

(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 2014/118474 A1

(43) Date de la publication internationale
7 août 2014 (07.08.2014)

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/574 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2014/050176

(22) Date de dépôt international :
31 janvier 2014 (31.01.2014)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
13/50907 1 février 2013 (01.02.2013) FR

(71) Déposants : BIOMÉRIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy-l'Etoile (FR). CHU DE DIJON [FR/FR]; 1 Boulevard Jeanne d'Arc, BP77908, F-21079 Dijon Cedex (FR).

(72) Inventeurs : CHARRIER, Jean-Philippe; 28 rue Barthé-
lémy Thimonnier, F-69160 Tassin La Demi-Lune (FR).
CHOQUET-KASTYLEVSKY, Geneviève; 25 Montée
de la Garde, F-69340 Francheville (FR). FORTIN, Tan-
guy; 22 rue Germain, F-69006 Lyon (FR). LEMOINE, Jé-
rôme; 108 rue des Guillardes, F-69480 Lucenay (FR).
SALVADOR, Arnaud; 10 Avenue Roberto Rossellini, F-
69100 Villeurbanne (FR). FAIVRE, Jean; 5 rue Vannerie,
F-21240 Talant (FR).

(74) Mandataire : CABINET GERMAIN & MAUREAU;
B.P.6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (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).

Publiée :

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

(54) Title : METHOD FOR DETECTING A COLORECTAL CANCER

(54) Titre : PROCÉDÉ DE DETECTION D'UN CANCER COLORECTAL

(57) Abstract : The invention relates to a method for the in vitro diagnosis of colorectal cancer in a patient, comprising determining the presence of prolidase in a biological sample from the patient.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de diagnostic, in vitro, du cancer colorectal chez un patient, par la détermination de la présence de la prolidase, dans un échantillon biologique du patient.



WO 2014/118474 A1

PROCEDE DE DETECTION D'UN CANCER COLORECTAL

La présente invention concerne le diagnostic du cancer colorectal chez un patient humain.

5 Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique. Son incidence mondiale a été estimée à 1 234 216 nouveaux cas en 2008, contre 875 000 en 1996. En France, le nombre de nouveaux cas par an a été estimé en 2011 à 40 500. Le taux d'incidence standardisé au niveau mondial était en 2011 de 36,3 pour 100 000 hommes et de 24,7 pour 100 000 femmes.

10 Le cancer colorectal se situe, tous sexes confondus, au troisième rang des cancers les plus fréquents (deuxième cancer chez la femme et troisième chez l'homme). Le taux de survie à 5 ans, tous stades confondus, est voisin de 56%.

 D'après les estimations, le nombre de cancers colorectaux devrait
15 augmenter dans les prochaines années pour atteindre en France 45 000 nouveaux cas annuels en 2020. En 2008, le cancer colorectal était le cancer le plus fréquent dans une dizaine de pays européens incluant la République Tchèque, la Hongrie, la Slovaquie, le Danemark, la Norvège, l'Italie, les Pays-Bas, l'Allemagne, la Belgique et la Slovénie, avec un taux d'incidence
20 standardisé à la population mondiale variant entre 35,5 et 43 pour 100 000. La France fait partie des pays dans lesquels le risque de cancer colorectal est élevé, tout comme les autres pays d'Europe de l'Ouest, les USA, l'Australie et, plus récemment, le Japon. Seul un diagnostic précoce offre l'espoir d'un traitement curatif. Or, à l'heure actuelle, il n'existe aucun test sérologique de
25 dépistage, ni de diagnostic spécifique qui soit précoce.

 En France comme dans un certain nombre de pays d'Europe, la politique de dépistage de masse mise en place pour le cancer colorectal repose sur la réalisation de la recherche de sang dans les selles, par un test paraclinique biennal dans les selles (Faecal Occult Blood test, FOBT,
30 commercialisé par exemple sous le nom d'Hémoccult®). Cette technique a démontré son utilité clinique. Lorsqu'elle est utilisée tous les 2 ans chez les personnes âgées de 50 à 74 ans, elle peut réduire de 15 à 20% la mortalité par cancer colorectal. Pour cela, il faut que plus de la moitié de la population concernée participe régulièrement au dépistage et qu'une coloscopie soit faite
35 en cas de test positif, suivie éventuellement d'un traitement adapté.

Néanmoins, cette technique de dépistage souffre d'un certain nombre de handicaps :

- L'inconvénient majeur de ce test est sa sensibilité médiocre, tout spécialement pour les adénomes (lésion dysplasique pré-cancéreuse) qui, s'ils sont de grande taille ou en dysplasie sévère, conduiront dans 1 cas sur 10 au développement d'un cancer.
- L'apparition de sang dans les selles peut être liée à une affection non tumorale : hémorragies recto-coliques, hémorroïdes, fistules, ...
- Il est difficile d'obtenir une acceptabilité importante, car il s'agit d'un test dans les selles. De ce fait, un dépistage de masse efficace repose sur une organisation très structurée, avec mise en place de relances systématiques.
- Enfin les tests de détection de sang dans les selles basés sur un test au gaïac, de type Hemoccult®, ne sont pas spécifiques de l'hémoglobine humaine. Ils sont délicats à interpréter, et doivent donc être lus dans des centres spécialisés, par un personnel qualifié et compétent.

Des tests immunologiques spécifiques de l'hémoglobine humaine (OC–Sensor, FOB Gold, Magstream...) ont également été décrits. Ils constituent un progrès par rapport au test Hemoccult®, en permettant en particulier une augmentation de la sensibilité à la fois pour les cancers et pour les adénomes, mais avec une diminution de la spécificité, et en conséquence une augmentation du nombre de coloscopies inutiles. Toutefois il s'agit encore d'un test de détection de sang dans les selles avec les problèmes inhérents à de tels tests : détection de saignements non spécifiques, variation dans le temps des saignements, et surtout risque de mauvaise adhésion de certains patients réticents à réaliser un test dans les selles.

Aux Etats-Unis, il n'y a pas à proprement parler de politique de dépistage de masse systématique pour le cancer colorectal. Il existe par contre des recommandations pour réaliser un dépistage, par une ou plusieurs méthodes existantes. En particulier, en plus de la recherche de sang dans les selles (par un test immunologique ou au gaïac), on peut réaliser une sigmoïdoscopie associée ou non à un test FOBT, une coloscopie, une coloscopie virtuelle ou un lavement baryté à double contraste. Les nouvelles méthodes, comme la recherche de mutations ou de méthylation de l'ADN dans les selles, sont encore à l'étude.

La réalisation systématique d'une coloscopie après 50 ans permet en théorie de réduire la mortalité par cancer colorectal. C'est l'examen le plus

sensible et le plus spécifique pour la détection des cancers, qui permet de plus l'exérèse éventuelle de lésions précancéreuses. Mais l'acceptabilité de cet examen chez des sujets en bonne santé est trop faible pour qu'une politique de dépistage utilisant l'endoscopie diminue la mortalité (l'acceptabilité pour la colonoscopie dans les pays d'Europe ayant mis en place cette stratégie de dépistage est aux alentours de 2%). Il existe un risque non négligeable (1‰) de perforation et hémorragie du côlon et de décès (1/10 000), ainsi qu'un coût élevé pour la santé publique. De plus, la colonoscopie nécessite une préparation colique préalable très contraignante, qui explique en grande partie la faible adhésion.

Des marqueurs tumoraux dosables par immunoessais ont été décrits de longue date dans le cadre du cancer colorectal. Il s'agit notamment de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) et du CA19-9.

L'ACE est utilisé pour le suivi. Il ne peut pas être utilisé pour le dépistage, ni pour le diagnostic précoce du cancer colorectal car sa sensibilité et sa spécificité sont insuffisantes. En effet, ce marqueur est exprimé par d'autres types de cancers et dans des pathologies bénignes, et surtout il ne détecte qu'un petit nombre des cancers colorectaux.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence de façon surprenante un nouveau marqueur de cancer colorectal qui pallie les inconvénients précités, notamment le manque de spécificité et de sensibilité, et qui de ce fait est bon candidat tant pour le diagnostic que pour le dépistage du cancer colorectal même à des stades très précoces et jusqu'à un stade encore non cancéreux que représente l'adénome.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé de diagnostic ou de dépistage du cancer colorectal par la détermination de la présence de la prolidase chez un patient.

Le procédé de l'invention peut aussi être mis en œuvre pour le diagnostic précoce du cancer colorectal chez un patient, ou pour la détection des carcinomes au stade in situ (Tis T0) ou encore pour la détection d'un adénome colorectal.

Selon une première variante de l'un quelconque des procédés de l'invention ci-dessus, le procédé est appliqué au diagnostic, ou au diagnostic précoce, du cancer colorectal, *in vitro*, ou à la détection d'un adénome colorectal ou d'un carcinome in situ, *in vitro*, par la détermination de la présence de la prolidase dans au moins un échantillon biologique du patient.

Les procédés ci-dessus peuvent être mis en œuvre, sans pour autant y être limités, sur des patients suspectés de cancer, par exemple de cancer colorectal.

5 L'invention a aussi pour objet un procédé de dépistage, *in vitro*, d'un cancer colorectal dans une population par détermination de la présence de la prolidase dans un échantillon biologique d'un individu.

Par détermination de la présence de la prolidase, on comprend qu'on détecte la prolidase et/ou au moins un traceur représentatif de la prolidase. Ce traceur est caractéristique de la présence de la prolidase. Selon la teneur en
10 prolidase chez le patient ou dans l'échantillon biologique et selon la technique employée, la détection d'un traceur précité peut être plus pertinente que celle de la prolidase en soi. Ainsi, un traceur peut être choisi parmi les précurseurs de la prolidase, les métabolites de la prolidase, ou à une réponse immune due à la prolidase. Ainsi, un traceur de la prolidase est de préférence choisi parmi
15 des peptides, de préférence des mélanges de peptides de la prolidase ; des acides nucléiques, de préférence des ARN messagers ou une modification du gène codant pour la prolidase, comme une méthylation de son promoteur, ou une modification de l'acide nucléique conduisant à une modification de l'expression de la prolidase ; des anticorps reconnaissant spécifiquement la
20 prolidase et produits chez le patient en réponse à une présence de la prolidase, par réaction immunogénique.

Plus particulièrement, selon un procédé de diagnostic ou de diagnostic précoce, du cancer colorectal, ou de détection d'un adénome colorectal, ou de détection d'un carcinome in situ, de l'invention, on détecte la prolidase et/ou au
25 moins un traceur représentatif de la prolidase, dans ledit échantillon biologique.

Un procédé de l'invention peut en outre comprendre une mise en évidence d'une variation de l'expression de la prolidase. Avantageusement, on met en évidence une diminution de l'expression de la prolidase. Cette variation peut être observée par comparaison à une population de référence dite
30 contrôle, de patients non suspectés de CCR, par exemple des patients ayant eu une coloscopie qui s'est révélée normale, ou par comparaison à une valeur de référence prédéterminée.

De préférence, la variation est comparée à une population de référence, avec des échantillons de même origine, tels que définis ci-dessous.

35 L'invention concerne également l'utilisation d'un quelconque procédé ci-dessus, tant dans le diagnostic précoce, le dépistage, le suivi thérapeutique, le

pronostic, que dans le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

Par échantillon biologique, on entend tout échantillon susceptible de contenir la prolidase et/ou au moins un traceur représentatif de la prolidase.

5 Cet échantillon peut provenir d'un prélèvement de tout fluide biologique, comme le sang total, le sérum, le plasma, l'urine, le liquide céphalo-rachidien, les sécrétions organiques, la salive, les selles par exemple, ou d'un prélèvement tissulaire ou des cellules isolées. De préférence, l'échantillon est distant de la tumeur potentielle.

10 La détermination de la présence de la prolidase dans un échantillon biologique distant ou non de la tumeur permet alors de conclure à la pathologie recherchée. Un des avantages du procédé de l'invention réside donc en la possibilité d'utiliser un échantillon distant de la tumeur potentielle à titre d'échantillon de diagnostic, ce qui permet un diagnostic simple et non invasif
15 alors qu'un diagnostic tissulaire nécessite une biopsie prélevée de façon invasive. En effet, l'étude de marqueurs tissulaires, par exemple sur coupe de tissu (immunohistochimie), peut présenter un intérêt pronostique mais n'a aucun intérêt pour le dépistage ou le diagnostic précoce du cancer colorectal.

Un procédé de l'invention peut aussi être associé à la détermination de
20 la présence, en plus de la prolidase, d'au moins un autre marqueur. Avantageusement, cet autre marqueur est choisi parmi les marqueurs suivants :

- ACE; Aminoacylase 1; Apolipoprotéine A1; Apolipoprotéine A2; Beta 2 Microglobuline; CA242; CA50; CA72-2; CA19-9; Calgranuline C;
25 Calréticuline; CCSA-3 (colon cancer specific antigen) ; CCSA-4; CD24; CD26; Cripto-1; Cytokératine 20; Epithelial-Cadhérine; Ezrine; Galectine-3; GST Pi (GSTP1); HSP60; Intelectine-1; Intestinal Fatty Acid-Binding Protein; Keratine type I Cytoskeletal 18; Keratine type I Cytoskeletal 19; Keratine type II Cytoskeletal 8; Leucocyte Elastase
30 Inhibitor, associé ou non à la Protéinase 3 (PRN3) ; Liver Fatty Acid-Binding Protein; L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B (LDHB); Maspine; MIF; MUC5AC; Ostéopontine; Plastine-I; Protéasome 20S; (Pro)défensine-A5; (Pro)défensine-A6; Protéine Disulfide Isomérase (PDI); Pyruvate kinase M2-PK; Regenerating Islet-Derived Protein 3
35 Alpha; S100A8; S100A9; Testostérone; TIMP-1; Translationally-Controlled Tumor Protein; Tumor-Associated Calcium Signal

Transducer 1; Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1; Villine;
Vimentine; Heat Shock cognate 71 kDa (HSP71), BIP (ou GRP-78),
Peroxiredoxin-5, Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
(G3PDH) ; Alpha-Enolase ;

- 5 - ADN méthylé dans le sang, de préférence l'ADN méthylé du gène
AXL4 (Aristaless-like Homeobox-4 Gene Methylation) ou l'ADN méthylé
du gène Septin-9 ;
- des altérations spécifiques de fragments d'ADN dans les selles
comme des mutations spécifiques de l'ADN dans les selles ou des
- 10 altérations spécifiques du profil de méthylation de l'ADN dans les selles ;
- haptoglobine dans les selles ;
- hémoglobine humaine dans les selles.

Mieux encore, on détermine la présence, en plus de la prolidase,
d'associations de marqueurs précités. Comme cela sera illustré dans les

15 exemples, certaines associations sont avantageuses.

Ainsi, l'invention se rapporte aussi à un procédé précité selon lequel, on
détermine la présence de la prolidase et celle d'au moins les associations
suivantes de marqueurs :

- ACE et CA19-9,
- 20 LFABP et PDI,
- LFABP, CA19-9 et ACE,
- LFABP, ACE et Timp1,
- LFABP, ACE et M2PK,
- L-FABP, CA19-9, ACE et PDI
- 25 LFABP, ACE, M2PK et Timp1,
- LFABP, ACE, CA19-9 et PDI,
- LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9 et PDI,
- LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine et PDI,
- LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, G3PDH et PDI,
- 30 LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine et G3PDH,
- LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine, G3PDH et PDI.

L'invention est ci-après décrite plus en détails.

La prolidase, aussi appelée Proline dipeptidase, Xaa-pro dipeptidase,
35 Imidodipeptidase, Peptidase D, PEPD (Gene ID: 5184, Uniprot accession
number P12955, EC=3.4.13.9) est un membre de la famille des peptidases,

plus particulièrement des métallo-protéinases (matrix métallo protéine, MMP). C'est une exopeptidase manganèse dépendante, qui forme un homodimère qui hydrolyse les imidodipeptides ou les imidotripeptides qui comportent en C-terminal un résidu proline ou hydroxy-proline (X-Pro or X-Hyp, ou X représente n'importe quel acide aminé). Trouvée dans le plasma, elle permet la libération de la proline comme stade final du catabolisme protéique, et particulièrement du collagène, source la plus importante de ces imidodipeptides. Cette enzyme a un rôle important pour le recyclage de la proline, et son absence est un facteur limitant pour la production du collagène. Elle joue de ce fait un rôle important dans le remodelage et la croissance cellulaire.

Le gène de la prolidase (PEPD) est situé sur le chromosome 19 (localisation chromosomique 19q13.11) et code pour un polypeptide de 493 acides aminés avec un poids moléculaire de 54 kDa. La forme mature de l'enzyme est un dimère composé de 2 sous-unités identiques. Le gène présente de nombreux polymorphismes alléliques, sans qu'il y ait d'impact sur l'activité enzymatique. Des mutations rares dans le gène, trouvées sur les exons 7, 8, 12 et 14 sont responsables de la déficience en prolidase, qui est une pathologie caractéristique par l'excrétion urinaire d'une grande quantité de peptides contenant de la proline (imidopeptidurie), d'atteintes cutanées, d'infections récurrentes, de retard mental et de la présence à une concentration élevée de dipeptides à proline dans le plasma.

Dans les articles de la littérature, les taux de prolidase sont obtenus par mesure de l'activité enzymatique de la protéine, par mesure de la quantité de proline relarguée par minute et par milligramme de protéine [<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Detection/colorectal-screening> ; *Screening for Colorectal Cancer: A Targeted, Updated Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2008;149(9):638-658*].

Ainsi, l'activité enzymatique de la prolidase a été évaluée dans le sérum de patientes porteuses d'un cancer de l'endomètre, atteintes d'un cancer de l'ovaire ou d'un cancer du sein et dans tous les cas, l'activité enzymatique était plus importante chez ces patientes que chez des sujets contrôles.

L'activité enzymatique de la prolidase a été évaluée dans ces différents cancers dans le sérum (comparaison à d'autres pathologies) ou dans le tissu (comparaison du tissu cancéreux par rapport au tissu « sain »). L'expression de la prolidase a été évaluée dans les tissus de cancer du poumon [Karna E,

Surazynski A, Palka J, *Int J Exp Pathol.* 2000 Oct;81(5):341-7. Collagen metabolism disturbances are accompanied by an increase in prolidase activity in lung carcinoma planoepitheliale] et de l'estomac [Guszczyn T, Sobolewski K., *Deregulation of collagen metabolism in human. stomach cancer. Pathobiology* 5 2004;71:308–13] de façon semi-quantitative, par Western Blot, et était augmentée. Par contre, l'expression de la prolidase n'a jamais été mesurée à distance de la tumeur, comme par exemple dans le sang ou le sérum, quelle que soit la pathologie associée à son expression. De plus, dans un tel fluide, il n'y a pas forcément de parallèle entre l'activité enzymatique d'une protéine et son expression. Il n'y a pas non plus forcément de corrélation entre l'expression tissulaire d'une protéine et la mesure des taux d'expression de cette même protéine à distance de la tumeur.

Les marqueurs dont la présence peut être déterminée, en plus de la prolidase, selon des variantes des procédés de l'invention sont ci-après décrits plus en détails.

Il convient de préciser que les marqueurs ci-après, à savoir Alpha-Enolase, G3PDH, BIP (GRP78), HSP71 (HSC70), Peroxy-5 et PDI, constituent en tant que tels des marqueurs du cancer colorectal et qu'ils peuvent, seuls ou en combinaison les uns avec les autres et/ou avec la prolidase et/ou tout autre marqueur, être utilisés dans un procédé de diagnostic du cancer colorectal chez un patient. A cet effet, on détermine chez ledit patient la présence d'au moins l'un des marqueurs ci-dessus. Selon une variante de ce procédé, on diagnostique, *in vitro*, un cancer colorectal chez un patient, par détermination de la présence d'au moins l'un de ces marqueurs dans un échantillon biologique du patient. Comme la prolidase, la détermination de la présence de ces marqueurs, seuls ou en combinaison entre eux, avec la prolidase et/ou tout autre marqueur, permet de diagnostiquer précocement un cancer colorectal invasif ou de détecter un adénome colorectal, ou de déterminer la présence d'un carcinome in situ, T0, chez un patient ou dans un échantillon biologique d'un patient, *in vitro*.

Les scores individuels de chacun des marqueurs précités pour la détection du CCR sont présentés dans l'exemple 6.

La définition d'échantillon biologique donnée précédemment en référence à la prolidase, s'applique à tout marqueur précité.

La détermination de la présence de ces marqueurs, seuls ou en combinaison, peut être mise en œuvre par toute méthode bien connue de

l'homme du métier, et en particulier celles exposées dans la présente description en référence à la prolidase.

Ainsi comme pour la prolidase, la détermination de leur présence peut résulter d'une détection directe de ces marqueurs et/ou d'une détection d'au moins un des traceurs représentatifs de ces marqueurs, tels que ceux choisis parmi les précurseurs de ces marqueurs, les métabolites de ces marqueurs, les produits de dégradation ou de clivage de ces marqueurs, et toute molécule associée à au moins une activité de ces marqueurs, par exemple une réponse immune. Ainsi, un traceur d'un tel marqueur est de préférence choisi parmi des peptides, de préférence des mélanges de peptides tels que ceux décrits ci-après pour chacun des marqueurs ; des acides nucléiques, de préférence des ARN messagers ou une modification du gène codant pour ledit marqueur, comme une méthylation de son promoteur, ou une modification de l'acide nucléique conduisant à une modification de l'expression du marqueur ; des anticorps reconnaissant spécifiquement ce marqueur et produits chez le patient en réponse à une présence de ce marqueur, par réaction immunogénique.

Selon une variante du procédé comprenant la détermination de la présence de plusieurs marqueurs, telle que décrit précédemment, les marqueurs, et/ou leurs traceurs, peuvent être détectés dans le même échantillon biologique, dans des échantillons biologiques différents mais provenant d'un fluide ou d'un tissu de même nature, dans des échantillons biologiques différents et de nature différente.

Parmi ces marqueurs, ceux décrits plus en détail ci-dessous sont des marqueurs préférés :

Alpha-Enolase

L'Alpha-Enolase, aussi appelée 2-phospho-D-glycerate hydro-lyase, C-myc promoter-binding protein, Enolase 1 ou Non-neural enolase (ENOA_HUMAN, Gene ID: ENO1, Uniprot accession number P06733, EC=4.2.1.11) appartient à la famille des Enolases. C'est une enzyme multifonctionnelle, qui joue un rôle dans la glycolyse, et intervient dans de nombreux processus comme le contrôle de la croissance, la tolérance à l'hypoxie et les réponses allergiques. C'est en particulier une enzyme métabolique impliquée dans la synthèse du pyruvate. Elle stimule la production d'immunoglobulines. Elle peut par ailleurs servir de récepteur et d'activateur du plasminogène à la surface de plusieurs types cellulaires, comme les leucocytes et les neurones. En tant que récepteur du plasminogène, elle permet l'action de la plasmine et

la dégradation de la matrice extra-cellulaire dans les processus tumoraux. Elle favoriserait l'invasion tumorale, et pourrait avoir une valeur diagnostique et pronostique.

Le gène de l'Alpha-Enolase code pour un polypeptide de 434 acides aminés avec un poids moléculaire de 47 kDa. C'est une protéine de 493 acides aminés. L'Enolase est chez les mammifères composée de 3 sous-unités qui peuvent former des homo ou des hétéro-dimères. Leur association est spécifique des sous-types cellulaires et du stade de développement. Elle est localisée dans le cytoplasme, avec une possible translocation à la membrane plasmique. Les homodimères alpha/alpha sont exprimés dans la plupart des tissus adultes et embryonnaires. Il a été montré que l'Alpha-Enolase est inductible en cas de lymphome, et est up-régulée en réponse à une infection par entérovirus 71. L'hétérodimère alpha/gamma est un marqueur d'hypoxie cérébrale après arrêt cardiaque. Un variant d'épissage du gène donne une isoforme plus courte qui peut lier le promoteur c-myc et fonctionner comme un suppresseur de tumeur. Des anticorps dirigés contre l'Alpha-Enolase ont été retrouvés dans les sérums de patients atteints de cancers, accompagnés d'une « rétinopathie associée au cancer » (CAR, pathologie paranéoplasique surtout associée au cancer du poumon à petites cellules). Le gène ENO1 a été montré comme ayant un rôle central de « nœud » de connexion entre différents gènes au cours des processus cancéreux. L'Alpha-Enolase semble avoir un rôle dans la transformation cellulaire et l'invasion via l'induction de l'expression de CCL20, et sa surexpression est liée au pronostic dans les cancers de la tête et du cou. La surexpression de l'Alpha-Enolase a été rapportée comme corrélée à la progression des tumeurs, en particulier du poumon et du neuroblastome, et elle a été rapportée dans l'hépatocarcinome, et analysée dans des lignées coliques.

L'expression tissulaire de l'Alpha-Enolase a été étudiée dans The Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000074800>) à l'aide de l'anticorps CAB018614 (la confiance dans les marquages est incertaine d'après les critères de contrôle qualité du site). L'expression de l'Alpha-Enolase est cytoplasmique, et ponctuellement nucléaire. Elle est modérée dans les tissus digestifs normaux dans plus de 75% des cas, de même dans les tissus colorectaux tumoraux.

Par contre, le dosage sérique de l'Alpha-Enolase n'a jamais été décrit pour le diagnostic, ni le suivi du cancer colorectal, ni pour son dépistage ou l'évaluation du pronostic.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence que les taux de l'Alpha-Enolase dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction Monitoring, sont augmentés par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe les scores obtenus pour l'Alpha-Enolase avec ceux obtenus pour la prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

G3PDH

N° Swiss Prot	Nom de la protéine	Noms synonyme de la protéine	Noms du gène
P04406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH	GAPDH	GAPDH GAPD

C'est une protéine de 335 acides aminés, de 36 KDalton.

La GAPDH est un homotétramère qui appartient à la famille des glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, et a à la fois des activités glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et nitrosylase, et joue un rôle respectivement dans la glycolyse et dans les fonctions nucléaires. Elle permet de moduler l'assemblage du cytosquelette, et stimule la liaison de CHP1 aux microtubules, et se lie elle-même aux microtubules.

Par ailleurs, la GAPDH est une enzyme clé pour la glycolyse, qui catalyse la première étape en convertissant le D-glyceraldéhyde 3-phosphate (G3P) en phospho-D-glyceroyl phosphate, avec du NAD comme substrat.

Au niveau cellulaire, elle est exprimée à la fois dans le cytoplasme, le noyau et à la membrane, et est liée au cytosquelette.

Le gène de la GAPDH est connu comme étant un gène normalisateur dans des analyses semi-quantitatives dans les expériences de Northern Blot ou de PCR. Il est de ce fait utilisé comme standard interne dans de nombreuses publications concernant la quantification de marqueurs de type ARNm, car il est connu pour avoir un taux d'expression stable. Contre toute attente, il a été montré que l'expression de la GAPDH est augmentée dans les

tissus de cancer colorectal par rapport aux tissus sains adjacents, et de même dans les lignées cancéreuses. Cette expression élevée pourrait jouer un rôle dans le développement du cancer et l'apparition de métastases, et la GAPDH pourrait être une cible thérapeutique. Mais d'autres auteurs ont étudié la

5 régulation par l'hypoxie de la GAPDH, comme la GAPDH est utilisée comme gène de standardisation. Il apparaît que la GAPDH n'est pas régulée par l'hypoxie dans des lignées d'hépto-carcinome, de cancer du poumon ni de cancer du côlon, et ne semble donc pas être une bonne cible thérapeutique.

La GAPDH n'a jamais été montrée comme marqueur diagnostique du

10 cancer colorectal.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence que les taux de GAPDH dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction Monitoring, sont augmentés par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe les

15 scores obtenus pour la GAPDH avec ceux obtenus pour la prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

BIP

N° Swiss Prot	Nom de la protéine	Noms synonyme de la protéine	Noms du gène
P11021	BiP GRP-78 Immunoglobulin heavy chain-binding protein	78 kDa glucose-regulated protein Heat shock 70 kDa protein 5 Endoplasmic reticulum luminal Ca(2+)-binding protein	HSPA5 GRP78

20 C'est une protéine de 654 acides aminés, de 72.3 KDalton ; elle appartient à la famille des Heat Shock protein 70.

Elle possède un rôle probable pour faciliter l'assemblage de complexes protéiques multimériques dans le réticulum endoplasmique, et joue un rôle comme auto-antigène dans la polyarthrite rhumatoïde.

25 La GRP78 fait partie d'un grand complexe de protéines chaperones comprenant JB11, HSP90B1, HYOU, PDIA2, PDIA4, PDIA6, PPIB, SDF2L1, UGT1A1. Comme protéine chaperone, elle a un rôle anti-apoptotique, et peut se lier au calcium. La GRP78 favorise la prolifération cellulaire, la survie, l'apparition de métastases et la résistance aux chimiothérapies. Elle pourrait

30 avoir un rôle comme cible thérapeutique. Il a été suggéré récemment que le niveau d'expression tissulaire de la GRP78, tout comme la présence d'auto-

anticorps dans le sérum des patients, pouvait servir à stratifier les patients et prévoir la réponse au traitement [Mintz PJ, Kim J, Do KA, et al. *Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. Nat Biotechnol* 2003;21:57–63; Gonzalez-Gronow M, Cuchacovich M, Llanos C, Urzua C, Gawdi G, Pizzo SV. *Prostate cancer cell proliferation in vitro is modulated by antibodies against glucose-regulated protein 78 isolated from patient serum. Cancer Res* 2006;66:11424–31]. Des auto-Ac anti-GRP78 ont été trouvés dans 3 cancers du côlon sur 15, chez 17/60 des cancers gastriques, et absents chez les sujets sains (0/20).

