



UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2024

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN MÉDECINE

**Mise au point de l'étude de la signature interféron
par technologie Nanostring au CHU de Lille**

Présentée et soutenue publiquement le 07/06/2024 à 18h
au Pôle Formation
par **Grégoire MIAUX**

JURY

Présidente :

Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Assesseur :

Monsieur le Professeur Eric HACHULLA

Directrices de thèse :

Madame le Docteur Aurore COLLET

Madame le Docteur Julie DEMARET

Avertissement

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Sommaire

Avertissement	2
Sommaire	3
Abréviations	6
Introduction	9
1. Les interférons	9
2. Les interféronopathies	12
a. Interféronopathies héréditaires	12
b. Interféronopathies acquises	14
c. Traitements.....	15
3. Méthode de quantification des interférons	18
a. Microneutralisation de l'effet cytopathique	19
b. Single-molecule array (SIMOA)	20
c. Signature interféron	22
4. Intérêt de la quantification des interférons	28
5. Objectifs du travail	31
Mise au point de la technique	32
1. Type de tube utilisé pour le prélèvement sanguin	32
a. Généralités	32
b. Stabilité de l'ARN	34
c. Qualité de l'ARN	35
d. Étude comparative lilloise	38

e. Synthèse.....	39
2. Normalisation et gènes de ménage.....	40
a. Choix des gènes de ménage	41
b. Choix du type de normalisation.....	42
3. Témoins sains et seuil de positivité.....	44
4. Contrôles positifs	46
Etudes comparatives des différents paramètres d'analyse.....	50
1. Contenant.....	50
a. EDTA Lille versus PAXgene Lyon.....	50
b. PAXgene Lille versus PAXgene Lyon	52
3. Type de normalisation : Logicielle versus individuelle.....	55
a. Etude comparative des scores interféron calculés avec une normalisation logicielle à Lille, une normalisation individuelle à Lille et une normalisation individuelle à Lyon.....	55
b. Etude comparative du score interféron du contrôle positif entre une normalisation logicielle et une normalisation individuelle	56
4. Comparaison des témoins négatifs Lillois versus témoins négatifs Lyonnais	58
a. Comparaison pour chaque ISG entre les témoins de Lille et de Lyon	58
b. Comparaison des scores interféron réalisés à Lille avec des témoins Lillois versus réalisés à Lille avec des témoins Lyonnais	59
5. Comparaison entre Lille et Lyon dans les mêmes conditions d'analyse	60
6. Conclusion sur les conditions d'analyse.....	62
Démarrage de l'activité au CHU de Lille	63
1. Pré-analytique.....	63

a. Information aux prescripteurs du CHU de Lille et flashinfo pour les prescripteurs extérieurs.....	63
b. Catalogue des analyses / Bon de demande.....	64
c. Acheminement / gestion des tubes PAXgene	65
2. Analytique	65
a. Extraction d'ARN	66
b. Technique Nanostring.....	67
3. Post-analytique.....	68
a. Validation biologique.....	68
b. Facturation.....	71
Retour d'expérience	72
1. Résultats patients.....	72
2. Nombre de demandes depuis le démarrage d'activité.....	75
Discussion	77
Conclusion et perspectives	87
Bibliographie.....	90
Annexes.....	96

Abréviations

Ac	Anticorps
ADNc	ADN complémentaire
Ag	Antigène
AGS	Syndrome d'Aicardi-Goutières
ALR	AIM2-like receptors
ARNm	ARN messagers
AUC	Area under the curve
BHN	B hors nomenclature
CBP	Centre de biologie pathologie génétique
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
CH	Centre hospitalier
CHU	Centre hospitalier universitaire
CLASI	Cutaneous lupus area and severity index
COFRAC	Comité français d'accréditation
CQ	Contrôle qualité
CQI	Contrôle qualité interne
CV	Coefficient de variation
CV%	Coefficient de variation en pourcentage
DM	Dermatomyosite
DS	Déviation standard (écart-type)
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EFS	Etablissement français du sang
EIL	Echanges inter laboratoires.

ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
fc	Fold change
FDR	False discovery rate
HLA	Antigène des leucocytes humains
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IC	Intervalle de confiance
IFN	Interféron
IFNAR	Interferon α/β receptor
IgIV	Immunoglobuline en intraveineux
IL	Interleukine
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Gène stimulé par les interférons
JAK	Janus kinase
LCS	Liquide cérébro-spinal
LS	Lupus systémique
NET	Neutrophil extracellular trap
PCR	Polymérase chain reaction
pH	Potentiel hydrogène
PHA	Phyohémagglutinine
PM	Polymyosite
PNN	Polynucléaire neutrophile
POLR2A	RNA polymerase II subunit A
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PRASS	Proteasome-associated auto-inflammatory syndrome
PRR	Pattern recognition receptors

RIN	RNA integrity number
RLR	RIG-I-like receptors
ROC	Receiver operating characteristic
RQ	Quantité relative
RT	Rétro-transcription
SAVI	Sting associated vasculopathy with onset in infancy
SD	Standard deviation (écart-type)
Se	Sensibilité
SGS	Syndrome de Goujerot-Sjögren
SIMOA	Single-molecule array
SMS	Syndrome de Singleton-Merten
Sp	Spécificité
SPENCD	Spondyloenchondrodysplasie
SSc	Sclérodémie systémique
TREX1	3' repair exonuclease 1
TYK2	Tyrosine kinase 2 (faisant partie de la famille JAK)
URT	Unity real time (logiciel permettant de suivre les CQ)
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

Introduction

1. Les interférons

Les interférons (IFN) sont une famille de cytokines notamment impliquées dans la réponse antivirale (1). Les IFN sont répartis en trois catégories : type 1, type 2 et type 3. Les IFN ont tout d'abord été séparés sur la base de leur sensibilité au pH, entre IFN de type 1 (stables à pH acide) et de type 2 (dégradés à pH acide) (2,3). L'analyse génomique a permis de découvrir plus tard la famille des IFN de type 3 (IFN λ) (4,5). Au total, il existe aujourd'hui 21 molécules IFN : 16 IFN de type 1 (12 IFN α , 1 IFN β , 1 IFN ϵ , 1 IFN κ , et 1 IFN ω), 1 IFN de type 2 (IFN γ) et 4 IFN de type 3 (IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 et IFN λ 4) qui ont plusieurs fonctions essentielles. Nous allons décrire en particulier les mécanismes impliqués dans la synthèse des IFN de type 1, en prenant l'exemple de la réaction à une infection virale (Figure 1).

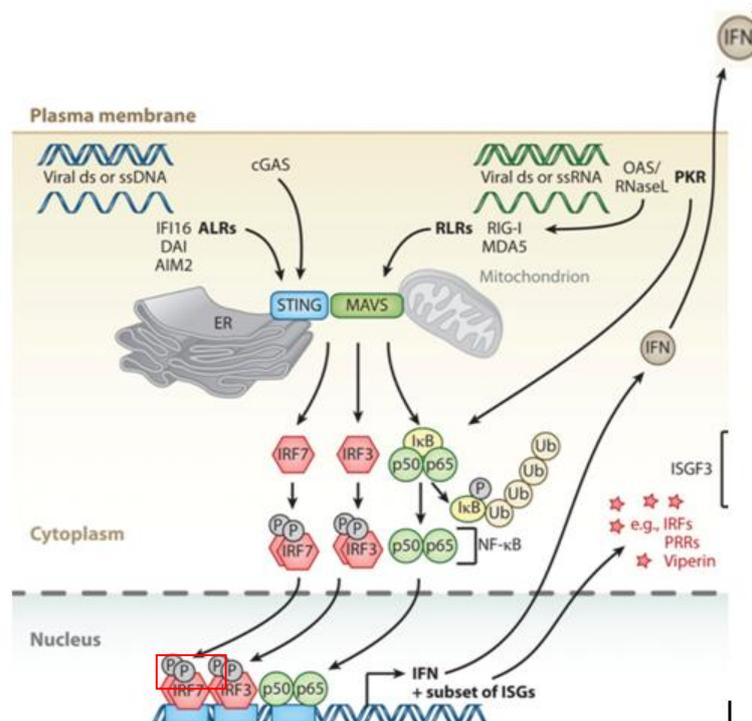


Figure 1 : Reconnaissance des séquences d'acides nucléiques viraux et activation de la synthèse des interférons. PRR = pattern recognition receptors. ALR = AIM2-like receptors. RLR = RIG-I-like receptors. IRF = Interferon Regulatory Factors. D'après Schneider et al. (6)

Lors d'une infection virale, les récepteurs cytosoliques de l'immunité innée (*pattern recognition receptors*, PRR) vont détecter la présence d'ADN ou d'ARN viral simple ou double brin dans le cytosol de la cellule infectée. Le signal est ensuite transduit dans le noyau afin d'activer des facteurs de transcription (*Interferon regulatory factors*, IRF) qui vont augmenter la synthèse des IFN, puis aboutir à leur sécrétion en extracellulaire.

Toutes les cellules de l'organisme peuvent produire de l'IFN de type 1. Cependant, durant une infection, ce sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui sécrètent la majorité de l'IFN α .

Les IFN de type 1 ont une action antivirale directe, mais également indirecte en stimulant l'expression des gènes appelés gènes stimulés par les interférons (ISG), qui produisent notamment d'autres effecteurs antiviraux.

Cette action indirecte est initiée par la liaison de l'IFN à son récepteur IFNAR présent à la membrane des cellules, provoquant son hétérodimérisation. Les récepteurs aux IFN de type 1 et celui pour les IFN de type 2 sont spécifiques de leur famille (7). L'hétérodimérisation du récepteur à la membrane cellulaire active une Janus Kinase (JAK), qui initie la cascade de signalisation intra-cellulaire JAK/STAT (8,9). Cette cascade aboutit, dans le noyau, à l'activation de la transcription d'une centaine d'ISG (10) (Figure 2).

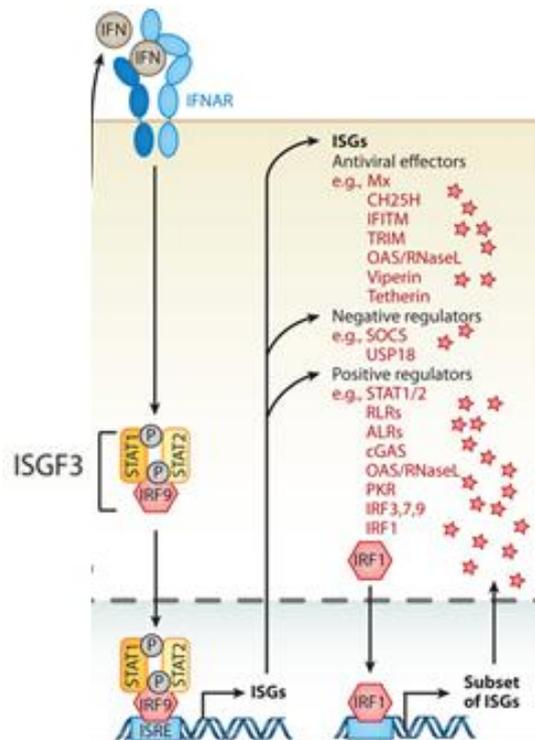


Figure 2 : Voie de signalisation intra-cellulaire médiée par les interférons de type 1 et activation de la synthèse des ISG, d'après Schneider et al. (6)

Les ISG sont donc des gènes, dont la transcription en ARN messagers (ARNm) augmente avec la réponse aux IFN qui activent les promoteurs de ces gènes. La transcription de ces ISG entraîne la synthèse de nombreuses protéines classées en effecteurs antiviraux, en régulateurs positifs de la réponse aux IFN, et en régulateurs négatifs. Parmi les effecteurs, plusieurs ISG contrôlent directement les infections virales, bactériennes et parasitaires en ciblant les signalisations et les fonctions clés requises pour la survie du pathogène. Parmi les régulateurs positifs, on peut citer les PRR, les IRF, JAK2 et STAT1/2 qui, bien que présents dans la cellule à l'état basal, sont aussi des ISG et renforcent la réponse cellulaire médiée par l'IFN. Enfin, des ISG vont être responsables d'un rétro-contrôle négatif sur la signalisation de l'IFN, afin de faciliter le retour à l'homéostasie de la cellule. D'autres ISG codent pour des protéines pro-apoptotiques, qui vont conduire à la mort cellulaire sous certaines conditions (6,11).

2. Les interféronopathies

Bien que la sécrétion d'IFN de type 1 soit essentielle pour le développement du système immunitaire et pour l'élimination des cellules infectées par des virus, une activation trop importante de cette voie peut être délétère (12). Les pathologies liées à une augmentation chronique inadaptée de l'IFN de type 1 dans le sang sont regroupées sous le terme d'interféronopathies. Une interféronopathie peut être héréditaire, donc due à une mutation constitutionnelle dans la voie de signalisation des IFN, ou liée à une dysrégulation associée à certaines pathologies auto-immunes (lupus systémique (LS), dermatomyosite (DM), syndrome de Goujerot-Sjögren (SGS), sclérodermie systémique (SSc), polyarthrite rhumatoïde (PR)).

a. Interféronopathies héréditaires

Concernant les pathologies héréditaires impliquant la mutation de gènes impliqués dans la production d'IFN de type 1, ont été décrits : le syndrome d'Aicardi-Goutières (AGS), le *Sting associated vasculopathy with onset in infancy* (SAVI), le lupus engelure, la spondyloenchondrodysplasie (SPENCD), le *proteasome-associated auto-inflammatory syndrome* (PRASS), et le syndrome de Singleton-Merten (SMS). Il est aujourd'hui décrit une quarantaine de gènes responsables d'interféronopathies de type 1, avec un large spectre d'expression phénotypique (13) (Figure 3).

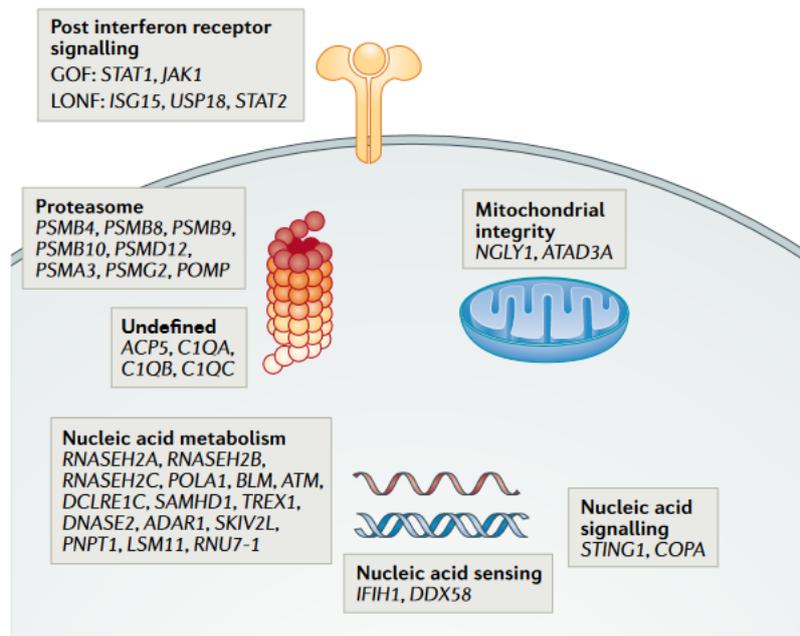


Figure 3 : Classification des mutations génétiques associées aux interféronopathies selon les fonctions cellulaires touchées, d'après Crow et al. (13)

Nous allons détailler l'exemple de la 1^{ère} interféronopathie héréditaire décrite : l'AGS. Classiquement, les enfants atteints présentent des troubles progressifs du système nerveux central avec une spasticité bilatérale et une dystonie, une microcéphalie acquise, et une progression rapide vers le décès. Ils présentent également une lymphocytose chronique dans leur liquide cérébro-spinal (LCS) (14). Ce syndrome est associé avec une élévation du taux d'IFN de type 1 dans le LCS comme dans le sérum (15). Nous allons décrire l'exemple de la première mutation génétique découverte à l'origine de l'AGS : celle du gène *TREX1*. L'enzyme TREX1 est une exonucléase qui dégrade l'ADN d'origine endogène situé au niveau cytosolique. Cela permet de masquer les acides nucléiques endogènes aux PRR afin d'éviter la production d'IFN de type 1 de façon constitutive en l'absence d'infection virale. Dans l'AGS, la mutation perte de fonction de *TREX1* entraîne une augmentation des acides nucléiques endogènes, indépendamment d'une infection virale et donc une production continue d'IFN de type 1 (16)

Depuis, d'autres mutations génétiques ont été découvertes, impliquant différents mécanismes augmentant la sécrétion d'IFN α .

b. Interféronopathies acquises

Certaines pathologies auto-immunes, de part leur physiopathologie et leur terrain génétique sous-jacent, impliquent une dérégulation de la voie de signalisation des IFN, aboutissant à un phénotype d'interféronopathie. C'est le cas du LS dont certains variants de gènes de susceptibilité sont communs avec ceux mutés dans l'AGS (17–19), de la DM (20), du SGS et de la PR (21). Le lien entre interféronopathie et SSc est également en train d'émerger (22).

Nous allons détailler l'exemple du LS, afin de décrire les mécanismes aboutissant au phénotype d'interféronopathie. Dans le LS, l'excès d'apoptose ou le défaut de clairance des corps apoptotiques va entraîner une source d'auto-antigènes (Ag) nucléaires libérés dans la circulation sanguine. Les auto-anticorps (Ac) se fixent aux auto-Ag nucléaires pour former des complexes immuns. Ces derniers, par activation de la voie classique du complément, accentuent les lésions tissulaires et donc amplifient la source d'auto-Ag nucléaires. De même, les polynucléaires neutrophiles (PNN) recrutés par chimiotactisme, vont être une source importante d'auto-Ag nucléaires par phénomène de « Neutrophil Extracellular Trap » (NET) en excès. La NETose est une mort cellulaire propre au PNN, c'est un processus rapide et actif de désintégration de sa membrane nucléaire et de sa chromatine. Cela aboutit à la formation de longs filaments de chromatine couplés au contenu des granules qui prennent la forme de filets. Ces auto-Ag vont entraîner une hyperactivation des cellules dendritiques plasmacytoïdes, ainsi que des PNN, par les PRR et par les

récepteurs au fragment constant des IgG (Fcγ-R), ce qui va entraîner une hyperproduction d' IFNα (23) (Figure 4)

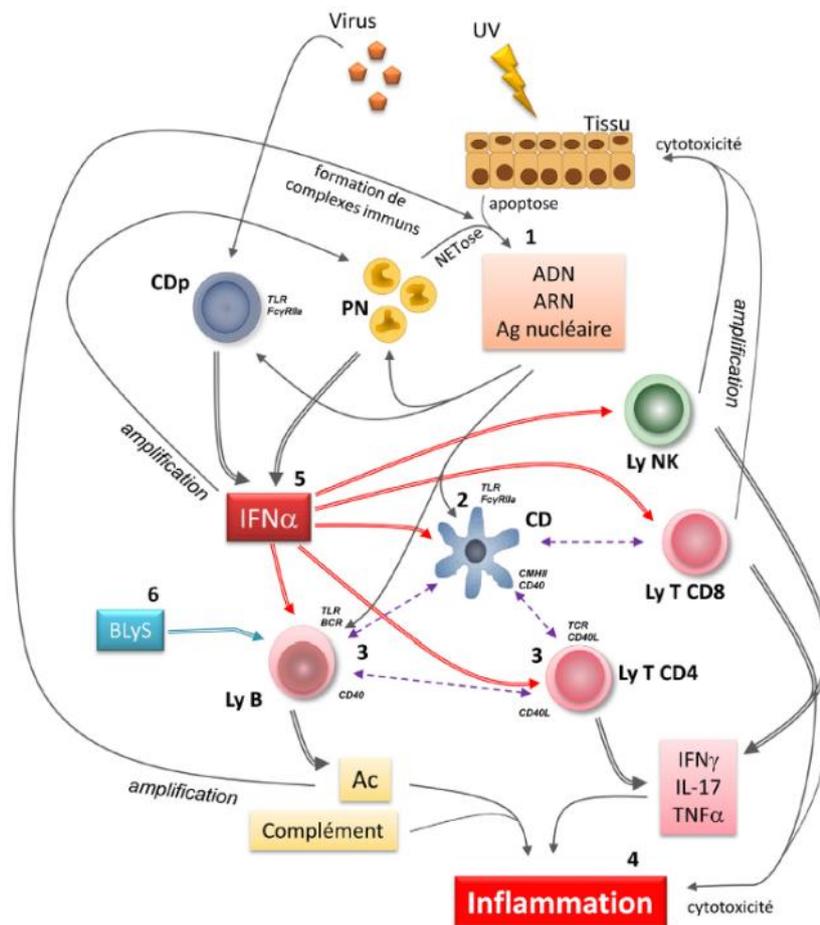


Figure 4 : Physiopathologie du lupus systémique et mécanisme d'hyperproduction d'IFNα. D'après Mathian et al. (23)

c. Traitements

Il existe des traitements permettant de limiter la production d'IFN de type 1 ou la réponse cellulaire aux IFN. Nous allons nous y intéresser par classe médicamenteuse comme énuméré dans la Figure 5 à savoir : les anti-rétroviraux, les inhibiteurs de la « Cyclic GMP-AMP synthase » (cGAS), les Ac anti-IFNα et anti-récepteur de l'IFN de type 1, les inhibiteurs de JAK et les Ac anti-interleukine. Pour chaque cas, nous allons voir le mécanisme d'action, l'impact clinique et biologique.

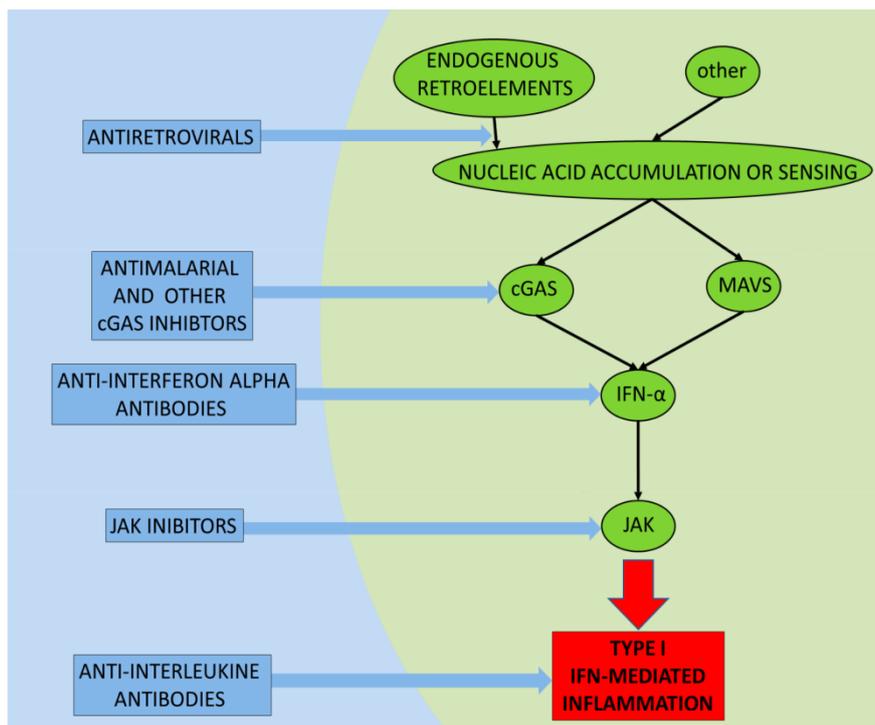


Figure 5 : Mécanismes d'action des différents traitements permettant de moduler la voie de l'interféron. D'après Tonduti et al. (24)

- Les anti-rétroviraux (notamment les inhibiteurs de transcriptase inverse) permettent d'inhiber la synthèse des acides nucléiques, qu'ils soient d'origine virale ou endogène. Or, les acides nucléiques endogènes cytosoliques jouent un rôle central dans les interféronopathies car, comme décrit précédemment, ils activent la voie de signalisation de l'IFN via leur reconnaissance par les PRR. Diminuer le nombre d'acides nucléiques endogènes permet donc de diminuer la production excessive et continue d'IFN de type 1 au cours des interféronopathies. Une étude a été réalisée chez 11 patients présentant un AGS, qui ont reçu une trithérapie comprenant 3 analogues nucléosidiques inhibiteurs de transcriptase inverse (zidovudine, lamivudine et abacavir) pendant 12 mois. Cela a permis une diminution du taux d'IFN α dans le sérum (sans information sur les symptômes cliniques) (25).

- La « Cyclic GMP-AMP synthase » (cGAS) est un composant de l'immunité innée faisant partie des PRR, destiné à reconnaître la présence d'ADN double brin dans le cytosol des cellules. Il active la voie cGAS-STING, qui stimule la production d'IFN.

Certains médicaments inhibiteurs de cGAS, comme l'hydroxychloroquine, inhibent la reconnaissance des acides nucléiques endogènes. Ils sont utilisés en traitement notamment dans le LS, et dans certaines interféronopathies génétiques.

- Le sifalimumab est un Ac monoclonal humain anti-IFN α qui permet de former des complexes et de neutraliser l'effet de l'IFN α avant qu'il ne se fixe sur ses récepteurs cellulaires. Il a été évalué dans le traitement du LS actif modéré à sévère ne répondant pas aux traitements classiques (26). L'étude montre une amélioration clinique significative et une diminution du taux d'IFN α sous traitement. Cependant, on note également une augmentation du risque de zona dans le groupe traité par sifalimumab. Le sifalimumab est encore en développement et a terminé la phase II d'essai clinique. L'anifrolumab, quant à lui, est un Ac anti-récepteur de l'IFN de type 1 (IFNAR1), il empêche l'IFN de se lier à son récepteur par compétition. L'anifrolumab induit également l'internalisation de l'IFNAR1, ce qui diminue la quantité d'IFNAR1 présents à la surface cellulaire. Cela permet donc le blocage de l'initiation de la voie de signalisation intra-cellulaire médiée par l'IFN α . Il est indiqué en traitement additionnel chez les patients atteints d'un LS modéré à sévère actif avec présence d'auto-Ac malgré un traitement standard (27).

- Les vaccins kinoïdes sont des vaccins qui visent à faire produire par l'organisme du patient des anticorps de haute affinité dirigés contre les cytokines. Le kinoïde, qui représente le principe actif du vaccin, est un immunogène capable d'induire la synthèse d'auto-anticorps contre une cytokine donnée. Le kinoïde est donc constitué de la cytokine contre laquelle on veut induire la production d'Ac chez le patient (dans notre cas : l'IFN α), et d'une protéine porteuse qui a pour rôle de la rendre immunogène. Ainsi, des vaccins kinoïdes ont été préparés afin d'entraîner la synthèse par le patient d'anticorps anti-IFN α (28). La phase d'essai clinique 2b

consistant à évaluer l'efficacité et la sécurité du vaccin kinoïde IFN α chez des patients lupiques est terminée. Les résultats de l'étude montrent la production d'anti-IFN α chez 91% des patients, ainsi qu'une réduction significative de la signature interféron à 36 semaines, mais il n'y a pas de différence significative de réponse au traitement entre le groupe traitement et le groupe placebo (29).

- Les inhibiteurs de JAK permettent de bloquer la voie de signalisation intracellulaire en réponse aux IFN. Ces médicaments, comme par exemple le ruxolitinib ou le baricitinib, bloquent des Janus kinases telles que JAK1 et TYK2, qui ont un rôle central dans la voie de signalisation de réponse aux IFN de type 1. Des études ont montré qu'ils permettent de diminuer la réponse inflammatoire et les symptômes cliniques chez les patients présentant une interféronopathie (30–32).

- Les anticorps anti-interleukines (IL) permettent de bloquer les acteurs de l'inflammation médiée par la réponse aux IFN. L'IL-6 est une cytokine produite par la cascade de l'IFN de type 1. Un anticorps anti-récepteur de l'IL6, le tocilizumab, a été testé chez un patient présentant un AGS. Le tocilizumab a permis une régression de la vasculopathie cérébrale ainsi qu'une diminution des marqueurs de l'inflammation (33).

3. Méthode de quantification des interférons

Les interféronopathies sont caractérisées sur le plan biologique par une augmentation du taux circulant d'IFN de type 1. La concentration sérique en IFN est de l'ordre du femtogramme par millilitre (fg/mL), que ce soit à l'état basal ou après élévation du taux suite à une infection virale ou à une interféronopathie. Or, les techniques conventionnelles de dosage en ELISA ne sont pas assez sensibles pour détecter une concentration aussi faible de cytokine dans le sang. D'autres

techniques ont donc été développées afin de pouvoir quantifier directement ou indirectement l'IFN circulant.

a. Microneutralisation de l'effet cytopathique

Ce test consiste en la culture de cellules sensibles à l'IFN, en présence de différentes dilutions de sang du patient et d'un virus cytopathique (Figure 6). En l'absence d'IFN, le virus cytopathique va infecter toutes les cellules de la culture et entraîner leur lyse. L'IFN présent dans le sang du patient va empêcher l'infection virale et ainsi protéger les cellules de la lyse.

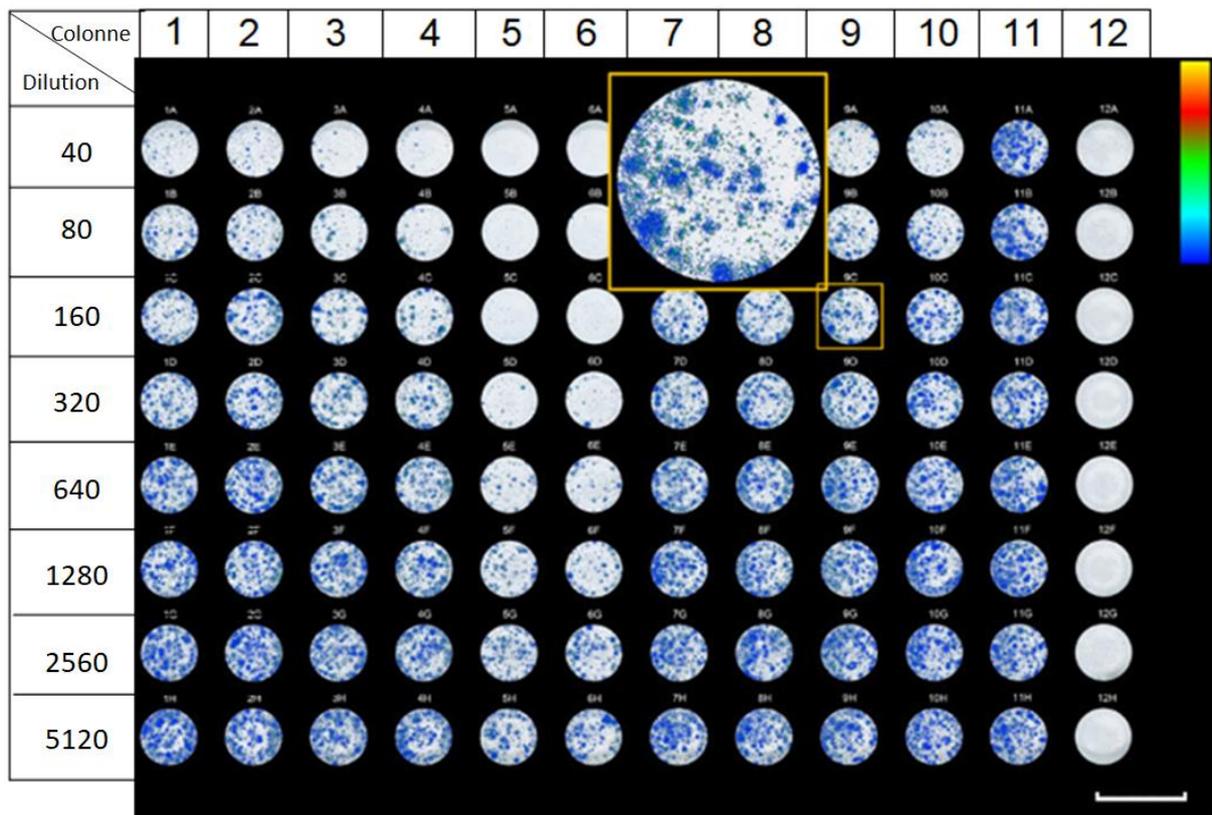


Figure 6 : Plaque de neutralisation d'effet cytopathique. Les colonnes 1 à 10 sont des tests de patients, la colonne 11 est le contrôle positif, et la colonne 12 est le témoin négatif. Les puits des colonnes 1 à 11 comprennent une culture cellulaire infectée par un virus cytopathique. Pour les colonnes patients de 1 à 10, de haut en bas, est ajouté le sang du patient à différentes dilutions (de 40 à 5120). Dans les puits, la couleur bleue correspond à la lyse due à l'effet cytopathique viral sur la culture cellulaire, et la couleur blanche à une culture cellulaire saine. D'après Lin et al. (34)

Il est alors possible d'en déduire le taux d'IFN dans le sang du patient en fonction de la dilution de sang à partir de laquelle on n'obtient plus que 50% de cellules lysées en culture.

Cependant, ce test n'est pas spécifique des IFN de type 1, il est long et lourd techniquement (plusieurs cultures virales, différentes dilutions du sang du patient), et ne rend qu'un résultat semi quantitatif (par correspondance d'un titrage).

b. Single-molecule array (SIMOA)

La technique Single-molecule array (SIMOA) est une technologie de dosage direct dérivé de l'ELISA, par formation de complexes immunitaires dits en sandwich à la surface de billes paramagnétiques (Figure 7).

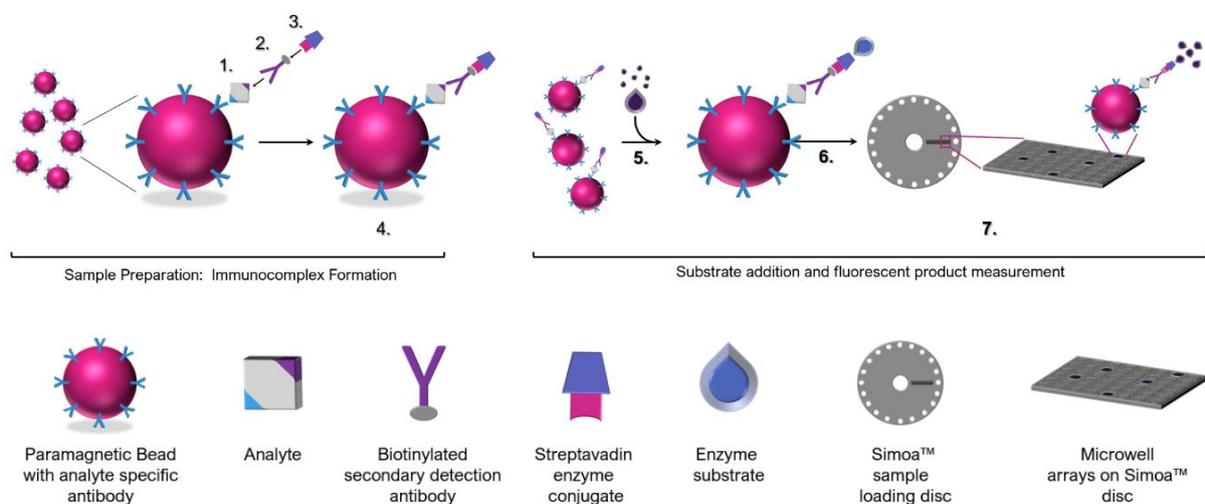


Figure 7 : Les différentes étapes du dosage en technique Single-molecule array (SIMOA) (35).

