

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2014/108646 A1**

(43) Date de la publication internationale  
17 juillet 2014 (17.07.2014)

(51) Classification internationale des brevets :  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2014/050039

(22) Date de dépôt international :  
10 janvier 2014 (10.01.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1350252 11 janvier 2013 (11.01.2013) FR

(71) Déposants : BIOMÉRIEUX [FR/FR]; F-69280 Marcy  
L'etoile (FR). HOSPICES CIVILS DE LYON [FR/FR]; 3  
quai des Célestins, F-69002 Lyon (FR).

(72) Inventeurs : CAZALIS, Marie-Angélique; Le Pré Cortet,  
Bât. T, 15 avenue Geroges Rougé, F-69120 Vaulx en Velin  
(FR). TOURNOUD, Maud; 16 rue docteur Greffier, F-  
38000 Grenoble (FR). VENET, Fabienne; 60 avenue du  
Général Frère, F-69008 Lyon (FR). LEPAPE, Alain; 26  
rue Edouard Millaud, F-69230 Saint Genis Laval (FR).  
MONNERET, Guillaume; 131 cours Albert Thomas, F-  
69003 Lyon (FR).

(74) Mandataire : DORGET, Elisabeth; bioMérieux, Départe-  
ment Propriété Industrielle, Chemin de l'Orme, F-69280  
Marcy L'etoile (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,  
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,  
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,  
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,  
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,  
OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,  
ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,  
UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,  
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,  
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,  
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,  
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclarations en vertu de la règle 4.17 :**

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

**Publiée :**

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avec la partie de la description réservée au listage des sé-  
quences (règle 5.2.a))

(54) Title : METHOD AND KIT FOR ESTABLISHING, *IN VITRO*, A PROGNOSIS OF SEVERITY IN A SEPTIC SHOCK PA-  
TIENT

(54) Titre : PROCÉDE ET KIT POUR ETABLIR *IN VITRO* UN PRONOSTIC DE SEVERITE CHEZ UN PATIENT EN CHOC  
SEPTIQUE

(57) Abstract : The invention concerns a method for establishing, *in vitro*, a prognosis of severity in a septic shock patient, compri-  
sing the following steps: (i) using a biological sample taken from said patient, measuring, *in vitro*, the level of expression of the ex-  
pression product of at least one gene chosen from the *lilrb2* and *lilrb1* genes, (ii) comparing the level of expression of the expression  
product of said at least one gene with a control level of expression of the expression product of the same gene indicating a good  
prognosis of severity, in which a level of expression of the expression product of said at least one gene that is lower than said control  
level of expression indicates a poor prognosis of severity for the patient, and a kit for implementing the method.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un procédé pour établir *in vitro* un pronostic de sévérité chez un patient en choc septique,  
comprenant les étapes suivantes:(i) à partir d'un échantillon biologique provenant dudit patient, on mesure *in vitro* le niveau d'ex-  
pression du produit d'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes *lilrb2* et *lilrb1*, (ii) on compare le niveau d'expression du  
produit d'expression dudit au moins un gène avec un niveau d'expression contrôle de bon pronostic de sévérité pour le produit d'ex-  
pression du même gène, dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression dudit au moins un gène en-dessous dudit niveau  
d'expression contrôle est indicatif d'un mauvais pronostic de sévérité pour le patient ainsi qu'un kit pour la mise en œuvre du procé-  
dé.



WO 2014/108646 A1

**Procédé et kit pour établir *in vitro* un pronostic de sévérité  
chez un patient en choc septique**

La présente invention concerne un procédé et un kit pour  
5 établir *in vitro* un pronostic de sévérité chez un patient en choc  
septique.

Les syndromes septiques représentent l'une des premières  
causes de mortalité dans les services de réanimation. Ils peuvent  
10 résulter d'une infection bactérienne, virale, mycosique ou  
parasitaire. Ils se définissent comme un syndrome de réponse  
systémique inflammatoire ou SIRS (Systemic Inflammatory Response  
Syndrome).

- le sepsis est un syndrome de réponse systémique inflammatoire  
15 en relation avec une infection,
- un sepsis sévère est un sepsis associé à une hypotension  
artérielle et/ou hypoperfusion et/ou au dysfonctionnement  
d'au moins un organe,
- le choc septique est un sepsis sévère associé à une  
20 hypotension persistante malgré des remplissages adéquats et  
des traitements vasopresseurs.

La différence entre SEPSIS, SEPSIS sévère et choc septique  
réside principalement dans l'importance de la perturbation de  
25 toutes les fonctions vitales.

Les syndromes septiques ont longtemps été considérés  
uniquement comme une réponse inflammatoire non régulée conduisant,  
en réponse à une dissémination bactérienne initiale, à une  
30 défaillance multi-viscérales de l'organisme. Cependant, les échecs  
des approches thérapeutiques, principalement anti-inflammatoires,  
expérimentées durant ces dernières années, ainsi que l'incapacité  
à caractériser la forte hétérogénéité des patients septiques ont  
contribué à remettre en cause la vision essentiellement pro-  
35 inflammatoire de la physiopathologie des syndromes septiques.

Actuellement, la réponse immunitaire au cours du choc  
septique est plutôt décrite en deux phases successives. Après une

brève phase initiale très inflammatoire, responsable de la symptomatologie du choc proprement dit, se met en place un état de dépression immunitaire induit par les mécanismes immunosuppresseurs chargés de contrôler la réponse pro-  
5 inflammatoire. Ainsi, cette composante anti-inflammatoire de la réaction à l'infection, initialement perçue comme purement compensatrice, s'est révélée prédominante chez la majorité des malades et s'accompagne d'une immunosuppression et d'une hypo-réactivité cellulaire marquée. De plus, il semble que la mortalité  
10 survienne principalement à distance du choc (ou de la défaillance d'organe initiale) dans un contexte où tous les patients présentent des signes biologiques d'immunodépression.

Certains marqueurs ont ainsi été décrits dans la littérature comme pouvant être une aide à un pronostic de mortalité ou de  
15 survie chez des patients en choc septique. Mais dans tous les procédés décrits jusqu'à présent, les échantillons de sang sont prélevés une première fois dans les 24 à 72 premières heures après le début du choc (J1-J3), puis plus tardivement au cours du choc septique. En dépit de leur intérêt, la significativité de ces  
20 marqueurs ne se révèle au plus tôt qu'à J1-J3. En d'autres termes, ils ne sont pas suffisamment précoces pour une prise en charge très réactive et la plus rapide possible d'un patient en état de choc. Or, une prise en charge adaptée du patient au plus tôt après le choc est indispensable. Il est donc nécessaire et très  
25 important de disposer de marqueurs qui permettent de réduire au maximum cette fenêtre pronostique.

De manière complètement inattendue, les présents inventeurs ont montré que les produits d'expression des gènes *lilrb2* et/ou *lilrb1* permettent d'établir dès les toutes premières heures et pas  
30 plus tard que dans les 12 premières heures après le début du choc, un pronostic de sévérité ou de survie/mortalité chez des patients en choc septique. Ces gènes appartiennent à la famille des gènes récepteurs des immunoglobulines qui sont localisés sur le chromosome 19q13.4

35 Il existe plusieurs variants pour les deux gènes cibles qui sont tous pertinents dans le cadre de l'invention. Ces variants sont répertoriés dans Genbank sous les références et numéros

d'accèsion suivants :

LILRB2:

5 « Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B  
(with TM and ITIM domains), member 2 (LILRB2), transcript »  
NM\_005874.3 variant 1 Refseq  
NM\_001080978.2 variant 2 Refseq

LILRB1

10 « Homo sapiens leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B  
(with TM and ITIM domains), member 1 (LILRB1), transcript »  
NM\_006669.3 variant 1 Refseq  
NM\_001081637.1 variant 2 Refseq  
NM\_001081638.1 variant 3 Refseq  
15 NM\_001081639.1 variant 4 Refseq

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé pour  
établir *in vitro* un pronostic de sévérité (de survie ou de risque  
accru de mortalité) chez un patient en choc septique, comprenant  
20 les étapes suivantes:

(i) à partir d'un échantillon biologique provenant dudit patient,  
on mesure *in vitro* le niveau d'expression du produit d'expression  
d'au moins un gène choisi parmi les gènes *lilrb2* et *lilrb1*, (ii) on  
compare le niveau d'expression du produit d'expression dudit au  
25 moins un gène avec un niveau d'expression contrôle de bon  
pronostic de sévérité pour le produit d'expression du même gène,  
dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression dudit  
au moins un gène en-dessous dudit niveau d'expression contrôle est  
indicatif d'un mauvais pronostic de sévérité pour le patient.