La GRP78 avait été identifiée en 1997 lors d'une analyse en électrophorèse bi-dimensionnelle de la lignée cellulaire de cancer colique LIM 1215 [Ji H, Reid GE, Moritz RL, Eddes JS, Burgess AW, Simpson RJ, *Electrophoresis*. 1997 Mar-Apr;18(3-4):605-13. *A two-dimensional gel database of human colon carcinoma proteins.*], sans qu'on puisse en conclure des propriétés diagnostiques. Elle est exprimée de façon relativement ubiquitaire à la surface des cellules. Il a été par ailleurs montré que des carcinogènes comme la nicotine impactent le promoteur de la GRP78, reflet du stress induit sur le réticulum endoplasmique [Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. Crowley-Weber CL, Dvorakova K, Crowley C, Bernstein H, Bernstein C, Garewal H, Payne CM. *Chem Biol Interact*. 2003 Mar 6;145(1):53-66]. La GRP78 et l'HSP90 ont été montrées comme étant constitutivement exprimées dans des lignées de cancers gastro-intestinaux [Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM Jr, Evers BM. *Surg Oncol*. 1995 Aug;4(4):197-203], avec une expression différentielle dans les cancers gastriques, pancréatiques et coliques, et peut être comme ayant un rôle protecteur.

Xioming Xing et al. ont étudié l'expression de la GRP78 au niveau protéique et de l'expression d'ARNm dans les tissus coliques. Alors qu'il ne semble pas y avoir de différence au niveau de l'expression de l'ARNm de la GRP78, la protéine est surexprimée au cours de la carcinogénèse colique, mais sans corrélation avec la différenciation dans les tissus cancéreux [Xing X, Lai M, Wang Y, Xu E, Huang Q. *Clin Chim Acta*. 2006 Feb;364(1-2):308-15. *Epub* 2005 Sep 21]; selon les mêmes auteurs, cette surexpression semble

associée avec la prolifération des cellules cancéreuses et leur résistance à l'apoptose [Xing X, Li Y, Liu H, Wang L, Sun L. *Acta Histochem.* 2011 Dec;113(8):777-82. doi: 10.1016/j.acthis.2010.11.006. Epub 2010 Dec 14].

Dans la demande de brevet WO2004/005928A2, sont décrits des
5 changements d'expression de diverses protéines, dont la GRP78 pour la détection de cellules cancéreuses non dépendantes des stéroïdes.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence de façon inattendue que les taux de GRP78 dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction
10 Monitoring, sont diminués par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe les scores obtenus pour la GRP78 avec ceux obtenus pour la prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

HSP71 (HSC70)

15

N° Swiss Prot	Nom de la protéine	Synonymes de la protéine	Nom du gène
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein	Heat shock 70 kDa protein 8	HSPA8 HSC70, HSP73, HSPA10

La protéine Heat shock cognate 71 kDa (HSC70) appartient à la famille des HSP70 qui comprend une douzaine de protéines ayant un poids moléculaire entre 66 et 78kDa. Les HSP70 sont des protéines chaperonnes,
20 c'est à dire des molécules qui, en se liant temporairement à une protéine nouvellement formée au sein d'une cellule vivante, lui permettent d'acquérir sa forme caractéristique.

Chaque protéine HSP70 possède une structure commune qui contient deux domaines : une extrémité amino-terminale hautement conservée à
25 activité ATPase et une extrémité carboxy-terminale moins conservée liant des peptides. En coopération avec les autres chaperonnes, les HSP70s stabilisent les protéines pré-existantes contre l'agrégation et modifient le repliement des polypeptides nouvellement traduits dans le cytosol ainsi qu'à l'intérieur des organelles.

30 La longueur de la séquence de HSC70 est de 646 AA, et elle fait 70,9 KDalton. HSC70 est rapidement transloquée du cytoplasme vers le noyau, et particulièrement vers le nucléole, sous l'effet de la hausse de température.

Récemment, une surexpression dans le cancer colorectal de la protéine HSC70 a été mise en évidence dans une étude utilisant l'électrophorèse bi-dimensionnelle de tissus micro-disséqués, sans indication d'un possible rôle diagnostique. Une autre étude retrouve des résultats similaires, avec une

5 expression augmentée de HSC70 dans les tissus tumoraux coliques, associée à une expression augmentée de HSP90, sans qu'il y ait de corrélation avec le stade du cancer.

Par contre, le dosage sérique de l'HSP71 (HSC70) n'a jamais été décrit pour le diagnostic ni le suivi du cancer colorectal, ni pour son dépistage ou

10 l'évaluation du pronostic. La Demanderesse a maintenant mis en évidence de façon inattendue que les taux de HSP71 dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction Monitoring, sont augmentés par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe les scores obtenus pour l'HSP71 avec ceux obtenus pour la

15 prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

Peroxy-5

N° Swiss Prot	Nom de la protéine	Noms synonyme de la protéine	Noms du gène
P30044	Peroxiredoxin-5, mitochondrial Alu corepressor 1 Antioxidant enzyme B166 Peroxiredoxin V Thioredoxin peroxidase PMP20 Thioredoxin reductase	Prx-V Peroxy-5	PRDX5 ACR1

20 La peroxyredoxin-5 est une protéine de 214 acides aminés, de 22 KDaltons. Elle appartient à la famille des peroxyredoxines 2. Elle est de localisation cytoplasmique ou mitochondriale.

Elle est impliquée dans les voies d'oxydation/réduction (système redox) intra-cellulaire, en réduisant les peroxydes d'hydrogène.

25 Elle a été décrite chez la souris comme une peroxidase pouvant inhiber l'apoptose induite par p53.

Elle n'a jamais été décrite comme outil diagnostique pour le cancer colorectal.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence que les taux de Peroxy-5 dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction Monitoring, sont augmentés par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe
 5 les scores obtenus pour la Peroxy-5 avec ceux obtenus pour la prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

PDI

N° Prot	Swiss	Nom de la protéine	Synonymes	Nom du gène
P07237		Protein disulfide-isomerase	EC 5.3.4.1 PDI Prolyl 4-hydroxylase subunit beta Cellular thyroid hormone-binding protein p55	P4HB PDI, PDIA1, PO4DB

10

La PDI est une protéine multi-fonctionnelle qui catalyse la formation, la rupture et le réarrangement des ponts disulfures intramoléculaire. A la surface des cellules elle agit en tant que réductase et clive les ponts disulfures des protéines attachées aux cellules. A l'intérieur des cellules, c'est une molécule
 15 soluble localisée dans la lumière du Réticulum Endoplasmique, où elle forme et réarrange les ponts disulfures des protéine néosynthétisées. C'est une protéine multi-fonctionnelle avec 2 domaines catalytiques de type Thioredoxine avec un motif CXXC caractéristique. A haute concentration la PDI fonctionne comme une protéine chaperonne qui inhibe l'agrégation des protéines mal repliées. A
 20 faible concentration, elle a un rôle antagoniste et facilite l'agrégation.

La PDI forme également la sous unité structurale de différentes enzymes, comme la Prolyl Hydroxylase qui catalyse l'hydroxylation des résidus proline des chaînes pro-alpha du pro-collagène.

La PDI a été trouvée comme particulièrement abondante à la surface de
 25 cellules cancéreuses. Des modifications post traductionnelles ont été observées en cas de cancer du côlon par T. Tomonaga et al. [*T. Tomonaga et al. Clin. Canc. Reas. 2004, 2007-2014*]. R. Stierum et al. [*R. Stierum et al. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 73-91*] ont montré que la différenciation de la lignée cellulaire du cancer colique Caco-2 s'accompagnait d'une
 30 augmentation de la concentration cellulaire de PDI.

La Demanderesse a maintenant mis en évidence que les taux de PDI dans les sérums des patients, dosés par exemple par une technologie de spectrométrie de masse de type Multiple Reaction Monitoring, sont diminués par rapport à ceux de sujets contrôles. Et que si l'on associe les scores
5 obtenus pour la PDI avec ceux obtenus pour la prolidase, on améliore le diagnostic du cancer colorectal.

Les différents procédés objets de l'invention et définis précédemment peuvent être mis en œuvre par toute technique appropriée et bien connue de
10 l'homme du métier.

Ainsi, on peut doser la prolidase par une technique quantitative de spectrométrie de masse, ou par toute technique immunologique, ou une combinaison des deux techniques. On peut utiliser par exemple la technique LC-MRM-MS qui combine la chromatographie liquide et la spectrométrie de
15 masse en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

On entend par détermination de la présence de la prolidase soit la détection directe de la prolidase, soit la culture de cellules ou d'un tissu sensibles à l'activité de la prolidase, ou tout autre procédé de détermination de la présence d'une protéine dans un échantillon, connu de l'homme du métier.
20 Comme dit précédemment, la méthode de détermination de la présence de la prolidase objet de la présente invention, s'applique également aux méthodes de détermination de la présence des marqueurs choisis parmi Alpha-Enolase, G3PDH, BIP, HSP71, Peroxy-5, PDI.

La détermination de la présence de la prolidase par détection directe de
25 la prolidase constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Par détection directe de la prolidase, on entend la mise en évidence de la prolidase elle-même dans l'échantillon biologique.

La détection directe de la prolidase dans l'échantillon biologique peut être mise en œuvre par tout moyen connu de l'homme du métier, comme par
30 exemple par test immunologique ou par spectrométrie de masse, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Le test immunologique peut être tout test largement connu de l'homme du métier impliquant des réactions immunologiques, à savoir des réactions entre la prolidase et un partenaire de liaison spécifique de la prolidase.

35 Les partenaires de liaison spécifiques de la prolidase sont tout partenaire susceptible de se lier à la prolidase. A titre d'exemple, on peut citer

les anticorps, les fractions d'anticorps, les récepteurs, les mimotopes, les anticorps synthétiques, les anticorps recombinants, les aptamères et toute autre molécule capable de se lier à la prolidase.

Les anticorps partenaires de liaison sont par exemple soit des anticorps
5 polyclonaux, soit des anticorps monoclonaux, ou encore des analogues d'anticorps et en particulier les protéines d'affinité aux propriétés compétitives connues sous la dénomination Nanofitines.

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec de la prolidase, suivie de la récupération des anticorps recherchés
10 sous forme purifiée, par prélèvement du sérum dudit animal, et séparation desdits anticorps des autres constituants du sérum, notamment par chromatographie d'affinité sur une colonne sur laquelle est fixé un antigène spécifiquement reconnu par les anticorps, notamment la prolidase. Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par la technique des hybridomes
15 dont le principe général est rappelé ci-après.

Dans un premier temps, on immunise un animal, généralement une souris (ou des cellules en culture dans le cadre d'immunisations *in vitro*), avec de la prolidase, dont les lymphocytes B sont alors capables de produire des anticorps contre ledit antigène. Ces lymphocytes producteurs d'anticorps sont
20 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
25 conduisant à la production d'un anticorps monoclonal dont les propriétés de reconnaissance vis-à-vis de la prolidase 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
30 chromatographie d'affinité décrite ci-dessus.

Les anticorps monoclonaux peuvent être également des anticorps recombinants obtenus par génie génétique, par des techniques bien connues de l'homme du métier.

Des exemples d'anticorps anti-prolidase sont connus et sont disponibles
35 notamment dans le catalogue de Abnova, et de USCN Life Science Inc.

Les partenaires de liaison spécifiques de la prolidase pourront être marqués pour la révélation de la liaison prolidase/partenaire de liaison lorsque le partenaire de liaison est utilisé comme réactif de détection, et donc pour la détection directe de la prolidase dans l'échantillon biologique.

5 Par marquage des partenaires de liaison, on entend la fixation d'un marqueur capable de générer directement ou indirectement un signal détectable. Une liste non limitative de ces marqueurs consiste en :

- les enzymes qui produisent un signal détectable par exemple par colorimétrie, fluorescence, luminescence, comme la peroxydase de raifort, la
10 phosphatase alcaline, la α -galactosidase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase,
- les chromophores comme les composés fluorescents, luminescents, colorants,
- les molécules radioactives comme le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^{125}I , et
15 • les molécules fluorescentes telles que l'alexa ou les phycocyanines,
- Des acides nucléiques qui peuvent ensuite être amplifiés pour obtenir une augmentation du signal.

Des systèmes indirects peuvent être aussi utilisés, comme par exemple des ligands capables de réagir avec un anti-ligand. Les couples ligand/anti-
20 ligand sont bien connus de l'homme du métier, ce qui est le cas par exemple des couples suivants : biotine/streptavidine, haptène/anticorps, antigène/anticorps, peptide/anticorps, sucre/lectine, polynucléotide/complémentaire du polynucléotide. Dans ce cas, c'est le ligand qui porte le partenaire de liaison. L'anti-ligand peut être détectable directement
25 par les marqueurs décrits au paragraphe précédent ou être lui-même détectable par un ligand/anti-ligand.

Ces systèmes indirects de détection peuvent conduire, dans certaines conditions, à une amplification du signal. Cette technique d'amplification du signal est bien connue de l'homme du métier, et l'on pourra se reporter aux
30 demandes de brevet antérieures FR2781802A1 ou WO95/08000A2 de l'une des Demanderesses ou à l'article de J. Chevalier et al. [*J. Chevalier, J. Yi, O. Michel, et XM Tang, J. Histochem. Cytochem. 45 : 481-491, 1997*].

Selon le type de marquage utilisé, l'homme du métier ajoutera des réactifs permettant la visualisation du marquage.

35 A titre d'exemple de tests immunologiques tels que définis ci-dessus, on peut citer les méthodes « sandwich » telles qu'ELISA, IRMA et RIA, les

méthodes dites de compétition et les méthodes d'immunodétection directe comme l'immunohistochimie, l'immunocytochimie, le Western-blot et le Dot-blot. On peut également utiliser des méthodes dites « digitales » pour augmenter la sensibilité de détection, en permettant de détecter des molécules uniques.

5 Dans le cas des méthodes dites de compétition, la prolidase est marquée comme décrit précédemment pour le partenaire de liaison.

Des exemples d'immunoessais sous forme de kits commerciaux peuvent être trouvés : par exemple la prolidase pourrait également être dosée à l'aide des tests en format microplaque comme les kits commercialisés par la société
10 USCN Life science Inc (ELISA Kit for Peptidase D, ref 81011). Ou à l'aide des couples d'anticorps commercialisés par la société Abnova (PEPD Matched Antibody Pair, Catalog # : H00005184-AP11).

La spectrométrie de masse peut également être utilisée pour la détection directe de la prolidase dans l'échantillon biologique. Le principe de la
15 spectrométrie est largement connu de l'homme du métier et est décrit par exemple dans Patterson, S., 2000, Mass spectrometry and proteomics. Physiological Genomics 2, 59-65.

Pour ce faire, l'échantillon biologique préalablement traité ou non est passé dans un spectromètre de masse et on compare le spectre obtenu avec
20 celui de la prolidase. Un exemple de traitement préalable de l'échantillon consiste à le faire passer sur un support d'immunocapture, comportant un des partenaires de liaison de la prolidase, par exemple un anticorps dirigé contre la prolidase. Un autre exemple de traitement préalable de l'échantillon peut être le pré-fractionnement de l'échantillon biologique, afin de séparer entre elles les
25 protéines de l'échantillon. Dans des techniques bien connues de l'homme du métier, on peut par exemple tout d'abord dépler les protéines majoritaires de l'échantillon.

La spectrométrie de masse à mettre en œuvre dans le procédé de l'invention est largement connue de l'homme du métier comme un outil
30 puissant pour l'analyse et la détection de différents types de molécules. De façon générale, tout type de molécule pouvant être ionisée peut être détecté en fonction de sa masse moléculaire à l'aide d'un spectromètre de masse. Selon la nature de la molécule à détecter, d'origine protéique ou métabolique, certaines technologies de spectrométrie de masse peuvent être plus adaptées.
35 Néanmoins, quelle que soit la méthode de spectrométrie de masse utilisée pour la détection, cette dernière comprend une étape d'ionisation de la

molécule cible en ions dits moléculaires, dans le cas présent une étape d'ionisation des marqueurs de caractérisation, et une étape de séparation des ions moléculaires obtenus en fonction de leur masse.

Tous les spectromètres de masse comportent donc :

- 5 i) une source d'ionisation destinée à ioniser les marqueurs présents dans l'échantillon à analyser, c'est-à-dire à conférer une charge positive ou négative à ces marqueurs;
- ii) un analyseur de masse destiné à séparer les marqueurs ionisés, ou ions moléculaires, en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z) ;
- 10 iii) un détecteur destiné à mesurer le signal produit soit directement par les ions moléculaires, soit par des ions produits à partir des ions moléculaires, comme détaillés ci-après.

L'étape d'ionisation nécessaire pour la mise en œuvre d'une spectrométrie de masse peut être mise en œuvre par tout procédé connu de
15 l'homme du métier. La source d'ionisation permet d'amener les molécules à doser sous un état gazeux et ionisé. Une source d'ionisation peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et seront utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées. On peut citer,
20 notamment :

- l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI) et la désorption-ionisation chimique (DCI)
- le bombardement par atomes rapides (FAB), atomes métastables (MAB) ou ions (SIMS, LSIMS)
- 25 – le couplage plasma inductif (ICP)
- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) et la photoionisation à pression atmosphérique (APPI)
- l'électronébulisation ou électrospray (ESI)
- la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI),
30 activée par une surface (SELDI) ou sur silicium (DIOS)
- l'ionisation-désorption par interaction avec espèces métastables (DART)

Notamment, l'ionisation peut être mise en œuvre comme suit :

L'échantillon contenant les molécules cibles est introduit dans une
35 source d'ionisation, où les molécules sont ionisées à l'état gazeux et ainsi transformées en ions moléculaires qui correspondent aux molécules initiales.

Une source d'ionisation de type électrospray (ESI pour ElectroSpray Ionisation) permet d'ioniser une molécule tout en la faisant passer d'un état liquide à un état gazeux. Les ions moléculaires obtenus correspondent alors aux molécules présentes à l'état liquide, avec en mode positif un, deux, voire trois protons supplémentaires ou plus et sont donc porteurs de une, deux, voire trois charges ou plus. Par exemple, lorsque la molécule cible est une protéine, une ionisation des peptides protéotypiques obtenus après fractionnement de la protéine cible, grâce à une source de type électrospray fonctionnant en mode positif, conduit à des ions polypeptidiques à l'état gazeux, avec un, deux, voire trois protons supplémentaires ou plus et qui sont donc porteurs de une, deux, voire trois charges ou plus, et permet un passage d'un état liquide à un état gazeux. Ce type de source est particulièrement bien adapté, lorsque les molécules cibles ou peptides protéotypiques obtenus sont préalablement séparées par chromatographie liquide en phase inverse. Néanmoins, le rendement d'ionisation des molécules présentes dans l'échantillon peut varier en fonction de la concentration et de la nature des différentes espèces en présence. Ce phénomène se traduit par un effet matrice bien connu de l'homme de l'art.

Une source d'ionisation MALDI permettra d'ioniser des molécules, à partir d'un échantillon à l'état solide.

L'analyseur de masse dans lequel est mis en œuvre l'étape de séparation des marqueurs ionisés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) est tout analyseur de masse connu de l'homme du métier. On peut citer les analyseurs basse résolution, du type quadripôle ou quadrupôle (Q), piège à ions 3D (IT) ou linéaire (LIT), également appelés trappe ionique, et les analyseurs haute résolution, permettant de mesurer la masse exacte des analytes et qui utilisent notamment le secteur magnétique couplé à un secteur électrique, le temps de vol (TOF).

La séparation des ions moléculaires en fonction de leur ratio m/z peut être mise en œuvre une seule fois (spectrométrie de masse simple ou MS), ou bien plusieurs séparations MS successives peuvent être menées. Lorsque deux séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS/MS ou MS². Lorsque trois séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS/MS/MS ou MS³ et plus généralement, lorsque n séparations MS successives sont réalisées, l'analyse est appelée MS ^{n} .

Parmi les techniques mettant en œuvre plusieurs séparations successives, les modes SRM (Selected Reaction Monitoring) en cas de détection ou dosage d'une seule molécule cible, ou bien MRM (Multiple Reaction Monitoring) en cas de détection ou dosage de plusieurs molécules cibles, sont des utilisations particulières de séparation MS². De même le mode MRM3 est une utilisation particulière de séparation en MS/MS/MS. On parle alors de spectrométrie de masse ciblée.

Dans le cas d'une détection en mode MS simple, c'est le rapport masse/charge des ions moléculaires obtenus qui est corrélé à la molécule cible à détecter.

Dans le cas d'une détection en mode MS/MS, essentiellement deux étapes sont ajoutées, par rapport à un dosage MS qui sont :

- i) une fragmentation des ions moléculaires, alors appelés ions précurseurs, pour donner des ions dit ions fragments de 1ère génération, et
- ii) une séparation des ions dit ions fragments de 1ère génération en fonction de leur masse (m/z)₂, le rapport (m/z)₁ correspondant au rapport (m/z) des ions précurseurs.

C'est alors le rapport masse/charge des ions fragments de 1ère génération ainsi obtenus qui est corrélé à la molécule cible à détecter. Par ion fragment de première génération, on entend un ion issu de l'ion précurseur, suite à une étape de fragmentation et dont le rapport masse sur charge m/z est différent de l'ion précurseur.

Les couples (m/z)₁ et (m/z)₂ sont baptisés transitions et sont représentatifs des ions caractéristiques à détecter.

Le choix des ions caractéristiques qui sont détectés pour être corrélés à la molécule cible est effectué par l'homme du métier selon les méthodes standards. Leur sélection conduira avantageusement aux dosages les plus sensibles, les plus spécifiques et les plus robustes possibles, en termes de reproductibilité et fiabilité. Dans les méthodes développées pour la sélection de peptides protéotypiques (m/z)₁, et de fragment de première génération (m/z)₂, le choix est essentiellement basé sur l'intensité de la réponse. Pour plus de détails, on pourra se référer à V. Fusaro et al. [*V. Fusaro et al. Nature Biotech.* 27 ; 2009 ; 190-198]. Des logiciels commerciaux, tels que les logiciels MIDAS et MRM Pilote d'Applied Biosystems ou encore MRMAid [*J. Mead et al., MCP, 15 nov 2008, E-pub*] pourront être utilisés par l'homme de l'art pour lui permettre de prédire tous les couples de transitions possibles. Il pourra

également être fait appel à une base de données nommée PeptideAtlas, construite par F. Desiere et al. [*F. Desiere et al. Nucleic Acids Res. 2006, Jan 1 ; 34(database issue) : D655-8*] pour compiler l'ensemble des transitions MRM de peptides décrites par la communauté scientifique. Cette base PeptideAtlas est disponible en accès libre sur internet. Pour des molécules non protéiques, il est également possible d'utiliser des bases de données, telles que par exemple celle accessible au travers du logiciel Cliquant de la société Applied Biosystems (USA).

Une approche alternative pour sélectionner les peptides protéotypiques, (m/z)₁ et (m/z)₂, consiste à utiliser les spectres de fragmentation MS/MS obtenus à l'occasion d'autres travaux. Ces travaux peuvent être, par exemple, les phases de découverte et d'identification des biomarqueurs par analyse protéomique. Cette approche a été proposée par Thermo Scientific lors de réunion utilisateurs. Elle permet de générer une liste de transitions candidates à partir des peptides identifiés expérimentalement par le logiciel SIEVE (Thermo Scientific). Certains critères ont été détaillés dans la littérature pour le choix des ions (m/z)₁ et (m/z)₂ et sont détaillés ci-après :

- Les peptides avec des sites de clivage interne, c'est-à-dire avec de la Lysine ou de l'Arginine interne, doivent être évités, sauf si la Lysine ou l'Arginine est suivie par de la Proline,

- Les peptides avec de l'Asparagine ou de la Glutamine doivent être évités car ils peuvent se désaminer,

- Les peptides avec de la Glutamine ou de l'Acide Glutamique en N-terminal doivent être évités car ils peuvent se cycliser spontanément,

- Les peptides avec de la Méthionine doivent être évités car ils peuvent être oxydés,

- Les peptides avec de la Cystéine doivent être évités car ils peuvent être modifiés de façon non reproductible lors d'une éventuelle étape de dénaturation, réduction et blocage des fonctions thiols,

- Les peptides avec de la Proline peuvent être considérés comme favorables parce qu'ils produisent généralement des fragments intenses en MS/MS avec un seul pic très majoritaire. Cependant, un seul fragment très majoritaire ne permet pas de valider l'identité de la transition dans un mélange complexe. En effet, seule la présence simultanée de plusieurs fragments caractéristiques permet de vérifier que l'ion précurseur recherché est bien détecté,

- Les peptides ayant une Proline adjacente au C-terminal (position n-1) ou en seconde position par rapport au C-terminal (position n-2) sont à éviter car, dans ce cas, la taille du peptide fragment de première génération est généralement considérée comme trop petite pour être suffisamment spécifique,

- 5 • La sélection de fragments ayant une masse supérieure au précurseur est à privilégier pour favoriser la spécificité. Pour cela, il faut sélectionner un ion précurseur dichargé et sélectionner l'ion fragment de première génération le plus intense ayant une masse supérieure au précurseur, c'est à dire un ion fragment de première génération monochargé.

10 La fragmentation des ions précurseurs sélectionnés est mise en œuvre dans une cellule de fragmentation telle que les modèles de type triple quadripôle, ou de type trappe ionique, ou encore de type temps de vol (TOF), lesquels permettent également la séparation des ions. La ou les fragmentations seront classiquement réalisées par collision avec un gaz inerte tel que l'argon

15 ou l'azote, au sein d'un champ électrique, par photo-excitation ou photodissociation à l'aide d'une source lumineuse intense, collision avec des électrons ou espèces radicalaires, par application d'une différence de potentiel, par exemple dans un tube de temps de vol, ou par tout autre mode d'activation. Les caractéristiques du champ électrique conditionnent l'intensité et la nature

20 de la fragmentation. Ainsi, le champ électrique appliqué en présence d'un gaz inerte, par exemple dans un quadripôle, conditionne l'énergie de collision apportée aux ions. Cette énergie de collision sera optimisée, par l'homme du métier, pour accroître la sensibilité de la transition à doser. A titre d'exemple, il est possible de faire varier l'énergie de collision entre 5 et 180 e-V en q2 dans

25 un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems (Foster City, Etats Unis d'Amérique). De même, la durée de l'étape de collision et l'énergie d'excitation au sein, par exemple, d'une trappe ionique seront optimisées, par l'homme du métier, pour conduire au dosage le plus sensible. A titre d'exemple, il est possible de faire varier cette durée, baptisée

30 temps d'excitation, entre 0,010 et 50 ms et l'énergie d'excitation entre 0 et 1 (Unité Arbitraire) en Q3 dans un spectromètre de masse AB SCIEX QTRAP® 5500 de la société Applied Biosystems.

Enfin, la détection des ions caractéristiques sélectionnés se fait de façon classique, notamment grâce à un détecteur et à un système de traitement. Le

35 détecteur collecte les ions et produit un signal électrique dont l'intensité dépend de la quantité d'ions collectée. Le signal obtenu est ensuite amplifié pour qu'il

puisse être traité informatiquement. Un ensemble informatique de traitement des données permet de transformer les informations reçues par le détecteur en spectre de masse.

Le principe du mode SRM, ou encore du mode MRM, est de
5 sélectionner spécifiquement un ion précurseur, de le fragmenter, puis de sélectionner spécifiquement l'un de ses ions fragments. Pour de telles applications, des dispositifs du type triple quadripôle ou des hybrides triple quadripôle à trappe ionique sont généralement utilisés.

Dans le cas d'un dispositif triple quadripôle (Q1q2Q3) utilisé en mode
10 MS2, en vue du dosage ou de la détection d'une protéine cible, le premier quadripôle (Q1) permet de filtrer les ions moléculaires, correspondant aux peptides protéotypiques caractéristiques de la protéine à doser et obtenus lors d'une étape antérieure de digestion, en fonction de leur ratio masse sur charge (m/z). Seuls les peptides ayant le ratio masse/charge du peptide protéotypique
15 recherché, ratio appelé (m/z)₁, sont transmis dans le deuxième quadripôle (q2) et jouent le rôle d'ions précurseurs pour la fragmentation ultérieure. L'analyseur q2 permet de fragmenter les peptides de ratio masse/charge (m/z)₁ en ions fragments de première génération. La fragmentation est généralement obtenue par collision des peptides précurseurs avec un gaz inerte, comme de l'azote ou
20 de l'argon dans q2. Les ions fragments de première génération sont transmis dans un troisième quadripôle (Q3) qui filtre les ions fragments de première génération en fonction d'un ratio masse sur charge spécifique, ratio appelé (m/z)₂. Seuls les ions fragments de première génération ayant le ratio masse/charge d'un fragment caractéristique du peptide protéotypique
25 recherché (m/z)₂ sont transmis dans le détecteur pour être détectés, voire quantifiés.

Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, en relation avec la sélection de l'ion précurseur d'une part et de la sélection de l'ion fragment de première génération d'autre part. La spectrométrie de masse en
30 mode SRM ou MRM est donc avantageuse pour la quantification

Lorsque la spectrométrie de masse mise en œuvre dans le procédé de l'invention est une spectrométrie de masse en tandem (MS2, MS3, MS4 ou MS5), plusieurs analyseurs de masse peuvent être couplés entre eux. Par exemple, un premier analyseur sépare les ions, une cellule de collision permet
35 de fragmenter les ions, et un second analyseur sépare les ions fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, constituent

plusieurs analyseurs en un et permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement.