L'anticorps de capture à la surface des billes est très spécifique de l'IFN α . Il détecte tous les types d'IFN α et ne croise pas avec les autres catégories d'IFN. Un second anticorps biotinylé est ajouté et va se coupler à des conjugués d'enzyme streptavidine. Les billes sont ensuite mélangées avec un substrat enzymatique afin de pouvoir générer un signal fluorescent, et déposées dans des disques de

chargement d'échantillons. Le mélange va migrer dans une microplaque contenant une centaine de milliers de puits d'une taille de 40 fL, capables d'isoler une seule bille par puits. Le signal fluorescent ainsi généré est confiné dans le puits, et est produit par une seule bille. Une caméra visualisant tous les puits de la microplaque permet de quantifier le signal fluorescent émis de manière simultanée (36).

Ainsi, le SIMOA est très sensible et permet une quantification d'IFN α de l'ordre du fg/mL, pouvant mettre en évidence une différence significative de taux d'IFN α sérique entre les patients présentant une interféronopathie et les témoins sains, comme illustré dans la Figure 8 (37).

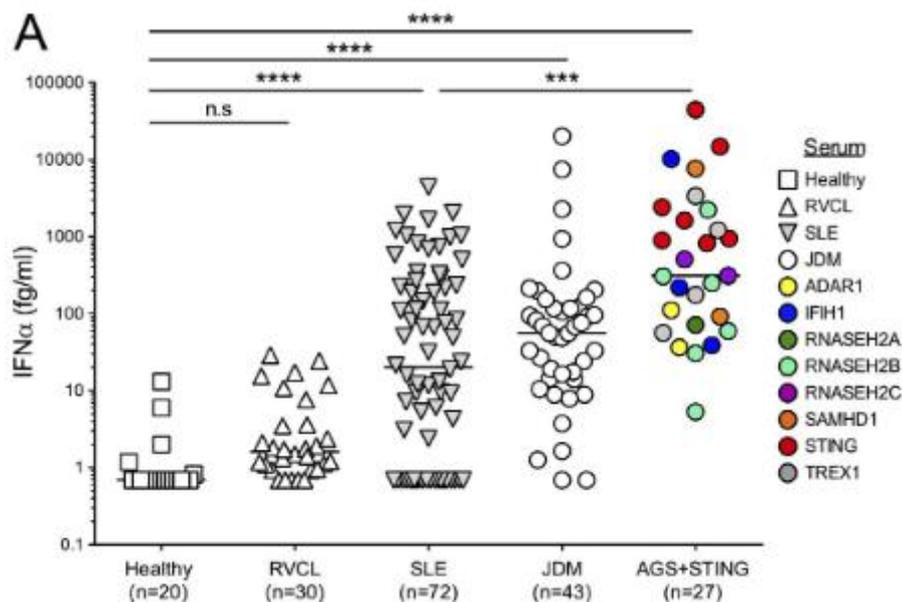


Figure 8 : Quantification d'IFN α par SIMOA par groupes de patients : population de témoins sains (n=20), patients présentant une rétinopathie vasculaire avec leucodystrophie cérébrale (RVCL) (n=30), un LS (n=72), une DM (n=43), une interféronopathie héréditaire type AGS ou STING (n=27), d'après Rodero et al. (37)

Cependant, c'est une technique très coûteuse qui n'est pas toujours réalisable pour le diagnostic et le suivi en routine.

c. Signature interféron

Principe et définition

Une solution alternative est une mesure indirecte des IFN circulants en passant par la quantification des ISG. Pour rappel, les ISG sont des gènes dont la transcription en ARNm est activée par la réponse cellulaire aux IFN. L'expression des ISG par les leucocytes circulants est corrélée à la concentration d'IFN. Il y a donc une augmentation significative de l'expression des ISG dans les interféronopathies comme le montre la Figure 9 pour des patients atteints d'AGS comparés à des témoins sains (38).

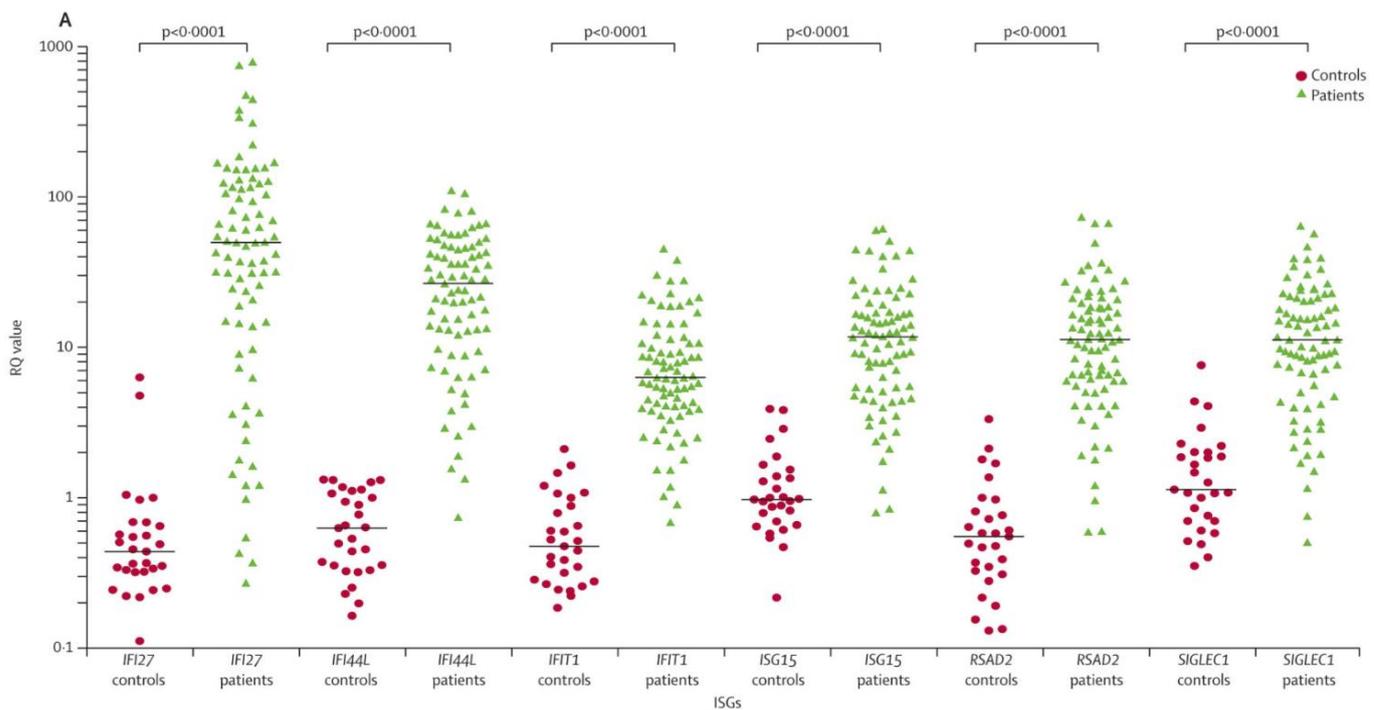


Figure 9 : Quantification sur sang total d'ARNm de 6 ISG (IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2, SIGLEC1) chez des patients présentant un syndrome d'Aicardi-Goutières (n=82) et des témoins sains (n=29). Comparaison de la quantification relative (RQ) entre patients AGS et témoins sains pour chaque ISG. D'après Rice et al. (38)

Un score reposant sur la quantification de différents ARNm des ISG a été proposé, appelé le « score interféron ». Il est défini comme le rapport entre la médiane d'expression de différents ISG du patient testé par rapport à celle d'un pool de

témoins sains. Le score interféron est significativement augmenté chez les patients présentant une interféronopathie et est donc utile au diagnostic (Figure 10).

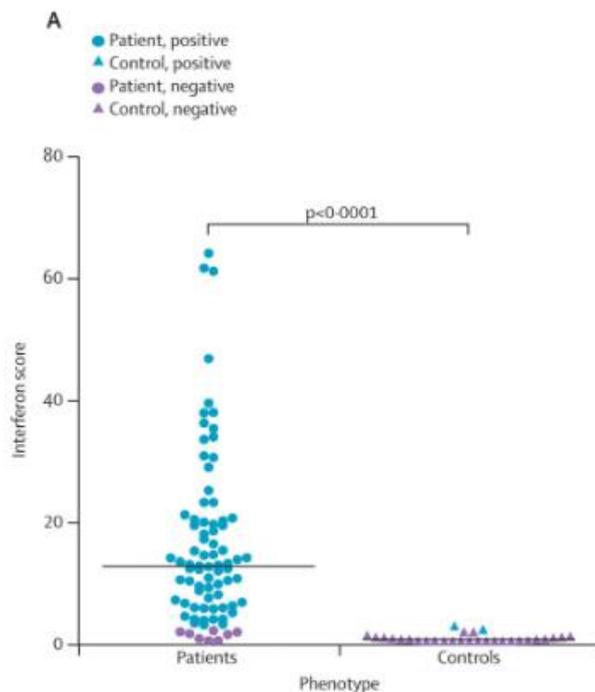


Figure 10 : Score interféron chez des patients avec un AGS et des témoins sains. Dans cette étude, le score interféron a été calculé avec un panel de 6 ISG. Le seuil de positivité du score interféron a été établi à 2.466 (= moyenne des scores interféron chez les témoins sains + 2DS). D'après Rice et al. (38).

Choix des ISG étudiés

Comme expliqué précédemment, il existe une centaine d'ISG. Le score interféron étant un rapport de médianes de quantification d'ISG entre patient et témoins, ce score est théoriquement réalisable avec n'importe quel nombre d'ISG à quantifier. Il faut donc trouver un compromis entre le coût et la lourdeur technique des quantifications d'ARNm qui augmentent avec le nombre d'ISG, et les performances du score (sensibilité (Se), spécificité (Sp), robustesse ...).

Pour cela, les ISG permettant de discriminer au mieux les patients atteints d'interféronopathie des témoins sains ont été recherchés. Cette différence entre patients et témoins peut être exprimée sous la forme de *fold change* (fc), qui est le rapport du niveau moyen d'expression d'un gène dans une condition par rapport à une autre. Il est généralement exprimé en \log_2 (logarithme en base 2). Une équipe a

étudié les ISG de patients atteints de LS par micropuce, puis a calculé le fc pour chaque ISG entre patients LS et témoins sains (39,40) (Figure 11). Au plus le \log_2 fc est élevé, au plus il existe une augmentation d'expression de l'ISG chez les patients LS par rapport aux témoins sains.

Probe ID	Gene title	Gene symbol	p value	\log_2 fc	q value (FDR)	Probe prevalence (% fc \geq 2)
202411.at	Interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	2.69E-08	4.40	0.00001	70.73
219519.s.at	Sialic acid binding 1g-like lectin 1, sialoadhesin	SIGLEC1	1.79E-08	3.40	0.00001	63.41
214059.at	Interferon-induced protein 44	IFI44	2.94E-08	3.33	0.00001	70.73
204415.at	Interferon, alpha-inducible protein 6	IFI6	9.71E-12	3.13	0.00000	80.49
213797.at	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	1.11E-06	3.10	0.00013	68.29
242625.at	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	RSAD2	9.45E-08	3.04	0.00003	65.85
204439.at	Interferon-induced protein 44-like	IFI44L	5.79E-07	2.94	0.00008	68.29
219211.at	Ubiquitin specific peptidase 18	USP18	2.09E-07	2.66	0.00005	63.41
214453.s.at	Interferon-induced protein 44	IFI44	1.33E-06	2.55	0.00014	70.73
207329.at	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)	MMP8	8.90E-05	2.54	0.00219	60.98
202145.at	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	LY6E	1.80E-08	2.42	0.00001	60.98
212768.s.at	Olfactomedin 4	OLFM4	0.000652117	2.28	0.00847	60.98
202869.at	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	OAS1	4.70E-08	2.25	0.00002	68.29
231688.at	Transcribed locus	—	0.000279919	2.23	0.00474	63.41
44673.at	Sialic acid binding 1g-like lectin 1, sialoadhesin	SIGLEC1	9.90E-08	2.23	0.00003	56.10
208470.s.at	Haptoglobin /// haptoglobin-related protein	HP /// HPR	5.60E-07	2.22	0.00008	80.49
1555643.s.at	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	LILRAE	2.32E-09	2.21	0.00000	75.61
222154.s.at	Viral DNA polymerase-transactivated protein 6	LOC26010	1.31E-06	2.21	0.00014	63.41
206697.s.at	Haptoglobin	HP	5.16E-07	2.20	0.00008	73.17
242234.at	XIAP associated factor-1	XAF1	3.06E-08	2.17	0.00001	63.41
241869.at	Apolipoprotein L, 6	APOL6	2.86E-05	2.16	0.00102	78.05
235643.at	Sterile alpha motif domain containing 9-like	SAMD9L	1.08E-08	2.14	0.00001	82.93
206871.at	Elastase 2, neutrophil	ELA2	0.00014434	2.14	0.00305	58.54
215838.at	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	LILRA5	3.10E-07	2.13	0.00006	73.17
239979.at	—	—	2.59E-07	2.11	0.00005	63.41
218400.at	2',5'-oligoadenylate synthetase 3, 100 kDa	OAS3	1.27E-06	2.11	0.00014	65.85
203153.at	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFIT1	1.66E-05	2.11	0.00072	65.85
205552.s.at	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	OAS1	1.11E-08	2.10	0.00001	63.41
222816.s.at	Zinc finger, CCHC domain containing 2	ZCCHC2	1.56E-06	2.05	0.00015	78.05
205483.s.at	I5015 ubiquitin-like modifier	ISG15	2.07E-07	2.05	0.00004	63.41
227609.at	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	EPST11	3.85E-07	2.05	0.00006	65.85
203757.s.at	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	CEACAM6	8.59E-05	2.01	0.00215	48.78
237340.at	Solute carrier family 26, member 8	SLC26A8	1.25E-07	1.96	0.00003	60.98
205569.at	Lysosomal-associated membrane protein 3	LAMPS	3.51E-07	1.95	0.00006	60.98
211657.at	Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	CEACAM6	0.000687104	1.94	0.00878	60.98

Figure 11 : Exemples de *fold change* (fc) \log_2 des ISG (parmi les 40 testés dans l'étude) en fonction des sondes utilisées entre les patients présentant un LS et des témoins sains. Le « False Discovery Rate » = FDR est la proportion attendue de découvertes qui sont fausses. Il s'interprète comme le p, en empêchant l'inflation du risque α dans les tests statistiques multiples, D'après Yao et al. (39)

Une autre étude, réalisée chez des patients présentant un AGS, a retenu le sous-groupe des 6 ISG les plus exprimés par rapport aux témoins sains afin de calculer le score interféron. Ces ISG retenus sont : IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2 et SIGLEC1 (41). Depuis cette étude princeps, la plupart des travaux à propos de la signature IFN utilisent ces 6 ISG pour le calcul du score IFN.

Méthodes de quantification des ISG

La méthode de quantification des ARNm-ISG considérée comme le gold standard pour étudier la signature interféron est la Polymerase Chain Reaction (PCR) quantitative après rétro-transcription (RT-qPCR). La RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN (Figure 12).

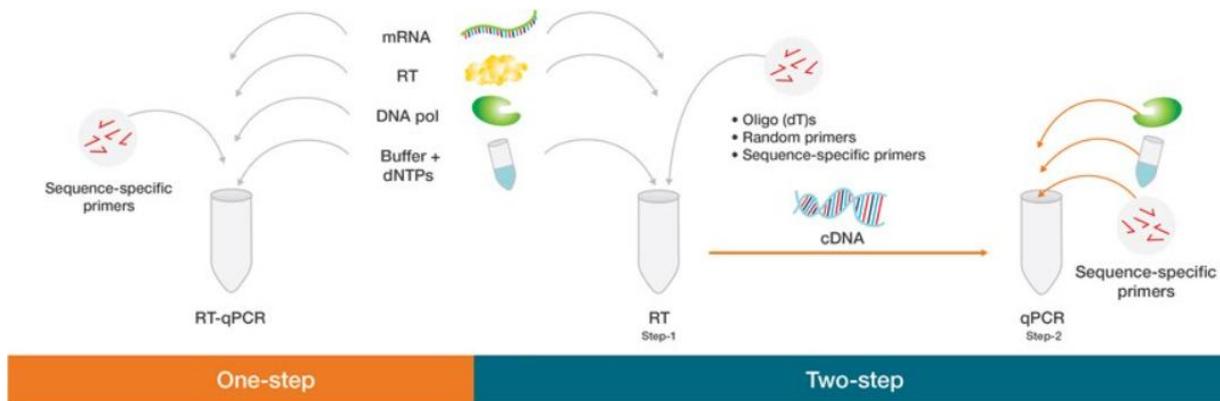


Figure 12 : Principe et étapes de réalisation d'une RT-qPCR (42)

L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une enzyme appelée la transcriptase inverse. Ensuite, la PCR quantitative (encore appelée PCR en temps réel) permet de mesurer la quantité initiale d'ADNc des gènes étudiés. Elle mesure le nombre d'amplicons (portion d'ADNc amplifiée entre le couple d'amorces), et grâce à une courbe d'étalonnage, permet de calculer la quantité initiale d'ADNc. Elle permet de suivre en continu, à chaque cycle, le processus d'amplification par PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo-formés. La détection en temps réel peut se faire soit à l'aide de SYBR green, un composé organique fluorescence qui se lie aux acides nucléiques, soit à l'aide de sondes comme par exemple la sonde Taqman (Figure 13).

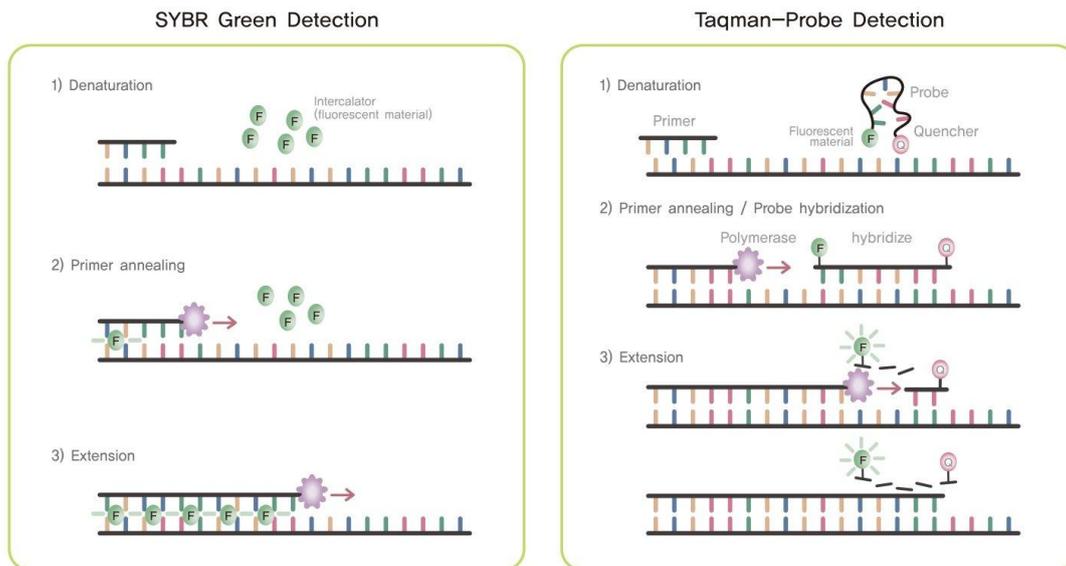


Figure 13 : Principe de révélation d'amplicon grâce à la fluorescence avec la technologie SYBR green et avec la sonde Taqman (43)

Cependant, la RT-qPCR est une technique longue, et les étapes de rétrotranscription et d'amplifications peuvent être source de potentiels biais.

La technologie Nanostring est une nouvelle technique de dosage direct des ARNm des ISG, c'est-à-dire sans étape de rétrotranscription, ni d'amplification par PCR. A partir de sang total, il faut réaliser une lyse des échantillons avant de pouvoir extraire les ARNm des leucocytes. Ensuite, la quantité totale d'ARN est dosée par spectrophotométrie (par exemple avec l'automate Nanodrop), puis la quantification des ISG est réalisée sur un appareil de type Nanostring (Figure 14).



Figure 14 : Etapes de réalisation de la signature interféron avec la technologie Nanostring (44).

Cette technique utilise des sondes qui comportent deux parties : une partie pour la capture de l'ARN cible, et l'autre partie couplée à un code barre (association de billes

de différentes fluorescences) qui assure la spécificité de la sonde. En utilisant des sondes différentes couplées à des codes barres différents, on va pouvoir multiplexer, c'est-à-dire quantifier simultanément, en un seul test, différents ARNm. Les différentes étapes de dosage par le Nanostring sont présentées dans la Figure 15. Après l'étape d'hybridation des sondes spécifiques aux ARNm à quantifier, l'excès de sondes est éliminé. Les couples ARNm/sondes sont ensuite fixés sur la cartouche et alignés, puis enfin comptés par l'appareil. Ce test offre un haut niveau de précision et de sensibilité (<1 copie (d'ARNm) par cellule).

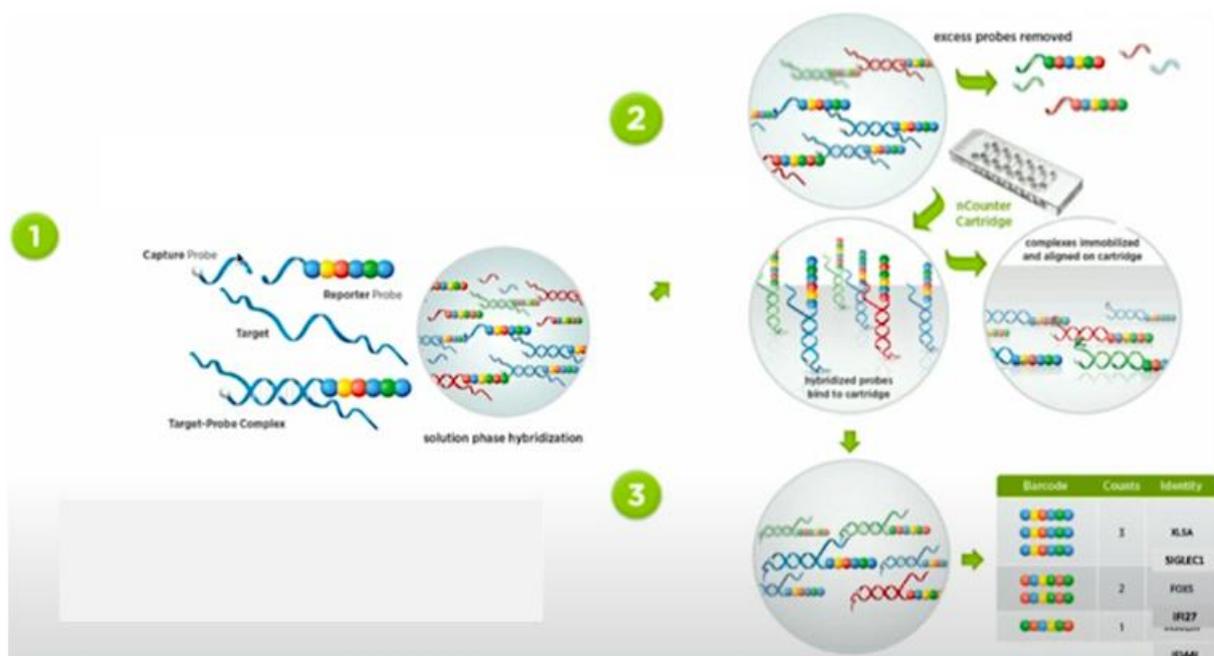


Figure 15 : Principe du dosage avec le Nanostring (44). L'étape 1 correspond à l'hybridation des sondes aux ARN des ISG à quantifier. L'étape 2 correspond à l'élimination de l'excès de sondes, puis à l'alignement sur la cartouche des couples ARN/sonde hybridés. L'étape 3 correspond au décompte de la cartouche par l'automate nCounter.

La technologie Nanostring est donc une technique de dosage plus rapide, plus adaptée à l'utilisation en routine à l'hôpital par rapport à la technique SIMOA, et évitant les étapes de potentiels biais de la RT-qPCR. Une étude a montré l'équivalence entre la technologie Nanostring et le gold standard RT-qPCR pour la réalisation du score interféron. La corrélation obtenue entre les deux techniques est excellente ($r = 0.87$) (45).

Performances diagnostiques

Dans une première étude réalisée à Lyon (44), avec la courbe ROC ayant une AUC = 0.880 et pour un seuil de positivité optimal fixé à 2.3, le score interféron réalisé avec la technologie Nanostring a une bonne sensibilité (Se = 0.895) et une bonne valeur prédictive négative (VPN = 0.913) pour le diagnostic des interféronopathies de type 1.

Une seconde étude réalisée à Lyon (45) retrouve des performances diagnostiques similaires : Se = 90.5%, VPN = 96.6% (courbe ROC avec une AUC = 0.896, et toujours pour un seuil de positivité à 2.3)

Ce score est également intéressant pour le suivi des pathologies, notamment pour évaluer la réponse aux traitements inhibant la production ou la réponse aux IFN (cf 4. Intérêt de la quantification des interférons.

Limites

Les ISG sont inductibles à la fois par les IFN de type 1 et de type 2, et donc le dosage des ISG est moins spécifique que le dosage direct de l'IFN α pour le diagnostic des interféronopathies de type 1 (46,47). De même, les autres situations pathologiques entraînant une élévation des taux d'IFN circulants telles que les infections virales sont une entrave au diagnostic/suivi des interféronopathies, car ils entraînent une augmentation significative du score interféron (13,48)

4. Intérêt de la quantification des interférons

L'étude des IFN de type 1 a plusieurs intérêts en pratique clinique. Tout d'abord, comme nous l'avons vu, la quantification des IFN est une aide au diagnostic des interféronopathies, qu'elles soient génétiques (Figure 10) ou liées aux pathologies auto-immunes (LS, DM).

Ensuite, l'étude de l'IFN de type 1 a un rôle au cours du suivi des interféronopathies. Il existe une corrélation positive entre le résultat du score interféron et le niveau d'activité de la maladie dans le LS et la DM comme le montre la Figure 16 (49,50).

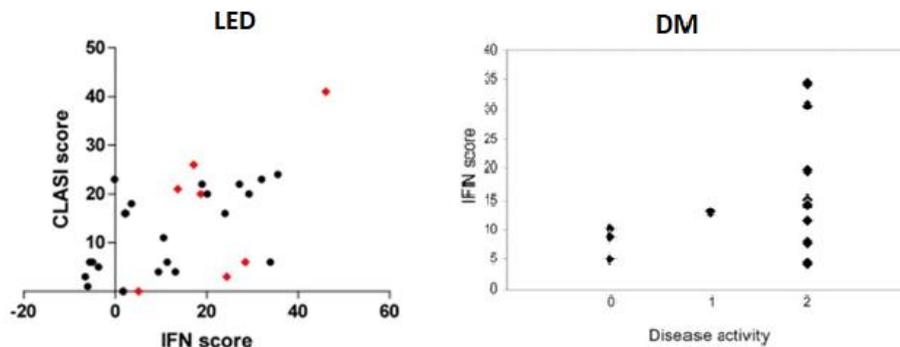


Figure 16 : Score interféron en fonction de l'activité clinique de la maladie dans le LS et la DM. Le score CLASI (Cutaneous LS Area and Severity Index) est un score combiné qui réunit l'activité et la sévérité des lésions du LS cutané. D'après Braunstein et al. (50) et d'après Baechler et al. (49)

Enfin, l'étude des IFN de type 1 a un rôle pronostique et prédictif de la réponse au traitement. Une étude a mis en évidence que le taux basal d'IFN au diagnostic est prédictif du risque de poussée de la maladie dans le LS sur les 5 années suivantes (51). La Figure 17 montre qu'il y a significativement moins de poussée dans le groupe de patients ayant un score interféron bas au diagnostic (< moyenne des témoins sains + 2 déviations standard (DS)) par rapport au groupe de patients ayant un score interféron élevé au diagnostic (> moyenne des témoins sains + 2 DS).

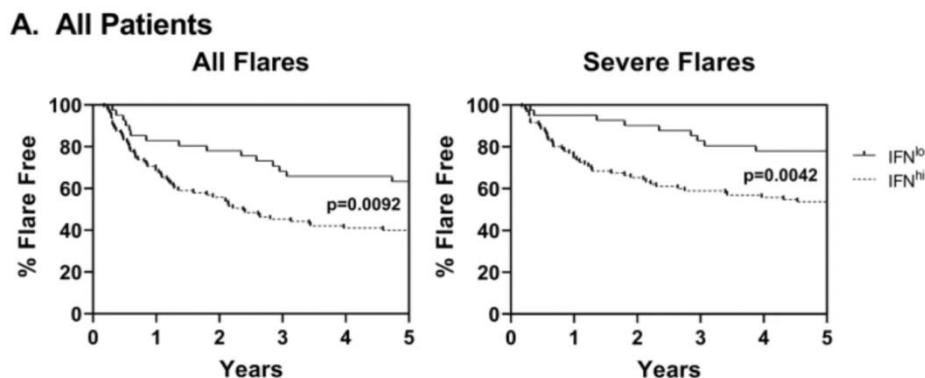


Figure 17 : Courbes de survie de poussées de LS sur 5 ans, en fonction du score interféron des patients au diagnostic. Le groupe score interféron bas (< moyenne des témoins sains + 2 DS) est en ligne pleine versus le groupe score interféron élevé (> moyenne des témoins sains + 2 DS) en ligne pointillée. D'après Mai et al. (51)

Des auteurs ont étudié le score interféron pour prédire la réponse au Rituximab au cours de la PR (52). Dans cette étude, 40 patients présentant une PR (selon les critères révisés de l'*American College of Rheumatology*) avec une maladie active (définie par un score DAS > 3.2) ont été inclus au diagnostic et le score IFN a été mesuré. Les patients ont reçu 1000 mg de rituximab en intra-veineux à J1 et J15 et ont été suivis prospectivement. A 6 mois, la non-réponse clinique était définie de deux manières : une variation du score d'activité DAS 28 (Δ DAS28) < 1.2 ou EULAR 0. Le score d'analyse de réponse EULAR évalue la réponse au traitement en utilisant les scores d'activité DAS et DAS28. Il classe les patients en 3 catégories : EULAR 0 (non répondeur au traitement), EULAR 1 (réponse modérée au traitement) et EULAR 2 (bonne réponse au traitement). La Figure 18 compare le groupe de réponse et de non-réponse au rituximab en fonction du score interféron basal. Le test de Student montre une différence significative du score interféron basal entre les patients répondeurs et non répondeurs. L'étude montre donc qu'un score interféron élevé au diagnostic est prédictif d'une mauvaise réponse au rituximab à 6 mois.

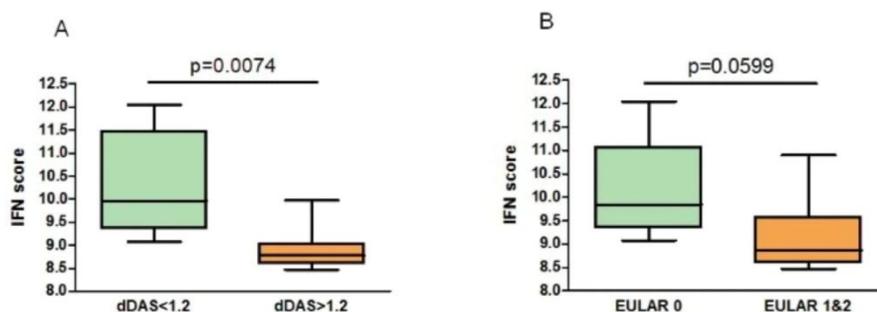


Figure 18 : Comparaison du score interféron basal au diagnostic en fonction de la réponse au rituximab à 6 mois chez des patients atteints de PR. Dans cette étude, la signature interféron est réalisée en quantifiant 8 ISG (LY6E, HERC5, IF44L, ISG15, MxA, MxB, EPST11 et RSAD2) par RT-qPCR. D'après Raterman et al. (52)

5. Objectifs du travail

En France, la réalisation de la signature interféron en routine n'était réalisée jusqu'ici qu'au CHU de Lyon par la technologie Nanostring (centre accrédité COFRAC). L'Institut Imagine à Paris réalise également cette analyse mais dans le cadre de la recherche. Or, devant l'intérêt diagnostique, de suivi et d'évaluation de réponse aux traitements anti-IFN, les demandes de signature interféron sont croissantes. Nous avons ainsi travaillé sur la mise en place de l'étude de la signature interféron au CHU de Lille en utilisant la technologie Nanostring. Nous avons donc évalué différentes conditions pré-analytiques (type de tube, kits, acheminement/transport ...) pour rechercher les plus adaptées à notre pratique. Ensuite, nous avons comparé nos résultats de score interféron avec ceux de Lyon en faisant varier certains paramètres permettant d'étudier et de choisir les meilleures conditions d'analyse. Enfin, après quelques mois de mise en place de l'analyse en routine au CHU de Lille, nous avons fait un retour d'expérience sur les données acquises jusqu'à présent.

Mise au point de la technique

1. Type de tube utilisé pour le prélèvement sanguin

a. Généralités

Le prélèvement de sang total est la première étape pour étudier l'ARN intracellulaire. Les tubes contenant un sel de potassium de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) sont les plus utilisés pour travailler sur sang total. En effet, l'EDTA est un chélateur puissant fixant les ions calcium, inhibant ainsi la coagulation dans le tube. Cependant, l'ARN intracellulaire est instable et peut se dégrader rapidement, en quelques heures après le prélèvement sanguin, en fonction du tube utilisé pour le prélèvement. De plus, certains ARN, par le biais d'un processus d'induction génétique, peuvent augmenter *in vitro* après le prélèvement sanguin. La dégradation de l'ARN *in vitro* et l'induction génétique peuvent entraîner une sous-estimation ou une surestimation du nombre de transcrits. Dans une étude, les tubes EDTA ont été laissés à température ambiante (18°C-25°C) pendant 24h (T24) ou 48h (T48) avant extraction et quantification par RT-qPCR (53). La quantification à ces différents temps a été comparée à celle réalisée juste après le prélèvement (T0) (Figure 19).

