1.05, 1.25, 1.17 and 1.26 million copies/ml. An additional figure shows this in more detail (Supplementary Fig. S5A,B). No clear difference was found when comparing McirDNA amounts collected at the various collection time points. Note, plasma appearance become opaque at 6.00 PM. An additional picture illustrates this observation (Supplementary Fig. S6).

## Discussion

Here, we present a comprehensive study on the quantification of nuclear and mitochondrial cirDNA in the plasma of healthy individuals and a homogenous cohort of mCRC patients. To our knowledge, this work is the first to address altogether the influence of various preanalytical, analytical and demographical factors on NcirDNA and McirDNA levels in a large set of individuals ( $n > 200$ ). Solid tumor mass is composed of a variety of cells, mostly consisting of malignant/cancer, stromal, endothelial and immunological cells. In order to avoid any confusion in nomenclature, we define as ‘tumor cells’ all the cells composing the tumor mass. The concentration values presented in this study correspond to total cell-free DNA in plasma, either of nuclear or mitochondrial origin. Our observations are summarized in Table 2 and Supplementary Table S3.

**Total cirDNA levels.** This study design relies on the analytical performance of the assay. We used here a qPCR-based method with an unmatched combination, of reproducibility, sensitivity and specificity for quantifying plasma cirDNA (see Methods section). Furthermore, our assay benefits from a clinically-validated optimal pre-analytical process that we previously set up for plasma preparation<sup>22</sup>; and adapted from Chiu *et al.*, DNA extraction and sample handling<sup>27</sup>. The accuracy of the cirDNA concentration measurement in this study is supported by two assessments: (i) total cirDNA concentration by targeting a *KRAS* sequence was routinely controlled by quantifying a *BRAF* sequence. In addition, this control quality enable to detect and exclude sample with loss of heterozygosity (LOH) or gene amplification which have been reported in CRC patients<sup>28</sup>. Moreover, since *KRAS* amplification is an infrequent event in CRC (0.67%)<sup>28</sup>, this level will not modify our observations or the values described in our manuscript; and (ii) the study of cirDNA measurement under Poisson law distribution revealed single copy detection of nuclear cirDNA.

Respective NcirDNA and McirDNA proportions inverted when the plasma cirDNA concentrations were calculated according to copy number or mass (Fig. 2A,C). For example, data obtained from 104 healthy individuals revealed that median McirDNA plasma concentration was approximately 50,000-fold higher than median NcirDNA plasma concentration in terms of copy number/mL (99.998% McirDNA and 0.002% NcirDNA), corresponding to approximately 4-fold lower in terms of ng/ml (25.0% McirDNA and 75.0% NcirDNA). This highlights the much lower size of the mitochondrial genome (16569 bp) than the nuclear genome (about  $3 \times 10^9$  bp), and also the high number of mitochondrial genome copies within a cell. Each human cell, depending on its type, contains a number of mitochondria ranging from 500 to 2,000 and each mitochondria holds between 2 and 10 mitochondrial DNA molecules. Therefore, each cell may contain approximately 1,000 to 20,000 mitochondrial DNA molecules and only one nuclear genome equivalent, which is consistent with our results. Our method of calculation, described here, appears as the most rigorous means to simultaneously quantify mitochondrial and nuclear DNA concentrations. A higher coefficient of variation was routinely observed for mitochondrial than for nuclear DNA, despite the higher analytical signal for McirDNA copy number. The median concentration levels we found here appear to be similar to the average values observed in several studies<sup>27,29</sup>. In addition, performance of our assay support the accuracy of the values presented throughout this study such as 5.43 and 1.36 ng/mL in healthy subject plasma of N- and McirDNA, respectively. Considering the significant percentage of McirDNA (i.e.: 25% in healthy subjects) among total cirDNA mass existing in plasma, we propose to always specify the origin of cirDNA when examining total circulating WT DNA.

**Influence of age and gender on NcirDNA levels in healthy individual plasma.** Most studies found no relationship between NcirDNA levels and any demographic parameters, such as age and gender, in healthy individuals<sup>30–32</sup>. A few studies showed opposite observations<sup>33–35</sup>. Here, we observed an influence of age on NcirDNA plasma concentration in the healthy individual cohort as a whole ( $p = 0.009$ ). Our data also revealed a statistical difference in NcirDNA amount between healthy males and females ( $p = 0.048$ ). We performed logistic regression for multivariate analysis including age and gender and showed that age  $\geq 47$  was predictive of a high NcirDNA concentration (OR = 2.41,  $p = 0.033$ ). This observation is in accordance with a study by Jylhävä *et al.*

Demographical considerations	Group	N	In accordance with previous works
<b>NcirDNA concentration</b>			
A statistical difference between males and females	Healthy	104	Catarino R, <i>et al.</i> <sup>63</sup>
No statistical difference between males and females	mCRC	118	Hao TB, <i>et al.</i> <sup>31</sup>
A statistical difference with regard to age	Healthy	104	Jylhävä J, <i>et al.</i> <sup>35</sup>
No statistical difference with regard to age	mCRC	118	Van der Drift MA, <i>et al.</i> <sup>30</sup>
Statistical increase in mCRC patients as compared to healthy individuals	Healthy mCRC	104 118	Bedin C, <i>et al.</i> <sup>64</sup>
<b>McirDNA concentration</b>			
No statistical difference between males and females	Healthy mCRC	104 50	New observation
No statistical difference with regard to age	Healthy mCRC	104 50	Jylhävä J, <i>et al.</i> <sup>35</sup> New observation
Statistical decrease in mCRC patients as compared to healthy individuals	Healthy mCRC	104 50	New observation
<b>McirDNA vs NcirDNA concentration</b>			
Necessity of independently quantifying NcirDNA and McirDNA			
About 50,000-fold more McirDNA copy number as compared to NcirDNA in healthy individuals	Healthy	104	New observation
About 3,000-fold more McirDNA copy number as compared to NcirDNA in cancer patients	mCRC	50	New observation
About 20-fold more McirDNA/NcirDNA ratio in healthy individuals as compared to mCRC patients	Healthy mCRC	104 50	New observation

**Table 2.** Summary of the observations made on the influence of demographical factors.

that consisted of 12 nonagenarian women (age > 90 years) and 11 healthy control female (22 < age < 37 years) that showed a higher concentration of NcirDNA in nonagenarians than in control women<sup>33</sup>. The authors explained this increase in the amount of cirDNA with age, as the accentuation of a senescence phenomenon and cell death, caused by an inflammation associated with age and even by decreased clearance and phagocytic capacity. Zhong *et al.* showed a significant increase in total plasma cirDNA concentration in women over 60, compared to younger women, which appears to be consistent with Jylhävä's study. We may speculate that menopause could be an explanation of the statistically higher NcirDNA concentration in healthy males as compared to healthy females ( $p = 0.048$ ), whereas no difference between mCRC males and females was observed ( $p = 0.971$ ). This speculation is based on two observations: (i) Median menopausal age in the European population is 51 years-old; 10–15% of women go into menopause before the age of 45, and globally 90–95% reach menopause by 55 years of age. By applying these categories of age to our women cohorts, we observed no statistical difference and no tendency between mCRC women <45, 45–54 and ≥55 year-old (*Kruskal-Wallis rank test*,  $P$  value = 0.592) while we showed a statistical difference between healthy women <45, 45–54 and ≥55 year-old, with a concentration gradient: 1275, 1440 and 2610 median copy number, respectively (*Kruskal-Wallis rank test*,  $P$  value = 0.026); and (ii) CRC females are at a high risk of chemotherapy-induced menopause or menstrual disorders like amenorrhea or a decrease of steroid hormone levels<sup>36,37</sup>, and metachronous mCRC patients may attain a menopausal state earlier. An additional figure shows these results in more detail (Supplementary Fig. S7).

**Influence of various parameters on NcirDNA levels in mCRC patients plasma.** Despite the large number of studies that aimed at determining if age and gender might influence NcirDNA levels, no clear results have been demonstrated<sup>30–32,38</sup>. There are discrepancies in the literature with regards to the influence of age and gender in patient populations suffering from various types of cancers. These discrepancies could result from use of serum, or pre-analytical or analytical factors. Note, a study by Hohaus *et al.* showed that patients with Hodgkin and non-Hodgkin's lymphoma over 60 year-old ( $n = 142$ ) had higher levels of cirDNA in plasma than younger patients ( $p = 0.018$ )<sup>38</sup>. Conversely, our data showed no statistical influence of age ( $p = 0.757$ ) and gender ( $p = 0.971$ ) on NcirDNA concentration in mCRC patients and these results was confirmed with a multivariate analysis using logistic regression. We also demonstrated no influence of pre-analytical factors like plasma aspect ( $p = 0.266$ ) or delay between last food intake and blood collection ( $p = 0.220$ ). On the other hand, our results also confirm those previously published by our laboratory<sup>25</sup> and by many teams<sup>39,40</sup>, namely that NcirDNA concentration is significantly higher cancer patients than in healthy individuals ( $p < 0.0001$ ), whether male or female. For more than a decade it was suggested that total NcirDNA could be a cancer biomarker<sup>25,41,42</sup>. However, previous attempts to apply total cirDNA quantity as a screening test for cancer lacked a strong statistical demonstration<sup>43</sup>. High standards, with regard to pre-analytical factors and quantification, could lead to its use as one marker, among other, for tumor burden.

**McirDNA levels in plasma.** Relatively few reports have quantitatively analyzed McirDNA and there are discrepancies among them. In one study there was no significant difference between young and aged healthy subjects<sup>35</sup>. For Pinti *et al.* however, McirDNA concentration would increase with age<sup>18</sup>. In this study, McirDNA content was analyzed in 831 plasma samples from subjects with different healthy status, aged from 1 to 104 years; McirDNA content significantly increased after fifty years-of-age and it peaked in nonagenarians. Elevated McirDNA levels might



help maintain the low-grade chronic inflammation that is common in elderly individuals. With regards to McirDNA level in cancer patients, Mengel-From *et al.* measured McirDNA copy number in blood cells from 1,067 subjects aged 18 to 93 and conversely, observed a tendency for lower mitochondrial DNA copy number with advanced age<sup>44</sup>. These findings are consistent with other studies, performed on different types of tissue, such as skeletal muscle and pancreatic islets<sup>45,46</sup>. This age-related tissue-specific depletion of cellular mitochondrial DNA could lead to a proportional reduction of McirDNA copy-number in plasma. Inversely, there was no association between serum McirDNA levels and demographic parameters (age/gender) in urological malignancies<sup>47,48</sup>. Likewise, in breast cancer, there was no significant difference in McirDNA content in blood samples of stage I patients with respect to their age<sup>49</sup>. Our data revealed no influence of age and gender on McirDNA concentration, either in plasma of healthy individuals or mCRC patients. These results were confirmed in multivariate analysis. We also reported no significant influence of plasma aspect ( $p = 0.263$ ) and delay between last food intake and blood collection ( $p = 0.509$ ). Nonetheless, our data revealed a significant higher McirDNA than NcirDNA concentration in plasma, whether for mCRC patients, healthy individuals, male or female, and regardless of the age of the subject. Note, while median NcirDNA concentration is much higher in mCRC patients than in healthy individuals, median McirDNA concentration is conversely lower in mCRC patients, revealing a proportionally lower McirDNA release from cancer cells. This might be explained by the fact that cancer cells, in comparison to healthy cells, may have, among other differences, fewer mitochondria per cell and less DNA within their mitochondria<sup>34,50</sup>. However, this is still controversial and explanation of our striking observation is under active investigation in our team. Nevertheless, we may speculate that the McirDNA/NcirDNA ratio might have some power in discriminating healthy individuals from cancer patients. McirDNA/NcirDNA ratio is undergoing clinical validation as potential biomarker for tumor burden or diagnosis in a large study involving broader scope of cancer patients with various malignancies and stages. In light of the high copy number of McirDNA and its tendency to be mutated in cancer<sup>51</sup>, our observations confirm the gradual acceptance of McirDNA as a new potent diagnostic and prognostic biomarker for many solid tumors<sup>52</sup>.

**Blood stability for cirDNA plasma assessment.** As previously reported<sup>23,53</sup>, NcirDNA concentration determined from blood collected in EDTA tubes increased with time highlighting release of genomic DNA resulting from blood cell lysis when stored at room temperature or +4 °C and consequently to contamination of cell-derived DNA. Note, whole blood stored in EDTA tubes at +4 °C showed no change in cirDNA concentration for up to one day suggesting their potential use within this time period (data not shown)<sup>23,53</sup>. We propose routine clinical analyses use plasma stored in EDTA tubes for up to 6 hours, given the uncertainty of maintaining the temperature of samples in the course of blood processing, as we earlier described<sup>54</sup>. Conversely, BCT tubes appeared to conserve blood cell integrity, since no DNA concentration increase was observed up to 7 days following blood collection<sup>23,55</sup>. Thus, BCT tubes maintain the true cirDNA concentration and are good tools to conserve/stabilize blood for optimal quantification of NcirDNA for up to 7 days following collection. Cell-preserving tubes greatly allows postal shipment of whole-blood within this time period and it allows interventional analysis as well as enabling clinical centers that lack lab facilities to immediately prepare plasma. While being cheaper by themselves, use of EDTA tubes necessitates plasma preparation within a short time frame and immediate subsequent storage under frozen conditions until analysis requiring costly shipment when plasma originate from a single patient. We first reported that McirDNA concentration determined from blood collected in EDTA tubes strongly increased with time. We may assume that this results as well blood cell lysis and blood cell-derived mitochondrial DNA contamination.

**Effect of blood collection time on cirDNA plasma concentration.** There is currently no indication in the literature on the optimal time for blood collection when analyzing cirDNA. Our data seem to indicate that NcirDNA median levels are 2- to 3-fold higher at 9.00 AM, which is the earliest time-point examined, compared to later blood-collection time-points (12.00, 3.00 and 6.00 PM) when the NcirDNA level stabilizes. Decrease from 9.00 AM to 12.00 PM might be explained by the postprandial effect of the breakfast being taken at 10.00 AM. This hypothesis is supported by several observations. First, we reported that NcirDNA plasma levels in blood collected between one and five hours after food intake were lower than in blood collected on patients under fasting conditions. It was previously showed that plasma triglyceride increased one hour after food intake, peaked  $\approx 3$  hours after intake of a test meal and baseline values were restored back to initial values after 5 hours<sup>56</sup>. Second, NcirDNA concentration was lower in opaque than in non-opaque plasmas. Multivariate analysis including age, gender, plasma aspect and delay between food intake and blood collection revealed no statistical influence but abnormal plasma aspect showed a clear tendency to have lower NcirDNA concentration ( $OR = 0.399$ ;  $p = 0.089$ ). These observations are all consistent with postprandial effects. Food intake with high lipid content may result in hyperlipidemia which can be characterized by opaque plasma and high triglyceride concentrations. However, despite the large examined cohort data, we cannot state that postprandial is the explanation since no statistical difference was found. This may be due to various factors: (i) blood triglyceride levels largely depend on fat distribution and body weight, lifestyle choices, and also genetic factors<sup>57</sup>; (ii) there were considerable within- and between-subject variations in non-fasting plasma triglycerides<sup>58</sup>; and (iii) the subjects had a chronic illness, mCRC. We speculate that the postprandial effect could occur because the presence of lipids or proteins may interfere with DNA extraction yield from plasma. We cannot exclude the possibility that NcirDNA levels depend on circadian clocks and metabolism, resulting in more elevated concentration in the morning. Moreover, we cannot exclude the possibility that other metabolic changes during fasting/feeding alter cirDNA yield. Nevertheless, our data suggest that fasting blood samples should be included when studying or clinically examining cirDNA to improve its diagnostic performance, especially when low mutation frequency in cancer patients or prenatal testing is considered. Note, in addition to opaque plasma, we remarked on various occasions that, icteric plasma had aberrant cirDNA concentration when qPCR was the analytical method. Therefore, we propose observation of icteric, hemolytic and opaque plasma as criteria of blood sample exclusion.



**Limitations of the study.** While the study was carried out with statistically sufficient number of subjects to support the observations, the *ad hoc* study is limited by the low number of tested individuals since *ad hoc* study experiments are cumbersome and time-consuming. Thus, blood stability and blood collection time was only carried out on a few number of healthy volunteers ( $n = 5$ ) and not on mCRC patients. This not allowed us to provide statistical analysis while the results showed clear tendencies. A specific study should be performed to statistically confirm these results on a larger cohort of healthy volunteers as well as mCRC patients. Although we routinely experienced that abnormal plasmas resulted in lowering cirDNA concentration values, we cannot fully discriminate the implication of postprandial effects like triglycerides serum level, to the possible involvement of biological changes due to the circadian rhythm. In order to definitively address this issue, it would be interesting to compare NcirDNA levels at 9.00 AM and 12.00 AM, with and without breakfast, in order to determine the impact of food intake and circadian rhythm, respectively. In addition, the influence of the menopause on cirDNA concentration with regard to our observations of gender, age and pathological status is only speculative. A specific study on the difference of NcirDNA concentration between postmenopausal and premenopausal healthy females, as well as the difference between premenstrual and postmenstrual young women, should be performed to definitively address this issue. Conclusions drawn here in respect to cancer plasma samples should be restricted to mCRC patients and extension to other malignancies or even to localized disease is speculative.

In conclusion, the levels of mitochondrial and nuclear circulating DNA differently vary with regards to pre-analytical and demographic factors. Those variables should be taken into consideration when evaluating cirDNA analysis in clinical setting and perhaps in the future clinical practice when cirDNA quantification is directly or indirectly used as a biomarker. In addition, our study highlights the potential for combining the analysis of NcirDNA and McirDNA since examining their respective levels may have diagnostic value.

## Methods

**Patients.** Blood samples collected from 104 healthy donors were provided by the Etablissement Français du Sang (E.F.S), the blood transfusion center of Montpellier (Convention EFS-PM N° 21PLER2015-0013). Blood samples collected by the E.F.S were analyzed (virology, serology, immunology, blood numeration). If an anomaly is detected, the sample is ruled out and the donor is warned then by mail. NcirDNA concentration and McirDNA copy number were determined for all healthy individuals. Data on age and gender were collected for all healthy individuals. mCRC patients data are taken from a study comparing the detection of *KRAS* exon 2 and *BRAF V600E* mutations by circulating DNA (cirDNA) analysis to conventional detection by tumor tissue analysis<sup>59</sup>. This study (KPLEX2) was performed and presented under the STARD criteria. 140 patients have been included in 11 clinical centers in France, over a period of 12 months. Eligible patients were male or female, aged  $\geq 18$  years, with a proven histologically mCRC, a measurable disease as defined by response evaluation criteria in solid tumors (RECIST v1.1) and untreated by radiotherapy or chemotherapy in the last 4 weeks before inclusion. There is no possibility that cirDNA from mCRC patients can be affected by therapy since eligible patients were untreated by radiotherapy or chemotherapy in the last 4 weeks before blood collection (inclusion criteria). Written consent was obtained from the part of all patients. Inclusion criteria were described previously<sup>59</sup>. 19 were excluded from analysis for no respect of the inclusion criteria (due to various inclusion criteria) and 3 were excluded due to lack of data collected on age or gender. NcirDNA analysis was performed on 118 patients and McirDNA analysis on 50/118 mCRC patients. While study on age and gender effect were carried out on all the included mCRC patients for NcirDNA ( $N = 118$ ), cohort patient number varied when studying plasma aspect and delay for NcirDNA, or age and gender for McirDNA because of two main reasons: non-reported information for delay and plasma aspect for NcirDNA and insufficient plasma volume needed to carry out supplementary analysis for McirDNA. All data on age and gender were collected. Plasma aspect (normal, abnormal: opaque or/and icteric) was noted for 106/118 mCRC patients and delay between time of blood draw and the last food intake was informed for 89/118 mCRC patients.

**Ethics approval and consent to participate.** Blood samples collected from 104 healthy donors were provided by the Etablissement Français du Sang (E.F.S), the blood transfusion center of Montpellier (Convention EFS-PM N° 21PLER2015-0013). Plasma samples from mCRC patients were obtained from the Kplex2 study registration number EUDRACT 2016-001490-33 with ethic committee approval ("Comité de Protection des Personnes", Nîmes, France). All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. The study obtained informed consent from all participants for the study.

**Blood stability.** 7 samples for each healthy donor were collected at 9.00 a.m. on Day 0 (fasted state): 3 with EDTA K2 tubes and 4 with Cell-Free DNA BCT® STRECK tubes. Each tube was processed as we early described, at day 0, 2 and 5 for EDTA tubes and day 0, 2, 5 and 7 for BCT tubes. EDTA tubes were stored at  $+4^{\circ}\text{C}$  and BCT tubes were conserved at room temperature before isolation. Healthy individual N°1 (HI1) and N°2 (HI2) are 57 year-old and 29 year-old men, respectively, both with no known disease. Healthy individual N°3 (HI3), N°4 (HI4) and N°5 (HI5) are 25 year-old, 24 year-old and 28 year-old women, respectively, both with no known diseases. NcirDNA analysis for HI1 was not performed due to clotting in BCT tubes.

**Blood collection time.** 4 blood collection times were defined 9.00 a.m. (fasted state), 12.00 p.m. (2 hours after breakfast), 3.00 p.m. (2 hours after lunch) and 6.00 p.m. (4 hours after lunch). One EDTA K2 and one Cell-Free DNA BCT® STRECK tube per day-time were collected for each donor. Healthy individual N°6 (HI6) and N°7 (HI7) are 29 year-old and 27 year-old men, respectively, both with no known diseases. Healthy individual N°8 (HI8) and N°9 (HI9) are 28 year-old and 30 year-old women respectively, both with no known diseases. Each donors took the same meal during breakfast: one butter croissant, one chocolate croissant and one coffee with sugar; and for the lunch: a dish of tomato rice with sausage, bread and one coffee with sugar.



**Sample characteristics and preparation.** Samples were collected and treated in accordance with a pre-analytical guideline previously established by our group<sup>22</sup>. In summary, blood was collected in EDTA K3 tubes and plasma was isolated within 2 hours. The isolation technique consist of a double centrifugation. Initially, tubes were centrifuged for 10 minutes at 4 °C and 1,200 g in a Heraeus Multifuge LR centrifuge. The supernatant was collected while carefully avoiding the buffy-coat. The second centrifugation was conducted for 10 minutes at 4 °C and 16,000 g. The supernatant was transferred to 1.5 ml tubes before performing the extraction of cirDNA or being stored at -20 °C. CirDNA extraction was performed with the Qiagen Blood Mini kit, following all steps of the protocol. In all, 0.2 to 1 ml of plasma was extracted in several successive passes on a column. The final elution volume was 80 to 130 µl and eluates were frozen at -20 °C prior to analysis by qPCR. Freeze-thaw cycles should be avoided to reduce the phenomenon of cirDNA fragmentation and the extracts are not kept longer than 3 months at -20 °C.

**Q-PCR analysis.** CirDNA analysis was performed by a qPCR technique developed in our laboratory, and clinically validated previously<sup>60</sup>. The method is based on an innovative design of short amplicons (60–100 bp ± 10 bp) targeting a wild-type sequence of the gene, (here the *KRAS* nuclear gene and the mitochondrial Cytochrome oxidase III gene, *MT-CO3*). Quantification of this amplicon gives an estimation of the total NcirDNA and McirDNA concentration, respectively. For the quantification of NcirDNA, we amplified a 67 bp-length sequence of the *KRAS* gene with the following primers: forward (5' CCTTGGGTTTCAAGTTATATG 3') and reverse (5' CCCTGACATACTCCCAAGGA 3'). For McirDNA, we amplified a 67 bp-length sequence of the cytochrome oxidase sub-unit 3 mitochondrial gene with the following primers: forward (5' GACCCACCAATCACATGC 3') and reverse (5' TGAGAGGGCCCTGTAG 3'). These primers were designed using the Primer 3 software according to the following requirements: (i)  $T_m$  ranging from 50 to 64 °C; (ii) GC-content between 40 and 60%; (iii) size from 18 to 23 NT; (iv) amplicon size ranging from 60 to 100 bp. We performed local-alignment analyses with the BLAST program to confirm the specificity of the designed primers. All sequences were checked for self- or inter-molecular annealing with nucleic-acid-folding software (Mfold and oligoAnalyzer 1.2). Oligonucleotides were synthesized and HPLC-purified by Eurofins (Ebersberg, Germany) and quality control of the oligonucleotides was performed by MALDI-TOF. For all analyses, negative controls and standard curves were used. All tests are performed in triplicate with 5 µl of DNA extract in a 25 µl reaction volume, on a CFX96 instrument using CFX manager software (Bio-Rad). This method (qPCR, primer design, program) and technical validation have been described previously<sup>25</sup>. The mCRC patient's blood samples were excluded if the total cirDNA concentration, due to a problem of pre-analytic treatment or even for unknown reasons, was below a quality threshold.

The DNA concentration quality threshold was 3 ng/mL (about 900 copies/mL) for cancer patients. Note, this value corresponds to about the half of the median concentration found for healthy individuals (N = 104, median NcirDNA concentration = 5.43 ng/mL of plasma corresponding to 1645 copies/mL). In addition to quantifying cirDNA by targeting two different sequences on two different chromosomes, an experiment based on Poisson law distribution showed the accuracy of our cirDNA amount measurement (Supplementary Fig. S8). It should be noted that our Q-PCR systems enable the detection of a single genome copy (Supplementary Table S4), and that we have previously shown that targeting a DNA sequence of the same size or longer than the input DNA fragment produced a similar PCR yield<sup>61</sup>. The measurement of the total cirDNA concentration by targeting a *KRAS* sequence was routinely controlled by quantifying a *BRAF* sequence. Control quality is acceptable when the *KRAS*-based value is 1.3 to 1.8-fold higher than that of the *BRAF*-based value when using the reported Q-PCR primer systems; otherwise, a second analysis is performed. Note, *BRAF* analysis data from 33 healthy individuals were not available. In addition, we excluded 26 patient plasmas (17 mCRC and 9 healthy) in which the *KRAS/BRAF* ratio was over 3 or below 0.5. Data revealed that the *KRAS*-based concentration value was positively correlated with the *BRAF*-based concentration values in the 62 healthy individuals (Spearman analysis;  $r = 0.762$ ,  $P \text{ value} < 0.0001$ ) and in the 101 mCRC patients (Spearman analysis;  $r = 0.882$ ,  $P \text{ value} < 0.0001$ ) (Supplementary Fig. S9). We already addressed this issue in our previous report (Spearman analysis;  $r = 0.966$ ,  $P \text{ value} < 0.001$ )<sup>25</sup>. The *KRAS* and *BRAF* genes are monogenic and poorly amplified in both healthy and cancer individuals<sup>62</sup>. Supplementary section figures present NcirDNA concentration determined from targeting *BRAF* with using a primer set of similar size. Data revealed that the same observations could be made: the NcirDNA amount, as determined using *BRAF* sequence targeting, is statistically different in healthy (N = 62) and mCRC individuals (N = 101) (Supplementary Fig. S10; Mann-Whitney U test,  $P \text{ value} < 0.0001$ ), and fully correlates with our observation based on *KRAS* sequence targeting. We may therefore indicate that amplification of the *KRAS* gene will not have any influence on the observations and conclusions made in this study. Valtorta *et al.* detected *KRAS* amplification in 7/1,039 (0.67%) evaluable CRC specimens, demonstrating that *KRAS* amplification is an infrequent event in CRC<sup>28</sup>. Thus this level will not modify significantly the observations or values described in our manuscript.

**CirDNA calibration assay.** *NcirDNA.* A genomic DNA extract from human wild-type *KRAS* colorectal cells was used for the NcirDNA calibration assay. Initial genomic DNA solution concentration and purity were determined by measuring optic density at  $\lambda = 260$  nm, 230 nm and 280 nm, with an Eppendorf BioPhotometer® D30. Starting genomic DNA concentration was adjusted to 1800 pg/µl for the first dilution point, according to optic density measurement at  $\lambda = 260$  nm. A qPCR standard curve was obtained by 6 successive dilutions of the vector solution (1800, 180, 45, 20, 10 and 5 pg/µl). The standard curve was used to determine the NcirDNA concentration of the mCRC patients and healthy individuals and calculate the NcirDNA copy number per milliliter of plasma.

*McirDNA.* A 3382-pb human ORF vector with a 786-pb *MT-CO3* insert was obtained from ABM good® (accession no.YP\_003024032) and used for the McirDNA calibration assay. Initial vector solution concentration

and purity were determined by measuring optic density at  $\lambda = 260$  nm, 230 nm and 280 nm, with an Eppendorf BioPhotometer® D30. Starting vector concentration was adjusted at 1800 pg/ $\mu$ l for the first dilution point, according to optic density measurement at  $\lambda = 260$  nm. A qPCR standard curve was obtained by 6 successive dilutions of the vector solution (1800, 180, 45, 20, 10 and 5 pg/ $\mu$ l). The standard curve was used to determine the McirDNA concentration of the mCRC patients and healthy individuals and calculate the McirDNA copy number per milliliter of plasma.

**CirDNA copy number calculation.** *NcirDNA.* NcirDNA copy number per milliliter of plasma, in all analyses, was determined with the following calculation:

$$Q_{nuclear} = \left( \frac{c}{3, 3} \right) * \left( \frac{V_{elution}}{V_{plasma}} \right)$$

$Q_{nuclear}$  is the NcirDNA copy number per milliliter,  $c$  is the NcirDNA concentration (pg/ $\mu$ l) determined by qPCR targeting the nuclear *KRAS* gene sequence and 3.3 pg is the human haploid genome mass.  $V_{elution}$  is the volume of cirDNA extract ( $\mu$ l) and  $V_{plasma}$  is the volume of plasma used for the extraction (ml).

*McirDNA.* McirDNA copy number per milliliter of plasma, in all analyses, was determined with the following calculation:

$$Q_{mito} = \left( \frac{c * N_A}{2 * MW * L_{vector}} \right) * \left( \frac{V_{elution}}{V_{plasma}} \right)$$

$Q_{mitochondrial}$  is the McirDNA copy number per milliliter, ' $c$ ' is the McirDNA mass concentration (g/ $\mu$ l) determined by a qPCR targeting the mitochondrial *MT-CO3* gene.  $N_A$  is Avogadro's number ( $6.02 * 10^{23}$  molecules per mole),  $L_{vector}$  is the plasmid length (nucleotides) and  $MW$  is the molecular weight of one nucleotide (g/mol).  $V_{elution}$  is the elution volume of cirDNA extract ( $\mu$ l) and  $V_{plasma}$  is the volume of plasma used for the extraction (ml).

**Statistical analysis.** For continuous variables, median and range were computed. To investigate their associations with the biologic parameters, univariate statistical analyses were performed using Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis rank test for continuous variables. Moreover, multivariate analyses were carried out using logistic regressions, with a stepwise selection procedure, to investigate known predictive. Odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CIs) are presented. The power of analysis was reduced due to all patients did not have measurements for all variables. All P values reported are two sided. A probability of  $\leq 0.05$  was considered to be statistically significant; \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ . Statistical analysis was performed using the STATA 13.1 software (Stata Corporation, College Station, TX).

### Data Availability

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### References

- Mandel, P. & Metais, P. [Not Available]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **142**, 241–243 (1948).
- Malik, A. N. *et al.* Altered circulating mitochondrial DNA and increased inflammation in patients with diabetic retinopathy. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **110**, 257–265 (2015).
- Dhondup, Y. *et al.* Low Circulating Levels of Mitochondrial and High Levels of Nuclear DNA Predict Mortality in Chronic Heart Failure. *J. Card. Fail.* **22**, 823–828 (2016).
- Timmermans, K., Kox, M., Scheffer, G. J. & Pickkers, P. Plasma Nuclear and Mitochondrial DNA Levels, and Markers of Inflammation, Shock, and Organ Damage in Patients with Septic Shock. *Shock Augusta Ga* **45**, 607–612 (2016).
- Zhang, S. *et al.* 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. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* **53**, 2763–2771 (2014).
- Lam, N. Y. L., Rainer, T. H., Chan, L. Y. S., Joynt, G. M. & Lo, Y. M. D. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* **49**, 1286–1291 (2003).
- Yaros, M. J. S. A. L. Free DNA in the Serum of Cancer Patients and the Effect of Therapy. *Cancer Research* **37**, 647 (1977).
- Zachariah, R. R. *et al.* Levels of circulating cell-free nuclear and mitochondrial DNA in benign and malignant ovarian tumors. *Obstet. Gynecol.* **112**, 843–850 (2008).
- Mahmoud, E. H., Fawzy, A., Ahmad, O. K. & Ali, A. M. Plasma Circulating Cell-free Nuclear and Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **16**, 8299–8305 (2015).
- Gautschi, O. *et al.* Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **22**, 4157–4164 (2004).
- Lo, Y. M. *et al.* Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet Lond. Engl.* **350**, 485–487 (1997).
- Lo, Y. M. *et al.* Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 768–775 (1998).
- Lo, Y. M. Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications. *Clin. Chem.* **46**, 1903–1906 (2000).
- Thierry, A. R., Messaoudi, S. E., Gahan, P. B., Anker, P. & Stroun, M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 347–376 (2016).
- Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A. & Anker, P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **313**, 139–142 (2001).
- Aucamp, J. *et al.* Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 2689–2707 (2017).
- Franceschi, C. Inflammaging as a Major Characteristic of Old People: Can It Be Prevented or Cured? *Nutr. Rev.* **65**, S173–S176 (2007).