Selon des modes de réalisation préférés de l'invention, le procédé de l'invention comprend une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- 5 - la spectrométrie de masse, mise en œuvre pour les propriétés de typage, de résistance potentielle à au moins un antimicrobien et facteur de virulence, est une spectrométrie de type MS/MS, ce qui a pour avantage de générer un fragment spécifique de la molécule à détecter ou à quantifier, et ainsi d'apporter une grande spécificité à la méthode de dosage ;
- 10 - la spectrométrie MS/MS est de la MRM, ce qui a pour avantage d'utiliser un temps de cycle d'analyse dans le spectromètre de masse de quelques dizaines de millisecondes, ce qui permet de détecter ou de quantifier avec une grande sensibilité, et de façon multiplexée, un grand nombre de molécules différentes ;
- 15 - la détermination des propriétés de typage, résistance à un antimicrobien et facteur de virulence est mise en œuvre dans le même appareil de spectrométrie de masse, de préférence simultanément, ce qui a pour avantage de réduire le temps d'analyse et le coût de l'instrument, cela facilite également le traitement et le rendu des résultats.
- 20 Lorsque les marqueurs à doser dans un fluide biologique sont d'origine protéique, en amont de la détection par spectrométrie de masse, l'échantillon à analyser est préférentiellement traité au préalable pour générer des peptides à partir de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon pour fragmenter ces protéines en peptides, par exemple par digestion avec une enzyme
- 25 protéolytique (protéase), ou par action d'un réactif chimique. En effet, le clivage des protéines peut être fait par un traitement physico-chimique, par un traitement biologique ou par une combinaison des deux traitements. Parmi les traitements utilisables, on peut citer le traitement par des radicaux hydroxyle, notamment avec de l' H_2O_2 . Le traitement par les radicaux hydroxyle provoque
- 30 une coupure des liaisons peptidiques qui se fait de manière aléatoire sur n'importe quelle liaison peptidique de la protéine. La concentration en radicaux hydroxyle conditionne le nombre de clivages opérés et donc la longueur des fragments peptidiques obtenus. D'autres traitements chimiques peuvent également être utilisés comme, par exemple, le traitement au bromure de
- 35 cyanogène (CNBr) qui scinde spécifiquement les liaisons peptidiques au niveau du groupe carboxylique des résidus méthionyle. Il est également

possible de réaliser un clivage acide partiel au niveau des résidus aspartyle par chauffage à 100°C d'une solution de protéines dans de l'acide trifluoroacétique.

Le traitement des protéines par digestion enzymatique est néanmoins préféré par rapport au traitement physico-chimique car il préserve davantage la structure des protéines, et est plus facile à contrôler. Par « digestion enzymatique », on entend l'action simple ou combinée d'une ou de plusieurs enzymes dans des conditions de réaction appropriées. Les enzymes effectuant la protéolyse, appelées protéases, coupent les protéines à des endroits spécifiques. Chaque protéase reconnaît généralement une séquence d'acides aminés au sein desquels elle effectue toujours la même coupure. Certaines protéases reconnaissent un seul acide aminé ou une séquence de deux acides aminés entre lesquels elles opèrent un clivage, d'autres protéases ne reconnaissent que des séquences plus longues. Ces protéases peuvent être des endoprotéases ou des exoprotéases. Parmi les protéases connues on peut citer, comme celles décrites dans la demande de brevet WO2005/098017A1:

- les enzymes spécifiques comme la trypsine qui scinde la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus Arg et Lys, l'endolysine qui clive la liaison peptidique du groupe -CO des lysines, la chymotrypsine qui hydrolyse la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la pepsine qui coupe au niveau du groupe NH₂ des résidus aromatiques (Phe, Tyr et Trp), la protéase V8 de la souche V8 de *Staphylococcus aureus* qui clive la liaison peptidique au niveau du groupe carboxylique du résidu Glu ;

- les enzymes non-spécifiques comme la thermolysine provenant de la bactérie *Bacillus thermoproteolyticus* qui hydrolyse la liaison peptidique du groupe NH₂ des acides aminés hydrophobes (Xaa-Leu, Xaa-Ile, Xaa-Phe), la subtilisine et la pronase qui sont des protéases bactériennes qui hydrolysent pratiquement toutes les liaisons et peuvent transformer les protéines en oligopeptides dans des conditions de réaction contrôlées (concentration en enzyme et durée de réaction).

Plusieurs protéases peuvent être utilisées de façon simultanée, si leurs modes d'action sont compatibles, ou elles peuvent être utilisées de façon successive. Dans le cadre de l'invention, la digestion de l'échantillon est, de préférence, réalisée par action d'une enzyme protéase, par exemple la trypsine.

La génération de peptides à l'aide d'un réactif chimique ou d'une protéase, peut être obtenue par simple réaction en solution. Elle peut

également être mise en œuvre avec un four à micro-ondes, ou sous pression, ou bien encore avec un dispositif à ultrasons. Dans ces trois derniers cas, le protocole sera beaucoup plus rapide.

Parmi les peptides ainsi obtenus, les peptides spécifiques de la protéine, sont nommés peptides protéotypiques. Ce sont eux qui seront dosés par spectrométrie de masse.

Selon un mode de réalisation de l'invention, les marqueurs de caractérisation sont des protéines dosables dans un fluide biologique. En particulier, lesdites protéines sont digérées en peptides, de préférence par une enzyme, de préférence encore par la trypsine.

De même, l'échantillon contenant des marqueurs d'origine protéique peut également être préalablement traité à des fins de purification. Lorsque les marqueurs sont d'origine protéique, ce traitement préalable de purification peut être mis en œuvre avant ou après l'étape de génération de peptides tels que décrits précédemment.

Le traitement préalable de purification d'échantillon est largement connu de l'homme du métier et pourra notamment mettre en œuvre des techniques de centrifugation, de filtration, d'électrophorèse ou de chromatographie. Ces techniques séparatives peuvent être utilisées seules ou combinées entre elles pour obtenir une séparation multidimensionnelle. Par exemple, une chromatographie multidimensionnelle peut être utilisée en associant une séparation par chromatographie d'échange d'ions à une chromatographie en phase inverse, comme décrit par T. Fortin et al. [*T. Fortin et al., 2009, Mol. Cell Proteomics, 8(5) : 1006-1015*], ou H. Keshishian et al. [*H. Keshishian et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2212-2229*]. Dans ces publications, le milieu chromatographique peut être en colonne ou en cartouche (extraction en phase solide).

La fraction électrophorétique ou chromatographique (ou le temps de rétention en chromatographie mono ou multidimensionnelle) des peptides protéotypiques est caractéristique de chaque peptide et la mise en œuvre de ces techniques permet donc de sélectionner le ou les peptides protéotypiques à doser. Un tel fractionnement des peptides générés permet d'accroître la spécificité du dosage ultérieur par spectrométrie de masse.

Pour toutes les méthodes de spectrométrie de masse décrites ci-dessus, un calibrage est nécessaire pour pouvoir corréler l'aire du pic mesurée, correspondant à l'intensité de courant induit par les ions détectés, à la quantité

de molécule cible à doser. Pour cela, les calibrages classiquement utilisés en spectrométrie de masse pourront être mis en œuvre, dans le cadre de l'invention. Les dosages MRM sont classiquement calibrés à l'aide de standards externes ou, de préférence, à l'aide de standards internes tels que

5 décrits par T. Fortin et al. précité. Dans le cas où la molécule cible est un peptide protéotypique, permettant de doser une protéine d'intérêt, la corrélation entre la mesure quantitative et la quantité de peptide protéotypique cible, et par la suite de protéine d'intérêt, est obtenue en étalonnant le signal mesuré par rapport à un signal étalon pour lequel la quantité à doser est connue.

10 L'étalonnage peut être réalisé au moyen d'une courbe d'étalonnage, par exemple obtenue par injections successives de peptide protéotypique étalon à différentes concentrations (étalonnage externe), ou de façon préférentielle, par étalonnage interne en utilisant un peptide lourd, comme standard interne, par exemple conformément aux méthodes AQUA, QconCAT ou PSAQ détaillées

15 ci-après. Par « peptide lourd », on entend un peptide correspondant au peptide protéotypique, mais dans lequel un ou plusieurs atomes de carbone 12 (^{12}C) est (sont) remplacé(s) par du carbone 13 (^{13}C), et/ou un ou plusieurs atomes d'azote 14 (^{14}N) est (sont) remplacé(s) par de l'azote 15 (^{15}N).

L'utilisation de peptides lourds, comme standards internes (AQUA), a

20 également été proposée dans la demande de brevet US2004/0229283A1. Le principe est de synthétiser artificiellement des peptides protéotypiques avec des acides aminés comportant des isotopes plus lourds que les isotopes naturels usuels. De tels acides aminés sont obtenus, par exemple, en remplaçant certains des atomes de carbone 12 (^{12}C) par du carbone 13 (^{13}C),

25 ou en remplaçant certains des atomes d'azote 14 (^{14}N) par de l'azote 15 (^{15}N). Le peptide artificiel (AQUA) ainsi synthétisé a rigoureusement les mêmes propriétés physicochimiques que le peptide naturel (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est généralement ajouté, à une concentration donnée, à l'échantillon, en amont du dosage par spectroscopie de masse, par exemple

30 entre le traitement entraînant le clivage des protéines de l'échantillon d'intérêt et le fractionnement des peptides obtenus après l'étape de traitement. De ce fait, le peptide AQUA est co-purifié avec le peptide naturel à doser, lors du fractionnement des peptides. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse, pour le dosage. Ils subissent

35 alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et AQUA, dont la concentration est connue,

permet de calculer la concentration du peptide naturel et de remonter ainsi à la concentration de la protéine à doser. Une variante de la technique AQUA a été proposée par J.-M. Pratt et al. [J.-M. Pratt et al., 2006, Nat. Protoc., 1:1029-1043] sous le nom de QconCat. Cette variante est également décrite dans la

5 demande de brevet WO2006/128492A1. Elle consiste à concaténer différents peptides AQUA et à produire le polypeptide artificiel sous forme de protéine recombinante lourde. La protéine recombinante est synthétisée avec des acides aminés comportant des isotopes lourds. De cette façon, il est possible d'obtenir un standard pour calibrer le dosage simultané de plusieurs protéines

10 à moindre coût. Le standard QconCAT est ajouté dès le début, en amont du traitement entraînant le clivage des protéines et avant les étapes de fractionnement des protéines, de dénaturation, de réduction puis de blocage des fonctions thiols des protéines, si celles-ci sont présentes. Le standard QconCAT subit donc le même cycle de traitement entraînant le clivage des

15 protéines que la protéine naturelle, ce qui permet de tenir compte du rendement de l'étape de traitement entraînant le clivage des protéines. En effet, le traitement, notamment par digestion, de la protéine naturelle peut ne pas être complet. Dans ce cas l'utilisation d'un standard AQUA conduirait à sous-estimer la quantité de protéine naturelle. Pour un dosage absolu, il peut donc

20 être important de tenir compte des rendements de traitement entraînant le clivage des protéines. Cependant, V. Brun et al. [V. Brun et al., 2007, Mol. Cell Proteomics, 2139-2149] ont montré que, parfois, les standards QconQAT ne reproduisaient pas exactement le rendement de traitement notamment par digestion de la protéine naturelle, sans doute du fait d'une conformation

25 tridimensionnelle différente de la protéine QconCAT.

V. Brun et al. ont alors proposé d'utiliser une méthode baptisée PSAQ et décrite dans la demande de brevet WO2008/145763A1. Dans ce cas, le standard interne est une protéine recombinante, ayant la même séquence que la protéine naturelle mais synthétisée avec des acides aminés lourds. La

30 synthèse est réalisée ex-vivo avec des acides aminés lourds. Ce standard a rigoureusement les mêmes propriétés physicochimiques que la protéine naturelle (à l'exception d'une masse plus élevée). Il est ajouté dès le début, avant l'étape de fractionnement des protéines, lorsque cette dernière est présente. Il est donc co-purifié avec la protéine native, lors de l'étape de

35 fractionnement des protéines. Il présente le même rendement de traitement, notamment par digestion, que la protéine native. Le peptide lourd obtenu après

clivage est également co-purifié avec le peptide naturel, si une étape de fractionnement des peptides est réalisée. Les deux peptides sont donc injectés simultanément dans le spectromètre de masse, pour être dosé quantitativement. Ils subissent alors les mêmes rendements d'ionisation dans la source. La comparaison des aires de pic des peptides naturels et des peptides de référence dans la méthode PSAQ permet de calculer la concentration de la protéine à doser en tenant compte de la totalité des étapes du procédé de dosage.

L'ensemble de ces techniques, à savoir AQUA, QconCAT ou PSAQ ou toute autre technique de calibrage, utilisée dans des dosages par spectrométrie de masse et en particulier dans les dosages MRM ou MS, pourront être mises en œuvre pour effectuer le calibrage, dans le cadre de l'invention.

De façon préférentielle, la spectrométrie de masse utilisée dans le procédé de détection selon l'invention est de type MS/MS. Plus préférentiellement, la spectrométrie de masse est la MRM.

Dans un mode préféré de l'invention, on mesure les aires de pic des peptides naturels (échantillon à doser) et du standard interne rajouté à l'échantillon, dont la concentration est connue. Le résultat est exprimé sous forme de ratio aire peptide naturel/aire standard interne. Pour obtenir une quantification absolue au cours d'une même expérience, une quantité fixe de standard est ajoutée à tous les échantillons analysés.

On dispose d'un standard à mesurer pour chaque transition suivie.

Par dosage on entend toute méthode analytique qui permet de quantifier une protéine donnée, qu'il s'agisse d'un dosage par MRM, par ELISA, ou toute autre méthode connue de l'homme du métier. La quantification peut être absolue. La dose de protéine est alors exprimée dans une unité du système international, comme les ng/ml. Ou relative, la dose est alors exprimée en Unités Arbitraires, quand on s'étalonne par rapport à une molécule de référence. C'est le cas par exemple pour la quantification par MRM, où l'on effectue le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde: aire léger / aire lourd. Pour le CA19-9, la quantité est estimée par rapport à un étalon international, comme décrit dans la notice de la trousse Vidas® CA19-9 de la Demanderesse.

Lorsque l'on utilise la spectrométrie de masse, et en particulier la technique LC-MRM-MS décrite ci-dessus, les doses pour plusieurs transitions

d'une même protéine sont summerisées pour obtenir un seul dosage de la protéine. Par summerisation et summeriser, on entend combiner entre eux plusieurs dosages indépendants de la même protéine, qui corrélient entre eux, pour obtenir une dose unique qui est représentative de la dose de la protéine dans l'échantillon biologique étudié.

La summerisation peut être réalisée par exemple par la méthode de median polish comme avec le package r qui utilise la procédure de Tukey Package stats version 2.15.0 Index ; <http://stat.ethz.ch/R-manual/R-patched/library/stats/html/medpolish.html>.

L'échantillon sur lequel le procédé de l'invention peut être mis en œuvre est tout échantillon susceptible de contenir la prolidase et les autres marqueurs d'intérêt, ou l'un quelconque de leurs traceurs. Il peut alors correspondre à un prélèvement de fluide biologique (sang total, sérum, plasma, urine, salive, liquide céphalo-rachidien, sécrétion organique, selles par exemple), sous forme liquide ou déposé par exemple sur un papier de recueil du type papier Watman (dried blood spot), un prélèvement tissulaire ou des cellules isolées. Ce prélèvement peut être utilisé tel quel dans la mesure où la prolidase, un de ses traceurs, ou l'un des autres marqueurs ou de leurs traceurs sont disponibles dans l'échantillon testé, ou bien il peut subir préalablement à l'analyse, une préparation de type enrichissement, extraction, concentration, purification, culture, selon des méthodes connues de l'homme du métier.

L'échantillon biologique utilisé pour la détection directe de la prolidase, susceptible de contenir de la prolidase en tant que tel, peut être constitué par du fluide biologique ou un tissu provenant de la biopsie de la tumeur, des ganglions ou des métastases du patient considéré.

A titre de fluide biologique, on peut citer le sang total ou ses dérivés tels que le sérum ou le plasma, la moelle osseuse, le lait, la salive, les selles, le liquide céphalo-rachidien, les urines et les épanchements. On préfère le sang ou ses dérivés, la salive, les urines et les selles.

Pour la détection de la prolidase, le fluide biologique, qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention, peut nécessiter un traitement particulier. En effet, le fluide biologique peut contenir la prolidase en tant que tel, ou bien il peut contenir des cellules tumorales circulantes qui contiennent de la prolidase, et/ou des cellules tumorales circulantes qui sont capables de sécréter la prolidase.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, le fluide biologique est préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes contenues dans le dit fluide.

Par isoler les cellules tumorales circulantes, on entend obtenir une
5 fraction cellulaire enrichie en cellules tumorales circulantes.

Le traitement du fluide pour isoler les cellules tumorales circulantes peut être effectué par tri cellulaire dans un cytomètre de flux, par enrichissement sur Ficoll, par enrichissement par billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques, par filtration en fonction de la taille des cellules ou de leurs
10 propriétés physico-chimiques, ou par toute autre méthode d'enrichissement spécifique connue de l'homme du métier.

Dans le cas du sang ou de la moelle à titre de fluide biologique, les cellules tumorales circulantes peuvent être isolées grâce à une technique de séparation cellulaire sur Ficoll associée à une déplétion des cellules sanguines
15 utilisant des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques (Dynal Biotech ASA, Norvège).

La détection directe de la prolidase et des autres marqueurs d'intérêt peut alors être effectuée directement à partir de cellules tumorales circulantes isolées du fluide biologique, par exemple par marquage immunocytochimique
20 de ces cellules avec un anticorps anti-prolidase, après avoir déposé les cellules tumorales circulantes sur une lame par cytopspin. La détection directe de la prolidase peut également être effectuée directement dans les cellules tumorales circulantes en utilisant la méthode de cytométrie de flux telle que décrite dans Métézau P, Ronot X, Le Noan-Merdrignac G, Ratinaud MH, La
25 cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique (Tome I), Eds Medsi-MacGrawhill.

Dans ces conditions, lesdites cellules circulantes peuvent être traitées dans des conditions permettant le blocage de la prolidase à l'intérieur desdites cellules. Un tel traitement est décrit par exemple dans Intracellular Flow
30 Cytometry, Applied reagents and Techniques, pp 1-21, BD Pharmingen.

La détection de la prolidase se fait alors après avoir rendu perméable la membrane des cellules pour faire rentrer les partenaires de liaison spécifique de la prolidase.

La détection directe de la prolidase à partir des cellules circulantes peut
35 également être effectuée à l'aide du procédé décrit dans la demande de brevet WO03/076942A2 déposée par l'une des Demanderesses.

La détection directe de la prolidase dans les cellules tumorales peut encore être effectuée dans le milieu de culture desdites cellules après les avoir cultivées dans des conditions telles qu'elles sécrètent de la prolidase.

Ces conditions de culture sont des conditions classiques telles que 37°C
5 sous atmosphère humide et à 5% de CO₂.

Lorsque l'échantillon biologique à tester est du tissu provenant de la biopsie de la tumeur, des ganglions ou des métastases du patient, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention, la détection directe de la prolidase est effectuée directement sur les coupes obtenues, sans
10 traitement préalable dudit tissu.

Un autre mode de détection de la présence de la prolidase consiste en la culture, en présence de l'échantillon biologique, de cellules sensibles à la prolidase, ce qui constitue un mode de réalisation particulier de l'invention.

Dans ce cas, la détection de la présence de la prolidase dans un
15 échantillon biologique est mise en évidence par la réaction des cellules sensibles à la prolidase.

Par cellules sensibles à la prolidase, on entend toute cellule sensible à l'activité biologique de la prolidase.

L'échantillon biologique que l'on peut utiliser pour la détection de la
20 présence de la prolidase par culture de cellules sensibles à la prolidase peut être tout échantillon tel que décrit précédemment.

Ainsi, l'échantillon biologique peut être constitué de fluide biologique, le cas échéant préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes, elles-mêmes pouvant ensuite être cultivées en conditions telles qu'elles
25 sécrètent de la prolidase, comme décrit précédemment.

Un autre mode de détection de la présence de prolidase dans les échantillons biologiques consiste en la détection de l'ARNm de la prolidase dans ledit échantillon, ce qui constitue un autre mode de réalisation de l'invention.

30 On entend par acide nucléique les oligonucléotides, les acides désoxyribonucléiques et les acides ribonucléiques, ainsi que leurs dérivés.

Le terme « oligonucléotide » désigne un enchaînement d'au moins 2 nucléotides (désoxyribonucléotides ou ribonucléotides, ou les deux), naturels ou modifiés, susceptibles de s'hybrider, dans des conditions appropriées
35 d'hybridation, avec un oligonucléotide au moins partiellement complémentaire. Par nucléotide modifié, on entend par exemple un nucléotide comportant une

base modifiée et/ou comportant une modification au niveau de la liaison internucléotidique et/ou au niveau du squelette. A titre d'exemple de base modifiée, on peut citer l'inosine, la méthyl-5-désoxycytidine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine et la bromo-5-désoxyuridine. Pour
5 illustrer une liaison internucléotidique modifiée, on peut mentionner les liaisons phosphorothioate, N-alkylphosphoramidate, alkylphosphonate et alkylphosphodiester. Les alpha-oligonucléotides tels que ceux décrits dans FR-A-2 607 507, les LNA tels que phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA décrits
10 dans *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 8, Issue 16, 18 August 1998, pages 2219-2222, et les PNA qui font l'objet de l'article de M. Egholm et al., [*M. Egholm et al., J. Am. Chem. Soc. (1992), 114, 1895-1897*], sont des exemples d'oligonucléotides constitués de nucléotides dont le squelette est modifié.

Une autre modification peut être par exemple une variation de l'épissage
15 des ARNm entraînant un changement dans la structure de la protéine. Par exemple la prolidase peut être exprimée sous forme tronquée. La détection d'ARNm dans un échantillon liquide est largement connue de l'homme du métier. Elle peut par exemple être mise en œuvre par des réactions d'hybridation entre l'ARNm cible et un acide nucléique capable de liaison avec
20 l'ARNm cible.

La révélation des réactions d'hybridation peut être effectuée par marquage des acides nucléiques de liaison, comme illustré précédemment.

Avant hybridation avec l'acide nucléique de liaison, l'ARNm cible peut être extrait par des méthodes connues de l'homme du métier, puis
25 éventuellement amplifié, comme par exemple par RT-PCR ou par NASBA [*Maleck, L., et al., 1994, Methods in Molecular Biology, 28, ch 36, Ed P.G. Isaac, Humana Press, Inc., Totowa, NJ*].

L'échantillon biologique que l'on peut utiliser pour la détection de la présence de la prolidase par détection d'ARNm de la prolidase peut être tout
30 échantillon tel que décrit précédemment.

Ainsi, l'échantillon biologique peut être constitué de tissu issu de biopsie de tumeur, de ganglion ou de métastase, ou bien de fluide biologique, le cas échéant préalablement traité pour isoler les cellules tumorales circulantes, comme décrit précédemment.

35 Un autre mode de détection de la présence de prolidase dans les échantillons biologiques consiste en la détection de tout ou partie du gène de la

prolidase dans ledit échantillon, ayant subi des modifications conduisant à une modification dans l'expression de la prolidase, ce qui constitue un autre mode de réalisation de l'invention. Une telle modification peut être par exemple une méthylation du promoteur du gène de la prolidase. D'autres modifications
5 peuvent être la présence de mutations de la chaîne nucléotidique ou des variations d'épissage de l'ARNm, entraînant un changement d'expression de la prolidase ou l'expression d'une forme modifiée de la prolidase.

Dans un mode préféré de l'invention, on peut détecter un traceur de la prolidase consécutif à la présence d'une forme modifiée de la prolidase. Par
10 exemple, on peut détecter la présence d'auto-anticorps dirigés contre la prolidase dans un échantillon distant de la tumeur.

La présente invention est maintenant illustrée par les exemples qui suivent qui en dégagent les intérêts et avantages.

15

Exemple 1 : Détection de la prolidase par la technique LC-MRM-MS

1) Méthodologie de la technique Multiple Reaction Monitoring (MRM)

20 Le principe de ce dosage repose sur l'association entre la chromatographie liquide et un spectromètre de masse de type hybride triple quadrupole/trappe ionique (5500QT d'AB Sciex Toronto, Canada) fonctionnant en mode MRM (Q1q2Q3). Dans le principe, pour chaque protéine d'intérêt on choisit les peptides tryptiques d'intérêt. Les transitions sont prédites par
25 exemple à l'aide des logiciels Skyline (MIT Cambridge USA) ou MRM pilot™ d'AB Sciex.

On quantifie la prolidase par le biais de la quantification d'un ou plusieurs de ses peptides. Ces peptides sont choisis en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, et de leur capacité à être détectés dans le
30 spectromètre de masse. Les peptides sélectionnés sont isolés dans le premier quadrupole Q1, pour être fragmentés dans la cellule de collision du spectromètre de masse (q2). A partir des ions fils générés, les plus représentatifs et spécifiques ont été choisis, et l'intensité de ces ions fils a été monitorée après sélection dans le troisième quadrupole Q3. Le couple de
35 masse ion parent/ion fils est appelé transition, et c'est l'association de la transition au temps de rétention chromatographique qui lui correspond qui

définit la spécificité de l'essai par rapport à la protéine cible. Pour avoir un dosage quantitatif, il faut ajouter un standard interne (par exemple un peptide identique « lourd » qui va servir d'étalon, en quantité connue, qui est ajouté à l'échantillon et est élué au même temps chromatographique et qui permet la quantification relative. Les peptides ont été sélectionnés en fonction de leur sensibilité (meilleure réponse dans le spectromètre de masse) et de leur spécificité dans la matrice.

Des peptides de séquences identiques aux peptides cibles sélectionnés ont été synthétisés, avec de la lysine ou de l'arginine marquées (^{13}C et ^{15}N) : +8 Dalton pour la lysine, +10 Da pour l'arginine, afin de pouvoir réaliser des dosages quantitatifs. En effets, ces peptides lourds ont les mêmes propriétés physico-chimiques que les peptides cibles, et sont élués aux mêmes temps de rétention chromatographiques.

Afin de pouvoir baisser la limite de détection à quelques ng/ml, un procédé amélioré de MRM-MS a été mis en œuvre, il comprend les étapes successives suivantes : digestion trypsique ; fractionnement SPE (Solid-Phase Extraction) des peptides ; et chromatographie liquide (LC) couplée à la MRM-MS et décrites ci-après.

La mise au point a été réalisée sur des échantillons surchargés en ajoutant les peptides synthétiques.

Calibration

Pour réaliser une étude quantitative relative de la prolidase, on a rajouté à chaque échantillon une quantité fixe (10 μl) d'un pool de peptides lourds de la protéine à doser synthétisés avec de l'Arginine ou de la Lysine comportant du ^{13}C et du ^{15}N . La quantification est relative et non absolue, car la quantité de peptides synthétisés et ajoutée est fixe pour tous les échantillons, mais elle est seulement estimée et pas connue de façon précise.

Digestion enzymatique

Les échantillons de sérums sont dénaturés dans une solution d'urée 6M tamponnée par 10 mM de Tris pH 8 et contenant 30 mM de dithiothreitol, pendant 40 minutes à 40°C, puis alkylés par de l'iodoacétamide 50 mM, à température ambiante, pendant 40 minutes, à l'obscurité. Ils sont dilués 6 fois dans l'eau, puis la digestion trypsique est réalisée à 37°C, sur la nuit, en utilisant un ratio enzyme substrat de 1:30 (Promega). La digestion est arrêtée

par ajout d'acide formique à une concentration finale de 0,5%. Les échantillons digérés sont dessalés par extraction sur phase solide (SPE, solid phase extraction) en utilisant les cartouches en phase inverse Oasis HLB 3cc (60 mg) (Waters, Manchester UK). Après application de l'échantillon, les cartouches
5 sont lavées par 1 ml d'acide formique à 0,1%, puis l'élution a été réalisée par un mélange méthanol/eau (80/20 v/v) contenant 0,1% d'acide formique. Les éluats sont séchés sous vide.

Fractionnement SPE

10 Les échantillons secs sont repris dans 1 ml de tampon acétate et chargés sur les cartouches mixtes (hydrophobe et échange de cation) Oasis MCX (mixed cation exchange) 60 mg (Waters, Manchester UK) équilibrées au préalable en tampon acétate et méthanol. Les cartouches sont lavées par 1 ml de tampon acétate et 1 ml de méthanol. Les peptides d'intérêt (Tableau 1) sont
15 élués par 1 ml d'un mélange méthanol/tampon acétate (50/50 v/v)). Le pH du tampon acétate est choisi en fonction du point isoélectrique du peptide d'intérêt. Les éluats sont séchés sous vide, dissous dans 200 µl d'une solution d'acétonitrile/eau (3/97 v/v) contenant 0,1% d'acide formique. Un aliquot de 50 µl a été injecté dans la LC couplée à un système MS-MS.

20

Chromatographie liquide et spectrométrie de masse

L'analyse LC-MS a été effectuée sur un système chromatographique haute pression (HPLC) de type HP 1100 series avec pompe binaire et injecteur (Agilent Technologies, Santa Clara Californie USA) couplé à un spectromètre
25 de masse, AB Sciex 5500 QTrap (MS hybride triple quadripôle – trappe ionique) (AB Sciex, Toronto Canada) pour une meilleure sensibilité. La séparation LC a été effectuée sur une colonne C₁₈ Symmetry (Waters, Manchester UK), à un débit d'élution de 300 µl/min. (Eluent A = 0,1% acide formique dans l'eau, éluant B = 0,1% acide formique dans l'acétonitrile,
30 gradient linéaire de 5%B à 50%B en 25 min, puis de 50%B à 100%B en 3 min). L'analyse MS est réalisée en mode d'ionisation positive à une tension de 5500 V appliquée à l'aiguille permettant l'ionisation dans la source. Le contrôle de l'instrument et l'acquisition des données sont réalisés avec le logiciel Analyst 1.4.1. Les débits du gaz de nébulisation (air) et du gaz rideau (azote) sont de
35 30 et 20 psi, respectivement. La source ionique Turbo VTM est réglée à 400°C, le flux d'azote auxiliaire à 40 psi. L'énergie de collision (CE), la tension d'orifice

(DP, declustering potential) et la tension à la sortie de la cellule de collision (CXP, collision cell exit potential) sont optimisées pour chacune des transitions MRM sélectionnées.

Tous les ions parents di- ou tri- chargés des peptides tryptiques théoriques dans un intervalle de masse allant de 800 à 3000 Da et tous les ions fragments possibles de type y ou b. Pour chaque protéine, chaque transition possible a été testée afin de déterminer les transitions les plus sensibles et les plus spécifiques. Le résultat de cette sélection est récapitulé dans le Tableau 1. La séparation chromatographique MCX a été réalisée à différents pH, le pH choisi pour la suite des expériences étant le pH qui permet d'obtenir l'aire du pic la plus élevée.