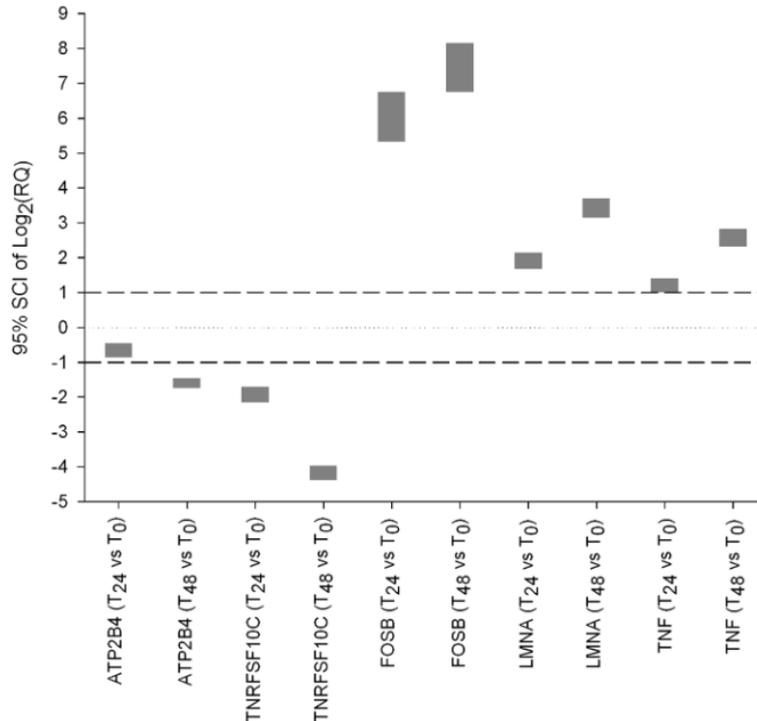


Figure 19 : Évolution dans le temps de la quantité relative des biomarqueurs ARNm prélevés sur tube EDTA (exprimés sous la forme d'intervalles de confiance à 95% des \log_2 (RQ)). D'après Zhang et al. (53)

Les différences de quantité relative sont exprimées en \log_2 avec leur intervalle de confiance (IC) à 95%. Elles sont dites significatives si la limite basse de l'intervalle de confiance > 1 ou si la limite haute de l'intervalle de confiance < -1 (-1 et 1 étant respectivement -2 DS et 2 DS). On conclut donc qu'il existe, pour certains ARN, une régulation positive et une régulation négative significative *in vitro* dès 24h sur tube EDTA à température ambiante.

Nous nous sommes donc demandé quel type de tube était le plus adapté pour prélever, transporter et conserver le sang périphérique des patients en vue d'une extraction d'ARN intracellulaire. Le tube PAXgene Blood RNA contient un additif qui lyse les cellules du sang et stabilise l'ARN *in vitro*. Ainsi, le profil de transcription de gènes *in vivo* est conservé, en réduisant la dégradation d'ARN *in vitro* et en minimisant l'induction de gènes.

Nous nous sommes donc intéressés aux différentes caractéristiques de ces tubes PAXgene vs EDTA : la stabilité de l'ARN à différentes températures de conservation avant l'extraction, le rendement et la qualité des ARN après extraction, leur impact sur la durée du protocole d'extraction, et leur coût.

b. Stabilité de l'ARN

Concernant la stabilité avant l'extraction, l'ARN dans le tube EDTA est instable et des variations sont possibles dès les premières heures après le prélèvement. Dans le tube PAXgene, l'ARN est stable jusqu'à 3 jours à 18-25°C et jusqu'à 5 jours à 2-8°C (54,55) (Figure 20).

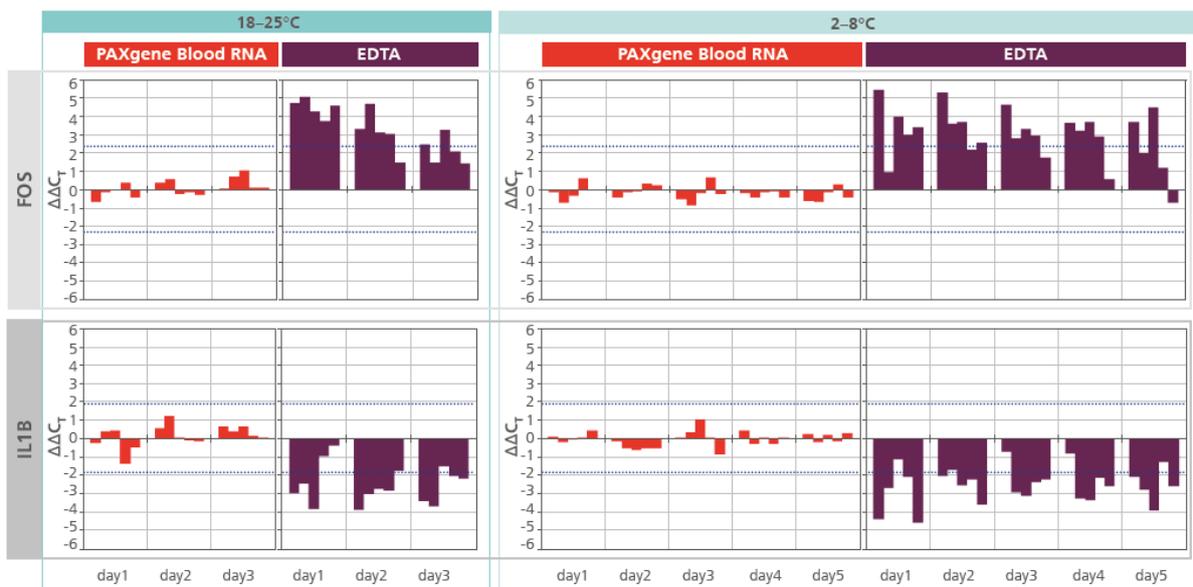


Figure 20 : Évolution dans le temps de la quantité d'ARN FOS et IL1B sur tube PAXgene et sur tube EDTA après différents temps de conservation à température ambiante (18-25°C) et au frais (2-8°C). L'ARN sur tube PAXgene est extrait manuellement avec le kit PAXgene Blood RNA (56)

La même étude montre que l'ARN sur tube PAXgene est stable au moins 6 ans après congélation à -20°C ou à -80°C. Une autre étude comparant différents kits d'extraction sur des tubes EDTA conservés à -80°C pendant environ 5 ans semble montrer une bonne conservation des ARN après congélation immédiate du tube EDTA à -80°C (57).

c. Qualité de l'ARN

Il existe plusieurs mesures pour estimer la qualité de l'ARN extrait : le rendement, la pureté et l'intégrité.

Le rendement est la quantité d'ARN mesurée par absorbance à 260 nm par spectrophotométrie, qui permet de mesurer la concentration en ARN.

La pureté de l'ARN est calculée par le ratio d'absorbance à 260 nm et à 280 nm. En effet, à 260 nm se trouve la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques, alors qu'à 280 nm se situe la zone d'absorbance maximale des protéines. Un ratio d'absorbance $A_{260/280} \geq 1.8$ (1.8 – 2.2) indique une bonne pureté (58). Si $A_{260/280} < 1.8$, cela peut indiquer la présence de protéines ou d'autres contaminants qui absorbent à 280 nm. De même, le calcul du rapport d'absorbance $A_{260/230}$ est utilisé comme mesure de la pureté des acides nucléiques. À 260 nm, on mesure l'absorbance des acides nucléiques, et à 230 nm, on mesure l'absorbance des produits chimiques utilisés pour l'extraction restants dans l'échantillon. La valeur $A_{260/230}$ doit être comprise entre 2.0 et 2.2. Si le rapport est plus faible que prévu, cela peut indiquer la présence de contaminants qui absorbent à 230 nm (par exemple : le phénol, l'EDTA).

L'intégrité de l'ARN est calculée par le RNA Integrity Number (RIN). L'utilisation d'une méthode électrophorétique, basée sur la séparation en fonction de la taille des fragments d'ARN, permet d'évaluer son intégrité et l'importance de sa dégradation. L'électrophorégramme montre la quantité de fluorescence mesurée en fonction de la taille du fragment d'ARN. Cette fluorescence est corrélée à la quantité d'ARN (taille du pic de fluorescence) et à la qualité d'ARN (taille du fragment) (59). Le RIN est un algorithme qui traite les données brutes de l'électrophorégramme afin de rendre un

score compris entre 1 et 10. Le RIN 1 correspond à un ARN très dégradé et le RIN 10 à un ARN de très bonne intégrité.

Une étude a comparé le rendement, la pureté et l'intégrité de l'ARN en utilisant des kits d'extraction différents : le TRI-reagent, le PAXgene et le NucleoSpin (Tableau 1).

	RNA yield (µg/ml)	RNA purity (A260/A280) (A260/A230)	RNA integrity (RIN)
TRI reagent	15.6 ± 8.7 (6.1-37.6)	1.7 ± 0.1 (1.6-1.7) 1.4 ± 0.4 (0.7-2.1)	3.2 ± 0.8 (1.6-5.0)
PAXgene	3.1 ± 1.7 (1.1-6.9)	2.0 ± 0.1 (1.9-2.1) 1.1 ± 0.3 (0.6-1.5)	6.0 ± 1.1 (4.0-7.7)
NucleoSpin	9.0 ± 5.5 (3.6-23.7)	2.0 ± 0.0 (2.0-2.1) 1.8 ± 0.2 (1.5-2.1)	6.4 ± 0.9 (4.6-7.6)

Tableau 1 : Rendement d'ARN, pureté et RIN en fonction des kits d'extraction utilisés (TRI-reagent, PAXgene et NucleoSpin). Les valeurs sont présentées en moyenne +/- écart type. Les nombres entre parenthèses représentent les valeurs minimales et maximales. D'après Kim et al. (57)

Le sang de 15 patients a été recueilli sur tubes EDTA et conservé à -80°C pendant environ 5 ans. Le kit d'extraction Paxgène étant adapté à l'ARN stabilisé par le réactif du tube Paxgène, les auteurs ont ajouté, après décongélation et avant extraction, dans le tube EDTA, le même ratio de réactif que celui contenu dans les tubes PAXgene. Les résultats montrent un meilleur rendement d'ARN avec le kit d'extraction TRI-reagent sur tube EDTA, mais une moins bonne pureté et une moins bonne intégrité.

Le kit d'extraction PAXgene présente un bon ratio de pureté $A_{260/280} = 2 \pm 0.1$, et un ratio de pureté $A_{260/230} = 1.1 \pm 0.3$ moins bon. Ce résultat peut s'expliquer par l'ajout du réactif PAXgene dans le tube EDTA. Pour rappel, l'EDTA absorbe à 230 nm et peut donc interférer sur cette valeur. L'étude montre également un RIN = 6 ± 1.1 satisfaisant pour le kit d'extraction PAXgene.

Cette étude semble montrer une bonne qualité d'ARN extrait avec le réactif stabilisateur PAXgene et le kit d'extraction PAXgene, malgré un faible rendement. A noter que cette étude n'a été réalisée que sur 15 prélèvements et que le protocole

avant extraction de l'ARN est différent de celui utilisé pour la réalisation de la signature interféron dans notre centre.

Une autre étude a été réalisée afin d'estimer le rendement et le RIN avec le tube PAXgene sur 576 donneurs. L'extraction est effectuée avec le kit PAXgene à la fois en suivant un protocole manuel (Annexe 1) et un protocole automatisé utilisant le QIAcube (Annexe 2). Afin d'étudier la reproductibilité, 3 personnes différentes (A, B et C) ont utilisé 3 lots de kit d'extraction différents (1, 2 et 3) en suivant les 2 protocoles (Figure 21).

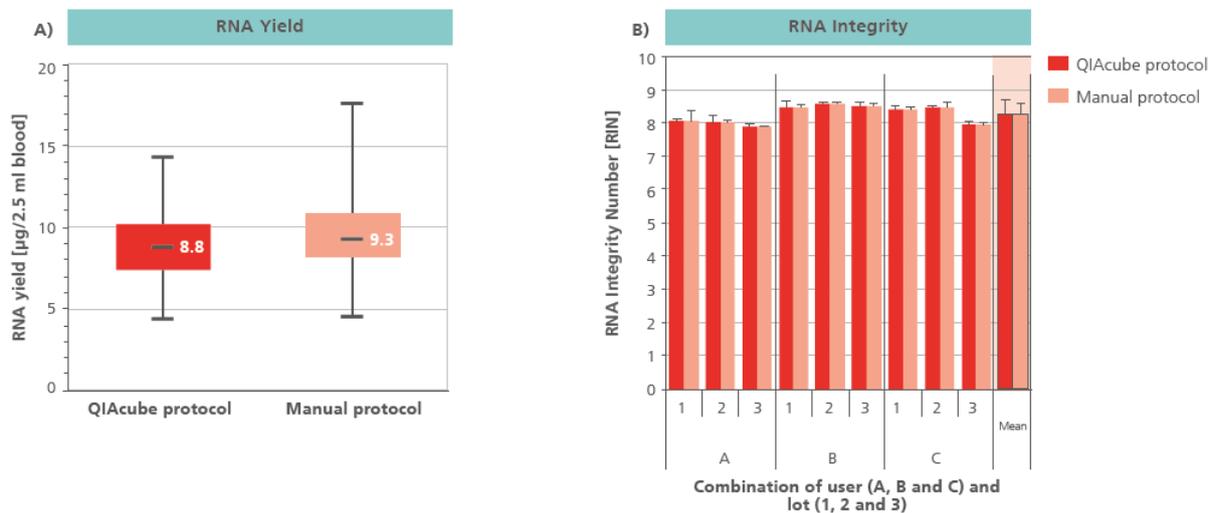


Figure 21 : A) Rendement d'ARN en µg/2.5mL de sang en protocole d'extraction automatisé QIAcube et en protocole d'extraction manuelle. B) RIN en fonction des lots, des techniciens et des protocoles. D'après www.preanalytix.com.

Les résultats de la Figure 21.A mettent en évidence un rendement d'ARN similaire à l'étude précédente, avec une moyenne de 8.8 µg/2.5mL (soit 3.5 µg/mL) avec le protocole automatisé QIAcube et de 9.3 µg /2.5mL (soit 3.7 µg/mL) avec le protocole manuel. Les résultats de la Figure 21.B montrent un bon score d'intégrité RIN, une bonne reproductibilité d'un lot à l'autre et une faible variabilité interindividuelle.

d. Étude comparative lilloise

Nous avons réalisé, au CHU de Lille, une étude comparative sur 4 témoins sains afin d'évaluer la non-infériorité du tube PAXgene par rapport au tube EDTA dans nos conditions d'utilisation. Chaque témoin a été prélevé sur tube EDTA et sur tube PAXgene. Les tubes ont été conservés à température ambiante (18°C-25°C) et l'extraction d'ARN a ensuite été réalisée dans les 48h, grâce aux kits d'extraction QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen®) (Annexe 3) pour les tubes EDTA, et PAXgene® Blood RNA kit pour les tubes PAXgene. Nous avons comparé la quantité d'ARN recueilli avec le Nanodrop (rendement) et sa pureté avec la comparaison des ratios $A_{260/280}$ et $A_{260/230}$ (Tableau 2).

	Paxgène					EDTA				
	Date prélèvement	date extraction	[ARN](ng/μL)	260/230	260/280	date prélèvement	date extraction	[ARN](ng/μL)	260/230	260/280
Témoin 1	11/09/23	11/09/23	59	2,07	1,07	27/04/23	27/04/23	39	2,03	0,1
Témoin 2	11/09/23	11/09/23	81	2,07	1,99	27/04/23	28/04/23	111	1,91	1,17
Témoin 3	12/09/23	12/09/23	100	2,08	1,9	27/04/23	27/04/23	78	2,01	0,5
Témoin 4	12/09/23	12/09/23	157	2,07	2,1	31/05/23	01/06/23	101	1,99	1,4
Moyenne			99,25	2,07	1,77			82,25	1,99	0,79

Tableau 2 : Concentration d'ARN en ng/μL, $A_{260/230}$ et $A_{260/280}$ mesurées par le Nanodrop chez 4 témoins prélevés sur tube PAXgene et sur tube EDTA après extraction dans les 48h.

On obtient un meilleur rendement d'ARN après extraction sur tube PAXgene que dans la littérature. Le ratio $A_{260/230}$ est proche de 2 dans les deux cas.

Nous avons réalisé un test statistique non paramétrique de Wilcoxon sur valeurs appariées afin de rechercher une différence significative entre tube PAXgene et tube EDTA (Figure 22).

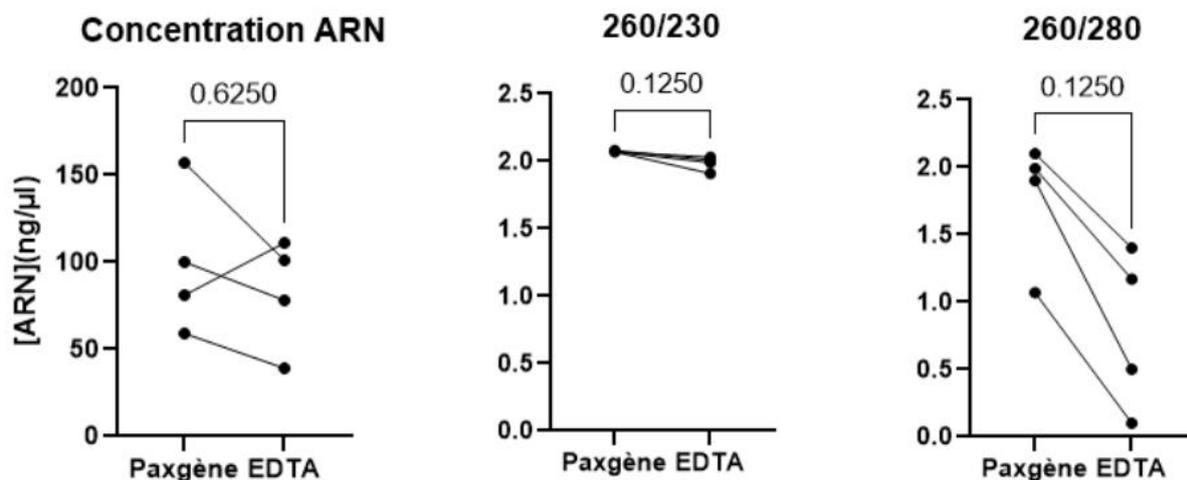


Figure 22 : Comparaison de la concentration d'ARN après extraction, du ratio $A_{260/230}$ et du ratio $A_{260/280}$, entre le tube PAXgene et le tube EDTA (test non paramétrique de Wilcoxon sur valeurs appariées). L'ARN a été extrait avec le kit QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen®) pour les tubes EDTA et avec le PAXgene® Blood RNA kit pour les tubes PAXgene. Pour chaque test, $p > 0.05$.

Les résultats des tests ne démontrent aucune différence significative en termes de quantité ou de pureté de l'ARN extrait entre les tubes EDTA et les tubes PAXgene dans ces conditions. Cependant dans notre étude, le fait que les prélèvements sur EDTA et PAXgene pour chaque témoin n'aient pas été réalisés en même temps est critiquable. Cela pose un problème de temporalité pour la comparaison des résultats et pourrait être une source de biais.

e. Synthèse

Nous avons résumé les différentes caractéristiques des tubes EDTA et PAXgene dans le Tableau 3.

Type de tube	Stabilité de l'ARN avant extraction.	Temps du protocole d'extraction	Coût du tube au CHU de Lille	Quantité et qualité de l'extraction
EDTA	- Dégradation de l'ARN <i>in vitro</i> dès les premières heures. - Stabilité au moins 5 ans après congélation à -80°C	- 1h15 pour 6 tubes avec le QIAamp RNA Blood Mini Kit (manuel) - 2h31 pour 12 tubes en automatisé	0,08€	Dépend de la conservation
PAXgene	- Stabilité 3 jours à température ambiante, 5 jours à 4°C, au moins 5 ans après congélation à -20°C ou à -80°C	- 1h30 pour 6 tubes avec le PAXgene® Blood RNA kit (manuel) - 2h30 pour 12 tubes en automatisé	13,20€	Non inférieures à l'EDTA dans les mêmes conditions de conservation

Tableau 3 : Résumé des caractéristiques des tubes EDTA et PAXgene.

En conclusion, par rapport au tube EDTA, le tube PAXgene permet une meilleure conservation de l'ARN intracellulaire *in vitro* avant l'étape d'extraction, tout en offrant un bon rendement et une bonne qualité d'ARN pour l'analyse, mais en revanche a un coût plus élevé.

Nous avons choisi d'utiliser des tubes PAXgene, car ce choix rend possible le transport des échantillons des Centres Hospitaliers (CH) périphériques (le transport en carboglace à -80°C est difficilement accessible, rendant compliqué l'utilisation de tubes EDTA). Cela facilite également l'organisation des extractions d'ARN, pouvant être réalisées en série de 6 échantillons, plutôt que très rapidement après réception du prélèvement comme imposé en cas d'utilisation de tube EDTA.

2. Normalisation et gènes de ménage

L'automate Nanostring, puis l'analyse par le logiciel associé nSolver, rend, pour un patient donné, des décomptes bruts des ARNm pour les 6 ISG sélectionnés. Ce décompte dépend de la quantité d'ARNm analysé dans l'échantillon et de

l'expression génique variable d'un patient à l'autre. Cependant, afin de pouvoir comparer les patients, les témoins et les contrôles positifs, il est nécessaire de normaliser les résultats grâce à l'utilisation de gènes de ménage.

a. Choix des gènes de ménage

Un gène de ménage est un gène qui assure les fonctions indispensables à la vie de tous les types de cellules. Son expression constitutive est stable car il ne subit pas de régulation spécifique au cours de la vie cellulaire, et ce quelles que soient les conditions (infections ...). La quantification de gènes de ménage pour un patient donné sert de référence de son expression génique. Cependant, plusieurs études ont montré que l'expression des gènes de ménage peut varier quantitativement en réponse à différents facteurs (60,61). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les protéines produites par les gènes de ménage ne sont pas seulement impliquées dans le métabolisme basal des cellules, mais peuvent également avoir d'autres fonctions (60). Afin de mesurer l'expression génique de manière précise, cette étude recommande de normaliser sur la moyenne géométrique d'au moins 3 gènes de ménage. L'utilisation de la moyenne géométrique par rapport à la moyenne arithmétique permet d'être moins sensible aux valeurs extrêmes d'une série de données (62). Elle donne, par conséquent, une meilleure estimation de la tendance centrale des données. De même, la société Nanostring Technologies recommande l'utilisation d'au moins 3 gènes de ménage afin de lisser une éventuelle sur ou sous-expression de l'un d'entre eux (63). A Lyon, pour la réalisation de la signature interféron avec la technologie Nanostring, les gènes de ménage utilisés sont au nombre de 3 : l'actine- β , l'HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) et POLR2A (RNA polymerase II sub-unit A) (45). Pour suivre les recommandations de

Nanostring, et afin d'harmoniser nos pratiques avec le laboratoire de Lyon, nous avons décidé d'utiliser ces 3 mêmes gènes de ménage.

Pour chaque gène de ménage utilisé, la moyenne du compte normalisé ainsi que leur écart-type chez l'ensemble des témoins sont calculés. Si, pour un patient, le compte normalisé d'un des gènes de ménage (à

savoir = $\frac{\text{Gène de ménage du patient}}{\text{Moyenne géométrique (3 gènes de ménage) du patient}}$) n'est pas compris dans l'intervalle

[moyenne des témoins - 2DS ; moyenne des témoins + 2DS], cela signifie que l'expression du gène de ménage de ce patient diffère de la population générale. Ce constat augmente l'incertitude du résultat du score interféron et doit être pris en compte dans le rendu du résultat.

b. Choix du type de normalisation

Il existe deux types de normalisation réalisables : la normalisation individuelle et la normalisation réalisée par le logiciel nSolver.

La normalisation individuelle consiste, pour un patient donné sur un run de 12 patients, à rapporter le décompte brut d'un ISG sur la moyenne géométrique des trois gènes de ménage du patient. Dans ce cas, on rapporte un ISG d'un patient aux gènes de ménage de ce même patient.

La normalisation par le logiciel, quant à elle, consiste à rapporter le décompte brut d'un ISG d'un patient donné d'un run sur la moyenne géométrique des 3 gènes de ménage de tous les patients de ce run. Dans ce cas, on rapporte un ISG d'un patient aux gènes de ménage de tous les patients du run.

A Lyon, le retour d'expérience sur les deux types de normalisation a permis de montrer que la normalisation par le logiciel entraînait une augmentation du coefficient de variation (CV) du contrôle de qualité interne (CQI) (données non publiées). Le CV

est le rapport de l'écart-type à la moyenne. Plus la valeur du CV est élevée, plus la dispersion autour de la moyenne est grande. Nous avons donc choisi, comme à Lyon, d'utiliser la méthode de normalisation individuelle.

Une fois le décompte normalisé obtenu pour chaque ISG, nous calculons le *fold change*. Il est calculé en rapportant le décompte normalisé d'un ISG du patient sur la médiane des décomptes normalisés de cet ISG chez des témoins.

Une fois le fold change calculé pour chaque ISG, nous pouvons calculer le score interféron du patient qui est la médiane des fold change des 6 ISG (Figure 23).

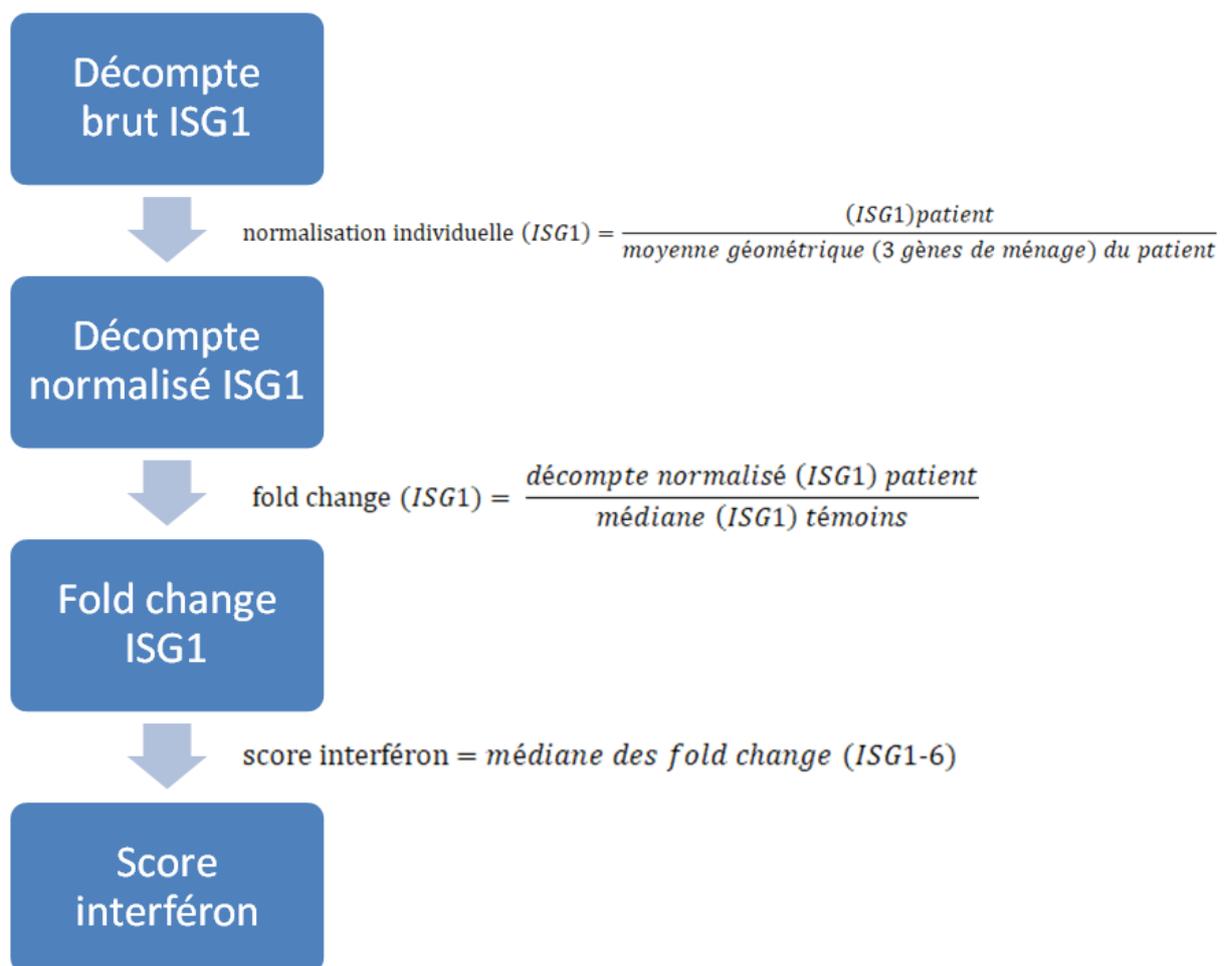


Figure 23 : Résumé des étapes de calcul à partir des données brutes rendues par le logiciel nSolver pour aboutir au score interféron. Dans cette figure, les 6 ISG sont numérotés d'ISG1 à ISG6. On part de l'exemple du calcul pour ISG1.

3. Témoins sains et seuil de positivité

Afin d'interpréter le score interféron d'un patient, il est nécessaire de déterminer le seuil de positivité. Le choix d'un seuil de positivité, dans le cas de tests quantitatifs, permet de définir la valeur à partir de laquelle le résultat sera considéré comme positif. Ce choix dépend de la gravité des conséquences des erreurs de classification (faux positifs et faux négatifs). Le choix d'un seuil bas va donc augmenter la sensibilité et diminuer la spécificité; alors que le choix d'un seuil haut va augmenter la spécificité et diminuer la sensibilité. Dans le cas de la signature interféron, la recherche d'une sensibilité élevée va permettre d'exclure le diagnostic d'interféronopathie en cas de test négatif par le principe du SNOUT (Sensibilité élevée, test Négatif = diagnostic OUT).

Une étude a été réalisée à Vancouver afin de comparer les scores interféron sur tube PAXgene et sur tube Tempus (tube présentant un réactif de stabilisation de l'ARN par lyse cellulaire, désactivation des RNases cellulaires) (64). La quantification a été réalisée par RT-qPCR, les 6 ISG quantifiés étaient : IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2 et SIGLEC1, et les gènes de ménage quantifiés étaient : HPRT1 et l'ARNr 18s. Le seuil de positivité était fixé en calculant, sur 8 témoins, la moyenne des témoins + 2 DS. Le seuil de positivité ainsi calculé était de 1.72 sur les tubes PAXgene et de 2.25 sur les tubes Tempus (64). Au vu du faible écart entre ces scores interféron, les auteurs concluaient que l'expression des 6 ISG était similaire sur tube PAXgene ou sur tube Tempus. Dans l'étude de la signature interféron réalisée à Lyon, le seuil de positivité a d'abord été fixé en calculant la moyenne des témoins + 2 DS, ce qui correspondait à un score = 2.3 (45). Dans la suite de l'étude incluant 21 patients connus comme ayant une interféronopathie et 90 témoins, la courbe ROC réalisée présentait une AUC = 0.90 (Figure 24). En se basant sur la

courbe ROC, le meilleur seuil afin d'obtenir une bonne VPN était également de 2.3. Avec un seuil de positivité fixé à 2.3, les performances diagnostiques de la signature interféron avec la technologie Nanostring étaient : Se = 90.5%, Sp = 63.3%, VPP = 36.5% et VPN = 96.6% (45).

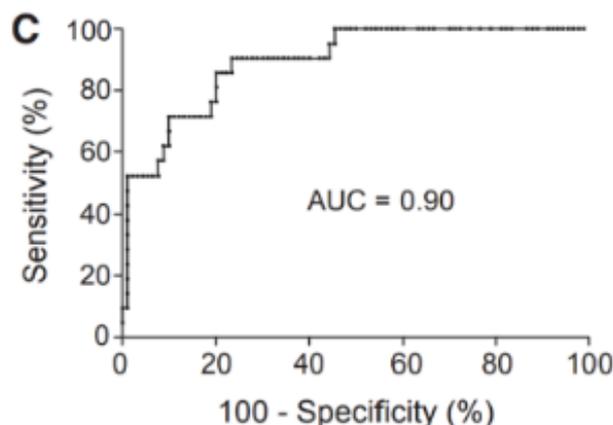


Figure 24 : Courbe ROC de la signature interféron réalisée avec le Nanostring à Lyon. Dans cette étude, 21 patients présentant une interféronopathie et 90 témoins ont été analysés. D'après Pescarmona et al. (45)

Nous avons réalisé, au CHU de Lille, une étude de la signature interféron de 26 témoins issus de prélèvements de l'établissement français du sang (EFS), réalisée avec le Nanostring. Le score interféron a été calculé en réalisant une normalisation individuelle sur les gènes de ménage. Le but de cette étude était de calculer la valeur de la moyenne + 2 DS chez des témoins de Lille afin de s'assurer qu'on retrouve un seuil de positivité aux alentours de 2.3, comme seuil choisi à Lyon. Les résultats de l'étude sont décrits dans le Tableau 4.

Moyenne du score interféron de 26 témoins analysés au CHU de Lille	Ecart-type (DS)	Moyenne + 2 DS = seuil de positivité
1,11	0,47	2,05

Tableau 4 : Etude de la signature interféron par Nanostring au CHU de Lille afin de déterminer le seuil de positivité.

A Lille, la moyenne + 2 DS des témoins sains = 2.05, ce qui est concordant avec la littérature. Pour la suite de l'étude, nous avons donc choisi de nous aligner sur le

seuil de 2.3 de Lyon car il est proche du nôtre et cette harmonisation nous permettra de comparer au mieux les résultats entre les 2 centres.

4. Contrôles positifs

Le passage d'un contrôle positif permet de s'assurer que le Nanostring est capable de rendre un résultat positif pour un échantillon attendu comme positif, et de vérifier la reproductibilité des résultats d'un run à l'autre.

Pour obtenir un échantillon contrôle positif, nous avons eu le choix entre deux options.