30 Dans un mode de réalisation préférée, (i) on mesure le niveau  
d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2*, (ii) on  
compare le niveau d'expression du produit d'expression du gène  
*lilrb2* avec le niveau d'expression contrôle de bon pronostic,  
dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression du gène  
35 *lilr2* du patient en-dessous de celui du niveau d'expression  
contrôle est indicatif d'un mauvais pronostic pour le patient.

Dans un autre mode de réalisation, (i) on mesure le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2* et le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb1* du patient, (ii) on compare le niveau d'expression du produit d'expression du gène *ilrb2* et du gène *ilrb1* du patient respectivement avec le niveau d'expression contrôle de chaque gène,

5 dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilr2* et du gène *lilrb1* du patient au-dessous respectivement du niveau d'expression contrôle de chaque gène est indicatif d'un mauvais pronostic pour le patient.

L'échantillon biologique est choisi parmi le sang, le plasma, le sérum, la salive, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural et le liquide péritonéal.

15

Le procédé de l'invention peut aussi comprendre une étape supplémentaire selon laquelle dans l'étape on extrait les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) de l'échantillon sanguin et on réalise les étapes subséquentes sur lesdites cellules mononucléées sanguines, comme décrit précédemment.

20

Le produit d'expression du gène ou des gènes est soit un ARN et de préférence un ARN messenger ou encore un ADNc, soit une protéine ou un polypeptide. Quand le produit d'expression est un ARN, son niveau d'expression est déterminé à l'aide d'au moins une sonde d'hybridation spécifique du produit d'expression et de préférence à l'aide d'au moins deux voire trois sondes d'hybridation et en particulier par une amplification enzymatique quantitative. Quand le produit d'expression du ou des gènes est un polypeptide ou une protéine son niveau d'expression est déterminé de préférence par un dosage immunologique quantitatif.

25

30

L'invention a aussi pour objet un procédé pour réaliser *in vitro* un suivi d'un patient en choc septique, par mesure de l'évolution du niveau d'expression du produit d'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes *ilrb2* et *ilrb1* chez ledit patient, dans lequel

35

(i) on mesure le niveau d'expression dudit au moins un gène dans un échantillon du patient prélevé à J1, c'est à dire au plus tard dans les 12 premières heures du choc septique,

(ii) on mesure le niveau d'expression dudit au moins un gène dans un échantillon du patient prélevé à Jx, c'est à dire subséquent à J1,

dans lequel une augmentation dudit niveau d'expression dudit au moins un gène entre J1 et Jx indique que le patient évolue vers un bon pronostic de sévérité.

Bien entendu, l'étape (ii) peut être réalisée plusieurs fois pour suivre l'évolution du niveau d'expression dudit au moins un gène au cours du temps.

Comme décrit ci-dessus le niveau d'expression du produit d'expression est de préférence mesuré par amplification quantitative et par dosage immunologique quantitatif.

L'invention concerne aussi un kit pour réaliser les procédés décrits ci-dessus comprenant au moins une sonde d'hybridation spécifique du produit d'expression ARN ou ADNc d'au moins un gène choisi parmi les gènes *ilrb2* et *ilrb1* ou au moins un ligand spécifique du produit d'expression polypeptide ou protéine d'au moins un gène choisi parmi les gènes *ilrb2* et *ilrb1*, en particulier un anticorps ou un dérivé d'anticorps ou un analogue d'anticorps.

### Définitions

Echantillon biologique signifie le sang, le plasma, le sérum, la salive, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural et le liquide péritonéal.

Echantillon de sang ou échantillon sanguin signifie indifféremment le sang total, le sérum ou le plasma.

On entend par produit d'expression d'un gène l'ARN messager ou un fragment d'ARNm, l'ADNc ou un fragment d'ADNc, un polypeptide ou une protéine ou un fragment de polypeptide ou de protéine.

On entend par réactif spécifique un réactif qui réagit avec

un matériel biologique de l'échantillon de sang ou des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) afin de mettre en évidence, d'une manière directe ou indirecte l'expression d'un gène cible, qui peut être déterminé par l'analyse des ARNm issus de ce gène, ou par l'analyse de la protéine codée par ce gène.

A titre indicatif, lorsque l'on souhaite déterminer l'expression d'un gène cible par l'analyse de la protéine codée par ce gène, ce réactif spécifique comprend au moins un anticorps spécifique de la protéine codée par ce gène cible.

A titre indicatif, lorsque l'on souhaite déterminer l'expression d'un gène cible par l'analyse des ARNm transcrits à partir de ce gène, ce réactif spécifique comprend au moins une amorce d'amplification spécifique de l'ADN complémentaire de cet ARNm (on parle alors d'amorce d'amplification spécifique d'un gène cible). L'ADN complémentaire d'un ARNm peut être obtenu selon un protocole bien connu de l'homme du métier. Par exemple, on extrait les ARN totaux (comprenant les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert, les ARNm) de l'échantillon sanguin ou des PBMCs. On réalise ensuite une réaction de transcription inverse à l'aide d'une enzyme transcriptase inverse qui permet d'obtenir, à partir d'un fragment d'ARN, un fragment complémentaire d'ADN (ADNc). La réalisation d'une telle étape est bien connue de l'homme du métier. Lorsque l'on souhaite plus particulièrement obtenir uniquement les ADN complémentaires des ARN messagers, on réalise cette étape enzymatique en présence de fragments nucléotidiques comprenant uniquement des bases thymine (polyT), qui s'hybrident par complémentarité sur la séquence polyA des différents ARNm afin de former un complexe polyT-polyA qui sert alors de point de départ à la réaction de transcription inverse réalisée par l'enzyme transcriptase inverse. On obtient alors différents ADN complémentaires des différents ARN messagers initialement présents dans l'échantillon sanguin ou dans les PBMCs. Dans la suite de l'exposé, on désigne par ADNc, un ADN complémentaire d'un ARN messenger.

Par amorce d'amplification, on entend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques, préférentiellement de 15 à 25 motifs nucléotidiques et possédant

une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une réaction d'amplification enzymatique.

5 Par réaction d'amplification enzymatique, on entend un processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique cible à l'aide d'amorces d'amplification spécifiques par l'action d'au moins une enzyme. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment les techniques suivantes : PCR (Polymerase Chain Reaction), LCR  
10 (Ligase Chain Reaction), RCR (Repair Chain Reaction), 3SR (Self Sustained Sequence Replication) avec la demande de brevet WO-A-90/06995, NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), et TMA (Transcription Mediated Amplification) avec le brevet US-A-5,399,491.

15 On parle alors d'amplicons pour désigner les polynucléotides générés par une technique d'amplification enzymatique. Préférentiellement, lorsque l'amplification enzymatique est une PCR, le réactif spécifique comprend au moins 2 amorces d'amplification spécifiques afin d'amplifier une région  
20 particulière de l'ADN complémentaire de l'ARNm issu du gène cible. Lorsque l'amplification enzymatique est une PCR réalisée après une réaction de transcription inverse, on parle de RT-PCR.

Par sonde d'hybridation, on entend un fragment nucléotidique comprenant de 5 à 100 motifs nucléotidiques, notamment de 6 à 35  
25 motifs nucléotidiques, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec un fragment nucléotidique cible. Dans la présente invention, le fragment nucléotidique cible peut être une séquence nucléotidique comprise dans un ARN messager ou une  
30 séquence nucléotidique comprise dans un ADN complémentaire obtenu par transcription inverse dudit ARN messager.