2) Exemple des peptides et transitions suivis pour le dosage de la prolidase

Tableau 1

<i>prolidase (Xaapro)</i>										
Séquences	pI	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
IDEPGLR (SEQ ID N°1)	4,4	9.8	400,2	442.3	405,2	452,3	101	10	17	12
				571.3		581,3	106	10	15	14
				686.3		696,3	101	10	15	16
AVYEAVLR (SEQ ID N°2)	6,38	11	460,76	375,7	465,75	380,7	85	4	19	20
				458,3		468,3	85	4	25	25
				587.4		597,4	85	4	25	48
				750.4		760,4	85	4	19	42
GVNTDSGSVCR (SEQ ID N°3)	5.8	11	576.3	665,3	581.3	675.3	126	10	25	32
				780,3		790.3	126	10	23	16
				881,4		891.4	126	10	21	20

Il est possible de réaliser le dosage de la prolidase en suivant et en quantifiant une ou plusieurs transitions comme décrit ci-dessus. Dans un mode préféré de l'invention, les transitions suivies sont moyennées par tout moyen

connu de l'homme du métier. Dans un mode préféré de l'invention, il est par exemple possible de moyenniser les transitions utilisées pour le dosage par la méthode du median polish. Dans un mode préféré de l'invention on peut utiliser un package r suivant la procédure de Tukey pour réaliser le median polish.

5 Dans un autre mode préféré de l'invention, on peut réaliser le dosage de la prolidase dans des échantillons en suivant une seule transition, par exemple la transition 400.2/686.3 du peptide de SEQ ID NO : 1, et la transition du peptide lourd correspondant. On établira pour chaque transition suivie le ratio de l'aire sous la courbe du pic chromatographique de la transition naturelle
10 divisée par l'aire sous la courbe du pic chromatographique de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

Les doses qui seront utilisées dans les exemples 3 et 4 pour l'obtention
15 de doses et de score de prolidase ont été obtenues en suivant et en quantifiant la transition 400.2/686.3 du peptide de SEQ ID NO : 1.

Exemple 2 : Détection de marqueurs tumoraux par la technique LC-MRM-MS

20 Le principe des dosages utilisant la technologie de dosage Multiple Reaction Monitoring MRM décrit à l'exemple 1 pour le dosage de la prolidase peut être appliqué de la même façon au dosage de tout marqueur protéique dont on connaît la séquence. Ces dosages peuvent être utilisés pour doser
25 tous types d'échantillons biologiques, comme par exemple le sang, le sérum, le plasma, les selles, les urines...

Comme décrit dans l'exemple 1, pour une protéine donnée on peut quantifier un marqueur en suivant une ou plusieurs transitions. Chaque transition peut être suivie de façon indépendante, ou bien on peut réaliser une
30 moyenne entre les transitions, en utilisant toute méthode de summerisation connue de l'homme du métier.

De la même façon pour la calibration, on réalise une étude quantitative relative de chaque marqueur, on a rajouté à chaque échantillon une quantité fixe (10µl) d'un pool de peptides lourds de la protéine à doser synthétisés avec
35 de l'Arginine ou de la Lysine comportant du ^{13}C et du ^{15}N . La quantification est relative et non absolue, car la quantité de peptides synthétisés et ajoutée est

fixe pour tous les échantillons, mais elle est seulement estimée et pas connue de façon précise. Pour obtenir les doses en Unités Arbitraires utilisées en combinaison dans l'exemple 4, on a effectué le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition

5 lourde.

On peut doser la protéine Alpha-Enolase en suivant par exemple les transitions listées dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

10

<i>Alpha-Enolase</i>										
Séquences	pl	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
YISPDQLADLYK (SEQ ID NO : 4)	4,2	18,1	713,37	531,8	717,35	535,8	181	4	31	14
				575,3		579,3	181	4	29	14
				609,3		617,2	181	4	39	14
IEEELGSK (SEQ ID NO : 5)	4,3	8,3	452,73	533,3	456,75	541,1	95	5	26	28
				662,3		670,2	95	5	22	34
				791,4		799,3	95	5	22	41

Dans un mode préféré de l'invention, on suivra la transition 452.7/662.2 du peptide IEEELGSK (SEQ ID NO : 5), et la transition du peptide lourd correspondant, on établira pour chaque transition le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition

15 lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un

20 score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en suivant la transition 452.7/662.2 du peptide de SEQ ID NO : 5.

On peut doser la protéine 78 kDa glucose-regulated protein (BIP, GRP78) en suivant par exemple les transitions listées dans le tableau 3 ci-

25 dessous :

Tableau 3

<i>BIP</i>										
Séquences	pl	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
ELEEIVQPIISK (SEQ ID NO : 6)	4,3	17,3	699,4	557,4	703,4	565,4	144	3	36,7	7
				685,4		693,4	144	3	27	8
				784,5		792,5	144	3	31	9
ITPSYVAFTPEGER (SEQ ID NO : 7)	4,5	15,2	783,9	587,3	788,9	597,3	152,3	4	35,8	7
				835,4		845,4	152,3	4	37,1	9
				906,4		916,4	152,3	4	37,3	10
LTPEEIER (SEQ ID NO : 8)	4,3	10,6	493,8	386,7	498,75	391,7	86,8	4	19,2	9
				675,4		685,4	86,8	4	27,2	8
				772,4		782,4	86,8	4	19,4	9

5 Dans un mode préféré de l'invention, on suivra les transitions du peptide de SEQ ID NO : 6 et leurs transitions du peptide lourd correspondant, on établira pour chaque transition le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre
10 elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en summerisant entre-elles les doses des 3 transitions du peptide de SEQ ID NO : 6, en utilisant la
15 méthode median polish.

On peut doser la protéine G3PDH (GAPDH) en suivant par exemple les transitions listées dans le Tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4

G3PDH										
Séquences	pl	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	E P	C E	CX P
GALQNIIPASTGAAK (SEQ ID NO : 9)	8,7	13,1	706,40	597,3	710,4	613,4	120	6	27	29
				815,4		823,4	120	6	32	37
VIPELNGK (SEQ ID NO : 10)	6	10,6	435,3	560,2	439,25	568,2	116	4	23	14
				657,2		665,2	116	4	13	16
VPTANVSVDLTCR (SEQ ID NO : 11)	5,8	13,9	765,9	483,3	770,9770,9	483,1	85	4	40	12
				549,3		559,3	85	4	53	14
				949,5		959,5	85	4	44	24
VGVNGFGR (SEQ ID NO : 12)	9,7	10,3	403,22	436,2	408,2	446,2	101	10	19	12
				550,3		560,3	101	10	19	14
				706,3		716,3	101	10	17	16

5 Dans un mode préféré de l'invention, on suivra les transitions du peptide de SEQ ID NO : 9, ou les transitions 403,2/550,3 et 403,2/706,3 du peptide de SEQ ID NO : 12, ou la transition 435,3/657,2 du peptide de SEQ ID NO : 10, ou la transition 765,9/949,5 du peptide de SEQ ID NO : 11, et leurs transitions des peptides lourds correspondants, on établira pour chaque transition le ratio des

10 aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

15 Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en summerisant entre-elles les doses des transitions 403,2/550,3 et 403,2/706,3 du peptide de SEQ ID NO : 12, les doses de la transition 765,9/949,5 du peptide de SEQ ID NO : 11, et les doses de la transition 435,3/657,2 du peptide de SEQ ID NO : 10, en

20 utilisant la méthode median polish.

On peut doser la protéine HSP71 (HSC70) en suivant par exemple les transitions listées dans le tableau 5 ci-dessous :

Tableau 5

5

HSP71										
Séquences	pI	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
FEELNADLFR (SEQ ID NO : 13)	4,1	18	627,3	735,3	632,3	745,3	156	4	25	16
				848,4		858,4	156	4	25	20
				977,5		987,4	156	4	21	24
DAGTIAGLNVLRL (SEQ ID NO : 14)	5,8	17	600,3	671,4	605,35	681,4	69	2	32	17
				742,5		752,5	69	2	30	18
				855,6		865,6	69	2	30	22
SQIHDIVLVGGSTR (SEQ ID NO : 15)	6,5	12,8	494,6	477,3	497,9	487,3	75	3	19	13
				576,3		586,3	75	3	18	16
				793,4		798,5	75	3	18	10

Dans un mode préféré de l'invention, on suivra les transitions 600,3/671,4 et 600,3/742,5 du peptide de SEQ ID NO : 14, ou la transition 494,6/793,4 du peptide de SEQ ID NO : 15, et leurs transitions des peptides
10 lourds correspondants, on établira pour chaque transition le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

15 Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en summerisant entre-elles les doses des transitions 600,3/671,4 et 600,3/742,5 du peptide de SEQ ID NO : 14, et la dose de la transition 494,6/793,4 du peptide de SEQ ID NO :
20 15, en utilisant la méthode median polish.

On peut doser la protéine PDI en suivant par exemple les transitions listées dans le tableau 6 ci-dessous :

Tableau 6

<i>PDI</i>										
Séquences	pl	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
IFGGEIK (SEQ ID NO : 16)	6	9,45	382,2	260,2	386,2	268,2	75	6	25	13
				503,3		511,3	75	6	17	25
				650,4		658,4	75	6	17	13
ENLLDFIK (SEQ ID NO : 17)	4,4	19,5	496,3	407,3	500,3	415,3	89	3	22	12
				522,3		530,3	89	3	19	11
				635,4		643,4	89	3	19	8

Dans un mode préféré de l'invention, on suivra les transitions du peptide de SEQ ID NO : 17, et leurs transitions du peptide lourd correspondant, on établira pour chaque transition le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en summerisant entre-elles les doses des différentes transitions du peptide de SEQ ID NO : 17, en utilisant la méthode median polish.

On peut doser la protéine peroxy-5 en suivant par exemple les transitions listées dans le tableau 7 ci-dessous :

Tableau 7

<i>Peroxi-5</i>										
Séquences	pl	TR	Q1 (peptide léger naturel)	Q3 (peptide léger naturel)	Q1 (peptide lourd standard interne)	Q3 (peptide lourd standard interne)	DP	EP	CE	CXP
THLPGFVEQAEALK	5,4	16	513,9	659,4	516,6	667,4	79,9	3	16,2	17

(SEQ ID NO : 18)				653,4		653,4	79,9	3	18,7	13
				788,4		796,4	79,9	3	16,2	19
LLADPTGAFGK (SEQ ID NO : 19)	5,8	14,8	545,3	677,4	549,3	685,4	103	3	25,1	15
				792,4		800,4	103	3	20	17
				863,4		871,4	103	3	17,1	20
VNLAELFK (SEQ ID NO : 20)	6	18,9	467,3	607,4	471,3	615,4	104,2	3	16,5	15
				720,4		728,4	104,2	3	15,4	15,3
				834,5		842,5	104,2	3	14,4	16

Dans un mode préféré de l'invention, on suivra la transition 545,3/677,4 du peptide de SEQ ID NO : 19, ou les transitions 513,9/653,4 et 513,9/788,4 du peptide de SEQ ID NO : 18, et leurs transitions des peptides lourds correspondants, on établira pour chaque transition le ratio des aires des pics chromatographiques de la transition naturelle divisée par l'aire de la transition lourde pour obtenir une dose par transition pour chaque échantillon, puis on summerisera entre elles ou non les doses obtenues pour les différentes transitions.

Les doses qui seront utilisées dans l'exemple 4 pour la réalisation d'un score en combinaison avec la prolidase, et dans l'exemple 6 pour l'obtention d'une dose et d'un score en individuel, ont été obtenues en summerisant entre-elles les doses de la transition 545,3/677,4 du peptide de SEQ ID NO : 19, et les doses des transitions 513,9/653,4 et 513,9/788,4 du peptide de SEQ ID NO : 18, en utilisant la méthode median polish.

Exemple 3 : Utilisation des dosages sériques réalisés en Immuno-essais

1) Sélection des protéines et dosages

La Demanderesse a montré dans l'exemple 3 que des doses anormalement diminuées de protéine prolidase pouvaient être observées dans la circulation sanguine de certains patients atteints d'un cancer colorectal. D'autre part, la Demanderesse a montré dans les demandes de brevet WO2009024691, WO2009019365, WO2009019368, WO2009019369, WO2009019366, WO2009019370, WO2009019367, WO2010004214, WO2010112777 que des doses anormalement élevées ou anormalement diminuées de d'autres marqueurs tumoraux comme Ezrine, L-FABP, Apo A1, Apo A2, Beta2 Microglobuline, ACE, CA19-9, Galectine-3, Protéasome 20S

(Prosomes), Protéine Disulfide isomérase (PDI) et ProDefensine A6 pouvaient être observées dans la circulation sanguine de certains patients atteints d'un cancer colorectal. Les procédés de dosage de ces marqueurs tumoraux ont été décrits dans les demandes de brevets suscités.

5 En pratique, les doses des différents marqueurs dosés en ELISA utilisés pour la combinaison avec la prolidase dans l'exemple 4 ont été obtenues de la façon suivante :

10 - Le procédé de dosage de Timp1 a été mis en œuvre avec le kit ELISA Timp1 de IBL International (N° RE54081) selon les instructions du fabricant, pour le dosage de la protéine Timp1 dans les plasma EDTA des patients et contrôles.

15 - Le procédé de dosage de M2PK a été mis en œuvre avec le kit ELISA M2PK de Schebo (ScheBo® Tumor M2-PK™ EDTA Plasma Test Cat.-No 08) selon les instructions du fabricant, pour le dosage de la protéine M2PK dans les plasma EDTA des patients et contrôles.

20 - Le procédé de dosage pour le marqueur HSP60 est décrit dans l'article de Hamelin et al. [*Céline Hamelin, Emilie Cornut, Florence Poirier, Sylvie Pons, Corinne Beaulieu, Jean-Philippe Charrier, Hader Haïdous, Eddy Cotte, Claude Lambert, Françoise Piard, Yasemin Ataman-Önal, Geneviève Choquet-Kastylevsky. Identification and verification of HSP60 as a potential serum marker for colorectal cancer. FEBS J. 2011 Dec;278(24):4845-4859*].

25 - Les protéines ApoA1 et ApoA2 ont été dosées dans les sérums avec les kits commercialisés par Abnova (APOA1 ELISA Kit, Catalog # : KA0460, APOA2 ELISA Kit, Catalog # : KA0461), selon les instructions du fabricant.

 - Les marqueurs tumoraux ACE, β 2 Microglobuline et CA19-9 ont été dosés à l'aide des trousse de dosage de la Demanderesse, respectivement Vidas® CEA(s), Vidas® β 2 Microglobulin, Vidas® CA19-9, en suivant le protocole opératoire propre à chaque trousse.

30 - Les protéines Galectine 3 et Protéasome 20S (Prosomes) ont été dosées comme décrit dans le brevet de la Demanderesse, WO_2010004214, avec des tests ELISA sandwich développés sur l'automate Vidas®.

35 - La protéine Ezrine a été dosée comme décrit dans le brevet WO_2009019365, avec un tests ELISA sandwich développé sur l'automate Vidas®.

 - La protéine LFABP a été dosée comme décrit ci-après :

Dosage de la LFABP

Obtention d'anticorps monoclonaux dirigés contre la LFABP

Obtention de la protéine recombinante

5 Pour réaliser des immunisations et obtenir des anticorps monoclonaux contre la protéine L-FABP nous avons tout d'abord obtenu de la protéine recombinante L-FABP.

L'ADN complémentaire, les vecteurs d'expression, le clonage et l'obtention de la protéine recombinante LFABP (expression et purification) ont
10 été réalisés de la même façon que décrits dans le brevet WO2010/004214.

Immunisations

Modèle animal

Les expériences d'immunisation ont été réalisées chez des souris BALB/c (H-2^d) femelles âgées de 6 à 8 semaines au moment de la première
15 immunisation.

Immunogènes et immunisations

Afin d'augmenter les réponses immunes obtenues chez les souris et pouvoir générer des anticorps monoclonaux, la protéine L-FABP a été produite sous forme de protéine recombinantes produite selon les modes opératoires
20 décrits dans la demande de brevet WO2010/004214. La protéine a été mélangée volume pour volume avec l'adjuvant de Freund (Sigma), préparé sous forme d'émulsion eau-dans-huile et dont il est connu qu'il présente un bon pouvoir immunogène. Trois souris ont été immunisées. Les souris ont reçu 3 doses successives de 10 µg des immunogènes à 0, 2 et 4 semaines. Toutes
25 les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée. La première injection est faite en mélange avec l'adjuvant de Freund complet, les deux suivantes se font en mélange avec l'adjuvant de Freund incomplet. Entre J50 et J70 après la première injection, les réponses humorales ont été restimulées avec une injection intraveineuse de 100 µg de la protéine recombinante.

30 Suivi de l'apparition de la réponse humorale

Afin de suivre l'apparition des anticorps, on effectue régulièrement sur les souris des prélèvements de sang. La présence des anticorps anti-marqueur tumoral est testée en utilisant un ELISA. La protéine d'intérêt est utilisée en capture (1 µg/puits), après saturation on fait réagir avec l'antigène différentes
35 dilutions des sérums à tester (incubation à 37°C, pendant 1h). Les anticorps spécifiques présents dans le sérum sont révélés par un anticorps de chèvre

anti-IgG de souris AffiniPure conjugué à la phosphatase alcaline (H+L, Jackson ImmunoResearch, Cat no. 115-055-146), qui se lie aux anticorps recherchés (0,1 µg/puits).

Obtention d'anticorps monoclonaux

- 5 Trois jours après la dernière injection, pour chaque marqueur tumoral, une des souris immunisées a été sacrifiée ; le sang et la rate ont été prélevés. Les splénocytes obtenues à partir de la rate ont été mises en culture avec les cellules de myélome Sp2/0-Ag14 pour qu'elles fusionnent et s'immortalisent, selon le protocole décrit par Köhler et Milstein [*G. Köhler et C. Milstein, 1975, Nature, 256, 495-497 ; G. Köhler et C. Milstein, 1976, Eur J Immunol, 6, 511-519*]. Après une période d'incubation de 12-14 jours les surnageants des hybridomes obtenus ont été criblés pour déterminer la présence d'anticorps anti-marqueur tumoral en utilisant le test ELISA décrit dans le point 3 de cet exemple. Les colonies d'hybridome positives ont été sous-clonées deux fois
10 selon la technique de la dilution limite, bien connue par l'homme du métier.

Caractérisation des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux obtenus contre la L-FABP sont les suivants : 2E5G9, 3A7B4, 5A8H2, 2C9G6, 3D6G1, 8B10B8, 7D8A11

Ils ont été analysés par la technique du Western blot.

- 20 Complémentarité des anticorps

- Pour pouvoir construire le test ELISA sur permettant de doser les échantillons de patients, on a tout d'abord testé la complémentarité des anticorps. Ce sont les mêmes anticorps qui sont utilisés en capture ou en révélation (après biotinylation). Chaque anticorps de révélation biotinylé est
25 testé avec chaque anticorps de capture (anticorps du cône VIDAS). Les couples sont testés avec la protéine recombinante L-FABP décrite ci-dessus. Le tableau 8 récapitule les résultats obtenus pour les différents couples d'anticorps.

Tableau 8

- 30 Tableau croisé montrant les résultats obtenus pour chaque couple d'anticorps avec la protéine recombinante L-FABP (moyenne du signal – moyenne du bruit de fond en RFV). (RFV ou Relative Fluorescence Value est le signal lu par Vidas®).

	Détection						
Capture	2E5G9	3A7B4	5A8H2	2C9G6	3D6G1	8B10B8	7D8A11
2E5G9	10,5	16,5	25	10537	10377,5	5066	0,5
3A7B4	42	198	707,5	10071	9923	10009	24,5
5A8H2	36	109	513	10404	10283,5	9930	18,5
2C9G6	10753,5	10815	10708,5	1417,5	213	10774,5	1562
3D6G1	10136,5	10707,5	10684,5	606,5	138	10462	1038,5
8B10B8	8846	9940,5	9677	10385,5	10637,5	87	363,5
7D8A11	5,5	21,5	14	8053,5	8094,5	128	4,5

A l'issu de ces tests on retient 6 couples d'anticorps complémentaires :

- 3A7B4 / 3D6G1
- 5A8H2 / 3D6G1
- 2C9G6 / 5A8H2
- 3D6G1 / 5A8H2
- 8B10B8 / 5A8H2
- 2C9G6/2E5G9

Caractérisation des épitopes

Les épitopes reconnus par les anticorps monoclonaux ont été caractérisés en utilisant les techniques du Spotscreen, le criblage de banque de peptides portés par des phages, et la construction de protéines chimères (bibliothèque de fragments).

- Méthodologie

La technique du Spotscreen, adaptée d'après Frank et Döring, permet de synthétiser de façon simultanée un grand nombre de peptides fixés sur membrane de cellulose. Ces peptides reproduisent la séquence de l'antigène cible sous forme de peptides de 8 à 12 acides aminés, se chevauchant de 1 à 4 résidus. Ces peptides sont ensuite mis en contact avec l'anticorps à étudier dans un test colorimétrique de type Blot, et l'identification des peptides immunoréactifs permet de déduire la séquence minimale de l'épitope de l'anticorps et de le localiser précisément sur l'antigène.

La synthèse s'effectue sur une membrane de cellulose portant uniformément des bras en polyéthylène glycol (PEG) d'une longueur de 8 à 10 unités, présentant une fonction NH₂ libre en bout de chaîne. Elle se déroule de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale des peptides. Les acides

aminés ont leur fonction aminée protégée par un groupement Fmoc (9-fluoréméthylloxycarbonyl), et leurs chaînes latérales, susceptibles de réagir au cours de la synthèse, sont également protégées par des groupements trityl, t-butyl ou t-butyl-éther. Les solutions-mères d'acides aminés sont préparées à une concentration de 0,33 M dans du NMP (N-méthyl-pyrrolidone) contenant 0,5 M de HOBt (hydroxybenzotriazole). Le dépôt des acides aminés s'effectue à l'aide du robot ASP 222 (Abimed, Langenfeld, Allemagne), piloté par l'intermédiaire du logiciel AutoSpot XL. L'utilisation de ce robot permet de faire en simultané jusqu'à 4 membranes de 96 spots, soit 384 peptides.

Pour un cycle de couplage d'un acide aminé, le robot dépose 0,7 µl de la solution d'acide aminé activé extemporanément (un volume de solution de diisopropyl-carbodiimide 1,1 M dilué en NMP pour 3 volumes de solution-mère d'acide aminé) sur les membranes. Ce dépôt est répété une seconde fois, puis les membranes sont rincées en DMF (N,N-diméthylformamide). Les groupements NH₂ n'ayant pas réagi sont ensuite été acétylés par 4 à 6 incubations de 10 minutes dans une solution d'anhydride acétique 10 % en DMF, afin d'éviter l'apparition de peptides abortifs ou tronqués. Après 3 lavages de 2 minutes en DMF, les groupements Fmoc protégeant la fonction aminée des acides aminés sont clivés par une incubation de 5 minutes dans une solution de pipéridine 20 % en DMF. Après 4 lavages en DMF, les spots sont colorés à l'aide d'une solution de bleu de bromophénol 1 % en DMF, puis la membrane est rincée 3 fois en méthanol et séchée à l'air libre avant le cycle de couplage suivant.

Ce protocole est répété pour l'ajout de chaque nouvel acide aminé. Après le couplage du dernier acide aminé, les peptides sont acétylés afin de permettre le blocage de tous les groupements NH₂ libres, empêchant ainsi l'ajout d'un autre acide aminé. Puis les chaînes latérales de tous les peptides sont déprotégées par l'incubation des membranes dans un bain acide trifluoroacétique / dichlorométhane / triisobutylsilane (5 : 5 : 0,3) pendant 1 heure. Les membranes sont ensuite rincées 4 fois en dichlorométhane, 3 fois en DMF et 3 fois en méthanol avant d'être séchées à l'air libre et conservées à -20°C jusqu'à l'immunorévélation.

Pour immunorévéler les spots avec un anticorps monoclonal, les membranes sont d'abord rincées en méthanol, puis lavées en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) avant d'être incubées sur la nuit à température ambiante dans la solution de saturation (solution concentrée 10X

à base de caséine (Western Blocking reagent, Roche) diluée en TBS-Tween 20 0,05% (TBS-T) et contenant 5% de saccharose). Après un lavage de 10 minutes en TBS-T, les membranes sont incubées pendant 1h30 à 37°C avec l'anticorps monoclonal dilué à 20 µg/ml en solution de saturation. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois en TBS-T, puis sont incubées avec le conjugué anti-souris couplé à la phosphatase alcaline (Jackson Immunoresearch), dilué au 1/2000^{ème} en solution de saturation. Après 2 lavages de 10 minutes en TBS-T, puis 2 lavages en CBS (acide citrique 10 mM pH 7, NaCl 140 mM, KCl 3 mM), le révélateur, préparé extemporanément (5-bromo, 4-chloro, 3-indoyl, phosphate 600 µM, thiazolyl blue tetrazolium bromide 720 µM, et MgCl₂ 5 mM en CBS), est mis en contact avec la membrane pendant 30 à 45 minutes à l'obscurité. Les peptides immunoréactifs apparaissent en bleu-violet. Après 3 rinçages en eau distillée, les membranes sont scannées puis conservées dans l'eau jusqu'à la régénération.

La régénération permet d'éliminer les anticorps et les conjugués fixés sur les peptides, ce qui permet ainsi de réaliser un nouveau test d'immunoréactivité vis-à-vis d'un autre anticorps. Les membranes subissent une série de lavages de 10 minutes chacun : 1 lavage en eau distillée, 6 lavages en DMF, 3 lavages en tampon de régénération A (urée 8 M, SDS (sodium dodecyl sulfate) 35 mM, β-mercaptoethanol 0,1 %), 3 lavages en tampon de régénération B (eau distillée / éthanol / acide acétique 4 : 5 : 1), puis 2 lavages en méthanol. Les membranes sont ensuite séchées à l'air libre avant d'être stockées à -20°C.

La caractérisation des épitopes par criblage de banques de peptides portés par des phages a été réalisée en utilisant le kit commercial PhD12 Phage Display Peptide Library Kit (Cat. No. E#8110S) de New England Biolabs, en suivant les instructions fournies avec le kit, version 2.7 du protocole datant de novembre 2007.

Une troisième technologie de localisation d'épitope a été utilisée : la construction d'une librairie de fragments de protéine L-FABP recombinante, contre laquelle on a testé l'affinité des anticorps d'intérêt

- Résultats

Le Tableau 9 récapitule les épitopes reconnus par 5 anticorps L-FABP dont l'épitope a été analysé par les 3 techniques mentionnées.

Tableau 9

Anticorps	N° épitope	Séquence de l'épitope ^a	Type d'épitope	Technique
2C9G6	1	N-term 1-56 SEQ ID NO : 21	Conformationnel	librairie de fragments
3D6G1	1	N-term 1-56 SEQ ID NO : 21	Conformationnel	librairie de fragments
8B10B8	1	N-term 1-56 SEQ ID NO : 21	Conformationnel	librairie de fragments
5A8H2	2	N-term 1-65 SEQ ID NO : 22 (AA 57 à 65 nécessaires)	Séquence nécessaire pour la liaison	Librairie de fragments
	3	HLSEYHPWHPR SEQ ID NO : 23	Mimotope Epitope conformationnel	Criblage banque de phage
7D8A11	4	TELNGDIITNTMTLGDIVF KRISKRI SEQ ID NO : 24 (102-127)	Epitope linéaire	Spotscan et librairie de fragments

^aSéquence en acide aminé de la région de fixation de la L-FABP à l'anticorps testé. Les nombres entre parenthèses correspondent à la position de l'épitope sur la séquence en acides aminés de la LFABP, la numérotation commençant à la méthionine initiale.

Les épitopes reconnus par les anticorps 3A7B4 et 5A8H2 n'ont pas pu être déterminés par la technique du Spotscan, ce qui indique qu'ils ne sont pas linéaires. Le criblage des banques de peptides portés par des phages a permis de sélectionner un mimotope (séquence linéaire mimant un épitope) qui réagit avec l'anticorps 5A8H2. La séquence consensus de ce mimotope a été alignée afin de déterminer une séquence consensus qui est indiquée dans le tableau 9, qui représente la séquence minimale reconnue par l'anticorps. Il n'a pas été possible de retrouver cette séquence consensus dans la structure primaire (ou séquence peptidique) de la L-FABP. Ainsi, cette séquence consensus correspond à des résidus situés à différents endroits sur la structure primaire de la protéine mais qui partagent une proximité dans sa structure tridimensionnelle afin de former un épitope conformationnel. Par ailleurs l'utilisation de la librairie de fragments de protéine recombinante a permis de localiser l'épitope pour les anticorps 2C9G6, 3D6G1 et 8B10B8 dans les 56 premiers acides aminés de la protéine. L'anticorps 5A8H2 a besoin quant à lui de 9 acides aminés supplémentaires (AA 1 à 65) pour se fixer, site de liaison à l'opposé du site de liaison de l'anticorps 7D8A11. L'anticorps 7D8A11 est le seul qui ait un épitope linéaire que l'on a pu caractériser en spotscan.

Développement de tests ELISA sandwich contre la protéine LFABP sur l'automate Vidas®

La protéine LFABP a été dosée à l'aide des anticorps décrits dans l'exemple 1 et d'un immuno-essai de type sandwich en utilisant par exemple
5 l'automate d'ELISA Vidas® (bioMérieux). Ce type de test peut aussi être réalisé en microplaque, de façon automatisée ou manuelle. Dans un premier temps, les différents anticorps disponibles ont été testés pour choisir un couple d'anticorps fonctionnel, c'est à dire, au moins un anticorps capable de capturer la protéine biomarqueur (anticorps de capture) et au moins un anticorps
10 capable de révéler la molécule biomarqueur (anticorps de révélation).