La première option est d'utiliser du sang prélevé sur tube EDTA de donneurs sains de l'EFS et de le stimuler avec des IFN. Dans l'étude de la signature interféron réalisée à Lyon, les auteurs ont calculé le score interféron de sang de témoin stimulé avec 40 000 UI/mL d'IFN α , d'IFN γ ou de phyohémagglutinine (PHA, un mitogène qui stimule la production d'IFN γ). Les résultats montrent une élévation du score interféron, avec un score interféron très élevé autour de 100 pour le sang de témoin stimulé par IFN α , un score interféron qui s'élève autour de 10 avec l'IFN γ et un score interféron qui s'élève autour de 5 avec la PHA. Ces données montrent d'ailleurs que les ISG sont plus stimulés par les IFN de type 1 que par les IFN de type 2 (45). Afin de créer un contrôle positif avec une signature interféron autour de 10, le laboratoire de Lyon a choisi dans un premier temps de stimuler le sang de témoin avec de l'IFN γ . Nous avons choisi de créer un contrôle à Lille de la même manière. La manipulation est rapide et se fait suivant le protocole présenté en Annexe 4. Les résultats obtenus des différents passages des contrôles positifs sont présentés dans le Tableau 5.

N° passage	Témoin EFS 1 stimulé IFN γ	Témoin EFS 2 stimulé IFN γ	Témoin EFS 3 stimulé IFN γ
1	17,78	8,93	9,46
2	16,75	8,86	9,1
3	18,13	9,96	9,51
4	16,65	8,92	9,03
5	14,7	8,97	8,96
6		8,72	8,82
7			9,89
8			9,28
Moyenne	16,80	9,06	9,26
CV%	7,97	4,96	3,79

Tableau 5 : Suivi du score interféron des échantillons 1, 2 et 3 de contrôle positif préparé à partir de sang EDTA de témoins sains de l'EFS stimulé par de l'IFN γ .

On remarque une bonne reproductibilité et une stabilité des résultats pour chaque échantillon de contrôle positif, comme le montre la Figure 25. Pour chaque échantillon, le coefficient de variabilité en pourcentage est : CV%(échantillon 1) = 7.97, CV%(échantillon 2) = 4.96 et CV%(échantillon 3) = 3.79

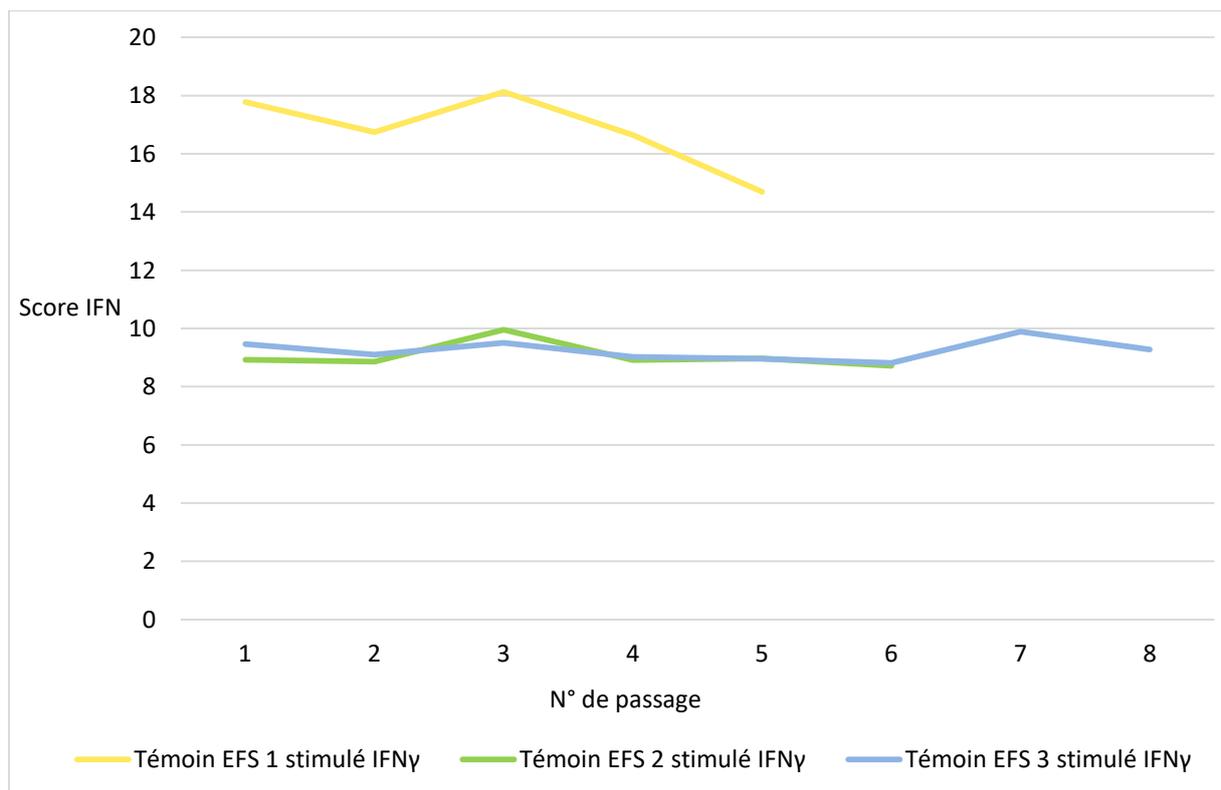


Figure 25 : Résultats du score interféron des échantillons 1, 2 et 3 des contrôles positifs préparés à partir de sang EDTA de donneurs sains de l'EFS stimulé par IFN γ .

Cependant, le contrôle positif préparé à partir de sang de témoin stimulé par IFN γ n'est pas optimal. Il est difficile de prévoir l'importance de la stimulation par l'IFN γ , et donc de prévoir le score interféron obtenu. On remarque également qu'avec cette méthode, les scores interféron obtenus sur les contrôles positifs sont bien plus élevés que le seuil de positivité qui se situe autour de 2.3. Or, il est intéressant d'avoir un contrôle positif autour du seuil décisionnel (donc viser plutôt un score de 3-4) afin de s'assurer qu'on est en mesure de détecter les patients faiblement positifs.

La deuxième option est de préparer un contrôle positif à partir d'un pool de patients positifs connus avec une signature interféron aux alentours de 4. Cela permet d'avoir un contrôle positif plus proche du seuil de positivité, ce qui est intéressant pour être discriminant entre les positifs et les négatifs. La limite de cette option est qu'il faut avoir un certain nombre de patients positifs connus afin de pouvoir réaliser un pool. Au CHU de Lille, nous avons commencé à réaliser un contrôle positif en poolant des patients positifs connus avec un score autour de 4. Les résultats sont décrits dans la Figure 26.

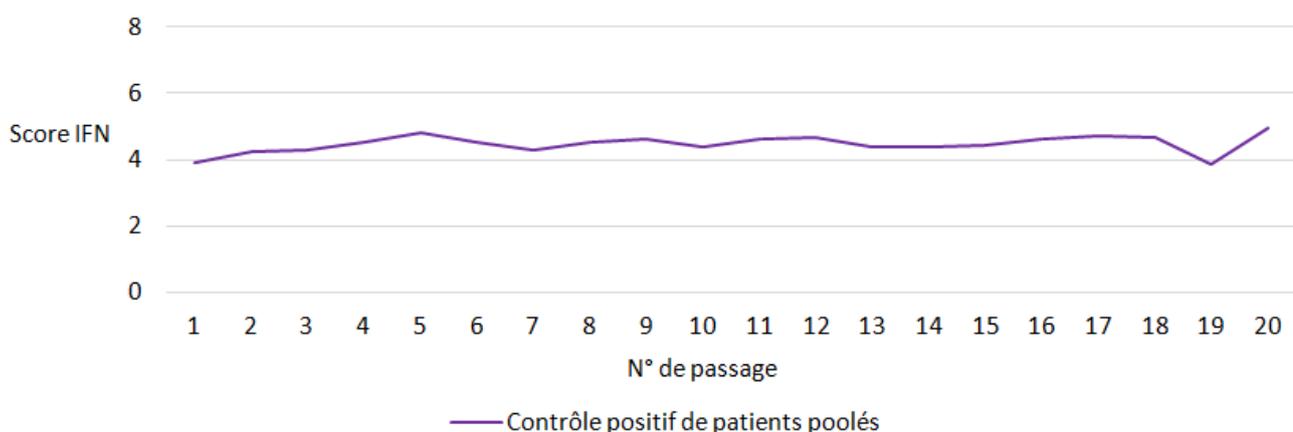


Figure 26 : Résultats du score interféron du contrôle positif créé à partir d'un pool de patients positifs connus.

Nous avons une bonne reproductibilité et une stabilité du contrôle positif poolé. Le CV% (contrôle poolé) est de 6.12%. De manière générale, nous considérons qu'un CV < 15% est acceptable. Dans une étude à Lyon faisant le retour d'expérience sur la signature interféron, deux CQI positifs ont été passés et les CV calculés sont respectivement de 7.5% (sur 116 passages) et de 7.4% (sur 153 passages) (65). La reproductibilité de notre contrôle poolé est donc du même ordre de grandeur que celle de Lyon.

De plus, par cette méthode, il est plus facile de prédire le score interféron du contrôle positif qu'en utilisant du sang de témoin stimulé par IFN γ , ce qui permet de s'approcher du seuil de positivité de 2.3.

Nous avons donc choisi la deuxième option en utilisant des pools de patients connus afin de réaliser notre contrôle positif.

Etudes comparatives des différents paramètres d'analyse

Dans cette partie, afin de choisir les meilleurs paramètres d'analyse du score interféron réalisé à Lille, nous allons faire varier ces différentes conditions (type de contenant, de normalisation, témoins) et comparer les résultats de score interféron obtenus. Le score interféron à Lyon (centre accrédité COFRAC) est calculé en utilisant les paramètres suivants : tube PAXgene, normalisation individuelle, témoins lyonnais. Nous allons donc faire varier individuellement chacun de ces paramètres pour le calcul du score interféron à Lille afin de comparer les scores obtenus à ceux de Lyon.

1. Contenant

a. EDTA Lille versus PAXgene Lyon

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser des tubes EDTA pour la réalisation de la signature interféron au CHU de Lille. La majorité des mises au point ont donc été réalisées sur ce type de contenant.

Nous nous sommes demandé dans quelle mesure le résultat du score interféron réalisé sur tube EDTA à Lille différait de celui obtenu sur tube PAXgene à Lyon. Pour cela, nous avons réalisé une étude sur n = 44 patients afin de comparer pour chacun le score interféron obtenus à Lille à partir d'un tube EDTA et à Lyon à partir d'un tube PAXgene. L'extraction d'ARN sur tube EDTA a été réalisée dans les 48h après prélèvement, et le tube PAXgene a été envoyé à Lyon.

Dans les deux cas, les autres conditions d'analyse étaient similaires, à savoir la réalisation d'une normalisation individuelle et l'utilisation des témoins lyonnais pour le

calcul du score interféron. Il est à noter que sur les 44 patients analysés, pour 12 d'entre eux, un tube STRECK et non PAXgene a été envoyé à Lyon pour réalisation du score interféron. Les tubes STRECK contenant également un stabilisateur d'ARN, nous avons décidé de ne pas les exclure de l'étude. Les résultats individuels des scores interféron sur tube EDTA réalisés à Lille et sur tube PAXgene réalisés à Lyon sont présentés dans l'Annexe 5.

Nous avons réalisé un graphique de Bland-Altman, et calculé le coefficient de corrélation de Spearman, qui sont présentés dans la Figure 27.

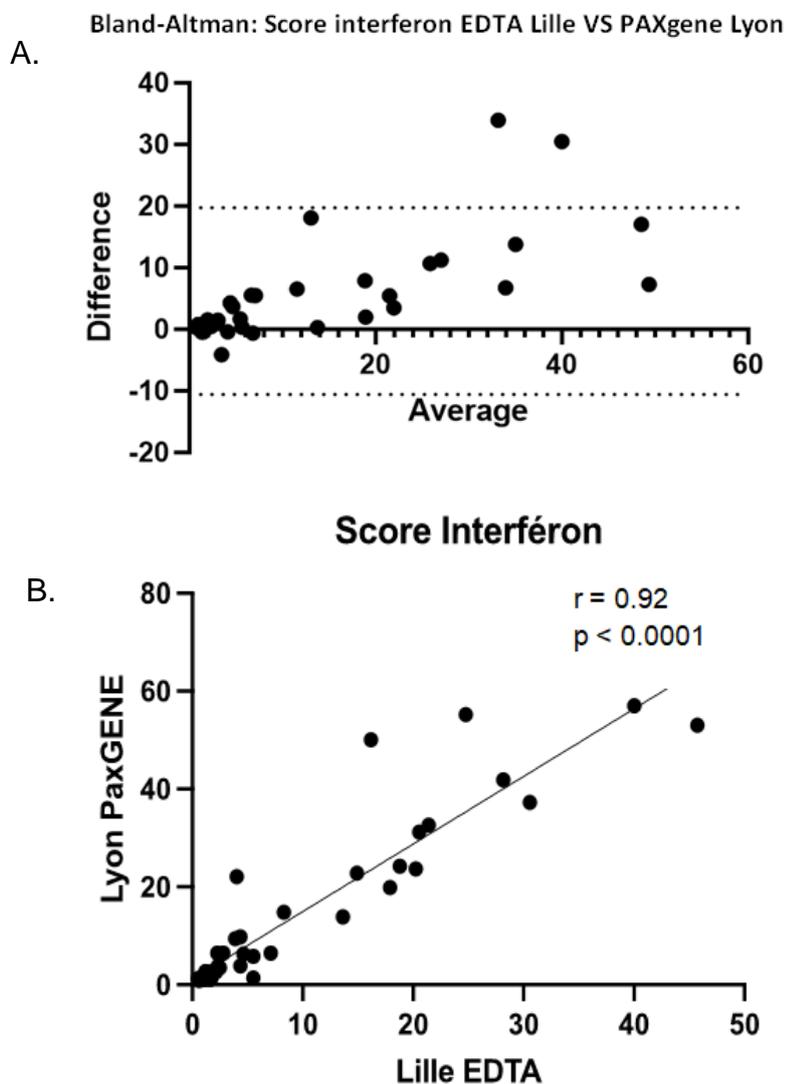


Figure 27 : A) Diagramme de Bland-Altman entre les scores interféron réalisés sur EDTA à Lille et ceux réalisés sur tube PAXgene à Lyon. Les pointillés correspondent à la moyenne +1.96DS et -1.96DS B) Calculs du coefficient de corrélation (r) de Spearman et p entre les scores interféron réalisés sur tube EDTA à Lille et les scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lyon. L'étude inclut $n=44$ patients.

Le Bland-Altman montre une bonne concordance de mesure. De plus, le coefficient de corrélation de Spearman à 0.92 (intervalle de confiance (IC) à 95% [0.85 ;0.96]) témoigne d'une très forte corrélation linéaire positive et statistiquement significative ($p < 0.0001$) entre les scores interféron réalisés sur tube EDTA à Lille et ceux réalisés sur tube PAXgene à Lyon. On remarque que le Bland-Altman semble montrer un biais, car la différence moyenne entre les deux mesures est souvent positive. Ce biais est discuté dans la partie 5. Comparaison entre Lille et Lyon dans les mêmes conditions d'analyse.

Les tubes EDTA s'avèrent donc être une option fiable afin de réaliser le score interféron à Lille.

Cependant, dans un 2^{ème} temps, nous avons finalement choisi d'utiliser des tubes PAXgene à Lille au vu de leur meilleure praticité déjà évoquée par rapport aux tubes EDTA. Il était donc nécessaire de réaliser ce même type d'étude sur tube PAXgene afin de vérifier que les résultats obtenus à Lille ont une bonne corrélation avec ceux de Lyon. Cette étude ayant déjà été réalisée sur un nombre important de patients sur tube EDTA (n = 44) et les résultats étant satisfaisants, nous les avons complétés sur un nombre plus restreint de patients sur tube PAXgene (n = 5).

b. PAXgene Lille versus PAXgene Lyon

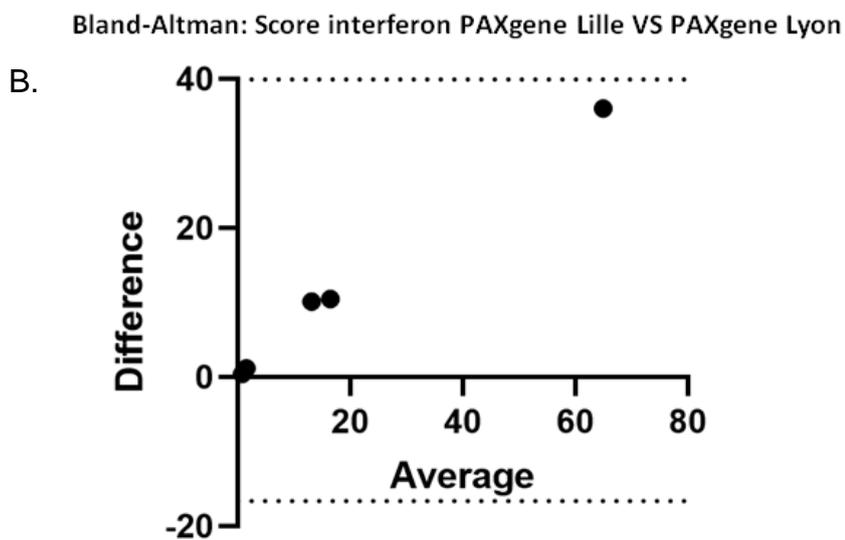
Nous avons donc réalisé une étude afin de comparer les scores interféron obtenus à partir de tube PAXgene extrait et analysé à Lille à ceux obtenus à partir d'un autre tube PAXgene envoyé, extrait et analysé à Lyon. Nous avons inclus n = 5 patients. Dans les deux cas, les autres conditions d'analyse étaient similaires, à savoir la

réalisation d'une normalisation individuelle et l'utilisation de témoins lyonnais pour le calcul du score interféron.

Les résultats des scores interféron sur tube PAXgene réalisés à Lille et à Lyon, le Bland-Altman, ainsi que le calcul du coefficient de corrélation de Spearman, sont présentés dans la Figure 28.

A.

Score IFN Lille PAXgene	Score IFN Lyon PAXgene
46,88	82,9
11,21	21,7
0,58	1
0,93	2,1
8,05	18,2



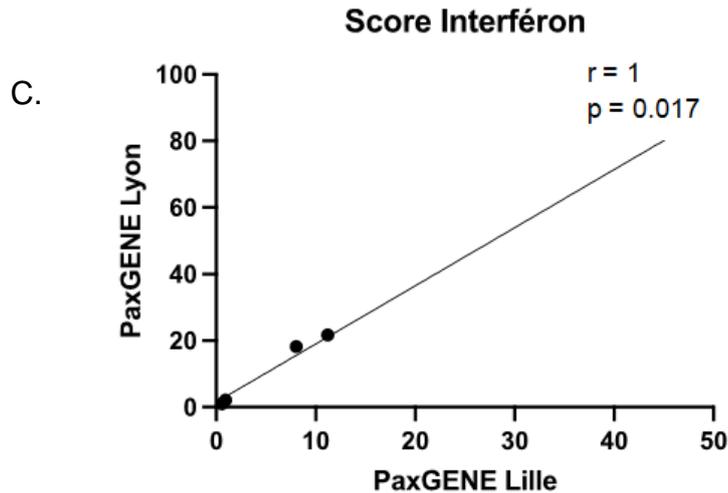


Figure 28 : A) Tableau des résultats de l'étude des scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lille et sur tube PAXgene à Lyon, n=5. Chaque ligne représente un patient. B) Diagramme de Bland-Altman entre les scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lille et sur tube PAXgene à Lyon C) Calculs du coefficient de corrélation de Spearman r et p entre les scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lille et les scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lyon.

Le Bland-Altman montre une bonne concordance de mesure. De plus, comme le r de Spearman = 1, il existe une très forte corrélation linéaire positive et statistiquement significative ($p = 0.017$) entre les scores interféron réalisés sur tube PAXgene à Lille et ceux réalisés sur tube PAXgene à Lyon. On remarque que le r entre les scores interféron sur tube PAXgene Lille et tube PAXgene Lyon est meilleur ($r = 1$) que le celui entre les scores interféron sur tube EDTA Lille et tube PAXgene Lyon ($r = 0.92$). La faiblesse de cette étude est l'inclusion d'un faible nombre de patients ($n=5$), ce qui nous empêche de calculer l'IC95% autour du r .

On peut également noter que le Bland-Altman semble montrer un biais car la différence moyenne entre les mesures est constamment positive. De plus, on remarque qu'il existe un rapport à peu près égal à 2 entre les scores interféron obtenus à Lyon et ceux obtenus à Lille. Cette différence est explorée dans la partie 5. Comparaison entre Lille et Lyon dans les mêmes conditions d'analyse.

Devant la bonne corrélation entre les résultats obtenus à Lille et à Lyon, et notamment avec les tubes PAXgene, nous avons décidé d'utiliser des tubes PAXgene pour la réalisation de la signature interféron en routine à Lille.

3. Type de normalisation : Logicielle versus individuelle

a. Etude comparative des scores interféron calculés avec une normalisation logicielle à Lille, une normalisation individuelle à Lille et une normalisation individuelle à Lyon

Afin d'étudier l'impact du type de normalisation sur le calcul du score interféron, nous avons réalisé une étude sur n=5 patients. Cette étude compare les scores interféron réalisés à Lille calculés avec une normalisation logicielle et individuelle, à ceux réalisés à Lyon calculés avec une normalisation individuelle. Les autres conditions d'analyse étaient similaires, à savoir l'utilisation de tube PAXgene et l'utilisation de témoins lyonnais pour le calcul du score interféron.

Les résultats du score interféron de Lille (en normalisation logicielle et en normalisation individuelle) et de Lyon sont présentés dans le Tableau 6.

Score IFN Lille normalisation logicielle	Score IFN Lille normalisation individuelle	Score IFN Lyon normalisation individuelle
10,66	46,88	82,9
2,56	11,21	21,7
0,12	0,58	1
0,21	0,93	2,1
1,88	8,05	18,2

Tableau 6 : Tableau des résultats des scores interféron réalisés à Lille avec une normalisation logicielle et avec une normalisation individuelle, ainsi que des scores interféron réalisés à Lyon avec une normalisation individuelle. Dans cette étude, n=5 patients et dans le tableau, chaque ligne représente un patient.

Entre les scores interféron de Lille en normalisation logicielle et ceux de Lyon, on calcule un coefficient de régression linéaire $r^2=0.9981$, et entre les scores interféron

de Lille en normalisation individuelle et ceux de Lyon un $r^2=0.9976$. Dans les deux cas, il existe une très forte corrélation linéaire positive statistiquement significative (p du coefficient de corrélation de Spearman < 0.05).

Cependant, la limite de cette étude est le faible nombre de patients inclus ($n=5$).

On remarque que dans les mêmes conditions d'analyse entre Lille (donc en normalisation individuelle) et Lyon, on retrouve le rapport de 2 entre les scores (cf 5. Comparaison entre Lille et Lyon dans les mêmes conditions d'analyse). Avec la normalisation logicielle, le rapport des scores augmente davantage pour être proche de 8.

b. Etude comparative du score interféron du contrôle positif entre une normalisation logicielle et une normalisation individuelle

Le CV% permet la comparaison de distributions de valeurs dont les échelles de mesure ne sont pas comparables.

On suppose que la normalisation logicielle, par rapport à la normalisation individuelle, entraîne un CV% plus élevé pour des valeurs répétées tel que le passage répété du contrôle positif car :

- Dans l'étude précédente (Tableau 6), on remarque que la plage de valeur du score interféron est moins étendue avec la normalisation logicielle (0 à 10) qu'avec la normalisation individuelle (Pour Lyon : 1 à 83). Or, une faible variation sur une petite échelle de mesure augmente plus facilement la dispersion que sur une grande échelle de mesure.

- On s'attend à une variabilité plus faible en rapportant les décomptes bruts des ISG du contrôle positif aux gènes de ménage du contrôle positif (normalisation

individuelle) plutôt qu'à la moyenne des gènes de ménage de tous les patients d'un run (normalisation logicielle).

- Le retour d'expérience à Lyon sur les deux types de normalisation a permis de montrer que la normalisation logicielle entraînait une augmentation du CV% du CQI (données non publiées).

Nous avons donc réalisé une étude afin de comparer le CV% du score interféron du contrôle positif de Lille après une normalisation logicielle et après une normalisation individuelle. Le contrôle positif choisi est l'échantillon 3 de sang de l'EFS stimulé par de l'IFN γ , que nous avons utilisé sur 8 runs différents. Les résultats du score interféron du témoin positif et le calcul du CV selon les deux types de normalisation sont présentés dans la Figure 29.

Numéro run	témoin 3 EFS normalisation logicielle	témoin 3 EFS normalisation individuelle
10	3,86	9,46
11	2,94	9,10
12	2,54	9,51
13	2,10	9,03
14	2,06	8,96
15	2,27	8,82
16	3,19	9,89
17	2,99	9,28

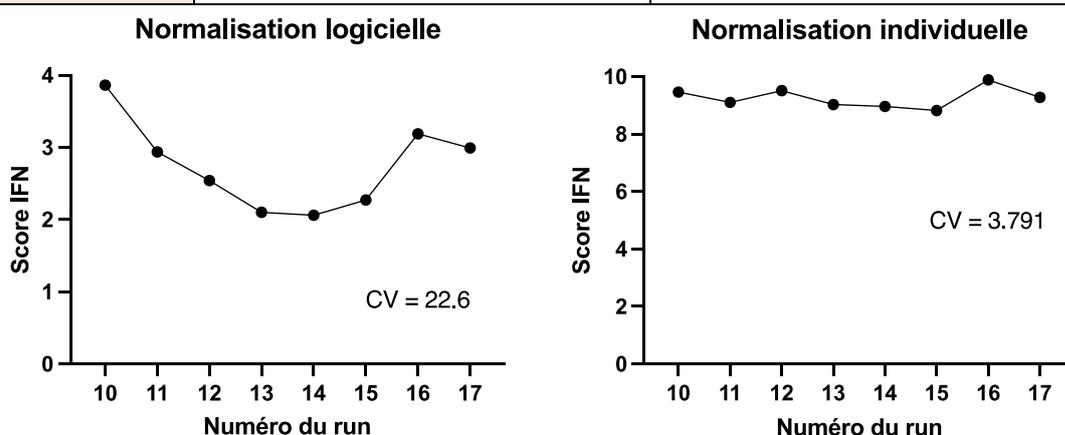


Figure 29 : Tableau des résultats des scores interféron du contrôle positif (échantillon 3 préparé à partir de sang de l'EFS boosté par de l'IFN) calculés par normalisation logicielle et par normalisation individuelle sur 8 runs différents. Pour chaque type de normalisation, calcul du CV du témoin 3 EFS.

On remarque que le CV% est bien plus élevé pour le contrôle positif avec une normalisation logicielle par rapport à une normalisation individuelle (22.6 contre 3.79). Il y a donc moins de dispersion avec la normalisation individuelle, c'est pourquoi nous avons choisi ce type de normalisation pour la réalisation de la signature interféron en routine au CHU de Lille.

4. Comparaison des témoins négatifs Lillois versus témoins négatifs Lyonnais

a. Comparaison pour chaque ISG entre les témoins de Lille et de Lyon

Nous nous sommes demandé si une éventuelle différence entre la médiane des ISG des témoins négatifs de Lille et ceux de Lyon pourrait avoir un impact sur le calcul du score interféron.

La médiane des comptes normalisés (par normalisation individuelle) pour chaque ISG des témoins de Lille et de Lyon est présentée dans le Tableau 7. Pour des soucis de lisibilité, les résultats ont été arrondis au millième, mais la valeur exacte est utilisée pour le calcul du score interféron.

	IFI27	IFI44L	IFIT1	ISG15	RSAD2	SIGLEC1
Médiane témoins Lille	0,014	0,051	0,084	0,218	0,035	0,007
Médiane témoins Lyon	0,008	0,055	0,116	0,217	0,050	0,007

Tableau 7 : Médiane pour chaque ISG calculée dans la population témoins de Lille et témoins de Lyon. Les résultats ont été arrondis au millième

Pour chaque ISG, les médianes des comptes normalisés sont très proches. Il est à noter que les comptes normalisés des ISG des témoins Lyonnais ont été réalisés à Lyon (extraction + nCounter Nanostring) alors que les comptes normalisés des ISG des témoins Lillois ont été réalisés à Lille (extraction + nCounter Nanostring).

b. Comparaison des scores interféron réalisés à Lille avec des témoins Lillois versus réalisés à Lille avec des témoins Lyonnais

Nous avons réalisé une étude à Lille sur $n = 53$ patients comparant le score interféron calculé avec des témoins de Lille et des témoins de Lyon afin de s'assurer de la concordance des résultats. Dans les deux cas, les autres conditions d'analyse étaient similaires, à savoir l'utilisation de tube PAXgene et une normalisation individuelle pour le calcul du score interféron.

Les résultats du coefficient de corrélation de Spearman entre les scores interféron calculés avec les témoins de Lille et ceux calculés avec les témoins de Lyon, sont présentés dans la Figure 30.

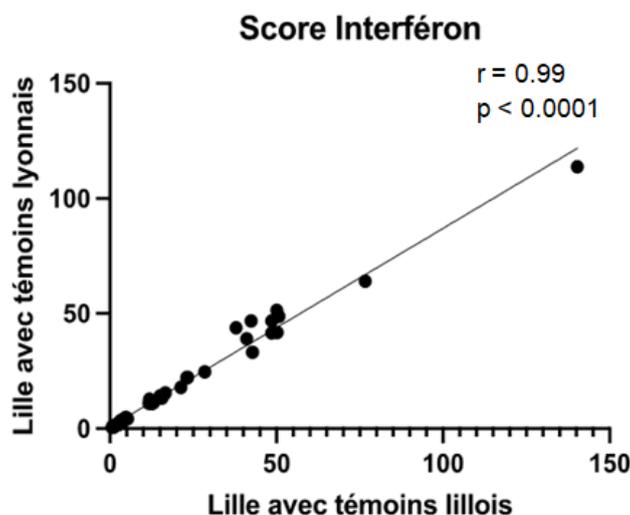


Figure 30 : Résultat du calcul du r de Spearman et p entre les scores interféron réalisés à Lille calculé avec des témoins de Lyon et avec des témoins de Lille.

Le $r = 0.993$ (IC95% [0.988 ; 0.996]) montre une très forte corrélation qui est statistiquement significative ($p < 0.0001$) entre les séries.

Devant l'équivalence de l'utilisation des témoins de Lille ou de Lyon pour le calcul du score interféron au CHU de Lille, nous avons choisi d'utiliser les témoins de Lyon, ce qui permet une reproductibilité de mesure d'un centre à l'autre.

5. Comparaison entre Lille et Lyon dans les mêmes conditions d'analyse

Afin de tenter de mieux comprendre le rapport de 2 retrouvé précédemment entre les scores interféron réalisés à Lille et ceux réalisés à Lyon dans les mêmes conditions d'analyse, nous avons réalisé une étude, sur n = 6 patients, afin de comparer:

- Le score interféron réalisé à Lille après extraction des ARN à Lille.
- Le score interféron réalisé à Lille après extraction des ARN à Lyon.
- Le score interféron réalisé à Lyon après extraction des ARN à Lyon.

Dans tous les cas, les autres conditions d'analyse étaient similaires, à savoir l'utilisation d'un tube PAXgene, la réalisation d'une normalisation individuelle et l'utilisation de témoins lyonnais pour le calcul du score interféron.

Les résultats des scores interféron sont présentés dans le Tableau 8.

Score IFN Lille extraction Lille (date run 26/09/2023)	Score IFN Lille extraction Lyon (date run 23/04/2024)	Score IFN Lyon extraction Lyon
46,88	80,71	82,90
11,21	21,86	21,70
0,58	0,89	1,00
0,93	1,80	2,10
8,05	12,42	18,20
36,99	64,25	69,50

Tableau 8 : Résultats des scores interféron réalisés à Lille après extraction à Lille et après extraction à Lyon, et de ceux réalisés à Lyon après extraction à Lyon.

On remarque que les scores interféron obtenus à Lille après extractions des ARN à Lyon (run le 23/04/2024) sont bien plus proches de ceux obtenus à Lyon que les scores interféron obtenus à Lille après extraction des ARN à Lille (run le 26/09/2023). Le rapport de 2 qui existait entre les scores interféron de Lille et de Lyon tend à s'effacer. On en conclut que ce rapport de score interféron entre Lille/Extraction Lille et Lyon/Extraction Lyon des patients lillois n'est pas liée à la méthode de dosage, ni aux conditions d'analyses, ni à la méthode de calcul du score interféron. Elle pourrait s'expliquer par différentes hypothèses : une différence d'une étape en amont (à

savoir le transport des tubes PAXgene à Lyon ou une différence de méthode d'extraction entre les différents centres), ou une différence liée à une temporalité différente (changement de lot réactif).

Cependant, comme détaillé précédemment, les ARN congelés sont stables au moins 5 ans sur tube PAXgene, et les tubes envoyés à Lyon ont fait le trajet aller, tandis que les ARN extraits à Lyon et renvoyés à Lille ont fait le trajet aller-retour. Le transport des tubes PAXgene entre Lille et Lyon ne semble donc pas expliquer la différence entre les scores interféron de Lille et de Lyon.

Nous avons suspecté une différence de protocole dans l'extraction des ARN entre Lille et Lyon puisque l'extraction à Lyon semble corriger le rapport de 2. Cependant, nous n'avons pas pu retrouver le protocole détaillé d'extraction de Lyon. De plus, le retour d'expérience montre qu'on tend à se rapprocher des résultats antérieurs de Lyon (chez les patients a priori stables dans leur pathologie, c'est-à-dire ni en poussée ni après initiation d'un traitement), sans aucun changement de protocole d'extraction de part et d'autre. Le rapport de 2 ne semble donc pas lié à une différence d'extraction entre les deux centres.

La dernière hypothèse est sur la temporalité, les séries Lille/Extraction Lille et Lille/Extraction Lyon ayant été réalisées à des dates différentes (26/09/23 et 23/04/24 respectivement), un lot de réactif défectueux (par exemple la cassette Nanostring) aurait pu être source d'un biais sur tout le lot. Comme nous étions en train de tester les différentes possibilités de contrôle positif à Lille, sur différents échantillons, ce type de biais lié à un lot réactif aurait pu nous échapper. C'est l'hypothèse qui nous paraît la plus probable pour expliquer ce rapport de 2 entre les scores interféron réalisés à Lille et ceux de Lyon dans les mêmes conditions d'analyse pendant notre mise au point.

Bien que nos protocoles avec Lyon soient très proches, nous rappelons dans nos comptes-rendus de résultats de signature IFN que les résultats de Lille et Lyon ne sont pas superposables et qu'il faut en tenir compte dans le suivi du patient.