18. Pinti, M. *et al.* Circulating mitochondrial DNA increases with age and is a familiar trait: Implications for 'inflamm-aging'. *Eur. J. Immunol.* **44**, 1552–1562 (2014).
19. Hsu, F.-C. *et al.* Association between inflammatory components and physical function in the health, aging, and body composition study: a principal component analysis approach. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **64**, 581–589 (2009).
20. Franceschi, C. & Campisi, J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *J. Gerontol. Ser. A* **69**, S4–S9 (2014).
21. Tóth, K. *et al.* Circadian Rhythm of Methylated Septin 9, Cell-Free DNA Amount and Tumor Markers in Colorectal Cancer Patients. *Pathol. Oncol. Res.* **23**, 699–706 (2017).
22. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F. & Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **424**, 222–230 (2013).
23. Parpart-Li, S. *et al.* The Effect of Preservative and Temperature on the Analysis of Circulating Tumor DNA. *Clin. Cancer Res.* **23**, 2471–2477 (2017).
24. Schmidt, B. & Fleischhacker, M. Is liquid biopsy ready for the litmus test and what has been achieved so far to deal with pre-analytical issues? *Transl. Cancer Res.* **7**, S130–S139 (2017).
25. Mouliere, F., El Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A. & Thierry, A. R. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **8**, 927–941 (2014).
26. Klotten, V. *et al.* Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of KRAS mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget* **8**, 86253–86263 (2017).
27. Chiu, R. W. K. *et al.* Quantitative analysis of circulating mitochondrial DNA in plasma. *Clin. Chem.* **49**, 719–726 (2003).
28. Valtorta, E. *et al.* KRAS gene amplification in colorectal cancer and impact on response to EGFR-targeted therapy. *Int. J. Cancer* **133**, 1259–1265 (2013).
29. Ye, W. *et al.* Accurate quantitation of circulating cell-free mitochondrial DNA in plasma by droplet digital PCR. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 2727–2735 (2017).
30. van der Drift, M. A. *et al.* Circulating DNA is a non-invasive prognostic factor for survival in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst. Neth.* **68**, 283–287 (2010).
31. Hao, T. B. *et al.* Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* **111**, 1482–1489 (2014).
32. Kim, K. *et al.* Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann. Surg. Treat. Res.* **86**, 136–142 (2014).
33. Jylhävä, J. *et al.* Aging is associated with quantitative and qualitative changes in circulating cell-free DNA: the Vitality 90+ study. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 20–26 (2011).
34. Zhong, X. Y., Hahn, S., Kiefer, V. & Holzgreve, W. Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with gender, age and frequency of blood donations? *Ann. Hematol.* **86**, 139–143 (2007).
35. Jylhävä, J. *et al.* Characterization of the role of distinct plasma cell-free DNA species in age-associated inflammation and frailty. *Aging Cell* **12**, 388–397 (2013).
36. Cercek, A., Siegel, C. L., Capanu, M., Reidy-Lagunes, D. & Saltz, L. B. Incidence of Chemotherapy-Induced Amenorrhea in Premenopausal Women Treated With Adjuvant FOLFOX for Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **12**, 163–167 (2013).
37. Wan, J., Gai, Y., Li, G., Tao, Z. & Zhang, Z. Incidence of Chemotherapy- and Chemoradiotherapy-Induced Amenorrhea in Premenopausal Women With Stage II/III Colorectal Cancer. *Clin. Colorectal Cancer* **14**, 31–34 (2015).
38. Hohaia, S. *et al.* Cell-free circulating DNA in Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **20**, 1408–1413 (2009).
39. Kohler, C. *et al.* Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol. Cancer* **8**, 105 (2009).
40. Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Maurice, P. A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **23**, 707–712 (1987).
41. Aucamp, J., Bronkhorst, A. J., Badenhorst, C. P. S. & Pretorius, P. J. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **73**, 4355–4381 (2016).
42. Rago, C. *et al.* Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res.* **67**, 9364–9370 (2007).
43. Tanos, R. & Thierry, A. R. Clinical relevance of liquid biopsy for cancer screening. *Transl. Cancer Res.* **7**, S105–S129 (2018).
44. Mengel-From, J. *et al.* Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood cells declines with age and is associated with general health among elderly. *Hum. Genet.* **133**, 1149–1159 (2014).
45. Nile, D. L. *et al.* Age-Related Mitochondrial DNA Depletion and the Impact on Pancreatic Beta Cell Function. *Plos One* **9** (2014).
46. Short, K. R. *et al.* Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 5618–5623 (2005).
47. Ellinger, J., Müller, S. C., Wernert, N., von Ruecker, A. & Bastian, P. J. Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU Int.* **102**, 628–632 (2008).
48. Ellinger, J. *et al.* Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urol. Oncol.* **30**, 509–515 (2012).
49. Xia, P. *et al.* Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer* **9**, 454 (2009).
50. Zhong, X. Y. *et al.* Elevated level of cell-free plasma DNA is associated with breast cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* **276**, 327–331 (2007).
51. Chatterjee, A., Mambo, E. & Sidransky, D. Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene* **25**, 4663–4674 (2006).
52. Yu, M. Generation, function and diagnostic value of mitochondrial DNA copy number alterations in human cancers. *Life Sci.* **89**, 65–71 (2011).
53. Kang, Q. *et al.* Comparative analysis of circulating tumor DNA stability In K3EDTA, Streck, and CellSave blood collection tubes. *Clin. Biochem.* **49**, 1354–1360 (2016).
54. El Messaoudi, S. *et al.* Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3067–3077 (2016).
55. Medina Diaz, I. *et al.* Performance of Streck cfDNA Blood Collection Tubes for Liquid Biopsy Testing. *PLoS One* **11**, e0166354 (2016).
56. Boquist, S. *et al.* Alimentary Lipemia, Postprandial Triglyceride-Rich Lipoproteins, and Common Carotid Intima-Media Thickness in Healthy, Middle-Aged Men. *Circulation* **100**, 723–728 (1999).
57. Truong, V. *et al.* Blood triglyceride levels are associated with DNA methylation at the serine metabolism gene PHGDH. *Sci. Rep.* **7**, 11207 (2017).
58. Larsen, L. F., Bladbjerg, E.-M., Jespersen, J. & Marckmann, P. Effects of Dietary Fat Quality and Quantity on Postprandial Activation of Blood Coagulation Factor VII. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 2904–2909 (1997).
59. Thierry, A. R. *et al.* Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 2149–2159 (2017).
60. Thierry, A. R. *et al.* Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* **20**, 430–435 (2014).

61. Sanchez, C., Snyder, M. W., Tanos, R., Shendure, J. & Thierry, A. R. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *Npj Genomic Med.* **3**, 31 (2018).
62. Corcoran, R. B. *et al.* BRAF Gene Amplification Can Promote Acquired Resistance to MEK Inhibitors in Cancer Cells Harboring the BRAF V600E Mutation. *Sci Signal* **3**, ra84–ra84 (2010).
63. Catarino, R. *et al.* Circulating DNA: diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One* **7**, e38559 (2012).
64. Bedin, C. *et al.* Diagnostic and prognostic role of cell-free DNA testing for colorectal cancer patients. *Int. J. Cancer* **140**, 1888–1898 (2017).

### Acknowledgements

We are grateful to A. Bauer and B. Ottolini for their help. We would like to thank the clinical investigators from the Kplex2 study: J.L. Raoul, R. Guimbaud, D. Pezet, P. Artru, E. Assenat, C. Borg, M. Mathonnet, C. De La Fouchardière, O. Bouché, and C. Gavoille for collecting the blood samples. The authors would like to thank Kevin Billings and Streck for providing the Cell-Free DNA BCT CE tubes. This work was supported by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Lilly (France), and the SIRIC Montpellier Grant (INCa-DGOS Inserm 6045), France.

### Author Contributions

R.M. and A.R.T. designed the study, developed the methodology, analyzed the data and prepared the manuscript. R.M., Z.A.A.D., A.O., R.T., B.P., C.S., J.A., G.T., S.A. and S.E.M. realized the experiments. R.M., S.T. and C.M. performed the statistical analysis. All of the authors (R.M., Z.A.A.D., S.T., A.O., R.T., B.P., C.S., J.A., G.T., S.A., C.M., A.A., S.E.M., P.B. and A.R.T.) discussed the results and approved the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41593-4>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## **II. L'hypoxie module la libération de l'ADN circulant d'origines nucléaire et mitochondriale**

Article sous presse à British Journal of Cancer.

### **i. Rationnel Scientifique**

L'hypoxie joue un rôle clé dans la progression tumorale, la différenciation et le métabolisme cellulaire, ainsi que dans la mort et la survie cellulaires. L'adaptation des cellules cancéreuses au microenvironnement tumoral hypoxique est essentielle à leur survie et à leur prolifération. D'un point de vue métabolique, les cellules cancéreuses favorisent la production d'énergie par une augmentation de la glycolyse et une réduction de la phosphorylation oxydative mitochondriale, dans des conditions hypoxiques. De plus, des études ont montré que les cellules tumorales hypoxiques sont plus résistantes à la radiothérapie et à de nombreux agents chimiothérapeutiques. En clinique, la présence de cellules hypoxiques dans les tumeurs solides est étroitement associée à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie chez les patients.

D'autre part, des études récentes menées sur des souris exposées à une hypoxie intermittente ont établi une corrélation entre le taux faible d'oxygène dans le microenvironnement tumoral et la présence d'ADN circulant dans leur plasma. Il est intéressant de noter que plusieurs rapports ont montré un intérêt significatif de l'analyse de l'ADNcir en oncologie clinique. Cependant, notre compréhension de la structure et des origines de l'ADNcir, de sa pharmacocinétique et de la corrélation entre la libération d'ADN et la biologie tumorale selon les conditions physio-pathologiques, notamment l'hypoxie, reste limitée. L'étude visait à évaluer l'impact de l'hypoxie sur la libération d'ADN d'origine nucléaire et mitochondriale.



## **ii. Résumé**

Dans ce travail, nous avons étudié l'incidence de l'hypoxie sur la libération de l'ADN extracellulaire d'origines nucléaire et mitochondrial. Nous avons quantifié ces molécules d'ADN en utilisant un test ultra-sensible de q-PCR, dans le surnageant de différentes lignées cellulaires colorectales et dans le plasma de souris greffées par une lignée cellulaire murine du cancer de poumon, dans des conditions normoxiques ou hypoxiques. Les données obtenues mettent en évidence une stabilité de l'ADN extracellulaire dans le milieu de culture et démontrent ainsi que, sur une durée de 6 heures, les lignées cellulaires cancéreuses libèrent des quantités équivalentes à la masse d'un chromosome. Par ailleurs, nous montrons que l'hypoxie induit une augmentation considérable des concentrations de l'ADNcirN et de l'ADNcirM dans les 24 premières heures de culture. Ensuite, les concentrations totales restent stables, ce qui suggère une régulation négative de la libération d'ADN. De plus, la libération quotidienne de l'ADNcirM après 24 heures de culture est fortement inhibée. Chez les souris greffées, nous avons observé un niveau significativement plus élevé de l'ADNcirN circulant en hypoxie alors que celui de l'ADNcirM reste stable, ce qui est en accord avec les observations *in vitro*. Cette étude suggère l'existence de mécanismes de relargage différents pour les ADN extracellulaires d'origines nucléaire et mitochondriale. Ces résultats ouvrent la voie à une meilleure compréhension des variations de concentrations en ADNcir en fonction des conditions physio-pathologiques.

## **iii. Contribution**

J'ai réalisé les expériences de stabilité de l'ADN extracellulaire d'origine nucléaire et mitochondrial dans le surnageant de culture des cellules tumorales. (Figure 1 de l'article)



**ARTICLE**

Cellular and Molecular Biology

# Hypoxia differently modulates the release of mitochondrial and nuclear DNA

Amaelle Otandault<sup>1,2,3</sup>, Jean-Daniel Abraham<sup>1,2,3</sup>, Zahra Al Amir Dache<sup>1,2,3</sup>, Abdelnaby Khalyfa<sup>4</sup>, Isabelle Jariel-Encontre<sup>5</sup>, Thierry Forné<sup>5</sup>, Corinne Prévostel<sup>1,2,3</sup>, Salem Chouaib<sup>6,7</sup>, David Gozal<sup>4</sup> and Alain R. Thierry<sup>1,2,3</sup>

**BACKGROUND:** We investigated the influence of hypoxia on the concentration of mitochondrial and nuclear cell-free DNA (McfDNA and NcfDNA, respectively).

**METHOD:** By an ultra-sensitive quantitative PCR-based assay, McfDNA and NcfDNA were measured in the supernatants of different colorectal cell lines, and in the plasma of C57/Bl6 mice engrafted with TC1 tumour cells, in normoxic or hypoxic conditions.

**RESULTS:** Our data when setting cell culture conditions highlighted the higher stability of McfDNA as compared to NcfDNA and revealed that cancer cells released amounts of nuclear DNA equivalent to the mass of a chromosome over a 6-h duration of incubation. In cell model, hypoxia induced a great increase in NcfDNA and McfDNA concentrations within the first 24 h. After this period, cfDNA total concentrations remained stable in hypoxia consecutive to a decrease of nuclear DNA release, and noteworthy, to a complete inhibition of daily mitochondrial DNA release. In TC1-engrafted mice submitted to intermittent hypoxia, plasma NcfDNA levels are much higher than in mice bred in normoxia, unlike plasma McfDNA concentration that is not impacted by hypoxia.

**CONCLUSION:** This study suggests that hypoxia negatively modulates nuclear and, particularly, mitochondrial DNA releases in long-term hypoxia, and revealed that the underlying mechanisms are differently regulated.

British Journal of Cancer <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0716-y>

**BACKGROUND**

Hypoxia plays a key role in tumour progression, cell differentiation and metabolism, as well as in cell death and survival.<sup>1–3</sup> The adaptation of cancer cells to the hypoxic tumour microenvironment is critical to their survival and proliferation.<sup>4</sup> At the molecular level, cancer cells modify their metabolism, promote aerobic glycolysis and decrease mitochondrial oxidative phosphorylation, independent of cellular oxygenation levels.<sup>5</sup> This process is known as the Warburg effect.<sup>6–8</sup> Since that discovery, many studies demonstrated the impact of hypoxia on tumour progression, revealing a number of critical effects on angiogenesis,<sup>9</sup> metastatic potential,<sup>10</sup> protein synthesis,<sup>11</sup> nuclear and mitochondrial DNA replication.<sup>12,13</sup> Moreover, the aberrant angiogenesis and rapid cell proliferation create tumour areas with different degrees of hypoxia.<sup>14</sup> Studies have shown that hypoxic tumour cells are more resistant to radiotherapy<sup>15</sup> and to many commonly used chemotherapeutic agents.<sup>16</sup> In clinical oncology, the presence of hypoxic cells in solid tumours is closely associated with a poor prognosis and survival in patients with many types of cancer.<sup>17–19</sup> Epidemiological studies have associated higher mortality and increased cancer aggressivity in patients with intermittent hypoxia (IH) due to obstructive sleep apnoea.<sup>20,21</sup>

Moreover, recent studies of the plasma of mice under IH have shown a correlation between oxygen deprivation in the tumour micro-environment and the presence of circulating cell-free DNA (cfDNA).<sup>22,23</sup> Interestingly, several reports have demonstrated the significant potential of cfDNA analysis in clinical oncology.<sup>24</sup> For instance, cfDNA detection can allow the identification of minimal residual disease,<sup>25,26</sup> the monitoring of drug efficacy or resistance,<sup>27–29</sup> and prognosis of the disease.<sup>30,31</sup> The potential of circulating cfDNA analysis was further shown in a recent analysis we performed on a large number of plasma samples taken from metastatic colorectal cancer (mCRC) patients, in which we compared the plasmatic concentrations of circulating cfDNA of nuclear (NcfDNA) and mitochondrial (McfDNA) origins. This analysis showed significantly higher NcfDNA concentrations in mCRC patients as compared to healthy subjects, while McfDNA concentrations were lower.<sup>32–35</sup> However, our understanding of the structure and origins of cfDNA, of their pharmacokinetics and of the correlation between DNA release and tumour biology in different physiological states, especially hypoxia, remains limited.<sup>36</sup> The aim of the present work is to study the effect of hypoxia on the release of DNA of both nuclear and mitochondrial origins. First, we set the appropriate cell culture

<sup>1</sup>IRCM, Inserm U1194, Institut de recherche en cancérologie de Montpellier, 208, avenue des Apothicaires, Montpellier 34298, France; <sup>2</sup>Université de Montpellier, Montpellier 34090, France; <sup>3</sup>Institut régional du cancer de Montpellier, Montpellier 34298, France; <sup>4</sup>Department of Child Health and Child Health Research Institute, University of Missouri School of Medicine, Columbia, MO 65201, USA; <sup>5</sup>Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, University of Montpellier, CNRS, Montpellier, France; <sup>6</sup>INSERM UMR 1186, Integrative Tumor Immunology and Genetic Oncology, Gustave Roussy, EPHE, Fac. de médecine-Univ. Paris-Sud, University Paris-Saclay, Villejuif 94805, France and <sup>7</sup>TRIPM, Gulf Medical University, Ajman, UAE

Correspondence: Alain R. Thierry (alain.thierry@inserm.fr)

These authors contributed equally: Amaelle Otandault, Jean-Daniel Abraham

Received: 19 April 2019 Revised: 29 November 2019 Accepted: 16 December 2019

Published online: 13 January 2020

conditions for optimising biological observations, in particular extracellular cfDNA stability and accumulation with incubation time. Thereafter, we determined the level and kinetics of the DNA release in normoxic and hypoxic conditions in cancer cell lines. We also used an in vivo autologous model to evaluate the amount of circulating NcfDNA and McfDNA in the plasma of mice engrafted with tumour cells, which were subjected to normoxia or IH as previously performed by our group.<sup>22</sup>

## METHODS

### Cell culture and cell lines

Human colorectal cancer cell lines (SW620, SW480 and HCT116) were cultured in RPMI-1640 medium (Wako, Osaka, Japan). DiFi and DLD1 cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technology, UK). All media were supplemented with 10% of foetal bovine serum (Eurobio) and 100 µg/mL of penicillin–streptomycin (Gibco™). For normoxic conditions, the cells were classically incubated at 37 °C in humidified atmospheric air with 5% CO<sub>2</sub> addition. For hypoxic incubation, cells were placed in an incubator upon 0.5% O<sub>2</sub>, 94.5% N<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Cell lines were routinely tested for mycoplasma contaminations.

### Tumour animal models

C57BL/6J male mice (7 weeks old) were acquired from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Twelve mice were placed in designed environmental chambers and subjected to IH, in alternating cycles of 90 s (6% FIO<sub>2</sub> (fraction of inspired oxygen in the air), followed by 21% FIO<sub>2</sub>, 20 cycles/h) for 12 h per day. A control group ( $n = 9$ ) was exposed to continuous circulating room air (RA). After 2 weeks of exposure,  $1.5 \times 10^5$  TC1 cells (ATCC, Manassas, VA, USA) were suspended in 200 µL sterile phosphate-buffered saline and injected into the middle right flank of each animal that were then exposed to the same protocol (RA or IH) during 4 weeks. The tumour growth was monitored three times per week using a calibrated calliper. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) gas was used for euthanasia, and the depth of anaesthesia was monitored by toe pinch, followed by cervical dislocation as per the institutionally approved ethical protocol. These procedures were always conducted between 9:00 and 11:00 a.m. in specially designated surgical room within the institutional vivarium. At the time of sacrifice (28 days after tumour injection), blood was collected from the tail, tumours were harvested for volume and

weight measurements and processed for histologic and biochemical analyses. All experimental procedures were approved by The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Chicago (protocol# 2190). Plasma samples were sent to IRCM (France) for blind cfDNA measurements.

### Sample treatment and cfDNA extraction

All methods were performed according to the pre-analytical guidelines previously established by our group.<sup>37</sup> Supernatants from cultured cancer cell lines or mice plasma were harvested in Eppendorf tubes, centrifuged to remove all cells (1200 × *g*; 10 min) and then frozen until use. After thawing, samples were centrifuged at 16,000 × *g* for 10 min at 4 °C to remove cellular debris and organelles.<sup>38,39</sup> The supernatants were then transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and immediately extracted using the Qiagen Blood Mini Kit (Qiagen, CA), according to the manufacturer's protocol. DNA was eluted from the column with 80 µL of elution buffer.

### Measurement of cfDNA concentration by qPCR and evaluation of MNR and DNA integrity

Table 1 describes the primers used to selectively amplify human and murine DNA sequences of nuclear and mitochondrial origins. The design of the primer system was performed under a stringent selective process. Quantifications of human NcfDNA and McfDNA were performed from the amplification of a 67 bp sequence on the *KRAS* gene<sup>24,31</sup> and a 67 bp sequence on the *MT-COX-3* gene (short nuclear and mitochondrial amplicons, respectively).<sup>32</sup> Fragments of 305 and 296 bp (long nuclear and mitochondrial amplicons, respectively) were amplified to evaluate DNA fragmentation by calculating the DNA integrity index (DII) (the ratio between long and short amplicon quantifications).<sup>40,41</sup> Theoretically, the lower the DII, the more cfDNA is fragmented. The mitochondrial-to-nuclear ratio (MNR) corresponds to the ratio of the concentration of the McfDNA to that of NcfDNA, each calculated via short amplicon quantification. In order to quantify the murine circulating cfDNA, primers targeting murine *KRAS* (61 bp for short amplicon, 146 bp for long amplicon) or murine *COX-1* (114 bp for short amplicon) were used for NcfDNA and McfDNA quantifications, respectively. Quantitative PCR (qPCR) was performed in a final reaction volume of 25 µL, which was composed of 12.5 µL of PCR mixture (Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix), 2.5 µL of each amplification primer (3 pmol/mL), 2.5 µL of PCR-quality

**Table 1.** List and sequence of human and murine primers used for qPCR assays.

Human	Primer name	Sens	Sequence	TM (°C)	%GC	Amplicon size (bp)
Nuclear DNA	KRAS B2	Reverse	CCCTGACATACTCCAAGGA	59.4		
	KRAS B1	Forward	CCTTGGGTTTCAAGTTATATG	54		67
	KRAS A1	Forward	GCCTGCTGAAAATGACTGA	54.5		305
Mitochondrial DNA	MT-COX3 F	Forward	GACCCACCAATCATGTC	56	55.6	
	MT-COX3 R 67	Reverse	TGAGAGGGCCCTGTTAG	58.2	61.1	67
	MIT-COX3 R 296	Reverse	CTCAGAAAAATCTCGGAAGA	55.9	42.9	296
Mouse	Primer name	Sens	Sequence	TM (°C)	%GC	Amplicon size (bp)
Nuclear DNA	MU KRAS 61–146 R	Reverse	GCTTCATTATCCTGCTTCC	56	47.4	
	MU KRAS 61 R	Forward	TTGATTCCTTGCTAGTTCT	52	36.8	61
	MU KRAS 146 F	Forward	TTCCCTGGGTTTTGGACTTA		45	146
Mitochondrial DNA	MU MT COX1 F	Forward	GTCCCACTAATAATCGGAGC	60	50	
	MU MT COX1 R REV C	Reverse	TGCTTCTACTATTGATGATGC	58	55.5	114

*KRAS* Kirsten rat sarcoma, *COX3* cytochrome c oxidase subunit 3, *COX1* cytochrome c oxidase subunit 1



water and 5  $\mu$ L of DNA sample. Real-time qPCR was performed as follows: hot polymerisation activation-denaturation, performed for 3 min at 95  $^{\circ}$ C, followed by 40 repeated cycles at 95  $^{\circ}$ C for 10 s and then at 60  $^{\circ}$ C for 30 s. After amplification, melting curves were generated by increasing the temperature from 60 to 90  $^{\circ}$ C in increments of 0.2  $^{\circ}$ C, to confirm the specificity of the PCR product. Human McfDNA concentrations were calculated in ng/mL, using an internal standard curve composed of serial dilutions of a 3382 bp human plasmid vector containing a unique MT-CO3 gene sequence (ABM good<sup>®</sup>). The concentration and the purity of the vector solution were determined by measuring the optical density with a BioPhotometer<sup>®</sup> D30 spectrophotometer (Eppendorf). Human NcfDNA concentrations were calculated using an internal standard curve composed of serial dilutions of genomic DNA from human colorectal cancer cells previously quantified by a BioPhotometer<sup>®</sup> D30 spectrophotometer, and expressed as ng/mL. The murine genomic DNA from Promega was used to produce a standard curve. Concentrations of the standard curve were expressed as ng/mL and were used to determine the concentration of NcfDNA and McfDNA in the murine plasma. Mean values were calculated from triplicate reactions, and internal negative controls with PCR-quality water were routinely used.

#### Stability of extracellular cfDNA and evaluation of daily released DNA

Supernatants from DLD1 and SW620 cells, previously cultured during 24 h in T25 flasks (1 million cells in 10 mL culture medium) were harvested after a 24-h period of culture, centrifuged and then placed in an incubator at 37  $^{\circ}$ C for 4 days, to evaluate the intrinsic stability of extracellular DNA over time independently of the cells. Each day, DNA was extracted from 400  $\mu$ L of supernatant and McfDNA and NcfDNA concentrations were evaluated by qPCR as described previously. Short and long amplicons were quantified to measure concentrations of both NcfDNA (67 and 305 bp, respectively) and McfDNA (67 and 296 bp, respectively). This allowed us to establish the equation necessary to estimate the amount of daily released extracellular DNA every 24 h in the culture medium:

$$[\text{cfDNA}]_{\text{neo-released}} = [\text{cfDNA}]_{\text{measured}} - [\text{cfDNA}]_{\text{stable}}$$

#### Statistical analysis

Data are expressed as the mean ( $\pm$ ) standard deviation. A non-parametric statistical Mann-Whitney *U* test was used to compare different groups of mice (GraphPad Prism software V7). Correlations were assessed using Spearman's non-parametric method. In all figures, statistical analyses were performed at the conventional significant *p* value: \**p*  $\leq$  0.05, \*\**p*  $\leq$  0.01, \*\*\**p*  $\leq$  0.001 and \*\*\*\**p*  $\leq$  0.0001.

## RESULTS

### NcfDNA and McfDNA stability in supernatants from DLD1 and SW620 cell cultures

As shown in Fig. 1a (DLD1 cell line) and Fig. 1b (SW620 cell line), the concentration of NcfDNA, measured via the detection of the long nuclear amplicon (black circles, full lines), dropped rapidly at D1: only 4% (DLD1 cells, Fig. 1a) and 7% (SW620 cells, Fig. 1b) of the concentration measured at D0 could be recovered. On the other hand, NcfDNA, measured via the detection of the short amplicon (black squares, dashed lines), remained relatively stable from D1 to D3 after a loss of 40% between D0 and D1, in DLD1 (Fig. 1a) or SW620 (Fig. 1b) supernatants. Likewise, McfDNA concentrations (67 and 296 bp amplicons) decreased between D0 and D1 (40% loss), but then remained stable after D1. This stability was highlighted by the mitochondrial DII value, which remained constant at 0.5 (Fig. 1c, dashed lines), in both cell lines. These profiles should be compared to the significant decrease of nuclear

DII from 0.4 at D0 to 0.01 at D3 (Fig. 1c, full lines). Noteworthy, MNR values, calculated from short amplicons measurements, remained constant throughout the study delay, whatever the cell line (Fig. 1d). Thus, we show the high stability of short extracellular DNA amplicons of nuclear and mitochondrial origins in cell culture medium in the absence of cells: 60% of NcfDNA and McfDNA were recovered after 24 h of incubation (as compared to D0 of incubation), and 40% of this amount is recovered after 48 h of incubation. These results are of importance and will be used to calculate the daily release of DNA in normoxic vs. hypoxic conditions.

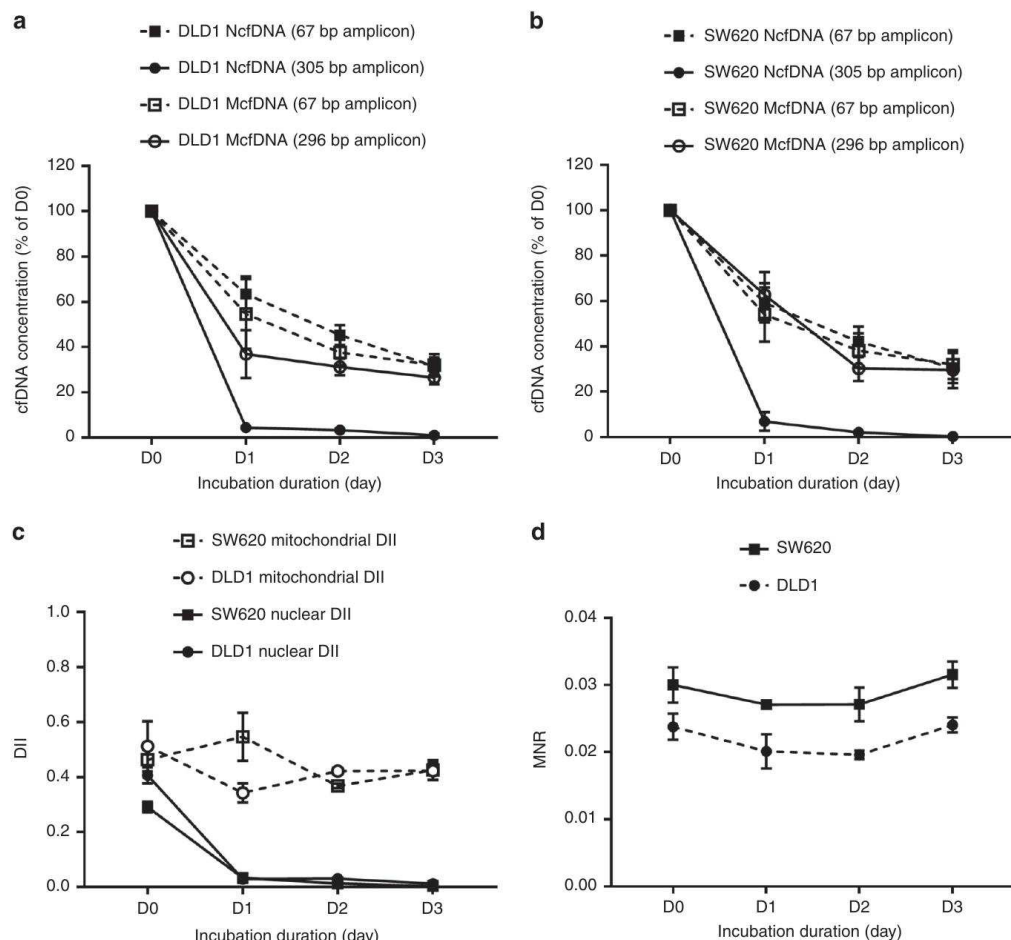
Release of DNA in the supernatant of colorectal cancer cell lines  
In order to address the question of the impact of the cell type on DNA release, different colorectal cancer cell lines (DiFi, HCT116 or SW620) were seeded at different concentrations (25,000, 100,000 or 400,000 cells per well). After 6 h of incubation, culture media and cells were collected and processed in order to quantify NcfDNA and McfDNA by qPCR. As shown in Fig. 2, levels of NcfDNA (Fig. 2a) and McfDNA (Fig. 2b) increased with the number of starting cells, regardless of the cell line tested. The same observation can be made regarding intracellular DNA (evaluated with the same qPCR protocol as the supernatants), which showed increased amounts of genomic DNA (Fig. 2c) and mitochondrial DNA (Fig. 2d) in cell pellets. Noteworthy, we also observed that the proportion of cfDNA as compared to intracellular DNA is fairly constant, whatever the cell line: between 0.6 and 2.8% of nuclear DNA was released from cells in 6 h (Fig. 2e). Lower proportions of mitochondrial DNA (from 0.14 to 0.22% of total mitochondrial DNA) were found in the supernatants, as compared to nuclear cfDNA. Finally, we were able to confirm the remarkable stability of the MNR parameter in cell supernatants, regardless of the number of cells (Fig. 2f). It is also interesting to note that the MNR value varied according to cell type: due to a lower mitochondrial DNA release, the SW620 cell line showed relatively lower MNR values in the extracellular medium, compared with the DiFi and HCT116 cell lines.

Hypoxia effect on the release of DNA in SW620 cancer cell lines  
After seeding SW620 cells for 24 h, the culture medium was replaced with a fresh medium and cells were cultured either in normoxic conditions or hypoxic conditions. Sequential aliquots of the same supernatant were sampled for 3 days (D1-D3). In normoxic condition, the total concentrations of NcfDNA and McfDNA increased during the 3 days of incubation, from 2.5 to 15.4 ng/mL (*p* = 0.0002) and from 0.05 to 0.14 ng/mL (*p* = 0.0194) respectively (Fig. 3a, b, normoxia panels). Under hypoxic conditions, total NcfDNA concentration was significantly higher in the first day of hypoxia (five times greater than under normoxic conditions; *p* = 0.01), and stabilised over time at 16.2 ng/mL at D3 (Fig. 3a, hypoxia panel). The total McfDNA concentration increased significantly in the first day of hypoxia (25 times greater than under normoxia; *p* = 0.004) and decreased slightly throughout the period of the study (1.37-0.77 ng/mL; Fig. 3b, *p* = 0.0436). When examining DNA release within one day, different cell behaviours can be distinguished. Indeed, owing to the results described in Fig. 1, we know that the concentrations of cfDNA measured at D2 include 60% of DNA released during the [0-24 h] period, while cfDNA measured at D3 include 60% of DNA released during the [24-48 h] period and 40% of DNA released during the [0-24 h] period. Thus, the daily release of DNA can be calculated on the basis of the following algorithm:

$$\text{cfDNA}_{[0-24\text{h}]} = \text{cfDNA}_{\text{D1}},$$

$$\text{cfDNA}_{[24-48\text{h}]} = \text{cfDNA}_{\text{D2}} - 60\% \text{cfDNA}_{[0-24\text{h}]},$$

$$\text{cfDNA}_{[48-72\text{h}]} = \text{cfDNA}_{\text{D3}} - 60\% \text{cfDNA}_{[24-48\text{h}]} - 40\% \text{cfDNA}_{[0-24\text{h}]}.$$



**Fig. 1** cfDNA stability in cell culture media. After a 24-h incubation period of the DLD1 and SW620 cell lines (one million cells in T25 flask), the medium was removed, centrifuged and incubated at 37 °C in 6-well plates. The concentration of cfDNA was monitored every day (D0, D1, D2 and D3) by qPCR, targeting *KRAS* or *COX3* genes and quantifying amplicons of 67 and 305 bp from nuclear cfDNA, and quantifying amplicons of 67 and 296 bp from mitochondrial cfDNA. The evaluation of cfDNA concentrations (in percentage of D0) is shown according to the cell line (**a**, **b**); **c** mitochondrial and nuclear DII; **d** MNR. Average values with ( $\pm$ ) standard deviations are represented; results having been reproduced in three independent experiments, each performed in triplicate. cfDNA: extracellular cell-free DNA; DII: DNA integrity index; MNR: mitochondrial-to-nuclear DNA ratio; *KRAS*: Kirsten rat sarcoma; *COX3*: cytochrome *c* oxidase subunit 3.

Consequently, under normoxic conditions, daily nuclear and mitochondrial DNA releases account, respectively, for 70 and 65% of the total concentrations measured at D2, and for 80 and 62% of the total concentrations measured at D3 (Fig. 3c, d, normoxia panels). Under hypoxia, daily release of nuclear DNA decreased down to 50% of the total NcfDNA concentration at D3, while daily mitochondrial DNA release dropped below 0.1% of the initial concentration by D3 (Fig. 3c, d, hypoxia panels). This difference of profile between normoxia and hypoxia is also illustrated in Fig. 3e, f. The nuclear DII remained low under hypoxia during the 3 days of the study (0.03–0.14; black triangles; Fig. 3e), as compared to normoxia (0.299–0.48; white squares; Fig. 3e). MNR also progressively decreased from 0.09 down to 0.04 in hypoxia, while remaining very low in normoxia (from 0.008 to 0.018; Fig. 3f).