Pour ce faire, le test ELISA a été construit en utilisant les réactifs du kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728 D – FR – 2005/05), modifiée ainsi :

15 Les réactifs ont été utilisés tels que décrits dans la notice correspondante (réf. 11728D–FR–2005/05), avec les modifications suivantes :

- Les cônes ont été sensibilisés avec les 5 Ac de capture sélectionnés utilisés à une concentration de 10 µg/ml.
- Le contenu du deuxième puit de la cartouche HBS Ag Ultra a été
20 remplacé par 300 µl d'anticorps de révélation, couplé à la biotine, dilués à 1 µg/ml dans le tampon du deuxième puit du kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampon avec sérum de chèvre et azoture de sodium à 1 g/l).
- L'échantillon de sérum (50µl) a été dilué directement dans le
25 deuxième puit de la cartouche HBS Ag Ultra.
- La réaction ELISA a été réalisée à l'aide de l'automate Vidas® et du protocole HBS dont l'étape d'incubation de l'échantillon avec les anticorps de capture et de révélation avait été porté à 100 cycles.
- Les résultats ont été obtenus sous forme de valeurs brutes après
30 soustraction du bruit de fond (lecture du substrat avant réaction).

Une courbe étalon a été établie en dosant une gamme de concentration de la protéine biomarqueur recombinante. La courbe étalon a été tracée en reportant en abscisse la concentration de la protéine biomarqueur et en
35 ordonnée le signal lu par Vidas® (RFV ou Relative Fluorescence Value). La concentration de la protéine biomarqueur présente dans le fluide corporel à

doser (sang, sérum, plasma, selle) a été calculée en reportant la concentration correspondant au signal RFV lu par Vidas®.

Equivalence des différents tests ELISA développés

5 On a voulu évaluer la corrélation entre les différents immuno-essais sandwich développés. Les tests Vidas® ont été comparés entre eux et également comparés au test commercialisé par la société Hycult biotechnology pour doser la protéine L-FABP humaine (Cat. No. HK404), tel que décrit dans le brevet WO 2009019368.

10 Ces tests d'équivalence ont été réalisés grâce à des échantillons sériques de patients atteints de cancer colorectal (CCR) ou de sujet sain contrôles donneurs de sang (EFS), obtenus respectivement dans des services hospitaliers dans le cadre de 2 protocoles loi Huriet, et dans un établissement français de banque du sang (sujets sains).

15 **Tableau 10**

Doses de LFABP en ng/ml obtenus avec le test commercial Hycult biotechnology et avec les différents tests Vidas® développés

Patient	Hycult	2C9G6/ 5A8H2	5A8H2/ 3D6G1	2C9G6/ 2E5G9	3A7B4/ 3D6G1	3D6G1/ 5A8H2	8B10B8/ 5A8H2
CBSE004	7,78		2,87	1,74	2,57		
CBSE011	7,73		1,92	1,33	1,72		
CBSE012	0,11		2,31	1,83	2,07		
CBSE018			1,35	0,75	1,19		
CBSE019	6,65		4,48	3,41	3,98		
CBSE023	8,21		4,60	4,92	4,07		
CBSE025	16,38		7,88	7,45	6,87		
CLSP043	2,89	1,94	2,49	1,70	2,47	2,29	0,22
CLSP047	1,94		1,39	0,00	1,22		
CLSP078	2,56		13,01	8,27	11,33		
CLSP090	3,77		1,18	0,98	1,04		
CLSP164	6,54	4,18	4,77	4,60	4,49	4,14	1,54
CLSP165	7,86	1,27	1,68	1,80	2,32	1,82	1,64
CLSP167	8,17	0,00	0,43	0,00	2,01	0,00	0,52
CLSP170	6,02	4,36	4,26	4,61	4,16	3,60	2,11
CLSP174	23,64	5,57	6,73	6,26	7,80	4,67	7,39
CLSP182	7,25	4,47	4,61	5,50	4,46	4,21	4,06
CLSP183	16,90	11,07	10,12	9,79	9,32	7,08	15,94
CLSP185	19,63	5,35	7,01	6,36	8,41	4,44	5,32

CLSP186	7,06	4,59	4,42	5,35	4,44	3,39	2,72
CLSP189	5,34	0,00	0,25	0,00	1,16	0,00	0,69
CLSP194	13,09	5,38	5,65	6,71	5,40	5,17	5,52
CLSP198	8,16	2,20	3,10	3,14	4,24	2,88	1,94
CLSP207	6,02	4,60	4,71	5,58	4,67	4,01	1,91
GHBD020	2,24		5,46	3,08	4,81		
GHBD021	1,84		1,58		1,41		
GHBD029	2,75		3,42	2,74	3,05		
N000533	3,46	0,59	1,18	0,96	1,51	1,21	1,85
N002301	7,78		5,54	5,19	4,88		
N005702	2,74		1,04	0,79	0,91		
N009944	3,49	1,41	2,06	2,66	1,90	1,98	1,69
N011147	2,86	0,92	1,52	1,82	1,41	1,50	1,16
N011968	2,06	1,26	1,56	1,64	1,62	1,65	0,97
N011984	5,29	0,87	1,32	1,21	1,80	1,45	1,19
N014106	2,66	0,45	0,91	0,66	1,25	0,89	0,74
N015402	4,41		1,34	0,90	1,18		
N017234	4,04	1,90	2,49	3,33	2,41	2,61	2,48
N017269	2,89	1,46	2,13	2,38	2,00	1,97	2,01
N018544	2,42	0,99	1,47	2,17	1,49	1,67	1,11
N018552	2,28	0,00	0,15	0,00	0,52	0,00	0,47
N020501	11,37		2,61	2,90	2,34		
N045730	2,29	0,19	0,69	0,63	0,89	0,61	0,74
N054582	1,84		1,45	1,65	1,28		
N057046	5,59		0,82	0,00	0,70		
N057054	21,05		2,69	3,25	2,40		
N074598	2,53		1,53	1,13	1,36		
N286613	4,11	2,38	2,54	3,30	2,56	3,00	3,83
N286656	7,95	1,77	2,26	2,73	3,24	2,60	4,12
N286680	4,58	2,75	2,86	3,30	2,85	3,39	1,45
N318050	3,93	1,56	2,16		2,18		2,05
N318341	4,46	1,72	2,38	2,86	2,12	2,40	1,86
N318384	1,63	0,60	1,19	1,29	1,12	1,18	0,71
N318421	3,86	0,69	1,15	1,45	1,47	1,14	1,56
N329630	6,90	1,24	1,69	2,34	2,28	1,82	4,04
N376488	4,73	0,64	1,20	1,30	1,57	1,14	1,57
N376912	2,55	0,27	0,84	0,94	1,15	0,80	1,07
N40776-	3,46	0,62	1,00	0,98	1,35	1,15	1,21
N418599	2,60	1,11	1,46	1,94	1,49	1,63	2,01
N46043-	4,18	0,67	1,34	1,18	1,72	1,03	0,90
N461993	2,92	0,00	0,16	0,01	0,69	0,00	0,73
N462187	3,96	0,79	1,32	1,18	1,79	1,43	1,23

N483535	6,42	0,00	0,30	0,00	1,28	0,00	0,83
N491678	7,73		3,86	3,38	3,43		
N494801	4,38		2,96	2,64	2,65		
N511498	2,24	0,46	0,81	0,71	1,03	0,78	0,51
N520547	7,74		3,03	3,74	2,70		
N527039	2,36	0,31	0,79	0,41	1,03	0,70	0,60
N530485	6,80	0,00	0,32	0,00	1,40	0,00	0,66
N593116	2,38	0,99	1,41	1,95	1,42	1,49	1,46
N734641	3,04		8,30	7,31	7,23		
N748022	2,14	0	0,17	0,00	0,46	0,00	0,47
N828353	8,21		4,52	4,11	4,01		
N831245	7,74		2,77	2,32	2,48		
N862300	3,59	1,79	4,75		3,53		2,33

Les corrélations de ces différents tests par rapport au test 2C9G6 / 5A8H2 sont rapportées dans le tableau 11 ci-dessous :

5

Tableau 11

Données de corrélation entre les différents tests ELISA

Parametre	5A8H2/3D6G1	2C9G6 / 2E5G9	3A7B4/3D6G1	3D6G1/5A8H2	8B10B8/5A8H2	Hycult
Nombre de paires XY	47	45	47	45	47	47
Corrélation de Spearman	0,9864	0,9783	0,9244	0,9909	0,8091	0,5298
Intervalle de confiance 95%	0.9752 to 0.9926	0.9598 to 0.9883	0.8653 to 0.9581	0.9831 to 0.9951	0.6752 to 0.8914	0.2781 to 0.7135
Valeur de P value (bilatéral)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,0001
La corrélation est-elle significative? (alpha=0.05)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes

Les différents tests développés en Vidas® ont une bonne corrélation entre eux et peuvent tous être utilisés pour doser la protéine LFABP.

10

Exemple 4 : Détection des patients atteints de cancers colorectaux et de patients contrôles par le dosage MRM de la prolidase

1) Patients et prélèvements

15

La collecte des échantillons de sang a été réalisée grâce à un réseau de 8 centres cliniques répartis dans toute la France, dans le cadre de 2 protocoles loi Huriet pour les patients atteints de cancer colorectal. Pour les patients contrôles, coloscopies négatives, une étude multicentrique impliquant une

trentaine de gastroentérologues a été mise en place pour collecter le sang de patients Hemocult™ positifs, de 50 à 75 ans, avant la réalisation de la coloscopie et de toute préparation colique. Les patients sains donateurs de sang ont été collectés dans l'établissement français du sang (EFS) de Lyon, et
5 dans l'EFS de Grenoble. Les patients étiquetés « MedGe » sont des patients de 51 à 74 ans, qui ont été collectés en Pologne dans le cadre d'une consultation de médecine générale.

Tous les prélèvements ont été réalisés en conformité avec la législation en vigueur et les Bonnes Pratiques Cliniques, suivant un process de stockage
10 et de suivi conformes aux bonnes pratiques de laboratoire, les patients cancer colorectal et les contrôles coloscopies négatives étant prélevés exactement dans les mêmes conditions.

Pour l'obtention de sérum, le prélèvement sanguin se fait sur tube sec. Après coagulation, le tube est centrifugé 10 min à 1000 g, le sérum est prélevé,
15 aliquoté et conservé à -80°C. Les échantillons sont parfaitement documentés pour l'histoire clinique des patients.

Pour l'obtention de plasma, le prélèvement sanguin se fait sur tube EDTA. Après centrifugation 10 min à 1000 g, le plasma est prélevé, aliquoté et conservé à -80°C. Les échantillons sont parfaitement documentés pour
20 l'histoire clinique des patients.

Au total, 331 patients ont été testés : 102 patients atteints de cancer colorectal invasif, de stades TNM I à IV, 11 patients atteints de Tis T0 , 3 patients atteints d'adénomes colorectaux et 215 patients contrôles :

- 70 patients contrôle avec une coloscopie totalement normale
25 (ColoNeg),
- 38 donateurs sains de l'EFS de Grenoble (EFS Gre)
- 37 donateurs sains de l'EFS de Lyon (EFS Ly)
- 70 contrôles collectés en consultation de médecine générale (MedGe)

30

2) Dosages de la prolidase dans les échantillons cliniques

La protéine prolidase a été dosée avec la technologie MRM, comme décrit dans l'exemple 1. En pratique seule la transition 400.2/ 686.3 du peptide de SEQ ID NO : 1 a été suivie et quantifiée, ainsi que la transition lourde
35 correspondante. Les résultats sont exprimés en Unité Arbitraire, en réalisant le ratio de l'aire sous la courbe du pic chromatographique de la transition

naturelle divisée par l'aire sous la courbe du pic chromatographique de la transition lourde : aire léger / aire lourd.

Tableau 12

- 5 Dosages sériques de la prolidase chez les patients cancer colorectal (CCR) et les contrôles (ColoNeg, EFS Ly, EFS Gre, MedGe)

Patient	Age	Sexe	Classe	Stade	prolidase Dose Ratio Unité Arbitraire
CBSE011	57	Homme	Tis	T0	0,113
CLSP234	57	Homme	Tis	T0	0,105
CLSP286	50	Femme	Tis	T0	0,109
CLSP300	60	Homme	Tis	T0	0,123
CLSP315	59	Homme	Tis	T0	0,096
CLSP367	57	Homme	Tis	T0	0,109
CLSP724	58	Homme	Tis	T0	0,122
CNSE003	59	Homme	Tis	T0	0,115
CNSE004	56	Homme	Tis	T0	0,132
GHBD015	58	Femme	Tis	T0	0,135
GHBD036	57	Femme	Tis	T0	0,148
CBSE001	56	Femme	CCR	I	0,098
CBSE016	74	Homme	CCR	I	0,091
CLSP047	76	Femme	CCR	I	0,10759
CLSP162	63	Femme	CCR	I	0,163
CLSP196	55	Homme	CCR	I	0,103
CLSP224	84	Femme	CCR	I	0,080
CLSP235	71	Femme	CCR	I	0,079
CLSP263	51	Homme	CCR	I	0,123
CLSP340	64	Femme	CCR	I	0,143
CLSP344	59	Femme	CCR	I	0,105
CLSP364	58	Femme	CCR	I	0,093
CLSP376	58	Homme	CCR	I	0,141
GHBD003	54	Homme	CCR	I	0,111
GHBD094	65	Homme	CCR	I	0,144
CLSP075	59	Homme	CCR	II	0,168
CLSP076	56	Homme	CCR	II	0,101
CLSP080	56	Femme	CCR	II	0,133

CLSP096	51	Femme	CCR	II	0,110
CLSP110	52	Femme	CCR	II	0,113
CLSP117	55	Femme	CCR	II	0,097
CLSP130	61	Homme	CCR	II	0,109
CLSP133	60	Homme	CCR	II	0,077
CLSP143	61	Homme	CCR	II	0,065
CLSP147	55	Femme	CCR	II	0,084
CLSP154	50	Femme	CCR	II	0,089
CLSP155	63	Homme	CCR	II	0,065
CLSP157	58	Femme	CCR	II	0,097
CLSP165	58	Femme	CCR	II	0,114
CLSP170	60	Femme	CCR	II	0,070
CLSP173	61	Homme	CCR	II	0,093
CLSP177	60	Homme	CCR	II	0,057
CLSP178	60	Homme	CCR	II	0,109
CLSP179	61	Homme	CCR	II	0,095
CLSP186	63	Femme	CCR	II	0,131
CLSP194	60	Homme	CCR	II	0,093
CLSP201	55	Homme	CCR	II	0,086
CLSP207	55	Homme	CCR	II	0,077
CLSP209	64	Homme	CCR	II	0,118
CLSP220	53	Homme	CCR	II	0,090
CLSP222	58	Homme	CCR	II	0,083
CLSP253	61	Femme	CCR	II	0,10650
CLSP256	86	Femme	CCR	II	0,088
CLSP280	62	Homme	CCR	II	0,103
CLSP296	56	Homme	CCR	II	0,169
CLSP310	81	Homme	CCR	II	0,122
CLSP327	64	Homme	CCR	II	0,063
CLSP333	60	Homme	CCR	II	0,116
CLSP341	53	Homme	CCR	II	0,079
CLSP346	66	Homme	CCR	II	0,105
CLSP347	49	Femme	CCR	II	0,132
CLSP380	60	Homme	CCR	II	0,083
CNSE002	62	Femme	CCR	II	0,087
GHBD021	71	Femme	CCR	II	0,117
GHBD043	71	Homme	CCR	II	0,084
GHBD064	83	Femme	CCR	II	0,099
GHBD066	82	Femme	CCR	II	0,138

GHBD075	58	Homme	CCR	II	0,104
GHBD087	62	Femme	CCR	II	0,123
GHBD090	59	Homme	CCR	II	0,191
GHBD096	62	Femme	CCR	II	0,110
GHBD100	75	Homme	CCR	II	0,067
GHBD103	68	Homme	CCR	II	0,192
CBSE023	76	Homme	CCR	III	0,141
CLSP044	80	Homme	CCR	III	0,113
CLSP074	79	Femme	CCR	III	0,058
CLSP078	72	Femme	CCR	III	0,078
CLSP081	78	Femme	CCR	III	0,059
CLSP098	61	Homme	CCR	III	0,057
CLSP174	77	Homme	CCR	III	0,086
CLSP227	52	Homme	CCR	III	0,093
CLSP233	59	Homme	CCR	III	0,078
CLSP255	42	Femme	CCR	III	0,078
CLSP289	52	Homme	CCR	III	0,129
CLSP320	70	Homme	CCR	III	0,104
CLSP324	53	Homme	CCR	III	0,061
CLSP383	78	Homme	CCR	III	0,131
CLSP384	37	Homme	CCR	III	0,144
CNSE001	78	Homme	CCR	III	0,131
CNSE016	65	Homme	CCR	III	0,089
CNSE017	77	Femme	CCR	III	0,093
CSEM015	65	Femme	CCR	III	0,147
CSEM029	63	Femme	CCR	III	0,098
GHBD004	58	Homme	CCR	III	0,092
GHBD017	70	Homme	CCR	III	0,078
GHBD034	48	Femme	CCR	III	0,139
GHBD042	77	Femme	CCR	III	0,140
GHBD045	73	Homme	CCR	III	0,032
GHBD089	54	Femme	CCR	III	0,093
GHBD105	79	Homme	CCR	III	0,118
CBSE012	37	Femme	CCR	IV	0,095
CBSE026	72	Homme	CCR	IV	0,073
CLSP156	59	Homme	CCR	IV	0,066
CLSP159	69	Femme	CCR	IV	0,170
CLSP167	81	Homme	CCR	IV	0,089
CLSP260	57	Femme	CCR	IV	0,120

CLSP334	54	Femme	CCR	IV	0,189
CLSP357	78	Homme	CCR	IV	0,125
CLSP365	64	Homme	CCR	IV	0,176
CLSP366	45	Homme	CCR	IV	0,157
GHBD022	56	Homme	CCR	IV	0,145
GHBD071	61	Homme	CCR	IV	0,149
CLSP197	68	Femme	CCR	NA	0,128
HGED005	68	Homme	Témoin ColoNeg		0,112
PROMIS 21-01-005	68	Homme	Témoin ColoNeg		0,124
PROMIS 21-01-006	62	Homme	Témoin ColoNeg		0,177
PROMIS 21-01-009	51	Femme	Témoin ColoNeg		0,149
PROMIS 21-01-011	60	Femme	Témoin ColoNeg		0,209
PROMIS 21-01-012	55	Femme	Témoin ColoNeg		0,129
PROMIS 21-02-001	73	Femme	Témoin ColoNeg		0,159
PROMIS 21-02-003	55	Femme	Témoin ColoNeg		0,188
PROMIS 21-02-004	57	Homme	Témoin ColoNeg		0,294
PROMIS 21-02-006	51	Homme	Témoin ColoNeg		0,130
PROMIS 21-02-008	55	Homme	Témoin ColoNeg		0,197
PROMIS 21-02-011	55	Femme	Témoin ColoNeg		0,120
PROMIS 21-02-014	58	Homme	Témoin ColoNeg		0,123
PROMIS 21-02-016	62	Homme	Témoin ColoNeg		0,191
PROMIS 21-03-004	61	Homme	Témoin ColoNeg		0,136
PROMIS 21-03-013	52	Femme	Témoin ColoNeg		0,279
PROMIS 21-03-015	74	Femme	Témoin ColoNeg		0,194
PROMIS 21-04-002	67	Homme	Témoin ColoNeg		0,117
PROMIS 21-04-006	72	Homme	Témoin ColoNeg		0,111
PROMIS 21-04-007	66	Femme	Témoin ColoNeg		0,171
PROMIS 21-04-008	62	Femme	Témoin ColoNeg		0,237
PROMIS 21-04-009	58	Homme	Témoin ColoNeg		0,203
PROMIS 21-04-013	63	Femme	Témoin ColoNeg		0,121
PROMIS 21-07-004	66	Homme	Témoin ColoNeg		0,149
PROMIS 21-12-001	59	Homme	Témoin ColoNeg		0,159
PROMIS 21-12-007	53	Femme	Témoin ColoNeg		0,10716
PROMIS 21-12-011	52	Homme	Témoin ColoNeg		0,169
PROMIS 21-22-001	61	Femme	Témoin ColoNeg		0,195
PROMIS 21-22-006	65	Femme	Témoin ColoNeg		0,155
PROMIS 21-22-008	57	Femme	Témoin ColoNeg		0,129
PROMIS 37-03-004	53	Femme	Témoin ColoNeg		0,110
PROMIS 37-04-001	65	Homme	Témoin ColoNeg		0,252

PROMIS 37-04-005	69	Femme	Témoign ColoNeg	0,112
PROMIS 37-05-008	55	Homme	Témoign ColoNeg	0,160
PROMIS 37-06-001	65	Femme	Témoign ColoNeg	0,144
PROMIS 37-09-002	50	Femme	Témoign ColoNeg	0,167
PROMIS 37-11-001	56	Homme	Témoign ColoNeg	0,10696
PROMIS 37-11-002	59	Homme	Témoign ColoNeg	0,170
PROMIS 37-11-011	71	Homme	Témoign ColoNeg	0,121
PROMIS 37-11-016	50	Femme	Témoign ColoNeg	0,153
PROMIS 37-12-002	63	Homme	Témoign ColoNeg	0,222
PROMIS 37-13-003	53	Femme	Témoign ColoNeg	0,174
PROMIS 37-13-006	53	Homme	Témoign ColoNeg	0,160
PROMIS 37-13-008	61	Homme	Témoign ColoNeg	0,203
PROMIS 37-14-009	63	Homme	Témoign ColoNeg	0,132
PROMIS 37-14-018	60	Homme	Témoign ColoNeg	0,087
PROMIS 37-14-021	61	Femme	Témoign ColoNeg	0,129
PROMIS 37-15-002	68	Femme	Témoign ColoNeg	0,165
PROMIS 37-15-006	67	Femme	Témoign ColoNeg	0,239
PROMIS 37-16-001	57	Homme	Témoign ColoNeg	0,256
PROMIS 37-17-001	52	Homme	Témoign ColoNeg	0,184
PROMIS 37-17-003	55	Homme	Témoign ColoNeg	0,140
PROMIS 37-17-004	58	Femme	Témoign ColoNeg	0,139
PROMIS 37-18-001	53	Homme	Témoign ColoNeg	0,134
PROMIS 37-18-003	50	Femme	Témoign ColoNeg	0,158
PROMIS 37-18-004	57	Homme	Témoign ColoNeg	0,188
PROMIS 37-18-005	55	Femme	Témoign ColoNeg	0,111
PROMIS 37-18-024		Homme	Témoign ColoNeg	0,128
PROMIS 37-19-006	50	Homme	Témoign ColoNeg	0,122
PROMIS 37-19-007	51	Femme	Témoign ColoNeg	0,136
PROMIS 37-20-004	53	Femme	Témoign ColoNeg	0,179
PROMIS 71-02-003	60	Femme	Témoign ColoNeg	0,159
PROMIS 71-04-003	75	Femme	Témoign ColoNeg	0,161
PROMIS 71-09-007	52	Homme	Témoign ColoNeg	0,175
PROMIS 71-10-001	56	Femme	Témoign ColoNeg	0,171
PROMIS 71-10-007	71	Femme	Témoign ColoNeg	0,162
PROMIS 71-11-001	63	Homme	Témoign ColoNeg	0,191
PROMIS 71-11-006	59	Homme	Témoign ColoNeg	0,155
PROMIS 71-11-008	54	Homme	Témoign ColoNeg	0,181
PROMIS 71-11-009	60	Femme	Témoign ColoNeg	0,140
801725-SER	43	Homme	Témoign EFS Gre	0,148

801726-SER	45	Homme	Témoin EFS Gre	0,163
801727-SER	34	Homme	Témoin EFS Gre	0,131
801729-SER	51	Femme	Témoin EFS Gre	0,132
801730-SER	44	Femme	Témoin EFS Gre	0,148
801731-SER	65	Femme	Témoin EFS Gre	0,182
801732-SER	24	Femme	Témoin EFS Gre	0,150
801733-SER	37	Femme	Témoin EFS Gre	0,127
801734-SER	36	Homme	Témoin EFS Gre	0,193
801735-SER	61	Femme	Témoin EFS Gre	0,171
801736-SER	56	Homme	Témoin EFS Gre	0,178
801737-SER	51	Homme	Témoin EFS Gre	0,125
801739-SER	45	Femme	Témoin EFS Gre	0,150
801740-SER	52	Homme	Témoin EFS Gre	0,112
801741-SER	46	Homme	Témoin EFS Gre	0,182
801742-SER	36	Homme	Témoin EFS Gre	0,146
801743-SER	57	Femme	Témoin EFS Gre	0,178
801744-SER	52	Homme	Témoin EFS Gre	0,191
801746-SER	60	Femme	Témoin EFS Gre	0,171
801747-SER	60	Femme	Témoin EFS Gre	0,247
801748-SER	58	Homme	Témoin EFS Gre	0,366
801749-SER	18	Femme	Témoin EFS Gre	0,124
801750-SER	61	Homme	Témoin EFS Gre	0,175
801751-SER	30	Femme	Témoin EFS Gre	0,165
801752-SER	22	Femme	Témoin EFS Gre	0,141
801753-SER	40	Femme	Témoin EFS Gre	0,124
801754-SER	57	Homme	Témoin EFS Gre	0,154
801757-SER	26	Homme	Témoin EFS Gre	0,184
801758-SER	38	Femme	Témoin EFS Gre	0,157
801759-SER	52	Femme	Témoin EFS Gre	0,115
801760-SER	42	Homme	Témoin EFS Gre	0,173
801761-SER	18	Femme	Témoin EFS Gre	0,190
801762-SER	22	Femme	Témoin EFS Gre	0,140
801763-SER	23	Femme	Témoin EFS Gre	0,109
801764-SER	36	Femme	Témoin EFS Gre	0,195
801765-SER	47	Homme	Témoin EFS Gre	0,163
801766-SER	39	Femme	Témoin EFS Gre	0,187
801767-SER	28	Femme	Témoin EFS Gre	0,178
P040 02 011 DL	64	Homme	Témoin MedGe	0,114
P040 02 012 CR	69	Homme	Témoin MedGe	0,219

P040 02 014 MG	62	Homme	Témoign MedGe	0,137
P040 02 015 HT	61	Homme	Témoign MedGe	0,143
P040 02 017 JS	60	Homme	Témoign MedGe	0,150
P040 02 018 PB	59	Homme	Témoign MedGe	0,158
P040 02 019 PK	52	Homme	Témoign MedGe	0,144
P040 02 020 KA	54	Homme	Témoign MedGe	0,100
P040 02 021 JL	63	Homme	Témoign MedGe	0,232
P040 02 022 MK	69	Homme	Témoign MedGe	0,158
P040 02 023 CM	67	Homme	Témoign MedGe	0,117
P040 02 024 TM	58	Homme	Témoign MedGe	0,242
P040 02 025 PA	53	Homme	Témoign MedGe	0,214
P040 02 026 MR	59	Homme	Témoign MedGe	0,121
P040 02 027 HF	57	Homme	Témoign MedGe	0,100
P040 02 030 Z,J	60	Homme	Témoign MedGe	0,149
P040 02 031 PW	56	Homme	Témoign MedGe	0,115
P040 02 032 WR	51	Homme	Témoign MedGe	0,141
P040 02 033 WZ	68	Homme	Témoign MedGe	0,171
P040 02 034 SJ	59	Homme	Témoign MedGe	0,132
P040 02 035 KF	70	Homme	Témoign MedGe	0,115
P040 02 036 PZ	52	Homme	Témoign MedGe	0,203
P040 02 037 GB	62	Homme	Témoign MedGe	0,126
P040 02 038 WS	74	Homme	Témoign MedGe	0,160
P040 02 039 KK	54	Homme	Témoign MedGe	0,184
P040 02 040 RT	59	Homme	Témoign MedGe	0,171
P040 02 041 JJ	62	Homme	Témoign MedGe	0,118
P040 02 042 WZ	63	Homme	Témoign MedGe	0,128
P040 03 011 BH	61	Homme	Témoign MedGe	0,146
P040 03 012 BJ	59	Homme	Témoign MedGe	0,152
P040 03 013 JE	52	Homme	Témoign MedGe	0,246
P040 03 014 GT	51	Homme	Témoign MedGe	0,146
P040 03 015 SM	64	Homme	Témoign MedGe	0,103
P040 03 016 CB	64	Homme	Témoign MedGe	0,144
P040 03 018 SS	62	Homme	Témoign MedGe	0,162
P040 03 019 RH	57	Homme	Témoign MedGe	0,152
P040 03 020 TJ	56	Homme	Témoign MedGe	0,140
P040 03 021 RW	51	Homme	Témoign MedGe	0,124
P040 03 022 ZZ	60	Homme	Témoign MedGe	0,171
P040 03 023 PA	63	Homme	Témoign MedGe	0,152
P040 03 024 LS	52	Homme	Témoign MedGe	0,157

P040 03 026 PS	69	Homme	Témoign MedGe	0,165
P040 03 027 FZ	62	Homme	Témoign MedGe	0,200
P040 03 028 WT	52	Homme	Témoign MedGe	0,124
P040 03 029 BZ	64	Homme	Témoign MedGe	0,149
P040 03 030 MR	53	Homme	Témoign MedGe	0,169
P040 03 031 TM	52	Homme	Témoign MedGe	0,111
P040 03 032 BW	55	Homme	Témoign MedGe	0,117
P040 03 033 JR	52	Homme	Témoign MedGe	0,158
P040 03 034 RJ	66	Homme	Témoign MedGe	0,136
P040 03 036 CZ	61	Homme	Témoign MedGe	0,147
P040 03 037 SZ	52	Homme	Témoign MedGe	0,153
P040 03 038 BT	60	Homme	Témoign MedGe	0,128
P040 03 039 CJ	62	Homme	Témoign MedGe	0,168
P040 03 040 DF	59	Homme	Témoign MedGe	0,213
P040 03 041 MN	56	Homme	Témoign MedGe	0,130
P040 03 042 SA	67	Homme	Témoign MedGe	0,119
P040 03 043 KJ	61	Homme	Témoign MedGe	0,124
P040 03 044 LA	53	Homme	Témoign MedGe	0,136
P040 03 045 BM	52	Homme	Témoign MedGe	0,144
P040 03 046 TS	55	Homme	Témoign MedGe	0,146
P040 03 047 NJ	59	Homme	Témoign MedGe	0,170
P040 03 048 KZ	58	Homme	Témoign MedGe	0,203
P040 03 049 CK	63	Homme	Témoign MedGe	0,157
P040 03 051 DJ	ND	Homme	Témoign MedGe	0,162
P040 03 052 DJ	ND	Homme	Témoign MedGe	0,246
P040 03 053 SZ	ND	Homme	Témoign MedGe	0,156
P040 06 005 SH	61	Homme	Témoign MedGe	0,153
P040 06 006 SM	71	Homme	Témoign MedGe	0,141
P040 06 007 K-J	70	Homme	Témoign MedGe	0,136
N0037612	54	Homme	Témoign EFS Ly	0,126
N0037639	36	Femme	Témoign EFS Ly	0,093
N0037751	54	Homme	Témoign EFS Ly	0,184
N011968	50	Homme	Témoign EFS Ly	0,180
N0247243	42	Homme	Témoign EFS Ly	0,155
N0247366	32	Femme	Témoign EFS Ly	0,152
N027871X	59	Femme	Témoign EFS Ly	0,131
N0352209	65	Femme	Témoign EFS Ly	0,136
N0352217	54	Femme	Témoign EFS Ly	0,127
N0352305	59	Homme	Témoign EFS Ly	0,176

N0352524	62	Femme	Témoin EFS Ly	0,173
N0352604	61	Femme	Témoin EFS Ly	0,142
N0356509	44	Femme	Témoin EFS Ly	0,136
N0389490	49	Homme	Témoin EFS Ly	0,124
N041234	57	Homme	Témoin EFS Ly	0,180
N042229	54	Homme	Témoin EFS Ly	0,121
N057046	51	Femme	Témoin EFS Ly	0,230
N1200020	49	Homme	Témoin EFS Ly	0,208
N1200039	64	Femme	Témoin EFS Ly	0,215
N144032	59	Femme	Témoin EFS Ly	0,169
N146687	51	Femme	Témoin EFS Ly	0,10751
N353910	52	Homme	Témoin EFS Ly	0,10717
N461790	57	Homme	Témoin EFS Ly	0,158
N462187	56	Homme	Témoin EFS Ly	0,10822
N483770	58	Homme	Témoin EFS Ly	0,163
N491627	51	Homme	Témoin EFS Ly	0,184
N50798X	59	Homme	Témoin EFS Ly	0,200
N53016X	59	Homme	Témoin EFS Ly	0,130
N530442	56	Homme	Témoin EFS Ly	0,149
N530485	53	Femme	Témoin EFS Ly	0,177
N543710	57	Femme	Témoin EFS Ly	0,148
N545062	56	Homme	Témoin EFS Ly	0,171
N555658	53	Femme	Témoin EFS Ly	0,145
N59426X	52	Femme	Témoin EFS Ly	0,146
N626516	53	Homme	Témoin EFS Ly	0,138
N828361	63	Femme	Témoin EFS Ly	0,090
N830656	64	Homme	Témoin EFS Ly	0,162

La prolidase est diminuée chez les patients atteints de CCR invasif et les patients atteints de carcinome in situ Tis T0 par rapport aux patients contrôles avec la technique MRM utilisée. Dans cet exemple avec le test MRM utilisé, on fixe le seuil pour la détection des cancers colorectaux invasifs et des Tis à 0,10696 (dose strictement inférieure à celle du deuxième contrôle ColoNeg de la cohorte pour le ratio échantillon/standard de la quantification du pic de la transition 400,2/ 686,3 du peptide de SEQ ID NO : 1. 59 patients CCR ou Tis sur 113 sont en dessous du seuil et sont détectés comme cancer colorectal, alors que seul 1 contrôle ColoNeg, 3 contrôles MedGe et 2 contrôles EFS Ly

sont en dessous du seuil. Soit 52,2% de sensibilité (42,61% à 61,70%) pour 97% de spécificité (94,03% à 98,97%).