6. Conclusion sur les conditions d'analyse

L'ensemble des études comparatives entre Lille et Lyon pour chaque paramètre d'analyse nous permet de conclure sur les différentes conditions d'analyse à utiliser lors du calcul du score interféron à Lille. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le tube PAXgene, la normalisation individuelle et les témoins Lyonnais pour la réalisation du score interféron à Lille, ce qui correspond aux mêmes conditions d'analyse que Lyon. Pour rappel, dans ces conditions, nous avons un $r = 1$ statistiquement significatif ($p = 0.017$) (Figure 28) pour les mêmes patients ($n=5$) entre les scores interféron réalisés à Lille et à Lyon. De plus, le rapport de 2 existant entre les scores interféron réalisés dans les mêmes conditions à Lille et à Lyon pendant notre mise au point s'explique probablement par un lot réactif défectueux.

Démarrage de l'activité au CHU de Lille

Afin de démarrer l'activité de la réalisation de la signature interféron au CHU de Lille, un ensemble de documents concernant la qualité et de procédures ont dû être rédigés. Nous allons les présenter dans les différentes parties, en les classant selon qu'ils concernent le pré-analytique, l'analytique ou le post analytique.

1. Pré-analytique

a. Information aux prescripteurs du CHU de Lille et flashinfo pour les prescripteurs extérieurs

Il a été nécessaire d'informer les médecins prescripteurs que l'analyse de la signature interféron, autrefois envoyée à Lyon, était désormais réalisée à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille.

Nous avons donc envoyé un mail groupé aux prescripteurs habituels de signature interféron travaillant au CHU de Lille, ainsi qu'un flashinfo aux CH extérieurs présenté en Annexe 6.

Dans ce mail, nous avons transmis le code informatique pour la prescription de l'analyse, ainsi que le type de tube à utiliser (PAXgene).

Nous avons donné le contact de l'équipe logistique du Centre de Biologie Pathologie Génétique (CBP), qui gère la problématique de la commande et l'approvisionnement en tubes PAXgene pour les services et les CH extérieurs (cf c. Acheminement / gestion des tubes PAXgene).

Nous avons également transmis en pièce jointe le bon de demande (Annexe 7) comprenant la feuille de renseignements cliniques qui doit être associée à chaque prescription, ainsi que le lien du site du catalogue des analyses du CBP sur lequel le trouver (cf b. Catalogue des analyses / Bon de demande).

Enfin, nous avons rappelé qu'étant donné le changement d'automate, il fallait interpréter avec précaution une éventuelle évolution du score interféron réalisé à Lille par rapport à un prélèvement antérieur analysé par Lyon.

b. Catalogue des analyses / Bon de demande

Le CBP du CHU de Lille tient un catalogue des analyses consultable en ligne sur internet. L'analyse « signature transcriptomique de l'interféron » a été ajoutée, permettant de diffuser diverses informations (type de contenant, conditions de transport, bon de demande, tarification) (66).

Pour les services de soins du CHU de Lille prescrivant cette analyse, un tube PAXgene doit être envoyé au laboratoire dans les 24h à température ambiante.

Les laboratoires extérieurs prescrivant cette analyse doivent nous faire parvenir un tube PAXgene congelé à -20°C.

Dans les deux cas, le bon de demande (Annexe 7) doit être rempli et joint à la demande. Ce dernier reprend les informations du patient, du service prescripteur, rappelle les conditions de prélèvement, donne le contact du service d'immunologie du CHU de Lille où l'analyse est réalisée, indique l'adresse de réception du prélèvement pour les laboratoires extérieurs, et demande les renseignements cliniques.

Les renseignements cliniques sont indispensables pour comprendre et interpréter le résultat. C'est pourquoi il est demandé aux prescripteurs de préciser l'indication de la prescription (diagnostic retenu ou suspecté), la présence ou non d'une phase de poussée de la maladie (augmentation du score interféron), la présence ou non d'une infection chronique ou sévère en cours ou récente (possible faux positif du score

IFN) et les traitements en cours à visée immunitaire (pouvant influencer sur le score IFN).

c. Acheminement / gestion des tubes PAXgene

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'acheminement des tubes PAXgene pour les demandes internes du CHU de Lille se fait à température ambiante dans les 24h, et se fait congelé à -20°C pour les demandes des laboratoires extérieurs. La gestion des tubes PAXgene se fait par l'équipe logistique du CBP. Elle s'occupe de la commande (13,20€ / unité) et de la distribution des tubes aux prescripteurs (dans les services de soins en interne et dans les laboratoires extérieurs). Au démarrage de l'activité, le laboratoire prend en charge l'achat et l'envoi des tubes PAXgene pour les services prescripteurs qui ne disposent pas de stock propre.

2. Analytique

Le document qualité interne du CHU de Lille reprenant les étapes de la réalisation technique de la signature interféron est présenté en Annexe 8. Il reprend le protocole d'extraction d'ARN, le protocole de la technique Nanostring, la récupération / traitement des données brutes ainsi que l'interprétation / validation du score interféron.

L'organigramme reprenant la synthèse des étapes de la réalisation de la signature interféron au CHU de Lille est présenté dans la Figure 31.

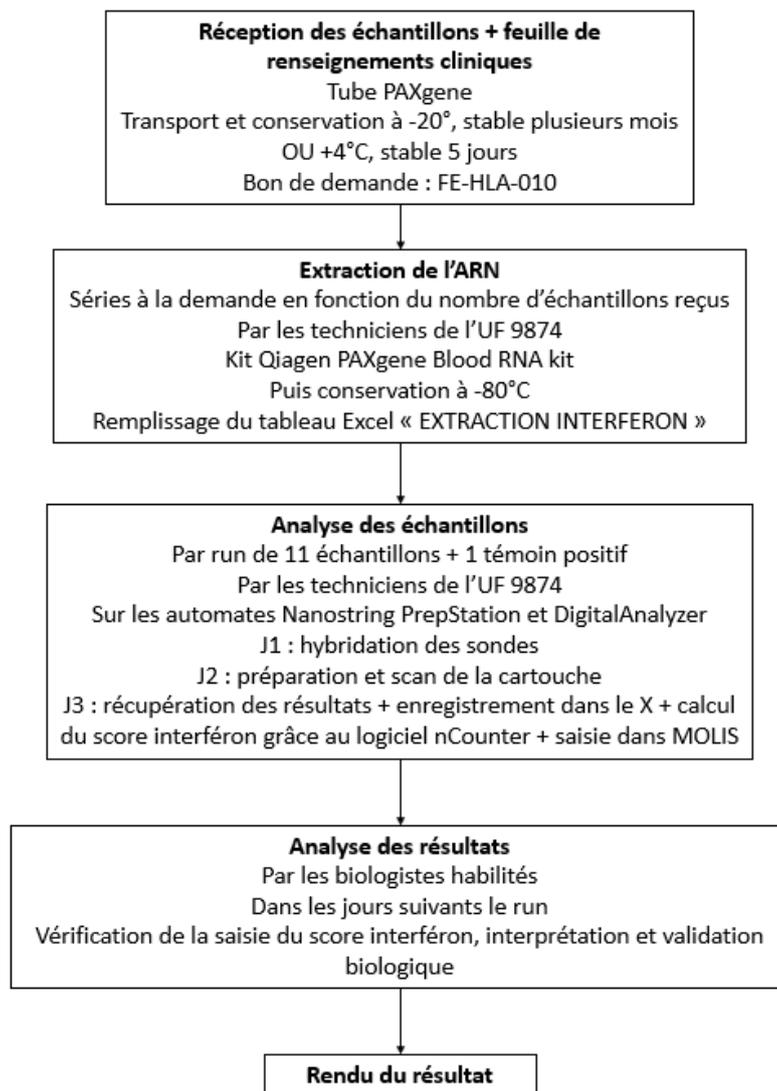


Figure 31 : Résumé des différentes étapes nécessaires à l'étude de la signature interféron au CHU de Lille. Chaque étape est détaillée dans le document qualité en Annexe 8.

a. Extraction d'ARN

A leur arrivée dans le laboratoire du CHU de Lille, les tubes sont conservés dans un congélateur à -20°C. Si les tubes ont été conservés à +4°C ou congelés à -20°C, ils sont ramenés à température ambiante pendant deux heures avant de commencer la procédure d'extraction d'ARN. Si l'extraction est réalisée rapidement après le prélèvement (sans congélation préalable), les tubes doivent être conservés au moins

deux heures à température ambiante après le prélèvement sanguin afin d'assurer la lyse complète des cellules sanguines.

Le protocole requiert un kit PAXgene Blood RNA kit, et est décrit en Annexe 8. Après l'extraction d'ARN, la densité optique est mesurée sur le Nanodrop afin d'obtenir la concentration d'ARN (nécessaire pour les calculs de volume lors du passage de l'échantillon sur le Nanostring) et la qualité d'ARN ($A_{260/280}$ et $A_{260/230}$).

Si, pour un échantillon, la concentration d'ARN est inférieure à 15 ng/ μ L, un commentaire de non-conformité pour quantité insuffisante est ajouté et le prescripteur est prévenu afin qu'il envoi d'un nouveau prélèvement.

b. Technique Nanostring

Après extraction de l'ARN à partir d'un tube PAXgène, la quantification des ISG est réalisée grâce à la technologie Nanostring. Le mode opératoire se déroule sur 3 jours.

Le premier jour correspond à l'hybridation des sondes sur les ARN des ISG. La dilution de l'ARN du patient avec de l'eau « RNase free » est réalisée directement dans le puits de la barrette afin d'obtenir un volume final égal à 7 μ L. Les volumes sont calculés selon les formules suivantes : « Volume d'ARN (μ L/200ng) = 200 / [ARN](ng/ μ L) » et « Volume d'eau RNase free = 7 μ L – Volume d'ARN ». Le « Master Mix » est créé en reconstituant et en mélangeant : les sondes de capture spécifiques des ISG à doser, les sondes « Reporter » couplées aux billes de fluorescence, ainsi que les sondes étiquettes (code-barres) pour le multiplexage. 8 μ L de Master Mix est ajouté dans chaque puits de la barrette. Enfin, la barrette est insérée dans un thermocycleur, qui effectue un cycle d'hybridation à 67°C qui dure 18h.

Le deuxième jour correspond à la purification et au comptage des ARN. La purification / préparation de la cartouche est réalisée sur la Prep Station Nanostring et va durer environ 3 heures. Cette station de préparation permet d'éliminer les sondes en excès de la barrette, et de transférer les couples ARN-ISG/sondes hybridés de la barrette en les alignant sur la cartouche. Une fois la cartouche prête, il ne reste plus qu'à l'insérer dans le nCounter de Nanostring pour que les décomptes bruts soient réalisés. Les résultats sont récupérés le lendemain matin (au troisième jour) sur l'automate nCounter sur une clef USB, importés dans le logiciel nSolver et traités afin de calculer le score interféron. Enfin, le technicien saisit les résultats de la série dans le logiciel de validation, et transmet la feuille de résultats correspondant à la série à valider au biologiste habilité.

3. Post-analytique

a. Validation biologique

Les détails sont décrits dans la partie validation biologique du document qualité présenté en Annexe 8.

Contrôles qualités (CQ)

La première étape est la vérification et la validation des CQ. Il existe plusieurs niveaux de contrôle de la qualité : CQ des échantillons et CQ de la série.

Afin de s'assurer de la fiabilité des résultats rendus par le spectrophotomètre Nanodrop, un contrôle qualité du dosage des acides nucléiques est passé quotidiennement. Le résultat est rentré dans l'URT (Unity Real Time, un logiciel permettant de suivre les CQ), par le technicien ayant réalisé l'extraction. Ce CQ est

validé quotidiennement par un biologiste habilité du secteur HLA au laboratoire d'immunologie du CHU de Lille.

Pour chaque échantillon, un contrôle de la qualité de l'extraction est réalisé au moment du dosage des ARN sur le Nanodrop. Pour rappel, une extraction est dite de bonne qualité si le ratio $A_{260/280}$ est proche de 2, et $A_{260/230}$ est proche de 1.8. En cas de rapport < 0.8 , un commentaire correspondant à une anomalie de l'extraction sera ajouté sur le compte rendu.

Au moment du passage sur le Nanostring, des sondes positives et négatives sont ajoutées dans les réactifs de chaque échantillon. Elles permettent de détecter un problème au niveau de la qualité de l'échantillon et de la série. En cas de problème, un drapeau apparaît dans le logiciel nSolver au niveau de l'une des colonnes au moment de la génération des décomptes bruts. Si ce drapeau apparaît dans la colonne « Imaging QC flag », il est possible de recommencer uniquement la lecture de la cartouche sur le Nanostring. Sinon, il est nécessaire de repasser l'échantillon sur une autre série ou de demander un nouvel échantillon de contrôle au prescripteur.

Pour chaque série, un contrôle qualité interne (CQI), obtenu à partir d'un pool de patients connus pour avoir un score interféron aux alentours de 4 (cf 4. Contrôles positifs), est analysé en parallèle des patients. Le résultat du CQI est saisi par le technicien dans l'URT, et validé par le biologiste.

Interprétation du score interféron

Pour chaque patient, le biologiste de validation vérifie la saisie manuelle de la valeur du score interféron effectuée par le technicien.

Ensuite, le score interféron est interprété comme suit :

- Si < 2.3 : « Score interféron négatif. »
- Si $[2.3-3.2]$: « Score interféron faiblement positif (compris entre 2.3 et 3.2). A contrôler sur un nouveau prélèvement en fonction du contexte clinique. »
- Si > 3.2 : « Score interféron positif : élévation des ISG (*interferon stimulated genes*) par rapport à une population de témoins. »

Enfin, un commentaire peut être ajouté si besoin en fonction des situations :

- Si le délai d'acheminement n'a pas été respecté, l'analyse n'est pas réalisée et le commentaire suivant est ajouté sur le compte rendu « Le résultat du score interféron ne peut être rendu en raison d'un délai pré-analytique non respecté. »
- En cas de mauvaise qualité d'extraction ($A_{260/280}$ ou $A_{260/230} < 0.8$), le commentaire suivant est ajouté sur le compte rendu : « La qualité de l'extraction de l'ARN de l'échantillon n'est pas optimale, augmentant l'incertitude du résultat. »
- Si les comptes normalisés des gènes de ménage ne sont pas similaires à ceux de la population générale, il faut ajouter le commentaire suivant « Expression des gènes de ménage différente de celle observée dans la population générale augmentant l'incertitude du résultat. »

Une fois que le score interféron est renseigné dans le dossier informatique du prélèvement et vérifié, que l'interprétation est complétée et que les éventuels commentaires ont été ajoutés, le biologiste peut valider l'analyse.

b. Facturation

La réalisation de la signature interféron n'est pas un examen inscrit à la nomenclature NABM. Le guide des analyses en immunologie (67), dans la fiche 12.2, mentionne le dosage des IFN de type 1 ainsi que l'identification d'une signature IFN périphérique par quantification des ARNm issus de gènes dont l'expression est induite par les IFN de type 1. Cependant, sur le site de l'Assurance Maladie reprenant la table nationale de codage de Biologie (68), la signature interféron n'est pas un acte inscrit à la nomenclature NABM.

A Lyon, l'acte est tarifé en BHN700 (B700 hors nomenclature), nous avons donc choisi de fixer la même tarification.

Retour d'expérience

1. Résultats patients

L'analyse de la signature interféron a débuté le 1^{er} novembre 2023 au CHU de Lille. Nous avons recueilli les données de chaque patient analysé sur 6 mois (jusqu'au 1^{er} mai 2024) : origine de la demande, contexte clinique, antériorité.

Au total, sur la période des 6 premiers mois du lancement de l'activité au CHU de Lille, nous avons reçu 386 prescriptions de signature interféron (services de soins du CHU de Lille et CH extérieurs). Parmi ces 386 demandes, 30 d'entre-elles ont été rejetées pour non-conformité et 356 résultats ont été analysés et rendus.

Sur ces 356 résultats rendus, 86.8% (soit 309 analyses) provenaient de services de soins du CHU de Lille, tandis que 13.2% (soit 47 analyses) étaient des prescriptions provenant des CH extérieurs. La répartition ainsi que le nombre d'analyses de signature interféron réalisées au CHU de Lille sur les 6 premiers mois en fonction des sites prescripteurs sont présentés dans la Figure 32.

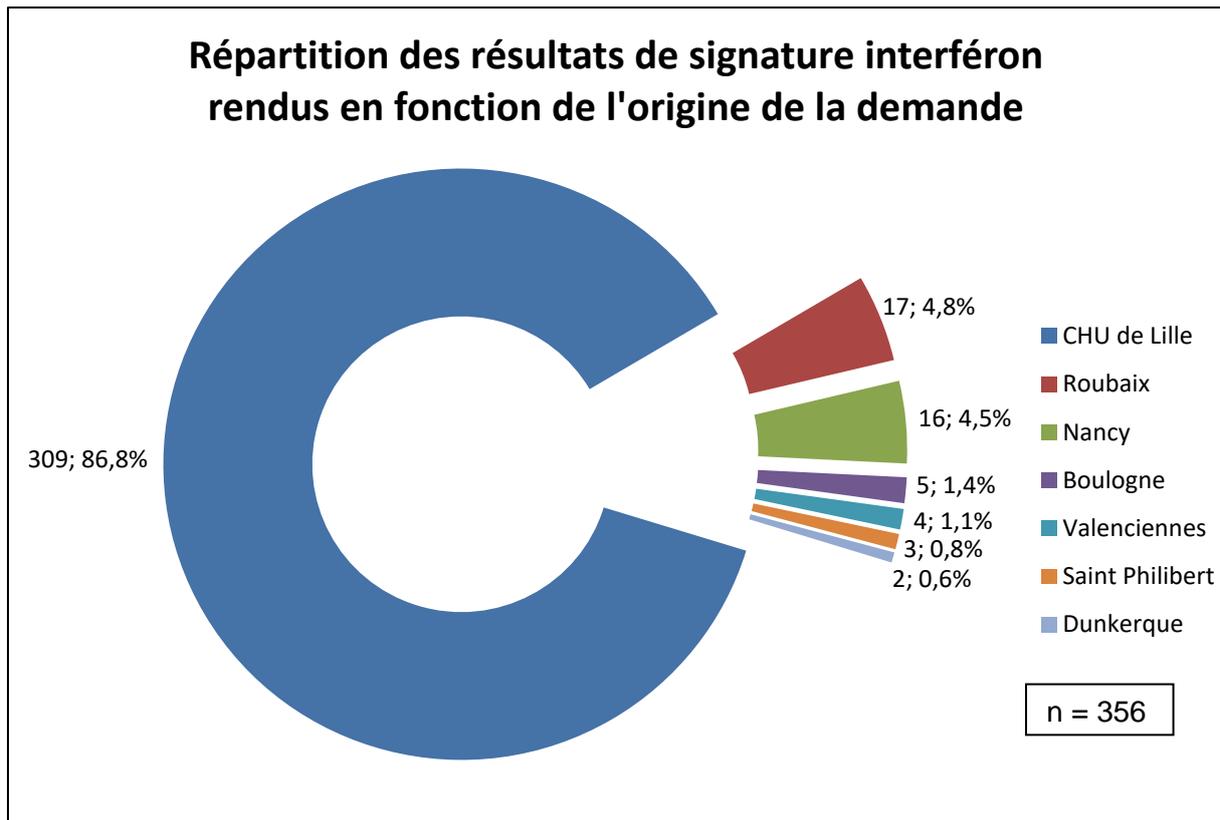


Figure 32 : Répartition des résultats de l'analyse de la signature interféron réalisée à Lille en fonction des sites prescripteurs.

Nous avons également étudié la répartition des prescriptions de la signature interféron en fonction des spécialités des services de soins du CHU de Lille. Sur 323 demandes, la grande majorité a été prescrite par le service de médecine interne (247 prescriptions, soit 76.5% des demandes). S'en suivent les services de pédiatrie (47 prescriptions soit 14.6% des demandes, dont 28 prescriptions provenant de la pédiatrie générale soit 8.7% et 19 prescriptions venant de la neuropédiatrie soit 5.9%), et de dermatologie (13 prescriptions soit 4% des demandes). La répartition des prescriptions de la signature interféron en fonction des services de soins du CHU de Lille est présentée dans la Figure 33.

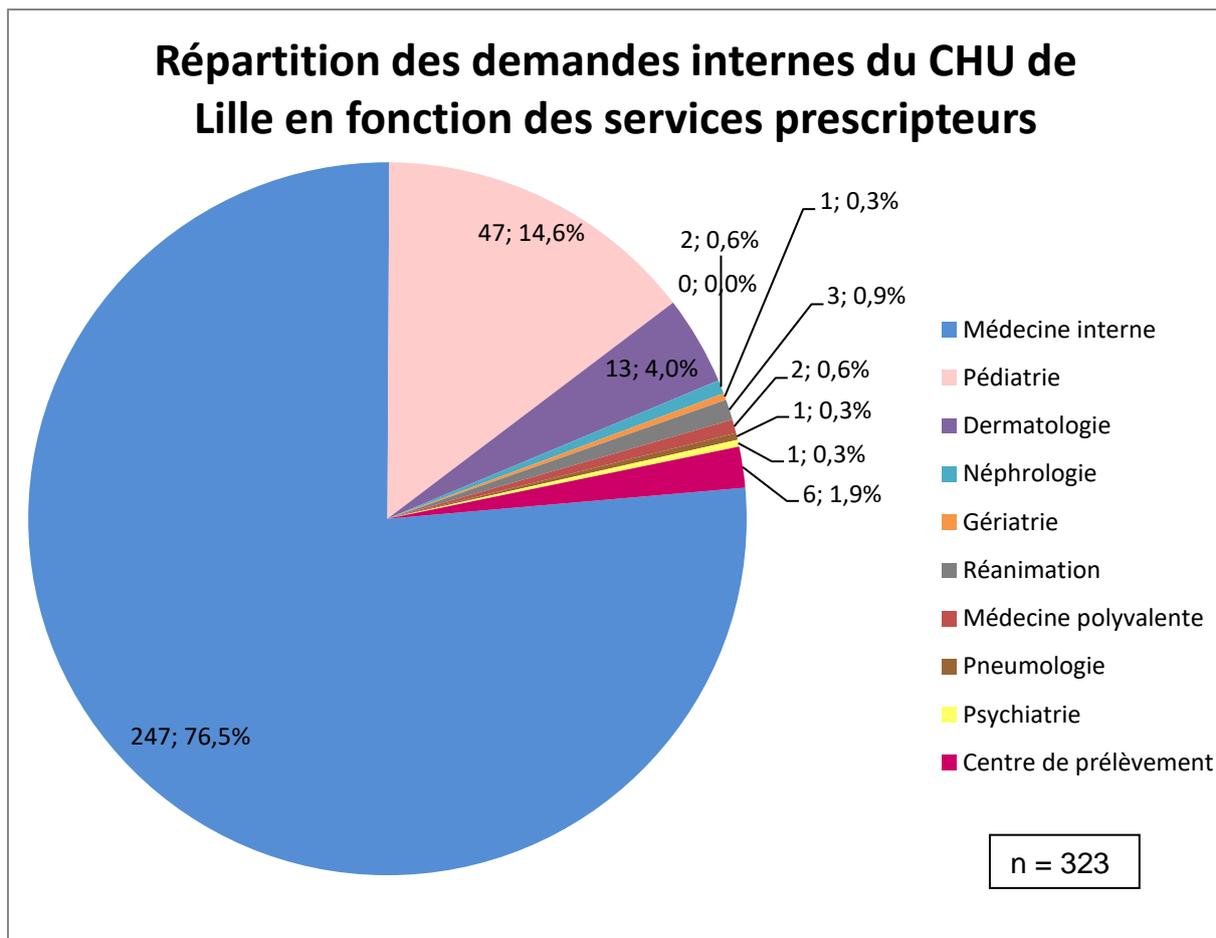


Figure 33 : Répartition des services de soins prescripteurs de la signature interféron au CHU de Lille.

De même, nous avons étudié la répartition du nombre d'analyses de la signature interféron en fonction de l'indication clinique. Les indications cliniques renseignées sur le bon de demande étaient soit une suspicion diagnostique, soit un suivi de pathologie déjà diagnostiquée. Par souci de classement, nous avons regroupé à la fois les pathologies suspectées et diagnostiquées sous le nom de la pathologie ou du groupe de pathologies concernées. Sur les 356 résultats rendus par le CHU de Lille, la majorité était prescrite dans le cadre d'un LS (169 analyses soit 47.5%). La répartition des indications cliniques des analyses de signature interféron rendues par le CHU de Lille sur les 6 premiers mois est présentée dans la Figure 34.

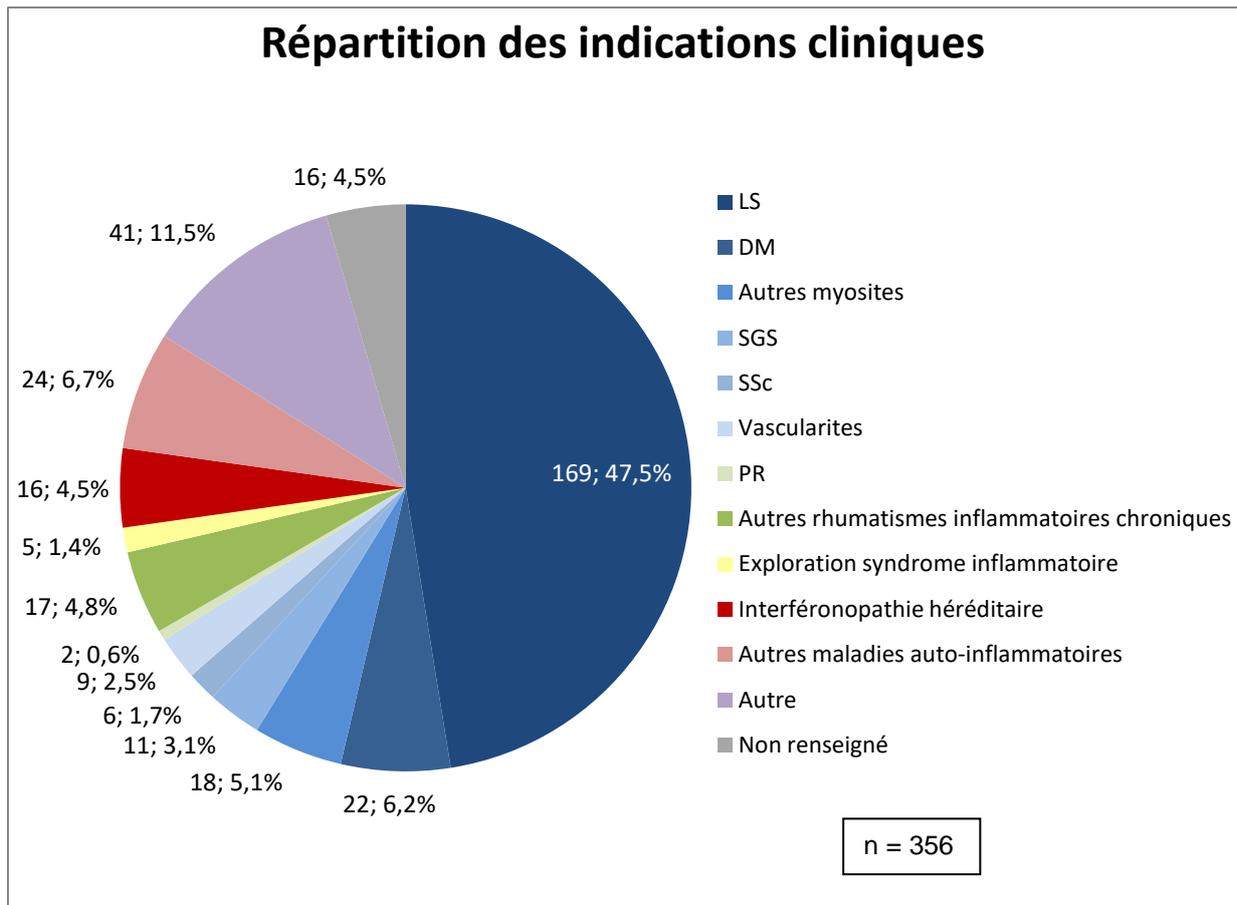


Figure 34 : Répartition des indications cliniques renseignées sur le bon de demande pour les analyses de la signature interféron rendues par le CHU de Lille. Pour chaque catégorie, les suspicions diagnostiques et les suivis +/- sous traitement ont été regroupés.

2. Nombre de demandes depuis le démarrage d'activité

Le nombre croissant de prescriptions de l'analyse de la signature interféron à Lille était un argument clef pour la réalisation de l'analyse au laboratoire du CHU de Lille. Le nombre annuel de demandes d'analyse de la signature interféron prescrit par Lille depuis l'année 2020 est présenté dans la Figure 35. Pour chaque année, nous précisons où la demande a été analysée (Lyon / Lille). Le nombre prévisionnel de résultats pour l'année 2024 a été calculé en se basant sur le nombre d'analyses rendues sur les 4 premiers mois.

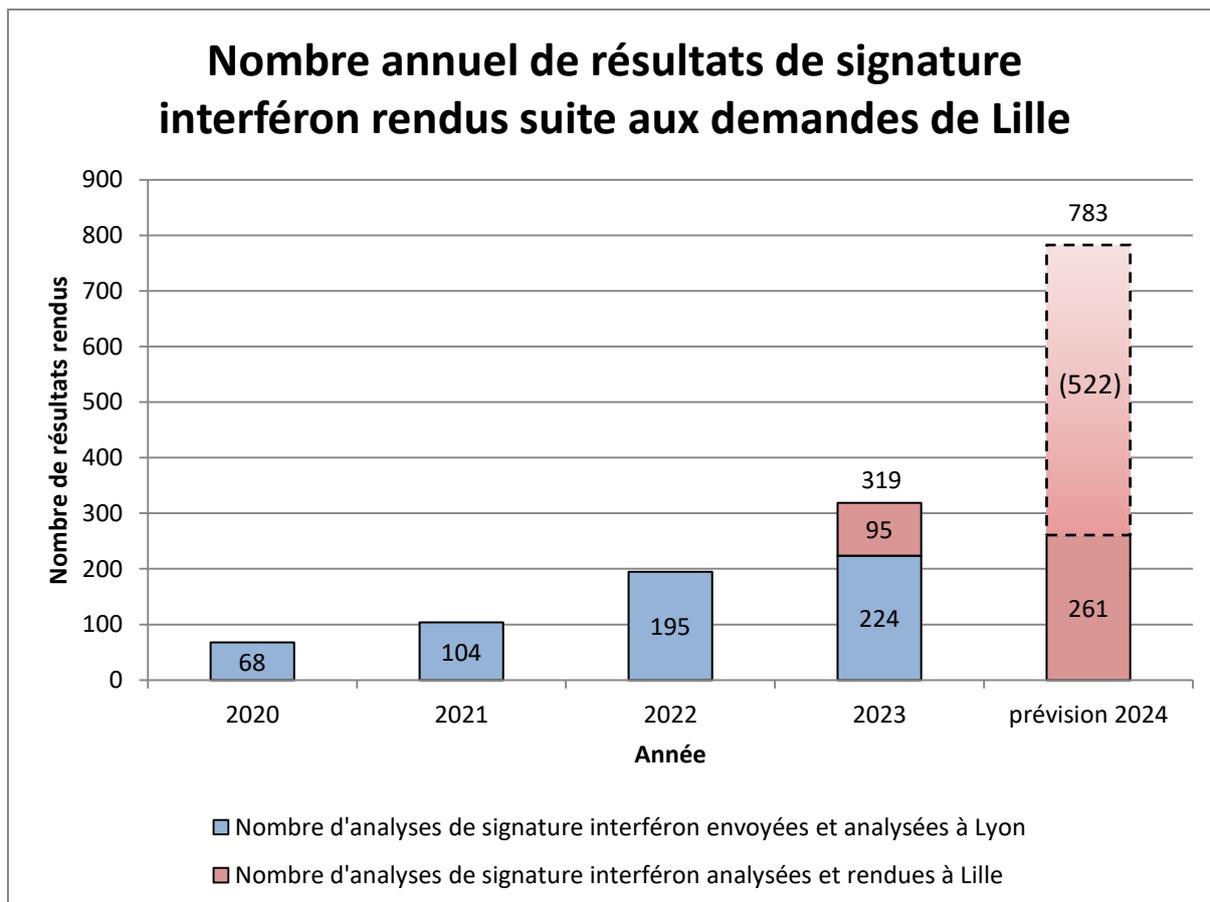


Figure 35 : Nombre de résultats rendus, respectivement par les laboratoires de Lille et de Lyon, de l'analyse signature interféron émanant des demandes de Lille, par année. Pour l'année 2024, les 261 résultats rendus par Lille correspondent aux 4 premiers mois (période du 1^{er} janvier 2024 au 30 avril 2024). Nous nous sommes basés sur ces résultats pour le calcul prévisionnel des 8 mois restants (522)

Discussion

En résumé, les IFN de type 1 sont des cytokines clefs dans le fonctionnement du système immunitaire et notamment pour l'élimination de cellules infectées par des virus (1). Sous certaines conditions de stress (par exemple une infection virale), un signal est transduit dans le noyau des cellules afin d'activer les IRF, qui vont eux même augmenter la synthèse et la sécrétion extracellulaire des IFN (Figure 1). L'IFN, après fixation sur son récepteur IFNAR, va activer la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT, ce qui aboutit dans le noyau à l'activation de la transcription d'une centaine d'ISG (6) (10) (Figure 2). Ces ISG codent pour des protéines qui ont plusieurs rôles : effecteurs antiviraux, régulateurs positifs et négatifs. Cependant, une augmentation inadaptée, importante et chronique des IFN de type I est délétère et responsable de symptômes cliniques (12). Ce phénotype est regroupé sous le terme d'interféronopathies, qui peuvent être héréditaires (par mutation génétique constitutionnelle) ou acquises (par dérégulation de la voie de signalisation de l'IFN). Ces interféronopathies peuvent être traitées par différentes catégories médicamenteuses : les anti-rétroviraux (notamment les inhibiteurs de transcriptase inverse), les inhibiteurs de cGAS, les Ac anti-IFN α et anti-récepteur de l'IFN de type 1, les vaccins kinoïdes permettant la production d'Ac anti-IFN α par le patient, les inhibiteurs de JAK et les Ac anti-interleukine (24) (Figure 5). L'efficacité clinique est variable en fonction des molécules et des pathologies. Certains traitements sont déjà prescrits dans cette indication et ont une réponse clinique et biologique prouvée, tandis que d'autres sont encore en cours de développement.