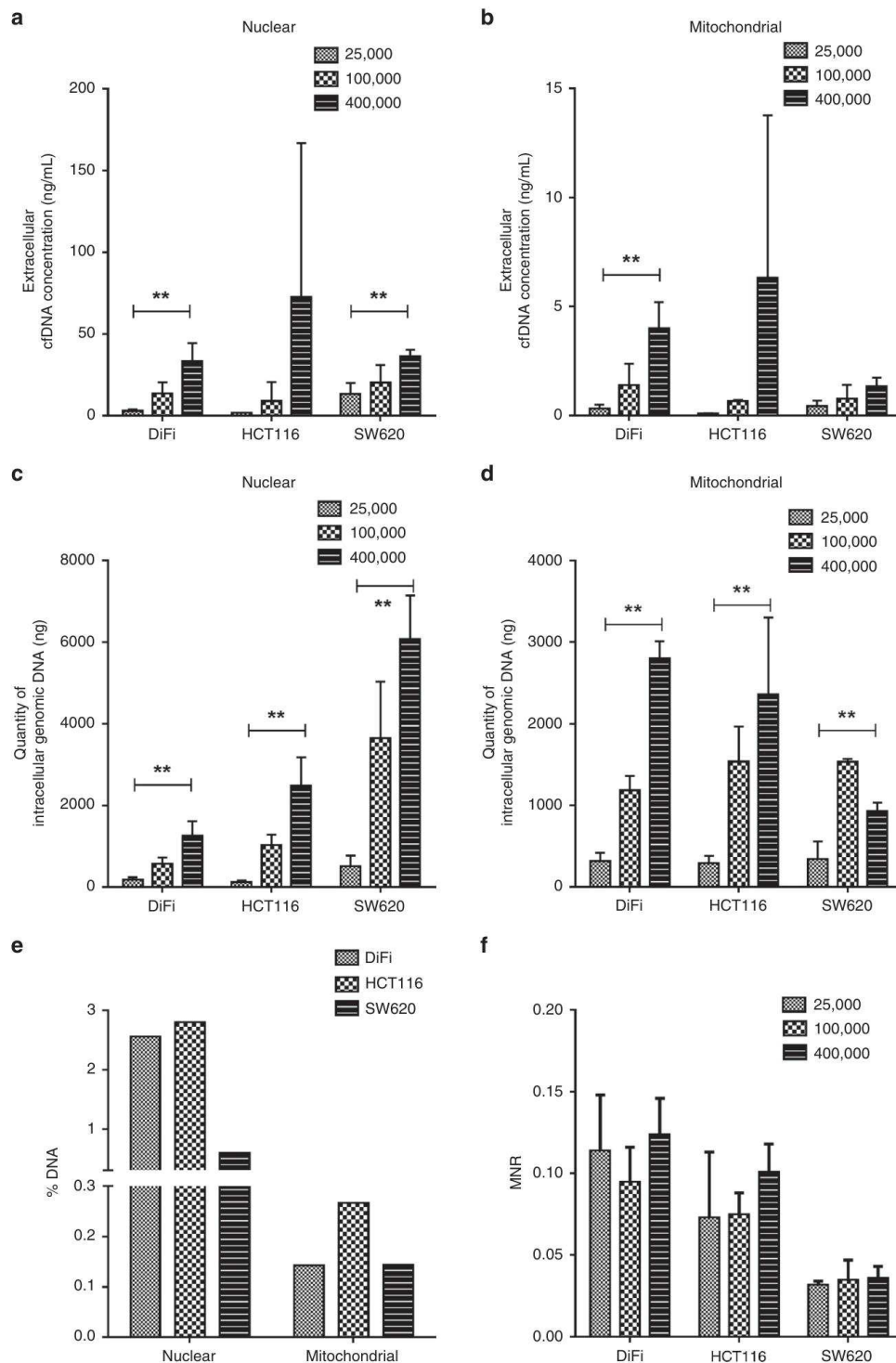
Hypoxia influences tumour weight and plasma cfDNA levels in grafted mice

Twenty-one C57BL/6j mice engrafted with murine TC1 cells were used for in vivo experiment; nine of these mice were exposed to

normoxia, while twelve were exposed to IH according to the experimental procedure depicted on Fig. 4a. Plasmatic circulating cfDNA concentrations were assessed in both conditions. Data showed a significant increase of the NcfDNA concentration in plasma from mice under IH as compared to normoxia (Fig. 4b,  $p = 0.0142$ ). Conversely, McfDNA concentration was slightly decreased (but not significantly; Fig. 4c,  $p = 0.1886$ ). As a result, IH greatly reduced the MNR in the plasma of grafted mice (Fig. 4e,  $p = 0.0022$ ). In contrast, no statistical difference was observed for nuclear DII (Fig. 4d,  $p = 0.2861$ ).

As shown in Fig. 4f, IH increased tumour weight ( $p = 0.0001$ ). Conversely, its impact on mice growth (delta body weight) was slightly negative (Fig. 4g;  $p = 0.0359$ ). Correlations between tumour weight and other parameters were assessed in the grafted mice: NcfDNA is positively correlated to tumour weight (Supplementary Fig. 1a;  $r = 0.5992$ ;  $p = 0.0041$ ), whereas MNR is negatively correlated to tumour weight (Supplementary Fig. 1d;  $r = -0.5054$ ;  $p = 0.0194$ ). McfDNA and nuclear DII are not significantly correlated to tumour weight (Supplementary Fig. 1b, c, respectively).





**Fig. 2 Release of cfDNA by colorectal cancer cells in culture.** Culture media and cell pellets from colorectal cell lines (DiFi, HCT116, SW620) were harvested after 6 h of incubation at a different number of cells per well (25,000, 100,000 or 400,000). Extracellular and intracellular DNA of nuclear (a, c, respectively) or mitochondrial origin (b, d, respectively) were measured by qPCR, as described in the Methods section, and estimation was made of the percentage of DNA released in culture medium as compared to intracellular DNA (e) and of MNR (f). Average values with ( $\pm$ ) standard deviations are represented, results having been reproduced in four independent experiments, each performed in triplicate. MNR: Mitochondrial-to-nuclear DNA ratio.  $P$  values significance:  $**P < 0.01$ .

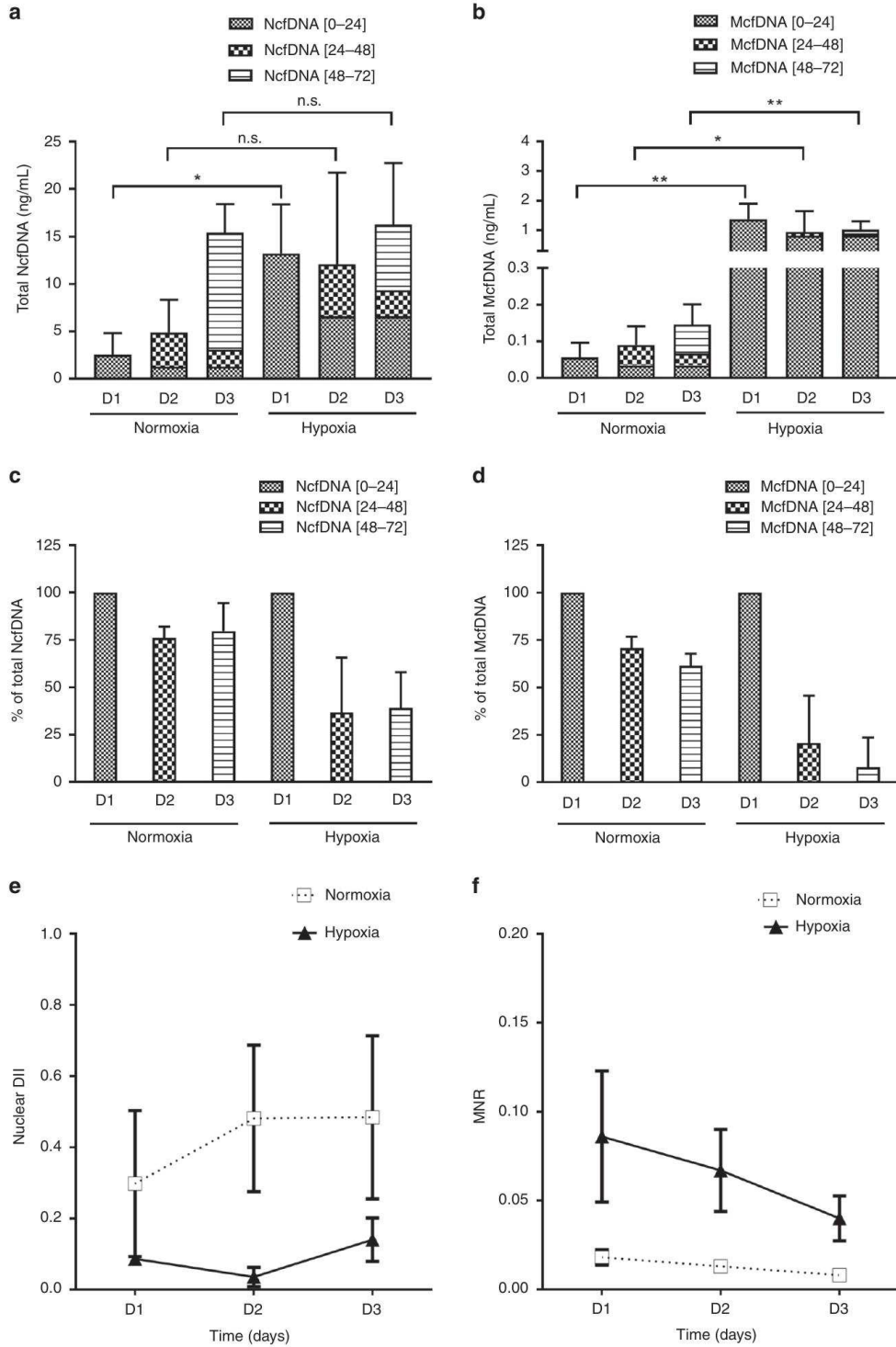


6

**DISCUSSION**

DNA molecules of nuclear and mitochondrial origins are found in the extracellular compartment, in vitro in the media of cell culture<sup>42,43</sup> and in vivo in the physiological fluids.<sup>44,45</sup> While the analysis of circulating DNA from plasma is now optimised and

standardised,<sup>37</sup> only poor experimental works have been performed with using cell culture. To accurately observe the effect of hypoxia on cells, we first carried out a study on standardising cell culture conditions to avoid any bias. We first examined the stability over time of NcfDNA concentration, as



**Fig. 3** **cfDNA release upon normoxic and hypoxic conditions.** After seeding SW620 cells for 24 h, the culture medium was replaced with a fresh medium and cells were placed in two different incubators: one with normoxic conditions (21% O<sub>2</sub>) and the other with hypoxic conditions (0.5% O<sub>2</sub>). Different aliquots of the same supernatant were sampled during 3 days (D1–D3, days of sample collection). Total concentrations of nuclear (a) and mitochondrial (b) extracellular cfDNA were quantified by qPCR. cfDNA [0–24] corresponds to the concentration of released DNA during the first 24 h; cfDNA [24–48] corresponds to the concentration of released DNA between the 24th and 48th hour of incubation; cfDNA [48–72] corresponds to the concentration of released DNA between the 48th and 72nd hour of incubation. The proportions of nuclear or mitochondrial DNA newly released during each period, as compared to the total concentration measured each day, are shown in c, d, respectively; e shows the nuclear DII of supernatants from cells cultured in normoxia (white square, dashed line) or in hypoxia (dark triangle, solid line); f shows the MNR of supernatants from cells cultured in normoxia (white square, dashed line) or in hypoxia (dark triangle, solid line). Values are presented as mean (±) standard error of four independent wells, each performed in triplicate. cfDNA: extracellular cell-free DNA; DII: DNA integrity index; MNR: mitochondrial-to-nuclear DNA ratio; n.s.: not significant. *p*-Values significance: \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* ≤ 0.001 and \*\*\*\**p* ≤ 0.0001.

detected via the amplification of a short DNA sequence compared to a long DNA sequence to further estimate the DII as it was performed *in vivo*.<sup>41</sup> The biphasic shape of the NcfDNA concentration curves suggests that at least two structural entities of different stability coexist in the pool of fragments over 67 bp. In contrast, fragments over 305 bp highly decrease with time of incubation down to nearly disappear after a few days of incubation. Thus, we can conclude that fragments of NcfDNA over 305 bp appear less stable than those higher than 67 bp in these *in vitro* conditions (almost 40% being still present following 2 days incubation in cell culture supernatant). We previously showed that targeting a sequence as short as possible enables to improve and consequently to accurately determine cfDNA concentration. The decrease of nuclear DII observed in our stability study, corresponding to the degradation of NcfDNA into fragments between 67 and 305 bp, can be explained by the presence of nucleosomal structures or transcription factor-associated complexes, which constitute 90–98% of the fragments detected in CRC patients.<sup>46</sup> Conversely, McfDNA concentration is less impacted by incubation time, regardless of the targeted sequence length. This result indicates structural differences between nuclear and mitochondrial DNA in cell culture supernatant. McfDNA appears more stable as compared to NcfDNA, certainly due to different structural complexes, not yet characterised. Our group has recently demonstrated that cell culture medium could contain cell-free circulating respiratory-competent mitochondria or cell membrane- or debris-associated mitochondria,<sup>47</sup> which could be one of the reasons why McfDNA seems protected. Noteworthy, the ratio between McfDNA and NcfDNA concentrations, which corresponds to the MNR, is highly stable and reproducible in cell-free culture medium. This observation is confirmed in cell model, as MNR, although varying according to the cell line, is constant regardless of the number of cells. This result indicates that MNR could be considered as a relevant biomarker, as it appears less influenced by collateral factors such as DNA conservation or cell number.<sup>34</sup>

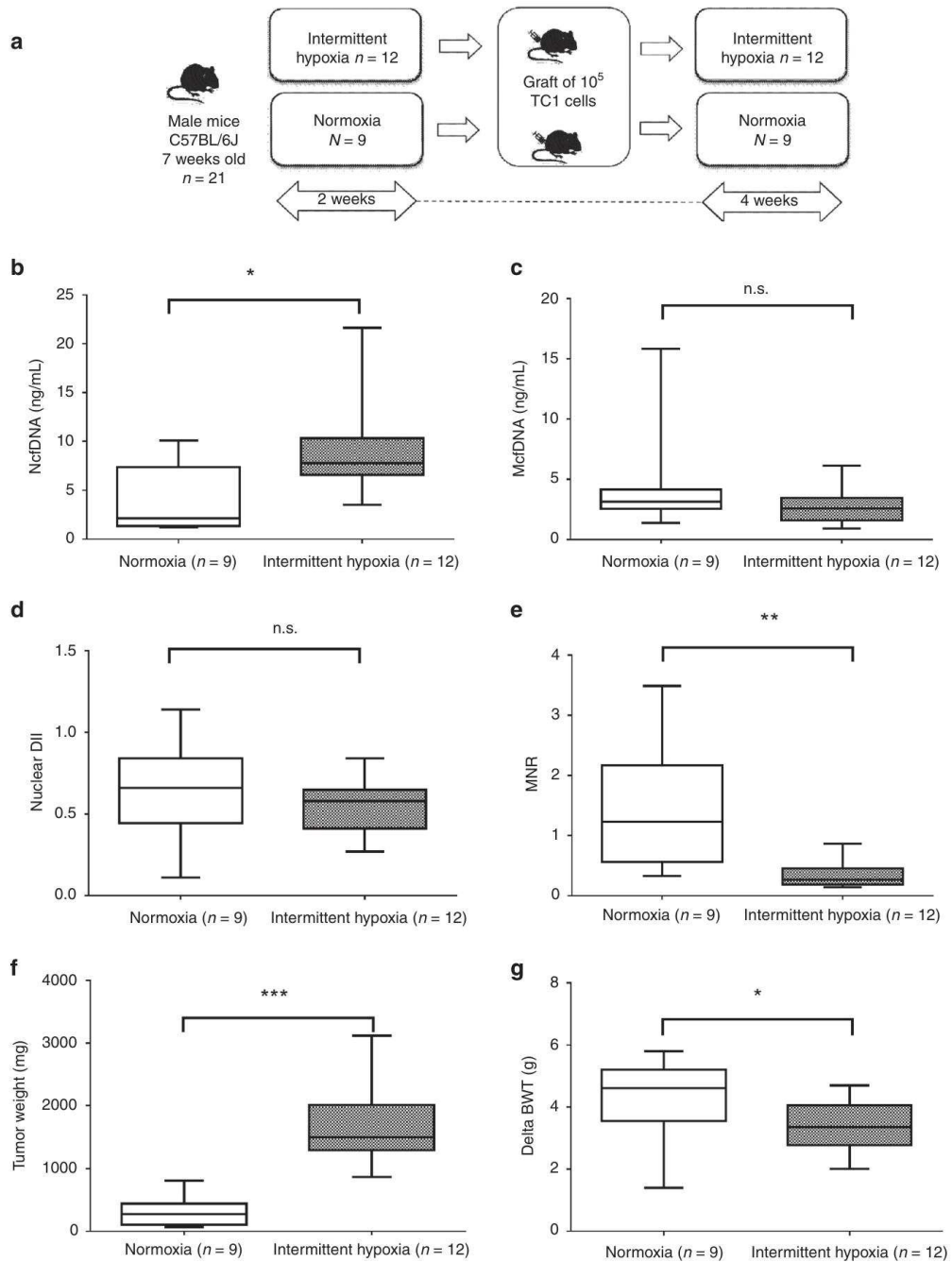
In cancer cell models, our data revealed a rapid and significant release of DNA into the culture medium. A rapid release of nuclear DNA was also reported by Wang et al.<sup>48</sup> in T47-D (80 ng/mL) and MDA-MB-231 (12 ng/mL) breast cancer cells over a short period of time (6 h of incubation). In addition to this, release of nuclear DNA was also observed during the first 24 h incubation in the culture medium of the human 143 B osteosarcoma cell line.<sup>49</sup> As expected, we observed in our study that NcfDNA and McfDNA concentrations increased with the number of cells, corresponding to about 2% and 0.1% of the intracellular content, respectively, whatever the cancer cell lines. This difference of proportion may be explained by different mechanisms implied in either nuclear or mitochondrial DNA release. It should be noted that this 2% of NcfDNA is approximately equivalent to the extracellular release of one chromosome in 6 h, highlighting the high genomic dynamics as well as the importance of DNA release in extracellular space, which cannot therefore be considered as a marginal mechanism. From a physiological point of view, these data are of great importance because extracellular nucleic acids have been

described as biologically active in inflammatory processes, and as potentially active in cell transformation and communication.<sup>50</sup>

The study of the DNA release and stability allowed us to provide an *in vitro* experimental model avoiding bias as much as possible in the following observations. Indeed, we took into consideration the respective stability of NcfDNA and McfDNA and the accumulation bias by using an algorithm allowing to delineate the daily rate of DNA release. Hence, our data revealed that hypoxia has a critical impact on cfDNA concentration in the supernatant of SW620 human colorectal cancer cell line, as compared to normoxic conditions, within the first 24 h of incubation. After this period of time, cfDNA concentrations did not increase further upon hypoxia. Inversely, cfDNA concentrations increase with normoxia, which allows a progressive accumulation of cfDNA in the cell supernatant. Furthermore, thanks to our stability study and the use of our algorithm, we reveal for the first time the different kinetics of nuclear and mitochondrial DNA release, revealing a biphasic behaviour of the cells submitted to hypoxia: a high release during the first 24 h followed by a reduced release at days 2 and 3. This effect was much more pronounced for mitochondrial DNA, the release of which is completely abrogated at day 3. This difference clearly indicates that the mechanisms implied in nuclear and mitochondrial DNA releases are different from each other.

The main mechanisms of nuclear DNA release described in the literature are cell death (apoptosis and necrosis) and active secretion, in particular through microparticle release.<sup>36,51</sup> Several structures such as exosomes, apoptotic bodies, nucleosomes and virtosomes, which may contain extracellular DNA and which have been shown to be positively regulated by hypoxia, have been described.<sup>51–53</sup> Moreover, other studies have shown that increased autophagy in response to hypoxic stress allows cell survival or death.<sup>54,55</sup> In addition, under hypoxic conditions, the endogenous antioxidant response of cells may be insufficient, resulting in an intracellular increase in reactive oxygen species (ROS),<sup>56</sup> and the increased release of nuclear and mitochondrial DNA. It may thus be speculated that DNA release may be increased by hypoxia via exosome production, ROS or autophagy in the early steps of our study. However, when the amount of ROS of a cell is too high, the necrotic activity of p53 could be induced, therefore promoting cell death.<sup>57,58</sup> Indeed, regulated necrosis includes multiple cell death modalities, resulting in the loss of mitochondrial inner membrane potential, disruption of ATP production, mitochondrial dysfunction and consequent necrosis. This could explain our observation that mitochondrial DNA release is more affected than nuclear DNA by late incubation upon hypoxic conditions.<sup>59</sup> Furthermore, it was shown that mitochondria undergo fission and fusion continually in response to changes in the extracellular environment: hypoxia promotes the production of ROS that cause an increase in mitochondrial fission.<sup>60</sup> Noteworthy, recent studies highlighted modifications in the expression of genes involved in oxidative phosphorylation,<sup>61</sup> linking hypoxia to mitochondrial adaption to this anaerobic environment. Under hypoxia, glucose consumption increases to maintain ATP production using less efficient anaerobic glycolysis, which induces major structural and





**Fig. 4 In vivo effects of intermittent hypoxia.** **a** Flow chart of the in vivo experiment: C57BL/6j mice were pre-exposed during 2 weeks to either room air or intermittent hypoxia, and then injected with  $10^5$  TC1 cells. Blood collection was performed 4 weeks after the graft. The concentrations of circulating cfDNA in plasma from mice subjected to normoxia (open boxes) or hypoxia (grey boxes) were evaluated by qPCR by targeting murine *KRAS* (**b**) or *COX1* (**c**) genes. This allowed the evaluation of the nuclear DII (**d**) and the MNR (**e**). The effect of hypoxia on tumour weight (**f**) and mouse body weight gain (**g**) are also presented. The line from end to end of the whisker represents the minimum and maximum values of the data, the line within each box represents the median and the lower and upper boundaries of the box indicate the first and third quartiles, respectively. Significant differences between normoxia and intermittent hypoxia were estimated using the Mann–Whitney test. *P* values significance: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$  and \*\*\* $p < 0.0005$ . NcfDNA: nuclear cell-free DNA; McfDNA: mitochondrial cell-free DNA; DII: DNA integrity index; MNR: mitochondrial-to-nuclear DNA ratio; dBWT: delta body weight; n.s.: not significant.

dynamical changes characterised by impairment of fusion process that leads to mitochondrial depolarisation, and finally loss of mitochondrial DNA.<sup>62,63</sup>

Under normoxic conditions, the MNR remains stable over time. This suggests a balance between cell growth and the release of nuclear DNA and mitochondrial DNA. Conversely, hypoxia leads to an imbalance in this stability. These results suggest that the regulations of mitochondrial and nuclear releases could be valuable parameters to follow-up hypoxia in patients. To date, multiple approaches exist to detect hypoxia either directly or indirectly.<sup>64</sup> Tumour hypoxia was shown to be a prognostic biomarker, as it was shown that extracellular vesicle-associated genes could correlate with hypoxic microenvironment and predict recurrence in lung adenocarcinoma.<sup>65</sup> Evaluating hypoxia could also be indicative for the selection of patients who would most benefit of chemo-radiotherapy.<sup>66</sup>

The in vivo effect of hypoxia on the concentration of circulating NcfDNA and McdDNA was evaluated in the plasma of mice engrafted with an autologous lung epithelial tumour model (TC1) cell line. As would be expected from our in vitro results, plasmatic NcfDNA concentration is highly correlated to tumour weight and size, both of which are increased in mice bred in a hypoxic atmosphere, as has been observed in the previous study.<sup>23</sup> Noteworthy, circulating McdDNA is weakly related to hypoxia in the mice model, as its plasmatic concentration is not significantly different in both groups of mice. As a result, McdDNA is not correlated to tumour weight. This result is in phase with the in vitro model, since we found that after a rapid and huge increase of its concentration in extracellular medium, mitochondrial DNA release is then negatively regulated after 24 h of incubation, and to a higher extent than nuclear DNA. The lack of difference in McdDNA levels in murine plasma between hypoxia and normoxia may also be explained by the fact that, due to structural similarities with bacterial DNA, mitochondrial components, including mitochondrial DNA itself, are particularly likely to activate the immune system, leading to their degradation.<sup>67</sup> This hypothesis should be tested by the use of immunosuppressed xenografted mice. Nevertheless, the McdDNA levels can be used to establish the MNR, which permits a more accurate discrimination between normoxic and hypoxic mice than could be done if using NcfDNA levels alone. It would therefore appear that McdDNA measurement allows a normalisation of individual differences, highlighting the discriminative power of NcfDNA.

The results of our study must be interpreted within the context of their limitations and strengths. Despite colorectal cancer cell lines appear to cover the genetic, transcriptional and phenotypic constitution of cancer cells, their characteristics may be far from those of in vivo tumours, as most in vitro cell lines are derived from rapidly growing, aggressive transplantable tumour lines. Furthermore, carcinoma cells in in vivo models form 3D structures that interact with the surrounding extracellular matrix and cells of the tumour stroma. These interactions have been shown to be essential for tumour development and progression, which prominently alter signalling pathways in both the tumour cells and the stromal cells.<sup>68,69</sup> These preliminary results will need to be consolidated by analysis on a larger number of cell lines and mice. To obtain a more complete picture of these processes, it will be necessary to identify the release mechanisms in order to establish how and why, in hypoxic conditions, the high release of mitochondrial DNA is transient and subsequently repressed, while that of nuclear DNA is much less affected.

In summary, this is the first study to delineate concomitantly the effect of hypoxia on the levels of nuclear and mitochondrial cfDNA in cell and murine models. We have clearly shown that cancer cell lines release high amounts of mitochondrial and nuclear DNA in the extracellular compartment, and that hypoxia strongly influences the amount and manner in which these are released. We have also demonstrated that cells are able to regulate

differentially the daily rate of release of DNA according to hypoxic conditions. In the grafted mice model, we have shown that MNR, which is correlated to tumour size and weight, may characterise the hypoxic condition of the tumour. While it does not fully recapitulate mCRC in patients, our in vivo study using mice engrafted with TC1 cells does suggest that analysis of MNR could be relevant in evaluating the degree of hypoxia of human tumours. Moreover, the amount of NcfDNA in plasma could be indicative of tumour size. Our study is a preliminary one, but could pave the way for the development of blood tests, which would evaluate cancer progression or residual disease.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Laurence Picque-Lasorsa and Dr. Safia El Messaoudi for fruitful discussions. Hypoxia studies were performed with the help of Dr. Virginie Deleuze (IGMM, Montpellier). We are grateful to Prof. E. Belembaogo and Dr. I.H. Koumakpayi from the Institut de Cancérologie de Libreville (Gabon) for their collaboration and their support. We thank Pr. Marc Ychou (ICM, Montpellier) for his support in the governance of the project.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.O., J.-D.A. and Z.A.A.D. performed in vitro experiments, analysed the results and wrote the manuscript. A.K. and D.G. performed in vivo experiments. I.J.-E., T.F., C.P. and S.C. contributed to the design of experiments and to the manuscript writing. A.R.T. designed experiments, analysed the results, wrote the manuscript and managed the project.

#### ADDITIONAL INFORMATION

**Ethics approval and consent to participate** All experimental procedures on grafted mice were approved by The Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Chicago (protocol # 72190).

**Data availability** Data are available upon request to the corresponding author, Dr. A.R. Thierry.

**Competing interests** The authors declare no competing interests.

**Funding information** This work was supported by Montpellier SIRIC no. 2015-045 SIRICEOTPR150773, the Agence Nationale des Bourses du Gabon (ANBG) 760820 J and the Ligue contre le Cancer LNCCPRC17021FF. A.R.T. is supported by INSERM.

**Supplementary information** is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0716-y>.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### REFERENCES

1. Chen, E. Y., Mazure, N. M., Cooper, J. A. & Giaccia, A. J. Hypoxia activates a platelet-derived growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway that results in glycogen synthase kinase-3 inactivation. *Cancer Res.* **61**, 2429–2433 (2001).
2. Lee, S. L. C., Rouhi, P., Dahl Jensen, L., Zhang, D., Ji, H., Hauptmann, G. et al. Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 19485–19490 (2009).
3. Rofstad, E. K., Gaustad, J.-V., Egeland, T. A. M., Mathiesen, B. & Galappathi, K. Tumors exposed to acute cyclic hypoxic stress show enhanced angiogenesis, perfusion and metastatic dissemination. *Int. J. Cancer* **127**, 1535–1546 (2010).
4. Triner, D. & Shah, Y. M. Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. *J. Clin. Invest.* **126**, 3689–3698 (2016).
5. Bertout, J. A., Patel, S. A. & Simon, M. C. The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 967–975 (2008).
6. Warburg, O., Wind, F. & Negelein, E. The metabolism of tumors in the body. *J. Gen. Physiol.* **8**, 519–530 (1927).
7. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 685–698 (2012).



8. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
9. Blumenson, L. E. & Bross, I. D. A possible mechanism for enhancement of increased production of tumor angiogenic factor. *Growth* **40**, 205–209 (1976).
10. Van den Brenk, H. A., Moore, V., Sharpington, C. & Orton, C. Production of metastases by a primary tumour irradiated under aerobic and anaerobic conditions in vivo. *Br. J. Cancer* **26**, 402–412 (1972).
11. Heacock, C. S. & Sutherland, R. M. Enhanced synthesis of stress proteins caused by hypoxia and relation to altered cell growth and metabolism. *Br. J. Cancer* **62**, 217–225 (1990).
12. Pastukh, V. M., Gorodnya, O. M., Gillespie, M. N. & Ruchko, M. V. Regulation of mitochondrial genome replication by hypoxia: the role of DNA oxidation in D-loop region. *Free Radic. Biol. Med.* **96**, 78–88 (2016).
13. Young, S. D., Marshall, R. S. & Hill, R. P. Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**, 9533–9537 (1988).
14. Ruan, K., Song, G. & Ouyang, G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer. *J. Cell. Biochem.* **107**, 1053–1062 (2009).
15. Dewhirst, M. W., Cao, Y. & Moeller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 425–437 (2008).
16. Teicher, B. A. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* **13**, 139–168 (1994).
17. Malfettone, A., Silvestris, N., Paradiso, A., Mattioli, E., Simone, G. & Mangia, A. Overexpression of nuclear NHERF1 in advanced colorectal cancer: association with hypoxic microenvironment and tumor invasive phenotype. *Exp. Mol. Pathol.* **92**, 296–303 (2012).
18. Swinson, D. E. B., Jones, J. L., Richardson, D., Wykoff, C., Turley, H., Pastorek, J. et al. Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **21**, 473–482 (2003).
19. Driessen, A., Landuyt, W., Pastorekova, S., Moons, J., Goethals, L., Haustermans, K. et al. Expression of carbonic anhydrase IX (CA IX), a hypoxia-related protein, rather than vascular-endothelial growth factor (VEGF), a pro-angiogenic factor, correlates with an extremely poor prognosis in esophageal and gastric adenocarcinomas. *Ann. Surg.* **243**, 334–340 (2006).
20. Nieto, F. J., Peppard, P. E., Young, T., Finn, L., Hla, K. M. & Farré, R. Sleep-disordered breathing and cancer mortality: results from the Wisconsin Sleep Cohort Study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 190–194 (2012).
21. Martínez-García, M.-Á., Martorell-Calatayud, A., Nagore, E., Valero, I., Selma, M. J., Chiner, E. et al. Association between sleep disordered breathing and aggressiveness markers of malignant cutaneous melanoma. *Eur. Respir. J.* **43**, 1661–1668 (2014).
22. Almendros, I., Wang, Y., Becker, L., Lennon, F. E., Zheng, J., Coats, B. R. et al. Intermittent hypoxia-induced changes in tumor-associated macrophages and tumor malignancy in a mouse model of sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 593–601 (2014).
23. Cortese, R., Almendros, I., Wang, Y. & Gozal D. Tumor circulating DNA profiling in xenografted mice exposed to intermittent hypoxia. *Oncotarget* **6**, 556–569 (2015).
24. Thierry, A. R., Moliere, F., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Lopez-Crapez, E., Rolet, F. et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nat. Med.* **20**, 430–435 (2014).
25. Tie, J., Wang, Y., Tomasetti, C., Li, L., Springer, S., Kinde, I. et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci. Transl. Med.* **8**, 346ra92 (2016).
26. Wan, J. C. M., Massie, C., Garcia-Corbacho, J., Moliere, F., Brenton, J. D., Caldas, C. et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 223–238 (2017).
27. Tissot, C., Toffart, A.-C., Villar, S., Souquet, P.-J., Merle, P., Moro-Sibilot, D. et al. Circulating free DNA concentration is an independent prognostic biomarker in lung cancer. *Eur. Respir. J.* **46**, 1773–1780 (2015).
28. Tabernero, J., Lenz, H.-J., Siena, S., Sobrero, A., Falcone, A., Ychou, M. et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol.* **16**, 937–948 (2015).
29. Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Mollevi, C., Raoul, J. L., Guimbaud, R., Pezet, D. et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann. Oncol.* **28**, 2149–2159 (2017).
30. Mehra, N., Penning, M., Maas, J., van Daal, N., Giles, R. H. & Voest, E. E. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 421–426 (2007).
31. El Messaoudi, S., Moliere, F., Du Manoir, S., Bascoul-Mollevi, C., Gillet, B., Nouaille, M. et al. Circulating DNA as a strong multimer prognostic tool for metastatic colorectal cancer patient management care. *Clin. Cancer Res.* **22**, 3067–3077 (2016).
32. Meddeb, R., Dache, Z. A. A., Thezenas, S., Otandault, A., Tanos, R., Pastor B. et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Sci. Rep.* **9**, 5220 (2019).
33. Otandault, A., Anker, P., Al Amir Dache, Z., Guillaumon, V., Meddeb, R., Pastor, B. et al. Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Ann. Oncol.* **30**, 374–384 (2019).
34. Thierry, A. R. & El Messaoudi, S. Methods for screening a subject for a cancer. WO/2016/063122 (2016).
35. Thierry, A. R., Tanos, R., Otandault, A., Mollevi, C., Bauer, A., Tusch G. et al. Towards a screening test for cancer by circulating DNA analysis. *J. Clin. Oncol.* **37**, (15 suppl):e13146–e13146 (2019).
36. Thierry, A. R., El Messaoudi, S., Gahan, P. B., Anker, P. & Stroun, M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 347–376 (2016).
37. Meddeb, R., Pisareva, E. & Thierry, A. R. Guidelines for the preanalytical conditions for analyzing circulating cell-free DNA. *Clin. Chem.* **5**, 623–633 (2019).
38. El Messaoudi, S., Rolet, F., Moliere, F. & Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: preanalytical considerations. *Clin. Chim. Acta* **424**, 222–230 (2013).
39. Chiu, R. W., Poon, L. L., Lau, T. K., Leung, T. N., Wong, E. M. & Lo, Y. M. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin. Chem.* **47**, 1607–1613 (2001).
40. Moliere, F., Robert, B., Peyrotte, E. A., Del Rio, M., Ychou, M., Molina, F. et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS ONE* **6**, e23418 (2011).
41. Moliere, F., El Messaoudi, S., Pang, D., Dritschilo, A. & Thierry, A. R. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol. Oncol.* **8**, 927–941 (2014).
42. Abolhassani, M., Tillotson, J. & Chiao, J. Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line hl-60. *Int. J. Oncol.* **4**, 417–421 (1994).
43. Morozkin, E. S., Laktionov, P. P., Rykova, E. Y. & Vlassov, V. V. Extracellular nucleic acids in cultures of long-term cultivated eukaryotic cells. *Ann. NY Acad. Sci.* **1022**, 244–249 (2004).
44. Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 181–232 (2007).
45. Vaissière, T., Cuenin, C., Paliwal, A., Vineis, P., Hoek, G., Krzyzanowski, M. et al. Quantitative analysis of DNA methylation after whole bisulfite amplification of a minute amount of DNA from body fluids. *Epigenetics* **4**, 221–230 (2009).
46. Sanchez, C., Snyder, M. W., Tanos, R., Shendure, J. & Thierry, A. R. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *NPJ Genom. Med.* **3**, 31 (2018).
47. Al Amir Dache, Z., Otandault, A., Tanos, R., Pastor, B., Meddeb, R., Sanchez, C. et al. Blood contains circulating cell free respiratory competent mitochondria. *FASEB J.* in press (2019).
48. Wang, W., Kong, P., Ma, G., Li, L., Zhu, J., Xia, T. et al. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget* **8**, 43180–43191 (2017).
49. Bronkhorst, A. J., Wentzel, J. F., Aucamp, J., van Dyk, E., du Plessis, L. & Pretorius, P. J. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 157–165 (2016).
50. Anker, P., Lyautey, J., Lefort, F., Lederrey, C. & Stroun, M. Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation. *C. R. Acad. Sci. III* **317**, 869–874 (1994).
51. Gahan, P. B. & Stroun, M. The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 529–538 (2010).
52. King, H. W., Michael, M. Z. & Gleadle, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. *BMC Cancer* **12**, 421 (2012).
53. Panigrahi, G. K., Praharaj, P. P., Peak, T. C., Long, J., Singh, R., Rhim, J. S. et al. Hypoxia-induced exosome secretion promotes survival of African-American and Caucasian prostate cancer cells. *Sci. Rep.* **8**, 3853 (2018).
54. Chen, Y., Henson, E. S., Xiao, W., Huang, D., McMillan-Ward, E. M., Israels, S. J. et al. Tyrosine kinase receptor EGFR regulates the switch in cancer cells between cell survival and cell death induced by autophagy in hypoxia. *Autophagy* **12**, 1029–1046 (2016).
55. Zhang, H., Liu, B., Li, T., Zhu, Y., Luo, G., Jiang, Y. et al. AMPK activation serves a critical role in mitochondria quality control via modulating mitophagy in the heart under chronic hypoxia. *Int. J. Mol. Med.* **41**, 69–76 (2017).
56. Li, P., Zhang, D., Shen, L., Dong, K., Wu, M., Ou, Z. et al. Redox homeostasis protects mitochondria through accelerating ROS conversion to enhance hypoxia resistance in cancer cells. *Sci. Rep.* **6**, 22831 (2016).
57. Hammond, E. M. & Giaccia, A. J. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 718–725 (2005).
58. Tu, H.-C., Ren, D., Wang, G. X., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Kim, H. et al. The p53-cathepsin axis cooperates with ROS to activate programmed necrotic death upon DNA damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 1093–1098 (2009).