Tableau 13

5 Dosages sériques de la prolidase chez les patients adénomes colorectaux

N° Patient	Age	Sexe	Classe	Histologie	prolidase Dose Ratio Unité Arbitraire
CLSP337	63	Femme	Adénome haut risque	Dysplasie de haut grade	0,079
CLSP378	75	Homme	Adénome haut risque	Dysplasie de haut grade	0,1736
GHBD079	76	Homme	Adénome bas risque	Dysplasie de bas grade	0,115

En gardant le seuil fixé ci-dessus à 0,10696, la prolidase est diminuée chez un patient porteur d'adénome colorectal sur 3.

10

Exemple 5 : Utilisation des dosages sériques des marqueurs tumoraux en combinaison

1) Sélection des protéines et dosages

15 La Demanderesse a montré dans l'exemple 4 que des doses anormalement diminuées de peptides traceurs de la prolidase pouvaient être observées dans la circulation sanguine de certains patients atteints d'un cancer colorectal. D'autre part, la Demanderesse a montré dans les demandes de brevet WO2009024691, WO2009019365, WO2009019368, 20 WO2009019369, WO2009019366, WO2009019370, WO2009019367, WO2010004214, WO2010112777 que des doses anormalement élevées ou anormalement diminuées de d'autres marqueurs tumoraux comme Ezrine, L-FABP, Apo A1, Apo A2, Beta2 Microglobuline, ACE, CA19-9, Galectine-3, Protéasome 20S, Protéine Disulfide isomérase (PDI) et ProDefensine A6 25 pouvaient être observées dans la circulation sanguine de certains patients atteints d'un cancer colorectal. Les procédés de dosage de ces marqueurs tumoraux ont été décrits dans les demandes de brevets suscités.

30 Les protéines L-FABP, Apo A1, Apo A2, Beta 2 Microglobuline, HSP60, ACE, CA19-9, Galectine-3, Ezrine, Protéasome 20S (prosome), Timp1 et

M2PK ont été dosées comme décrit dans l'exemple 3.

Les dosages peuvent également être réalisés en utilisant la technologie de dosage en spectrométrie de masse de type MRM, comme décrite dans les exemples 1, 2 et 4. En particulier la prolidase (PEPD) a été dosée comme décrit dans les exemples 1 et 4, et la protéine Alpha-Enolase, la protéine 78 kDa glucose-regulated protein (BIP, GRP78), la protéine Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH, GAPDH), la protéine Heat shock cognate 71 kDa protein (HSC70), la protéine Disulfite isomérase (PDI), la protéine Peroxiredoxin-5, mitochondriale (Peroxy-5) ont été dosées dans les sérums des patients et contrôles comme décrit dans l'exemple 2.

2) Patients et prélèvements

Les patients testés pour la combinaison de marqueurs sont les 113 patients atteints de cancer colorectal invasif (CCR) ou de Tis et les 70 contrôles coloscopie négative (ColoNeg) qui ont été décrits dans l'exemple 4. Les prélèvements testés sont des sérums, sauf pour les protéines Timp1 et M2PK pour lesquelles ce sont les plasmas des mêmes patients, collectés au même moment suivant la procédure décrite dans l'exemple 4.

3) Méthodologie de combinaison et scores

De façon surprenante, l'augmentation ou la diminution de la dose sanguine de deux marqueurs donnés n'est pas systématiquement observée chez les mêmes patients. De ce fait, la combinaison de plusieurs marqueurs tumoraux permet d'augmenter le nombre de patients identifiés comme ayant un cancer colorectal. C'est ainsi qu'un patient A peut présenter une augmentation ou une diminution d'un ou plusieurs marqueurs tumoraux (groupe X), les dits marqueurs du groupe X pouvant être normaux chez un patient B ; chez ce même patient B un ou plusieurs autres marqueurs tumoraux (groupe Y) peuvent être élevés ou diminués, les dits marqueurs du groupe Y pouvant être normaux chez le patient A.

Les différents marqueurs tumoraux dosés par la Demanderesse peuvent ainsi être combinés au moyen de divers algorithmes mathématiques bien connus de l'homme du métier. A titre d'illustration et sans que cet exemple ait un caractère exhaustif, il a été mis en œuvre le procédé suivant :

- Une valeur seuil a été fixée pour chaque marqueur tumoral, en fonction d'une spécificité minimale souhaitée.

- 5 - Lorsque la dose sanguine du marqueur tumoral était augmentée en cas de cancer colorectal, la dose sanguine obtenue pour un patient donné a été divisée par sa valeur seuil. Lorsque la dose sanguine du marqueur tumoral était diminuée en cas de cancer colorectal, la dose sanguine obtenue pour un patient donné a été inversée puis multipliée par sa valeur seuil.
- 10 - Lorsque le ratio, dose sanguine divisée par valeur seuil, était supérieur à 1, le ratio a été multiplié par un coefficient, par exemple 10. La valeur ainsi obtenue a été baptisée « score » pour le patient étudié du marqueur tumoral considéré. Le score est donc systématiquement positif, que le marqueur tumoral soit augmenté ou diminué dans la circulation sanguine des patients atteints de cancer colorectal.
- 15 - Les scores obtenus pour différents marqueurs tumoraux ont été ajoutés en les pondérant d'un facteur propre à chaque marqueur. Dans le cas de l'exemple ci-dessous tous les facteurs de pondération ont été fixés à 1.
- 20 - La somme des scores a été divisée par le nombre total de scores sommés et la valeur ainsi obtenue a été baptisée « score total ».
- Le patient est diagnostiqué comme ayant un cancer colorectal lorsque son score total est augmenté par rapport à un score seuil, fixé à nouveau en fonction de la spécificité souhaitée.

Avec ce procédé, il suffit donc pour un patient donné qu'un seul marqueur ait un score positif pour que le score total en combinaison soit positif.

25 Les scores totaux pour une sélection de différentes combinaisons à 2 marqueurs comprenant la prolidase sont donnés dans le Tableau 16. Les scores totaux pour une sélection de différentes combinaisons à 3, 4, 5 et 8 marqueurs comprenant la prolidase sont donnés dans le Tableau 15. Les scores totaux pour des exemples de combinaisons à 3 et à 4 marqueurs ne

30 comprenant pas la prolidase sont donnés dans le tableau 16.

La combinaison des marqueurs a été évaluée sur le même groupe de 113 patients atteints de cancer colorectal invasif ou de Tis, et de 70 contrôles témoins avec une coloscopie totalement négative.

35 Le tableau 14 donne les résultats pour la prolidase en dose (dose du marqueur diminuée chez certains cancers colorectaux CCR invasifs et certains Tis) et en score (score augmenté, >1, chez certains cancers colorectaux CCR

invasifs et certains Tis).

Tableau 14

Patient	Classe	Stade	prolidase Dose Ratio Unité Arbitraire	prolidase Score
Seuil			0,10696	1
CBSE011	Tis	T0	0,113	0,95
CLSP234	Tis	T0	0,105	16,2
CLSP286	Tis	T0	0,109	0,98
CLSP300	Tis	T0	0,123	0,87
CLSP315	Tis	T0	0,096	17,8
CLSP367	Tis	T0	0,109	0,98
CLSP724	Tis	T0	0,122	0,88
CNSE003	Tis	T0	0,115	0,93
CNSE004	Tis	T0	0,132	0,81
GHBD015	Tis	T0	0,135	0,79
GHBD036	Tis	T0	0,148	0,72
CBSE001	CCR	I	0,098	17,5
CBSE016	CCR	I	0,091	18,8
CLSP047	CCR	I	0,108	0,99
CLSP162	CCR	I	0,163	0,65
CLSP196	CCR	I	0,103	16,7
CLSP224	CCR	I	0,080	21,5
CLSP235	CCR	I	0,079	21,6
CLSP263	CCR	I	0,123	0,87
CLSP340	CCR	I	0,143	0,75
CLSP344	CCR	I	0,105	16,4
CLSP364	CCR	I	0,093	18,4
CLSP376	CCR	I	0,141	0,76
GHBD003	CCR	I	0,111	0,97
GHBD094	CCR	I	0,144	0,74
CLSP075	CCR	II	0,168	0,64
CLSP076	CCR	II	0,101	16,9
CLSP080	CCR	II	0,133	0,80
CLSP096	CCR	II	0,110	0,97
CLSP110	CCR	II	0,113	0,94
CLSP117	CCR	II	0,097	17,6
CLSP130	CCR	II	0,109	0,98
CLSP133	CCR	II	0,077	22,2
CLSP143	CCR	II	0,065	26,2
CLSP147	CCR	II	0,084	20,5
CLSP154	CCR	II	0,089	19,2
CLSP155	CCR	II	0,065	26,2
CLSP157	CCR	II	0,097	17,7

CLSP165	CCR	II	0,114	0,93
CLSP170	CCR	II	0,070	24,4
CLSP173	CCR	II	0,093	18,4
CLSP177	CCR	II	0,057	30,3
CLSP178	CCR	II	0,109	0,98
CLSP179	CCR	II	0,095	18,0
CLSP186	CCR	II	0,131	0,81
CLSP194	CCR	II	0,093	18,3
CLSP201	CCR	II	0,086	20,0
CLSP207	CCR	II	0,077	22,3
CLSP209	CCR	II	0,118	0,90
CLSP220	CCR	II	0,090	19,0
CLSP222	CCR	II	0,083	20,7
CLSP253	CCR	II	0,106	16,1
CLSP256	CCR	II	0,088	19,4
CLSP280	CCR	II	0,103	16,5
CLSP296	CCR	II	0,169	0,63
CLSP310	CCR	II	0,122	0,88
CLSP327	CCR	II	0,063	27,0
CLSP333	CCR	II	0,116	0,92
CLSP341	CCR	II	0,079	21,6
CLSP346	CCR	II	0,105	16,3
CLSP347	CCR	II	0,132	0,81
CLSP380	CCR	II	0,083	20,7
CNSE002	CCR	II	0,087	19,7
GHBD021	CCR	II	0,117	0,92
GHBD043	CCR	II	0,084	20,4
GHBD064	CCR	II	0,099	17,2
GHBD066	CCR	II	0,138	0,78
GHBD075	CCR	II	0,104	16,4
GHBD087	CCR	II	0,123	0,87
GHBD090	CCR	II	0,191	0,56
GHBD096	CCR	II	0,110	0,98
GHBD100	CCR	II	0,067	25,4
GHBD103	CCR	II	0,192	0,56
CBSE023	CCR	III	0,141	0,76
CLSP044	CCR	III	0,113	0,95
CLSP074	CCR	III	0,058	29,4
CLSP078	CCR	III	0,078	21,8
CLSP081	CCR	III	0,059	28,8
CLSP098	CCR	III	0,057	30,0
CLSP174	CCR	III	0,086	19,8
CLSP227	CCR	III	0,093	18,5
CLSP233	CCR	III	0,078	21,9

CLSP255	CCR	III	0,078	22,0
CLSP289	CCR	III	0,129	0,83
CLSP320	CCR	III	0,104	16,4
CLSP324	CCR	III	0,061	28,2
CLSP383	CCR	III	0,131	0,82
CLSP384	CCR	III	0,144	0,74
CNSE001	CCR	III	0,131	0,82
CNSE016	CCR	III	0,089	19,2
CNSE017	CCR	III	0,093	18,4
CSEM015	CCR	III	0,147	0,73
CSEM029	CCR	III	0,098	17,5
GHBD004	CCR	III	0,092	18,6
GHBD017	CCR	III	0,078	22,0
GHBD034	CCR	III	0,139	0,77
GHBD042	CCR	III	0,140	0,77
GHBD045	CCR	III	0,032	54,3
GHBD089	CCR	III	0,093	18,4
GHBD105	CCR	III	0,118	0,90
CBSE012	CCR	IV	0,095	18,0
CBSE026	CCR	IV	0,073	23,3
CLSP156	CCR	IV	0,066	26,1
CLSP159	CCR	IV	0,170	0,63
CLSP167	CCR	IV	0,089	19,3
CLSP260	CCR	IV	0,120	0,89
CLSP334	CCR	IV	0,189	0,57
CLSP357	CCR	IV	0,125	0,85
CLSP365	CCR	IV	0,176	0,61
CLSP366	CCR	IV	0,157	0,68
GHBD022	CCR	IV	0,145	0,74
GHBD071	CCR	IV	0,149	0,72
CLSP197	CCR	NA	0,128	0,83
HGED005	Témoin ColoNeg		0,112	0,96
PROMIS 21-01-005	Témoin ColoNeg		0,124	0,86
PROMIS 21-01-006	Témoin ColoNeg		0,177	0,60
PROMIS 21-01-009	Témoin ColoNeg		0,149	0,72
PROMIS 21-01-011	Témoin ColoNeg		0,209	0,51
PROMIS 21-01-012	Témoin ColoNeg		0,129	0,83
PROMIS 21-02-001	Témoin ColoNeg		0,159	0,67
PROMIS 21-02-003	Témoin ColoNeg		0,188	0,57
PROMIS 21-02-004	Témoin ColoNeg		0,294	0,36
PROMIS 21-02-006	Témoin ColoNeg		0,130	0,82
PROMIS 21-02-008	Témoin ColoNeg		0,197	0,54
PROMIS 21-02-011	Témoin ColoNeg		0,120	0,89
PROMIS 21-02-014	Témoin ColoNeg		0,123	0,87

PROMIS 21-02-016	Témoin ColoNeg		0,191	0,56
PROMIS 21-03-004	Témoin ColoNeg		0,136	0,79
PROMIS 21-03-013	Témoin ColoNeg		0,279	0,38
PROMIS 21-03-015	Témoin ColoNeg		0,194	0,55
PROMIS 21-04-002	Témoin ColoNeg		0,117	0,92
PROMIS 21-04-006	Témoin ColoNeg		0,111	0,96
PROMIS 21-04-007	Témoin ColoNeg		0,171	0,62
PROMIS 21-04-008	Témoin ColoNeg		0,237	0,45
PROMIS 21-04-009	Témoin ColoNeg		0,203	0,53
PROMIS 21-04-013	Témoin ColoNeg		0,121	0,88
PROMIS 21-07-004	Témoin ColoNeg		0,149	0,72
PROMIS 21-12-001	Témoin ColoNeg		0,159	0,67
PROMIS 21-12-007	Témoin ColoNeg		0,10716	0,998
PROMIS 21-12-011	Témoin ColoNeg		0,169	0,63
PROMIS 21-22-001	Témoin ColoNeg		0,195	0,55
PROMIS 21-22-006	Témoin ColoNeg		0,155	0,69
PROMIS 21-22-008	Témoin ColoNeg		0,129	0,83
PROMIS 37-03-004	Témoin ColoNeg		0,110	0,98
PROMIS 37-04-001	Témoin ColoNeg		0,252	0,42
PROMIS 37-04-005	Témoin ColoNeg		0,112	0,96
PROMIS 37-05-008	Témoin ColoNeg		0,160	0,67
PROMIS 37-06-001	Témoin ColoNeg		0,144	0,74
PROMIS 37-09-002	Témoin ColoNeg		0,167	0,64
PROMIS 37-11-001	Témoin ColoNeg		0,10696	1,000
PROMIS 37-11-002	Témoin ColoNeg		0,170	0,63
PROMIS 37-11-011	Témoin ColoNeg		0,121	0,88
PROMIS 37-11-016	Témoin ColoNeg		0,153	0,70
PROMIS 37-12-002	Témoin ColoNeg		0,222	0,48
PROMIS 37-13-003	Témoin ColoNeg		0,174	0,62
PROMIS 37-13-006	Témoin ColoNeg		0,160	0,67
PROMIS 37-13-008	Témoin ColoNeg		0,203	0,53
PROMIS 37-14-009	Témoin ColoNeg		0,132	0,81
PROMIS 37-14-018	Témoin ColoNeg		0,087	19,7
PROMIS 37-14-021	Témoin ColoNeg		0,129	0,83
PROMIS 37-15-002	Témoin ColoNeg		0,165	0,65
PROMIS 37-15-006	Témoin ColoNeg		0,239	0,45
PROMIS 37-16-001	Témoin ColoNeg		0,256	0,42
PROMIS 37-17-001	Témoin ColoNeg		0,184	0,58
PROMIS 37-17-003	Témoin ColoNeg		0,140	0,76
PROMIS 37-17-004	Témoin ColoNeg		0,139	0,77
PROMIS 37-18-001	Témoin ColoNeg		0,134	0,80
PROMIS 37-18-003	Témoin ColoNeg		0,158	0,68
PROMIS 37-18-004	Témoin ColoNeg		0,188	0,57
PROMIS 37-18-005	Témoin ColoNeg		0,111	0,97

PROMIS 37-18-024	Témoin ColoNeg		0,128	0,84
PROMIS 37-19-006	Témoin ColoNeg		0,122	0,88
PROMIS 37-19-007	Témoin ColoNeg		0,136	0,79
PROMIS 37-20-004	Témoin ColoNeg		0,179	0,60
PROMIS 71-02-003	Témoin ColoNeg		0,159	0,67
PROMIS 71-04-003	Témoin ColoNeg		0,161	0,67
PROMIS 71-09-007	Témoin ColoNeg		0,175	0,61
PROMIS 71-10-001	Témoin ColoNeg		0,171	0,63
PROMIS 71-10-007	Témoin ColoNeg		0,162	0,66
PROMIS 71-11-001	Témoin ColoNeg		0,191	0,56
PROMIS 71-11-006	Témoin ColoNeg		0,155	0,69
PROMIS 71-11-008	Témoin ColoNeg		0,181	0,59
PROMIS 71-11-009	Témoin ColoNeg		0,140	0,76

4) Résultats des combinaisons de la prolidase avec un autre marqueur chez les patients et les contrôles

En suivant le même principe de score, on peut combiner les résultats obtenus pour la prolidase avec les résultats obtenus avec d'autres marqueurs, 2 à 2. Pour un patient, si un marqueur est retenu comme étant au-dessus d'un seuil fixé à l'avance en fonction de la spécificité souhaité, le score final sera considéré comme significativement positif.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Galectine 3 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^a » augmentés chez 65 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Gal3 était augmenté chez 13 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et LFABP permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^b » augmentés chez 77 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage LFABP était augmenté chez 42 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients

Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^c » augmentés chez 71 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
5 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage ACE était augmenté chez 29 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients
10 Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et HSP60 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^d » augmentés chez 68 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
15 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage HSP60 était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Alpha-Enolase permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^e » augmentés chez 71 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints
25 d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Alpha-Enolase était augmenté chez 17 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et BIP permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^f » augmentés chez 67 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
30 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul score du marqueur BIP était augmenté chez 24
35 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2

patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et G3PDH permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^g » augmentés chez 76 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
5 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage G3PDH était augmenté chez 31 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients
10 Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et HSP71 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^h » augmentés chez 67 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
15 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage HSP71 était augmenté chez 13 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Peroxi-5 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2ⁱ » augmentés chez 71 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
20 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Peroxi-5 était augmenté chez 24 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et CA19-9 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^j » augmentés chez 71 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
30 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage CA19-9 était augmenté chez 23 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient
35

Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et ApoA1 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^k » augmentés chez 64 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
5 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul score du marqueur ApoA1 était augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1
10 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et ApoA2 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^l » augmentés chez 65 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
15 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul score du marqueur ApoA2 était augmenté chez 10 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Prosomes permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^m » augmentés chez 68 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
20 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Prosomes était augmenté chez 14 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et M2PK permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2ⁿ » augmentés chez 72 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
30 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage M2PK était augmenté chez 24 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients
35

Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Timp1 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2° » augmentés chez 67 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
5 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Timp1 était augmenté chez 24 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients
10 Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Ezrine permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^p » augmentés chez 65 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
15 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Ezrine était augmenté chez 17 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et PDI permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 2^q » augmentés chez 72 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le
20 seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul score de PDI était augmenté chez 29 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase et Beta2-microglobuline permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des
30 scores totaux « 2^r » augmentés chez 69 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, et le seul dosage Beta2-microglobuline était
35 augmenté chez 29 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou

d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

Tableau 15 : Scores des associations de chaque marqueur pris isolément en combinaison avec la prolidase

Patient	Pathologies	Stade	Score 2 ^a	Score 2 ^b	Score 2 ^c	Score 2 ^d	Score 2 ^e	Score 2 ^f	Score 2 ^g	Score 2 ^h	Score 2 ⁱ	Score 2 ^j	Score 2 ^k	Score 2 ^l	Score 2 ^m	Score 2 ⁿ	Score 2 ^o	Score 2 ^p	Score 2 ^q	Score 2 ^r
CBSE011	Tis	T0	0.66	0.65	0.72	0.47	0.88	0.88	0.88	0.88	0.88	0.55	0.72	0.94	0.75	19.9	10.7	9.5	0.87	9.60
CLSP234	Tis	T0	8.49	17.6	8.29	8.12	8.34	8.57	8.47	8.44	8.33	8.18	8.31	8.51	8.55	8.28	8.54	8.28	8.57	16.3
CLSP286	Tis	T0	0.85	0.54	0.49	0.49	9.26	0.98	11.0	8.54	9.29	0.60	0.90	0.83	0.67	0.76	0.76	0.72	8.98	0.79
CLSP300	Tis	T0	0.47	0.86	0.62	0.43	0.64	9.36	0.71	0.80	0.64	0.49	0.62	0.75	0.74	0.76	0.71	0.63	11.6	0.75
CLSP315	Tis	T0	9.19	18.2	8.99	8.91	9.06	17.8	9.10	9.03	9.11	8.96	9.01	9.26	9.03	9.18	9.22	9.08	9.38	17.1
CLSP367	Tis	T0	0.83	0.87	0.60	0.92	0.49	0.89	14.8	9.85	10.0	0.60	11.5	9.06	0.73	11.6	8.89	0.95	0.83	11.5
CLSP724	Tis	T0	0.82	10.4	0.55	0.44	9.47	0.85	14.0	10.5	0.82	11.9	0.63	0.91	0.88	0.92	0.80	0.79	0.82	0.72
CNSE003	Tis	T0	0.95	15.4	0.46	14.1	0.74	0.94	0.79	0.67	9.30	0.60	0.76	0.78	0.64	16.0	0.79	0.77	8.83	8.49
CNSE004	Tis	T0	0.77	0.63	0.40	0.62	0.71	8.80	0.75	0.56	0.73	0.44	0.78	0.82	0.61	0.87	0.66	0.83	8.70	0.70
GHD015	Tis	T0	0.68	11.1	0.49	8.98	10.2	0.82	14.8	0.67	12.9	0.54	0.61	0.77	0.88	0.82	0.81	19.37	0.81	0.77
GHD036	Tis	T0	0.56	0.69	0.68	0.67	11.3	9.06	12.1	0.79	10.2	0.46	0.53	0.72	0.49	0.55	8.64	0.55	8.73	9.46
CBSE001	CCR	I	9.12	21.2	9.22	29.1	9.22	9.23	9.23	9.10	9.20	8.82	17.5	17.5	17.5	9.17	19.9	16.9	9.19	9.11
CBSE016	CCR	I	9.81	23.9	22.2	18.3	9.70	9.79	9.75	9.60	9.85	9.42	9.61	9.83	9.64	9.71	20.3	17.9	9.80	9.85
CLSP047	CCR	I	0.77	0.51	0.62	0.50	0.63	0.98	0.79	0.66	0.90	0.52	0.99	0.99	0.99	0.99	0.90	0.79	9.90	0.88
CLSP162	CCR	I	0.67	0.65	0.33	0.33	0.58	0.75	8.73	0.63	0.44	0.34	22.8	0.65	0.71	0.59	0.59	0.72	0.75	0.53
CLSP196	CCR	I	8.62	17.0	8.77	8.56	8.53	8.75	8.62	8.55	8.73	8.56	8.61	8.74	8.73	8.67	8.67	8.54	8.77	8.73
CLSP224	CCR	I	11.1	46.2	19.5	50.6	11.0	11.2	11.1	11.0	11.2	10.9	24.1	11.2	23.1	19.5	11.2	11.2	11.2	20.5
CLSP235	CCR	I	11.0	10.9	10.8	10.8	10.9	22.5	10.8	10.8	11.0	10.9	11.2	11.2	10.9	10.9	10.8	10.8	25.7	10.9
CLSP263	CCR	I	9.61	0.85	0.56	0.77	0.79	0.79	12.6	9.32	0.78	12.5	0.70	0.80	13.0	0.64	0.77	0.73	0.78	10.9
CLSP340	CCR	I	0.72	0.58	0.53	0.55	9.82	0.65	9.18	10.9	0.85	0.45	0.61	0.72	0.67	0.55	0.64	0.78	0.67	0.73
CLSP344	CCR	I	8.44	8.38	8.35	8.18	8.43	8.59	8.60	8.41	8.46	8.23	8.50	8.60	8.57	8.33	8.47	25.29	8.64	8.64
CLSP364	CCR	I	9.48	9.25	9.33	9.18	9.51	9.46	9.63	9.49	17.6	9.30	9.30	9.50	9.46	9.41	9.54	9.48	9.48	9.65
CLSP376	CCR	I	0.68	0.51	0.52	0.38	0.74	0.71	0.84	0.69	0.73	0.70	0.76	0.76	0.76	0.77	0.64	0.71	0.66	0.75
GHD003	CCR	I	0.63	0.53	0.60	0.48	0.97	0.86	0.75	0.70	0.78	0.55	0.69	0.90	0.64	0.61	0.75	0.64	0.86	0.74
GHD094	CCR	I	0.99	0.77	0.50	0.37	0.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.46	0.58	0.73	0.68	0.76	0.68	0.35	0.74	0.79
CLSP075	CCR	II	0.62	0.59	0.41	0.32	0.61	0.74	0.63	0.54	0.72	0.39	0.64	0.64	0.64	0.53	0.69	0.79	0.79	0.68