Il est intéressant de développer un test capable de quantifier le taux circulant d'IFN de type 1. Cependant, la concentration sérique en IFN étant de l'ordre du fg/mL, elle n'est pas accessible aux techniques conventionnelles de dosage direct en

ELISA qui ne sont pas assez sensibles. La signature interféron est une mesure indirecte du taux d'IFN circulant par la quantification des ARNm transcrits par les ISG. Les ISG ont un *fold change* significatif entre les patients atteints d'interféronopathie et les témoins sains. Le choix et le nombre des ISG à quantifier sont basés sur une étude princeps, qui a retenu le sous-groupe des 6 ISG les plus exprimés chez les patients atteints d'interféronopathie par rapport aux témoins sains (41). Ces ISG retenus sont : IFI27, IFI44L, IFIT1, ISG15, RSAD2 et SIGLEC1. Depuis, la plupart des travaux à propos de la signature IFN utilisent ces 6 ISG pour le calcul du score IFN.

La méthode de quantification des ARNm transcrits des ISG considérée comme le gold standard pour étudier la signature interféron est la RT-qPCR. Cependant, il s'agit d'une technique longue, et les étapes de rétrotranscription et d'amplification peuvent être source de potentiels biais. La technologie Nanostring est une nouvelle technique de dosage direct des ARNm des ISG. Après une étape de lyse cellulaire, l'ARN est extrait. Cette technique utilise des sondes qui comportent deux parties : une partie pour la capture de l'ARN cible, et l'autre partie couplée à un code barre (association de billes de différentes fluorescences) qui assure la spécificité de la sonde. L'utilisation de différentes sondes couplées à des codes-barres différents permet de multiplexer, donc de quantifier simultanément plusieurs ARNm-ISG (Figure 15). L'équivalence entre le gold standard pour la réalisation de la signature interféron a été démontrée.

La signature interféron apporte une aide au diagnostic des interféronopathies (Figure 10), et permet un suivi des phases de poussée et un suivi des patients sous traitement. De plus, le taux basal a un rôle pronostique (risque de poussée dans le

LS (51)) et prédictif de réponse au traitement (réponse au Rituximab dans la PR (52)).

La réalisation de la signature interféron par technologie Nanostring n'était réalisée jusqu'ici qu'au CHU de Lyon, qui l'a mise en place en routine en 2018. L'Institut Imagine à Paris réalise également cette analyse mais dans le cadre de la recherche, en quantifiant un plus grand nombre d'ISG pour le calcul du score. Face à l'intérêt de la signature interféron et devant des demandes croissantes émanant des services de soins du CHU de Lille, le but de ce travail était la mise en place de l'analyse de la signature interféron à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille en utilisant la technologie Nanostring. Nous avons donc étudié les conditions pré-analytiques (contenant, transport, conservation, protocole d'extraction) et analytiques (gènes de ménage, normalisation, seuil de positivité, constitution d'un contrôle positif, témoins) en les comparant avec celles utilisées à Lyon. Nous avons également travaillé sur les étapes post-analytiques : information aux prescripteurs, création d'un bon de demande, gestion et validation des contrôles qualités, interprétation et rendu des résultats.

La mise au point de la technique a nécessité des choix sur les paramètres utilisés au niveau pré-analytique, analytique et post-analytique.

Le tube utilisé pour recueillir le sang contenant les ARN à doser est un élément important pour la qualité du résultat. Pour le choix des tubes, nous nous sommes demandé quelles sont les différences entre les tubes EDTA, classiquement utilisés pour travailler sur sang total, et les tubes PAXgene, contenant un stabilisateur de l'ARN.

Nous avons donc décidé d'utiliser le tube PAXgene pour la réalisation de la signature interféron en routine à Lille car :

- il offre une meilleure stabilité d'ARN *in vitro* et donc une conservation avantageuse (stable jusqu'à 3 jours à 18-25°C et jusqu'à 5 jours à 2-8°C) par rapport au tube EDTA (instabilité dès 24h) (56) (Figure 20).

- il est possible de le transporter congelé à -20°C par navette alors qu'il n'est pas possible de transporter les tubes EDTA congelés à -80°C en carboglace par navette.

- il n'y a pas de différence significative en comparant la quantité et la qualité des ARN après extraction sur tube PAXgene et sur tube EDTA (Figure 22).

- lors de nos tests comparatifs de score interféron avec Lyon, on obtient un meilleur coefficient de corrélation de Spearman avec les tubes PAXgene qu'avec les tubes EDTA ($r = 1$ versus $r = 0.92$).

La normalisation sur les gènes de ménage permet de comparer des comptes entre patients, témoins et contrôles, même si les concentrations initiales en ARN sont différentes.

Concernant le choix des gènes de ménage, il est recommandé d'en utiliser 3 et de normaliser sur la moyenne géométrique qui est moins sensible aux valeurs extrêmes par rapport à la moyenne arithmétique (62) (63). Nous avons choisi d'utiliser l'actine- β , l'HPRT1 et la POLR2A, qui sont également les gènes de ménage utilisés à Lyon, ce qui permet d'harmoniser nos pratiques.

La normalisation individuelle rapporte le décompte brut d'un ISG d'un patient par rapport aux gènes de ménage de ce même patient, alors que la normalisation réalisée par le logiciel nSolver rapporte un ISG d'un patient aux gènes de ménage de tous les patients de la série.

Lors des tests comparatifs des scores interféron avec Lyon, bien que dans les deux cas il existe une bonne corrélation statistiquement significative, on remarque qu'avec la normalisation logicielle les scores interféron sont plus éloignés (environ divisé par 8 par rapport à Lyon) qu'avec la normalisation individuelle (environ divisé par 2 par rapport à Lyon) (Tableau 6). De plus, on remarque que le CV% est bien plus élevé pour le contrôle positif avec une normalisation logicielle par rapport à une normalisation individuelle (22.6 contre 3.79) (Figure 29). Il y a donc moins de dispersion avec la normalisation individuelle, c'est pourquoi nous avons choisi ce type de normalisation pour la réalisation de la signature interféron en routine au CHU de Lille.

L'analyse de la signature interféron rendant un score quantitatif, il est nécessaire de déterminer un seuil de positivité. Or, il n'existe pas de consensus dans la littérature pour définir ce seuil. La plupart des études le fixe en utilisant la moyenne des témoins sains + 2DS. Une étude réalisée à Vancouver avait défini un seuil à 1.72 sur les tubes PAXgene et à 2.25 sur les tubes Tempus par Nanostring (64), une autre étude avait défini un seuil à 2.47 sur tube PAXgene par RT-qPCR (38). L'étude réalisée à Lyon trouvait un seuil de positivité de 2.30 (45), avec de bonnes performances diagnostiques (Se = 90.5%, VPN = 96.6%). Dans l'étude réalisée à Lille, nous avons trouvé un seuil à 2.05 en utilisant les témoins sains lillois (Tableau 4), ce qui est concordant avec la littérature. Cependant, nous avons choisi de nous aligner sur le seuil de 2.30 (moyenne des témoins sains de Lyon + 2 DS) utilisé à Lyon car (i) il est proche du nôtre, (ii) comme expliqué ci-dessous, nous utilisons les témoins sains lyonnais et (iii) cette harmonisation nous permettra de comparer au mieux les résultats entre les 2 centres.

De même, pour le calcul du score interféron, le *fold change* de chaque ISG du patient est calculé en rapportant le décompte normalisé de l'ISG à la médiane de cet ISG chez des témoins sains. Nous avons donc regardé s'il existait une différence entre les médianes des ISG des témoins sains de Lille et de Lyon, et s'il y avait un impact sur le calcul du score interféron. Pour chaque ISG, les données montrent que les médianes des comptes normalisés sont très proches (Tableau 7). De plus, la comparaison des scores interféron de Lille en utilisant les témoins de Lille ou de Lyon montre une très forte corrélation qui est statistiquement significative (Figure 30). Devant l'équivalence de l'utilisation de témoins de Lille ou de Lyon pour le calcul du score interféron au CHU de Lille, nous avons choisi d'utiliser les témoins de Lyon, ce qui permet une reproductibilité de mesure d'un centre à l'autre.

Dans chaque série, le passage d'un contrôle positif permet de s'assurer que le Nanostring est capable de rendre un résultat positif d'un échantillon attendu comme positif, et de vérifier la reproductibilité des résultats d'un run à l'autre.

Nous avons commencé par créer notre contrôle positif en utilisant du sang de donneurs sains de l'EFS prélevé sur tube EDTA et stimulé par de l'IFN. On remarque une bonne reproductibilité et une stabilité des résultats pour chaque échantillon de contrôle positif (CV% égal à 7.97%, 4.96% et 3.79% respectivement) (Tableau 5, Figure 25). Cependant, les scores obtenus avec les contrôles créés par sang de l'EFS stimulé par de l'IFN sont difficiles à prédire et sont bien plus élevés que le seuil de positivité. Or, il est intéressant d'avoir un contrôle positif autour du seuil décisionnel (donc viser plutôt un score de 3-4) afin de s'assurer qu'on est en mesure de détecter les patients faiblement positifs.

Nous sommes ensuite passés sur la préparation d'un contrôle positif à partir d'un pool de patients positifs connus avec une signature interféron aux alentours de 4.

Cela a pour avantage d'être plus proche du seuil de positivité. Après 20 passages, nous obtenons une bonne reproductibilité et une bonne stabilité avec un CV% = 6.12% (Figure 26). Nous avons choisi d'utiliser un contrôle positif en poolant des patients connus ayant un score interféron autour de 4.

L'étude comparative dans les mêmes conditions d'analyse que Lyon, à savoir l'utilisation d'un tube PAXgene, l'utilisation d'une normalisation individuelle et des témoins lyonnais pour le calcul du score interféron, avait une bonne concordance statistiquement significative, mais les scores calculés à Lille (série du 26/09/23) étaient environ divisés par 2 par rapport à Lyon (Figure 28).

Nous avons envoyé nos tubes PAXgene à Lyon afin qu'ils réalisent l'extraction et nous renvoient les ARN pour calcul du score. Cette série (réalisée le 23/04/24) retrouve des scores bien plus proches de ceux de Lyon, et on remarque que le rapport de 2 tend à disparaître (Tableau 8). L'hypothèse la plus probable retenue est un lot de réactif défectueux sur la série du 26/09/23, qui aurait entraîné un biais systématique non détecté car nous étions en train de tester différents contrôles positifs.

Au total, pour la mise au point de la technique de l'analyse de la signature interféron au CHU de Lille, nous avons fait les choix suivants :

- prélèvement sur tube PAXgene
- ARN extrait manuellement en utilisant le PAXgene® Blood RNA kit, avec vérification de la quantité et la qualité des ARN sur le nanodrop
- décompte brut des ISG réalisé par le nCounter par série de 11 en ajoutant un contrôle positif composé d'un pool de patients
- chaque ISG est normalisé individuellement sur la moyenne géométrique des 3 gènes de ménage, le *fold change* de chaque ISG est calculé en rapportant le

compte normalisé sur la médiane de cet ISG des témoins lyonnais, et le score interféron est calculé en réalisant la médiane des *fold change* des 6 ISG pour chaque patient.

- interprétation du score interféron en fonction du seuil de positivité de 2.3 comme à Lyon.

Le démarrage de l'activité de l'analyse en routine en novembre 2023 a nécessité la rédaction d'un ensemble de documents d'information, de documents qualités et de procédures.

Concernant le pré-analytique, nous avons envoyé un mail groupé aux services prescripteurs du CHU de Lille, ainsi qu'un flashinfo aux CH périphériques afin de les informer que l'analyse de la signature interféron, jusqu'alors envoyée à Lyon, était désormais réalisée à l'institut d'immunologie du CHU de Lille (Annexe 6). Nous avons rappelé les conditions pré-analytiques (envoi d'un tube PAXgene à température ambiante dans les 24h pour les demandes émanant des services de soins du CHU de Lille, envoi congelé à -20°C pour les CH périphériques). Nous avons également créé et transmis le bon de demande à joindre avec chaque prescription (Annexe 7). Celui-ci permet de renseigner des éléments cliniques, notamment l'indication de la prescription, la présence ou non d'une phase de poussée de la maladie ainsi que la présence ou non d'une infection.

Nous avons mis à jour le catalogue des analyses consultables en ligne en y ajoutant l'analyse du score IFN (66). Sur cette page web, les prescripteurs peuvent retrouver les informations pré-analytiques (type de contenant, conservation, transport), ainsi que le bon de demande.

Concernant l'analytique, nous avons rédigé le protocole d'extraction manuel réalisé par série de 6 avec le PAXgene Blood RNA kit (Annexe 8).

Nous avons également rédigé le mode opératoire de la réalisation du score interféron (Annexe 8).

Concernant le post analytique, nous avons rédigé les règles de validation. La validation des CQ sont effectués par le biologiste. Il vérifie la saisie manuelle de la valeur et l'interprétation du score interféron puis ajoute un commentaire si besoin. Sur le compte rendu, il est rappelé qu'il faut interpréter avec précaution une éventuelle évolution du score interféron réalisé à Lille par rapport à un prélèvement antérieur analysé par Lyon. La signature interféron n'étant pas un acte inscrit à la NABM (68), la facturation de l'analyse est tarifée en BHN700, comme à Lyon.

Nous avons recueilli sur 6 mois les données de chaque demande de signature interféron : origine de la demande, contexte clinique, existence et valeur d'une éventuelle antériorité.

Nous avons reçu 386 prescriptions de signature interféron (services intérieurs du CHU de Lille et laboratoires extérieurs). Trente d'entre elles ont été rejetées pour non-conformité, nous avons donc rendu 356 analyses. Les prescriptions internes aux services de soins du CHU de Lille représentent 86.8% des analyses (soit 309 analyses), tandis que 13.2% (soit 47 analyses) proviennent des laboratoires / CH extérieurs (Figure 32).

Sur les 323 demandes de services de soins du CHU de Lille, la grande majorité a été prescrite par le service de médecine interne (247 prescriptions soit 76.5% des demandes de l'intérieur). Sur les 356 résultats rendus par le CHU de Lille, la majorité

était prescrite dans le cadre d'un LS (suspicion diagnostique ou suivi) (169 analyses soit 47.5%) (Figure 33).

Le nombre croissant de prescriptions de l'analyse de la signature interféron à Lille (CHU Lille et laboratoires/CH périphériques) était un argument clef pour la réalisation de l'analyse au laboratoire du CHU de Lille. Les prévisions de résultats rendus par le laboratoire de Lille pour l'année 2024 sont de 783 analyses, ce qui confirme la tendance à l'augmentation des années précédentes (Figure 35).

Conclusion et perspectives

La mise en place de l'analyse en routine de la signature interféron à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille est un succès et permet de répondre à des demandes croissantes. Cette thèse a permis de s'approprier chaque étape de la technologie de Nanostring, du pré-analytique au post analytique, en passant notamment par la compréhension de chaque paramètre et du calcul du score lors de la phase analytique.

Devant l'augmentation croissante des demandes de l'analyse de signature interféron, l'extraction manuelle d'ARN est fastidieuse. Il existe un protocole d'extraction automatisé en utilisant le PAXgene blood RNA kit. Celui-ci permet d'extraire 12 échantillons en 2h30 (comprenant la manipulation initiale des tubes PAXgene, à savoir centrifugations, lavage du culot et remise en suspension), avec une durée de manipulation par le technicien beaucoup plus faible que pour le protocole manuel. Nous avons donc pour projet d'automatiser l'extraction d'ARN, ce qui sera plus adapté à la routine et à un nombre croissant de demandes.

Pour cela, une nouvelle plateforme d'extraction va être mise en place sur le plateau commun de biologie moléculaire du CHU de Lille, qui sera dotée de 2 robots pipeteurs STARlet Hamilton (1 dédié à l'ADN et 1 à l'ARN) et de 3 extracteurs MagnetaPure 32 Plus (2 dédiés à l'extraction d'ADN et 1 à l'extraction d'ARN). Il est prévu qu'à terme, la plateforme permette d'extraire de l'ARN à partir de tube PAXgene pour nos analyses de signature interféron.

La mise en place de cette analyse amène de nouvelles perspectives.

Elle permet notamment la réalisation d'études cliniques au niveau du CHU de Lille. Dans ce cadre, un travail analysant la signature interféron au cours de la sclérodémie systémique va bientôt débuter. Elle vise à étudier la corrélation entre le score interféron et les caractéristiques cliniques de la maladie.

Lors de notre mise au point, nous avons choisi à plusieurs reprises d'utiliser des conditions d'analyse similaires à Lyon (témoins Lyonnais, normalisation individuelle, seuil de positivité), afin d'harmoniser nos pratiques et de comparer au mieux nos résultats. Nous projetons de mettre en place avec Lyon des échanges inter laboratoires (EIL), ce qui permettrait d'évaluer en continu la reproductibilité des centres, afin notamment de détecter d'éventuelles dérives.

Enfin, nous avons centré notre démarche pour la mise en place de la signature interféron de type 1. Qu'en est-il de l'IFN de type 2 ? L'IFN γ , est une cytokine essentielle à l'immunité innée et adaptative contre les infections virales, certaines bactéries (notamment intracellulaires comme *M.tuberculosis*) et certains agents pathogènes unicellulaires. L'expression anormale d'IFN γ est associée à un certain nombre de maladies auto-inflammatoires et auto-immunes. Une étude a mis en évidence une élévation significative du taux d'IFN γ dans la DM et la polymyosite (PM) (69). De plus, d'autres auteurs ont étudié les sous-populations de lymphocytes T et de cellules dendritiques présents dans les biopsies musculaires de patients atteints de DM et de PM, ainsi que l'expression de l'IFN γ , de l'IL17, et de la réponse à l'injection d'immunoglobulines en intraveineux (IgIV) (70). Dans la biopsie musculaire, les résultats montrent une augmentation significative du nombre de

cellules produisant de l'IFN γ chez les patients non répondeurs à l'IgIV. Ainsi, une signature interféron de type 2 pourrait avoir un intérêt diagnostique et prédictif de réponse au traitement par IgIV dans certaines myosites. Il semblerait donc intéressant de mettre au point une signature interféron de type 2 avec la technologie Nanostring par quantification directe des ARN dont la synthèse est augmentée par l'IFN γ afin d'élargir cette méthode à d'autres pathologies.

Bibliographie

1. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B. 12 sept 1957;147(927):258-67.
2. Wheelock EF. Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin. Science. 16 juill 1965;149(3681):310-1.
3. Stewart WE. Interferon Nomenclature Recommendations. Journal of Infectious Diseases. 1 oct 1980;142(4):643-643.
4. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. Nat Immunol. janv 2003;4(1):63-8.
5. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol. janv 2003;4(1):69-77.
6. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. Annu Rev Immunol. 21 mars 2014;32(1):513-45.
7. Walter MR. The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. Front Immunol. 12 nov 2020;11:606489.
8. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and Related Cytokines and Receptors. Annual Review of Immunology. 2004;22(1):929-79.
9. Ferrao R, Lupardus PJ. The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK–Receptor Interactions. Frontiers in Endocrinology [Internet]. 2017 [cité 5 oct 2023];8. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2017.00071>
10. Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, et al. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. Nat Rev Drug Discov. déc 2007;6(12):975-90.
11. Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? Annu Rev Virol. 29 sept 2019;6(1):567-84.
12. Gresser I, Morel-Maroger L, Rivière Y, Guillon J, Tovey MG, Woodrow D, et al. INTERFERON-INDUCED DISEASE IN MICE AND RATS*. Annals of the New York Academy of Sciences. oct 1980;350(1):12-20.
13. Crow YJ, Stetson DB. The type I interferonopathies: 10 years on. Nat Rev Immunol. août 2022;22(8):471-83.
14. Crow YJ, Manel N. Aicardi–Goutières syndrome and the type I interferonopathies. Nat Rev Immunol. juill 2015;15(7):429-40.

15. Lebon P, Badoual J, Ponsot G, Goutières F, Hémeury-Cukier F, Aicardi J. Intrathecal synthesis of interferon-alpha in infants with progressive familial encephalopathy. *Journal of the Neurological Sciences*. avr 1988;84(2-3):201-8.
16. Crow YJ, Hayward BE, Parmar R, Robins P, Leitch A, Ali M, et al. Mutations in the gene encoding the 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause Aicardi-Goutières syndrome at the AGS1 locus. *Nat Genet*. août 2006;38(8):917-20.
17. Dale RC, Ping Tang S, Heckmatt JZ, Tatnall MF. Familial Systemic Lupus Erythematosus and Congenital Infection-Like Syndrome. *Neuropediatrics*. juin 2000;31(3):155-8.
18. Kind B, Muster B, Staroske W, Herce HD, Sachse R, Rapp A, et al. Altered spatio-temporal dynamics of RNase H2 complex assembly at replication and repair sites in Aicardi-Goutières syndrome. *Human Molecular Genetics*. 15 nov 2014;23(22):5950-60.
19. Ellyard JI, Jerjen R, Martin JL, Lee AYS, Field MA, Jiang SH, et al. Identification of a pathogenic variant in TREX1 in early-onset cerebral systemic lupus erythematosus by Whole-exome sequencing. *Arthritis Rheumatol*. déc 2014;66(12):3382-6.
20. Kim H. Updates on interferon in juvenile dermatomyositis: pathogenesis and therapy. *Current Opinion in Rheumatology*. sept 2021;33(5):371-7.
21. Higgs BW, Liu Z, White B, Zhu W, White WI, Morehouse C, et al. Patients with systemic lupus erythematosus, myositis, rheumatoid arthritis and scleroderma share activation of a common type I interferon pathway. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1 nov 2011;70(11):2029-36.
22. Kakkar V, Assassi S, Allanore Y, Kuwana M, Denton CP, Khanna D, et al. Type 1 interferon activation in systemic sclerosis: a biomarker, a target or the culprit. *Current Opinion in Rheumatology*. nov 2022;34(6):357-64.
23. Mathian A, Arnaud L, Amoura Z. Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014. *La Revue de Médecine Interne*. août 2014;35(8):503-11.
24. Tonduti D, Fazzi E, Badolato R, Orcesi S. Novel and emerging treatments for Aicardi-Goutières syndrome. *Expert Review of Clinical Immunology*. 1 févr 2020;16(2):189-98.
25. Rice GI, Meyzer C, Bouazza N, Hully M, Boddaert N, Semeraro M, et al. Reverse-Transcriptase Inhibitors in the Aicardi-Goutières Syndrome. *N Engl J Med*. 6 déc 2018;379(23):2275-7.
26. Khamashta M, Merrill JT, Werth VP, Furie R, Kalunian K, Illei GG, et al. Sifalimumab, an anti-interferon- α monoclonal antibody, in moderate to severe systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. nov 2016;75(11):1909-16.

27. Service d'immunologie, Faculté de Pharmacie de Lille. Guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique [Internet]. 2023 [cité 4 févr 2024]. Disponible sur: https://acthera.univ-lille.fr/co/Anifrolumab__SAPHNELOJ_.html
28. Bensussan A, Bizzini B, Pouletty P, Gallo RC, Zagury D. Les kinoïdes: Une nouvelle génération de vaccins thérapeutiques. *Med Sci (Paris)*. mars 2008;24(3):306-13.
29. Houssiau FA, Thanou A, Mazur M, Ramiterre E, Gomez Mora DA, Misterska-Skora M, et al. IFN- α kinoid in systemic lupus erythematosus: results from a phase IIb, randomised, placebo-controlled study. *Ann Rheum Dis*. mars 2020;79(3):347-55.
30. Frémond ML, Rodero MP, Jeremiah N, Belot A, Jeziorski E, Duffy D, et al. Efficacy of the Janus kinase 1/2 inhibitor ruxolitinib in the treatment of vasculopathy associated with TMEM173 -activating mutations in 3 children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. déc 2016;138(6):1752-5.
31. Tüngler V, König N, Günther C, Engel K, Fiehn C, Smitka M, et al. Response to: 'JAK inhibition in STING-associated interferonopathy' by Crow *et al*. *Ann Rheum Dis*. déc 2016;75(12):e76-e76.
32. Sanchez GAM, Reinhardt A, Ramsey S, Wittkowski H, Hashkes PJ, Berkun Y, et al. JAK1/2 inhibition with baricitinib in the treatment of autoinflammatory interferonopathies. *Journal of Clinical Investigation*. 2 juill 2018;128(7):3041-52.
33. Henrickson M, Wang H. Tocilizumab reverses cerebral vasculopathy in a patient with homozygous SAMHD1 mutation. *Clin Rheumatol*. juin 2017;36(6):1445-51.
34. Lin Y, Gu Y, McCauley JW. Optimization of a Quantitative Micro-neutralization Assay. *JoVE*. 14 déc 2016;(118):54897.
35. Technologies de Mitogen [Internet]. [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: <https://mitogendx.com/fr/technologies/>
36. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *SLAS Technology*. août 2016;21(4):533-47.
37. Rodero MP, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice GI, Werneke S, et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *Journal of Experimental Medicine*. 1 mai 2017;214(5):1547-55.
38. Rice GI, Forte GMA, Szykiewicz M, Chase DS, Aeby A, Abdel-Hamid MS, et al. Assessment of interferon-related biomarkers in Aicardi-Goutières syndrome associated with mutations in TREX1, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, and ADAR: a case-control study. *The Lancet Neurology*. déc 2013;12(12):1159-69.
39. Yao Y, Higgs BW, Morehouse C, de Los Reyes M, Trigona W, Brohawn P, et al. Development of Potential Pharmacodynamic and Diagnostic Markers for Anti-

IFN- α Monoclonal Antibody Trials in Systemic Lupus Erythematosus. Hum Genomics Proteomics. 17 nov 2009;2009:374312.

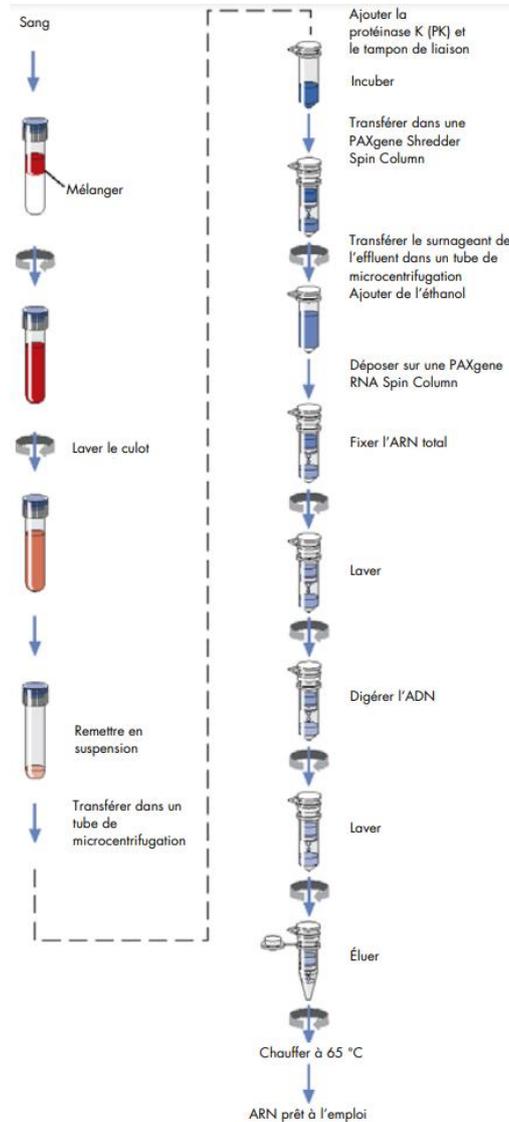
40. Kim H, De Jesus AA, Brooks SR, Liu Y, Huang Y, VanTries R, et al. Development of a Validated Interferon Score Using NanoString Technology. Journal of Interferon & Cytokine Research. avr 2018;38(4):171-85.
41. Rice GI, Kasher PR, Forte GMA, Mannion NM, Greenwood SM, Szykiewicz M, et al. Mutations in ADAR1 cause Aicardi-Goutières syndrome associated with a type I interferon signature. Nat Genet. nov 2012;44(11):1243-8.
42. ThermoFisher. Basic Principles of RT-qPCR [Internet]. [cité 5 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/basic-principles-rt-qpcr.html>
43. Sagar A. Real-Time PCR: Principle, Process, Markers, Uses [Internet]. 2023 [cité 5 févr 2024]. Disponible sur: <https://microbenotes.com/real-time-pcr-principle-process-markers-advantages-applications/>
44. Viel S. Signature interféron par la technologie Nanostring [Internet]. 2019 [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: https://www.youtube.com/watch?v=7WgT_f9dDwg&t=292s&ab_channel=Fili%C3%A8redesant%C3%A9FAI%C2%B2R
45. Pescarmona R, Belot A, Villard M, Besson L, Lopez J, Mosnier I, et al. Comparison of RT-qPCR and Nanostring in the measurement of blood interferon response for the diagnosis of type I interferonopathies. Cytokine. janv 2019;113:446-52.
46. Echebli N, Tchitchek N, Dupuy S, Bruel T, Peireira Bittencourt Passaes C, Bosquet N, et al. Stage-specific IFN-induced and IFN gene expression reveal convergence of type I and type II IFN and highlight their role in both acute and chronic stage of pathogenic SIV infection. Apetrei C, éditeur. PLoS ONE. 11 janv 2018;13(1):e0190334.
47. Plataniias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol. mai 2005;5(5):375-86.
48. Sugrue JA, Bourke NM, O'Farrelly C. Type I Interferon and the Spectrum of Susceptibility to Viral Infection and Autoimmune Disease: A Shared Genomic Signature. Front Immunol. 30 nov 2021;12:757249.
49. Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, et al. An Interferon Signature in the Peripheral Blood of Dermatomyositis Patients is Associated with Disease Activity. Mol Med. janv 2007;13(1-2):59-68.
50. Braunstein I, Klein R, Okawa J, Werth VP. The interferon-regulated gene signature is elevated in subacute cutaneous lupus erythematosus and discoid lupus erythematosus and correlates with the cutaneous lupus area and severity index score. British Journal of Dermatology. mai 2012;166(5):971-5.

51. Mai L, Asaduzzaman A, Noamani B, Fortin PR, Gladman DD, Touma Z, et al. The baseline interferon signature predicts disease severity over the subsequent 5 years in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* déc 2021;23(1):29.
52. Raterman HG, Vosslamber S, De Ridder S, Nurmohamed MT, Lems WF, Boers M, et al. Interferon type I signature may predict non response upon rituximab in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R95.
53. Zhang H, Korenková V, Sjöback R, Švec D, Björkman J, Kruhøffer M, et al. Biomarkers for Monitoring Pre-Analytical Quality Variation of mRNA in Blood Samples. Wang J, éditeur. *PLoS ONE.* 4 nov 2014;9(11):e111644.
54. Fournisseur de tube PAXgene [Internet]. [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: <https://fr.vwr.com/store/product/7551617/rna-collection-tubes-bd-paxgenetm>
55. Unstable RNA profile after blood collection [Internet]. [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: <https://www.preanalytix.com/knowledge/blood/rna/FR?cHash=f2e5f98283a01d1ae1aa7dae271fda4a&fbclid=IwAR1M9r80FdJI5hagbPuptfNtjQ5mk4GT5zuMo4c-MvSVZ5o4K8u9xRRk5wM>
56. Présentation des performances des tubes PAXgene Blood RNA et du kit d'extraction PAXgene Blood RNA Kit [Internet]. [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: https://www.preanalytix.com/storage/download/_ProductResources_/Brochures/PROM-2416-002_1113528_BD-8247_BR_Blood_RNA_System_0119_WW-SINGLE.pdf
57. Kim JH, Jin HO, Park JA, Chang YH, Hong YJ, Lee JK. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. *SpringerPlus.* déc 2014;3(1):76.
58. Tang R, She Q, Lu Y, Yin R, Zhu P, Zhu L, et al. Quality Control of RNA Extracted from PAXgene Blood RNA Tubes After Different Storage Periods. *Biopreservation and Biobanking.* 1 oct 2019;17(5):477-82.
59. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biol.* déc 2006;7(1):3.
60. Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology.* oct 1999;75(2-3):291-5.
61. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control Selection for RNA Quantitation. *BioTechniques.* août 2000;29(2):332-7.
62. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 18 juin 2002;3(7):research0034.1.