59. Ying, Y. & Padanilam, B. J. Regulation of necrotic cell death: p53, PARP1 and cyclophilin D-overlapping pathways of regulated necrosis? *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2309–2324 (2016).
60. Han, Y., Kim, B., Cho, U., Park, I. S., Kim, S. I., Dhanasekaran, D. N. et al. Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells. *Oncogene* **38**, 7089–7105 (2019).
61. Zou, Y.-F., Rong, Y.-M., Tan, Y.-X., Xiao, J., Yu, Z.-L., Chen, Y.-F. et al. A signature of hypoxia-related factors reveals functional dysregulation and robustly predicts clinical outcomes in stage I/II colorectal cancer patients. *Cancer Cell Int.* **19**, 243 (2019).
62. Al Tameemi, W., Dale, T. P., Al-Jumaily, R. M. K. & Forsyth, N. R. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 4 (2019).
63. Jezek, P. & Plecítá-Hlavatá, L. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1790–1804 (2009).
64. Walsh, J. C., Lebedev, A., Aten, E., Madsen, K., Marciano, L. & Kolb, H. C. The clinical importance of assessing tumor hypoxia: relationship of tumor hypoxia to prognosis and therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1516–1554 (2014).
65. Cao, B., Dai, W., Ma, S., Wang, Q., Lan, M., Luo, H. et al. An EV-associated gene signature correlates with hypoxic microenvironment and predicts recurrence in lung adenocarcinoma. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **17**, 879–890 (2019).
66. Clavo, B., Robaina, F., Fiuza, D., Ruiz, A., Lloret, M., Rey-Baltar, D. et al. Predictive value of hypoxia in advanced head and neck cancer after treatment with hyperfractionated radio-chemotherapy and hypoxia modification. *Clin. Transl. Oncol.* **19**, 419–424 (2017).
67. Zhang, Q., Raouf, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W. et al. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–107 (2010).
68. Bremnes, R. M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R. et al. The role of tumor stroma in cancer progression and prognosis: emphasis on carcinoma-associated fibroblasts and non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **6**, 209–217 (2011).
69. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Res.* **18**, 84 (2016).



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



### **III. Progrès récents dans les applications cliniques de l'ADN circulant en oncologie**

Revue publiée dans *Annals of Oncology*, (2019).

#### **i. Résumé :**

L'ADNcir est l'un des domaines en oncologie, qui a connu une croissance rapide au cours de ces dernières années. Ses utilisations potentielles en clinique couvrent maintenant chaque phase de la prise en charge des patients atteints de cancer (l'information prédictive, la détection de la maladie minimale résiduelle, la détection précoce de la résistance et la surveillance du traitement, la surveillance de la récurrence ainsi que la détection précoce et le dépistage du cancer). Cette revue décrit les progrès récents dans l'application de l'ADN ou de l'ARN circulant en oncologie en s'appuyant sur des résultats et des travaux initiaux ou encore non-publiés présentés lors du 10<sup>ème</sup> symposium international sur les acides nucléiques circulants dans le plasma et le sérum (CNAPS pour Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum) tenu à Montpellier du 20 au 22 septembre 2017. Durant ce congrès, les présentateurs ont présentés leurs récentes observations et résultats portant notamment sur (i) la biologie, les structures des ADNcir et leurs implications pour une détection optimale ; (ii) le rôle des ADNcir dans les processus métastatiques ou immunologiques ; (iii) l'évaluation des panels d'ARNm pour le suivi des patients cancéreux ; (iv) la détection de la maladie minimale résiduelle ; (v) l'évaluation du dépistage du cancer par l'analyse de l'ADNcir ; et (vi) des recommandations préanalytiques pour cette analyse. Cette revue liste non seulement les avancées récentes dans le domaine, présentées lors du congrès, mais aussi des résultats récemment publiés dans la littérature. Il propose une vue d'ensemble de la recherche fondamentale et de son potentiel, ainsi que de la mise en œuvre et des défis actuels dans l'utilisation des acides nucléiques circulants en oncologie.

## **ii. Contributions :**

J'ai participé à l'organisation du 10ème symposium international sur les acides nucléiques circulants dans le plasma et le sérum (CNAPS), et j'ai contribué à la rédaction de la revue, essentiellement dans les parties « Structures et origines tissulaires » et « Biologie ».

REVIEW

# Recent advances in circulating nucleic acids in oncology

A. Otandault<sup>1,2,3,4</sup>, P. Anker<sup>1,2,3,4</sup>, Z. Al Amir Dache<sup>1,2,3,4</sup>, V. Guillaumon<sup>4,5</sup>, R. Meddeb<sup>1,2,3,4</sup>, B. Pastor<sup>1,2,3,4</sup>, E. Pisareva<sup>1,2,3,4</sup>, C. Sanchez<sup>1,2,3,4</sup>, R. Tanos<sup>1,2,3,4</sup>, G. Tousch<sup>1,2,3,4</sup>, H. Schwarzenbach<sup>6</sup> & A. R. Thierry<sup>1,2,3,4\*</sup>

<sup>1</sup>IRCM, Institute of Research in Oncology of Montpellier, Montpellier; <sup>2</sup>INSERM, U1194, Montpellier; <sup>3</sup>Department of Oncology, Montpellier University, Montpellier; <sup>4</sup>Regional Institute of Cancer of Montpellier, Montpellier; <sup>5</sup>SIRIC, Integrated Cancer Research Site, Montpellier, France; <sup>6</sup>Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

\*Correspondence to: Dr Alain R. Thierry, INSERM, U1194, IRCM, 208 rue des Apothicaires, 34298 Montpellier cedex 5, France. Tel: +33-6-63-82-19-94; E-mail: alain.thierry@inserm.fr

Circulating cell-free DNA (cfDNA) is one of the fastest growing and most exciting areas in oncology in recent years. Its potential clinical uses cover now each phase of cancer patient management care (predictive information, detection of the minimal residual disease, early detection of resistance, treatment monitoring, recurrence surveillance, and cancer early detection/screening). This review relates the recent advances in the application of circulating DNA or RNA in oncology building on unpublished or initial findings/work presented at the 10th international symposium on circulating nucleic acids in plasma and serum held in Montpellier from the 20th to the 22nd of September 2017. This year, presenters revealed their latest data and crucial observations notably in relation to (i) the circulating cell-free (cfDNA) structure and implications regarding their optimal detection; (ii) their role in the metastatic or immunological processes; (iii) evaluation of miRNA panels for cancer patient follow up; (iv) the detection of the minimal residual disease; (v) the evaluation of a screening tests for cancer using cfDNA analysis; and (vi) elements of preanalytical guidelines. This work reviews the recent progresses in the field brought to light in the meeting, as well as in the most important reports from the literature, past and present. It proposes a broader picture of the basic research and its potential, and of the implementation and current challenges in the use of circulating nucleic acids in oncology.

**Key words:** cancer, circulating DNA, diagnostic, treatment, resistance, screening

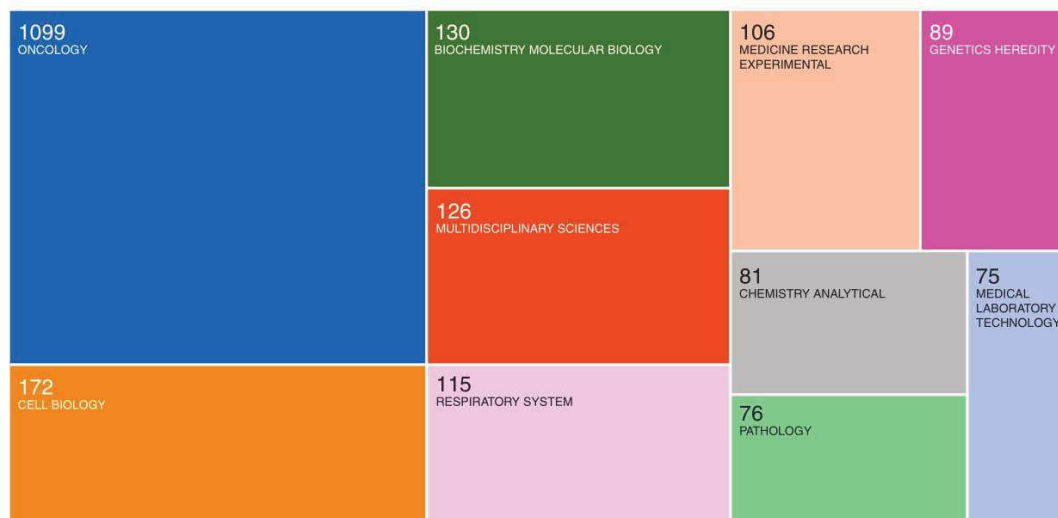
## Introduction

Use of circulating DNA (Figure 1) or RNA (Figure 2) received high scrutiny (Figure 3), especially during the last decade in various oncology fields (Figure 4). Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) meetings (supplementary data S1, available at *Annals of Oncology* online) are unique in that they focus on and link together basic and applied research in various pathologies for nearly 20 years. Held once every 2 years, they are typically the occasion for the early presentation of new observations, and gave us the opportunity to relate these to previous milestone reports and recent literature, and to review the potential of these new avenues of research, as well as the challenges, which exist in developing the use of circulating nucleic acids in oncology.

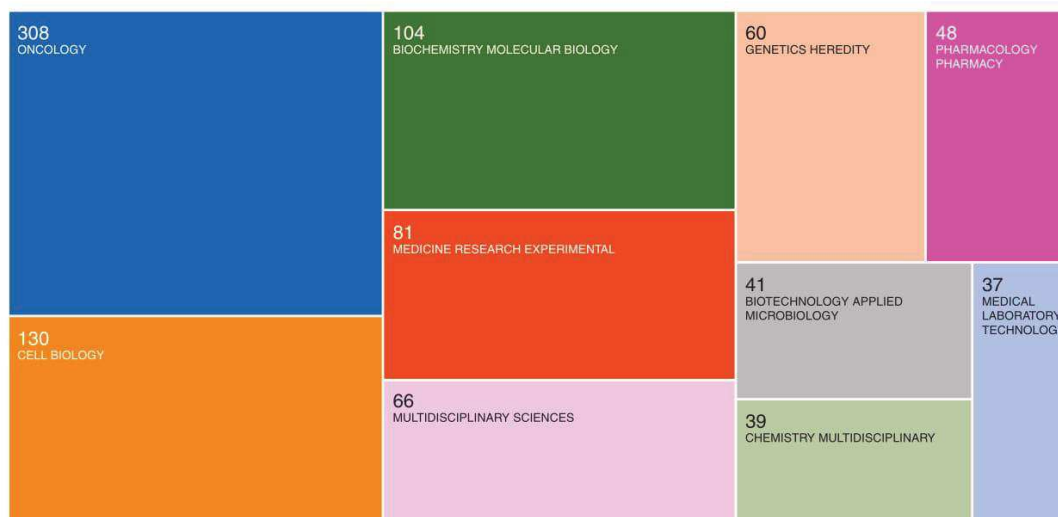
## Structures and tissue origins

Circulating cell-free DNA (cfDNA) can be present in the form of protein-associated DNA fragments or extracellular vesicles (EV), in the physiological circulating fluids of healthy and diseased individuals as recently reviewed [1, 2]. cfDNA is derived not only from genomic DNA but also from extrachromosomal mitochondrial DNA. While various clinical applications of cfDNA are currently progressing [3, 4], the identification of structural characteristics remains under investigation.

Confirming pioneering work on size profiling [5, 6], a higher fragmentation of cfDNA in metastatic colorectal and non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients compared with healthy donors, and a significant difference in size profile between mutated and wild type DNA in cancer patients were



**Figure 1.** Publication number reporting use of circulating DNA in cancer upon research areas in 2017 and 2018. Web of science citation reports showing 2113 records for TOPIC: (cancer circulating DNA) in 2017 and 2018. This citation level corresponds to 36% to the total number of records up to 2018 (5800 records). A 51% of the publications concerned use in clinical oncology.



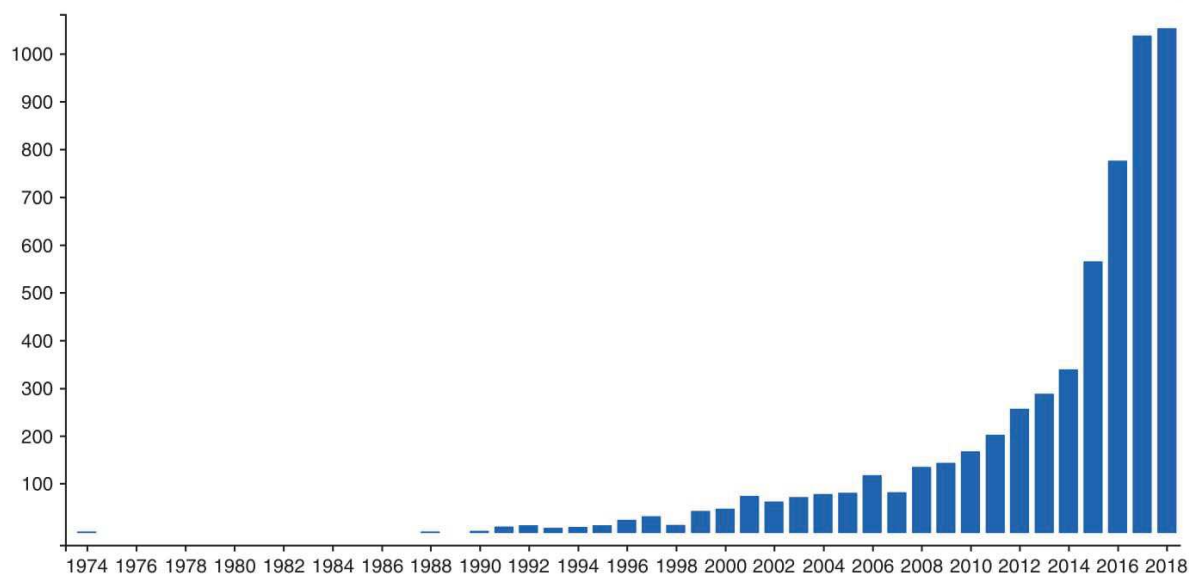
**Figure 2.** Publication number reporting use of circulating RNA in cancer upon research areas in 2017 and 2018. Web of Science citation reports showing 912 records for TOPIC: (cancer circulating RNA). This citation level corresponds to 24% to the total number up to 2018 (3751 records). A 34% of publications concerned use in clinical oncology. Number of records during that period of time was more than twofold less than records reporting circulating DNA in cancer (2113). The number of reports on the use of microRNA was nearly threefold higher than those on mRNA.

demonstrated, during the CNAPS, by Garlan et al., using the BIABooster system [7]. Similarly, Piskorz et al. presented their previous work which showed that in an ovarian cancer mouse, circulating tumor DNA fragments are shorter than nontumor cell-free DNA in plasma, and that the selection of fragments between 90 and 150 bp, using targeted and whole-genome sequencing (WGS) approaches, could enrich the tumor DNA up to 11-fold [8].

During the meeting, a blinded study by Sanchez et al. [9] demonstrated that circulating tumor DNA from cancer patients showed a similar size profile using either whole genome deep

sequencing from single strand library preparation or using a q-PCR based method, revealing a higher proportion of shorter cfDNA fragments (below 80 bp) not readily detectable by standard double-stranded DNA library preparation protocols (as previously shown by Underhill et al.). This showed the higher capacity of single strand DNA template analysis to detect cfDNA fragments, and revealed that cfDNA molecules, which are initially packed in chromatin, are released from cells and then dynamically degraded in blood, both within and between nucleosomes or transcription factor-associated subcomplexes. In addition, this study revealed that cfDNA size distribution obtained from the





**Figure 3.** Publication record. Web of science publication records per year reached up to 1050 in 2018 for TOPIC: (cancer circulating DNA). The sum of publication records up to now is 5800. The sum of times cited per year was in exponential phase in the last decade up to 28 000 in 2018.

conventional WGS from a double-stranded DNA library should be distinguished from that obtained with q-PCR or WGS from a single-stranded DNA library which use single-strand DNA as a first template. Using standard WGS, Markus et al. showed that, in contrast to plasma where cfDNA fragments of mononucleosome length are predominant, the length of the most abundant fragments in urine is short (80–81 bp), which is consistent with DNA wrapped in a subnucleosomal structure and undergoing DNA digestion.

Bronkhorst et al. had previously demonstrated that 143B cancer cell line is able to actively release 2000–3000 bp sized segments of heterochromatin [10]. In their new work, they found that these fragments are of a repetitive nature, including alpha satellite, mini satellite and active transposons originating from the centromeric and the pericentromeric regions of chromosomes 1, 9 and 16. They suggest that this secretion into the extracellular environment can induce a wide range of detrimental biological effects.

Following initial observations from Lehmann-Werman et al. [11], Lo et al. [12] and Snyder et al. [13], the tissue origin of cfDNA has become of great interest especially in determining a particular biological state leading to a higher diagnostic value. These studies, among others, revealed the high proportion of cfDNA released by hematopoietic cells. Moss et al. had previously proposed a novel strategy for the identification of tissue origin of cfDNA, based on the discovery of the DNA methylation profile by Illumic Epic array [11]. Using this approach, the team was recently able to detect and monitor breast cancer. Moreover, in the CNAPS meeting they confirmed that this strategy is useful for the simultaneous identification of multiple tissue contributors of cfDNA in healthy individuals, transplant recipients and cancer patients [14]. This report followed the previous demonstration of the noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation [15] using the same approach. Lam et al. presented their published data demonstrating that erythroid DNA represents a median of 30.1% of plasma DNA in healthy subjects [16]. Simon et al. had earlier found that cfDNA is predominantly

released as pro-inflammatory chromatin from cells of the hematopoietic lineage in response to acute exercise [17].

Specific cfDNA structure, as observed by size profile analysis [9, 18, 19], methylation [14, 20] or nucleosome positioning [11, 13] may benefit to higher capacity in diagnostics or cancer screening.

### Biology

A number of previous studies had supported the concept that cfDNA can penetrate host cells and modify the biology of those cells. In their prior studies, Mittra et al. considered that DNA which exists in the extracellular compartment, including the circulation, had local and systemic biological functions that could form the basis of some human diseases. His team had demonstrated previously that DNA molecules which originate from dying cells due to chemotherapy and radiotherapy have the ability to integrate into genomes of bystander healthy cells in order to induce DNA damage and trigger apoptotic and inflammatory responses. They have shown that this patho-physiological effect can be prevented by using DNA-neutralizing and degrading agents [21]. Their preliminary data showed that circulating DNA released from hypoxic cells is directly involved in the activation of paracrine factors that modulate cells of the tumor microenvironment. In addition, Glebova et al. suggested that oxidized DNA can act as genetic elements involved in horizontal gene transfer, as shown in experiments with MCF-7 cells able to uptake and transcript previously oxidized cfDNA. In addition, Raghuram et al. have already confirmed that this phenomenon of horizontal gene transfer with cfDNA is a function of cfDNA size [22]. Their study showed that high molecular weight DNA is not able to enter cells, while sonicated DNA from different sources with sizes ranging from 300 to 3000 bp is able to do so, regardless of species or kingdom boundaries. They also proved that sonicated DNA has a



biological effect, such as the activation of the proinflammatory transcription factor. Here, Neuberger et al. have demonstrated the immunological effects of cfDNA. A higher gene expression of *IL1B*, *TNF* and *IL8* in THP1 cell line was observed after their stimulation with nucleosomal DNA released by netosis, compared with stimulation with purified genomic DNA. Netosis is a very recently discovered pathogen-killing mechanism in which neutrophils produce and release neutrophil extracellular traps that are composed of DNA and granular proteins [23]. Furthermore, using whole-transcriptome sequencing, Semenov et al. have recently reported that the incubation of A549 cell line with exosomes purified from human blood plasma induced the upregulation of innate immunity genes and the activation of toll-like receptors (TLR) and p53 signaling pathway.

Additionally, Rykova et al. discussed data published in the literature that encourages the development of immunomodulatory DNA-based therapeutics. The consequence of nucleic acids and their metabolites accumulation in the bloodstream due to obstruction of clearance functions, to specifically activate immune receptors is significant. For example, TLR9 is activated by unmethylated CpG motif [24], and TBK1 receptor is activated by cytoplasmic double stranded DNA [25]. Rykova also showed results proving that synthetic immunomodulatory CpG ODNs (oligo-deoxynucleotides) can be used as vaccine adjuvants against different types of cancer and many other diseases [26, 27]. Taking into consideration all these supporting results, further studies should be carried out to develop potential specifically targeted nontoxic immunomodulatory DNA-based therapeutics.

It has previously been shown that telomeric sequences in the pool of cfDNA are able to block TLR9 and inhibit the above-mentioned immune response [28]. Korabecna et al. studied the stimulatory effects on monocytic THP1 cells of telomeric cfDNA present in plasma and serum, before and after treatment with DNases [29]. *TNF- $\alpha$*  messenger RNA (mRNA) expression in stimulated THP1 cells increased significantly after DNase treatment. Thus, they confirmed the involvement of cell-free telomeric sequences in the regulation of immune functions.

Mitra hypothesized that cfDNA could integrate into genomes of healthy cells to trigger inflammatory effects. Finally, because the circulatory system is crucial for cancer propagation, many researchers are now working on genomestasis theory, which considers nucleic acids in the circulation as a driver of metastasis [30, 31].

Additional work should be done to elucidate more completely the biological properties of cfDNA, in order to extend our knowledge of the subject with a mind toward clinical implementation of cfDNA analysis. New data combining structural and biological features of cfDNA have promising possibilities for the diagnosis and treatment of cancer and other diseases.

### Theragnostics/companion test

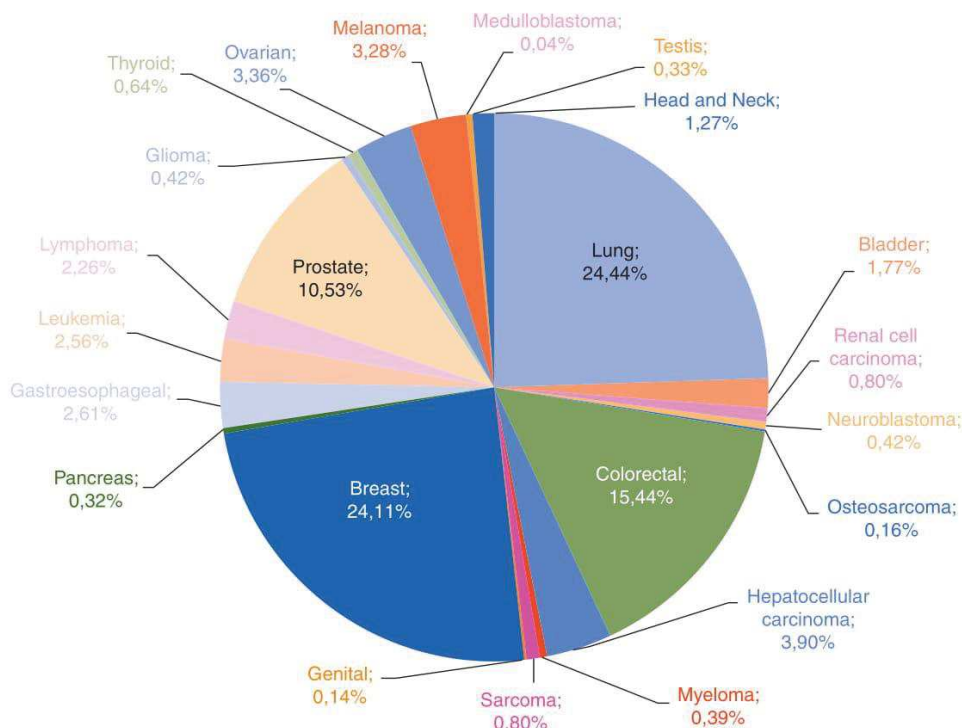
The utility of circulating tumoral DNA (mutant cfDNA) as a predictive biomarker for the therapeutic adaptation/response of patients suffering from various types of cancers, as foreseen by Stroun et al. [32, 33], Leon et al. [34], and first clinically evaluated by Diehl et al. [35], is now widely described in the literature [3, 36]. Recently, Thierry et al. demonstrated the clinical utility of using cfDNA analysis by rapidly detecting *RAS* and *BRAF*

mutations in metastatic colorectal cancer (mCRC) patient plasma showing a median data turnaround-time of 2 and 16 days for mutant cfDNA and tumor-tissue analysis, respectively [37]. In addition, the authors found a higher presence of mutations (24% of WT scored patients for both genes, instead of 45% by tumor-tissue analysis). It should be noted that the mutation profile, as determined from cfDNA analysis using various detection thresholds, highlights the importance of the test sensitivity. Kopetz et al. and Laurent-Puig et al. showed results of a clinical study named AGEO RASANC, already presented by Bachet at ASCO 2017 and published after the CNAPS meeting. This focused on the concordance between mutant cfDNA- and tissue-analysis in mCRC using next-generation sequencing (NGS) [38]. For instance, Laurent-Puig et al. obtained 92% of sensitivity, 94% of specificity and 93% of concordance between plasma and tissue analysis.

Lyskjær et al. presented unpublished results of a proof-of-concept phase II study about the prediction of Irinotecan efficacy in a cohort of 18 mCRC patients using mutant cfDNA assessed by droplet digital PCR (ddPCR). The aim of this study was to test if early alterations in plasma mutant cfDNA can be used as a marker for therapeutic effectiveness in mCRC patients treated with first line Irinotecan. The authors showed that mutant cfDNA levels decreased during the first 40 days of treatment, in accordance with the fact that none of the 18 patients had relapsed by the time of the first scan. Patients with a high baseline level of ctDNA (>median) were associated with an earlier progression. In addition, authors found an approximately fivefold increase in the relative risk of progression in patients with <10-fold reduction in mutant cfDNA levels at day 40 post-treatment start. In sum, mutant cfDNA is a promising marker for early prediction of Irinotecan response in mCRC patients.

Keller et al. also presented results which were published after the CNAPS meeting which focused on the correlation between the results of medical imaging and the variation of cfDNA assessed using ddPCR [39] in a cohort of melanoma patients treated by immunotherapy, and found statically significant results (Fisher's exact test:  $P=0.034$ ). They also conducted an analysis of 13 patients with blood samples taken at baseline (BL) and during the early course of treatment (cycle C2 or C3). The results showed significantly lower progression-free survival (PFS) in patients with increased mutant cfDNA levels between BL and C3, compared with patients with decreased mutant cfDNA (21 versus 145 days, respectively). From these results, they suggested early mutant cfDNA variation as a predictor of tumor response to immunotherapy in melanoma patients.

The presentation of Rosenfeld et al. pointed out the recent approval for use by the European Medicines Agency (EMA) and the Food and Drug Administration (FDA) of cobas *EGFR* Mutation real-time PCR Test v2, using plasma specimens as a companion test for the detection of exon 19 deletions or exon 21 substitution (*L858R*) mutations in the epidermal growth factor receptor (*EGFR*) gene, necessary for identifying patients with metastatic NSCLC eligible for treatment with Tarceva<sup>®</sup> (erlotinib). Rosenfeld et al. also presented the published results of Remon about the Tagrisso<sup>®</sup> (Osimertinib) benefit in *EGFR*-mutant NSCLC patients with *T790M*-mutation detected by mutant cfDNA [40]. In this study, the authors showed that among assessable patients Osimertinib gave a partial response rate of 62.5%



**Figure 4.** Proportion of the publication number reporting use of circulating DNA in cancer upon cancer types. Web of science citation reports showing 5800 records for TOPIC: (cancer circulating DNA) in up to end 2018.

and a stable disease rate of 37.5%, and they concluded that mutant cfDNA can be used as a substitute marker for *T790M* detection. In sum, cfDNA qualitative (mutation testing) and/or quantitative analysis shows considerable promise in the prediction of therapeutic tumor response in various types of cancer.

Data as regards the theragnostic/companion test field is also very encouraging. The recently approved use of cobas *EGFR* Mutation real-time PCR Test v2 using plasma samples in metastatic NSCLC should open the door for the approval of other tests for the prediction of therapeutic response. However, prospective randomized clinical trials to test the clinical utility of cfDNA as a stand-alone diagnostic test are still needed.

### Minimal residual disease and recurrence

CfDNA analysis presents the opportunity to detect minimal residual disease and monitor recurrence, which might help improve patients' management and outcomes. However, the sensitivity of the analysis is often limited by the small amount of mutant DNA. This topic was widely discussed in the meeting and was the subject of numerous publications briefly before or after the conference. Tie et al. reported that cfDNA analysis may help in detecting the minimal residual disease, suggesting the capacity to select cancer patients for adjuvant therapy based on the detection of mutant cfDNA [41]. Rosenfeld suggested that massively multiplexed assays are needed to detect low levels of mutant cfDNA, hence the Tailored Panel Sequencing (TAPAS) method

that analyses 100s–1000s of mutant loci. Wan et al. demonstrated that this method's sensitivity allows the detection of residual levels of tumor DNA in the plasma and urine samples of melanoma patients receiving therapy [3]. Mutant cfDNA's ability to track tumor progression and provide evidence of minimal residual disease was investigated by Openshaw et al. [42], by tracking *TP53* mutation frequency in tumor tissues and corresponding plasma samples from patients with gastroesophageal adenocarcinoma. A different study by Phallen et al. used massively parallel sequencing to identify somatic mutations to be used as mutant cfDNA markers in CRC patients for the detection of minimal residual disease and to monitor changes in tumor burden during a 3-year follow-up period. Mutant cfDNA was detected in all relapsing patients but not in nonrelapsing patients [43]. Lin et al. evaluated the utility of a sensitive 54-cancer gene digital NGS assay, which covers all major melanoma driver genes, in melanoma patients with regional metastasis following curative surgical resection [44]. They showed that cfDNA mutation levels correlated with tumor burden ( $P=0.019$ ) and that monitoring these enabled earlier detection of recurrence than by monitoring serum LDH levels ( $P=0.01$ ). In the plasma of gastric cancer (GC) patients, Ogino et al. showed that the *HER2* ratio determined by ddPCR is a repeatable noninvasive approach for the detection of recurrence and for real-time evaluations of the *HER2* status to monitor the effects of treatments for patients with *HER2*-positive GC [45]. A copy-number aberration score was calculated by Silva et al. for melanoma patients with active disease and patients with recently excised disease [46]. cfDNA was higher in the first group and was



considered a good predictor of the presence of active disease with an AUC of 0.89.

Another group, Ehlert et al. developed a specific q-PCR approach, which was presented in the meeting, employing a first round blocking primer, *KRAS* mutation-specific ARMS primers and short LNA-probes to quantify minute amounts of mutant cfDNA. Martinson examined variant frequencies by using single-strand library preparation technology, an approach developed by Abbosh et al. [47], to study extremely fragmented DNA in baseline and postsurgical NSCLC samples. He showed in the conference that the fraction of variant-positive cases decreased in postsurgical samples. In another study, Kothari et al. evaluated the feasibility of detecting cfDNA and using it to noninvasively characterize genetic profiles of high-risk relapsed neuroblastoma.

In sum, the ability of mutant cfDNA detection to provide evidence of residual disease and identify patients at very high risk of relapse was validated in different studies, and work on the implementation of this analysis in clinical practice is ongoing.

### Treatment and resistance monitoring

Drug resistance is clearly a challenge in oncology. Since previous pioneering works from L. Diaz and Bardelli's group [4, 48–50] demonstrating that resistant clones emerge in the tumor causing resistance to targeted therapy, the use of cfDNA analysis has emerged as a potential tool in detecting early resistance in the course of treatment. Works presented at the CNAPS 2017 showed advances in the identification of *de novo* or acquired methylations and point mutations leading to drug resistance [48]. In this context, a previous study by Thierry et al. showed the need for an ultrasensitive method of detecting *RAS* and *BRAF* point mutations in cfDNA before treatments, or when tracking secondary resistance in mCRC patients treated with chemotherapy and cetuximab [51]. Results revealed that 64% and 21% of point mutations detected in cfDNA would be missed if the limit of detection was below 1% or 0.1%, respectively [51]. Bardelli's team also showed in 2016 that, in mCRC patients, *EGFR* extracellular domain (ECD) point mutations can emerge during anti-*EGFR* therapy, leading to secondary resistance [49]. *EGFR* ECD point mutations induce a change in the *EGFR* structure, leading to nonrecognition by anti-*EGFR* monoclonal antibodies (cetuximab or panitumumab). To override this problem, Bardelli prepared a murine avatar from a G465E *EGFR*-mutant tumor derived from an mCRC patient. The resulting 2D cell culture was treated with a combination of anti-*EGFR* antibodies (MM-151), showing a dramatic reduction in cell viability compared with cetuximab or panitumumab alone [52]. Kopetz's team showed in the CNAPS meeting one of the first examples of cfDNA genomic landscape, in 1397 patients with CRC. Firstly, data showed that the mutational prevalence of the 20 most commonly mutated genes in cfDNA was strongly associated with the mutational prevalence in tumor tissue ( $R^2 = 0.95$ ;  $P < 0.0001$ ). Secondly, data revealed that 91% of patients with *EGFR* ECD mutations also harboring multiple alterations including *RAS* and *BRAF* point mutations, leading to resistance [53]. The emergence of point mutations is not the only way to monitor treatment. The modulation of mutant cfDNA concentration could also predict the efficacy of various treatments. Laurent-Puig's team suggested

that in their published data [54] early decreases in mutant cfDNA concentration (*KRAS* point mutation or *WIFI* and *NPY* hypermethylation) was a marker of therapeutic efficacy in mCRC patients. Moreover, Mouliere et al. designed a patient-TAPAS approach to track mutation levels and fragmentation patterns in cfDNA. They observed changes in mutant cfDNA levels in the first 2 days following treatment initiation, including the emergence of subclonal mutations. In the same way, Reinert et al. showed earlier in CRC patients after local or systemic interventions that changes in mutant cfDNA level showed a good agreement with changes in tumor volume ( $\kappa = 0.41$ , Spearman's  $\rho = 0.4$ ) [55]. Heitzer et al. developed the mFAST SeqS, an untargeted assessment of tumor DNA fraction, to monitor treatment response in metastatic breast cancer patients. They showed before the meeting that changing in levels of mutant cfDNA (*z*-score FAST-Seq) correlate with treatment response [56].