Par hybridation, on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, tels que par exemple une sonde d'hybridation et un fragment  
35 nucléotidique cible, ayant des séquences suffisamment complémentaires sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques. Un fragment

nucléotidique "capable de s'hybrider" avec un polynucléotide est un fragment pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées  
5 par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux  
10 acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans  
15 lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes d'hybridation utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier. En général, selon la longueur des sondes d'hybridation utilisées, la température pour  
20 la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M. On réalise ensuite une étape de détection de la réaction d'hybridation.

Par détection on entend soit une détection directe par une  
25 méthode physique, soit une méthode de détection à l'aide d'un marqueur. De nombreuses méthodes de détection existent pour la détection des acides nucléiques [1,2].

Par marqueur, on entend un traceur capable d'engendrer un signal. Une liste non limitative de ces traceurs comprend les  
30 enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence ou luminescence, comme la peroxydase de raifort, la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase ; les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents ou colorants ; les groupements à  
35 densité électronique détectables par microscopie électronique ou par leurs propriétés électriques comme la conductivité, par les méthodes d'ampérométrie ou de voltamétrie, ou par des mesures

d'impédance ; les groupements détectables par des méthodes optiques comme la diffraction, la résonance plasmon de surface, la variation d'angle de contact ou par des méthodes physiques comme la spectroscopie de force atomique, l'effet tunnel, etc. ; les  
5 molécules radioactives comme  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^{125}\text{I}$ . Ainsi, le polynucléotide peut être marqué pendant l'étape d'amplification enzymatique, par exemple en utilisant un nucléotide triphosphate marqué pour la réaction d'amplification. Le nucléotide marqué sera un désoxyribonucléotide dans les systèmes d'amplification générant  
10 un ADN, comme la PCR, ou un ribonucléotide dans les techniques d'amplification générant un ARN, comme les techniques TMA ou NASBA. Le polynucléotide peut aussi être marqué après l'étape d'amplification, par exemple en hybridant une sonde marquée selon la technique d'hybridation sandwich décrite dans le document WO-A-  
15 91/19812.

Au sens de la présente invention, la sonde d'hybridation peut être une sonde dite de capture. Dans ce cas, le fragment nucléotidique cible peut être préalablement marqué au moyen d'un marqueur. La sonde dite de capture est immobilisée ou  
20 immobilisable sur un support solide par tout moyen approprié, c'est-à-dire directement ou indirectement, par exemple par covalence ou adsorption. On réalise alors une réaction d'hybridation entre ladite sonde de détection et le fragment nucléotidique cible marqué.

25 La sonde d'hybridation peut également être une sonde dite de détection. Dans ce cas, la sonde d'hybridation peut être marquée au moyen d'un marqueur. On réalise alors une réaction d'hybridation entre ladite sonde de capture et le fragment nucléotidique cible.

30 Que l'on utilise une sonde dite de capture ou une sonde dite de détection, la réaction d'hybridation peut être réalisée sur un support solide qui inclut tous les matériaux sur lesquels peut être immobilisé un acide nucléique. Des matériaux de synthèse ou des matériaux naturels, éventuellement modifiés chimiquement,  
35 peuvent être utilisés comme support solide, notamment les polysaccharides tels que les matériaux à base de cellulose, par exemple du papier, des dérivés de cellulose tels que l'acétate de

cellulose et la nitrocellulose ou le dextrane, des polymères, des copolymères, notamment à base de monomères du type styrène, des fibres naturelles telles que le coton, et des fibres synthétiques telles que le nylon ; des matériaux minéraux tels que la silice, le quartz, des verres, des céramiques ; des latex ; des particules magnétiques ; des dérivés métalliques, des gels etc. Le support solide peut être sous la forme d'une plaque de microtitration, d'une membrane comme décrit dans la demande WO-A-94/12670, d'une particule ou d'une biopuce.

10 Dans la présente invention, la détermination de l'expression d'un gène cible peut être analysée par l'expression des ARNm qui sont transcrits à un temps donné. Dans ce cas, le matériel biologique est un acide nucléique, et le réactif spécifique peut être indifféremment une amorce d'amplification ou une sonde d'hybridation telles que définies précédemment.

15 On peut déterminer l'expression d'un gène cible de la manière suivante:

1) après avoir extrait les ARN totaux d'un échantillon sanguin ou de PBMCs, on réalise une étape de transcription inverse, telle que décrite précédemment afin d'obtenir les différents ADN complémentaires des différents ARN messagers initialement présents dans l'échantillon sanguin ou dans les PBMCs (ou ADNc)

2) on amplifie spécifiquement les ADNc. Dans ce cas, le réactif spécifique utilisé comprend au moins une amorce d'amplification spécifique du gène cible, telle que définie précédemment. Cette étape peut être réalisée notamment par une réaction d'amplification de type PCR ou par toute autre technique d'amplification appropriée

3) on détermine l'expression du gène cible en quantifiant les ADNc. Les ADNc peuvent être quantifiés notamment par l'utilisation d'une gamme de quantification obtenue par une réaction d'amplification conduite jusqu'à saturation. Afin de tenir compte de la variabilité d'efficacité enzymatique qui peut être observée lors des différentes étapes (transcription inverse, PCR quantitative...), on peut normaliser l'expression du gène cible des différents groupes de patients, par la détermination simultanée de

l'expression d'un gène dit de référence dont l'expression est similaire chez les différents groupes de patients. En réalisant un rapport entre l'expression du gène cible et l'expression du gène de référence, on corrige ainsi toute variabilité entre les différentes expérimentations. L'homme du métier pourra se référer notamment aux publications suivantes : [3-4] Bustin SA *Journal of molecular endocrinology*, 2002, 29 : 23-39 ; Giulietti A *Methods*, 2001, 25 : 386-401

On peut également déterminer l'expression d'un gène cible de la manière suivante:

1) après avoir extrait les ARN totaux d'un échantillon sanguin ou des PBMCs, on réalise une étape de transcription inverse, telle que décrite précédemment afin d'obtenir les différents ADN complémentaires des différents ARN messagers initialement présents dans l'échantillon ou les PBMCs (ou ADNc)

2) on immobilise les ADNc sur une membrane

3) on détermine l'expression du gène cible en hybridant les ADNc à des sondes d'hybridation spécifiques du gène cible préalablement marquées. De telles techniques d'hybridation sont bien connues de l'homme du métier, et on peut citer notamment la technique du Northern blot. Cette réaction d'hybridation peut être réalisée après une étape d'amplification spécifique des ADN complémentaires des ARN messagers d'un gène cible lorsque notamment le gène est faiblement exprimé

L'expression d'un gène cible peut être également analysée par l'expression des protéines codées par le gène cible. Dans ce cas, le matériel biologique est une protéine ou un polypeptide et plusieurs techniques de détection avec ou sans ligand peuvent être utilisées. La spectrométrie de masse peut être utilisée comme technique de détection sans ligand. Le réactif spécifique peut être un ligand spécifique de la protéine codée par le gène cible pour un système de détection avec ligand.

En particulier, le ligand est un anticorps ou un dérivé d'anticorps (tel qu'un fragment d'anticorps) ou un analogue d'anticorps.

Les anticorps recombinants, spécifiques de la protéine traduite du gène cible peuvent être obtenus selon des procédés

classiques connus de l'homme du métier, à partir d'organismes procaryotes, tels que bactéries, ou à partir d'organismes eucaryotes, tels que levures, cellules de mammifères, de plantes, d'insectes ou d'animaux, ou par des systèmes de production extra-cellulaire.

Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés selon les techniques classiques connues de l'homme du métier telles que la technique des hybridomes dont le principe général est rappelé ci-dessous.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris, (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*) avec un antigène cible d'intérêt, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont ensuite fusionnés avec des cellules myélomateuses "immortelles" (murines dans l'exemple) pour donner lieu à des hybridomes. A partir du mélange hétérogène des cellules ainsi obtenu, on effectue alors une sélection des cellules capables de produire un anticorps particulier et de se multiplier indéfiniment. Chaque hybridome est multiplié sous la forme de clone, chacun conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de l'antigène d'intérêt pourront être testées par exemple en ELISA, par immunotransfert en une ou deux dimensions, en immunofluorescence, ou à l'aide d'un biocapteur. Les anticorps monoclonaux ainsi sélectionnés, sont par la suite purifiés notamment selon la technique de chromatographie d'affinité.

Des fragments d'anticorps peuvent par exemple être obtenus par protéolyse. Ainsi, ils peuvent être obtenus par digestion enzymatique, résultant en des fragments de type Fab (traitement à la papaïne [5] ou de type F(ab)'<sub>2</sub> (traitement à la pepsine; [6]. Ils peuvent également être préparés par voie recombinante [7]. Un autre fragment d'anticorps qui convient aux fins de l'invention comprend un fragment Fv qui est un dimère constitué de l'association non covalente du domaine variable léger (VL) et du domaine variable lourd (VH) du fragment Fab, donc de l'association de deux chaînes polypeptidiques. Afin d'améliorer la stabilité du

fragment Fv due à la dissociation des deux chaînes polypeptidiques, ce fragment Fv peut être modifié par génie génétique en insérant un lien peptidique adapté entre le domaine VL et le domaine VH [8]. On parle alors de fragment scFv (« single chain Fragment variable ») car il est constitué d'une seule chaîne polypeptidique. L'utilisation d'un lien peptidique composé préférentiellement de 15 à 25 acides aminés permet de relier l'extrémité C-terminale d'un domaine à l'extrémité N-terminale de l'autre domaine, constituant ainsi une molécule monomérique dotée de propriétés de liaison similaires à celles de l'anticorps sous sa forme complète. Les deux orientations des domaines VL et VH conviennent (VL-lien-VH et VH-lien-VL) car elles présentent des propriétés fonctionnelles identiques. Bien entendu, tout fragment connu de l'homme du métier et présentant les caractéristiques immunologiques définies ci-dessus convient aux fins de l'invention.

Par analogue d'anticorps, on entend en particulier les protéines d'affinité aux propriétés compétitives (les nanofitines<sup>TM</sup>).

Lorsque le matériel biologique est un polypeptide ou une protéine issue de l'expression d'un gène, on peut déterminer l'expression de ce dernier, en détectant et ou quantifiant la dite protéine par Western Blot ou ELISA, ou toute autre méthode connue de l'homme du métier, telle qu'une méthode de chimiluminescence à partir du matériel biologique.

La technique ELISA (« Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ») est un dosage immunoenzymatique sur support solide. Ce test entre dans le cadre plus général des EIA (« Enzyme Immunoassays ») dans lequel le dosage est couplé à une réaction catalysée par une enzyme. La technique utilise un ou deux anticorps. L'anticorps de détection de la formation de complexes immuns (antigène / anticorps) est couplé à l'enzyme et peut générer l'émission d'un signal par un substrat chromogène ou fluorogène.

La technique Western Blot est un test pour détecter une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps

spécifique de cette protéine comprenant les étapes suivantes telle que décrites ci-dessous.

La première étape est une électrophorèse sur gel, qui permet de séparer les protéines de l'échantillon selon leur taille.

5 Les protéines dans le gel sont alors transférées sur une membrane (nitrocellulose, PVDF...) par pression ou par application d'un courant électrique, les protéines se fixant à la membrane grâce à des interactions hydrophobes et ioniques.

Après saturation des sites d'interaction non spécifique, un premier anticorps, spécifique de la protéine à étudier (anticorps 10 primaire) est incubé avec la membrane.

La membrane est ensuite rincée afin d'enlever les anticorps primaires non liés, puis incubée avec des anticorps dits secondaires, qui vont se lier aux anticorps primaires. Cet 15 anticorps secondaire est habituellement lié à une enzyme qui permet l'identification visuelle de la protéine étudiée sur la membrane. L'ajout d'un substrat marqué de l'enzyme engendre une réaction colorée qui est visible sur la membrane.

## 20 **FIGURES**

Figure 1 : Les figures 1A et 1B représentent respectivement les niveaux d'expression de LILRB2 avec 2 probesets Affymetrix indépendants : 207967\_x\_at et 210146\_x\_at. Les données sont exprimées en intensité de fluorescence pour les 3 groupes de 25 patients : volontaires sains (VS), patients non survivants (NS) et survivants (S).

Figure 2 : La figure 2 représente la corrélation de l'intensité de fluorescence pour LILRB2 avec les 2 probesets Affymetrix.

Figure 3 : La figure 3 montre les niveaux d'expression de LILRB1 avec le probeset Affymetrix 211336\_x\_at. Les données sont exprimées en intensité de fluorescence pour les 3 groupes de 30 patients : volontaires sains (VS), patients non survivants (NS) et survivants (S).

Figure 4 : La figure 4 représente la corrélation de l'intensité de fluorescence entre les 2 probesets Affymetrix des gènes LILRB1 35 (211336\_x\_at) et LILRB2 (207697\_x\_at).

Figure 5: La figure 5 montre la corrélation entre l'intensité de fluorescence du probese (207697\_x\_at) obtenue avec la plateforme Affymetrix et les mesures CNRQ de LILRB2 obtenues en RT-qPCR sur la cohorte de découverte.

5 Figure 6: La figure 6 présente les CNRQ de LILRB2 pour les patients survivants (S) et non survivants (NS).

Figure 7 : La figure 7 représente la courbe ROC de l'association entre les valeurs de CNRQ de LILRB2 et la probabilité de décès chez les patients en choc septique.

10 Figure 8 : La figure 8 représente la courbe de survie de Kaplan Meier pour les patients présentant des valeurs de CNRQ pour LILRB2 au-dessus de la médiane (0,86) en caractères gras et en dessous de la médiane en caractères normaux.

15

**EXEMPLES: Recherche d'un profil d'expression pour le pronostic de survie ou de sévérité d'un patient en choc septique**

20 **Exemple 1 : Description des patients**

### 1.1 Cohorte de découverte

L'étude a été réalisée sur une cohorte de 51 patients en choc septique âgés de 25 à 85 ans (33 hommes, 18 femmes, âge médian: 66 ans) et admis dans le service de réanimation du centre hospitalier

25 Lyon Sud - Lyon (France) entre 2004 et 2009 pour la prise en charge d'un choc septique. Leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 1 ci-dessous. Tous les patients étaient en état de choc septique nécessitant un traitement par les amines après remplissage vasculaire. Le début du traitement aux catécholamines  
30 est considéré comme le T0 du choc septique et de l'étude. Parmi les 51 patients de la cohorte, 17 patients (33%) sont décédés dans les 28 premiers jours après mise sous traitement par catécholamine (patients non survivants : NS) et 34 patients ont survécu au-delà de 28 jours (patients survivants : S). Les patients âgés de moins  
35 de 18 ans sont exclus de l'étude.