63. Nanostring. Recommandations pour les analyses de données d'expression génique [Internet]. [cité 3 mars 2024]. Disponible sur: https://nanostring.com/wp-content/uploads/Gene_Expression_Data_Analysis_Guidelines.pdf
64. Lamot L, Niemietz I, Brown KL. Comparable type I interferon score determination from PAXgene and Tempus whole blood RNA collection and isolation systems. *BMC Res Notes*. déc 2019;12(1):511.
65. Nombel A, Foray AP, Garnier L, Lombard C, Hachulla E, Bader-Meunier B, et al. Assessment of type I interferon response in routine practice in France in 2022. *RMD Open*. juin 2023;9(2):e003211.
66. Centre de Biologie Pathologie Génétique du CHU de Lille. Fiche de l'analyse « signature transcriptomique de l'interféron » du catalogue des analyses du CBP [Internet]. [cité 15 avr 2024]. Disponible sur: <https://biologiepathologie.chu-lille.fr/catalogue-analyses/Detail.php?codeCatalogueAnalyses=5127>
67. ASSIM, SFI. Guide des analyses en immunologie: Indications, critères de réalisation et limites. Elsevier Health Sciences; 2020. 331 p.
68. Amelie.fr. Table nationale de codage de biologie [Internet]. 2024 [cité 21 avr 2024]. Disponible sur: http://www.codage.ext.cnamts.fr/codif/nabm/chapitre/index_chap.php?p_ref_menu_code=1&p_site=AMELI
69. Shen H, Xia L, Lu J. Pilot study of interleukin-27 in pathogenesis of dermatomyositis and polymyositis: Associated with interstitial lung diseases. *Cytokine*. nov 2012;60(2):334-7.
70. Tournadre A, Porcherot M, Chérin P, Marie I, Hachulla E, Miossec P. Th1 and Th17 balance in inflammatory myopathies: Interaction with dendritic cells and possible link with response to high-dose immunoglobulins. *Cytokine*. juin 2009;46(3):297-301.
71. Preanalytix. Manuel du PAXgene blood RNA kit version 2 [Internet]. 2020 [cité 6 févr 2024]. Disponible sur: https://www.preanalytix.com/storage/download/_ProductResources_/Handbooks/HB-0101-007_HB_PAX_Blood_RNA_IVDD_1220_v2_FR.pdf
72. QIAGEN. QIAamp® RNA Blood Mini Handbook [Internet]. 2021 [cité 4 mars 2024]. Disponible sur: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=5ea61358-614f-4b25-b4a5-a6a715f9d3aa&lang=en>

Annexes

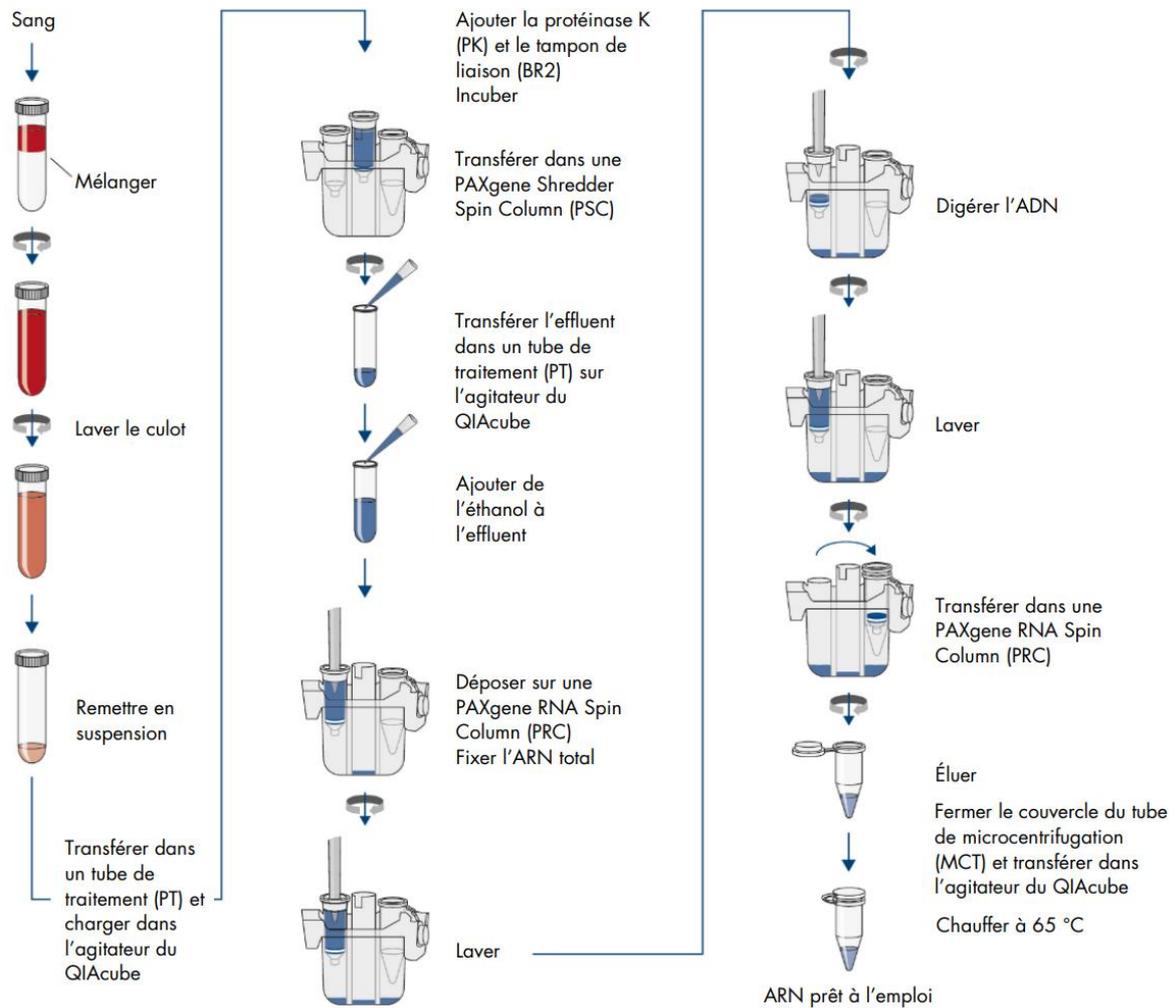
Annexe 1 : Protocole d'extraction manuelle de l'ARN avec le kit « PAXgene blood RNA kit » à partir de tube PAXgene



Annexe 1 : Procédure manuelle d'extraction PAXgene Blood RNA (71)

Le protocole manuel, après centrifugation, lavage et remise en suspension du culot, utilise le kit « PAXgene blood RNA kit » en passant par une étape de lyse, de fixation, de lavage et d'éluion.

Annexe 2 : Protocole d'extraction automatisée de l'ARN avec le kit « PAXgene blood RNA kit » sur QIAcube à partir de tube PAXgene



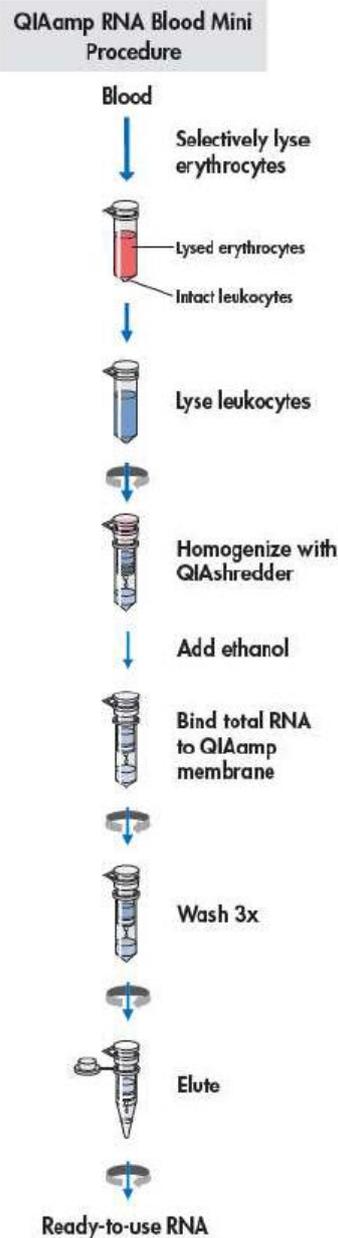
Annexe 2 : Procédure automatisée d'extraction PAXgene Blood RNA sur QIAcube (71)

Le QIAcube est un automate équipé d'un agitateur et d'une centrifugeuse, qui peut prendre en charge 12 échantillons. Il est capable de réaliser des étapes de lyse, de fixation, de lavage et d'élution, permettant d'utiliser le PAXgene Blood RNA Kit pour la purification d'ARN. Le protocole automatisé de purification de l'ARN consiste en 2 parties : Partie A et Partie B, avec une brève intervention manuelle entre les 2 parties (71)

Le culot d'acides nucléiques centrifugé, lavé et remis en suspension est transféré du tube PAXgene dans des tubes de traitement, qui sont placés sur l'agitateur thermique du QIAcube. L'automate réalise la partie A du protocole jusqu'à l'élution de

l'ARN dans le tampon d'élution. Le technicien transfère alors les tubes de microcentrifugation qui contiennent l'ARN purifié dans l'agitateur thermique du QIAcube, puis l'automate réalise la partie B du protocole en effectuant la dénaturation thermique (71).

Annexe 3 : Protocole d'extraction automatisée de l'ARN avec le kit « QIAamp RNA Blood Mini » sur QIAcube à partir de tube EDTA



Annexe 3 : Procédure d'extraction QIAamp RNA Blood Mini (72)

Annexe 4 : Protocole stimulation de sang EDTA de témoin par de l'IFN γ

Protocole stimulation de sang EDTA témoin par de l'IFN γ :

- Reprendre 25 μ g d'IFN γ lyophilisé dans 100 μ l de PBS 1X stérile
- Vortexer
- Mettre 5ml de sang dans une flasque T25
- Ajouter 32 μ l d'IFN γ par flasque
- Mélanger délicatement (faire des signes infini avec la flasque sur la paillasse)
- Incuber 1 nuit à 37°C, 5% de CO $_2$
- Extraction d'ARN le lendemain OU congélation des ARN à -80°C jusqu'à extraction.

Annexe 4 : Protocole stimulation de sang EDTA témoin par de l'IFN γ . Les calculs des concentrations et des volumes ont été réalisés afin qu'1mL de sang soit stimulé par 40 000UI d'IFN γ .

Annexe 5 : Résultats de l'étude des scores interféron réalisés sur tube EDTA à Lille et sur tube PAXgene à Lyon

Score IFN LILLE EDTA	Score IFN Lyon PAXgene
18,78	24,2
1,18	2,7
4,34	9,8
0,99	1,3
28,15	41,9
2,8	6,5
2,18	3,2
20,23	23,7
0,88	1,2
0,93	1,2
21,4	32,6
30,58	37,3
17,91	19,9
5,5	5,8
2,48	3,5
2,25	6,5
16,19	50,1
1,71	1,9
13,62	13,9
4,62	6,3
3,88	9,4
24,75	55,2
0,86	1,5
0,89	1,1
14,9	22,8
2,13	2,6
0,63	0,9
1,5	2,6
8,28	14,8
4,01	22,1
40	57
7,11	6,5
4,34	3,9
0,7	1,3
1,71	1,3
20,53	31,2
1,35	2
1,58	1,1
5,52	1,4
0,51	1,3
1,03	1,1
1,38	2,1
45,73	53
2,33	3,8

Annexe 5 : Résultats de l'étude des scores interféron réalisés sur tube EDTA à Lille et sur tube PAXgene à Lyon, n=44. Chaque ligne représente un patient.

Annexe 6 : Flashinfo à propos de la mise en place de l'analyse de la signature interféron au CHU de Lille

Pôle de Biologie Pathologie Génétique



FLASH INFO BIOLOGIE RECOURS
7 novembre 2023

//

ACTUALITES MEDICALES : SIGNATURE INTERFERON

Nous avons le plaisir de vous annoncer la mise en place de l'analyse de la signature interféron à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille (analyse qui était auparavant sous-traitée aux Hospices Civils de Lyon) à partir de ce jeudi 02/11/2023.

L'envoi se fait sur tube de type **PAXgène**, congelé à la verticale et envoyé en carboglace, ce qui permet une stabilité de plusieurs mois.
Il est également possible d'envoyer le tube à +4°C, avec un délai de stabilité de 5 jours.

Si votre laboratoire ne dispose pas de tube PAXgène, vous pouvez en faire la demande à l'aide du formulaire joint.

Une **feuille de renseignements cliniques** doit lui être associée : vous la trouverez sur le catalogue des analyses du CBP :

[Pôle Biologie Pathologie Génétique > Signature transcriptomique de l'interféron \(chu-lille.fr\)](#)

Nous prévoyons un délai de rendu des résultats d'environ 3 semaines, qui sera adapté en fonction du nombre de demandes reçues pour cette analyse.

Etant donné le changement d'automate, nous recommandons d'interpréter avec précaution une éventuelle évolution du score interféron par rapport à un prélèvement antérieur analysé par les Hospices Civils de Lyon

Dr Julie Demaret et Dr Aurore Collet
Institut d'Immunologie

Contacts : julie.demaret@chu-lille.fr – aurore.collet@chu-lille.fr

Conformément à la loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, nous vous informons que les données recueillies par l'intermédiaire d'un formulaire ou autre ne sauraient en aucun cas être transmises, à titre gratuit ou onéreux, à des tierces personnes physiques ou morales. Vous pouvez à tout moment accéder aux informations personnelles vous concernant et détenues, demander leur modification ou leur suppression par l'envoi d'un e-mail à secretariatcbp@chu-lille.fr

Rue Paul Nayrac

59037 LILLE Cédex

Secrétariat : 03 20 444 555

Facturation : 03 20 444 070

Logistique : 03 20 444 384

Télécopie : 03 20 446 962

secretariatcbp@chu-lille.fr

facturationcbp@chu-lille.fr

logistiquecbp@chu-lille.fr

<https://biologiepathologie.chu-lille.fr/>

Page 1 / 1

Annexe 7 : Bon de demande pour la réalisation de la signature interféron

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - HLA</i> <i>Transplantation UF 9874</i>	FICHE D'ENREGISTREMENT	PRA-FE-HLA-010
	BON DE DEMANDE SIGNATURE INTERFERON	V : 2
		Applicable au : 31/10/2023
		Page 1 sur 1

Date de prélèvement : / / Heure de prélèvement : :

NOM de naissance :

NOM (marital) complet du patient :

PRÉNOM complet du patient :

SEXE : F M DATE de NAISSANCE : / /

Centre demandeur : Service :

Médecin prescripteur : Téléphone :

Mail du prescripteur :

Etiquette patient

CADRE RECEPTION

ENVOI TELEBAC 28

CONDITIONS DE PRÉLÈVEMENT

Pour les services du CHU de Lille :
Prélèvement sanguin - Tube PAXgene – Envoi à température ambiante

Pour les CH périphériques :
Prélèvement sanguin – Tube PAXgene
Congelé à la verticale et envoyé en carboglace (stable plusieurs mois à -20°C)
OU envoi sans pré-traitement à +4°C (stable 5 jours)

Contacts pour renseignements :
Dr Aurore COLLET : aurore.collet@chu-lille.fr
Dr Julie DEMARET : julie.demaret@chu-lille.fr
Secrétariat : 03 20 44 55 72 – Fax : 03 20 44 69 54

RENSEIGNEMENTS CLINIQUES ET CONTEXTE DE LA DEMANDE

Diagnostic (retenu ou suspecté) : _____

Phase de poussée de la maladie :

Oui

Non

Infection chronique ou sévère en cours ou récente : _____

Traitements en cours à visée immunitaire : _____

POUR LES CH PÉRIPHÉRIQUES :
TRANSPORT PAR LE TRANSPORTEUR DE VOTRE CHOIX
À : Réception Biologie de Recours, CHRU de Lille,
Centre de Biologie Pathologie, Rue Paul Nayrac
59037 LILLE Cedex
Tél. : 03.20.44.54.31

Traçabilité des contrôles - Analyses Ext			
Débal		C Admi	
Etique		C Ana	
Décant			

Annexe 8 : Synthèse de la procédure de l'étude de la signature interféron

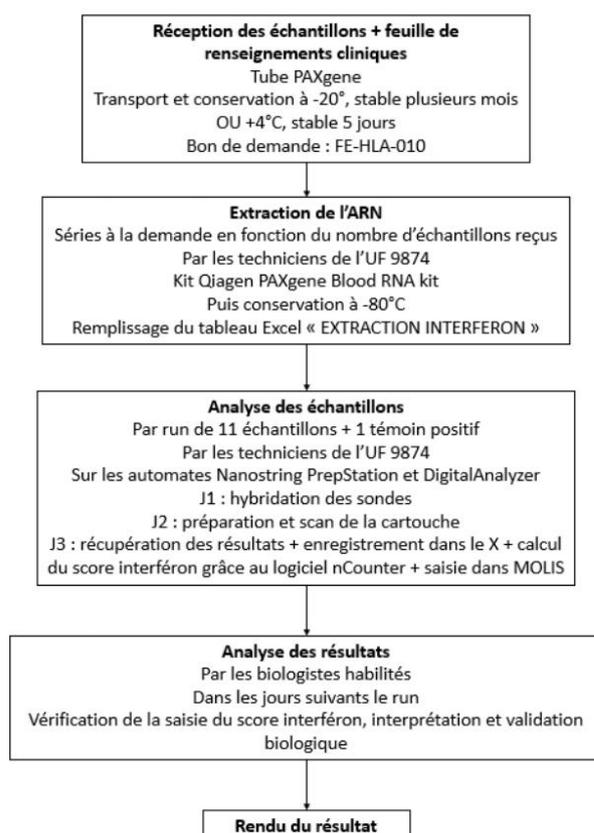
	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 1 sur 23
REDACTION	VERIFICATION	APPROBATION
COUPET CECILE, CIREDDU ANTOINE	CIREDDU ANTOINE, DUPONT ALEXIS	DEMARET JULIE, COLLET AURORE

REFONTE COMPLETE DU DOCUMENT

SYNTHESE DE LA PROCEDURE DE L'ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON

La signature interféron est une technique de quantification indirecte de la concentration en interféron dans le sang des patients. Elle consiste à quantifier l'expression de 6 gènes qui sont exprimés sous le contrôle de l'interféron (ISG : interferon stimulated genes).

Cet organigramme résume les différentes étapes nécessaires à l'étude de la signature interféron. Chaque étape est ensuite détaillée dans la suite de ce document.



 CHU LILLE	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
		Applicable au :
		Page 2 sur 23

I] EXTRACTION D'ARN

1) PRINCIPE DE LA TECHNIQUE

Les tubes PAXgene Blood RNA permettent de stabiliser l'ARN cellulaire pendant un maximum de 5 jours à +4°C. L'ARN est stable plusieurs mois à -20°C. A leur arrivée dans le service, les tubes sont conservés dans le congélateur -20°C **EM/HLA/72**. Si les tubes ont été conservés à +4°C ou congelés à -20°C, il doivent d'abord revenir à température ambiante pendant 2h avant de commencer la procédure. Si l'extraction est réalisée rapidement après le prélèvement (sans congélation préalable) les tubes doivent être incubés au moins 2 heures à température ambiante après le prélèvement sanguin afin d'assurer la lyse complète des cellules sanguines.

2) PRECAUTIONS PARTICULIERES

- Toujours travailler avec des gants
- Travailler en pièce d'extraction

3) MATERIEL

- Centrifugeuses (EM/HLA/47 et EM/HLA/45)
- Bac à glace
- Vortex
- Pipettes
- Agitateur chauffant (pièce 50481 Plateau commun « Novaseq-Illumina »)
- Agitateur
- Bloc chauffant

4) CONSOMMABLES

- Kit PAXgene Blood RNA Kit
- Ethanol absolu

5) MODE OPERATOIRE

A l'ouverture du kit, reconstituer le tampon BR4 en ajoutant 44 mL d'éthanol à 100%.

La Dnase I doit être reconstituée dans 550 µl de DRB buffer fourni dans le kit, puis réaliser des aliquots et conserver à -20°C dans le congélateur **EM/HLA/62** (stabilité 9 mois)

Ils peuvent être ensuite décongelés au fur et à mesure et conservés 6 semaines au frigo **EM/HLA/70**.

Ne pas recongeler un aliquot décongelé !

Le tampon BR2 peut former un précipité, au besoin le rechauffer à 37°C pour dissoudre les cristaux.

PROTOCOLE :

- Identifier avec une étiquette Molis les tubes des patients à extraire
- Mettre de côté environ 4ml de sang et le conserver jusqu'à la fin de la procédure d'extraction
- Centrifuger le tube PAXgene (contenant env 4/5 ml de sang restant) 10 min à 4000 G

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 3 sur 23

- Retirer le surnagant avec une pipette
- S'assurer de la présence d'un culot cellulaire. Dans le cas contraire, centrifuger le reste du sang prélevé initialement et pooler les deux culots obtenus
- Ajouter 4 mL d'eau Rnase free (**flacon RNF**) et refermer le tube au moyen d'un **bouchon sécurité BD Hemogard (fourni dans le kit)**
- Vortexer pour dissoudre le culot
- Centrifuger 10 minutes à 4000 G
- **Allumer l'agitateur-incubateur (il se trouve dans la pièce 50481 « Plateau commun- Novaseq-Illumina » en face des biopuces) et placer le carton « HLA interféron » à côté de l'agitateur pour prévenir l'hémato de notre utilisation.**
- Retirer **complètement** le surnageant à l'aide d'une pipette
- Ajouter 350 µL de buffer BR1
- Vortexer pour dissoudre le culot
- Transférer l'échantillon dans un microtube eppendorf identifié de 1.5 ml (fourni dans le kit)
- Ajouter 300 µL de Buffer BR2
- Ajouter 40 µL de protéinase K
- Vortexer pendant 5 secondes
- Incuber 10 min à 55°C à l'aide d'un agitateur-Incubateur à 800 tr/min.
- Prendre une **colonne PAXgene Shredder (couleur violette)** puis transférer la totalité du lysat à l'aide d'une pipette dans la colonne.
- Centrifuger 3 min à max 10 000 g
- Jeter la colonne puis transférer la totalité du surnageant dans un eppendorf identifié de 1.5mL sans emporter le culot.
- Ajouter 350 µL d'éthanol, vortexer puis centrifuger brièvement à la tortue afin de récupérer la totalité du prélèvement.
- Prendre une **colonne PAXgene rouge** puis transférer la moitié de l'échantillon (environ 600µl).
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- Transférer le reste de l'échantillon et Centrifuger 1 min à 10000 g.
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- Ajouter 350µl de **Buffer BR3** sur la colonne.
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- Dans un tube eppendorf 1.5mL (fourni dans le kit) ajouter 10 µl de Dnase I + 70µl de Buffer RDD par échantillon (ex : pour 10 échantillons mettre 100µl de DNASE I + 700µl de Buffer RDD)
- NE PAS VORTEXER !!**
- Mélanger en tapotant le tube délicatement **NE PAS VORTEXER !!**
- Ajouter **80 µL de mélange (DNASE I + RDD) directement sur la membrane** de la colonne
- Incuber 15 min à température ambiante
- Ajouter à nouveau **350 µL de Buffer BR3** dans la colonne
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- Ajouter **500 µL de Buffer BR4** dans la colonne
- Centrifuger 1 min à 10000 g
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- **Ajouter à nouveau 500 µL de Buffer BR4** dans la colonne

 CHU LILLE	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 4 sur 23

- Centrifuger **3 min** à 10000 g
- Allumer le bloc chauffant à 65°C et aller chercher de la glace
- **Garder la colonne** et la placer dans un nouveau tube de 2 mL
- Centrifuger 1 min à 10000g
- **Garder la colonne** et la placer dans tube eppendorf identifié de 1.5mL
- Déposer **20 µl de Buffer BR5 directement sur la colonne**
- Centrifuger 1 min à 10000 g pour éluer l'ARN
- **Garder le tube eppendorf !!**
- Déposer à nouveau **20µl de Buffer BR5** sur la colonne **en gardant le même eppendorf afin de maximiser le rendement**
- Centrifuger de nouveau 1 min à 10000 g pour éluer l'ARN
- Jeter la colonne et incubé l'éluat **5 min maximum** à 65°C (l'agitation n'est pas nécessaire)
- **Refroidir immédiatement sur la glace**
- Identifier le tube préalablement enregistré dans Gémol avec NOM, Prénom code BM. (L'attribution du code BM se fait en suivant l'ordre dans le fichier extraction IFN : **Si xx**)
- **Prendre rapidement la DO sur le nanodrop** (programme ARN), si la DO ne peut être prise immédiatement, ne pas laisser les ARNs au frigo mais sur la glace.
- Normaliser la concentration d'ARN à 100ng/µl .
- Si la concentration d'ARN est inférieure à 15ng/µl, ajouter une non conformité pour quantité insuffisante.
- Jeter le sang mis de côté au début si la concentration est >25ng/µl sinon refaire une extraction à partir du sang restant en éluant dans une quantité moindre.
- Ranger les ARNs dans la boîte Signature interféron en cours située dans le congélateur -80°C (boîtes numérotées de 1 à 3, les ARNs de la boîte la + ancienne sont jetés lorsque les 3 boîtes sont pleines)
- **Compléter le fichier excel EXTRACTION IFN situé sur le cbpg/HLA/Signature IFN.**

II] TECHNIQUE NANOSTRING DE LA SIGNATURE INTERFERON

1) PRINCIPE DE LA TECHNIQUE :

Après extraction de l'ARN à partir d'un tube Paxgène, la quantification des ISG est réalisée grâce à la technologie Nanostring. Il s'agit d'une méthode digitale permettant la quantification de plusieurs ARN en une seule réaction grâce à un système de code-barre fluorescent, spécifique de chaque ARN d'intérêt. Cela permet d'obtenir un décompte du nombre de copie de chaque ISG dans le prélèvement, qui est normalisé grâce à 3 gènes de ménage. La médiane du décompte de chacun des 6 ISG est calculée, et rapportée à celle d'une population de témoins. Cela permet d'aboutir à un « score interféron » reflétant l'exposition aux interférons de type 1.

2) PRECAUTIONS PARTICULIERES :

- Porter des gants pour la manipulation des prélèvements biologiques.
- Manipuler les ARN sur la glace
- Garder le Tagset à l'abri de la lumière après décongélation
- Ne jamais vortexer le Tagset

 CHU LILLE	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 5 sur 23

- Toujours conserver et ouvrir la plaque contenant les billes dans le bon sens (flèche vers le haut), si les billes ne sont pas que dans la 1^{ère} ligne, renvoyer le kit à Nanostring
- La technique est à réaliser sur 2 jours : 1er jour à réaliser en début d'après-midi (car PCR de 18h). Démarrer le jour 2 dès le matin suivant et en informer les référentes de l'automate Nanostring qui doivent être présentes pour le chargement et en cas de maintenance de l'appareil (genomique-medicine@univ-lille.fr).

3) MATERIEL :

- Thermocycleur
- Vortex
- Pipettes
- Bac à glace
- Support de plaque froid
- Centrifugeuse à plaque
- Prep Station Nanostring
- Lecteur de cartouche Nanostring

4) CONSOMMABLES :

- Master Probe Stock (= MixA et MixB)
- Tampon d'hybridation
- Tween 20
- Tris EDTA 1X pH8
- Tagset (1 mix pour 12 réactions)
- Barette 12 puits
- Bouchon pour barette 12 puits
- Tube eppendorf 1.5mL
- Kit Prep Plate (plaque avec billes)
- Kit Prep Pack (support avec pointes / tips sheat / film autocollant pour cartouche / barette / bouchons)
- Cartouche

5) INSTRUCTIONS OPERATOIRES :

I/ JOUR 1 : Hybridation des sondes

Préparer la liste de travail en sélectionnant 11 patients et en **incluant le CQI**.

Utiliser la feuille de calcul excel « modèle run » dans le dossier cbpg/HLA/Signature IFN/RUN et enregistrer sous avec le numéro du run.

Saisir la concentration d'ARN dans la colonne appropriée et le calcul des volumes se fait automatiquement suivant les formules suivantes :

Volume d'ARN (μ l/200ng) = 200 / [ARN](ng/ μ l)

Volume d'eau RNase free = 7 μ l – Volume d'ARN

Sortir au préalable (10 min avant) :

- Les Master Probe Stock (= MixA et MixB) du -80°C.
- Le Tagset du -80°C

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 6 sur 23

- Les ARNs (les stocker sur la glace)

Avant de lancer, sortir les différents réactifs nécessaires (stockés à température ambiante):

- Tampon d'hybridation
- Tween 20
- Tris EDTA

A) Préparation des réactions d'hybridation

Préparation des échantillons

Vortexer puis centrifuger brièvement chaque échantillon.

Faire la même opération pour les master Mix.

Attention **ne pas vortexer le tagset** et le garder à l'obscurité.

Préparation de la barrette

Numéroter la barrette de 1 à 12 et la couper en son milieu **Attention au sens de la barrette !**.

La barrette doit rester **dans la glace jusqu'à ce qu'elle soit placée dans le thermocycleur** (utiliser le support froid conservé au congélateur).

Réaliser les dilutions directement dans le tube suivant le tableau de calcul, le volume final doit être de 7 µL.

Mettre un bouchon sur la barrette.

B) Préparer le Working Probe Pools

Solution TE-Tween :

Dans un tube eppendorf de 1,5mL, mélanger :

- 1) 1ml de Tris-EDTA 1X pH8 + 1µl de Tween 20
- 2) Vortexer puis centrifuger brièvement

Working Probe Pools pour 12 réactions (= 1 cartouche)

Dans 2 eppendorfs identifiés (un pour le mix A et l'autre pour le mix B)

- 1) 29µl de TE-Tween + 4µl de Master Probe Stock A = 33µl de Working probe pool A
- 2) 29µl de TE-Tween + 4µl de Master Probe Stock B = 33µl de Working probe pool B

Vortexer puis centrifuger brièvement les Working probe pools A et B.

C) Création du Master Mix

Ne RIEN VORTEXER à cette étape !

Création du Master Mix

- 1) Mettre 70µl d'hybridization buffer dans le Tagset.
Mélanger en inversant le tube plusieurs fois, tapoter le tube pour faire descendre les gouttes si nécessaire puis centrifuger brièvement.
- 2) Ajouter 7µl de Working Probe Pool A dans le Tagset.
Mélanger en inversant le tube plusieurs fois, tapoter le tube pour faire descendre les gouttes si nécessaire puis centrifuger brièvement.
- 3) Ajouter 7µl de Working Probe Pool B dans le Tagset.
Mélanger en inversant le tube plusieurs fois, tapoter le tube pour faire descendre les gouttes si nécessaire puis centrifuger brièvement.

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 8 sur 23

Mettre sous tension l'appareil.

Nettoyage du Deck de la Prep Station

- Vérifier que la poubelle est vide.
- Nettoyer tous les éléments présents sur le Deck à l'éthanol 70%.

B) Préparation et démarrage de la Prep Station

Appuyer sur « Nanostring Life Sciences » pour réaliser le comptage.

Remarques :

- Si l'icône « lubricate o-rings » apparaît, appeler la plateforme génomique pour lubrifier les pointes de la machine.
- La maintenance est réalisée par la plateforme génomique.

« Start processing »

Laisser « High Sensitivity »

Suivre l'automate, étape par étape, afin de placer tous les composants.

Poser sur le deck :

- Les 2 plaques de billes
Bien les coincer grâce au clip et à la pointe.
Le code barre face à nous.
- Les cônes sur le portoir dédié
Les cônes noirs, en bas à droite.
Bien clipser le socle des pointes au rack.
- Les Tip Sheaths
- La cartouche
Remplacer la cartouche blanche (à ranger dans sa boîte située dans le placard) par la cartouche test.
Accompagner l'ouverture et la fermeture du couvercle
Ne pas laisser les électrodes à l'air libre !
Ne pas forcer sur le couvercle pour ne pas casser les électrodes !
- Les Strip Tubes et les échantillons
Placer les Strip Tubes

Sortir la barette du thermocycleur.
La centrifuger et vérifier qu'il n'y a pas eu d'évaporation.
Enlever le bouchon soigneusement.
Mettre les échantillons dans la machine **dans le bon sens !**

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets</i> <i>immunitaires et immuno thérapies</i> <i>UF 9879</i>	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
		Applicable au :
		Page 9 sur 23



Sélectionner les échantillons (Sample Selection)

« Select All »
« Next »

Notification options :

Comme il n'y a pas de connexion internet, passer cette étape.
« Next »

Fermer la vitre de la machine

« Start »

Rester devant la machine durant la mise en route afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de message d'erreur.

Après 3h environ, enlever et filmer la cartouche avec le film fourni dans le coffret sans recouvrir le code-barre.

Si l'analyse n'est pas réalisée immédiatement, la cartouche peut être placée à 4°C durant une semaine maximum sans trop altérer les résultats.

Jeter les autres composés et laver les éléments du Desk à l'éthanol 70%.

La poubelle se démonte en 2 parties. Elle doit être rincée à l'eau distillée puis à l'éthanol 70%.

Conserver les codes-barres des plaques pour la feuille de pailleasse.

Conserver les étiquettes des plaques de billes et de la cartouche et les coller sur la feuille de pailleasse pour le suivi des lots.

C) Scan de la cartouche

1) Préparation du fichier CDF

- a. Créer un fichier CDF à partir d'un ancien fichier sur la clé USB fournie (clé verte Nanostring)
- b. Ouvrir le dossier CDFData
- c. Choisir un fichier d'un run précédent, faire clic droit et l'ouvrir en sélectionnant le bloc note
- d. Modifier :
 - i. Le nom du run
 - ii. Le nom des échantillons (mettre numéro BM)
 - iii. La date du run
- e. NE PAS TOUCHER AU RESTE DU FICHER (ponctuation, majuscules, espaces...)
- f. Faire enregistrer sous, renommer le fichier avec la date et le numéro de run
AAAAMMJJ_IFNRunX ; s'assurer que l'extension du fichier est en .cdf (ajouter.cdf (en minuscule))

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficits</i> <i>immunitaires et immuno thérapies</i> <i>UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 10 sur 23

- 2) Mettre la cartouche dans le scanner. Retenir l'emplacement (éviter l'emplacement 1).
- 3) Insérer la clé USB dédiée et intégrer les fichiers CDF modifiés.

- « Nanostring Life Sciences »
- « Main Menu »
- « Upload Files »
 - Pour l'étude INTERFERON, le fichier RLF est déjà inséré dans l'automate
 - « Upload CDF »
- « Start Counting »

Sélectionner l'emplacement dans lequel se trouve la cartouche

- « Load existing »

Sélectionner le CDF dans l'automate

- « Next »

Bien vérifier que tous les échantillons sont sélectionnés

- « Next »
- « Done »

Lancement de l'analyse de la cartouche.

III/ Récupération des données et validation technique

A) Récupération des données

Insérer la clé USB fournie dans le scanner.

« download data »

Retirer la cartouche du scanner et la conserver dans la boîte au frigo (pièce Nanostring).

En cas de problème, il est possible de relancer l'analyse de la cartouche.

Cliquer sur « Finished »

Ne pas éteindre la machine.

B) Validation technique et saisie Molis

Après la technique, les techniciens habilités analysent les fichiers de résultats (.RCC) préalablement générés, calculent le score interféron et rentrent le résultat dans MOLIS, puis les transmettent au biologiste pour validation.