As the development of cfDNA analysis continues, more and more work is now focused on its implementation in nonmetastatic stage cancer [57, 58], and in investigating predictive response to chemotherapy [59]. It should be noted that, in addition to mutation analysis, methylation was found to be a great surrogate marker for following up metastatic cancer patients [60]. cfDNA analysis in oncology is a promising tool in the identification of early drug sensitivity or resistance, and in doing so guide the clinician for adapting therapies to tumor evolution. The next step in its development will be to use interventional clinical studies to investigate whether cfDNA analysis can increase patient survival (PFS and OS) by adapting therapies in real time.

### Circulating RNA in oncology

In the session on cfRNA in oncology, the speakers presented their data on cfRNA, which is also a highly important research area in the field of liquid biopsy (Figure 2). In the bloodstream, cfRNA consists of diverse RNA subpopulations that are protected from degradation by association with lipids/proteins or by incorporation into EV such as exosomes.

Tewari et al. presented his data on RNA-seq, which are increasingly being used for profiling of cfRNA present in plasma and other biofluids. Many different methods for performing RNA-seq have been described to date. Tewari et al. improved the protocol- and sequence-specific bias of RNA-seq by using adapters for ligation with randomized end-nucleotides and computational correction factors. They detected that EV populations exhibit a common mRNA signature, carry tumor-specific alterations and can be interrogated as a source of cancer-derived cargo [61]. Garcia-Olmo showed the clinical relevance of perioperative detection of mRNA encoding *hTERT* and *GAPDH* in plasma from laryngeal and hypopharyngeal cancer patients by real-time PCR. Detection of *hTERT* mRNA before surgery had diagnostic value and was related to subsequent recurrence. Mean levels of plasma *GAPDH* mRNA in untreated patients were significantly higher than in healthy subjects [62]. Epigenetic biomarkers are increasingly recognized as promising diagnostic and prognostic tools in CRC. Using an ELISA-based assay, Gezer demonstrated that the levels of trimethylation of histone H4 lysine 20 (H4K20me3), a repressive histone methylation mark usually enriched in pericentromeric heterochromatin, decrease in circulating nucleosomes in blood of CRC patients [20].



Several studies in recent years have focused on circulating miRNAs, short single-stranded noncoding RNA that inhibits mRNA expression. In this area, Laktionov presented his screening of miRNAs in urine from prostate cancer patients. Expression of four pairs of miR-15a/miR-26b, miR-19b/miR-26b, miR-22-3p/miR-26b, miR-26b/miR-378a differentiated 80% of these patients with absolute specificity [63]. Using TaqMan real-time PCR and microarrays, Schwarzenbach's laboratory revealed that a network of deregulated cell-free and exosomal miRNAs involved in the regulation of cancer-associated signaling pathways, such as the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT way, are associated with a particular biology of breast and ovarian carcinomas. Furthermore, they found an excessive secretion of exosomes in these patients, something associated with the prevalence of miRNAs in exosomes, when compared with cell-free miRNAs [64, 65].

Overall, the recent advances in cfRNA highlight the significant potential of cfRNAs as future tumor markers and their therapeutic value.

### Cancer screening

Early cancer detection can improve survival and decrease mortality by increasing the chances of successful treatment. Papadopoulos' team managed to increase the sensitivity of cancer detection by combining mutation detection in more than one bodily fluid (saliva and blood) from the same individual, or by associating mutation detection with other markers or other clinical information. In a study called CancerSeek, published in January 2018 and including more than 1000 patients with 8 different cancer types (pancreas, colon, breast, liver, lung, ovarian, stomach and esophagus) and healthy individuals, they also showed an increased sensitivity in cancer detection while preserving specificity by combining mutation detection in the plasma of 16 genes commonly mutated in cancer and 41 protein markers [66]. While the CancerSeek test showed unrivaled performance, it nonetheless presents certain limitations in the context of universal cancer screening; for instance, it is principally used to confirm a previous diagnosis, with a low median sensitivity of only 43% for stage I cancers, whereas universal cancer screening should be carried out on an ostensibly healthy population [67].

Dennis Lo's group developed a test for nasopharyngeal cancer (NPC) by detecting the Epstein-Barr virus (EBV) involved in most NPC cases. Among the 20 174 male subjects recruited and screened, 5.5% showed a positive first test for EBV DNA, 1.5% had 2 consecutive positive plasma EBV DNA tests and 34 cases of NPC were identified [68]. Volition, a multi-national life sciences company, developed an age-adjusted algorithm of four normalized assays, each of which captures intact cell-free nucleosomes and labels a specific structural feature by double antibody ELISA. This algorithm improved precancerous polyp/adenoma detection and early stage CRC detection [69].

A study conducted by Rykova et al. [70] assessed the diagnostic potential of combinations of circulating aberrant methylated DNA and microRNAs (miRNAs) markers for lung cancer. Adlert et al. [43] proposed an approach called Targeted Error Correction Sequencing (TEC-Seq) that was able to detect mutant cfDNA in over half of early stage patients (I and II) and over three quarters of late stage patients (III and IV) with breast, lung,

colorectal and ovarian cancers ( $n=200$ ), while no mutations were identified in the control population ( $n=44$ ). The authors suggest that this technique could be applicable for noninvasive early cancer detection, screening and cancer patient management. Tanos et al. developed a multiparametric cfDNA screening test using a specific q-PCR-based method and targeting nuclear and mitochondrial sequences in the plasma of healthy individuals and CRC patients. This study showed a significant difference between these two groups, and gave a strong indication of the test's capacity to discriminate healthy and cancer patients [71].

Cancer screening and early detection by using cfDNA analysis start to be evaluated. Moore et al., who used targeted sequencing for *TP53* on plasma samples of 130 women with high-grade serous ovarian cancer (HGSOC). The technique was able to detect mutant cfDNA in patients with stage I HGSOC, as well as 50% of all cancer cases, although optimization is necessary to improve sensitivity and increase detection. In the LUCID study, Heider et al. developed a technique for early stage mutant cfDNA detection based on patient-specific panels, using a parallel analysis of large numbers of mutations to assess mutant cfDNA levels at diagnosis. Several other studies were based on the detection of methylated markers, such as that of Mijnes et al., who examined the tumor-specific hypermethylation of *SPAG6*, *NKX2* and *PER1* promoters, which appears to be a promising tool for blood-based breast cancer detection. Indeed, it showed a 70% sensitivity and a 80% specificity for ductal carcinoma in situ detection. Fleischhacker et al. presented preliminary data suggesting the ability of a panel combining the methylation markers *mSHOX2* and *mSEPT9* to discriminate between patients with hepatocellular carcinoma from patients with alcohol-induced liver cirrhosis.

All of these studies encourage the opinion that cfDNA analysis presents a promising avenue for cancer screening and early detection. That said, further investigation of these emerging biomarkers is vital, since most studies underline the necessity of combining different parameters and markers in order to increase sensitivity and specificity for a better discrimination between early stage cancer patients and healthy individuals.

### Preanalytics

Dana Tsui (New York, USA) and Michael Fleischhacker (Halle/Saale, Germany) organized a workshop dedicated to preanalytical procedures for the analysis of circulating nucleic acids. This session consisted of two parts. The first involved the oral presentations of Markus Havell and Ørntoft Mai-britt Worm on the evaluation of preanalytical factors affecting plasma DNA analysis, and the establishment of a standard operating procedure for cell-free DNA purification. The second part was an interactive workshop involving the contribution of all participants.

The lack of standardization of the preanalytical conditions hinders the use of cfDNA as a clinically robust biomarker in oncology [72, 73]. The main long-term objective of this workshop was to reach an agreement on the optimal handling of blood samples for cfDNA analysis, by presenting the importance of preanalytical factors, by exchanging on current practices in different laboratories, and efforts to standardize these procedures.

The discussion focused on time collection, collection tubes, sample processing delay, DNA extraction methods, methods of



**Figure 5.** Comparison of the number of publications reporting use of NGS- and PCR-based methods upon research areas in 2017 and 2018. (A) Web of science citation reports showing 146 records for TOPIC: (cancer circulating DNA NGS) in 2017 and 2018. This citation level corresponds to 67% to the total number up to 2018 (219 records). (B) Web of science citation reports showing 278 records for TOPIC: (cancer circulating DNA PCR-based) in 2017 and 2018. This citation level corresponds to 28% to the total number up to 2018 (988). PCR-based methods are still twice as much used when compared with NGS-based methods. However, increase of using NGS-based methods in the last 2 years is about twofold higher than the increase of using of PCR-based methods. A 62% of publication reporting NGS-based methods concern use in clinical oncology, while 30% of publication reporting PCR-based methods concerned use in clinical oncology. The numbers of publications reporting use of NGS- and PCR-based methods in clinical oncology were similar in the 2017–2018 period.

DNA quantification, and the storage of plasma and DNA samples. Preanalytical procedures still appear to vary from one laboratory to another. In addition, NGS- or PCR-based methods are among others the most used methods for analyzing cfDNA (Figure 5A and B). Nevertheless, with regard to sample processing, there is a general consensus in the scientific community on double centrifugation and a maximum delay in sample processing of 4 h in order to avoid genomic DNA contamination. The use of different extraction kits and quantification techniques in

different laboratories were seen to influence the quality and quantity of extracted cfDNA.

Other comments on the origin of circulating DNA have emphasized the need not to quantify the mitochondrial DNA as nuclear DNA, but to calculate the copy number in DNA samples.

Method reproducibility and cost of the analysis are additional important factors to be taken into account in considering the use of circulating nucleic acids in clinical practice.



Despite routine analysis in clinical areas such as prenatal testing or oncology, and active investigation toward applying cfDNA analysis, the significance of preanalytics and demographic variables is not widely known. Consequently, the lack of standard operating procedures impedes the maturing of this new and promising diagnostic tool. Recent efforts from Meddeb et al. [74] to characterize and optimize cfDNA quantification in humans will help to address this.

## Nomenclature

Historically, since the discovery of circulating DNA, no homogeneous nomenclature has been given to total circulating DNA in the bloodstream, unlike circulating DNA from tumor cells named ctDNA. For this purpose, during the CNAPS symposium a survey was taken to determine a common consensus on the matter. The three terms most widely used in the literature (cfDNA for cell-free DNA, ccfDNA for circulating cell-free DNA and ctDNA for circulating DNA) were proposed to the scientific community, who were also allowed to suggest other denominations. Sixty-three people participated in this vote. A 76% of the participants chose cfDNA, 16% ccfDNA, 5% ctDNA and 3% suggested another denomination. The results of this survey confirm 'cfDNA' as a term that can be used to commonly designate all extracellular circulating DNA in the blood.

In the oncology field, most reports use the term ctDNA (circulating tumor DNA), as illustrated by this small survey. One can discriminate among cfDNA origins three constituents in the blood of a cancer patient: malignant tumor cell-derived DNA, nonmalignant tumor cell-derived DNA and normal cells germline DNA [67]. However, ctDNA is employed in the literature to mean cfDNA bearing genetic or epigenetic alterations. Alternatively, ctDNA would word-by-word mean circulating DNA deriving from the tumor which is constituted of malignant and nonmalignant cells (stromal, endothelial and hematopoietic cells). Since the concentration of wild type cfDNA deriving from the microenvironment cells increases with the progression of the tumor, part of cfDNA is specific to the tumor growth. Readers could also be confused by the fact that ctDNA concentration values are biased in the literature, since in most cases ctDNA is determined from mutations of a few or a panel of genes, which inevitably leads to a bias in considering the total amount of cfDNA deriving from all the malignant cells. Because of these considerations, instead of the term ctDNA we used the term mutant cfDNA in this review.

This survey also addressed a second issue. The term 'biopsy' was first introduced by Besnier in 1879 [75] to designate the technique used to collect an organ or tissue fragment (cell samples) in order to establish an accurate diagnosis. According to the definition established by the National Cancer Institute (NCI Dictionary of Cancer Terms; available at <https://www.kucancercenter.org/cancer-information/cancer-terms-dictionary>), a liquid biopsy is a test done on a blood sample to look for cancer cells or pieces of tumor DNA found in the bloodstream. Given that cfDNA has nothing in common with DNA released from circulating tumor cells, and that cfDNA can also derive from nontumor cells, the question might be raised as to whether or not circulating DNA and RNA analysis ought to be considered as a

'liquid biopsy' properly speaking? A 80% of the voters supported this opinion, 10% disapproved and 10% had no opinion regarding the issue. F. Diehl (Hamburg, Germany) who organized the workshop session acknowledged the vote showing the need from the researchers from the field to unify the nomenclature despite inconsistencies.

In conclusion, cfDNA with PD-1 and cfDNA with PD-L1 checkpoint pathway immunotherapies are the two fastest growing and most exciting areas in oncology in recent years. Following their first clinical evaluation in predictive medicine, all six potentials of cfDNA analysis in oncology (predictive information, detection of the minimal residual disease, early detection of resistance, treatment monitoring, recurrence surveillance and cancer early detection/screening) are now well covered by a comprehensive literature on each phase of cancer patient management care. A new and exciting therapeutic challenge now faces the scientific/clinical community: the use of cfDNA analysis to guide immunotherapy. Meanwhile, broadening our knowledge of the structural and biological features of cfDNA, as well as standardizing the preanalytical conditions, remain key steps to be taken toward the clinical implementation of cfDNA analysis, and may provide new avenues of research in tumor biology.

## Acknowledgements

A special thanks and tribute to Maurice Stroun who past away just before the CNAPS Xth meeting. Maurice Stroun was remembered as one of the 'founding parents' of the circulating nucleic acids community. In particular, he founded the CNAPS conference series together with Anker [76]. Maurice was able to see his lifelong pursuit of circulating nucleic acids become an important part of scientific research and medical diagnostics. The field will continue to grow, and while those working in it will miss Maurice's physical presence, his indomitable pioneering spirit and his remarkable contributions will remain with the CNAPS community even as it reaches new frontiers.

The authors would like to thank all of the CNAPS scientific committee: P. Anker (Geneva, Switzerland), F. Diehl (Baltimore, USA), L. Diaz (New York, USA), M. Fleischhacker (Halle/Saale, Germany), P. Gahan (Montpellier, France), D. Lo (Hong Kong, China), N. Rosenfeld (Cambridge, UK), H. Schwarzenbach (Hamburg, Germany), M. Stroun (Geneva, Switzerland), and A. R. Thierry (Montpellier, France). We thank to Safia El Messaoudi who co-organized with A. R. Thierry the Xth CNAPS meeting with the critical contribution of the French Society of Nucleic Acids (SFAC) and Sabine Dejasse, SFAC President. Authors thank Marc Ychou, Karine Saget and Aurore Marquis from the SIRIC Montpellier. The authors would also like to thank Stefan Holdenrieder, Barbara Ottolini, Jean-Yves Cance, Serge Thierry and Philippe Grandjean.

## Funding

This work was supported by the SFAC (Société Française des Acides Nucléiques Circulants/French Society of Circulating Nucleic Acids), the University of Montpellier (France), the GSO canceropole (France), the Languedoc-Roussillon region (France), Lilly (France) and the SIRIC Montpellier Grant



(INCa-DGOS Inserm 6045), France. This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No. 755333 (LIMA). ART is supported by the INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, France).

### Disclosure

ART is cofounder, shareholder of DiaDx SAS and co-inventor of patent applications on cfDNA analytical methods. PA, CS and HS are co-inventors of patent applications on cfDNA analytical methods. All remaining authors have declared no conflicts of interest.

### References

- Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB et al. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev* 2016; 35(3): 347–376.
- Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet* 2018; 26(7): 937–945.
- Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J et al. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer* 2017; 17(4): 223–238.
- Diaz LA, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol* 2014; 32(6): 579–586.
- Mouliere F, Robert B, Peyrotte EA et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One* 2011; 6(9): e23418.
- Mouliere F, Messaoudi SE, Gongora C et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high *KRAS* or *BRAF* mutation load. *Transl Oncol* 2013; 6(3): 319.
- Andriamanampisoa C-L, Bancaud A, Boutonnet-Rodat A et al. BIABooster: online DNA concentration and size profiling with a limit of detection of 10 fg/ $\mu$ L and application to high-sensitivity characterization of circulating cell-free DNA. *Anal Chem* 2018; 90(6): 3766–3774.
- Mouliere F, Piskorz AM, Chandrananda D et al. Selecting short DNA fragments in plasma improves detection of circulating tumour DNA. *Sci Transl Med* 2018; 10(466). doi: <https://doi.org/10.1101/134437>.
- Sanchez C, Snyder MW, Tanos R et al. New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *NPJ Genomic Med* 2018; 3(1): 31.
- Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J et al. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2016; 1863(1): 157–165.
- Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016; 113(13): E1826–E1834.
- Sun K, Jiang P, Chan KCA et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(40): E5503–E5512.
- Snyder MW, Kircher M, Hill AJ et al. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell* 2016; 164(1–2): 57.
- Moss J, Magenheimer J, Neiman D et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun* 2018; 448142.
- De Vlaminck I, Martin L, Kertesz M et al. Noninvasive monitoring of infection and rejection after lung transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112(43): 13336–13341.
- Lam WKJ, Gai W, Sun K et al. DNA of erythroid origin is present in human plasma and informs the types of anemia. *Clin Chem* 2017; 63(10): 1614–1623.
- Tug S, Helmig S, Deichmann ER et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev* 2015; 21: 164–173.
- Chandrananda D, Thorne NP, Bahlo M. High-resolution characterization of sequence signatures due to non-random cleavage of cell-free DNA. *BMC Med Genomics* 2015; 8: 29.
- Underhill HR, Kitzman JO, Hellwig S et al. Fragment length of circulating tumor DNA. *PLoS Genet* 2016; 12(7): e1006162.
- Gezer U, Yörüker EE, Keskin M et al. Histone methylation marks on circulating nucleosomes as novel blood-based biomarker in colorectal cancer. *IJMS* 2015; 16(12): 29654–29662.
- Mitra I, Pal K, Pancholi N et al. Prevention of chemotherapy toxicity by agents that neutralize or degrade cell-free chromatin. *Ann Oncol* 2017; 28(9): 2119–2127.
- Raghuram GV, Gupta D, Subramaniam S et al. Physical shearing imparts biological activity to DNA and ability to transmit itself horizontally across species and kingdom boundaries. *BMC Mol Biol* 2017; 18(1): 21.
- Bonaventura A, Liberale L, Carbone F et al. The pathophysiological role of neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases. *Thromb Haemost* 2018; 118(1): 6–27.
- Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of endogenous nucleic acids by the innate immune system. *Immunity* 2016; 44(4): 739–754.
- Corrales L, McWhirter SM, Dubensky TW, Gajewski TF. The host STING pathway at the interface of cancer and immunity. *J Clin Invest* 2016; 126(7): 2404–2411.
- Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine* 2014; 32(48): 6377–6389.
- Wittig B, Schmidt M, Scheithauer W, Schmoll H-J. MGN1703, an immunomodulator and toll-like receptor 9 (TLR-9) agonist: from bench to bedside. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 94(1): 31–44.
- Gursel I, Gursel M, Yamada H et al. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 2003; 171(3): 1393–1400.
- Zinkova A, Brynychova I, Svacina A et al. Cell-free DNA from human plasma and serum differs in content of telomeric sequences and its ability to promote immune response. *Sci Rep* 2017; 7(1): 2591.
- Chaudhary S, Raghuram GV, Mitra I. Is inflammation a direct response to dsDNA breaks? *Mutat Res* 2018; 808: 48–52.
- Olmedillas-López S, García-Olmo DC, García-Arraz M et al. Liquid biopsy by NGS: differential presence of exons (DPE) in cell-free DNA reveals different patterns in metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Cancer Med* 2018; 7(5): 1706–1716.
- Stroun M, Anker P, Maurice P et al. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology* 1989; 46(5): 318–322.
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB. Circulating nucleic acids in higher organisms. *Int Rev Cytol* 1977; 51: 1–48.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37(3): 646–650.
- Diehl F, Li M, Dressman D et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(45): 16368–16373.
- Moati E, Taly V, Didelot A et al. Role of circulating tumor DNA in the management of patients with colorectal cancer. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2018; 42(5): 396–402.
- Thierry AR, El Messaoudi S, Mollevi C et al. Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann Oncol* 2017; 28(9): 2149–2159.
- Bachet JB, Bouché O, Taieb J et al. *RAS* mutation analysis in circulating tumor DNA from patients with metastatic colorectal cancer: the AGE0 RASANC prospective multicenter study. *Ann Oncol* 2018; 29(5): 1211–1219.
- Keller L, Guibert N, Casanova A et al. Early circulating tumour DNA variations predict tumour response in melanoma patients treated with immunotherapy. *Acta Derm Venerol* 2019; 99(2): 206–210.
- Remon J, Caramella C, Jovelet C et al. Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA. *Ann Oncol* 2017; 28(4): 784–790.

41. Tie J, Wang Y, Tomasetti C et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Sci Transl Med* 2016; 8(346): 346ra92.
42. Openshaw MR, Richards CJ, Guttery DS et al. The genetics of gastroesophageal adenocarcinoma and the use of circulating cell free DNA for disease detection and monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 2017; 17(5): 459–470.
43. Phallen J, Sausen M, Adleff V et al. Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci Transl Med* 2017; 9(403). doi: 10.1126/scitranslmed.aan2415
44. Lin SY, Huang SK, Huynh KT et al. Multiplex gene profiling of cell-free DNA in patients with metastatic melanoma for monitoring disease. *JCO Precision Oncol* 2018; (2): 1–30.
45. Ogino S, Konishi H, Ichikawa D et al. Detection of fusion gene in cell-free DNA of a gastric synovial sarcoma. *World J Gastroenterol* 2018; 24(8): 949–956.
46. Silva S, Danson S, Teare D et al. Genome-wide analysis of circulating cell-free DNA copy number detects active melanoma and predicts survival. *Clin Chem* 2018; 64(9): 1338–1346.
47. Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA et al. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature* 2017; 545(7655): 446–451.
48. Misale S, Yaeger R, Hobor S et al. Emergence of *KRAS* mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486(7404): 532–536.
49. Van Emburgh BO, Arena S, Siravegna G et al. Acquired *RAS* or *EGFR* mutations and duration of response to EGFR blockade in colorectal cancer. *Nat Commun* 2016; 7: 13665.
50. Diaz LA, Williams R, Wu J et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486(7404): 537–540.
51. Thierry AR, Pastor B, Jiang Z-Q et al. Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23(16): 4578–4591.
52. Arena S, Siravegna G, Mussolin B et al. MM-151 overcomes acquired resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancers harboring EGFR extracellular domain mutations. *Sci Transl Med* 2016; 8(324): 324ra14.
53. Strickler JH, Loree JM, Ahronian LG et al. Genomic landscape of cell-free DNA in patients with colorectal cancer. *Cancer Discov* 2018; 8(2): 164–173.
54. Garlan F, Laurent-Puig P, Sefrioui D et al. Early evaluation of circulating tumor DNA as marker of therapeutic efficacy in metastatic colorectal cancer patients (PLACOL study). *Clin Cancer Res* 2017; 23(18): 5416–5425.
55. Scholer LV, Reinert T, Ørntoft M-BW et al. Clinical implications of monitoring circulating tumor DNA in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23(18): 5437–5445.
56. Belic J, Koch M, Ulz P et al. mFast-SeqS as a monitoring and pre-screening tool for tumor-specific aneuploidy in plasma DNA. *Adv Exp Med Biol* 2016; 924: 147–155.
57. Tie J, Cohen JD, Wang Y et al. Serial circulating tumour DNA analysis during multimodality treatment of locally advanced rectal cancer: a prospective biomarker study. *Gut* 2018; doi:10.1136/gutjnl-2017-315852.
58. Schou JV, Larsen FO, Sørensen BS et al. Circulating cell-free DNA as predictor of treatment failure after neoadjuvant chemo-radiotherapy before surgery in patients with locally advanced rectal cancer. *Ann Oncol* 2018; 29(3): 610–615.
59. Yao J, Zang W, Ge Y et al. *RAS/BRAF* circulating tumor DNA mutations as a predictor of response to first-line chemotherapy in metastatic colorectal cancer patients. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2018; 2018: 4248971.
60. Boeckx N, Op de Beeck K, Beyens M et al. Mutation and methylation analysis of circulating tumor DNA can be used for follow-up of metastatic colorectal cancer patients. *Clin Colorectal Cancer* 2018; 17(2): e369–e379.
61. Conley A, Minicacchi VR, Lee DH et al. High-throughput sequencing of two populations of extracellular vesicles provides an mRNA signature that can be detected in the circulation of breast cancer patients. *RNA Biol* 2017; 14(3): 305–316.
62. García-Olmo DC, Contreras JD, Picazo MG et al. Potential clinical significance of perioperative levels of mRNA in plasma from patients with cancer of the larynx or hypopharynx. *Head Neck* 2017; 39(4): 647–655.
63. Bryzgunova OE, Konoshenko MY, Laktionov PP. MicroRNA-guided gene expression in prostate cancer: literature and database overview. *J Gene Med* 2018; 20(5): e3016.
64. Meng X, Müller V, Milde-Langosch K et al. Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2016; 7(13): 16923–16935.
65. Eicheler C, Stückerath I, Müller V et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget* 2014; 5(20): 9650–9663.
66. Cohen JD, Li L, Wang Y et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science* 2018; 359(6378): 926–930.
67. Thierry AR. A step closer to cancer screening by blood test. *Clin Chem* 2018; 64(10): 1420–1422.
68. Lam WKJ, Jiang P, Chan KCA et al. Sequencing-based counting and size profiling of plasma Epstein–Barr virus DNA enhance population screening of nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115(22): E5115–E5124.
69. Rahier J-F, Druetz A, Faugeras L et al. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 2017; 9: 53.
70. Zaporozhchenko IA, Ponomaryova AA, Rykova EY, Laktionov PP. The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities. *Expert Rev Mol Diagn* 2018; 18(2): 133–145.
71. Tanos R, Thierry AR. Clinical relevance of liquid biopsy for cancer screening. *Transl Cancer Res* 2018; 7(S2): S105–S129.
72. Schmidt B, Reinicke D, Reindl I et al. Liquid biopsy - performance of the PAXgene® blood ccfDNA tubes for the isolation and characterization of cell-free plasma DNA from tumor patients. *Clin Chim Acta* 2017; 469: 94–98.
73. Schmidt B, Fleischhacker M. Is liquid biopsy ready for the litmus test and what has been achieved so far to deal with pre-analytical issues? *Transl Cancer Res* 2018; 7(S2): S130–S139.
74. Meddeb R, Al Amir Dache Z, Thezenas S et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Sci Rep* 2018.
75. Nezelof C, Guinebretière J-M. [1879, Ernest Besnier inventor of the word “biopsy”]. *Rev Prat* 2006; 56(18): 2081–2085.
76. Anker P, Stroun M (eds). *Circulating Nucleic Acids in Plasma or Serum*, Vol. 906. New York, NY: New York Academy of Sciences 2000; 1–188.





## Références :

1. P. Mandel, F. Metais, Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* (1948), pp. 241 – 243.
2. A. Bendich, T. Wilczok, E. Borenfreund, Circulating DNA as a Possible Factor in Oncogenesis. *Science*. **148**, 374–376 (1965).
3. E. M. Tan, Deoxyribonucleic Acid (DNA) and Antibodies to DNA in the Serum of Patients with Systemic Lupus Erythematosus, 9.
4. P. Anker, M. Stroun, Circulating DNA in plasma or serum. *Medicina (B Aires)*. **60**, 699–702 (2000).
5. M. Stroun, P. Anker, Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem. J.* **128**, 100P-101P (1972).
6. S. A. Leon, B. Shapiro, D. M. Sklaroff, M. J. Yaros, Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* **37**, 646–650 (1977).
7. B. Shapiro, M. Chakrabarty, E. M. Cohn, S. A. Leon, Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*. **51**, 2116–2120 (1983).
8. M. Stroun, P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey, M. Beljanski, Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. **46**, 318–322 (1989).
9. G. D. Sorenson, D. M. Pribish, F. H. Valone, V. A. Memoli, D. J. Bzik, S. L. Yao, Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **3**, 67–71 (1994).
10. V. Vasioukhin, P. Anker, P. Maurice, J. Lyautey, C. Lederrey, M. Stroun, Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* **86**, 774–779 (1994).
11. G. Cuda, A. Gallelli, A. Nisticò, P. Tassone, V. Barbieri, P. S. Tagliaferri, F. S. Costanzo, C. M. E. Tranfa, S. Venuta, Detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in serum DNA of small and non-small cell lung cancer patients: a tool for early diagnosis? *Lung Cancer*. **30**, 211–214 (2000).
12. R. M. Bremnes, R. Sirera, C. Camps, Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up? *Lung Cancer*. **49**, 1–12 (2005).
13. F. Diehl, M. Li, D. Dressman, Y. He, D. Shen, S. Szabo, L. A. Diaz, S. N. Goodman, K. A. David, H. Juhl, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *MEDICAL SCIENCES*, 6.



14. Y. M. Lo, N. Corbetta, P. F. Chamberlain, V. Rai, I. L. Sargent, C. W. Redman, J. S. Wainscoat, Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. **350**, 485–487 (1997).
15. M. Fleischhacker, B. Schmidt, Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **1775**, 181–232 (2007).
16. A. R. Thierry, S. El Messaoudi, P. B. Gahan, P. Anker, M. Stroun, Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer and Metastasis Reviews*. **35**, 347–376 (2016).
17. I. Mitra, N. K. Nair, P. K. Mishra, Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *J. Biosci*. **37**, 301–312 (2012).
18. P. P. Laktionov, S. N. Tamkovich, E. Y. Rykova, O. E. Bryzgunova, A. V. Starikov, N. P. Kuznetsova, V. V. Vlassov, Cell-Surface-Bound Nucleic Acids: Free and Cell-Surface-Bound Nucleic Acids in Blood of Healthy Donors and Breast Cancer Patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1022**, 221–227 (2004).
19. S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. **35**, 495–516 (2007).
20. R. Singh, A. Letai, K. Sarosiek, Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **20**, 175–193 (2019).
21. S. Nagata, Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res*. **256**, 12–18 (2000).
22. K. Kawane, K. Motani, S. Nagata, DNA Degradation and Its Defects. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **6** (2014), doi:10.1101/cshperspect.a016394.
23. I. C. B. Viorritto, N. P. Nikolov, R. M. Siegel, Autoimmunity versus tolerance: Can dying cells tip the balance? *Clinical Immunology*. **122**, 125–134 (2007).
24. S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, H. Fukuyama, Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. **10**, 108 (2003).
25. S. N. Tamkovich, V. V. Vlassov, P. P. Laktionov, Circulating DNA in the blood and its application in medical diagnosis. *Mol Biol*. **42**, 9–19 (2008).
26. P. O. Delgado, B. C. A. Alves, F. de Sousa Gehrke, R. K. Kuniyoshi, M. L. Wroclavski, A. Del Giglio, F. L. A. Fonseca, Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumor Biol*. **34**, 983–986 (2013).
27. S. Jahr, H. Hentze, S. Englisch, D. Hardt, F. O. Fackelmayer, R.-D. Hesch, R. Knippers, DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res*. **61**, 1659–1665 (2001).
28. P. Rumore, B. Muralidhar, M. Lin, C. Lai, C. R. Steinman, Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance. *Clin Exp Immunol*. **90**, 56–62 (1992).

29. M. Stroun, J. Lyautey, C. Lederrey, A. Olson-Sand, P. Anker, About the possible origin and mechanism of circulating DNA: Apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta*. **313**, 139–142 (2001).
30. M. van der Vaart, D. V. Semenov, E. V. Kuligina, V. A. Richter, P. J. Pretorius, Characterisation of circulating DNA by parallel tagged sequencing on the 454 platform. *Clinica Chimica Acta*. **409**, 21–27 (2009).
31. A. Hochreiter-Hufford, K. S. Ravichandran, Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. **5**, a008748 (2013).
32. J. Aucamp, A. J. Bronkhorst, C. P. S. Badenhorst, P. J. Pretorius, The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biological Reviews*. **93**, 1649–1683 (2018).
33. S. Holdenrieder, P. Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. **46**, 1–24 (2009).
34. M. Leist, B. Single, A. F. Castoldi, S. Kühnle, P. Nicotera, Intracellular Adenosine Triphosphate (ATP) Concentration: A Switch in the Decision Between Apoptosis and Necrosis. *Journal of Experimental Medicine*. **185**, 1481–1486 (1997).
35. P. Syntichaki, Death by necrosis: Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports*. **3**, 604–609 (2002).
36. N. I. Walker, B. V. Harmon, G. C. Gobé, J. F. Kerr, Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. **13**, 18–54 (1988).
37. Y. Yang, G. Jiang, P. Zhang, J. Fan, Programmed cell death and its role in inflammation. *Military Medical Research*. **2** (2015), doi:10.1186/s40779-015-0039-0.
38. G. Kroemer, W. S. El-Deiry, P. Golstein, M. E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, B. Zhivotovsky, M. V. Blagosklonny, W. Malorni, R. A. Knight, M. Piacentini, S. Nagata, G. Melino, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation* (2005), , doi:10.1038/sj.cdd.4401724.
39. N. Holler, R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.-L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, J. Tschopp, Fas triggers an alternative, caspase-8–independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. **1**, 489–495 (2000).
40. D.-W. Zhang, J. Shao, J. Lin, N. Zhang, B.-J. Lu, S.-C. Lin, M.-Q. Dong, J. Han, RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science*. **325**, 332–336 (2009).
41. H. Wang, L. Sun, L. Su, J. Rizo, L. Liu, L.-F. Wang, F.-S. Wang, X. Wang, Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell*. **54**, 133–146 (2014).

42. Y. K. Dhuriya, D. Sharma, Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation*. **15**, 199 (2018).
43. V. Sagulenko, S. J. Thygesen, D. P. Sester, A. Idris, J. A. Cridland, P. R. Vajjhala, T. L. Roberts, K. Schroder, J. E. Vince, J. M. Hill, J. Silke, K. J. Stacey, AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ*. **20**, 1149–1160 (2013).
44. T. Bergsbaken, S. L. Fink, B. T. Cookson, Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol*. **7**, 99–109 (2009).
45. F. Martinon, K. Burns, J. Tschopp, The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell*. **10**, 417–426 (2002).
46. T. Fernandes-Alnemri, J. Wu, J.-W. Yu, P. Datta, B. Miller, W. Jankowski, S. Rosenberg, J. Zhang, E. S. Alnemri, The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*. **14**, 1590–1604 (2007).
47. W.-W. Jiang, M. Zahurak, D. Goldenberg, Y. Milman, H. L. Park, W. H. Westra, W. Koch, D. Sidransky, J. Califano, Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *International Journal of Cancer*. **119**, 2673–2676 (2006).
48. N. Umetani, J. Kim, S. Hiramatsu, H. A. Reber, O. J. Hines, A. J. Bilchik, D. S. B. Hoon, Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin. Chem*. **52**, 1062–1069 (2006).
49. B. G. Wang, H.-Y. Huang, Y.-C. Chen, R. E. Bristow, K. Kassaei, C.-C. Cheng, R. Roden, L. J. Sokoll, D. W. Chan, I.-M. Shih, Increased Plasma DNA Integrity in Cancer Patients. *Cancer Res*. **63**, 3966–3968 (2003).
50. A. V. Lichtenstein, H. S. Melkonyan, L. D. Tomei, S. R. Umansky, Circulating Nucleic Acids and Apoptosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **945**, 239–249 (2001).
51. J.-J. Choi, C. F. Reich, D. S. Pisetsky, The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*. **115**, 55–62 (2005).
52. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. **303**, 1532–1535 (2004).
53. N. Branzk, V. Papayannopoulos, Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. **35**, 513–530 (2013).
54. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. **176**, 231–241 (2007).