La sévérité de l'affection a été calculée par le score SAPS-II (Simplified Acute Physiology Score) établi par Le Gall, et al.

en 1993 qui prend en compte différents paramètres cliniques (l'âge, la fréquence cardiaque, la température centrale, la PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, la diurèse, l'urée sanguine, les globules blancs, la kaliémie, la natrémie, la bicarbonatémie, la bilirubine, le type d'admission, les pathologies associées et le score de Glasgow) et également le score de SOFA (Sequential Organ Failure Assessment score) qui prend en compte les défaillances d'organes (basé sur six notes différentes, une pour chacune des voies respiratoires, cardio-vasculaires, hépatiques, coagulation, les systèmes rénaux et neurologiques). Ces scores sont inversement proportionnels à la survie. Pour le groupe de patients étudié, le SAPSII médian est 51 et le SOFA médian est 10. Toutes ces informations sont résumées dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1

	Non survivants n= 17 (33%)	Survivants n= 34 (67%)	Total n=51 (%)	P- value
Femme n (%)	9 (53)	9 (26)	18 (35)	0.062
Homme n (%)	8 (47)	25 (74)	33 (65)	
Age (années) médiane (Q1-Q3)	59 (48-70)	66 (56-76)	66 (54-74)	0.418
SAPS II médiane (Q1-Q3)	64 (56-70)	47 (38-55)	51 (43-61)	<.001
SOFA médiane (Q1-Q3)	12 (10-15)	9 (8-11)	10 (8-12)	0.002
Type d'infection				
communautaire n(%)	8 (47)	17 (50)	25 (49)	ns
nosocomiale n (%)	8 (47)	17 (50)	25 (49)	
Site d'infection				
abdominale n (%)	4 (38)	15 (40)	19 (39)	0.291
pulmonaire n (%)	10 (46)	13 (40)	23 (42)	
autres n (%)	4 (16)	6 (20)	10 (19)	

### 1.2 Série de contrôle

Des sujets volontaires sains (VS) ont été recrutés afin d'obtenir une série contrôle dont les échantillons ont été traités et analysés dans des conditions identiques à celles des malades. Il s'agit de 24 sujets sains (12 femmes et 12 hommes) d'un âge médian de 57 ans. Ces informations sont résumées dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2

	<b>VS</b> <b>n=24 (%)</b>
Femme n (%)	12 (50)
Homme n (%)	12 (50)
Age (années) médiane (Q1-Q3)	57 52-60)

### 5 1.3 Cohorte de Validation :

La cohorte de validation inclut 262 patients en choc septique de 19 à 93 ans (164 hommes, 93 femmes, âge médian: 67 ans) admis dans 6 services de réanimation de Lyon (France) entre 2009 et 2011 pour la prise en charge d'un choc septique. Ces patients sont tous en

10 état de choc nécessitant un traitement par les amines après remplissage vasculaire. Le début du traitement aux catécholamines est considéré comme le T0 du choc septique. Parmi les 262 inclus dans l'étude, 90 patients (34%) sont décédés dans les 28 premiers jours après mise sous traitement par catécholamine.

15 Les patients âgés de moins de 18 ans sont exclus de l'étude.

La sévérité de l'affection est calculée par le score SAPS-II et par le score de SOFA. Pour le groupe de patients étudié le SAPS-II médian est 62 et le SOFA médian est 12.

20 Le tableau 3 ci-dessous résume les informations sur les patients de la cohorte de validation.

Tableau 3

	<b>Non survivants n= 90 (34%)</b>	<b>Survivants n= 172 (66%)</b>	<b>Total n=262 (%)</b>	<b>P- value</b>
Femme n (%)	33 (36.7)	65 (37.8)	98 (37.4)	0.965
Homme n (%)	57 (63.3)	107 (62.2)	164 (62.6)	
Age (années) médiane (Q1-Q3)	71.5 (63-78)	65 (56-77)	67 (58-78)	0.003
SAPS II médiane (Q1-Q3)	77 (63-93)	57 (44-68)	62 (50-77)	<.001
SOFA médiane (Q1-Q3)	14 (12-16)	11 (9-13)	12 (10-14)	<.001
Type d'infection				
communautaire n (%)	48 (53.3)	114 (66.3)	162 (61.8)	0.041
nosocomiale n (%)	42 (46.7)	58 (33.7)	100 (38.2)	
Site d'infection				
abdominale n (%)	30 (33.3)	41 (23.8)	71 (27.1)	0.212
pulmonaire n (%)	36 (40.0)	72 (41.9)	108 (41.2)	
autres n (%)	24 (26.7)	59 (34.3)	83 (31.7)	

**Exemple 2 : Echantillonnage et collection des données :**

Les premiers échantillons sanguins sont obtenus au plus tard 12 heures après le début du choc septique.

**5 2.1 Extraction des ARN totaux de l'échantillon biologique:**

Les prélèvements ont été collectés directement dans des tubes PAXgene™ Blood RNA (PreAnalytix, Hilden, Allemagne). Après prélèvement, les tubes ont été laissés à température ambiante pendant 4 heures puis conservés à -80°C jusqu'à l'extraction du matériel biologique dans le but d'optimiser et de standardiser les conditions de conservation des échantillons. Plus précisément, dans ce protocole, les ARN totaux ont été extraits à l'aide des kits PAXgene™ Blood RNA® (PreAnalytix) en respectant les recommandations du fabricant.

15 La qualité des ARN totaux extraits a été analysée par le bio-analyseur AGILENT 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) à l'aide du système Lab-on-chip RNA 6000 Nano Assay (Agilent). Les ARN totaux comprennent les ARN de transfert, les ARN messagers (ARNm) et les ARN ribosomiaux.

20

**2.2 Etude de découverte :**

Pour l'étude de découverte, la réaction de transcription inverse des ARNm est réalisée selon le protocole d'Affymetrix à partir de 50 ng d'ARN total. Une amorce oligonucléotidique a été utilisée pour cibler tous les ARN pendant la transcription inverse. L'ensemble des étapes a été réalisé avec le kit WTO NuGen et hybridé sur des puces à ADN. L'hybridation de l'ARNc est réalisée avec les biopuces GeneChipHuman Genome U133 Plus 2 avant l'étape d'amplification du signal par l'incubation avec le mélange SAPE contenant la Streptavidine Phycoerythrine puis les anticorps IgG de chèvre anti Streptavidine mélangés avec l'anticorps biotinylé anti IgG de chèvre. Cette dernière étape utilise la plateforme Fluidic FS450. L'analyse des données Affymetrix débute par la capture de l'image de la biopuce par le scanner GeneChip® 3000 d'Affymetrix. Les données sont ensuite normalisées par RMA (Robust

Multiple-Array Average). Toutes les données basées sur l'intensité du signal sont utilisées après la normalisation. Les différences de niveaux d'expression en ARNm entre les patients décédés dans les 28 premiers jours (patients non survivants) et les patients survivants sont déterminées par la méthode SAM (Tusher, Tibshirani, and Chu, 2001).

Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les patients survivants, non survivants et les contrôles sains, on constate une surexpression d'LILRB2 chez les patients survivants comparée au niveau d'expression obtenue à la fois chez les contrôles sains et chez les non survivants dont les niveaux d'expression sont comparables. Ces résultats sont présentés à la figure 1 annexée avec 2 probesets Affymetrix indépendants, respectivement identifiés en 207697\_x\_at et 210146\_x\_at, ce qui confirme la robustesse et la fiabilité des résultats. Dans la figure 1, respectivement figure 1A et figure 1B, les données sont présentées en intensité de fluorescence pour les 2 probesets Affymetrix 207697\_x\_at et 210146\_x\_at, respectivement, pour les 3 groupes de patients : volontaires sains (cf. tableau 2), patients non survivants et survivants (cf. tableau 1).

L'intensité de fluorescence des probesets 207697\_x\_at et 210146\_x\_at a été comparée pour les patients survivants et non survivants. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Probeset	SFC	AUC	p-value
207697_x_at	1,53	0,84	0,0002
210146_x_at	1,19	0,78	0,0012

- 25 **SFC:** Standard Fold Change
- AUC:** Area Under Curve
- p-value:** selon le test de Mann Whitney

L'intensité de fluorescence a ensuite été corrélée pour les 2 probesets Affymetrix. Les résultats sont présentés à la figure 2.

Spearman coefficient corrélation r	0,68
Intervalle de confiance 95%	0,565 to 0,762
Spearman test significativité P value	< 0,0001

Comme cela ressort de la figure 2, on constate une très bonne corrélation pour les 2 probesets Affymetrix.