CLSP076	CCR	II	8,77	17,1	8,58	20,8	8,69	8,95	8,77	8,67	8,76	8,48	16,9	16,9	16,9	8,71	8,88	8,69	8,93	8,81
CLSP080	CCR	II	0,64	0,45	0,47	0,40	0,58	0,77	0,66	0,82	0,72	0,51	0,54	9,15	0,64	0,62	0,67	0,55	0,77	0,80
CLSP096	CCR	II	0,73	0,95	24,4	0,49	0,78	0,95	0,66	0,85	0,75	0,67	0,82	0,71	0,62	13,4	0,96	0,75	0,93	11,7
CLSP110	CCR	II	0,66	9,18	0,47	0,47	0,73	9,05	0,74	0,63	0,80	0,53	0,77	0,81	0,74	0,74	0,87	0,66	9,41	0,90
CLSP117	CCR	II	8,98	25,7	9,04	9,11	17,0	9,13	21,8	21,3	9,28	8,92	40,8	9,04	8,76	17,6	18,5	9,0	9,07	20,3
CLSP130	CCR	II	10,6	9,82	0,63	0,49	0,76	0,96	0,76	0,64	0,70	0,58	0,70	0,84	0,83	0,73	0,98	0,73	0,96	9,74
CLSP133	CCR	II	11,4	11,3	11,2	11,1	11,2	19,9	11,3	11,2	11,2	11,2	20,2	11,5	22,2	11,4	11,3	11,2	20,2	11,4
CLSP143	CCR	II	13,4	13,4	23,4	13,1	13,3	13,6	12,9	13,2	13,3	13,2	13,4	13,4	13,3	13,5	13,4	13,3	23,7	13,5
CLSP147	CCR	II	19,5	10,4	10,4	10,6	10,5	10,7	10,5	10,5	10,5	10,3	21,1	10,7	33,0	32,4	19,2	10,6	19,5	18,8
CLSP154	CCR	II	9,76	9,91	30,4	9,58	9,84	18,1	9,89	9,83	9,90	9,79	9,90	10,1	9,86	9,88	9,90	9,86	10,1	9,98
CLSP155	CCR	II	13,5	13,3	34,9	13,1	13,3	13,5	13,3	13,3	13,5	28,3	13,4	13,4	13,2	13,5	13,4	13,2	13,6	13,5
CLSP157	CCR	II	9,10	9,30	8,94	8,86	9,06	9,18	18,7	9,00	18,8	8,89	9,21	9,24	8,98	9,13	9,11	9,24	9,33	9,03
CLSP165	CCR	II	0,62	0,76	0,47	0,47	0,76	9,10	0,74	0,81	0,74	0,53	0,93	8,76	0,68	0,66	0,80	0,63	9,32	0,70
CLSP170	CCR	II	12,3	23,1	21,8	12,2	12,4	12,6	12,7	12,4	12,4	12,4	12,4	12,7	12,6	12,5	12,6	12,3	12,6	12,4
CLSP173	CCR	II	9,70	9,24	9,29	9,42	9,56	9,70	17,3	9,42	18,4	9,43	9,55	17,3	9,45	9,56	9,64	9,71	9,64	9,61
CLSP177	CCR	II	15,5	15,6	15,3	27,4	26,3	15,5	30,5	15,6	34,2	27,0	29,3	15,6	15,6	30,3	25,6	27,5	15,3	15,5
CLSP178	CCR	II	0,80	112,0	39,5	25,8	0,88	0,88	0,97	0,84	0,83	0,71	0,84	0,94	0,70	0,98	0,86	0,74	0,94	0,83
CLSP179	CCR	II	19,2	17,3	20,0	8,99	9,15	9,44	9,19	9,14	9,28	9,20	9,27	9,45	9,16	9,37	9,23	9,13	9,39	9,33
CLSP186	CCR	II	0,73	11,7	0,58	0,41	0,60	0,81	0,54	0,82	0,68	0,48	0,61	0,71	0,67	0,58	0,85	0,74	0,86	12,7
CLSP194	CCR	II	9,39	25,1	9,27	9,35	9,40	9,55	9,48	9,32	9,53	9,20	9,26	9,56	18,3	9,26	9,45	9,41	17,6	18,1
CLSP201	CCR	II	10,2	23,6	10,3	79,4	10,2	10,4	10,2	10,2	10,4	10,0	10,4	10,2	10,2	10,1	26,1	10,2	10,3	22,7
CLSP207	CCR	II	11,5	23,8	11,3	11,1	11,3	20,3	11,3	11,3	11,4	21,6	22,3	22,3	22,3	11,3	11,5	11,3	11,6	11,4
CLSP209	CCR	II	0,83	15,4	0,57	0,69	0,68	8,74	0,76	0,72	0,73	0,52	0,69	0,76	9,42	0,59	12,5	0,6	8,71	0,73
CLSP220	CCR	II	18,2	18,4	23,7	9,51	9,72	18,9	9,96	9,71	9,78	9,83	9,69	19,8	9,68	9,82	9,95	9,76	9,98	9,92
CLSP222	CCR	II	10,6	28,0	20,7	24,9	10,7	18,9	10,7	10,6	18,6	10,4	10,7	10,6	10,7	24,9	19,5	10,7	10,8	19,7
CLSP253	CCR	II	8,33	8,38	8,22	8,03	8,25	17,2	8,29	8,22	8,41	8,10	16,1	16,1	16,1	8,33	8,36	8,21	16,3	8,41
CLSP256	CCR	II	10,2	10,1	10,1	74,3	10,0	10,1	10,2	10,0	10,1	9,97	10,0	10,0	10,2	37,9	17,9	10,2	10,1	19,1
CLSP280	CCR	II	8,72	8,57	8,53	8,27	8,58	8,66	24,6	21,2	18,5	8,49	8,66	8,65	8,65	8,55	17,7	8,6	8,65	8,67
CLSP296	CCR	II	0,48	8,63	0,54	0,71	0,51	8,80	0,56	0,60	0,52	29,7	32,8	0,71	0,61	0,42	16,5	0,5	0,80	0,59

CLSP310	CCR	II	0.68	0.59	0.66	0.44	0.70	0.84	0.77	0.66	0.75	0.62	0.72	0.86	0.79	0.65	0.87	0.66	0.93	0.83	
CLSP327	CCR	II	13.8	13.9	13.6	13.8	13.8	13.9	21.7	13.8	13.9	13.5	13.7	13.9	13.7	14.0	13.9	13.9	13.9	14.0	13.8
CLSP333	CCR	II	0.79	8.84	0.65	0.46	0.68	0.82	0.91	0.75	0.85	0.95	0.64	0.82	0.93	0.64	0.84	0.74	0.78	8.58	
CLSP341	CCR	II	11.1	11.0	10.9	22.0	11.2	11.2	20.7	11.2	11.1	10.9	11.1	11.2	11.0	11.0	11.2	11.0	11.3	11.2	
CLSP346	CCR	II	8.52	8.44	21.7	8.15	17.5	8.42	18.1	8.55	8.62	24.2	8.38	8.43	8.53	8.63	8.56	8.34	8.42	16.8	
CLSP347	CCR	II	8.60	0.74	14.4	0.41	10.5	0.69	13.0	0.73	0.90	0.44	0.50	0.76	8.43	0.79	0.86	0.84	0.69	0.79	
CLSP380	CCR	II	10.7	10.8	10.4	10.6	10.7	10.7	23.1	10.8	10.8	10.4	10.7	10.7	10.7	19.2	10.6	19.4	10.7	10.8	
CNSE002	CCR	II	10.1	9.92	10.3	9.84	10.1	10.2	10.1	10.0	10.2	9.95	33.2	19.6	10.3	19.7	10.3	10.1	10.2	10.2	
GHB0021	CCR	II	0.72	0.51	0.52	0.62	0.70	0.93	0.73	0.66	0.83	0.51	0.83	0.85	0.92	0.61	0.77	0.66	0.87	0.80	
GHB0043	CCR	II	10.5	10.5	10.5	10.5	10.4	18.3	10.5	10.4	10.4	10.4	10.5	10.5	10.4	10.6	30.7	10.5	10.7	21.5	
GHB0064	CCR	II	17.3	27.1	48.4	9.03	8.84	9.00	9.04	8.82	9.02	8.76	8.75	9.10	9.03	21.9	9.07	19.36	9.07	16.6	
GHB0066	CCR	II	0.76	0.75	0.46	0.66	0.65	0.85	0.77	0.59	0.56	0.44	0.64	8.91	0.86	0.70	0.84	0.60	0.84	0.76	
GHB0075	CCR	II	8.55	8.54	8.51	20.1	8.48	8.70	8.49	8.38	8.54	8.26	8.52	8.64	8.50	8.53	8.45	8.58	8.62	8.43	
GHB0087	CCR	II	0.78	0.90	0.69	0.80	0.64	0.90	0.61	0.57	0.64	0.56	0.64	0.69	0.64	0.61	0.75	0.58	8.47	0.71	
GHB0090	CCR	II	0.44	0.53	0.37	0.28	0.45	0.63	0.43	0.50	0.54	0.37	0.37	0.59	0.55	0.65	0.61	0.45	0.60	0.55	
GHB0096	CCR	II	0.64	0.84	0.85	0.49	0.59	0.98	0.59	0.56	0.76	0.53	0.90	8.82	0.70	12.0	0.82	0.59	9.99	0.83	
GHB0100	CCR	II	16.4	21.9	12.9	22.1	13.0	25.4	25.4	25.4	25.4	12.8	20.7	13.1	12.9	26.8	25.8	13.2	25.4	26.2	
GHB0103	CCR	II	0.58	8.99	0.40	0.28	0.56	0.72	0.77	0.56	0.63	0.36	0.60	0.70	0.70	0.49	0.60	0.57	0.65	8.90	
CBSE023	CCR	III	8.86	9.67	0.65	0.63	10.1	0.86	14.5	0.80	9.81	0.61	0.67	0.76	9.79	0.76	0.76	0.83	0.82	0.73	
CLSP044	CCR	III	0.76	0.72	140.3	0.47	0.79	0.82	0.90	0.73	11.3	0.56	0.68	0.75	0.95	0.67	0.77	0.73	0.86	0.79	
CLSP074	CCR	III	15.0	14.9	14.8	31.3	14.9	23.4	15.0	14.9	28.2	14.9	29.4	29.4	29.4	15.1	24.7	15.0	15.2	23.1	
CLSP078	CCR	III	11.3	29.1	11.0	31.1	21.8	11.4	11.1	11.1	19.1	11.0	11.2	11.1	11.2	11.3	11.3	11.1	18.9	11.3	
CLSP081	CCR	III	14.7	14.6	14.6	52.2	14.8	14.8	22.9	14.7	23.0	14.5	28.8	28.8	28.8	28.8	28.8	14.8	14.8	23.5	
CLSP098	CCR	III	15.2	15.2	15.1	15.5	15.0	24.9	24.2	15.2	15.4	15.1	26.2	15.5	15.1	15.2	15.2	24.7	25.9	15.3	
CLSP174	CCR	III	20.0	27.0	69.0	10.2	19.5	10.2	19.1	19.2	26.5	116.2	10.3	10.3	18.2	19.8	30.7	21.8	10.2	10.2	
CLSP227	CCR	III	9.73	46.8	36.6	9.24	9.49	18.3	9.53	9.45	19.5	9.42	19.0	9.61	9.51	17.5	9.55	9.59	9.62	18.8	
CLSP233	CCR	III	11.3	11.1	11.1	11.0	11.2	22.4	11.2	11.1	11.2	11.1	21.9	21.9	21.9	11.2	11.2	11.1	19.3	11.2	
CLSP255	CCR	III	11.3	27.8	11.1	11.2	11.2	11.5	11.3	11.2	11.4	37.4	52.0	11.4	11.1	11.2	11.4	11.2	11.5	11.4	
CLSP289	CCR	III	0.70	0.85	0.52	0.42	0.73	0.89	0.79	0.67	0.71	0.47	0.76	0.87	0.85	0.63	0.68	0.61	0.86	0.65	

CLSP320	CCR	III	8,42	8,40	8,41	8,21	8,32	8,65	8,51	8,43	8,40	8,28	8,30	8,52	8,56	8,57	8,47	8,50	16,8	8,45
CLSP324	CCR	III	14,3	14,2	22,7	14,4	23,9	14,6	24,5	23,8	22,9	14,5	37,8	14,5	22,9	14,5	14,5	14,4	14,4	14,4
CLSP383	CCR	III	0,69	0,47	0,63	0,64	0,68	0,79	0,89	0,74	0,71	0,45	0,82	0,82	0,82	10,5	10,5	0,7	0,82	0,80
CLSP384	CCR	III	0,58	13,5	129,7	0,37	0,66	0,75	8,65	0,76	0,68	11,1	10,9	0,73	12,9	24,0	0,71	0,61	0,66	0,78
CNSE001	CCR	III	0,66	0,72	12,6	8,55	0,79	0,89	0,73	0,63	0,89	16,6	27,2	0,83	0,63	0,69	0,80	0,82	9,36	0,71
CNSE016	CCR	III	9,93	73,3	48,4	101,5	10,0	9,96	9,94	9,85	9,99	46,2	9,89	10,0	9,96	20,5	9,91	18,71	9,80	9,93
CNSE017	CCR	III	9,54	22,5	9,30	9,53	9,43	18,5	9,34	9,33	9,52	9,28	20,9	9,52	9,45	9,43	9,52	18,13	20,9	9,57
CSEM015	CCR	III	0,66	10,0	0,53	0,36	0,57	0,85	0,52	0,48	0,51	0,39	0,85	0,75	0,56	0,73	0,73	0,52	9,54	0,62
CSEM029	CCR	III	9,10	9,07	9,02	9,01	8,96	9,22	8,97	8,96	9,15	8,86	9,02	9,16	9,18	9,16	17,6	9,0	18,8	9,12
GHD004	CCR	III	9,43	9,42	40,0	18,2	18,6	9,77	9,39	9,41	9,51	9,46	9,51	9,71	9,53	9,53	9,62	9,47	9,72	9,67
GHD017	CCR	III	11,2	11,0	11,1	11,4	11,2	11,4	11,3	11,2	11,2	11,1	11,2	11,3	11,3	11,3	19,6	11,3	11,4	11,4
GHD034	CCR	III	0,79	0,41	0,45	0,69	8,74	0,86	16,7	10,3	0,87	0,46	0,69	0,60	0,63	0,58	0,75	9,57	0,85	0,63
GHD042	CCR	III	12,2	0,64	0,44	0,38	0,67	0,81	0,70	0,53	10,7	0,73	0,65	0,86	0,54	0,63	0,73	0,61	0,78	0,76
GHD045	CCR	III	27,5	27,2	27,2	27,2	27,3	27,6	27,3	27,3	27,3	27,2	27,5	27,5	27,4	27,6	27,6	27,3	27,5	36,7
GHD089	CCR	III	9,46	9,58	55,4	9,22	9,47	9,71	9,46	9,33	9,45	9,47	9,47	17,6	9,33	9,45	9,47	9,39	17,9	9,59
GHD105	CCR	III	0,71	0,76	0,61	0,45	0,69	0,95	0,78	0,59	0,66	15,5	0,87	0,79	13,2	15,2	8,58	0,67	0,78	0,92
CBSE012	CCR	IV	9,26	9,25	9,50	32,1	9,22	17,2	9,12	9,17	9,17	27,0	19,1	9,46	18,0	17,3	9,42	9,32	17,7	9,25
CBSE026	CCR	IV	12,0	35,4	640,7	109,0	12,1	12,0	12,0	11,9	12,1	9596	12,1	12,0	27,9	23,3	23,3	32,7	12,0	23,4
CLSP156	CCR	IV	25,2	13,5	39,5	13,0	13,4	13,5	27,2	21,6	13,5	30,4	13,3	13,5	13,5	24,1	13,4	13,3	21,4	13,5
CLSP159	CCR	IV	0,69	10,3	84,1	43,8	0,69	0,77	0,69	0,61	34,0	66,5	0,62	0,71	0,68	21,7	0,78	0,72	0,74	0,80
CLSP167	CCR	IV	9,94	9,74	9,86	9,64	9,85	18,8	9,94	9,83	9,94	23,8	10,1	9,97	9,90	9,91	18,0	9,9	18,8	18,5
CLSP260	CCR	IV	0,57	59,0	57,0	14,7	9,18	0,86	0,94	0,76	8,67	0,89	0,81	0,70	11,4	0,84	0,75	11,74	0,90	0,92
CLSP334	CCR	IV	0,53	0,46	0,48	0,28	10,3	0,60	12,1	8,85	10,2	0,38	0,64	0,76	8,29	8,84	0,53	0,72	0,65	0,46
CLSP357	CCR	IV	0,73	0,66	18,1	0,43	0,78	0,70	9,85	0,87	0,83	31,1	0,64	0,81	0,87	0,90	0,71	0,64	0,73	0,91
CLSP365	CCR	IV	0,61	0,64	56,0	16,6	0,70	0,68	0,62	0,54	0,60	456,0	0,57	0,73	11,4	11,5	0,79	8,77	0,64	0,66
CLSP366	CCR	IV	0,50	0,58	0,65	0,78	0,72	0,71	8,79	0,72	0,79	21,4	0,68	0,73	0,54	9,36	0,65	0,60	0,74	0,63
GHD022	CCR	IV	0,67	11,7	2584	41,4	9,12	0,78	0,74	0,62	0,64	9,03	0,48	0,79	0,81	0,81	9,68	0,86	0,70	0,67
GHD071	CCR	IV	9,77	32,4	72,1	65,1	18,8	8,63	11,0	8,61	12,2	16,9	0,70	11,3	0,85	12,7	0,66	43,03	0,81	0,61
CLSP197	CCR	NA	0,73	0,79	0,49	0,42	0,71	0,83	0,83	0,83	0,83	0,67	0,71	0,79	0,82	0,87	0,49	0,69	0,83	0,70

HGED005	Témoins ColoNeg	0,88	0,67	0,72	0,68	8,85	0,86	0,87	0,84	0,96	0,59	0,96	0,96	0,94	0,97	11,09	0,82	0,89
PROMIS 21-01-005	Témoins ColoNeg	0,64	0,74	0,49	0,43	0,68	0,91	0,69	0,58	0,63	0,86	0,69	0,86	0,67	0,75	0,67	0,85	0,78
PROMIS 21-01-006	Témoins ColoNeg	0,47	0,44	0,30	0,30	0,54	0,74	0,46	0,55	0,46	0,35	0,39	0,69	0,48	0,62	0,57	0,76	0,54
PROMIS 21-01-009	Témoins ColoNeg	0,56	0,81	0,44	0,36	0,56	0,67	0,48	0,61	0,75	0,62	0,58	0,63	0,44	0,58	0,73	0,74	0,47
PROMIS 21-01-011	Témoins ColoNeg	0,44	0,28	0,26	0,26	0,35	0,61	0,43	0,39	0,46	0,36	0,49	0,63	0,38	0,56	0,59	0,60	0,47
PROMIS 21-01-012	Témoins ColoNeg	0,71	0,52	0,66	0,42	0,76	0,75	0,74	0,66	0,76	0,64	0,54	0,72	0,63	0,66	0,67	0,81	0,67
PROMIS 21-02-001	Témoins ColoNeg	11,8	9,59	0,47	0,34	0,65	0,67	0,84	0,54	0,69	0,46	0,67	0,67	0,74	13,9	0,7	0,59	12,1
PROMIS 21-02-003	Témoins ColoNeg	0,56	0,46	0,38	0,28	0,38	0,67	0,44	0,40	0,50	0,78	0,63	0,73	0,46	0,59	0,51	0,69	0,56
PROMIS 21-02-004	Témoins ColoNeg	0,39	0,56	0,18	0,18	0,36	0,45	0,68	0,68	0,62	0,24	0,36	0,58	0,41	0,48	0,46	0,38	0,44
PROMIS 21-02-006	Témoins ColoNeg	0,57	0,62	0,41	0,41	0,57	9,29	0,91	8,68	0,91	0,50	0,64	0,85	0,65	0,65	0,46	9,90	0,66
PROMIS 21-02-008	Témoins ColoNeg	0,58	8,82	0,40	0,27	0,46	0,69	0,50	27,6	0,44	0,46	0,36	8,67	0,54	0,54	0,58	0,67	0,54
PROMIS 21-02-011	Témoins ColoNeg	0,67	0,55	0,63	0,45	0,60	0,82	0,66	0,60	0,61	0,79	0,61	0,92	0,89	0,89	0,77	0,89	0,71
PROMIS 21-02-014	Témoins ColoNeg	0,60	0,78	0,53	0,43	0,60	0,93	0,60	0,63	0,63	0,48	0,87	0,87	0,87	0,87	0,64	0,88	0,70
PROMIS 21-02-016	Témoins ColoNeg	0,63	0,30	0,68	0,53	0,60	0,67	0,59	0,44	0,56	0,37	0,37	0,58	0,70	0,57	0,54	0,61	0,55
PROMIS 21-03-004	Témoins ColoNeg	0,56	0,84	0,80	0,63	0,62	0,75	0,60	0,57	0,70	0,45	0,79	0,79	0,84	0,76	0,73	0,79	0,63
PROMIS 21-03-013	Témoins ColoNeg	0,36	0,35	0,19	0,19	0,49	0,66	0,44	0,43	0,46	0,22	0,44	0,58	0,38	0,59	0,40	0,69	0,47
PROMIS 21-03-015	Témoins ColoNeg	0,47	0,61	0,38	0,28	0,45	0,68	0,42	0,46	0,45	0,34	0,55	0,78	0,47	0,65	0,46	0,67	0,69
PROMIS 21-04-002	Témoins ColoNeg	0,80	0,77	0,56	0,46	0,70	0,96	0,88	0,73	0,65	0,70	0,64	0,87	0,94	0,92	0,64	0,84	0,71
PROMIS 21-04-006	Témoins ColoNeg	0,77	0,60	0,56	0,48	0,86	0,95	0,84	0,70	0,84	0,54	0,85	0,92	0,63	0,70	0,84	0,98	0,76
PROMIS 21-04-007	Témoins ColoNeg	0,67	0,65	0,41	0,31	0,44	0,65	0,50	0,50	0,57	0,39	0,40	0,70	0,65	0,76	0,57	0,70	0,68
PROMIS 21-04-008	Témoins ColoNeg	0,41	0,50	0,35	0,23	0,72	0,55	0,50	0,46	0,48	0,25	0,56	0,63	0,49	0,53	0,42	0,58	0,52
PROMIS 21-04-009	Témoins ColoNeg	0,47	0,46	0,39	0,26	0,45	0,60	0,44	0,46	0,51	0,56	0,50	0,64	0,76	0,64	0,53	0,56	0,67
PROMIS 21-04-013	Témoins ColoNeg	0,60	0,70	0,80	0,44	0,56	0,79	0,52	0,57	0,55	0,74	0,88	0,88	0,71	0,71	0,59	0,82	0,77
PROMIS 21-07-004	Témoins ColoNeg	0,53	0,86	0,52	0,86	0,57	0,75	0,53	0,54	0,67	0,46	0,54	0,77	0,57	0,71	0,60	0,68	0,63
PROMIS 21-12-001	Témoins ColoNeg	0,52	0,49	0,58	0,34	0,78	0,76	0,65	0,48	0,61	0,59	0,45	0,64	12,2	0,58	0,59	0,71	0,61
PROMIS 21-12-007	Témoins ColoNeg	0,75	0,80	0,50	0,50	0,70	9,51	0,59	0,61	0,68	0,57	0,78	0,93	1,00	0,74	0,65	1,00	0,75
PROMIS 21-12-011	Témoins ColoNeg	0,61	0,41	0,82	0,32	0,53	0,67	0,50	0,48	0,56	0,53	0,46	0,61	0,67	0,59	0,52	0,67	0,57
PROMIS 21-22-001	Témoins ColoNeg	0,57	0,38	0,61	0,27	0,47	0,58	0,48	0,44	0,67	0,71	0,60	0,58	0,45	8,49	0,50	0,62	0,56
PROMIS 21-22-006	Témoins ColoNeg	0,71	0,69	0,47	0,34	0,49	0,81	0,50	0,47	0,48	0,40	0,69	0,69	0,64	0,61	0,51	0,77	0,73

PROMIS 21-22-008	Témoin ColoNeg		0,77	0,69	0,41	0,41	0,41	0,66	0,78	0,71	0,82	0,77	0,85	0,70	0,48	0,91	0,84	0,68	0,59	0,68	0,59	0,75	0,75
PROMIS 37-03-004	Témoin ColoNeg		0,74	0,66	0,58	0,49	0,74	0,74	0,87	0,82	0,77	0,85	0,54	0,58	0,77	0,77	0,78	0,77	0,78	0,77	0,78	0,90	0,73
PROMIS 37-04-001	Témoin ColoNeg		0,54	0,66	0,95	0,21	0,50	0,56	0,53	0,44	0,48	0,33	0,56	0,96	0,43	0,47	0,58	0,62	0,47	0,58	0,75	0,48	0,71
PROMIS 37-04-005	Témoin ColoNeg		0,85	0,82	0,59	0,48	0,63	0,87	0,59	0,82	0,67	0,57	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96	0,82	0,94
PROMIS 37-05-008	Témoin ColoNeg		0,60	0,70	0,33	0,69	0,69	0,77	0,76	0,63	0,66	0,41	0,49	0,54	0,66	0,61	0,83	0,61	0,83	0,59	0,77	0,69	0,69
PROMIS 37-06-001	Témoin ColoNeg		0,62	0,72	0,55	0,37	0,66	0,71	0,52	0,58	0,61	0,51	0,74	0,79	0,68	0,82	0,82	0,62	0,59	0,72	0,72	0,68	0,68
PROMIS 37-09-002	Témoin ColoNeg		0,53	0,40	0,41	0,32	0,52	0,72	0,59	0,49	0,54	10,8	0,53	0,77	0,54	0,55	0,55	0,77	0,56	0,72	0,72	0,59	0,59
PROMIS 37-11-001	Témoin ColoNeg		0,78	0,66	0,50	0,95	0,70	0,93	0,74	0,63	0,67	0,54	0,66	0,80	0,77	0,70	0,77	18,16	0,95	0,77	0,95	0,77	0,77
PROMIS 37-11-002	Témoin ColoNeg		0,55	0,44	0,31	0,31	0,49	0,76	0,64	0,50	0,47	0,36	0,61	0,74	0,71	0,78	0,65	0,56	0,78	0,69	0,78	0,69	0,69
PROMIS 37-11-011	Témoin ColoNeg		0,57	0,69	0,59	0,44	0,59	0,92	0,81	0,57	0,56	0,45	0,72	0,89	0,57	0,65	0,74	0,65	0,78	0,76	0,78	0,76	0,76
PROMIS 37-11-016	Témoin ColoNeg		0,68	0,45	0,35	0,35	0,55	0,72	0,54	0,49	0,64	0,48	0,70	0,52	0,56	0,941	0,84	0,56	0,73	0,67	0,73	0,67	0,67
PROMIS 37-12-002	Témoin ColoNeg		0,55	0,40	0,33	0,24	0,41	0,59	0,57	0,39	0,50	0,31	0,64	0,67	0,59	0,45	0,51	0,45	0,60	0,57	0,60	0,57	0,57
PROMIS 37-13-003	Témoin ColoNeg		0,61	0,62	0,42	0,46	0,46	0,69	0,48	0,47	0,47	0,49	0,60	0,74	0,54	0,57	0,71	0,50	0,67	0,66	0,67	0,66	0,66
PROMIS 37-13-006	Témoin ColoNeg		0,40	0,78	0,44	0,45	0,57	0,78	0,52	0,48	0,57	0,37	0,57	0,80	0,83	0,62	0,83	0,58	0,76	0,59	0,76	0,59	0,59
PROMIS 37-13-008	Témoin ColoNeg		11,4	0,48	0,26	0,26	0,55	0,58	0,73	0,60	0,48	0,29	0,55	0,60	0,53	0,42	0,51	0,49	0,64	0,57	0,64	0,57	0,57
PROMIS 37-14-009	Témoin ColoNeg		0,59	0,78	0,52	0,58	0,56	0,85	0,50	0,84	0,55	0,42	0,60	0,89	0,62	0,56	0,72	0,58	0,80	0,65	0,80	0,65	0,65
PROMIS 37-14-018	Témoin ColoNeg		10,1	10,2	0,90	0,83	0,93	10,3	0,92	0,91	10,0	0,90	10,1	10,2	0,94	19,7	19,7	19,7	9,9	10,3	10,1	10,3	10,1
PROMIS 37-14-021	Témoin ColoNeg		0,65	0,45	0,52	0,42	0,53	0,87	0,50	0,49	0,51	0,51	0,75	0,85	0,70	0,57	0,69	0,58	0,79	0,69	0,79	0,69	0,69
PROMIS 37-15-002	Témoin ColoNeg		0,51	0,49	0,40	0,43	0,65	0,85	0,50	0,48	0,51	0,42	0,63	0,69	0,62	0,46	0,82	0,52	0,65	0,60	0,65	0,60	0,60
PROMIS 37-15-006	Témoin ColoNeg		0,44	0,53	0,35	0,22	0,37	0,61	0,40	0,34	0,33	0,28	0,54	0,67	0,36	0,47	0,67	0,44	0,64	0,60	0,64	0,60	0,60
PROMIS 37-16-001	Témoin ColoNeg		0,48	0,42	0,30	0,21	0,40	0,53	8,96	0,57	0,64	0,30	0,64	0,59	0,61	0,66	0,47	0,48	0,54	0,49	0,54	0,49	0,49
PROMIS 37-17-001	Témoin ColoNeg		0,48	0,51	0,51	0,29	0,49	0,69	0,60	0,52	0,64	0,41	0,42	0,66	0,46	0,48	0,55	0,52	0,62	0,55	0,62	0,55	0,55
PROMIS 37-17-003	Témoin ColoNeg		0,58	0,52	11,3	0,38	0,50	0,75	0,60	0,46	0,61	0,42	0,63	0,70	0,52	0,73	0,63	0,54	0,67	0,64	0,67	0,64	0,64
PROMIS 37-17-004	Témoin ColoNeg		0,60	0,66	0,50	0,38	0,60	0,70	0,56	0,60	0,52	0,46	0,69	0,81	0,64	0,76	0,65	0,63	0,77	0,69	0,77	0,69	0,69
PROMIS 37-18-001	Témoin ColoNeg		0,58	0,63	0,46	0,40	0,57	0,83	0,66	0,63	0,85	0,49	0,62	0,83	0,55	0,55	0,64	0,57	0,80	0,62	0,80	0,62	0,62
PROMIS 37-18-003	Témoin ColoNeg		0,64	0,70	0,41	0,34	0,48	0,77	0,57	0,52	0,55	0,40	0,53	0,73	0,75	0,46	0,62	0,47	0,80	0,53	0,80	0,53	0,53
PROMIS 37-18-004	Témoin ColoNeg		0,42	0,48	0,28	0,28	0,43	0,67	0,62	0,43	0,50	0,34	0,56	0,62	0,70	0,48	0,67	0,49	0,71	0,56	0,71	0,56	0,56
PROMIS 37-18-005	Témoin ColoNeg		0,63	0,67	0,58	0,48	0,61	0,92	0,67	0,64	0,67	0,56	0,77	0,87	0,65	0,65	0,76	0,63	0,87	0,81	0,87	0,81	0,81
PROMIS 37-18-024	Témoin ColoNeg		0,52	0,55	0,55	0,42	0,52	0,84	0,53	0,59	0,86	0,53	0,84	0,77	0,62	0,72	0,74	0,55	0,86	0,71	0,86	0,71	0,71