55. B. G. Yipp, P. Kubes, NETosis: how vital is it? *Blood*. **122**, 2784–2794 (2013).
56. V. Papayannopoulos, Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology*. **18**, 134–147 (2018).
57. S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, H. U. Simon, Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death and Differentiation*. **16**, 1438–1444 (2009).
58. D. M. Boe, B. J. Curtis, M. M. Chen, J. A. Ippolito, E. J. Kovacs, Extracellular traps and macrophages: new roles for the versatile phagocyte. *Journal of Leukocyte Biology*. **97**, 1023–1035 (2015).
59. V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. **198**, 773–783 (2012).
60. J. Cools-Lartigue, J. Spicer, B. McDonald, S. Gowing, S. Chow, B. Giannias, F. Bourdeau, P. Kubes, L. Ferri, Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest*. **123**, 3446–3458 (2013).
61. L. Luo, S. Zhang, Y. Wang, M. Rahman, I. Syk, E. Zhang, H. Thorlacius, Proinflammatory role of neutrophil extracellular traps in abdominal sepsis. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. **307**, L586–L596 (2014).
62. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. *PNAS*. **107**, 15880–15885 (2010).
63. M. J. Kaplan, M. Radic, Neutrophil Extracellular Traps: Double-Edged Swords of Innate Immunity. *The Journal of Immunology*. **189**, 2689–2695 (2012).
64. T. Beiter, A. Fragasso, J. Hudemann, M. Schild, J. Steinacker, F. C. Mooren, A. M. Niess, Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *Journal of Applied Physiology*. **117**, 325–333 (2014).
65. F. Wartha, B. Henriques-Normark, ETosis: A Novel Cell Death Pathway. *Sci. Signal*. **1**, pe25–pe25 (2008).
66. S. Yousefi, J. A. Gold, N. Andina, J. J. Lee, A. M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G. J. Gleich, H.-U. Simon, Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature Medicine*. **14**, 949–953 (2008).
67. S. Yousefi, D. Simon, H.-U. Simon, Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. *Current Opinion in Immunology*. **24**, 736–739 (2012).
68. J. C. Rogers, D. Boldt, S. Kornfeld, S. A. Skinner, C. R. Valeri, Excretion of Deoxyribonucleic Acid by Lymphocytes Stimulated with Phytohemagglutinin or Antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **69**, 1685–1689 (1972).

69. P. Anker, M. Stroun, P. Maurice, Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer Res.* (1975).
70. D. H. Adams, P. B. Gahan, Stimulated and non-stimulated rat spleen cells release different DNA-complexes. *Differentiation.* **22**, 47–52 (1982).
71. D. H. Adams, A. A. McIntosh, Studies on the cytosolic DNA of chick embryo fibroblasts and its uptake by recipient cultured cells. *Int. J. Biochem.* **17**, 1041–1051 (1985).
72. D. H. Adams, A. A. McIntosh, The cytosol origin of macromolecules extruded by cultured chick embryo fibroblast cells. *Int. J. Biochem.* **16**, 721–726 (1984).
73. C. Challen, D. H. Adams, Further studies on the size and composition of the chick embryo fibroblast cytosolic DNA complex. *Int. J. Biochem.* **18**, 423–429 (1986).
74. M. Stroun, P. Anker, M. Beljanski, J. Henri, C. Lederrey, M. Ojha, P. A. Maurice, Presence of RNA in the nucleoprotein complex spontaneously released by human lymphocytes and frog auricles in culture. *Cancer Res.* **38**, 3546–3554 (1978).
75. P. B. Gahan, M. Stroun, The virtosome—a novel cytosolic informative entity and intercellular messenger. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 529–538 (2010).
76. S. R. Pelc, Turnover of DNA and function. *Nature.* **219**, 162–163 (1968).
77. P. B. Gahan, P. Anker, M. Stroun, Metabolic DNA as the origin of spontaneously released DNA? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137**, 7–17 (2008).
78. P. Anker, D. Jachertz, M. Stroun, R. Brögger, C. Lederrey, J. Henri, P. A. Maurice, The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response. *J. Immunogenet.* **7**, 475–481 (1980).
79. P. Anker, J. Lyautey, F. Lefort, C. Lederrey, M. Stroun, [Transformation of NIH/3T3 cells and SW 480 cells displaying K-ras mutation]. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie.* **317**, 869–874 (1994).
80. A. J. Bronkhorst, J. F. Wentzel, J. Aucamp, E. van Dyk, L. du Plessis, P. J. Pretorius, Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* **1863**, 157–165 (2016).
81. E. van der Pol, A. N. Boing, P. Harrison, A. Sturk, R. Nieuwland, Classification, Functions, and Clinical Relevance of Extracellular Vesicles. *Pharmacological Reviews.* **64**, 676–705 (2012).
82. B. L. Deatherage, B. T. Cookson, Membrane Vesicle Release in Bacteria, Eukaryotes, and Archaea: a Conserved yet Underappreciated Aspect of Microbial Life. *Infection and Immunity.* **80**, 1948–1957 (2012).
83. G. van Niel, G. D'Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **19**, 213 (2018).



84. B. György, T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E. I. Buzás, Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2667–2688 (2011).
85. D. Turpin, M.-E. Truchetet, B. Faustin, J.-F. Augusto, C. Contin-Bordes, A. Brisson, P. Blanco, P. Duffau, Role of extracellular vesicles in autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews.* **15**, 174–183 (2016).
86. A. Latifkar, Y. H. Hur, J. C. Sanchez, R. A. Cerione, M. A. Antonyak, New insights into extracellular vesicle biogenesis and function. *Journal of Cell Science.* **132**, jcs222406 (2019).
87. S. L. N. Maas, X. O. Breakefield, A. M. Weaver, Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* **27**, 172–188 (2017).
88. M. Mathieu, L. Martin-Jaular, G. Lavieu, C. Théry, Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nat. Cell Biol.* **21**, 9–17 (2019).
89. M. Yáñez-Mó, P. R.-M. Siljander, Z. Andreu, A. B. Zavec, F. E. Borràs, E. I. Buzas, K. Buzas, E. Casal, F. Cappello, J. Carvalho, E. Colás, A. Cordeiro-da Silva, S. Fais, J. M. Falcon-Perez, I. M. Ghobrial, B. Giesel, M. Gimona, M. Graner, I. Gursel, M. Gursel, N. H. H. Heegaard, A. Hendrix, P. Kierulf, K. Kokubun, M. Kosanovic, V. Kralj-Iglic, E.-M. Krämer-Albers, S. Laitinen, C. Lässer, T. Lener, E. Ligeti, A. Linē, G. Lipps, A. Llorente, J. Lötvall, M. Manček-Keber, A. Marcilla, M. Mittelbrunn, I. Nazarenko, E. N. M. Nolte-'t Hoen, T. A. Nyman, L. O'Driscoll, M. Olivan, C. Oliveira, É. Pállinger, H. A. Del Portillo, J. Reventós, M. Rigau, E. Rohde, M. Sammar, F. Sánchez-Madrid, N. Santarém, K. Schallmoser, M. S. Ostensfeld, W. Stoorvogel, R. Stukelj, S. G. Van der Grein, M. H. Vasconcelos, M. H. M. Wauben, O. De Wever, Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles.* **4**, 27066 (2015).
90. A. Piccin, W. G. Murphy, O. P. Smith, Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Reviews.* **21**, 157–171 (2007).
91. F. Ender, N. V. Bubnoff, F. Gieseler, Extracellular Vesicles: Subcellular Organelles With the Potential to Spread Cancer Resistance. *Anticancer Res.* **39**, 3395–3404 (2019).
92. J. Skog, T. Würdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, W. T. C. Jr, B. S. Carter, A. M. Krichevsky, X. O. Breakefield, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology.* **10**, 1470–1476 (2008).
93. M. Osaki, F. Okada, Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Yonago Acta Medica.* **62**, 182–190 (2019).
94. S. A. Bellingham, B. B. Guo, B. M. Coleman, A. F. Hill, Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front Physiol.* **3**, 124 (2012).

95. M. Mack, A. Kleinschmidt, H. Brühl, C. Klier, P. J. Nelson, J. Cihak, J. Plachý, M. Stangassinger, V. Erfle, D. Schlöndorff, Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. Med.* **6**, 769–775 (2000).
96. J. I. Zwicker, Predictive value of tissue factor bearing microparticles in cancer associated thrombosis. *Thrombosis Research.* **125**, S89–S91 (2010).
97. F. a. W. Coumans, C. J. M. Doggen, G. Attard, J. S. de Bono, L. W. M. M. Terstappen, All circulating EpCAM+CK+CD45- objects predict overall survival in castration-resistant prostate cancer. *Ann. Oncol.* **21**, 1851–1857 (2010).
98. M. Nawaz, G. Camussi, H. Valadi, I. Nazarenko, K. Ekström, X. Wang, S. Principe, N. Shah, N. M. Ashraf, F. Fatima, L. Neder, T. Kislinger, The emerging role of extracellular vesicles as biomarkers for urogenital cancers. *Nat Rev Urol.* **11**, 688–701 (2014).
99. S. A. Melo, L. B. Luecke, C. Kahlert, A. F. Fernandez, S. T. Gammon, J. Kaye, V. S. LeBleu, E. A. Mittendorf, J. Weitz, N. Rahbari, C. Reissfelder, C. Pilarsky, M. F. Fraga, D. Piwnica-Worms, R. Kalluri, Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature.* **523**, 177–182 (2015).
100. L. Console, M. Scalise, C. Indiveri, Exosomes in inflammation and role as biomarkers. *Clinica Chimica Acta.* **488**, 165–171 (2019).
101. S. EL Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, M. J. A. Wood, Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery.* **12**, 347–357 (2013).
102. B. György, M. E. Hung, X. O. Breakefield, J. N. Leonard, Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* **55**, 439–464 (2015).
103. X. Zhuang, X. Xiang, W. Grizzle, D. Sun, S. Zhang, R. C. Axtell, S. Ju, J. Mu, L. Zhang, L. Steinman, D. Miller, H.-G. Zhang, Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol. Ther.* **19**, 1769–1779 (2011).
104. F. A. W. Coumans, A. R. Brisson, E. I. Buzas, F. Dignat-George, E. E. E. Drees, S. EL Andaloussi, C. Emanuelli, A. Gasecka, A. Hendrix, A. F. Hill, R. Lacroix, Y. Lee, T. G. van Leeuwen, N. Mackman, I. Mäger, J. P. Nolan, E. van der Pol, D. M. Pegtel, S. Sahoo, P. R. M. Siljander, G. Sturk, O. de Wever, R. Nieuwland, Methodological Guidelines to Study Extracellular Vesicles. *Circulation Research.* **120**, 1632–1648 (2017).
105. D. E. Murphy, O. G. de Jong, M. Brouwer, M. J. Wood, G. Lavieu, R. M. Schiffelers, P. Vader, Extracellular vesicle-based therapeutics: natural versus engineered targeting and trafficking. *Exp. Mol. Med.* **51**, 32 (2019).
106. C. Théry, M. Ostrowski, E. Segura, Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology.* **9**, 581–593 (2009).

107. L. Margolis, Y. Sadovsky, The biology of extracellular vesicles: The known unknowns. *PLOS Biology*. **17**, e3000363 (2019).
108. J. Lötvall, A. F. Hill, F. Hochberg, E. I. Buzás, D. Di Vizio, C. Gardiner, Y. S. Gho, I. V. Kurochkin, S. Mathivanan, P. Quesenberry, S. Sahoo, H. Tahara, M. H. Wauben, K. W. Witwer, C. Théry, Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. **3**, 26913 (2014).
109. E. G. Trams, C. J. Lauter, Jr. Norman Salem, U. Heine, Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. **645**, 63–70 (1981).
110. C. Harding, J. Heuser, P. Stahl, Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
111. B. T. Pan, K. Teng, C. Wu, M. Adam, R. M. Johnstone, Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 942–948 (1985).
112. Tkach Mercedes, Kowal Joanna, Théry Clotilde, Why the need and how to approach the functional diversity of extracellular vesicles. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **373**, 20160479 (2018).
113. P. Wolf, The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* **13**, 269–88 (1967).
114. V. R. Minciocchi, M. R. Freeman, D. Di Vizio, Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. **40**, 41–51 (2015).
115. D. K. Jeppesen, A. M. Fenix, J. L. Franklin, J. N. Higginbotham, Q. Zhang, L. J. Zimmerman, D. C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W. H. Fissell, J. G. Patton, L. H. Rome, D. T. Burnette, R. J. Coffey, Reassessment of Exosome Composition. *Cell*. **177**, 428-445.e18 (2019).
116. E. Willms, C. Cabañas, I. Mäger, M. J. A. Wood, P. Vader, Extracellular Vesicle Heterogeneity: Subpopulations, Isolation Techniques, and Diverse Functions in Cancer Progression. *Front. Immunol.* **9** (2018), doi:10.3389/fimmu.2018.00738.
117. G. Raposo, W. Stoorvogel, Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* **200**, 373–383 (2013).
118. C. Théry, K. W. Witwer, E. Aikawa, M. J. Alcaraz, J. D. Anderson, R. Andriantsitohaina, A. Antoniou, T. Arab, F. Archer, G. K. Atkin-Smith, D. C. Ayre, J.-M. Bach, D. Bachurski, H. Baharvand, L. Balaj, S. Baldacchino, N. N. Bauer, A. A. Baxter, M. Bebawy, C. Beckham, A. Bedina Zavec, A. Benmoussa, A. C. Berardi, P. Bergese, E. Bielska, C. Blenkiron, S. Bobis-Wozowicz, E. Boilard, W. Boireau, A. Bongiovanni, F. E. Borràs, S. Bosch, C. M. Boulanger, X. Breakefield, A. M. Breglio, M. A. Brennan, D. R. Brigstock, A. Brisson, M. L. Broekman, J. F. Bromberg, P. Bryl-Górecka, S. Buch, A. H. Buck, D. Burger, S. Busatto, D. Buschmann, B. Bussolati, E.

I. Buzás, J. B. Byrd, G. Camussi, D. R. Carter, S. Caruso, L. W. Chamley, Y.-T. Chang, C. Chen, S. Chen, L. Cheng, A. R. Chin, A. Clayton, S. P. Clerici, A. Cocks, E. Cocucci, R. J. Coffey, A. Cordeiro-da-Silva, Y. Couch, F. A. Coumans, B. Coyle, R. Crescitelli, M. F. Criado, C. D'Souza-Schorey, S. Das, A. Datta Chaudhuri, P. de Candia, E. F. De Santana, O. De Wever, H. A. Del Portillo, T. Demaret, S. Deville, A. Devitt, B. Dhondt, D. Di Vizio, L. C. Dieterich, V. Dolo, A. P. Dominguez Rubio, M. Dominici, M. R. Dourado, T. A. Driedonks, F. V. Duarte, H. M. Duncan, R. M. Eichenberger, K. Ekström, S. El Andaloussi, C. Elie-Caille, U. Erdbrügger, J. M. Falcón-Pérez, F. Fatima, J. E. Fish, M. Flores-Bellver, A. Försönits, A. Frelet-Barrand, F. Fricke, G. Fuhrmann, S. Gabrielsson, A. Gámez-Valero, C. Gardiner, K. Gärtner, R. Gaudin, Y. S. Gho, B. Giebel, C. Gilbert, M. Gimona, I. Giusti, D. C. Goberdhan, A. Görgens, S. M. Gorski, D. W. Greening, J. C. Gross, A. Gualerzi, G. N. Gupta, D. Gustafson, A. Handberg, R. A. Haraszti, P. Harrison, H. Hegyesi, A. Hendrix, A. F. Hill, F. H. Hochberg, K. F. Hoffmann, B. Holder, H. Holthofer, B. Hosseinkhani, G. Hu, Y. Huang, V. Huber, S. Hunt, A. G.-E. Ibrahim, T. Ikezu, J. M. Inal, M. Isin, A. Ivanova, H. K. Jackson, S. Jacobsen, S. M. Jay, M. Jayachandran, G. Jenster, L. Jiang, S. M. Johnson, J. C. Jones, A. Jong, T. Jovanovic-Talisman, S. Jung, R. Kalluri, S.-I. Kano, S. Kaur, Y. Kawamura, E. T. Keller, D. Khamari, E. Khomyakova, A. Khvorova, P. Kierulf, K. P. Kim, T. Kislinger, M. Klingeborn, D. J. Klinke, M. Kornek, M. M. Kosanović, Á. F. Kovács, E.-M. Krämer-Albers, S. Krasemann, M. Krause, I. V. Kurochkin, G. D. Kusuma, S. Kuypers, S. Laitinen, S. M. Langevin, L. R. Languino, J. Lannigan, C. Lässer, L. C. Laurent, G. Lavieu, E. Lázaro-Ibáñez, S. Le Lay, M.-S. Lee, Y. X. F. Lee, D. S. Lemos, M. Lenassi, A. Leszczynska, I. T. Li, K. Liao, S. F. Libregts, E. Ligeti, R. Lim, S. K. Lim, A. Linē, K. Linnemannstöns, A. Llorente, C. A. Lombard, M. J. Lorenowicz, Á. M. Lörincz, J. Lötvall, J. Lovett, M. C. Lowry, X. Loyer, Q. Lu, B. Lukomska, T. R. Lunavat, S. L. Maas, H. Malhi, A. Marcilla, J. Mariani, J. Mariscal, E. S. Martens-Uzunova, L. Martin-Jaular, M. C. Martinez, V. R. Martins, M. Mathieu, S. Mathivanan, M. Maugeri, L. K. McGinnis, M. J. McVey, D. G. Meckes, K. L. Meehan, I. Mertens, V. R. Minciocchi, A. Möller, M. Møller Jørgensen, A. Morales-Kastresana, J. Morhayim, F. Mullier, M. Muraca, L. Musante, V. Mussack, D. C. Muth, K. H. Myburgh, T. Najrana, M. Nawaz, I. Nazarenko, P. Nejsum, C. Neri, T. Neri, R. Nieuwland, L. Nimrichter, J. P. Nolan, E. N. Nolte-'t Hoen, N. Noren Hooten, L. O'Driscoll, T. O'Grady, A. O'Loghlen, T. Ochiya, M. Olivier, A. Ortiz, L. A. Ortiz, X. Osteikoetxea, O. Østergaard, M. Ostrowski, J. Park, D. M. Pegtel, H. Peinado, F. Perut, M. W. Pfaffl, D. G. Phinney, B. C. Pieters, R. C. Pink, D. S. Pisetsky, E. Pogge von Strandmann, I. Polakovicova, I. K. Poon, B. H. Powell, I. Prada, L. Pulliam, P. Quesenberry, A. Radeghieri, R. L. Raffai, S. Raimondo, J. Rak, M. I. Ramirez, G. Raposo, M. S. Rayyan, N. Regev-Rudzki, F. L. Ricklefs, P. D. Robbins, D. D. Roberts, S. C. Rodrigues, E. Rohde, S. Rome, K. M. Rouschop, A. Rughetti, A. E. Russell, P. Saá, S. Sahoo, E. Salas-Huenuleo, C. Sánchez, J. A. Saugstad, M. J. Saul, R. M. Schiffelers, R. Schneider, T. H. Schøyen, A. Scott, E. Shahaj, S. Sharma, O. Shatnyeva, F. Shekari, G. V. Shelke, A. K. Shetty, K. Shiba, P. R.-M. Siljander, A. M. Silva, A. Skowronek, O. L. Snyder, R. P. Soares, B. W. Sódar, C. Soekmadji, J. Sotillo, P. D. Stahl, W. Stoorvogel, S. L. Stott, E. F. Strasser, S. Swift, H. Tahara, M. Tewari, K. Timms, S. Tiwari, R. Tixeira, M. Tkach, W. S. Toh, R. Tomasini, A. C. Torrecilhas, J. P. Tosar, V. Toxavidis, L. Urbanelli, P. Vader, B. W. van Balkom, S. G. van der Grein, J. Van Deun, M. J. van Herwijnen, K. Van Keuren-Jensen, G. van Niel, M. E. van Royen, A. J. van Wijnen, M. H. Vasconcelos, I. J. Vechetti, T. D. Veit, L. J. Vella, É. Velot, F. J. Verweij, B. Vestad, J. L. Viñas, T. Visnovitz, K. V. Vukman, J. Wahlgren, D. C. Watson, M. H. Wauben, A. Weaver, J. P.

- Webber, V. Weber, A. M. Wehman, D. J. Weiss, J. A. Welsh, S. Wendt, A. M. Wheelock, Z. Wiener, L. Witte, J. Wolfram, A. Xagorari, P. Xander, J. Xu, X. Yan, M. Yáñez-Mó, H. Yin, Y. Yuana, V. Zappulli, J. Zarubova, V. Žekas, J.-Y. Zhang, Z. Zhao, L. Zheng, A. R. Zheutlin, A. M. Zickler, P. Zimmermann, A. M. Zivkovic, D. Zocco, E. K. Zuba-Surma, Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. **7**, 1535750 (2018).
119. M. P. Zaborowski, L. Balaj, X. O. Breakefield, C. P. Lai, Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *BioScience*. **65**, 783–797 (2015).
  120. T. Vagner, C. Spinelli, V. R. Minciocchi, L. Balaj, M. Zandian, A. Conley, A. Zijlstra, M. R. Freeman, F. Demichelis, S. De, E. M. Posadas, H. Tanaka, D. D. Vizio, Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. *Journal of Extracellular Vesicles*. **7**, 1505403 (2018).
  121. L. Balaj, R. Lessard, L. Dai, Y.-J. Cho, S. L. Pomeroy, X. O. Breakefield, J. Skog, Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*. **2**, 180 (2011).
  122. B. K. Thakur, H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, Y. Zheng, A. Hoshino, H. Brazier, J. Xiang, C. Williams, R. Rodriguez-Barrueco, J. M. Silva, W. Zhang, S. Hearn, O. Elemento, N. Paknejad, K. Manova-Todorova, K. Welte, J. Bromberg, H. Peinado, D. Lyden, Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell Research*. **24**, 766–769 (2014).
  123. E. Lázaro-Ibáñez, A. Sanz-García, T. Visakorpi, C. Escobedo-Lucea, P. Siljander, A. Ayuso-Sacido, M. Yliperttula, Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate*. **74**, 1379–1390 (2014).
  124. T. H. Lee, S. Chennakrishnaiah, E. Audemard, L. Montermini, B. Meehan, J. Rak, Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **451**, 295–301 (2014).
  125. C. Kahlert, S. A. Melo, A. Protopopov, J. Tang, S. Seth, M. Koch, J. Zhang, J. Weitz, L. Chin, A. Futreal, R. Kalluri, Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *J Biol Chem*. **289**, 3869–3875 (2014).
  126. M. Guescini, S. Genedani, V. Stocchi, L. F. Agnati, Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm*. **117**, 1 (2009).
  127. A. Németh, N. Orgovan, B. W. Sódar, X. Osteikoetxea, K. Pálóczi, K. É. Szabó-Taylor, K. V. Vukman, Á. Kittel, L. Turiák, Z. Wiener, S. Tóth, L. Drahos, K. Vékey, R. Horvath, E. I. Buzás, Antibiotic-induced release of small extracellular vesicles (exosomes) with surface-associated DNA. *Scientific Reports*. **7**, 8202 (2017).



128. P. Sansone, C. Savini, I. Kurelac, Q. Chang, L. B. Amato, A. Strillacci, A. Stepanova, L. Iommarini, C. Mastroleo, L. Daly, A. Galkin, B. K. Thakur, N. Soplop, K. Uryu, A. Hoshino, L. Norton, M. Bonafé, M. Cricca, G. Gasparre, D. Lyden, J. Bromberg, Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer. *PNAS*. **114**, E9066–E9075 (2017).
129. J. Cai, W. Guan, X. Tan, C. Chen, L. Li, N. Wang, X. Zou, F. Zhou, J. Wang, F. Pei, X. Chen, H. Luo, X. Wang, D. He, L. Zhou, P. A. Jose, C. Zeng, SRY gene transferred by extracellular vesicles accelerates atherosclerosis by promotion of leucocyte adherence to endothelial cells. *Clinical Science*. **129**, 259–269 (2015).
130. A. Waldenström, N. Gennebäck, U. Hellman, G. Ronquist, Cardiomyocyte Microvesicles Contain DNA/RNA and Convey Biological Messages to Target Cells. *PLOS ONE*. **7**, e34653 (2012).
131. S. Fischer, K. Cornils, T. Speiseder, A. Badbaran, R. Reimer, D. Indenbirken, A. Grundhoff, B. Brunswig-Spickenheier, M. Alawi, C. Lange, Indication of Horizontal DNA Gene Transfer by Extracellular Vesicles. *PLOS ONE*. **11**, e0163665 (2016).
132. G. V. Shelke, S. C. Jang, Y. Yin, C. Lässer, J. Lötvall, Human mast cells release extracellular vesicle-associated DNA. *Matters*. **2**, e201602000034 (2016).
133. A. Takahashi, R. Okada, K. Nagao, Y. Kawamata, A. Hanyu, S. Yoshimoto, M. Takasugi, S. Watanabe, M. T. Kanemaki, C. Obuse, E. Hara, Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nature Communications*. **8**, 15287 (2017).
134. E. Dzierzak, S. Philipsen, Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **3**, a011601–a011601 (2013).
135. A. R. Migliaccio, Erythroblast enucleation. *Haematologica*. **95**, 1985–1988 (2010).
136. M. Moras, S. D. Lefevre, M. A. Ostuni, From Erythroblasts to Mature Red Blood Cells: Organelle Clearance in Mammals. *Frontiers in Physiology*. **8** (2017), doi:10.3389/fphys.2017.01076.
137. K. E. McGrath, Red cell island dances: switching hands. *Blood*. **123**, 3847–3848 (2014).
138. A. E. Geddis, Megakaryopoiesis. *Seminars in Hematology*. **47**, 212–219 (2010).
139. K. Tozawa, Y. Ono-Uruga, Y. Matsubara, K. Tozawa, Y. Ono-Uruga, Y. Matsubara, Megakaryopoiesis. *Clin Exp Thromb Hemost*. **1**, 54–58 (2014).
140. J. E. Italiano, P. Lecine, R. A. Shivdasani, J. H. Hartwig, Blood Platelets Are Assembled Principally at the Ends of Proplatelet Processes Produced by Differentiated Megakaryocytes. *J Cell Biol*. **147**, 1299–1312 (1999).
141. X. Sim, M. Poncz, P. Gadue, D. L. French, Understanding platelet generation from megakaryocytes: implications for in vitro–derived platelets. *Blood*. **127**, 1227–1233 (2016).

142. L. Raptis, H. A. Menard, Quantitation and characterization of plasma DNA in normals and patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* **66**, 1391–1399 (1980).
143. Y. M. Lo, L. Y. Chan, K. W. Lo, S. F. Leung, J. Zhang, A. T. Chan, J. C. Lee, N. M. Hjelm, P. J. Johnson, D. P. Huang, Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* **59**, 1188–1191 (1999).
144. H. J. Yang, V. W. S. Liu, P. C. K. Tsang, A. M. W. Yip, K. F. Tam, L. C. Wong, T. Y. Ng, H. Y. S. Ngan, Quantification of human papillomavirus DNA in the plasma of patients with cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* **14**, 903–910 (2004).
145. D. Wichmann, M. Panning, T. Quack, S. Kramme, G.-D. Burchard, C. Grevelding, C. Drosten, Diagnosing Schistosomiasis by Detection of Cell-Free Parasite DNA in Human Plasma. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* **3**, e422 (2009).
146. S. Spisák, N. Solymosi, P. Itzész, A. Bodor, D. Kondor, G. Vattay, B. K. Barták, F. Sipos, O. Galamb, Z. Tulassay, Z. Szállási, S. Rasmussen, T. Sicheritz-Ponten, S. Brunak, B. Molnár, I. Csabai, Complete Genes May Pass from Food to Human Blood. *PLOS ONE.* **8**, e69805 (2013).
147. Y. Y. N. Lui, K.-W. Chik, R. W. K. Chiu, C.-Y. Ho, C. W. K. Lam, Y. M. D. Lo, Predominant Hematopoietic Origin of Cell-free DNA in Plasma and Serum after Sex-mismatched Bone Marrow Transplantation. *Clinical Chemistry.* **48**, 421–427 (2002).
148. S. Tug, S. Helmig, E. R. Deichmann, A. Schmeier-Jürchott, E. Wagner, T. Zimmermann, M. Radsak, M. Giacca, P. Simon, Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exerc Immunol Rev.* **21**, 164–173 (2015).
149. Y. Dor, H. Cedar, Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet.* **392**, 777–786 (2018).
150. A. F. Fernandez, Y. Assenov, J. I. Martin-Subero, B. Balint, R. Siebert, H. Taniguchi, H. Yamamoto, M. Hidalgo, A.-C. Tan, O. Galm, I. Ferrer, M. Sanchez-Cespedes, A. Villanueva, J. Carmona, J. V. Sanchez-Mut, M. Berdasco, V. Moreno, G. Capella, D. Monk, E. Ballestar, S. Ropero, R. Martinez, M. Sanchez-Carbayo, F. Prosper, X. Agirre, M. F. Fraga, O. Graña, L. Perez-Jurado, J. Mora, S. Puig, J. Prat, L. Badimon, A. A. Puca, S. J. Meltzer, T. Lengauer, J. Bridgewater, C. Bock, M. Esteller, A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res.* **22**, 407–419 (2012).
151. A. Kundaje, J. Ernst, M. Bilenky, A. Yen, A. Heravi-Moussavi, P. Kheradpour, Z. Zhang, J. Wang, M. J. Ziller, V. Amin, J. W. Whitaker, M. D. Schultz, L. D. Ward, A. Sarkar, G. Quon, R. S. Sandstrom, M. L. Eaton, Y.-C. Wu, A. R. Pfenning, X. Wang, M. Claussnitzer, Yaping Liu, C. Coarfa, R. Alan Harris, N. Shores, C. B. Epstein, E. Gjoneska, D. Leung, W. Xie, R. David Hawkins, R. Lister, C. Hong, P. Gascard, A. J. Mungall, R. Moore, E. Chuah, A. Tam, T. K. Canfield, R. Scott Hansen, R. Kaul, P. J. Sabo, M. S. Bansal, A. Carles, J. R. Dixon, K.-H. Farh, S. Feizi, R. Karlic, A.-R. Kim, A. Kulkarni, D. Li, R. Lowdon, G. Elliott, T. R. Mercer, S. J. Neph, V. Onuchic, P. Polak, N. Rajagopal, P. Ray, R. C. Sallari, K. T. Siebenthal, N. A. Sinnott-Armstrong, M. Stevens, R. E. Thurman, J. Wu, B. Zhang, X. Zhou, A. E. Beaudet, L. A. Boyer, P.

- L. D. Jager, P. J. Farnham, S. J. Fisher, D. Haussler, S. J. M. Jones, W. Li, M. A. Marra, M. T. McManus, S. Sunyaev, J. A. Thomson, T. D. Tlsty, L.-H. Tsai, W. Wang, R. A. Waterland, M. Q. Zhang, L. H. Chadwick, B. E. Bernstein, J. F. Costello, J. R. Ecker, M. Hirst, A. Meissner, A. Milosavljevic, B. Ren, J. A. Stamatoyannopoulos, T. Wang, M. Kellis, Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*. **518**, 317–330 (2015).
152. S. Moran, A. Martínez-Cardús, S. Sayols, E. Musulén, C. Balañá, A. Estival-Gonzalez, C. Moutinho, H. Heyn, A. Diaz-Lagares, M. C. de Moura, G. M. Stella, P. M. Comoglio, M. Ruiz-Miró, X. Matias-Guiu, R. Pazo-Cid, A. Antón, R. Lopez-Lopez, G. Soler, F. Longo, I. Guerra, S. Fernandez, Y. Assenov, C. Plass, R. Morales, J. Carles, D. Bowtell, L. Mileskin, D. Sia, R. Tothill, J. Taberero, J. M. Llovet, M. Esteller, Epigenetic profiling to classify cancer of unknown primary: a multicentre, retrospective analysis. *Lancet Oncol.* **17**, 1386–1395 (2016).
153. S. Guo, D. Diep, N. Plongthongkum, H.-L. Fung, K. Zhang, K. Zhang, Identification of methylation haplotype blocks aids in deconvolution of heterogeneous tissue samples and tumor tissue-of-origin mapping from plasma DNA. *Nature Genetics*. **49**, 635 (2017).
154. W. Tang, S. Wan, Z. Yang, A. E. Teschendorff, Q. Zou, Tumor origin detection with tissue-specific miRNA and DNA methylation markers. *Bioinformatics*. **34**, 398–406 (2018).
155. K. Sun, P. Jiang, K. C. A. Chan, J. Wong, Y. K. Y. Cheng, R. H. S. Liang, W. Chan, E. S. K. Ma, S. L. Chan, S. H. Cheng, R. W. Y. Chan, Y. K. Tong, S. S. M. Ng, R. S. M. Wong, D. S. C. Hui, T. N. Leung, T. Y. Leung, P. B. S. Lai, R. W. K. Chiu, Y. M. D. Lo, Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *PNAS*. **112**, E5503–E5512 (2015).
156. J. Moss, J. Magenheimer, D. Neiman, H. Zemmour, N. Loyfer, A. Korach, Y. Samet, M. Maoz, H. Druid, P. Arner, K.-Y. Fu, E. Kiss, K. L. Spalding, G. Landesberg, A. Zick, A. Grinshpun, A. M. J. Shapiro, M. Grompe, A. D. Wittenberg, B. Glaser, R. Shemer, T. Kaplan, Y. Dor, Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nature Communications*. **9** (2018), doi:10.1038/s41467-018-07466-6.
157. M. W. Snyder, M. Kircher, A. J. Hill, R. M. Daza, J. Shendure, Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. **164**, 57–68 (2016).
158. R. Lehmann-Werman, D. Neiman, H. Zemmour, J. Moss, J. Magenheimer, A. Vaknin-Dembinsky, S. Rubertsson, B. Nellgård, K. Blennow, H. Zetterberg, K. Spalding, M. J. Haller, C. H. Wasserfall, D. A. Schatz, C. J. Greenbaum, C. Dorrell, M. Grompe, A. Zick, A. Hubert, M. Maoz, V. Fendrich, D. K. Bartsch, T. Golan, S. A. B. Sasson, G. Zamir, A. Razin, H. Cedar, A. M. J. Shapiro, B. Glaser, R. Shemer, Y. Dor, Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *PNAS*. **113**, E1826–E1834 (2016).