5 Parmi les gènes différentiellement exprimés entre les patients survivants, non survivants et les contrôles sains, on constate aussi une surexpression d'LILRB1 chez les patients survivants comparée au niveau d'expression obtenue à la fois chez les contrôles sains et chez les non survivants. Ces résultats sont présentés à la figure 3 annexée avec 1 probeset Affymetrix  
10 indépendants, respectivement identifiés en 207697\_x\_at et 211336\_x\_at pour les 3 groupes de patients : volontaires sains, patients non survivants et survivants. Les résultats sont données en intensité de fluorescence.

15 L'intensité de fluorescence entre les 2 probesets Affymetrix des gènes LILRB1 (211336\_x\_at) et LILRB2 (207697\_x\_at) a ensuite été corrélée. Les résultats sont présentés à la figure 4. On observe une corrélation significative (0.86[0.81-0.90]) entre les résultats d'expression des deux gènes LILRB2 et LILRB1.

20

### 2.3 Validation technique (transfert de plateforme) :

Afin de confirmer les résultats à l'aide d'une autre technique de biologie moléculaire, l'expression d'ARN de LILRB2 a été mesurée par RT-PCR quantitative sur la même cohorte.

25 Brièvement, une réaction de transcription reverse (RT) a été réalisée à partir de 200 ng d'ARN total dans un volume final de 20 µl à l'aide des kits SuperScript® VILO™ system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en respectant les recommandations du fabricant. Chaque solution de cDNA a été diluée au 1/10 dans de  
30 l'eau DEPC. Un standard a été préparé pour le gène d'intérêt (LILRB2) et le gène de référence (HPRT1) par une amplification PCR (polymerase chain reaction) conduite jusqu'à saturation. Les amplicons obtenus ont été purifiés (PCR purification kit, Qiagen Ltd) et la présence d'un amplicon unique a été vérifié par  
35 électrophorèse capillaire à l'aide du bioanalyseur AGILENT 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) et du système Lab-on-

chip DNA Assay (Agilent).

Le LightCycler™ 480 (Roche) a été utilisé et les réactions PCR ont été effectuées à l'aide du kit LightCycler® 480 Probes Master (Roche Molecular Biochemicals). Chaque PCR a été effectuée dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de LightCycler® 480 Probes Master, 2x conc, 2 µl de amorces-sonde MIX, 10x conc contenant les amorces sens et anti-sens (0.5 µM concentration finale) ainsi que la sonde Taqman (0.1µM concentration finale), et 8 µl de solution de cDNA dilué au 20ème. Après une étape de dénaturation de 10 min à 95°C, l'amplification a été effectuée à l'aide de 40 cycles d'un protocole de "touch-down" PCR (10 sec à 95°C, 29 sec d'hybridation à 68-58°C, suivi d'une extension de 11 sec à 72°C). A la fin de chaque cycle, la fluorescence libérée par la sonde d'hydrolyse Taqman a été mesurée.

15

Les combinaisons d'amorces nécessaires à la quantification du gène de référence HPRT1 et du gène d'intérêt LILRB2 sont décrites ci-dessous. Pour HPRT1, le n° d'accension Genbank est NM\_000194.2 et la région amplifiée est 630-788. Pour LILRB2, variant 1, le n° d'accension Genbank est NM\_005874.3 et la région amplifiée est 2006-2182 et pour le variant 2, le numéro d'accension Genebank est NM\_001080978.2 et la région amplifiée est 1791-1879.

20

LILRB2 :

25 Amorce sens 5'-->3' CCAGAGCCCACAGACAGAGG (SEQ ID NO :1)  
 Amorce anti-sens 5'-->3' TGTCTTCACGGCAGCATAGA (SEQ ID NO :2)  
 Sonde TaqMan GACTCCCACTCAGTAGAAG (SEQ ID NO :3)

HPRT1 : amplicon 158pb

30 Amorce sens 5'-->3' CCAAAGATGGTCAAGGTCGC (SEQ ID NO :4)  
 Amorce anti-sens 5'-->3' GACACAAACATGATTCAAATCC (SEQ ID NO :5)  
 Sonde TaqMan CAAGTTTGTGTAGGATATGCC (SEQ ID NO :6)

35

La quantité d'ARNm cible LILRB2 relative à la quantité d'ARNm du gène de référence HPRT1 a été analysée par la technique de quantification relative avec le LightCycler Relative Quantification Software (Roche Molecular Biochemicals). La "Second

Derivative Maximum Method" du logiciel LightCycler™ (Roche) a été utilisée pour déterminer automatiquement le Crossing Point (Cp) pour chaque échantillon. La valeur du Cp a été définie comme le nombre de cycles pour lequel la fluorescence était

5 significativement différente du bruit de fond.

Cinq dilutions en séries au 1/10 ont été réalisées en quadruplicate avec chaque standard afin de générer une courbe d'étalonnage exprimant le Cp en fonction du logarithme du nombre de copies. Les dilutions de standard ont été optimisées afin que

10 la courbe d'étalonnage couvre le niveau d'expression attendu pour le gène cible et le gène de référence. Les courbes standards relatives décrivant l'efficacité de PCR pour le gène cible et le gène de référence ont été générées et utilisées pour réaliser une quantification relative appelée CRNQ (calibrated normalized

15 relative quantities) décrite par Jan Hellemans *et al.* (qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 2007)

La figure 5 annexée montre la corrélation entre l'intensité de

20 fluorescence du probeset (207697\_x\_at) obtenue avec la plateforme Affymetrix et les mesures CNRQ obtenues en RT-qPCR sur la cohorte de découverte pour le gène LILRB2. Les résultats montrent une corrélation significative (0.81[0.72-0.86]) entre les résultats Affymetrix et ceux de RT-PCR quantitative, confirmant la

25 pertinence du gène.

Spearman coefficient correlation r	0,8075
Intervalle de confiance 95%	0,7254 to 0,8670
Spearman test significativité P value	< 0,0001

#### 30 **2.4 Validation biologique:**

Afin de valider l'association entre l'expression de LILRB2 et la prédiction de survie chez les patients en choc septique, l'expression des ARNm de LILRB2 a été mesurée par RT-PCR quantitative sur une cohorte de validation (incluant 262 patients

35 en choc septique, avec 172 survivants et 90 non survivants (décédés dans les 28 premiers jours) (cf. tableau 3)

La figure 6 présente les CNRQ de LILRB2 pour les patients survivants (S) et non survivants (NS).

5

Un modèle logistique a été utilisé pour décrire l'association entre LILRB2 et la probabilité de décès. Le modèle logistique décrit la probabilité de mourir avant le 28<sup>ème</sup> jour. La mesure d'association entre la probabilité de décès et la covariable est l'Odds Ratio (OR). Cette mesure d'association peut être interprétée comme un risque relatif. Par exemple, un OR = 2 pour le groupe 1 versus le groupe 2 signifie que la probabilité de décès pour les patients du groupe 1 est égal à 2 fois la probabilité de mourir pour les patients du groupe 2.

15

L'Odds Ratio pour un incrément de 1 point du CNRQ de LILRB2 est 0.47 (p=0.0028). L'Odds Ratio entre les patients présentant des valeurs de CNRQ pour LILRB2 = 1.3 (3ème quartile) et 0.5 (1<sup>er</sup> quartile) est 0.55. Ainsi, les patients avec un niveau d'expression de LILRB2 élevé ont une probabilité de décès significativement plus faible de décéder que les patients avec un niveau d'expression plus faible.

20

La figure 7 représente la courbe ROC de l'association entre les valeurs de LILRB2 et la probabilité de décès chez les patients en choc septique.

25

LILRB2 est également associé à la date de survie des patients en choc septique (et non seulement à la probabilité de décès dans les 28 premiers jours). La figure 8 représente la courbe de survie de Kaplan Meier pour les patients en choc septique à J1 présentant des valeurs de CNRQ pour LILRB2 au-dessus de la médiane (0,86) caractères gras et en dessous de la médiane en caractères normaux.