1) Import des données, analyse et export des résultats dans le logiciel nSolver

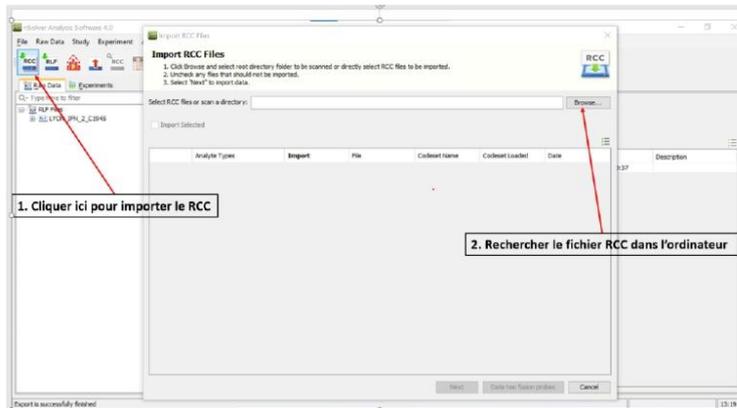
Le but de cette étape est de générer un fichier Excel contenant les données qui serviront pour le calcul du score interféron.

a. Importer les RCC dans le logiciel nSolver :

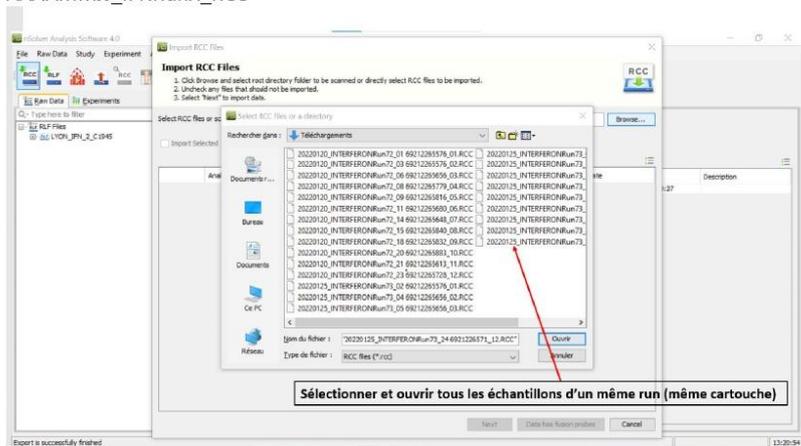
Copier le fichier .RCC récupéré sur la clé USB dans le dossier du run du jour (cbpg/HLA/Signature IFN/RUN/ et le dézipper (« extraire tout »)

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiés immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	FICHE D'INSTRUCTIONS ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	ANA-FI-HLA-351 V : 3 Applicable au : Page 11 sur 23
---	--	--

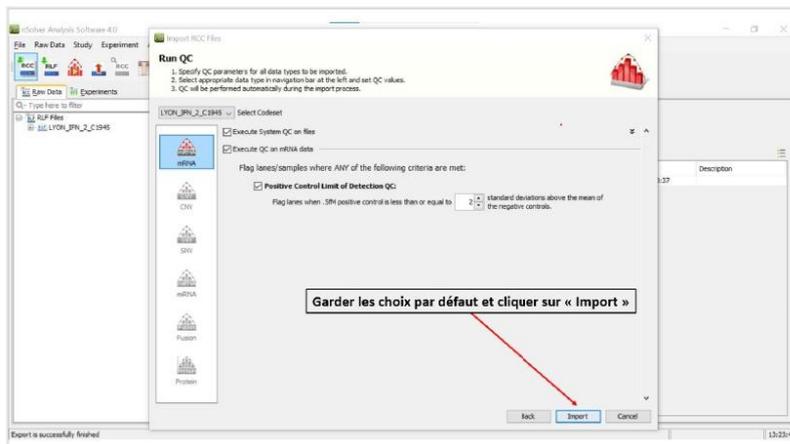
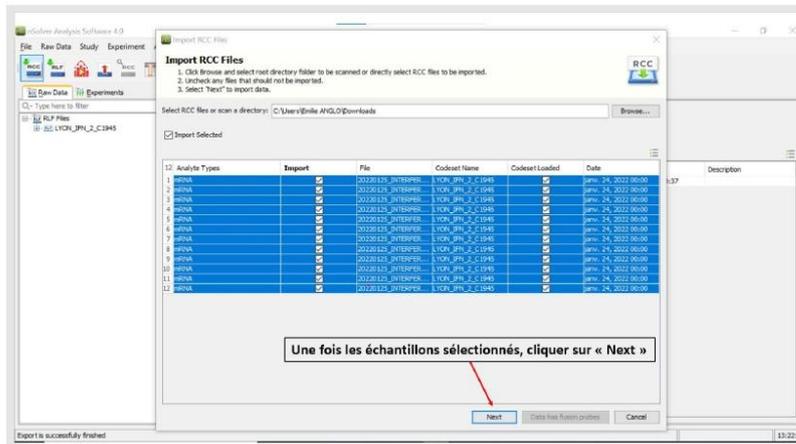
Ouvrir le logiciel nSolver installé sur l'un des PC de sérologie



Pour chaque run, un dossier contenant tous les .RCC d'un même run est créé sous le format : AAAAMMJJ_IFNRUnX_RCC

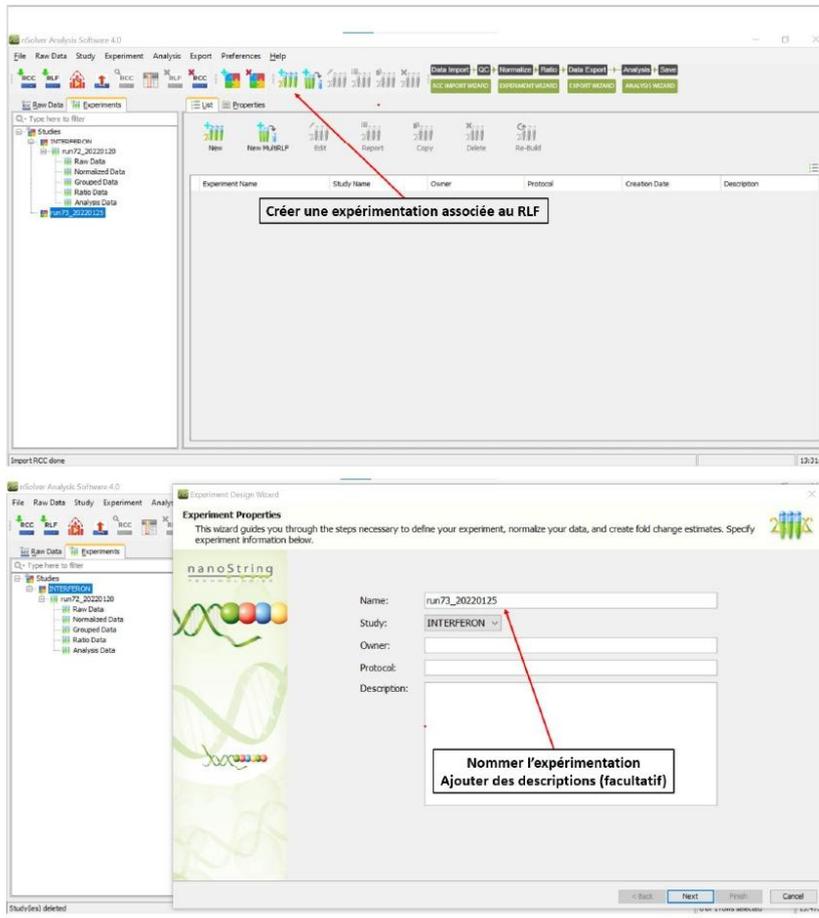


	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 12 sur 23



- b. Associer les .RCC à l'étude interféron (RLF de Lyon, déjà enregistré dans nSolver) = création d'une expérimentation

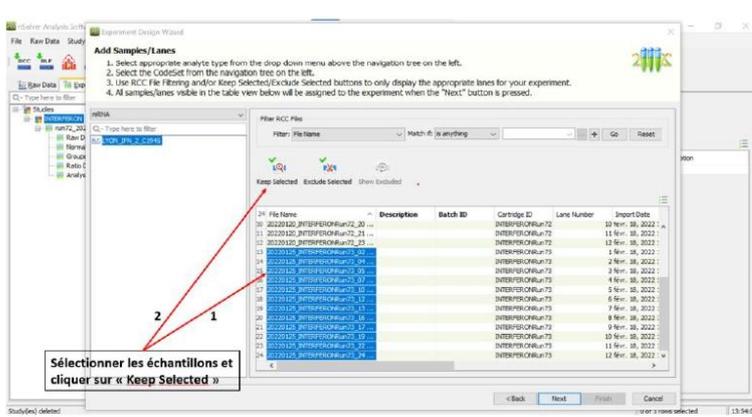
	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 13 sur 23



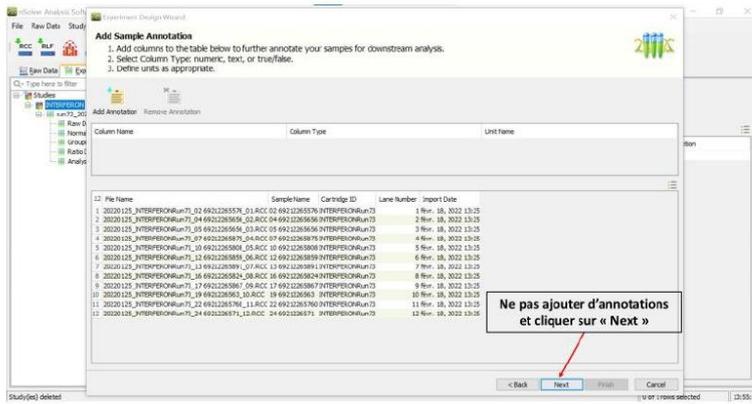
Format de nom pour l'expérimentation : runX_AAAAMMJJ

Cliquer sur LYON_IFN_2 pour afficher les échantillons

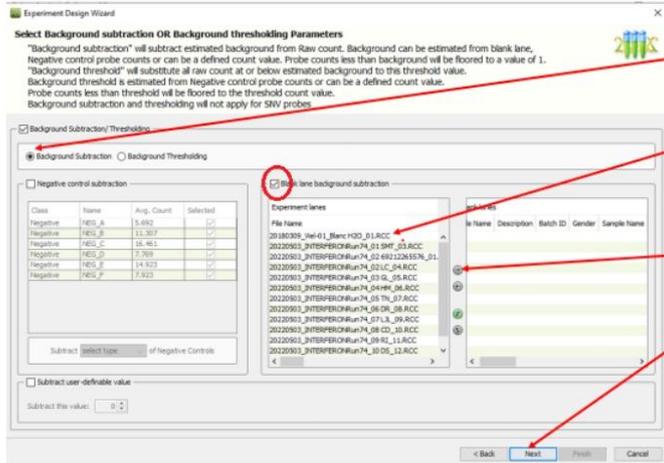
 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
		V : 3
	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	Applicable au :
		Page 14 sur 23



A cette étape, sélectionner également le blanc : 20180309_Viel-01_Blanc H2O_01.RCC
Puis cliquer sur NEXT



 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE INSTITUT D'IMMUNOLOGIE <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> UF 9879	FICHE D'INSTRUCTIONS ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	ANA-FI-HLA-351 V : 3 Applicable au : Page 15 sur 23
--	--	--

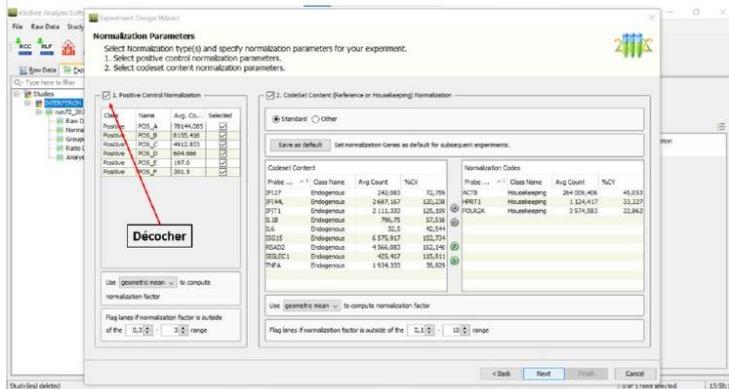


Cocher « Background subtraction »

Sélectionner l'échantillon blanc

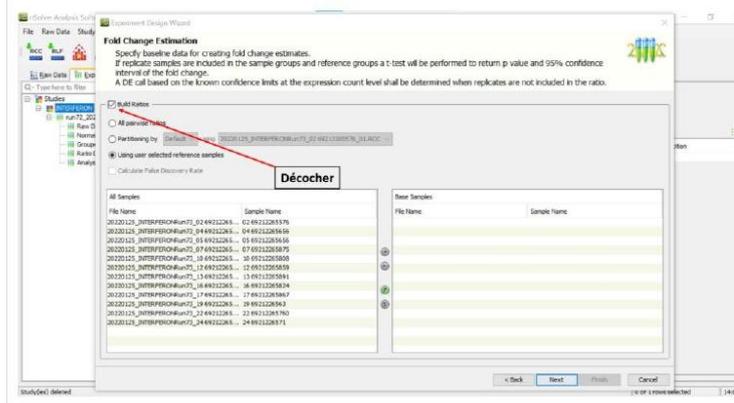
Le faire passer dans la catégorie « Blank lanes »

Cliquer sur « Next »



Decoche

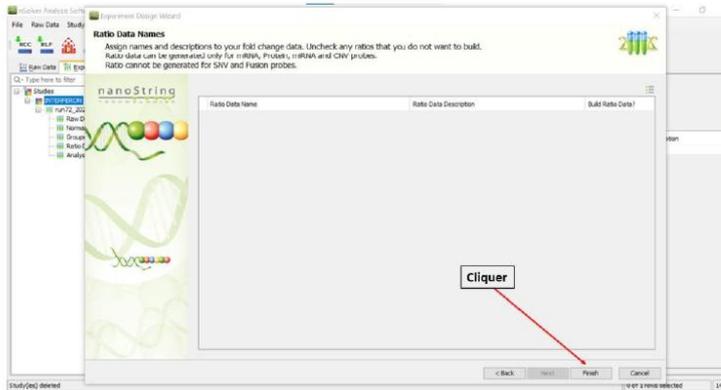
Cliquer sur Next



Decoche

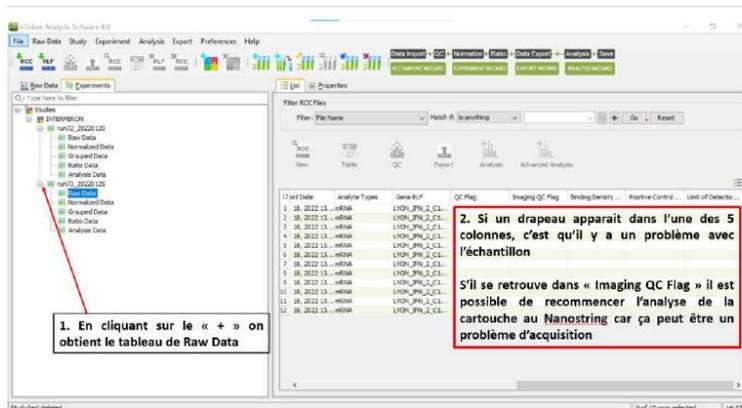
Cliquer sur Next

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	FICHE D'INSTRUCTIONS ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	ANA-FI-HLA-351 V : 3 Applicable au : Page 16 sur 23
--	--	--



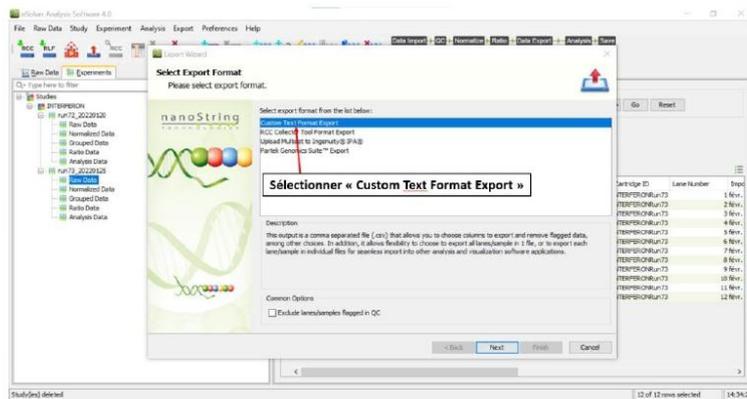
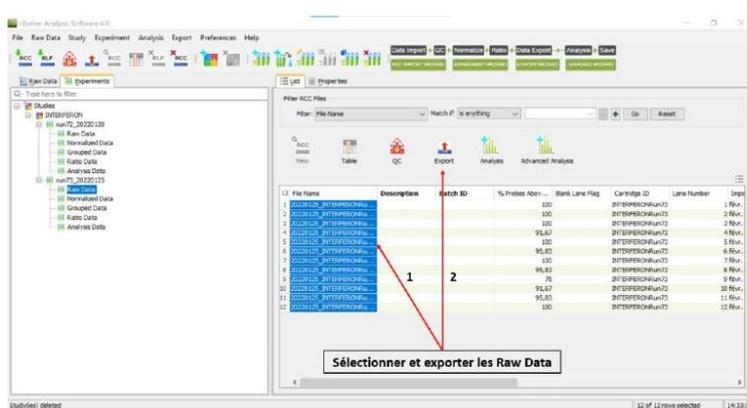
c. Exporter les raw data au format .txt et vérifier l'absence de problème technique lors du run

Cliquer sur Raw Data à gauche de l'écran

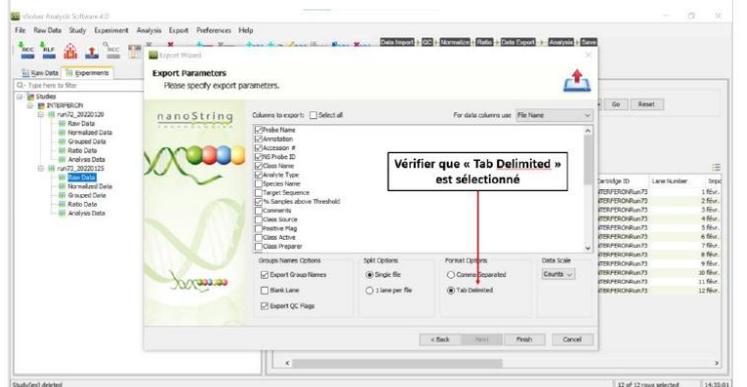


En cas d'apparition d'un drapeau dans l'une des colonnes (sauf celle du contrôle négatif), le signaler au biologiste qui adaptera la conduite à tenir.

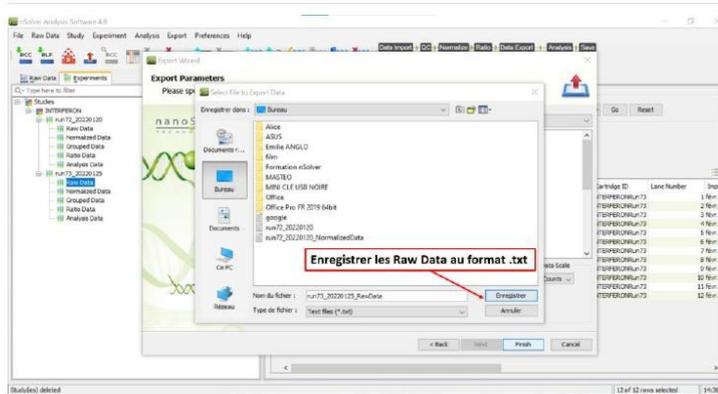
 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE INSTITUT D'IMMUNOLOGIE <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies</i> UF 9879	FICHE D'INSTRUCTIONS ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	ANA-FI-HLA-351 V : 3 Applicable au : Page 17 sur 23
--	--	--



Cliquer sur Next



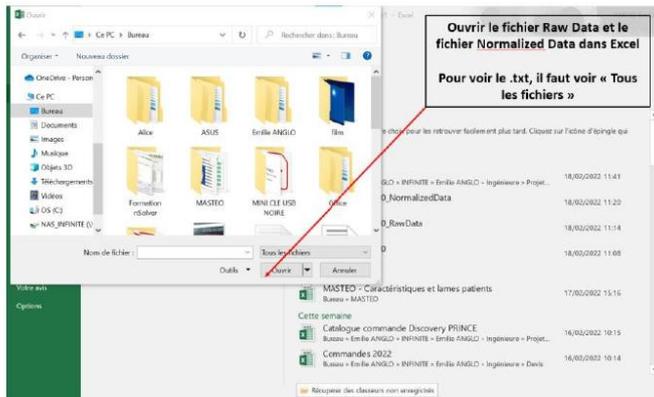
	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiés immunitaires et immunothérapies</i> <i>UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 18 sur 23



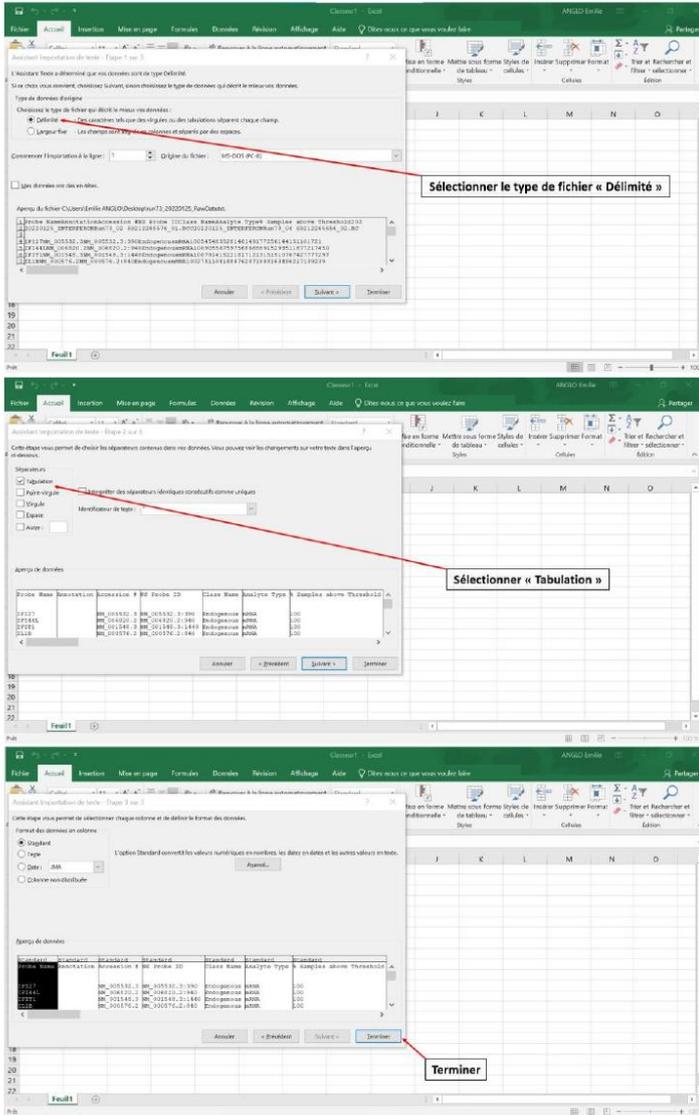
Enregistrer les raw data dans le dossier contenant les fichiers RCC correspondants (cbpg:\HLA\Signature IFN\RUN\ Run_AAAAMMJ\AAAAMMJRunX_RCC) sous le nom RunX_AAAAMMJ_Rawdata

d. Enregistrer les raw data au format Excel

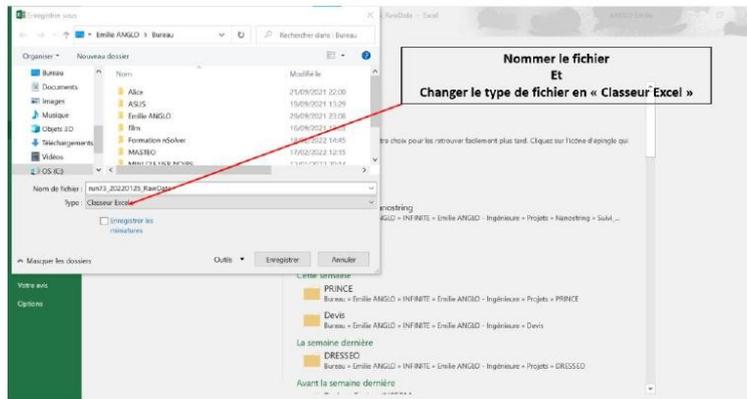
Ouvrir un nouveau classeur Excel et ouvrir le fichier précédemment enregistré.



	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE INSTITUT D'IMMUNOLOGIE <i>Immunologie - Déficiés immunitaires et immunothérapies</i> UF 9879	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 19 sur 23



	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE <i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE</i> <i>Immunologie - Déficiets immunitaires et immuno thérapies</i> <i>UF 9879</i>	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3 Applicable au : Page 20 sur 23



Enregistrer le fichier Excel contenant les raw data dans le même dossier que le fichier txt précédemment généré, sous le nom RunX_AAAAMMJJ_Rawdata

2) Calcul des résultats normalisés puis du score interféron grâce au le fichier Excel dédié

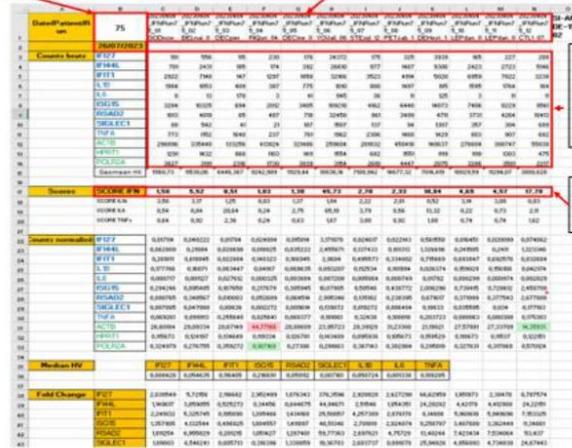
- a. Utiliser le fichier Résultats Nanostring présent en onglet dans le fichier Modèle Run (2^e onglet avec la feuille de paillasse).
- b. Compléter le numéro et la date du run dans les cases en haut à gauche.
- c. Copier-coller les noms des échantillons dans la ligne 1 sans sélectionner le blanc
- d. Copier-coller les raw data dans le 1^{er} tableau. Sélectionner les valeurs de IFI27 à POLR2A sans sélectionner le blanc ni % sample (colonne I4 à T15)
- e. Le fichier réalise automatiquement la normalisation des comptes de gènes associés à l'interféron, sur les comptes de gènes de ménage. Puis il rapporte ces données normalisées à celles des témoins. Pour chaque patient, le score interféron apparait automatiquement dans la ligne 17.
- f. Copier / coller les valeurs du score interféron dans le tableau du 1er onglet de la feuille de paillasse
- g. **Vérifier +++ l'ordre des patients** qui peut être différent entre le 1^{er} (feuille de paillasse) et le 2^{ème} onglet (résultats Nanostring) (contrôle + au début au lieu d'être à la fin). Utiliser un collage spécial en cochant « valeurs » et « Transposer ». Bien vérifier la correspondance des numéros BM entre les 2 onglets. Les résultats sont rendus à 2 chiffres après la virgule.
- h. Saisir la valeur du CQI interféron dans UNITY : « Score interféron ».

 POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficiets immunitaires et immunothérapies UF 9879	FICHE D'INSTRUCTIONS ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	ANA-FI-HLA-351 V : 3 Applicable au : Page 21 sur 23
--	--	--

1. Ouvrir le fichier « Masque analyse signature IFN Lyon » et l'enregistrer sous la forme « RunX_AAAAMMJJ_ScoreIFN »

2. Compléter le numéro et la date du run

3. Copier-coller les identités des patients



The screenshot shows a spreadsheet with columns for patient identifiers (ID, N° de patient, etc.) and various assay results. Red boxes highlight the patient ID column, the sample ID column (containing codes like IFN1, IFN2, etc.), and a summary row at the bottom with numerical values.

4. Insérer les résultats des échantillons à partir du fichier « runXX_date_RawData »

5. Ici apparaît le résultat du score interféron

3) Entrée du score interféron dans MOLIS

Imprimer la feuille de paillasse

Saisir la valeur du score est saisie dans MOLIS dans la ligne « HSCORE ».

Donner au biologiste habilité la feuille de paillasse correspondant au Run à valider.

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immuno thérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 22 sur 23

III] VALIDATION BIOLOGIQUE

Responsable(s) : Dr Julie Demaret, Dr Aurore Collet

I. Contrôles qualité

Il existe plusieurs niveaux de contrôle de la qualité des échantillons et du run :

- Pour chaque échantillon, un contrôle de la qualité de l'extraction est réalisé au moment du dosage des ARN au Nanodrop. Ce résultat est disponible dans le fichier « RUN » sélectionner le nom du run : RunXX_AAAAMMJ onglet « Feuille de paillasse » dans le dossier cbpg:\HLA\Signature IFN\Run.
 - o Le rapport 260/280 doit être proche de 2
 - o Le rapport 260/230 doit être proche de 1.8
 - o En cas de rapport < 0.8, ajouter le commentaire correspondant à une anomalie de l'extraction à l'étape V.
- Un contrôle qualité du dosage des acides nucléiques sur le Nanodrop est passé quotidiennement, et le résultat est rentré dans URT par le technicien ayant réalisé l'extraction. Ce contrôle qualité est validé quotidiennement par un biologiste habilité du secteur HLA.
- Au moment du passage sur le Nanostring, pour chaque échantillon des sondes positives et négatives sont ajoutées dans les réactifs. Cela permet de détecter un problème au niveau de la qualité de l'échantillon et du run. En cas de problème, un drapeau apparait au moment de l'une des colonnes au moment de la génération des raw data (cf. étape III.6). Si ce drapeau apparait dans la colonne « Imaging QC flag », il est possible de recommencer uniquement la lecture de la cartouche sur le Nanostring. Sinon, il est nécessaire de repasser l'échantillon sur le run suivant ou de demander un contrôle.
- Pour chaque run, un CQI (pool de patients sélectionnés sur leur résultat de score interféron aux alentours de 4) est analysé en parallèle des patients. Le résultat du CQI est saisi dans UNITY par le technicien et validé par le biologiste.
Ce résultat est reporté pour chaque run dans le fichier « Suivi contrôle positif » (cbpg:\HLA\Signature IFN\Suivi contrôle positif)

II. Interprétation du score interféron, ajout d'un commentaire, et validation de l'analyse

1. Vérification de la saisie manuelle du score interféron, ajout de l'interprétation et d'un éventuel commentaire

La valeur du score interféron est calculée grâce au fichier Excel « RésultatsNanostring_ScoreRunXX_AAAAMMJ », puis saisie dans MOLIS dans la ligne « HSCORE » par le technicien (cf. ANA-FI-HLA-351).

Récupérer auprès du technicien la feuille de paillasse contenant le numéro du Run à valider.
Ouvrir le fichier excel « RunXX_AAAAMMJ » correspondant afin d'avoir accès aux valeurs de la qualité de l'extraction (onglet « feuille de paillasse », aux valeurs des scores interféron et aux données sur les gènes de ménage (onglet « Résultats Nanostring »).

Par le biologiste, sur MOLIS, sélectionner l'action de validation « IMIFN2 ».

	FICHE D'INSTRUCTIONS	ANA-FI-HLA-351
POLE DE BIOLOGIE PATHOLOGIE GENETIQUE	ETUDE DE LA SIGNATURE INTERFERON	V : 3
<i>INSTITUT D'IMMUNOLOGIE Immunologie - Déficits immunitaires et immunothérapies UF 9879</i>		Applicable au :
		Page 23 sur 23

Pour chaque patient :

- **Vérifier la saisie manuelle de la valeur du score interféron** effectuée par le technicien dans la ligne « HSCORE ».
- Dans la ligne « HSIFN », **vérifier l'interprétation du score interféron** (remplie de manière automatique par MOLIS) :
 - o Si < 2.3 : Score interféron négatif
 - o Si 2.3-3.2 : Score interféron faiblement positif (compris entre 2.3 et 3.2). A contrôler sur un nouveau prélèvement en fonction du contexte clinique.
 - o Si > 3.2 : Score interféron positif : élévation des ISG (*interferon stimulated genes*) par rapport à une population de témoins.
- Dans la ligne « COSHIFN », **rentrer si besoin l'un des commentaires suivants** :
 - o Si les counts normalisés des gènes de ménage ne sont pas similaires à ceux de la population générale (visualisé par la présence d'une case rouge ou verte dans le tableau « RunXX_AAAAMMJJ » au niveau des lignes 23 à 33) : « Expression des gènes de ménage différente de celle observée dans la population générale augmentant l'incertitude du résultat. » (code « menage »)
 - o Délai d'analyse non respecté : « Le résultat du score interféron ne peut être rendu en raison d'un délai pré-analytique non respecté. » (code « delai »)
 - o Mauvaise qualité de l'extraction :
 - Le rapport 260/280 doit être proche de 2
 - Le rapport 260/230 doit être proche de 1.8
 - En cas de rapport < 0.8, ajouter le commentaire : « La qualité de l'extraction de l'ARN de l'échantillon n'est pas optimale, augmentant l'incertitude du résultat. » (code « quali »)
 - o Si mauvaise qualité de l'extraction (rapport < 0.8) ET expression des gènes de ménage différente (case(s) colorée(s)) : mettre uniquement le commentaire « quali ».
 - o Si n'est pas nécessaire de mettre de commentaire, mettre « . » dans la ligne (n'édite pas la ligne).

2. Validation de l'analyse

Une fois le score interféron rempli et vérifié, l'interprétation complétée et les éventuels commentaires ajoutés, le biologiste peut valider l'analyse.

III. Communication des résultats

1. Pour les prescripteurs du CHU

Les résultats sont édités dans Cirus après validation dans MOLIS.

2. Pour les prescripteurs hors du CHU

Les résultats sont transmis selon les modalités habituelles pour le prescripteur concerné.

AUTEUR : Nom : MIAUX

Prénom : Grégoire

Date de soutenance : 07/06/2024

Titre de la thèse : Mise au point de l'étude de la signature interféron par technologie Nanostring au CHU de Lille

Thèse - Médecine - Lille « 2024 »

Cadre de classement : Biologie médicale

DES + FST/option : Polyvalent

Mots-clés : Signature interféron, Nanostring, interféronopathie.

Résumé :

Contexte : Les interférons (IFN) de type 1 sont essentiels pour le développement du système immunitaire et pour l'élimination des cellules infectées par des virus. Cependant, une augmentation d'IFN chronique et inadaptée peut être délétère et aboutir à un phénotype d'interféronopathie. La signature interféron est un score basé sur la quantification des ARNm issus de la transcription de gènes stimulés par les interférons (ISG). La technologie Nanostring permet une quantification directe sans étape de rétro transcription ni d'amplification, adaptée à l'activité en routine d'un laboratoire hospitalier. La signature interféron est une aide au diagnostic, au suivi, et même au pronostic de certaines interféronopathies. En France, ce dosage n'était réalisé jusqu'ici qu'au CHU de Lyon. Face à des prescriptions croissantes, l'objectif de ce travail était la mise au point de l'étude de l'étude de la signature interféron par technologie Nanostring à l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille.

Méthode : Ce travail s'intéresse aux actions menées par le laboratoire dans le cadre de la mise au point de la technique aux phases pré-analytique, analytique et post-analytique. La méthode comprend le protocole d'extraction manuelle d'ARN sur tube PAXgene avec le PAXgene® Blood RNA kit, la mesure de la quantité et la qualité des ARN extraits sur Nanodrop, l'analyse des échantillons par l'automate nCounter, le calcul du score IFN ainsi que les règles de validation biologique. Nous avons comparé nos résultats avec ceux de Lyon pour choisir différents paramètres d'analyse.

Résultat : Nous avons choisi d'utiliser le tube PAXgene, la normalisation individuelle et les témoins Lyonnais pour le calcul du score interféron. En comparant nos scores avec ceux de Lyon dans ces conditions d'analyse, nous obtenons un coefficient de corrélation de Spearman égal à 1, qui est statistiquement significatif. La réalisation de la signature interféron en routine au CHU de Lille a débuté en novembre 2023. Sur les 6 premiers mois, 356 résultats ont été rendus.

Conclusion : Le défi de la mise en place de l'étude par technologie Nanostring a été relevé avec succès par l'Institut d'Immunologie du CHU de Lille. La technologie apportée permet de répondre aux demandes et permet l'ouverture de nouvelles perspectives pour le laboratoire.

Composition du Jury :

Présidente : Madame le Professeur Myriam LABALETTE

Assesseurs : Monsieur le Professeur Eric HACHULLA

Directrices de thèse : Madame le Docteur Aurore COLLET

Madame le Docteur Julie DEMARET