159. S. Holdenrieder, P. Stieber, H. Bodenmüller, M. Busch, J. Pawel, A. Schalhorn, D. Nagel, D. Seidel, Circulating Nucleosomes in Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **945**, 93–102 (2006).
160. H. R. Underhill, J. O. Kitzman, S. Hellwig, N. C. Welker, R. Daza, D. N. Baker, K. M. Gligorich, R. C. Rostomily, M. P. Bronner, J. Shendure, Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLOS Genetics*. **12**, e1006162 (2016).
161. V. V. Vlassov, P. P. Laktionov, E. Y. Rykova, Extracellular nucleic acids. *BioEssays*. **29**, 654–667 (2007).
162. F. Mouliere, S. El Messaoudi, D. Pang, A. Dritschilo, A. R. Thierry, Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Molecular Oncology*. **8**, 927–941 (2014).
163. F. Mouliere, B. Robert, E. Arnau Peyrotte, M. Del Rio, M. Ychou, F. Molina, C. Gongora, A. R. Thierry, High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS ONE*. **6**, e23418 (2011).
164. K. C. A. Chan, Size Distributions of Maternal and Fetal DNA in Maternal Plasma. *Clinical Chemistry*. **50**, 88–92 (2004).
165. G. Leszinski, J. Lehner, U. Gezer, S. Holdenrieder, Increased DNA integrity in colorectal cancer. *In Vivo*. **28**, 299–303 (2014).
166. S. Holdenrieder, A. Burges, O. Reich, F. W. Spelsberg, P. Stieber, DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1137**, 162–170 (2008).
167. C. Sanchez, M. W. Snyder, R. Tanos, J. Shendure, A. R. Thierry, New insights into structural features and optimal detection of circulating tumor DNA determined by single-strand DNA analysis. *npj Genomic Medicine*. **3**, 31 (2018).
168. Y. Liu, A new perspective on Darwin's Pangenesis. *Biological Reviews*. **83**, 141–149 (2008).
169. M. Stroun, C. C. Mathon, J. Stroun, Alteration of hereditary traits in *Solanum melongena* induced by grafts with *Solanum nigrum*. *Proceedings of the 11th International Congress of Genetics (la Haye)*. **1**, 218 (1963).
170. M. Stroun, C. Mathon, J. Stroun, Modifications transmitted to the offspring, provoked by heterograft in *Solanum melongena*. *Archives des Sciences*. **16**, 225–245 (1963).
171. P. B. Gahan, M. Stroun, in *Extracellular Nucleic Acids*, Y. Kikuchi, E. Y. Rykova, Eds. (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010; [https://doi.org/10.1007/978-3-642-12617-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-12617-8_10)), *Nucleic Acids and Molecular Biology*, pp. 167–189.
172. E. H. Szybalska, W. Szybalski, Genetics of human cress line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **48**, 2026–2034 (1962).

173. S. M. Gartler, O. R. Pavlovskis, Demonstration of cellular uptake of polymerized DNA in mammalian cell cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **3**, 127–131 (1960).
174. I. Mitra, N. K. Khare, G. V. Raghuram, R. Chaubal, F. Khambatti, D. Gupta, A. Gaikwad, P. Prasannan, A. Singh, A. Iyer, A. Singh, P. Upadhyay, N. K. Nair, P. K. Mishra, A. Dutt, Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J. Biosci.* **40**, 91–111 (2015).
175. I. Mitra, K. Pal, N. Pancholi, A. Shaikh, B. Rane, P. Tidke, S. Kirolkar, N. K. Khare, K. Agrawal, H. Nagare, N. K. Nair, Prevention of chemotherapy toxicity by agents that neutralize or degrade cell-free chromatin. *Ann. Oncol.* **28**, 2119–2127 (2017).
176. P. Anker, D. Jachertz, M. Stroun, R. Brögger, C. Lederrey, P. A. Maurice, [Transfer of genetic information from T to B human lymphocytes during an immune response to herpes simplex virus]. *C. R. Acad. Sci., D, Sci. Nat.* **289**, 217–220 (1979).
177. P. Anker, D. Jachertz, P. A. Maurice, M. Stroun, Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell Biochem. Funct.* **2**, 33–37 (1984).
178. D. C. García-Olmo, C. Domínguez, M. García-Arranz, P. Anker, M. Stroun, J. M. García-Verdugo, D. García-Olmo, Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer Res.* **70**, 560–567 (2010).
179. D. Osti, M. D. Bene, G. Rappa, M. Santos, V. Matafora, C. Richichi, S. Faletti, G. V. Beznoussenko, A. Mironov, A. Bachi, L. Fornasari, D. Bongetta, P. Gaetani, F. DiMeco, A. Lorico, G. Pelicci, Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res.* **25**, 266–276 (2019).
180. L. Han, E. W.-F. Lam, Y. Sun, Extracellular vesicles in the tumor microenvironment: old stories, but new tales. *Molecular Cancer.* **18**, 59 (2019).
181. M. Demers, S. L. Wong, K. Martinod, M. Gallant, J. E. Cabral, Y. Wang, D. D. Wagner, Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology.* **5**, e1134073 (2016).
182. A.-K. Olsson, J. Cedervall, NETosis in Cancer - Platelet-Neutrophil Crosstalk Promotes Tumor-Associated Pathology. *Front Immunol.* **7**, 373 (2016).
183. J. Park, R. W. Wysocki, Z. Amoozgar, L. Maiorino, M. R. Fein, J. Jorns, A. F. Schott, Y. Kinugasa-Katayama, Y. Lee, N. H. Won, E. S. Nakasone, S. A. Hearn, V. Küttner, J. Qiu, A. S. Almeida, N. Perurena, K. Kessenbrock, M. S. Goldberg, M. Egeblad, Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med.* **8**, 361ra138 (2016).
184. J. Albregues, M. A. Shields, D. Ng, C. G. Park, A. Ambrico, M. E. Poindexter, P. Upadhyay, D. L. Uyeminami, A. Pommier, V. Küttner, E. Bružas, L. Maiorino, C. Bautista, E. M. Carmona, P. A. Gimotty, D. T. Fearon, K. Chang, S. K. Lyons, K. E. Pinkerton, L. C. Trotman, M. S. Goldberg, J. T.-H. Yeh, M. Egeblad, Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science.* **361** (2018), doi:10.1126/science.aao4227.



185. L. Erpenbeck, M. P. Schön, Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*. **36**, 2483–2490 (2017).
186. A. West, Mitochondrial dysfunction as a trigger of innate immune responses and inflammation. *Toxicology*. **391**, 54–63 (2017).
187. C. A. Janeway, R. Medzhitov, Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*. **20**, 197–216 (2002).
188. O. Takeuchi, S. Akira, Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. **140**, 805–820 (2010).
189. A. P. West, A. A. Koblansky, S. Ghosh, Recognition and Signaling by Toll-Like Receptors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **22**, 409–437 (2006).
190. D. Goubau, S. Deddouche, C. Reis e Sousa, Cytosolic Sensing of Viruses. *Immunity*. **38**, 855–869 (2013).
191. L. Schaefer, Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *J. Biol. Chem.* **289**, 35237–35245 (2014).
192. G. Y. Chen, G. Nuñez, Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*. **10**, 826–837 (2010).
193. K. L. Rock, H. Kono, The Inflammatory Response to Cell Death. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. **3**, 99–126 (2008).
194. A. Roers, B. Hiller, V. Hornung, Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity*. **44**, 739–754 (2016).
195. D. S. Pisetsky, The origin and properties of extracellular DNA: From PAMP to DAMP. *Clinical Immunology*. **144**, 32–40 (2012).
196. G. Marsman, S. Zeerleder, B. M. Luken, Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation. *Cell Death Dis.* **7**, e2518 (2016).
197. G. N. Coritsidis, P. C. Beers, P. M. Rumore, Glomerular uptake of nucleosomes: evidence for receptor-mediated mesangial cell binding. *Kidney Int.* **47**, 1258–1265 (1995).
198. E. Ben Chetrit, E. H. Dunskey, S. Wollner, D. Eilat, In vivo clearance and tissue uptake of an anti-DNA monoclonal antibody and its complexes with DNA. *Clin. Exp. Immunol.* **60**, 159–168 (1985).
199. V. Urbonaviciute, B. G. Fürnrohr, S. Meister, L. Munoz, P. Heyder, F. De Marchis, M. E. Bianchi, C. Kirschning, H. Wagner, A. A. Manfredi, J. R. Kalden, G. Schett, P. Rovere-Querini, M. Herrmann, R. E. Voll, Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J. Exp. Med.* **205**, 3007–3018 (2008).

200. M. Napirei, H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, T. Möröy, Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nat. Genet.* **25**, 177–181 (2000).
201. F. Martinez-Valle, E. Balada, J. Ordi-Ros, S. Bujan-Rivas, A. Sellas-Fernandez, M. Vilardell-Tarres, DNase 1 activity in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus.* **18**, 418–423 (2009).
202. A. Kustanovich, R. Schwartz, T. Peretz, A. Grinshpun, Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy.* **0**, 1–11 (2019).
203. I. D. Vlamincck, H. A. Valantine, T. M. Snyder, C. Strehl, G. Cohen, H. Luikart, N. F. Neff, J. Okamoto, D. Bernstein, D. Weisshaar, S. R. Quake, K. K. Khush, Circulating Cell-Free DNA Enables Noninvasive Diagnosis of Heart Transplant Rejection. *Science Translational Medicine.* **6**, 241ra77-241ra77 (2014).
204. A. Avriel, M. P. Wiessman, Y. Almog, Y. Perl, V. Novack, O. Galante, M. Klein, M. J. Pencina, A. Douvdevani, Admission Cell Free DNA Levels Predict 28-Day Mortality in Patients with Severe Sepsis in Intensive Care. *PLOS ONE.* **9**, e100514 (2014).
205. S. H. Nymo, T. Ueland, E. Askevold, C. P. Dahl, L. Gullestad, P. Aukrust, A. Yndestad, Circulating nucleosomes in chronic heart failure. *International Journal of Cardiology.* **203**, 742–743 (2016).
206. Y. Dhondup, T. Ueland, C. P. Dahl, E. T. Askevold, Ø. Sandanger, A. Fiane, I. K. Ohm, I. Sjaastad, A. V. Finsen, A. Wæhre, L. Gullestad, P. Aukrust, A. Yndestad, L. E. Vinge, Low Circulating Levels of Mitochondrial and High Levels of Nuclear DNA Predict Mortality in Chronic Heart Failure. *J. Card. Fail.* **22**, 823–828 (2016).
207. E. R. Hammond, A. N. Shelling, L. M. Cree, Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Hum. Reprod.* **31**, 1653–1661 (2016).
208. F. Mouliere, A. R. Thierry, The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert Opinion on Biological Therapy.* **12**, S209–S215 (2012).
209. A.-L. Volckmar, H. Sultmann, A. Riediger, T. Fioretos, P. Schirmacher, V. Endris, A. Stenzinger, S. Dietz, A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes, Chromosomes and Cancer.* **57**, 123–139 (2018).
210. S.-J. Dawson, D. W. Y. Tsui, M. Murtaza, H. Biggs, O. M. Rueda, S.-F. Chin, M. J. Dunning, D. Gale, T. Forshew, B. Mahler-Araujo, S. Rajan, S. Humphray, J. Becq, D. Halsall, M. Wallis, D. Bentley, C. Caldas, N. Rosenfeld, Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1213261> (2013), , doi:10.1056/NEJMoa1213261.
211. E. Heitzer, P. Ulz, J. B. Geigl, Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry.* **61**, 112–123 (2015).

212. G. Sozzi, D. Conte, M. Leon, R. Cirincione, L. Roz, C. Ratcliffe, E. Roz, N. Cirenei, M. Bellomi, G. Pelosi, M. A. Pierotti, U. Pastorino, Quantification of Free Circulating DNA As a Diagnostic Marker in Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. **21**, 3902–3908 (2003).
213. K. Kim, D. G. Shin, M. K. Park, S. H. Baik, T. H. Kim, S. Kim, S. Lee, Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*. **86**, 136–142 (2014).
214. J. D. Cohen, L. Li, Y. Wang, C. Thoburn, B. Afsari, L. Danilova, C. Douville, A. A. Javed, F. Wong, A. Mattox, R. H. Hruban, C. L. Wolfgang, M. G. Goggins, M. D. Molin, T.-L. Wang, R. Roden, A. P. Klein, J. Ptak, L. Dobbyn, J. Schaefer, N. Silliman, M. Popoli, J. T. Vogelstein, J. D. Browne, R. E. Schoen, R. E. Brand, J. Tie, P. Gibbs, H.-L. Wong, A. S. Mansfield, J. Jen, S. M. Hanash, M. Falconi, P. J. Allen, S. Zhou, C. Bettegowda, L. A. Diaz, C. Tomasetti, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, A. M. Lennon, N. Papadopoulos, Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. **359**, 926–930 (2018).
215. A. J. Bronkhorst, V. Ungerer, S. Holdenrieder, The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification*. **17**, 100087 (2019).
216. G. Tian, X. Li, Y. Xie, F. Xu, D. Yu, F. Cao, X. Wang, F. Yu, W. Zhong, S. Lu, X. Tu, X. Yao, J. He, C. Liu, The Early Diagnosis in Lung Cancer by the Detection of Circulating Tumor DNA. *bioRxiv*, 189340 (2017).
217. C. Bettegowda, M. Sausen, R. J. Leary, I. Kinde, Y. Wang, N. Agrawal, B. R. Bartlett, H. Wang, B. Lubner, R. M. Alani, E. S. Antonarakis, N. S. Azad, A. Bardelli, H. Brem, J. L. Cameron, C. C. Lee, L. A. Fecher, G. L. Gallia, P. Gibbs, D. Le, R. L. Giuntoli, M. Goggins, M. D. Hogarty, M. Holdhoff, S.-M. Hong, Y. Jiao, H. H. Juhl, J. J. Kim, G. Siravegna, D. A. Laheru, C. Lauricella, M. Lim, E. J. Lipson, S. K. N. Marie, G. J. Netto, K. S. Oliner, A. Olivi, L. Olsson, G. J. Riggins, A. Sartore-Bianchi, K. Schmidt, le-M. Shih, S. M. Oba-Shinjo, S. Siena, D. Theodorescu, J. Tie, T. T. Harkins, S. Veronese, T.-L. Wang, J. D. Weingart, C. L. Wolfgang, L. D. Wood, D. Xing, R. H. Hruban, J. Wu, P. J. Allen, C. M. Schmidt, M. A. Choti, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos, L. A. Diaz, Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine*. **6**, 224ra24-224ra24 (2014).
218. J. C. M. Wan, C. Massie, J. Garcia-Corbacho, F. Mouliere, J. D. Brenton, C. Caldas, S. Pacey, R. Baird, N. Rosenfeld, Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer*. **17**, 223–238 (2017).
219. K. C. A. Chan, J. K. S. Woo, A. King, B. C. Y. Zee, W. K. J. Lam, S. L. Chan, S. W. I. Chu, C. Mak, I. O. L. Tse, S. Y. M. Leung, G. Chan, E. P. Hui, B. B. Y. Ma, R. W. K. Chiu, S.-F. Leung, A. C. van Hasselt, A. T. C. Chan, Y. M. D. Lo, Analysis of Plasma Epstein–Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*. **377**, 513–522 (2017).

220. F. Amant, M. Verheecke, I. Wlodarska, L. Dehaspe, P. Brady, N. Brison, K. Van Den Bogaert, D. Dierickx, V. Vandecaveye, T. Tousseyn, P. Moerman, A. Vanderstichele, I. Vergote, P. Neven, P. Berteloot, K. Putseys, L. Danneels, P. Vandenberghe, E. Legius, J. R. Vermeesch, Presymptomatic Identification of Cancers in Pregnant Women During Noninvasive Prenatal Testing. *JAMA Oncol.* **1**, 814–819 (2015).
221. E. Gormally, P. Vineis, G. Matullo, F. Veglia, E. Caboux, E. L. Roux, M. Peluso, S. Garte, S. Guarrera, A. Munnia, L. Airoidi, H. Autrup, C. Malaveille, A. Dunning, K. Overvad, A. Tjønneland, E. Lund, F. Clavel-Chapelon, H. Boeing, A. Trichopoulou, D. Palli, V. Krogh, R. Tumino, S. Panico, H. B. Bueno-de-Mesquita, P. H. Peeters, G. Pera, C. Martinez, M. Dorronsoro, A. Barricarte, C. Navarro, J. R. Quirós, G. Hallmans, N. E. Day, T. J. Key, R. Saracci, R. Kaaks, E. Riboli, P. Hainaut, TP53 and KRAS2 Mutations in Plasma DNA of Healthy Subjects and Subsequent Cancer Occurrence: A Prospective Study. *Cancer Res.* **66**, 6871–6876 (2006).
222. L. Mao, R. H. Hruban, J. O. Boyle, M. Tockman, D. Sidransky, Detection of Oncogene Mutations in Sputum Precedes Diagnosis of Lung Cancer. *Cancer Res.* **54**, 1634–1637 (1994).
223. C. A. Parkinson, D. Gale, A. M. Piskorz, H. Biggs, C. Hodgkin, H. Addley, S. Freeman, P. Moyle, E. Sala, K. Sayal, K. Hosking, I. Gounaris, M. Jimenez-Linan, H. M. Earl, W. Qian, N. Rosenfeld, J. D. Brenton, Exploratory Analysis of TP53 Mutations in Circulating Tumour DNA as Biomarkers of Treatment Response for Patients with Relapsed High-Grade Serous Ovarian Carcinoma: A Retrospective Study. *PLOS Medicine.* **13**, e1002198 (2016).
224. A. R. Thierry, F. Mouliere, C. Gongora, J. Ollier, B. Robert, M. Ychou, M. Del Rio, F. Molina, Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6159–6175 (2010).
225. A. A. Kamat, F. Z. Bischoff, D. Dang, M. Baldwin, L. Y. Han, Y. G. Lin, W. M. Merritt, C. N. Landen, C. Lu, D. M. Gershenson, J. L. Simpson, A. K. Sood, Circulating cell-free DNA: A novel biomarker for response to therapy in ovarian carcinoma. *Cancer Biology & Therapy.* **5**, 1369–1374 (2006).
226. A. D. Nygaard, P. C. Holdgaard, K.-L. G. Spindler, N. Pallisgaard, A. Jakobsen, The correlation between cell-free DNA and tumour burden was estimated by PET/CT in patients with advanced NSCLC. *British Journal of Cancer.* **110**, 363–368 (2014).
227. K.-L. G. Spindler, A. L. Appelt, N. Pallisgaard, R. F. Andersen, I. Brandslund, A. Jakobsen, Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *International Journal of Cancer.* **135**, 2984–2991 (2014).
228. S. E. Messaoudi, F. Mouliere, S. D. Manoir, C. Bascoul-Mollevi, B. Gillet, M. Nouaille, C. Fiess, E. Crapez, F. Bibeau, C. Theillet, T. Mazard, D. Pezet, M. Mathonnet, M. Ychou, A. R. Thierry, Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res.* **22**, 3067–3077 (2016).

229. C. Oshiro, N. Kagara, Y. Naoi, M. Shimoda, A. Shimomura, N. Maruyama, K. Shimazu, S. J. Kim, S. Noguchi, PIK3CA mutations in serum DNA are predictive of recurrence in primary breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **150**, 299–307 (2015).
230. R. Sirera, R. M. Bremnes, A. Cabrera, E. Jantus-Lewintre, E. Sanmartín, A. Blasco, N. del Pozo, R. Rosell, R. Guijarro, J. Galbis, J. J. Sánchez, C. Camps, Circulating DNA is a Useful Prognostic Factor in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology.* **6**, 286–290 (2011).
231. E. Sunami, M. Shinozaki, C. S. Higano, R. Wollman, T. B. Dorff, S. J. Tucker, S. R. Martinez, R. Mizuno, F. R. Singer, D. S. B. Hoon, Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clin. Chem.* **55**, 559–567 (2009).
232. T. Lecomte, A. Berger, F. Zinzindohoué, S. Micard, B. Landi, H. Blons, P. Beaune, P.-H. Cugnenc, P. Laurent-Puig, Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis - Lecomte - 2002 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library. *Int. J. Cancer.* **100**, 542–548 (2002).
233. T. B. Hao, W. Shi, X. J. Shen, J. Qi, X. H. Wu, Y. Wu, Y. Y. Tang, S. Q. Ju, Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* **111**, 1482–1489 (2014).
234. N. Umetani, A. E. Giuliano, S. H. Hiramatsu, F. Amersi, T. Nakagawa, S. Martino, D. S. B. Hoon, Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J. Clin. Oncol.* **24**, 4270–4276 (2006).
235. D. Madhavan, M. Wallwiener, K. Bents, M. Zucknick, J. Nees, S. Schott, K. Cuk, S. Riethdorf, A. Trumpp, K. Pantel, C. Sohn, A. Schneeweiss, H. Surowy, B. Burwinkel, Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res. Treat.* **146**, 163–174 (2014).
236. K. C. A. Chan, S.-F. Leung, S.-W. Yeung, A. T. C. Chan, Y. M. D. Lo, Persistent aberrations in circulating DNA integrity after radiotherapy are associated with poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* **14**, 4141–4145 (2008).
237. A. M. Aravanis, M. Lee, R. D. Klausner, Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell.* **168**, 571–574 (2017).
238. J. Jin, X. Wu, J. Yin, M. Li, J. Shen, J. Li, Y. Zhao, Q. Zhao, J. Wu, Q. Wen, C. H. Cho, T. Yi, Z. Xiao, L. Qu, Identification of Genetic Mutations in Cancer: Challenge and Opportunity in the New Era of Targeted Therapy. *Front. Oncol.* **9** (2019), doi:10.3389/fonc.2019.00263.
239. Y. Chang, B. Tolani, X. Nie, X. Zhi, M. Hu, B. He, Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor DNA in cancer monitoring. *Therapeutics and Clinical Risk Management* (2017), , doi:10.2147/TCRM.S141991.
240. R. A. Burrell, N. McGranahan, J. Bartek, C. Swanton, The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature.* **501**, 338–345 (2013).



241. K. H. Allison, G. W. Sledge, Heterogeneity and Cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*. **28**, 772–778 (2014).
242. M. Gerlinger, A. J. Rowan, S. Horswell, J. Larkin, D. Endesfelder, E. Gronroos, P. Martinez, N. Matthews, A. Stewart, P. Tarpey, I. Varela, B. Phillimore, S. Begum, N. Q. McDonald, A. Butler, D. Jones, K. Raine, C. Latimer, C. R. Santos, M. Nohadani, A. C. Eklund, B. Spencer-Dene, G. Clark, L. Pickering, G. Stamp, M. Gore, Z. Szallasi, J. Downward, P. A. Futreal, C. Swanton, Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine*. **366**, 883–892 (2012).
243. L. A. Diaz, A. Bardelli, Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *JCO*. **32**, 579–586 (2014).
244. A. R. Thierry, F. Mouliere, S. El Messaoudi, C. Mollevi, E. Lopez-Crapez, F. Rolet, B. Gillet, C. Gongora, P. Dechelotte, B. Robert, M. Del Rio, P.-J. Lamy, F. Bibeau, M. Nouaille, V. Lorient, A.-S. Jarrousse, F. Molina, M. MATHONNET, D. Pezet, M. Ychou, Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA. *Nature Medicine*. **20**, 430–435 (2014).
245. Y. Li, H. Xu, S. Su, J. Ye, J. Chen, X. Jin, Q. Lin, D. Zhang, C. Ye, C. Chen, Clinical validation of a highly sensitive assay to detect EGFR mutations in plasma cell-free DNA from patients with advanced lung adenocarcinoma. *PLOS ONE*. **12**, e0183331 (2017).
246. K. L. Aung, E. Donald, G. Ellison, S. Bujac, L. Fletcher, M. Cantarini, G. Brady, M. Orr, G. Clack, M. Ranson, C. Dive, A. Hughes, Analytical Validation of BRAF Mutation Testing from Circulating Free DNA Using the Amplification Refractory Mutation Testing System. *The Journal of Molecular Diagnostics*. **16**, 343–349 (2014).
247. O. A. Zill, C. Greene, D. Sebisano, L. M. Siew, J. Leng, M. Vu, A. E. Hendifar, Z. Wang, C. E. Atreya, R. K. Kelley, K. V. Loon, A. H. Ko, M. A. Tempero, T. G. Bivona, P. N. Munster, A. Talasz, E. A. Collisson, Cell-Free DNA Next-Generation Sequencing in Pancreatobiliary Carcinomas. *Cancer Discov*. **5**, 1040–1048 (2015).
248. M. J. Higgins, D. Jelovac, E. Barnathan, B. Blair, S. Slater, P. Powers, J. Zorzi, S. C. Jeter, G. R. Oliver, J. Fetting, L. Emens, C. Riley, V. Stearns, F. Diehl, P. Angenendt, P. Huang, L. Cope, P. Argani, K. M. Murphy, K. E. Bachman, J. Greshock, A. C. Wolff, B. H. Park, Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin. Cancer Res*. **18**, 3462–3469 (2012).
249. A. W. Wyatt, M. Annala, R. Aggarwal, K. Beja, F. Feng, J. Youngren, A. Foye, P. Lloyd, M. Nykter, T. M. Beer, J. J. Alumkal, G. V. Thomas, R. E. Reiter, M. B. Rettig, C. P. Evans, A. C. Gao, K. N. Chi, E. J. Small, M. E. Gleave, Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *J. Natl. Cancer Inst*. **109** (2017), doi:10.1093/jnci/djx118.
250. S. Misale, F. D. Nicolantonio, A. Sartore-Bianchi, S. Siena, A. Bardelli, Resistance to Anti-EGFR Therapy in Colorectal Cancer: From Heterogeneity to Convergent Evolution. *Cancer Discov*. **4**, 1269–1280 (2014).

251. A. Kulkarni, H. Al-Hraishawi, S. Simhadri, K. M. Hirshfield, S. Chen, S. Pine, C. Jeyamohan, L. Sokol, S. Ali, M. L. Teo, E. White, L. Rodriguez-Rodriguez, J. M. Mehnert, S. Ganesan, BRAF Fusion as a Novel Mechanism of Acquired Resistance to Vemurafenib in BRAFV600E Mutant Melanoma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 5631–5638 (2017).
252. K. Tanaka, K. Nosaki, K. Otsubo, K. Azuma, S. Sakata, H. Ouchi, R. Morinaga, H. Wataya, A. Fujii, N. Nakagaki, N. Tsuruta, M. Takeshita, E. Iwama, T. Harada, Y. Nakanishi, I. Okamoto, Acquisition of the T790M resistance mutation during afatinib treatment in EGFR tyrosine kinase inhibitor-naïve patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR mutations. *Oncotarget.* **8**, 68123–68130 (2017).
253. M. Schreuer, G. Meersseman, S. V. D. Herrewegen, Y. Jansen, I. Chevolet, A. Bott, S. Wilgenhof, T. Seremet, B. Jacobs, R. Buyl, G. Maertens, B. Neyns, Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *Journal of Translational Medicine.* **14**, 95 (2016).
254. H. Bai, Z. Wang, K. Chen, J. Zhao, J. J. Lee, S. Wang, Q. Zhou, M. Zhuo, L. Mao, T. An, J. Duan, L. Yang, M. Wu, Z. Liang, Y. Wang, X. Kang, J. Wang, Influence of Chemotherapy on EGFR Mutation Status Among Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO.* **30**, 3077–3083 (2012).
255. J. Tie, I. Kinde, Y. Wang, H. L. Wong, J. Roebert, M. Christie, M. Tacey, R. Wong, M. Singh, C. S. Karapetis, J. Desai, B. Tran, R. L. Strausberg, L. A. Diaz, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, P. Gibbs, Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* **26**, 1715–1722 (2015).
256. L. Cabel, F. Riva, V. Servois, A. Livartowski, C. Daniel, A. Rampanou, O. Lantz, E. Romano, M. Milder, B. Buecher, S. Piperno-Neumann, V. Bernard, S. Baulande, I. Bieche, J. Y. Pierga, C. Proudhon, F.-C. Bidard, Circulating tumor DNA changes for early monitoring of anti-PD1 immunotherapy: a proof-of-concept study. *Ann Oncol.* **28**, 1996–2001 (2017).
257. L. B. Ahlborn, I. V. Tuxen, F. Mouliere, S. Kinalis, A. Y. Schmidt, K. S. Rohrberg, E. Santoni-Rugiu, F. C. Nielsen, U. Lassen, C. W. Yde, O. Oestrup, M. Mau-Sorensen, Circulating tumor DNA as a marker of treatment response in BRAF V600E mutated non-melanoma solid tumors. *Oncotarget.* **9**, 32570–32579 (2018).
258. S. Kruger, V. Heinemann, C. Ross, F. Diehl, D. Nagel, S. Ormanns, S. Liebmann, I. Prinz-Bravin, C. B. Westphalen, M. Haas, A. Jung, T. Kirchner, M. von Bergwelt-Baildon, S. Boeck, S. Holdenrieder, Repeated mutKRAS ctDNA measurements represent a novel and promising tool for early response prediction and therapy monitoring in advanced pancreatic cancer. *Ann Oncol.* **29**, 2348–2355 (2018).
259. C. Demuth, A. Winther-Larsen, A. T. Madsen, P. Meldgaard, B. S. Sorensen, A method for treatment monitoring using circulating tumour DNA in cancer patients without targetable mutations. *Oncotarget.* **9**, 31066–31076 (2018).

260. K.-L. G. Spindler, N. Pallisgaard, I. Vogelius, A. Jakobsen, Quantitative Cell-Free DNA, KRAS, and BRAF Mutations in Plasma from Patients with Metastatic Colorectal Cancer during Treatment with Cetuximab and Irinotecan. *Clin Cancer Res.* **18**, 1177–1185 (2012).
261. K. Birkenkamp-Demtröder, E. Christensen, I. Nordentoft, M. Knudsen, A. Taber, S. Høyer, P. Lamy, M. Agerbæk, J. B. Jensen, L. Dyrskjøt, Monitoring Treatment Response and Metastatic Relapse in Advanced Bladder Cancer by Liquid Biopsy Analysis. *European Urology.* **73**, 535–540 (2018).
262. L. A. Diaz, R. Williams, J. Wu, I. Kinde, J. R. Hecht, J. Berlin, B. Allen, I. Bozic, J. G. Reiter, M. A. Nowak, K. W. Kinzler, K. S. Oliner, B. Vogelstein, The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature.* **486**, 537–540 (2012).
263. A. R. Thierry, B. Pastor, Z.-Q. Jiang, A. D. Katsiampoura, C. Parseghian, J. M. Loree, M. J. Overman, C. Sanchez, S. E. Messaoudi, M. Ychou, S. Kopetz, Circulating DNA demonstrates convergent evolution and common resistance mechanisms during treatment of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* **23**, 4578–4591 (2017).
264. M. Murtaza, S.-J. Dawson, D. W. Y. Tsui, D. Gale, T. Forshew, A. M. Piskorz, C. Parkinson, S.-F. Chin, Z. Kingsbury, A. S. C. Wong, F. Marass, S. Humphray, J. Hadfield, D. Bentley, T. M. Chin, J. D. Brenton, C. Caldas, N. Rosenfeld, Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature.* **497**, 108–112 (2013).
265. F.-C. Bidard, J. Madic, P. Mariani, S. Piperno-Neumann, A. Rampanou, V. Servois, N. Cassoux, L. Desjardins, M. Milder, I. Vaucher, J.-Y. Pierga, R. Lebofsky, M.-H. Stern, O. Lantz, Detection rate and prognostic value of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in metastatic uveal melanoma. *Int. J. Cancer.* **134**, 1207–1213 (2014).
266. T. Reinert, L. V. Schøler, R. Thomsen, H. Tobiasen, S. Vang, I. Nordentoft, P. Lamy, A.-S. Kannerup, F. V. Mortensen, K. Stribolt, S. Hamilton-Dutoit, H. J. Nielsen, S. Laurberg, N. Pallisgaard, J. S. Pedersen, T. F. Ørntoft, C. L. Andersen, Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut.* **65**, 625–634 (2016).
267. M. Frattini, G. Gallino, S. Signoroni, D. Balestra, L. Lusa, L. Battaglia, G. Sozzi, L. Bertario, E. Leo, S. Pilotti, M. A. Pierotti, Quantitative and qualitative characterization of plasma DNA identifies primary and recurrent colorectal cancer. *Cancer Lett.* **263**, 170–181 (2008).
268. N. Guo, F. Lou, Y. Ma, J. Li, B. Yang, W. Chen, H. Ye, J.-B. Zhang, M.-Y. Zhao, W.-J. Wu, R. Shi, L. Jones, K. S. Chen, X. F. Huang, S.-Y. Chen, Y. Liu, Circulating tumor DNA detection in lung cancer patients before and after surgery. *Sci Rep.* **6** (2016), doi:10.1038/srep33519.
269. F. Diehl, K. Schmidt, M. A. Choti, K. Romans, S. Goodman, M. Li, K. Thornton, N. Agrawal, L. Sokoll, S. A. Szabo, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, L. A. Diaz, Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat. Med.* **14**, 985–990 (2008).

270. A. A. Chaudhuri, J. J. Chabon, A. F. Lovejoy, A. M. Newman, H. Stehr, T. D. Azad, M. S. Khodadoust, M. S. Esfahani, C. L. Liu, L. Zhou, F. Scherer, D. M. Kurtz, C. Say, J. N. Carter, D. J. Merriott, J. C. Dudley, M. S. Binkley, L. Modlin, S. K. Padda, M. F. Gensheimer, R. B. West, J. B. Shrager, J. W. Neal, H. A. Wakelee, B. W. Loo, A. A. Alizadeh, M. Diehn, Early Detection of Molecular Residual Disease in Localized Lung Cancer by Circulating Tumor DNA Profiling. *Cancer Discov.* **7**, 1394–1403 (2017).
271. M. W. Gray, Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **4** (2012), doi:10.1101/cshperspect.a011403.
272. W. Schwartz, Lynn Margulis, Origin of Eukaryotic Cells. Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie.* **13**, 186–186 (1973).
273. J. R. Friedman, J. Nunnari, Mitochondrial form and function. *Nature.* **505**, 335–343 (2014).
274. S. W. G. Tait, D. R. Green, Mitochondria and cell signalling. *Journal of Cell Science.* **125**, 807–815 (2012).
275. J. G. McCarron, C. Wilson, M. E. Sandison, M. L. Olson, J. M. Girkin, C. Saunter, S. Chalmers, From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *Journal of Vascular Research.* **50**, 357–371 (2013).
276. J. Nunnari, A. Suomalainen, Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell.* **148**, 1145–1159 (2012).
277. A. Rongvaux, Innate immunity and tolerance toward mitochondria. *Mitochondrion.* **41**, 14–20 (2018).
278. R. H. Houtkooper, F. M. Vaz, Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 2493–2506 (2008).
279. D. K. Aanen, J. N. Spelbrink, M. Beekman, What cost mitochondria? The maintenance of functional mitochondrial DNA within and across generations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **369** (2014), doi:10.1098/rstb.2013.0438.
280. A. Lièvre, P. Laurent-Puig, Mutations de l'ADN mitochondrial et cancer colorectal. *Gastroentérologie Clinique et Biologique.* **29**, 33–40 (2005).
281. J.-W. Taanman, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* **1410**, 103–123 (1999).
282. R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics.* **6**, 389–402 (2005).
283. H. Sharma, A. Singh, C. Sharma, S. K. Jain, N. Singh, Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Int.* **5**, 34 (2005).