30

35

**REVENDICATIONS**

1. Procédé pour établir *in vitro* un pronostic de sévérité chez un patient en choc septique, comprenant les étapes suivantes:
- 5 (i) à partir d'un échantillon biologique provenant dudit patient, on mesure *in vitro* le niveau d'expression du produit d'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes *lilrb2* et *lilrb1*, (ii) on compare le niveau d'expression du produit d'expression dudit au moins un gène avec un niveau d'expression contrôle de bon pronostic de sévérité pour le produit d'expression du même gène, dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression dudit au moins un gène en-dessous dudit niveau d'expression contrôle est indicatif d'un mauvais pronostic de sévérité pour le patient.
- 10
- 15
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel
- (i) on mesure le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2*, (ii) on compare le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2* avec le niveau d'expression contrôle du gène *lilrb2*,
- 20 dans lequel le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2* du patient au-dessous du niveau d'expression contrôle est indicatif d'un mauvais pronostic pour le patient.
- 25
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel
- (i) on mesure le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2* et le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb1* du patient, (ii) on compare le niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilrb2* et du gène *lilrb1* du patient respectivement avec le niveau d'expression contrôle de chaque gène,
- 30 dans lequel un niveau d'expression du produit d'expression du gène *lilr2* et du gène *lilrb1* du patient au-dessous respectivement du niveau d'expression contrôle seuil prédéterminé de chaque gène est indicatif d'un mauvais pronostic pour le patient.
- 35

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel ledit échantillon biologique est choisi parmi le sang, le plasma, le sérum, la salive, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, le liquide pleural et le liquide péritonéal.

5

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le produit d'expression du gène est un ARN, de préférence un ARN messager ou un ADNc.

10

6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le produit d'expression est une protéine ou un polypeptide.

15

7. Procédé selon la revendication 5, dans lequel le niveau d'expression de l'ARN est déterminé à l'aide d'au moins une sonde d'hybridation spécifique du produit d'expression.

20

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le niveau d'expression de l'ARN est déterminé par une amplification enzymatique quantitative.

25

9. Procédé selon la revendication 6, dans lequel le niveau d'expression du polypeptide est déterminé par un dosage immunologique quantitatif.

30

10. Procédé pour réaliser *in vitro* un suivi d'un patient en choc septique, par mesure de l'évolution du niveau d'expression du produit d'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes *lilrb2* et *lilrb1* chez ledit patient, dans lequel

(i) on mesure le niveau d'expression dudit au moins un gène dans un échantillon du patient prélevé à J1,

(ii) on mesure le niveau d'expression dudit au moins un gène dans un échantillon du patient prélevé à Jx,

35

dans lequel une augmentation dudit niveau d'expression dudit au moins un gène entre J1 et Jx indique que le patient évolue vers un bon pronostic de sévérité.

11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel ledit niveau d'expression est mesuré par amplification quantitative.

5 12. Procédé selon la revendication 10, dans lequel le niveau d'expression est mesuré par un dosage immunologique quantitatif.

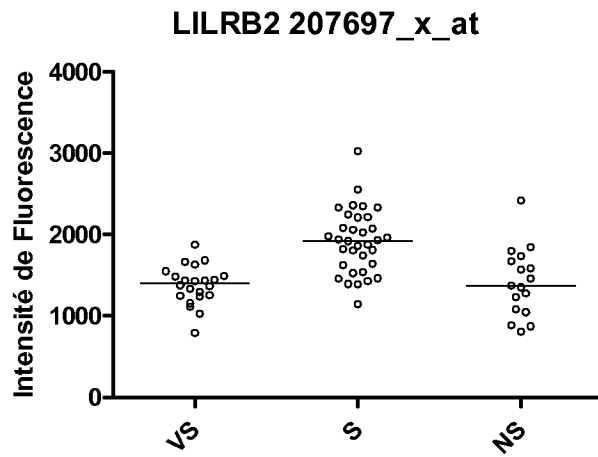


Figure 1A

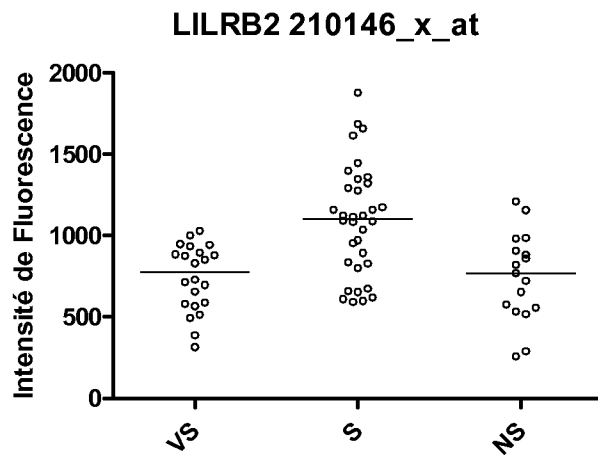


Figure 1B

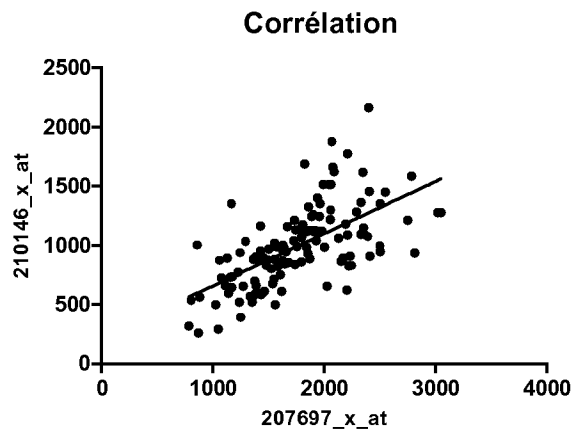


Figure 2

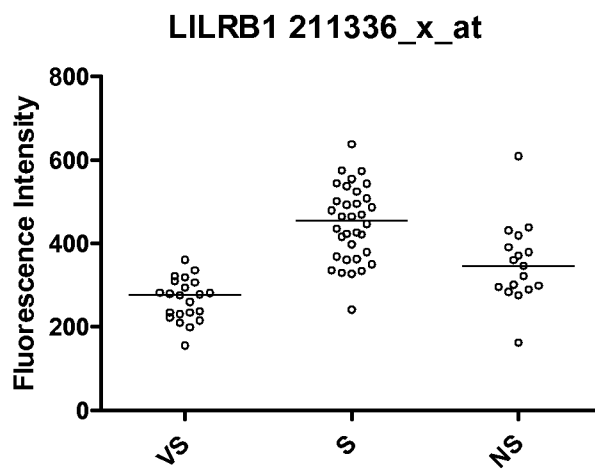
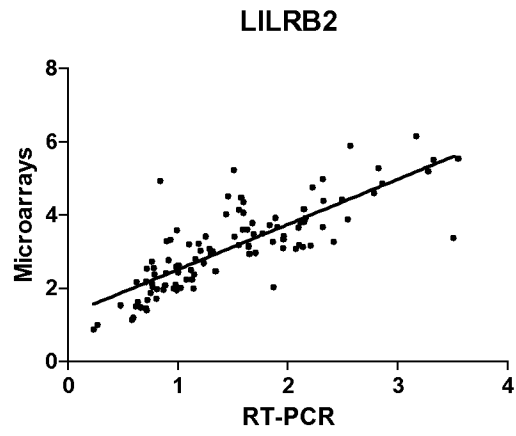
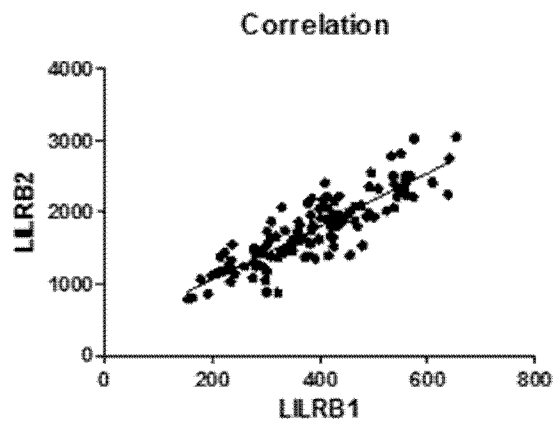