284. C. Kukat, C. A. Wurm, H. Spahr, M. Falkenberg, N.-G. Larsson, S. Jakobs, Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**, 13534–13539 (2011).
285. F. Legros, F. Malka, P. Frachon, A. Lombès, M. Rojo, Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *Journal of Cell Science*. **117**, 2653–2662 (2004).
286. X. J. Chen, R. A. Butow, The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Reviews Genetics*. **6**, 815 (2005).
287. Y. Wang, D. F. Bogenhagen, Human Mitochondrial DNA Nucleoids Are Linked to Protein Folding Machinery and Metabolic Enzymes at the Mitochondrial Inner Membrane. *J. Biol. Chem.* **281**, 25791–25802 (2006).
288. T. I. Alam, Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic Acids Research*. **31**, 1640–1645 (2003).
289. I. J. Holt, A. E. Harding, J. A. Morgan-Hughes, Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*. **331**, 717 (1988).
290. D. C. Wallace, G. Singh, M. T. Lott, J. A. Hodge, T. G. Schurr, A. M. Lezza, L. J. Elsas, E. K. Nikoskelainen, Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. **242**, 1427–1430 (1988).
291. E. A. Schon, S. DiMauro, M. Hirano, Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 878–890 (2012).
292. H. A. L. Tuppen, E. L. Blakely, D. M. Turnbull, R. W. Taylor, Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. **1797**, 113–128 (2010).
293. E. Ylikallio, A. Suomalainen, Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann. Med.* **44**, 41–59 (2012).
294. R. E. Giles, H. Blanc, H. M. Cann, D. C. Wallace, Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6715–6719 (1980).
295. P. Yu-Wai-Man, P. G. Griffiths, D. T. Brown, N. Howell, D. M. Turnbull, P. F. Chinnery, The epidemiology of Leber hereditary optic neuropathy in the North East of England. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 333–339 (2003).
296. T. R. Prezant, J. V. Agopian, M. C. Bohlman, X. Bu, S. Oztas, W. Q. Qiu, K. S. Arnos, G. A. Cortopassi, L. Jaber, J. I. Rotter, Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* **4**, 289–294 (1993).
297. D. T. Brown, D. C. Samuels, E. M. Michael, D. M. Turnbull, P. F. Chinnery, Random Genetic Drift Determines the Level of Mutant mtDNA in Human Primary Oocytes. *Am J Hum Genet.* **68**, 533–536 (2001).



298. C. B. Park, N.-G. Larsson, Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol.* **193**, 809–818 (2011).
299. D. Harman, Free radical theory of aging. *Mutat. Res.* **275**, 257–266 (1992).
300. L. C. Greaves, A. K. Reeve, R. W. Taylor, D. M. Turnbull, Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* **226**, 274–286 (2012).
301. D. C. Wallace, A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found. Symp.* **235**, 247–263; discussion 263-266 (2001).
302. W. C. Copeland, J. T. Wachsman, F. M. Johnson, J. S. Penta, Mitochondrial DNA Alterations in Cancer. *Cancer Investigation.* **20**, 557–569 (2002).
303. R. W. K. Chiu, Quantitative Analysis of Circulating Mitochondrial DNA in Plasma. *Clinical Chemistry.* **49**, 719–726 (2003).
304. S. Zhong, M. C. Y. Ng, Y. M. D. Lo, J. C. N. Chan, P. J. Johnson, Presence of mitochondrial tRNA Leu(UUR) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Pathology.* **53**, 466–469 (2000).
305. N. Mehra, M. Penning, J. Maas, N. van Daal, R. H. Giles, E. E. Voest, Circulating Mitochondrial Nucleic Acids Have Prognostic Value for Survival in Patients with Advanced Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* **13**, 421–426 (2007).
306. R. Mair, F. Mouliere, C. G. Smith, D. Chandrananda, D. Gale, F. Marass, D. W. Y. Tsui, C. E. Massie, A. J. Wright, C. Watts, N. Rosenfeld, K. M. Brindle, Measurement of Plasma Cell-Free Mitochondrial Tumor DNA Improves Detection of Glioblastoma in Patient-Derived Orthotopic Xenograft Models. *Cancer Res.* **79**, 220–230 (2019).
307. E. H. Mahmoud, A. Fawzy, O. K. Ahmad, A. M. Ali, Plasma Circulating Cell-free Nuclear and Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* **16**, 8299–8305 (2016).
308. J. Fernandes, V. Michel, M. Camorlinga-Ponce, A. Gomez, C. Maldonado, H. D. Reuse, J. Torres, E. Touati, Circulating Mitochondrial DNA Level, a Noninvasive Biomarker for the Early Detection of Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **23**, 2430–2438 (2014).
309. J. Ellinger, P. Albers, S. C. Müller, A. V. Ruecker, P. J. Bastian, Circulating mitochondrial DNA in the serum of patients with testicular germ cell cancer as a novel noninvasive diagnostic biomarker. *BJU International.* **104**, 48–52 (2009).
310. J. Ellinger, D. C. Müller, S. C. Müller, S. Hauser, L. C. Heukamp, A. von Ruecker, P. J. Bastian, G. Walgenbach-Brunagel, Circulating mitochondrial DNA in serum: A universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations.* **30**, 509–515 (2012).
311. W.-W. Jiang, B. Masayeva, M. Zahurak, A. L. Carvalho, E. Rosenbaum, E. Mambo, S. Zhou, K. Minhas, N. Benoit, W. H. Westra, A. Alberg, D. Sidransky, W. Koch, J.

- Califano, Increased Mitochondrial DNA Content in Saliva Associated with Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res.* **11**, 2486–2491 (2005).
312. Cell-free Circulating Mitochondrial DNA in the Serum: A Potential Non-invasive Biomarker for Ewing’s Sarcoma | Elsevier Enhanced Reader, , doi:10.1016/j.arcmed.2012.06.007.
313. R. Meddeb, Z. Al Amir Dache, S. Thezenas, A. Otandault, R. Tanos, B. Pastor, C. Sanchez, J. Azzi, G. Tousch, S. Azan, C. Mollevi, A. Adenis, S. E. Messaoudi, P. Blache, A. R. Thierry, Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports.* **9**, 5220 (2019).
314. J. Chen, L. Zhang, X. Yu, H. Zhou, Y. Luo, W. Wang, L. Wang, Clinical application of plasma mitochondrial DNA content in patients with lung cancer. *Oncology Letters.* **16**, 7074–7081 (2018).
315. P. Xia, H.-X. An, C.-X. Dang, R. Radpour, C. Kohler, E. Fokas, R. Engenhardt-Cabillic, W. Holzgreve, X. Y. Zhong, Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer.* **9** (2009), doi:10.1186/1471-2407-9-454.
316. C.-Y. HUANG, Y.-M. CHEN, C.-H. WU, C.-M. TSAI, Y.-C. LEE, R.-P. PERNG, J. WHANG-PENG, Circulating free mitochondrial DNA concentration and its association with erlotinib treatment in patients with adenocarcinoma of the lung. *Oncol Lett.* **7**, 2180–2184 (2014).
317. J. Ellinger, S. C. Müller, N. Wernert, A. von Ruecker, P. J. Bastian, Mitochondrial DNA in serum of patients with prostate cancer: a predictor of biochemical recurrence after prostatectomy. *BJU Int.* **102**, 628–632 (2008).
318. M. Patrushev, V. Kasymov, V. Patrusheva, T. Ushakova, V. Gogvadze, A. Gaziev, Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 3100–3103 (2004).
319. R. J. Youle, D. P. Narendra, Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* **12**, 9–14 (2011).
320. T. Oka, S. Hikoso, O. Yamaguchi, M. Taneike, T. Takeda, T. Tamai, J. Oyabu, T. Murakawa, H. Nakayama, K. Nishida, S. Akira, A. Yamamoto, I. Komuro, K. Otsu, Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature.* **485**, 251–255 (2012).
321. NakahiraKiichi, HisataShu, C. M.K, The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling* (2015), doi:10.1089/ars.2015.6407.
322. A. Kaczmarek, P. Vandenabeele, D. V. Krysko, Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity.* **38**, 209–223 (2013).
323. A. Maeda, B. Fadeel, Mitochondria released by cells undergoing TNF- $\alpha$ -induced necroptosis act as danger signals. *Cell Death & Disease.* **5**, e1312–e1312 (2014).

324. L. H. Boudreau, A.-C. Duchez, N. Cloutier, D. Soulet, N. Martin, J. Bollinger, A. Pare, M. Rousseau, G. S. Naika, T. Levesque, C. Laflamme, G. Marcoux, G. Lambeau, R. W. Farndale, M. Pouliot, H. Hamzeh-Cognasse, F. Cognasse, O. Garraud, P. A. Nigrovic, H. Guderley, S. Lacroix, L. Thibault, J. W. Semple, M. H. Gelb, E. Boilard, Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*. **124**, 2173–2183 (2014).
325. B. Ingelsson, D. Söderberg, T. Strid, A. Söderberg, A.-C. Bergh, V. Loitto, K. Lotfi, M. Segelmark, G. Spyrou, A. Rosén, Lymphocytes eject interferogenic mitochondrial DNA webs in response to CpG and non-CpG oligodeoxynucleotides of class C. *PNAS*. **115**, E478–E487 (2018).
326. P. Jiang, C. W. M. Chan, K. C. A. Chan, S. H. Cheng, J. Wong, V. W.-S. Wong, G. L. H. Wong, S. L. Chan, T. S. K. Mok, H. L. Y. Chan, P. B. S. Lai, R. W. K. Chiu, Y. M. D. Lo, Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**, E1317–E1325 (2015).
327. R. Zhang, K. Nakahira, X. Guo, A. M. K. Choi, Z. Gu, Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Scientific Reports*. **6**, 36097 (2016).
328. P. Burnham, M. S. Kim, S. Agbor-Enoh, H. Luikart, H. A. Valentine, K. K. Khush, I. De Vlaminc, Single-stranded DNA library preparation uncovers the origin and diversity of ultrashort cell-free DNA in plasma. *Scientific Reports*. **6** (2016), doi:10.1038/srep27859.
329. C. Newell, S. Hume, S. C. Greenway, L. Podemski, J. Shearer, A. Khan, Plasma-derived cell-free mitochondrial DNA: A novel non-invasive methodology to identify mitochondrial DNA haplogroups in humans. *Mol. Genet. Metab*. **125**, 332–337 (2018).
330. M. Li, R. Schröder, S. Ni, B. Madea, M. Stoneking, Extensive tissue-related and allele-related mtDNA heteroplasmy suggests positive selection for somatic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**, 2491–2496 (2015).
331. Q. Zhang, K. Itagaki, C. J. Hauser, Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 MAP kinase. *Shock*. **34**, 55–59 (2010).
332. C. G. McCarthy, C. F. Wenceslau, S. Gouloupoulou, S. Ogbi, B. Baban, J. C. Sullivan, T. Matsumoto, R. C. Webb, Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res*. **107**, 119–130 (2015).
333. K. Zaremba-Niedzwiedzka, E. F. Caceres, J. H. Saw, D. Bäckström, L. Juzokaite, E. Vancaester, K. W. Seitz, K. Anantharaman, P. Starnawski, K. U. Kjeldsen, M. B. Stott, T. Nunoura, J. F. Banfield, A. Schramm, B. J. Baker, A. Spang, T. J. G. Ettema, Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature*. **541**, 353–358 (2017).
334. A. Caicedo, P. M. Aponte, F. Cabrera, C. Hidalgo, M. Khoury, Artificial Mitochondria Transfer: Current Challenges, Advances, and Future Applications. *Stem Cells International* (2017), , doi:https://doi.org/10.1155/2017/7610414.

335. T. Kitani, D. Kami, T. Kawasaki, M. Nakata, S. Matoba, S. Gojo, Direct Human Mitochondrial Transfer: A Novel Concept Based on the Endosymbiotic Theory. *Transplantation Proceedings*. **46**, 1233–1236 (2014).
336. J. L. Spees, S. D. Olson, M. J. Whitney, D. J. Prockop, Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 1283–1288 (2006).
337. M. N. Islam, S. R. Das, M. T. Emin, M. Wei, L. Sun, K. Westphalen, D. J. Rowlands, S. K. Quadri, S. Bhattacharya, J. Bhattacharya, Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* **18**, 759–765 (2012).
338. K. Hayakawa, E. Esposito, X. Wang, Y. Terasaki, Y. Liu, C. Xing, X. Ji, E. H. Lo, Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. **535**, 551–555 (2016).
339. T. Ahmad, S. Mukherjee, B. Pattnaik, M. Kumar, S. Singh, M. Kumar, R. Rehman, B. K. Tiwari, K. A. Jha, A. P. Barhanpurkar, M. R. Wani, S. S. Roy, U. Mabalirajan, B. Ghosh, A. Agrawal, Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* **33**, 994–1010 (2014).
340. C. A. Pacak, J. M. Preble, H. Kondo, P. Seibel, S. Levitsky, P. J. del Nido, D. B. Cowan, J. D. McCully, Actin-dependent mitochondrial internalization in cardiomyocytes: evidence for rescue of mitochondrial function. *Biology Open*. **4**, 622–626 (2015).
341. M. V. Jackson, T. J. Morrison, D. F. Doherty, D. F. McAuley, M. A. Matthay, A. Kissenpfennig, C. M. O’Kane, A. D. Krasnodembskaya, Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*. **34**, 2210–2223 (2016).
342. D. Torralba, F. Baixauli, F. Sánchez-Madrid, Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front Cell Dev Biol.* **4**, 107 (2016).
343. M. A. Clark, J. W. Shay, Mitochondrial transformation of mammalian cells. *NATURE*. **295**, 605–607 (1982).
344. M. P. King, G. Attardi, Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell*. **52**, 811–819 (1988).
345. M. P. King, G. Attardi, Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*. **246**, 500–503 (1989).
346. A. Caicedo, V. Fritz, J.-M. Brondello, M. Ayala, I. Dennemont, N. Abdellaoui, F. de Fraipont, A. Moisan, C. A. Prouteau, H. Boukhaddaoui, C. Jorgensen, M.-L. Vignais, MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific Reports*. **5** (2015), doi:10.1038/srep09073.

347. S. El Messaoudi, F. Rolet, F. Mouliere, A. R. Thierry, Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*. **424**, 222–230 (2013).
348. R. Meddeb, E. Pisareva, A. R. Thierry, Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clin. Chem.* **65**, 623–633 (2019).
349. R. A. Haraszti, M.-C. Didiot, E. Sapp, J. Leszyk, S. A. Shaffer, H. E. Rockwell, F. Gao, N. R. Narain, M. DiFiglia, M. A. Kiebish, N. Aronin, A. Khvorova, High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*. **5**, 32570 (2016).
350. M. Durcin, A. Fleury, E. Taillebois, G. Hilairret, Z. Krupova, C. Henry, S. Truchet, M. Trötz Müller, H. Köfeler, G. Mabileau, O. Hue, R. Andriantsitohaina, P. Martin, S. L. Lay, Characterisation of adipocyte-derived extracellular vesicle subtypes identifies distinct protein and lipid signatures for large and small extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. **6**, 1305677 (2017).
351. J. Kowal, G. Arras, M. Colombo, M. Jouve, J. P. Morath, B. Primdal-Bengtson, F. Dingli, D. Loew, M. Tkach, C. Théry, Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *PNAS*. **113**, E968–E977 (2016).
352. S. Keerthikumar, L. Gangoda, M. Liem, P. Fonseka, I. Atukorala, C. Ozcitti, A. Mechler, C. G. Adda, C.-S. Ang, S. Mathivanan, Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget*. **6**, 15375–15396 (2015).
353. V. R. Minciocchi, S. You, C. Spinelli, S. Morley, M. Zandian, P.-J. Aspuria, L. Cavallini, C. Ciardiello, M. R. Sobreiro, M. Morello, G. Kharmate, S. C. Jang, D.-K. Kim, E. Hosseini-Beheshti, E. T. Guns, M. Gleave, Y. S. Gho, S. Mathivanan, W. Yang, M. R. Freeman, D. D. Vizio, Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*. **6**, 11327–11341 (2015).
354. S. Dames, L.-S. Chou, Y. Xiao, T. Wayman, J. Stocks, M. Singleton, K. Eilbeck, R. Mao, The Development of Next-Generation Sequencing Assays for the Mitochondrial Genome and 108 Nuclear Genes Associated with Mitochondrial Disorders. *The Journal of Molecular Diagnostics*. **15**, 526–534 (2013).
355. R. Lacroix, C. Judicone, P. Poncelet, S. Robert, L. Arnaud, J. Sampol, F. Dignat-George, Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **10**, 437–446 (2012).
356. C. Rigotherier, R. Daculsi, S. Lepreux, P. Auguste, J. Villeneuve, A. Dewitte, E. Doudnikoff, M. Saleem, C. Bourget, C. Combe, J. Ripoche, CD154 Induces Matrix Metalloproteinase-9 Secretion in Human Podocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*. **117**, 2737–2747 (2016).
357. E. Lázaro-Ibáñez, C. Lässer, G. V. Shelke, R. Crescitelli, S. C. Jang, A. Cyjetkovic, A. García-Rodríguez, J. Lötvall, DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *Journal of Extracellular Vesicles*. **8**, 1656993 (2019).



358. C. Frezza, S. Cipolat, L. Scorrano, Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols*. **2**, 287–295 (2007).
359. S. Cointe, C. Judicone, S. Robert, M. J. Mooberry, P. Poncelet, M. Wauben, R. Nieuwland, N. S. Key, F. Dignat-George, R. Lacroix, Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platforms: results of a multicenter collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. **15**, 187–193 (2017).
360. G. Marcoux, A.-C. Duchez, N. Cloutier, P. Provost, P. A. Nigrovic, E. Boilard, Revealing the diversity of extracellular vesicles using high-dimensional flow cytometry analyses. *Scientific Reports*. **6**, 35928 (2016).
361. S. Pickles, N. Arbour, C. Vande Velde, Immunodetection of Outer Membrane Proteins by Flow Cytometry of Isolated Mitochondria. *J Vis Exp* (2014), doi:10.3791/51887.
362. N. Arraud, C. Gounou, R. Linares, A. R. Brisson, A simple flow cytometry method improves the detection of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. **13**, 237–247 (2015).
363. S. Mastoridis, G. M. Bertolino, G. Whitehouse, F. Dazzi, A. Sanchez-Fueyo, M. Martinez-Llordella, Multiparametric Analysis of Circulating Exosomes and Other Small Extracellular Vesicles by Advanced Imaging Flow Cytometry. *Front. Immunol*. **9** (2018), doi:10.3389/fimmu.2018.01583.
364. T. Kobayashi, S. Kuroda, M. Tada, K. Houkin, Y. Iwasaki, H. Abe, Calcium-induced mitochondrial swelling and cytochrome c release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Research*. **960**, 62–70 (2003).
365. J. J. Lemasters, T. P. Theruvath, Z. Zhong, A.-L. Nieminen, Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death. *Biochim Biophys Acta*. **1787**, 1395–1401 (2009).
366. Puhm Florian, Afonyushkin Taras, Resch Ulrike, Obermayer Georg, Rohde Manfred, Penz Thomas, Schuster Michael, Wagner Gabriel, Rendeiro Andre F., Melki Imene, Kaun Christoph, Wojta Johann, Bock Christoph, Jilma Bernd, Mackman Nigel, Boilard Eric, Binder Christoph J., Mitochondria Are a Subset of Extracellular Vesicles Released by Activated Monocytes and Induce Type I IFN and TNF Responses in Endothelial Cells. *Circulation Research*. **125**, 43–52 (2019).
367. A. Saraste, K. Pulkki, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. **45**, 528–537 (2000).
368. M. Zhu, A. S. Barbas, L. Lin, U. Scheuermann, M. Bishawi, T. V. Brennan, Mitochondria Released by Apoptotic Cell Death Initiate Innate Immune Responses. *ImmunoHorizons*. **2**, 384–397 (2018).
369. H. Wajant, The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science*. **296**, 1635–1636 (2002).
370. K. McArthur, L. W. Whitehead, J. M. Heddleston, L. Li, B. S. Padman, V. Oorschot, N. D. Geoghegan, S. Chappaz, S. Davidson, H. S. Chin, R. M. Lane, M. Dramicanin, T.

- L. Saunders, C. Sugiana, R. Lessene, L. D. Osellame, T.-L. Chew, G. Dewson, M. Lazarou, G. Ramm, G. Lessene, M. T. Ryan, K. L. Rogers, M. F. van Delft, B. T. Kile, BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis. *Science*. **359**, eaao6047 (2018).
371. E.-B. Kayser, M. M. Sedensky, P. G. Morgan, C. L. Hoppel, Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Defective in the Long-lived Mutant *clk-1*. *J. Biol. Chem.* **279**, 54479–54486 (2004).
372. Karch Jason, Molkentin Jeffery D., Regulated Necrotic Cell Death. *Circulation Research*. **116**, 1800–1809 (2015).
373. T. Eleftheriadis, G. Pissas, V. Liakopoulos, I. Stefanidis, Cytochrome c as a Potentially Clinical Useful Marker of Mitochondrial and Cellular Damage. *Frontiers in Immunology*. **7** (2016), doi:10.3389/fimmu.2016.00279.
374. R. Jemmerson, B. LaPlante, A. Treeful, Release of intact, monomeric cytochrome c from apoptotic and necrotic cells. *Cell Death Differ.* **9**, 538–548 (2002).
375. D. G. Phinney, M. Di Giuseppe, J. Njah, E. Sala, S. Shiva, C. M. St Croix, D. B. Stolz, S. C. Watkins, Y. P. Di, G. D. Leikauf, J. Kolls, D. W. H. Riches, G. Deiluiis, N. Kaminski, S. V. Boregowda, D. H. McKenna, L. A. Ortiz, Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature Communications*. **6** (2015), doi:10.1038/ncomms9472.
376. E. L. Mills, B. Kelly, L. A. J. O’Neill, Mitochondria are the powerhouses of immunity. *Nature Immunology*. **18**, 488–498 (2017).
377. A. Rodríguez-Nuevo, A. Zorzano, The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell Stress*. **3**, 195–207 (2019).
378. S. Grazioli, J. Pugin, Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns: From Inflammatory Signaling to Human Diseases. *Frontiers in Immunology*. **9**, 832 (2018).
379. R. B. Seth, L. Sun, C.-K. Ea, Z. J. Chen, Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- $\kappa$ B and IRF3. *Cell*. **122**, 669–682 (2005).
380. R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, J. Tschopp, A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. **469**, 221–225 (2011).
381. A.-M. Rodríguez, J. Nakhle, E. Griessinger, M.-L. Vignais, Intercellular mitochondria trafficking highlighting the dual role of mesenchymal stem cells as both sensors and rescuers of tissue injury. *Cell Cycle*. **17**, 712–721 (2018).
382. M. Mahrouf-Yorgov, L. Augeul, C. C. Da Silva, M. Jourdan, M. Rigolet, S. Manin, R. Ferrera, M. Ovize, A. Henry, A. Guguin, J.-P. Meningaud, J.-L. Dubois-Randé, R. Motterlini, R. Foresti, A.-M. Rodríguez, Mesenchymal stem cells sense mitochondria released from damaged cells as danger signals to activate their rescue properties. *Cell Death and Differentiation*. **24**, 1224–1238 (2017).

383. M.-L. Vignais, A. Caicedo, J.-M. Brondello, C. Jorgensen, Cell Connections by Tunneling Nanotubes: Effects of Mitochondrial Trafficking on Target Cell Metabolism, Homeostasis, and Response to Therapy. *Stem Cells Int.* **2017** (2017), doi:10.1155/2017/6917941.
384. H. Han, J. Hu, Q. Yan, J. Zhu, Z. Zhu, Y. Chen, J. Sun, R. Zhang, Bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue injured H9c2 cells via transferring intact mitochondria through tunneling nanotubes in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model. *Mol Med Rep.* **13**, 1517–1524 (2016).
385. K. Liu, K. Ji, L. Guo, W. Wu, H. Lu, P. Shan, C. Yan, Mesenchymal stem cells rescue injured endothelial cells in an in vitro ischemia-reperfusion model via tunneling nanotube like structure-mediated mitochondrial transfer. *Microvasc. Res.* **92**, 10–18 (2014).
386. E. Y. Plotnikov, T. G. Khryapenkova, S. I. Galkina, G. T. Sukhikh, D. B. Zorov, Cytoplasm and organelle transfer between mesenchymal multipotent stromal cells and renal tubular cells in co-culture. *Experimental Cell Research.* **316**, 2447–2455 (2010).
387. A. Acquistapace, T. Bru, P.-F. Lesault, F. Figeac, A. E. Coudert, O. le Coz, C. Christov, X. Baudin, F. Auber, R. Yiou, J.-L. Dubois-Randé, A.-M. Rodriguez, Human Mesenchymal Stem Cells Reprogram Adult Cardiomyocytes Toward a Progenitor-Like State Through Partial Cell Fusion and Mitochondria Transfer. *STEM CELLS.* **29**, 812–824 (2011).
388. L. Ippolito, A. Morandi, M. L. Taddei, M. Parri, G. Comito, A. Iscaro, M. R. Raspollini, F. Magherini, E. Rapizzi, J. Masquelier, G. G. Muccioli, P. Sonveaux, P. Chiarugi, E. Giannoni, Cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer malignancy via metabolic rewiring and mitochondrial transfer. *Oncogene.* **38**, 5339–5355 (2019).
389. A. S. Tan, J. W. Baty, L.-F. Dong, A. Bezawork-Geleta, B. Endaya, J. Goodwin, M. Bajzikova, J. Kovarova, M. Peterka, B. Yan, E. A. Pesdar, M. Sobol, A. Filimonenko, S. Stuart, M. Vondrusova, K. Kluckova, K. Sachaphibulkij, J. Rohlena, P. Hozak, J. Truksa, D. Eccles, L. M. Haupt, L. R. Griffiths, J. Neuzil, M. V. Berridge, Mitochondrial genome acquisition restores respiratory function and tumorigenic potential of cancer cells without mitochondrial DNA. *Cell Metab.* **21**, 81–94 (2015).
390. J. Pasquier, B. S. Guerrouahen, H. Al Thawadi, P. Ghiabi, M. Maleki, N. Abu-Kaoud, A. Jacob, M. Mirshahi, L. Galas, S. Rafii, F. Le Foll, A. Rafii, Preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells through tunneling nanotubes modulates chemoresistance. *J Transl Med.* **11**, 94 (2013).
391. E. E. Kesner, A. Saada-Reich, H. Lorberboum-Galski, Characteristics of Mitochondrial Transformation into Human Cells. *Scientific Reports.* **6** (2016), doi:10.1038/srep26057.
392. D. Patel, J. Rorbach, K. Downes, M. J. Szukszto, M. L. Pekalski, M. Minczuk, Macropinocytic entry of isolated mitochondria in epidermal growth factor-activated human osteosarcoma cells. *Scientific Reports.* **7**, 12886 (2017).

393. T. Kitani, D. Kami, S. Matoba, S. Gojo, Internalization of isolated functional mitochondria: involvement of macropinocytosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **18**, 1694–1703 (2014).
394. E. Boilard, A.-C. Duchez, A. Brisson, The diversity of platelet microparticles. *Curr. Opin. Hematol.* **22**, 437–444 (2015).
395. C.-C. Hsu, L.-M. Tseng, H.-C. Lee, Role of mitochondrial dysfunction in cancer progression. *Exp Biol Med (Maywood)*. **241**, 1281–1295 (2016).
396. H.-C. Lee, S.-H. Li, J.-C. Lin, C.-C. Wu, D.-C. Yeh, Y.-H. Wei, Somatic mutations in the D-loop and decrease in the copy number of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Mutat. Res.* **547**, 71–78 (2004).
397. C.-W. Wu, P.-H. Yin, W.-Y. Hung, A. F.-Y. Li, S.-H. Li, C.-W. Chi, Y.-H. Wei, H.-C. Lee, Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in gastric cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. **44**, 19–28 (2005).
398. L.-M. Tseng, P.-H. Yin, C.-W. Chi, C.-Y. Hsu, C.-W. Wu, L.-M. Lee, Y.-H. Wei, H.-C. Lee, Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial DNA depletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. **45**, 629–638 (2006).
399. M. M. Kim, J. D. Clinger, B. G. Masayeva, P. K. Ha, M. L. Zahurak, W. H. Westra, J. A. Califano, Mitochondrial DNA quantity increases with histopathologic grade in premalignant and malignant head and neck lesions. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8512–8515 (2004).
400. C.-S. Lin, S.-C. Chang, L.-S. Wang, T.-Y. Chou, W.-H. Hsu, Y.-C. Wu, Y.-H. Wei, The role of mitochondrial DNA alterations in esophageal squamous cell carcinomas. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **139**, 189-197.e4 (2010).
401. K. L. Hertweck, S. Dasgupta, The Landscape of mtDNA Modifications in Cancer: A Tale of Two Cities. *Front. Oncol.* **7** (2017), doi:10.3389/fonc.2017.00262.
402. M. Brandon, P. Baldi, D. C. Wallace, Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene*. **25**, 4647–4662 (2006).
403. A. Chatterjee, E. Mambo, D. Sidransky, Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*. **25**, 4663–4674 (2006).
404. O. Warburg, On the Origin of Cancer Cells. *Science*. **123**, 309–314 (1956).
405. W.-X. Zong, J. D. Rabinowitz, E. White, Mitochondria and Cancer. *Molecular Cell*. **61**, 667–676 (2016).
406. S. Matoba, J.-G. Kang, W. D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P. J. Hurley, F. Bunz, P. M. Hwang, p53 regulates mitochondrial respiration. *Science*. **312**, 1650–1653 (2006).
407. K. Książkowska-Łakoma, M. Żyła, J. R. Wilczyński, Mitochondrial dysfunction in cancer. *Prz Menopauzalny*. **13**, 136–144 (2014).

408. S. Vyas, E. Zaganjor, M. C. Haigis, Mitochondria and Cancer. *Cell*. **166**, 555–566 (2016).
409. P. Maycotte, A. Marín-Hernández, M. Goyri-Aguirre, M. Anaya-Ruiz, J. Reyes-Leyva, P. Cortés-Hernández, Mitochondrial dynamics and cancer. *Tumour Biol*. **39**, 1010428317698391 (2017).
410. G. Arismendi-Morillo, Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **41**, 2062–2068 (2009).
411. A. Lièvre, C. Chapusot, A.-M. Bouvier, F. Zinzindohoué, F. Piard, P. Roignot, L. Arnould, P. Beaune, J. Faivre, P. Laurent-Puig, Clinical Value of Mitochondrial Mutations in Colorectal Cancer. *JCO*. **23**, 3517–3525 (2005).



## Résumé:

Le plasma transporte des cellules sanguines avec un mélange de composés, y compris les nutriments, déchets, anticorps, et messagers chimiques...dans tout l'organisme. Des facteurs non solubles tels que l'ADN circulant et les vésicules extracellulaires ont récemment été ajoutés à la liste de ces composants et ont fait l'objet d'études approfondies en raison de leur rôle dans la communication intercellulaire. Or, l'ADN circulant (ADNcir) est composé de fragments d'ADN libres ou associés à d'autres particules, libérés par tous les types cellulaires. Cet ADN est non seulement de l'ADN génomique mais aussi de l'ADN mitochondrial extra-chromosomique. De nombreux travaux réalisés au cours des dernières années indiquent que l'analyse quantitative et qualitative de l'ADNcir représente une avancée dans les applications cliniques en tant que biomarqueur non invasif de diagnostic, de pronostic et de suivi thérapeutique. Cependant, malgré l'avenir prometteur de cet ADNcir dans les applications cliniques, notamment en oncologie, les connaissances sur ses origines, sa composition et ses fonctions qui pourraient pourtant permettre d'optimiser considérablement sa valeur diagnostique, font encore défaut.

Le principal objectif de ma thèse a été d'identifier et de caractériser les propriétés structurales de l'ADN extracellulaire d'origine mitochondrial. En examinant l'intégrité de cet ADN, ainsi que la taille et la densité des structures associées, ce travail a révélé la présence de particules denses d'une taille supérieure à 0,2 µm contenant des génomes mitochondriaux complets et non fragmentés. Nous avons caractérisé ces structures notamment par microscopie électronique et cytométrie en flux et nous avons identifié des mitochondries intactes dans le milieu extracellulaire *in vitro* et *ex-vivo* (dans des échantillons de plasma d'individus sains). Une consommation d'oxygène par ces mitochondries a été détectée par la technique du Seahorse, suggérant qu'au moins une partie de ces mitochondries extracellulaires intactes pourraient être fonctionnelles.

Par ailleurs, j'ai participé à d'autres travaux réalisées dans l'équipe, dont 1- une étude visant à évaluer l'influence des paramètres pré-analytiques et démographiques sur la quantification d'ADNcir d'origine nucléaire et mitochondrial sur une cohorte composée de 104 individus sains et 118 patients atteints de cancer colorectal métastatique, 2- une étude dont l'objectif était d'évaluer l'influence de l'hypoxie sur le relargage de l'ADN circulant *in vitro* et *in vivo*, et 3- une étude visant à évaluer le potentiel de l'analyse de l'ADN circulant dans le dépistage et la détection précoce du cancer.

Ce manuscrit présente une synthèse récente de la littérature sur l'ADNcir, ses différents mécanismes de relargage, qui vont de pair avec la caractérisation structurale de cet ADN, ses aspects fonctionnels et ses différentes applications en cliniques. De plus, cette thèse apporte des connaissances nouvelles sur la structure de l'ADN mitochondrial extracellulaire tout en ouvrant de nouvelles pistes de réflexion notamment sur l'impact que pourrait avoir la présence de ces structures circulantes sur la communication cellulaire, l'inflammation et des applications en clinique.

## Abstract:

Plasma transports blood cells with a mixture of compounds, including nutrients, waste, antibodies, and chemical messengers...throughout the body. Non-soluble factors such as circulating DNA and extracellular vesicles have recently been added to the list of these components and have been the subject of extensive research due to their role in intercellular communication. Circulating DNA (cirDNA) is composed of cell-free and particle-associated DNA fragments, which can be released by all cell types. CirDNA is derived not only from genomic DNA but also from extrachromosomal mitochondrial DNA. Numerous studies carried out lately indicate that the quantitative and qualitative analysis of cirDNA represents a breakthrough in clinical applications as a non-invasive biomarker for diagnosis, prognosis and therapeutic follow-up. However, despite the promising future of cirDNA in clinical applications, particularly in oncology, knowledge regarding its origins, composition and functions, that could considerably optimize its diagnostic value, is still lacking.

The main goal of my thesis was to identify and characterize the structural properties of extracellular DNA of mitochondrial origin. By examining the integrity of this DNA, as well as the size and density of associated structures, this work revealed the presence of dense particles larger than 0.2 µm containing whole mitochondrial genomes. We characterized these structures by electron microscopy and flow cytometry and identified intact mitochondria in the extracellular medium *in vitro* and *ex vivo* (in plasma samples from healthy individuals). Oxygen consumption by these mitochondria was detected by the Seahorse technology, suggesting that at least some of these intact extracellular mitochondria may be functional.

In addition, I contributed to other studies carried out in the team, such as studies aiming at evaluating (1) the influence of pre-analytical and demographic parameters on the quantification of nuclear and mitochondrial cirDNA on a cohort of 104 healthy individuals and 118 patients with metastatic colorectal cancer, (2) the influence of hypoxia on the release of cirDNA *in vitro* and *in vivo*, and (3) the potential of cirDNA analysis in the early detection and screening of cancer.

This manuscript presents a recent review on cirDNA and its different mechanisms of release, which go hand in hand with the structural characterization of this DNA, its functional aspects and its clinical applications. In addition, this thesis provides new knowledge on the structure of extracellular mitochondrial DNA and opens up new avenues for reflection, particularly on the potential impact that could have those circulating mitochondria on cell-cell communication, inflammation and clinical applications.