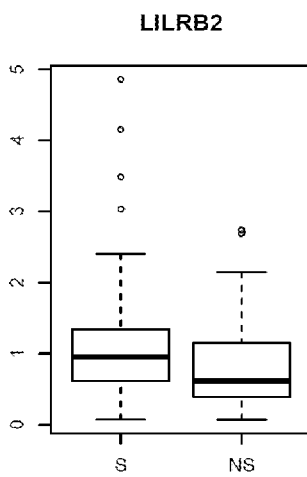
Figure 3



**Figure 4**



**Figure 5**



**Figure 6**

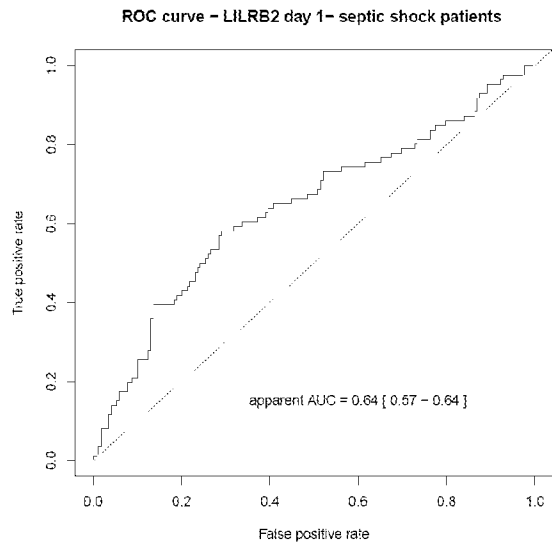


Figure 7

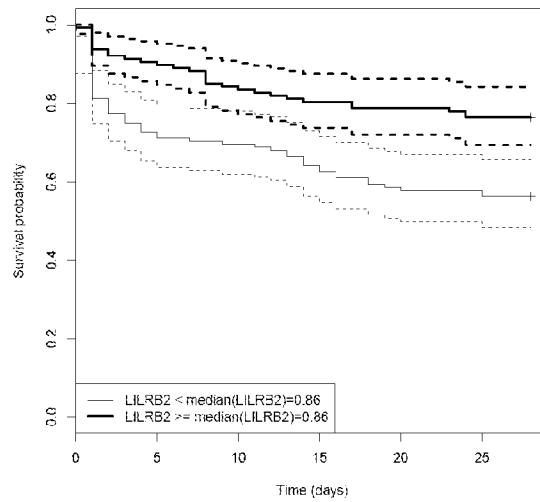


Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2014/050039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. C12Q1/68  
ADD.  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HECTOR R. WONG ET AL: "Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum*", CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 37, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1558-1566, XP055076786, ISSN: 0090-3493, DOI: 10.1097/CCM.0b013e31819fcc08 page 3, second paragraphe; matériel supplémentaire</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-12

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  25 March 2014	Date of mailing of the international search report  08/04/2014
--	--

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Hennard, Christophe
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2014/050039

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEPIN E J M ET AL: "FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HLA-F AND BINDING OF HLA-F TETRAMERSTO ILT2 AND ILT4 RECEPTORS", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 30, no. 12, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 3552-3561, XP001024681, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L page 3556, paragraphe 2.6	1-12
A	US 2004/241167 A1 (SUCIU-FOCA NICOLE [US] ET AL) 2 December 2004 (2004-12-02) revendication 66	1-12
Y	WO 2008/143890 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER [US]; WONG HECTOR R [US]) 27 November 2008 (2008-11-27) pages 3-6; page 11, [0032] revendications	1-12
Y	HECTOR R WONG: "Clinical review: Sepsis and septic shock - the potential of gene arrays", CRITICAL CARE, vol. 16, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 204-211, XP055076787, page 6, "Conclusion"	1-12
Y	THOMAS SHANLEY ET AL: "Genome-Level Longitudinal Expression of Signaling Pathways and Gene Networks in Pediatric Septic Shock", MOLECULAR MEDICINE, vol. 13, no. 9-10, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 495-508, XP055076790, ISSN: 1076-1551, DOI: 10.2119/2007-00065.Shanley page 496 ; "Results"	1-12
Y	WO 2004/087949 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; REINHART KONRAD [DE]; SALUZ) 14 October 2004 (2004-10-14) revendications ; pages 8-16	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2014/050039
---

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 2004241167	A1	02-12-2004	US	2004241167 A1	02-12-2004
			US	2009280109 A1	12-11-2009
-----					
WO 2008143890	A2	27-11-2008	US	2010279878 A1	04-11-2010
			WO	2008143890 A2	27-11-2008
-----					
WO 2004087949	A2	14-10-2004	EP	1611255 A2	04-01-2006
			EP	2366799 A2	21-09-2011
			US	2008070235 A1	20-03-2008
			WO	2004087949 A2	14-10-2004
-----					

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE                  INV. C12Q1/68                  ADD.</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)                  C12Q</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)                  EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>HECTOR R. WONG ET AL: "Genomic expression profiling across the pediatric systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock spectrum*",                  CRITICAL CARE MEDICINE,                  vol. 37, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01),                  pages 1558-1566, XP055076786,                  ISSN: 0090-3493, DOI:                  10.1097/CCM.0b013e31819fcc08                  page 3, second paragraphe; matériel supplémentaire</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-12
<p><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</p>		
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
<p>Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée</p> <p style="text-align: center;">25 mars 2014</p>		<p>Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">08/04/2014</p>
<p>Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale</p> <p style="text-align: center;">Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2                  NL - 2280 HV Rijswijk                  Tel. (+31-70) 340-2040,                  Fax: (+31-70) 340-3016</p>		<p>Fonctionnaire autorisé</p> <p style="text-align: center;">Hennard, Christophe</p>

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	LEPIN E J M ET AL: "FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF HLA-F AND BINDING OF HLA-F TETRAMERSTO ILT2 AND ILT4 RECEPTORS", EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, WILEY - V C H VERLAG GMBH & CO. KGAA, DE, vol. 30, no. 12, 1 janvier 2000 (2000-01-01), pages 3552-3561, XP001024681, ISSN: 0014-2980, DOI: 10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L page 3556, paragraphe 2.6	1-12
A	US 2004/241167 A1 (SUCIU-FOCA NICOLE [US] ET AL) 2 décembre 2004 (2004-12-02) revendication 66	1-12
Y	WO 2008/143890 A2 (CHILDRENS HOSP MEDICAL CENTER [US]; WONG HECTOR R [US]) 27 novembre 2008 (2008-11-27) pages 3-6; page 11, [0032] revendications	1-12
Y	HECTOR R WONG: "Clinical review: Sepsis and septic shock - the potential of gene arrays", CRITICAL CARE, vol. 16, 1 janvier 2012 (2012-01-01), pages 204-211, XP055076787, page 6, "Conclusion"	1-12
Y	THOMAS SHANLEY ET AL: "Genome-Level Longitudinal Expression of Signaling Pathways and Gene Networks in Pediatric Septic Shock", MOLECULAR MEDICINE, vol. 13, no. 9-10, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 495-508, XP055076790, ISSN: 1076-1551, DOI: 10.2119/2007-00065.Shanley page 496 ; "Results"	1-12
Y	WO 2004/087949 A2 (SIRS LAB GMBH [DE]; RUSSWURM STEFAN [DE]; REINHART KONRAD [DE]; SALUZ) 14 octobre 2004 (2004-10-14) revendications ; pages 8-16	1-12

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050039

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2004241167 A1	02-12-2004	US 2004241167 A1	02-12-2004
		US 2009280109 A1	12-11-2009
-----			
WO 2008143890 A2	27-11-2008	US 2010279878 A1	04-11-2010
		WO 2008143890 A2	27-11-2008
-----			
WO 2004087949 A2	14-10-2004	EP 1611255 A2	04-01-2006
		EP 2366799 A2	21-09-2011
		US 2008070235 A1	20-03-2008
		WO 2004087949 A2	14-10-2004
-----			