PROMIS 37-19-006	Témoins ColoNeg	0,69	0,89	0,44	0,44	0,54	0,78	0,59	0,57	0,58	0,48	0,67	0,88	0,63	0,68	0,70	0,59	0,73	0,73
PROMIS 37-19-007	Témoins ColoNeg	0,56	0,57	0,47	0,39	0,55	0,78	0,54	0,51	0,67	0,41	0,82	0,85	0,58	0,53	0,69	0,61	0,83	0,68
PROMIS 37-20-004	Témoins ColoNeg	0,56	0,45	0,44	0,30	0,58	0,65	0,77	0,55	11,1	0,32	0,80	0,63	0,52	0,77	0,64	0,63	0,64	0,56
PROMIS 71-02-003	Témoins ColoNeg	0,47	0,42	0,40	0,34	0,45	0,68	0,55	0,48	0,54	0,37	0,60	0,82	0,51	0,71	0,59	0,59	0,75	0,62
PROMIS 71-04-003	Témoins ColoNeg	0,58	0,70	0,40	0,53	0,62	0,74	0,53	0,78	15,5	0,47	0,52	0,71	0,51	0,56	0,61	0,56	0,75	0,67
PROMIS 71-09-007	Témoins ColoNeg	0,51	0,54	0,41	0,31	0,51	0,72	0,63	0,56	0,72	0,43	0,51	0,59	0,47	0,44	0,66	0,44	0,69	0,62
PROMIS 71-10-001	Témoins ColoNeg	0,51	0,42	0,45	52,7	0,63	0,58	0,56	0,59	0,57	0,69	0,45	0,68	0,49	0,57	0,55	0,55	0,65	0,61
PROMIS 71-10-007	Témoins ColoNeg	0,83	0,37	0,66	0,33	0,83	0,67	9,28	0,59	0,54	0,41	0,66	0,66	0,66	0,70	0,69	0,62	0,66	0,81
PROMIS 71-11-001	Témoins ColoNeg	0,47	0,47	0,45	0,52	0,59	0,60	0,82	0,50	0,57	0,36	0,61	0,63	0,69	0,51	0,59	0,57	0,58	0,66
PROMIS 71-11-006	Témoins ColoNeg	0,61	0,56	0,42	0,34	0,59	0,64	0,58	0,51	0,52	0,40	0,62	0,75	0,67	0,50	0,60	0,55	0,72	0,64
PROMIS 71-11-008	Témoins ColoNeg	0,58	0,43	0,40	0,30	0,40	0,61	0,39	0,48	0,57	0,50	0,48	0,59	0,55	0,44	0,56	0,47	0,63	0,55
PROMIS 71-11-009	Témoins ColoNeg	0,52	0,70	0,44	0,38	0,53	0,79	0,54	0,53	0,58	0,56	11,1	0,78	0,50	0,57	0,63	0,55	0,76	0,72
Performances		Score 2 ^a	Score 2 ^b	Score 2 ^c	Score 2 ^d	Score 2 ^e	Score 2 ^f	Score 2 ^g	Score 2 ^h	Score 2 ⁱ	Score 2 ^j	Score 2 ^k	Score 2 ^l	Score 2 ^m	Score 2 ⁿ	Score 2 ^o	Score 2 ^p	Score 2 ^q	Score 2 ^r
Seuil		0,99	0,95	0,85	0,92	0,97	0,98	0,97	0,87	0,96	0,95	0,99	0,99	0,99	1,00	0,98	0,95	1	0,94
Sensibilité %		57,5	68,1	62,8	60,2	62,8	58,4	66,4	58,4	61,9	61,9	56,6	57,5	60,2	63,7	59,3	56,6	63,7	61,1
Spécificité %		95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	97,2	97,2	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	97,2	97,2
CCR invasif et Tis au-dessus du seuil		65	77	71	68	71	67	76	67	71	71	64	65	68	72	67	65	72	69
ColoNeg au-dessus du seuil		3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	2

Tis: Patients atteints d'une tumeur in situ (carcinome intra-muqueux T0), CCR = patients atteints d'un cancer colorectal invasif de stade TNM I à IV (Adénocarcinome), ColoNeg- = sujets contrôles, avec une coloscopie totalement normale, et un test FOBT positif

Score 2^a: Association Gal3, prolidase

Score 2^b: association LFABP, prolidase

Score 2^c: association ACE, prolidase

Score 2^d: association HSP60,-prolidase

Score 2^e: association Alpha-Enolase, prolidase

Score 2^f: association BIP, prolidase

Score 2^g: association G3PDH, prolidase
Score 2^h: association HSP71, prolidase
Score 2ⁱ: association Peroxy-5, prolidase
Score 2^j: association CA19-9, prolidase
Score 2^k: association ApoA1, prolidase
Score 2^l: association ApoA2, prolidase
Score 2^m: association Prosomes, prolidase
Score 2ⁿ: association M2PK, prolidase
Score 2^o: association Timp1, prolidase
Score 2^p: association Ezrine, prolidase
Score 2^q: association PDI, prolidase
Score 2^r: association Beta2-microglobuline, prolidase

5) Résultats des combinaisons de la prolidase avec plusieurs marqueurs chez les patients et les contrôles

La Demanderesse a également associé les performances de la prolidase avec plusieurs marqueurs. La prolidase est particulièrement utile pour la détection du cancer colorectal, car elle permet de compléter la détection effectuée par les autres marqueurs du cancer colorectal. Voir Tableaux 15 et 16.

A titre d'exemple on peut citer les associations ci-dessous :

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 3^s » augmentés chez 83 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal, pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 42 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil, et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, CA19-9 et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 4^t » augmentés chez 85 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage CA19-9 était augmenté chez 23 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, M2PK et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 4^u » augmentés chez 86 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal

invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage M2PK était augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, Timp1 et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 4^v » augmentés chez 87 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage Timp1 était augmenté chez 24 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, M2PK, Timp1 et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 5^{wa} » augmentés chez 88 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage M2PK était augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du

seuil, le seul dosage Timp1 était augmenté chez 22 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, ACE, PDI et CA19-9 permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 5^{wb} » augmentés chez 93 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul score de PDI était augmenté chez 29 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, et le seul dosage CA19-9 était augmenté chez 23 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

L'association des marqueurs tumoraux prolidase, LFABP, M2PK, Timp1, Villine, CA19-9, G3PDH et ACE permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 8^x » augmentés chez 94 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Alors que le seul score de prolidase était augmenté chez 59 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour un patient Coloscopie Négative avec un score au-dessus du seuil, le seul dosage LFABP était augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage M2PK était augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage Timp1 était augmenté chez 4 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou

d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage Villine était augmenté chez 5 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage G3PDH était augmenté chez 24 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage CA19-9 était augmenté chez 21 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil et le seul dosage ACE était augmenté chez 25 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil.

6) La prolidase peut à elle seule remplacer la combinaison de plusieurs marqueurs

La Demanderesse a également montré que par ses performances la prolidase remplace avantageusement à elle seule une combinaison de plusieurs marqueurs. Par exemple, l'association de la LFABP, de l'ACE et du marqueur M2PK permet d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 3 sans prolidase^y » augmentés chez 58 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 2 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil, avec le seul dosage ACE augmenté chez 25 patients adénocarcinome colorectal sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage M2PK augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, et seul dosage LFABP augmenté chez 39 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Sur ce même groupe de patients, à elle seule la prolidase permet de détecter 59 patients pour un Coloscopie Négative en-dessous du seuil, comme décrit dans l'exemple 1.

Avec un autre exemple, l'association de l'ACE, du CA19-9, du marqueur Timp1 et du marqueur M2PK permet ainsi d'obtenir pour le même groupe de 183 patients des scores totaux « 4 sans prolidase^z » augmentés chez 54 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 3 patients Coloscopie Négative au-dessus du seuil, avec le seul dosage ACE augmenté chez 25 patients adénocarcinome colorectal sans patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage M2PK augmenté chez 18 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient

Coloscopie Négative au-dessus du seuil, le seul dosage Timp1 augmenté chez 22 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil, et le seul dosage CA19-9 augmenté chez 23 patients atteints d'un adénocarcinome colorectal invasif ou d'un Tis pour 1 patient Coloscopie Négative au-dessus du seuil. Sur ce même groupe de patients, à elle seule la prolidase permet de détecter 59 patients pour un Coloscopie Négative en-dessous du seuil, comme décrit dans l'exemple 1.

Cet exemple peut être répété avec différents marqueurs connus qui permettent en combinaison de détecter environ 50% des cancers colorectaux.

Tableau 16

Patient	Classe	Stade	Score 3s	Score 4t	Score 4u	Score 4v	Score 5wa	Score 5wb	Score 8x	Score 3 sans prolidase y	Score 3 sans prolidase z
CBSE011	Tis	T0	0,55	0,44	8,99	5,52	11,2	0,51	6,78	11,7	13,7
CLSP234	Tis	T0	11,8	8,56	8,61	8,75	7,05	7,03	4,51	6,07	0,36
CLSP286	Tis	T0	0,36	0,31	0,39	0,40	0,42	3,65	4,73	0,19	0,30
CLSP300	Tis	T0	0,67	0,51	0,63	0,62	0,61	4,86	0,42	0,55	0,37
CLSP315	Tis	T0	12,2	8,86	8,96	8,99	7,29	7,27	4,57	6,00	0,33
CLSP367	Tis	T0	0,63	0,50	5,37	4,66	7,57	0,54	6,01	6,83	9,09
CLSP724	Tis	T0	6,99	9,30	5,13	5,10	4,25	7,59	5,81	6,55	6,14
CNSE003	Tis	T0	10,3	7,26	14,1	7,37	11,4	9,16	7,21	18,5	7,10
CNSE004	Tis	T0	0,42	0,32	0,51	0,44	0,51	3,57	0,41	0,42	0,35
GHBD015	Tis	T0	7,47	5,31	5,44	5,46	4,52	4,41	6,12	6,99	0,50
GHBD036	Tis	T0	0,62	0,49	0,53	4,59	3,65	3,74	3,03	0,47	4,28
CBSE001	CCR	I	14,4	10,4	10,6	16,0	12,8	8,51	5,51	8,27	5,85
CBSE016	CCR	I	22,2	16,2	16,3	21,6	17,3	13,1	8,44	15,5	10,1
CLSP047	CCR	I	0,40	0,31	0,40	0,50	0,50	4,01	0,42	0,10	0,34
CLSP162	CCR	I	0,43	0,32	0,43	0,45	0,45	0,43	0,41	0,36	0,25
CLSP196	CCR	I	11,5	8,44	8,51	8,53	6,94	6,93	4,45	5,79	0,59
CLSP224	CCR	I	31,1	22,2	22,4	22,4	18,1	18,0	11,4	22,7	0,74
CLSP235	CCR	I	7,28	5,49	5,49	5,53	4,45	10,4	2,81	0,13	0,15
CLSP263	CCR	I	0,63	5,08	0,55	0,63	0,57	4,20	3,17	0,45	6,33
CLSP340	CCR	I	0,46	0,37	0,42	0,47	0,43	0,41	0,43	0,30	0,30
CLSP344	CCR	I	5,67	4,27	4,31	4,39	3,56	3,60	2,33	0,30	0,30
CLSP364	CCR	I	6,24	4,72	4,78	4,86	3,96	3,90	2,56	0,25	0,39
CLSP376	CCR	I	0,41	0,42	0,48	0,43	0,48	0,45	0,45	0,38	0,51
GHBD003	CCR	I	0,41	0,33	0,36	0,44	0,39	0,41	0,31	0,16	0,26

GHBD094	CCR	I	0,50	0,43	0,54	0,54	0,57	0,51	0,37	0,54	0,50
CLSP075	CCR	II	0,44	0,34	0,41	0,50	0,47	0,46	0,40	0,34	0,34
CLSP076	CCR	II	11,4	8,30	8,40	8,50	6,88	6,83	4,40	5,56	0,36
CLSP080	CCR	II	0,33	0,29	0,34	0,38	0,38	0,38	0,36	0,19	0,31
CLSP096	CCR	II	12,3	9,27	14,9	9,44	12,1	7,60	7,61	19,5	14,8
CLSP110	CCR	II	6,12	4,33	4,43	4,51	3,70	7,04	2,38	5,59	0,34
CLSP117	CCR	II	17,2	12,4	16,5	17,2	17,1	10,1	10,6	16,0	6,49
CLSP130	CCR	II	6,61	4,69	4,77	4,90	4,00	3,94	2,55	6,03	0,44
CLSP133	CCR	II	7,55	5,69	5,80	5,79	4,75	8,18	3,02	0,35	0,35
CLSP143	CCR	II	9,26	6,96	7,11	7,06	5,78	9,79	3,58	0,74	0,56
CLSP147	CCR	II	7,04	5,29	15,1	9,75	15,5	7,95	7,71	13,2	14,2
CLSP154	CCR	II	16,7	12,6	12,7	12,7	10,3	10,3	6,54	10,5	8,00
CLSP155	CCR	II	19,4	20,4	14,7	14,7	11,9	16,5	7,59	10,9	15,9
CLSP157	CCR	II	6,24	4,68	4,79	4,79	3,93	3,93	4,67	0,48	0,29
CLSP165	CCR	II	0,51	0,39	0,46	0,54	0,50	3,86	0,43	0,30	0,28
CLSP170	CCR	II	15,7	11,5	11,6	11,6	9,4	9,38	5,99	7,29	0,63
CLSP173	CCR	II	6,20	4,73	4,80	4,86	4,01	3,96	5,60	0,26	0,50
CLSP177	CCR	II	10,5	12,4	10,5	13,1	13,0	9,99	8,74	0,55	14,8
CLSP178	CCR	II	93,7	66,7	66,9	66,8	53,6	53,6	33,7	88,8	14,7
CLSP179	CCR	II	11,8	5,07	5,15	5,10	4,21	4,21	2,73	0,88	0,63
CLSP186	CCR	II	7,87	5,57	5,61	5,76	4,66	4,63	2,96	7,21	0,39
CLSP194	CCR	II	16,8	12,1	12,1	12,2	9,8	13,1	6,24	10,1	0,25
CLSP201	CCR	II	15,9	11,5	11,5	19,5	15,5	9,28	8,19	8,67	7,98
CLSP207	CCR	II	16,0	11,8	11,6	11,8	9,5	9,63	6,01	8,07	5,53
CLSP209	CCR	II	10,4	7,31	7,34	13,3	10,6	9,15	3,92	9,49	6,02
CLSP220	CCR	II	19,2	14,2	14,2	14,3	11,6	11,6	7,36	12,6	5,69
CLSP222	CCR	II	19,0	13,7	20,1	18,2	19,6	11,1	10,3	19,9	11,2
CLSP253	CCR	II	5,68	4,27	4,37	4,41	3,63	6,74	2,30	0,48	0,38
CLSP256	CCR	II	6,96	5,31	17,6	9,29	14,3	4,40	9,04	17,1	13,0
CLSP280	CCR	II	5,84	4,45	4,49	9,08	7,26	3,71	6,07	0,47	4,91
CLSP296	CCR	II	5,86	11,7	0,53	8,59	6,73	9,57	6,31	0,49	22,7
CLSP310	CCR	II	0,50	0,44	0,47	0,59	0,54	0,55	0,42	0,33	0,47
CLSP327	CCR	II	9,30	6,97	7,17	7,15	5,88	5,77	3,80	0,57	0,44
CLSP333	CCR	II	5,98	0,73	0,62	0,73	0,65	0,71	0,56	0,53	0,58
CLSP341	CCR	II	7,37	5,55	5,61	5,70	4,63	4,62	5,11	0,27	0,34
CLSP346	CCR	II	12,2	15,3	9,38	9,37	7,67	12,4	7,13	7,08	13,4
CLSP347	CCR	II	7,30	5,47	5,63	5,69	4,68	4,49	5,74	7,24	5,51
CLSP380	CCR	II	7,21	5,42	5,64	5,52	4,61	4,47	5,72	0,62	0,44
CNSE002	CCR	II	6,83	5,17	6,83	5,36	5,35	4,29	3,14	0,41	0,60
GHBD021	CCR	II	0,37	0,30	0,34	0,43	0,39	0,40	0,36	0,15	0,26
GHBD043	CCR	II	7,14	5,43	5,51	15,6	12,4	4,53	5,90	0,54	10,4
GHBD064	CCR	II	37,4	27,5	33,3	27,7	26,8	22,2	16,9	38,7	20,7

GHBD066	CCR	II	0,53	0,40	0,52	0,61	0,60	0,51	0,45	0,44	0,41
GHBD075	CCR	II	5,84	4,39	4,51	4,49	3,70	3,67	2,39	0,54	0,39
GHBD087	CCR	II	0,72	0,58	0,60	0,68	0,61	3,67	0,44	0,52	0,39
GHBD090	CCR	II	0,40	0,33	0,45	0,46	0,49	0,39	0,35	0,42	0,40
GHBD096	CCR	II	0,74	0,56	5,64	0,71	4,64	4,25	2,95	7,20	5,41
GHBD100	CCR	II	9,40	5,93	13,8	14,5	16,6	10,8	7,14	13,8	12,4
GHBD103	CCR	II	6,05	4,29	4,35	4,42	3,61	3,58	2,34	5,62	0,33
CBSE023	CCR	III	6,58	4,72	6,18	6,18	6,18	3,95	7,38	8,88	0,43
CLSP044	CCR	III	68,5	51,4	51,5	51,5	41,3	41,3	26,0	68,3	51,3
CLSP074	CCR	III	10,0	7,56	7,66	12,5	10,0	6,24	4,07	0,40	5,16
CLSP078	CCR	III	19,4	14,0	14,1	14,2	11,5	14,4	7,28	11,6	0,43
CLSP081	CCR	III	9,85	7,41	9,84	9,84	9,84	6,09	8,03	0,37	0,21
CLSP098	CCR	III	10,2	7,67	7,75	7,77	6,30	10,5	6,01	0,34	0,29
CLSP174	CCR	III	46,8	75,3	46,0	44,9	44,6	60,3	40,5	59,2	113,1
CLSP227	CCR	III	44,5	32,2	32,4	32,3	26,0	25,9	16,3	37,0	10,5
CLSP233	CCR	III	7,46	5,63	5,71	5,69	4,64	7,85	2,95	0,30	0,31
CLSP255	CCR	III	18,6	23,5	13,5	13,6	10,9	19,0	10,1	10,6	13,6
CLSP289	CCR	III	0,62	0,47	0,54	0,58	0,54	0,56	0,49	0,45	0,29
CLSP320	CCR	III	5,70	4,29	4,43	4,40	3,64	6,87	2,36	0,43	0,40
CLSP324	CCR	III	9,72	7,44	7,49	7,52	6,17	6,11	6,25	0,59	0,81
CLSP383	CCR	III	0,42	0,33	4,76	5,34	7,72	0,43	2,62	6,07	9,44
CLSP384	CCR	III	71,9	57,6	63,9	53,7	51,3	46,2	32,3	85,0	63,1
CNSE001	CCR	III	6,40	11,0	4,91	4,99	4,08	12,4	2,77	6,28	12,8
CNSE016	CCR	III	67,8	62,8	53,6	48,9	43,0	50,3	31,4	65,0	37,4
CNSE017	CCR	III	15,0	10,9	10,9	11,0	8,9	13,3	5,58	8,44	0,29
CSEM015	CCR	III	6,74	4,76	6,33	6,33	6,33	7,47	3,26	9,13	0,14
CSEM029	CCR	III	6,17	4,65	4,79	9,03	7,26	7,74	2,61	0,54	4,60
GHBD004	CCR	III	21,2	16,0	16,0	16,1	12,9	12,9	8,10	15,1	11,5
GHBD017	CCR	III	7,40	5,59	5,70	9,85	7,91	4,63	3,02	0,26	4,41
GHBD034	CCR	III	0,31	0,26	0,32	0,41	0,39	0,39	3,94	0,16	0,32
GHBD042	CCR	III	0,45	0,47	0,44	0,51	0,49	0,53	0,38	0,33	0,47
GHBD045	CCR	III	18,2	13,6	13,8	13,9	11,2	11,0	7,02	0,33	0,46
GHBD089	CCR	III	28,8	21,7	21,7	21,8	17,5	20,9	11,0	22,8	17,2
GHBD105	CCR	III	0,58	6,18	6,95	4,49	5,75	5,08	3,78	8,96	14,3
CBSE012	CCR	IV	6,40	11,7	5,02	4,99	4,17	12,8	4,87	0,68	9,58
CBSE026	CCR	IV	329,6	3920	328,6	328,6	328,6	3136	1723	481,3	10043
CLSP156	CCR	IV	21,9	23,0	21,2	16,5	17,1	21,8	16,0	19,6	23,3
CLSP159	CCR	IV	47,6	60,7	44,8	35,6	36,0	48,8	30,7	59,6	73,3
CLSP167	CCR	IV	6,60	10,4	5,06	9,15	7,32	12,0	2,85	0,32	11,4
CLSP260	CCR	IV	66,9	48,4	48,4	48,4	38,9	38,9	24,5	64,3	21,2
CLSP334	CCR	IV	0,40	0,33	0,53	0,42	0,52	0,41	2,95	0,52	0,48
CLSP357	CCR	IV	9,04	18,5	6,98	6,92	5,70	14,9	9,40	9,03	22,1

CLSP365	CCR	IV	27,5	195,3	25,6	20,9	20,6	156,3	68,5	33,9	253,3
CLSP366	CCR	IV	0,54	8,46	0,64	0,55	0,64	6,93	3,09	0,63	11,0
GHBD022	CCR	IV	1265,0	948,6	948,5	953,0	762,5	759,0	474,6	1264,5	951,9
GHBD071	CCR	IV	56,5	47,7	46,8	41,5	37,5	38,3	27,9	62,1	40,0
CLSP197	CCR	NA	0,43	0,40	0,53	0,43	0,52	0,51	4,20	0,53	0,47
HGED005	Témoin ColoNeg		0,57	0,46	0,62	0,67	0,69	0,51	0,54	0,51	0,59
PROMIS 21-01-005	Témoin ColoNeg		0,53	0,55	0,49	0,54	0,51	0,61	0,43	0,36	0,49
PROMIS 21-01-006	Témoin ColoNeg		0,29	0,24	0,29	0,37	0,36	0,37	0,23	0,19	0,26
PROMIS 21-01-009	Témoin ColoNeg		0,58	0,52	0,45	0,53	0,45	0,57	0,43	0,37	0,30
PROMIS 21-01-011	Témoin ColoNeg		0,19	0,18	0,19	0,29	0,27	0,28	0,22	0,09	0,26
PROMIS 21-01-012	Témoin ColoNeg		0,47	0,43	0,44	0,47	0,45	0,50	0,36	0,31	0,42
PROMIS 21-02-001	Témoin ColoNeg		6,46	4,59	4,72	11,3	9,05	3,78	2,61	6,08	6,87
PROMIS 21-02-003	Témoin ColoNeg		0,35	0,45	0,34	0,41	0,39	0,52	0,31	0,26	0,51
PROMIS 21-02-004	Témoin ColoNeg		0,37	0,29	0,37	0,42	0,41	0,31	0,39	0,37	0,28
PROMIS 21-02-006	Témoin ColoNeg		0,41	0,34	0,41	0,42	0,42	4,07	0,36	0,27	0,27
PROMIS 21-02-008	Témoin ColoNeg		5,95	0,51	0,58	0,58	0,58	0,56	0,43	0,59	0,29
PROMIS 21-02-011	Témoin ColoNeg		0,46	0,47	0,45	0,45	0,45	0,55	0,38	0,23	0,48
PROMIS 21-02-014	Témoin ColoNeg		0,57	0,43	0,55	0,55	0,55	0,53	0,33	0,40	0,12
PROMIS 21-02-016	Témoin ColoNeg		0,39	0,33	0,48	0,44	0,50	0,39	0,40	0,46	0,52
PROMIS 21-03-004	Témoin ColoNeg		0,76	0,58	0,75	0,74	0,75	0,62	0,49	0,74	0,56
PROMIS 21-03-013	Témoin ColoNeg		0,23	0,18	0,25	0,37	0,36	0,34	0,25	0,21	0,29
PROMIS 21-03-015	Témoin ColoNeg		0,46	0,35	0,42	0,52	0,48	0,44	0,34	0,37	0,34
PROMIS 21-04-002	Témoin ColoNeg		0,56	0,51	0,63	0,55	0,63	0,56	0,58	0,53	0,49
PROMIS 21-04-006	Témoin ColoNeg		0,44	0,35	0,39	0,44	0,40	0,48	0,37	0,20	0,24
PROMIS 21-04-007	Témoin ColoNeg		0,48	0,38	0,50	0,57	0,57	0,46	0,37	0,46	0,44
PROMIS 21-04-008	Témoin ColoNeg		0,39	0,30	0,40	0,44	0,44	0,38	0,38	0,38	0,32
PROMIS 21-04-009	Témoin ColoNeg		0,37	0,38	0,49	0,46	0,54	0,42	0,41	0,48	0,60
PROMIS 21-04-013	Témoin ColoNeg		0,65	0,59	0,59	0,61	0,58	0,63	0,39	0,50	0,53
PROMIS 21-07-004	Témoin ColoNeg		0,65	0,51	0,57	0,64	0,59	0,53	0,38	0,51	0,37
PROMIS 21-12-001	Témoin ColoNeg		0,44	0,43	5,58	0,45	4,56	0,49	2,93	7,21	5,58
PROMIS 21-12-007	Témoin ColoNeg		0,53	0,42	0,52	0,51	0,50	0,53	0,33	0,28	0,20
PROMIS 21-12-011	Témoin ColoNeg		0,52	0,47	0,54	0,52	0,54	0,52	0,38	0,51	0,58
PROMIS 21-22-001	Témoin ColoNeg		0,42	0,48	0,39	4,42	0,51	0,52	0,37	0,34	0,67
PROMIS 21-22-006	Témoin ColoNeg		0,52	0,40	0,51	0,51	0,51	0,49	0,36	0,45	0,34
PROMIS 21-22-008	Témoin ColoNeg		0,46	0,36	0,41	0,47	0,43	0,42	0,36	0,28	0,24
PROMIS 37-03-004	Témoin ColoNeg		0,48	0,38	0,46	0,50	0,48	0,47	0,48	0,29	0,30
PROMIS 37-04-001	Témoin ColoNeg		0,74	0,58	0,70	0,74	0,72	0,57	0,53	0,79	0,64
PROMIS 37-04-005	Témoin ColoNeg		0,60	0,47	0,58	0,58	0,58	0,51	0,34	0,40	0,17
PROMIS 37-05-008	Témoin ColoNeg		0,46	0,36	0,45	0,48	0,47	0,46	0,42	0,38	0,28
PROMIS 37-06-001	Témoin ColoNeg		0,57	0,47	0,61	0,54	0,59	0,51	0,39	0,57	0,45
PROMIS 37-09-002	Témoin ColoNeg		0,31	0,48	0,33	0,46	0,44	0,55	0,41	0,23	5,58
PROMIS 37-11-001	Témoin ColoNeg		0,44	0,34	0,41	0,46	0,44	0,45	0,33	0,22	0,24

PROMIS 37-11-002	Témoin ColoNeg		0,29	0,23	0,42	0,38	0,47	0,37	0,38	0,35	0,39
PROMIS 37-11-011	Témoin ColoNeg		0,53	0,40	0,48	0,54	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30
PROMIS 37-11-016	Témoin ColoNeg		0,30	0,27	0,47	0,47	0,57	0,37	0,37	0,39	0,55
PROMIS 37-12-002	Témoin ColoNeg		0,31	0,25	0,32	0,36	0,36	0,35	0,32	0,27	0,29
PROMIS 37-13-003	Témoin ColoNeg		0,46	0,41	0,45	0,54	0,52	0,47	0,35	0,40	0,44
PROMIS 37-13-006	Témoin ColoNeg		0,57	0,43	0,54	0,66	0,63	0,51	0,39	0,50	0,43
PROMIS 37-13-008	Témoin ColoNeg		0,32	0,24	0,30	0,36	0,34	0,35	0,33	0,23	0,20
PROMIS 37-14-009	Témoin ColoNeg		0,57	0,42	0,49	0,58	0,51	0,50	0,31	0,38	0,27
PROMIS 37-14-018	Témoin ColoNeg		6,80	5,12	6,79	6,79	6,79	4,26	3,43	0,35	0,12
PROMIS 37-14-021	Témoin ColoNeg		0,35	0,30	0,33	0,40	0,37	0,39	0,26	0,16	0,29
PROMIS 37-15-002	Témoin ColoNeg		0,36	0,30	0,33	0,52	0,46	0,38	0,32	0,22	0,38
PROMIS 37-15-006	Témoin ColoNeg		0,41	0,32	0,41	0,52	0,50	0,42	0,32	0,40	0,40
PROMIS 37-16-001	Témoin ColoNeg		0,32	0,27	0,43	0,36	0,45	0,35	0,43	0,44	0,40
PROMIS 37-17-001	Témoin ColoNeg		0,45	0,37	0,41	0,46	0,43	0,43	0,36	0,35	0,35
PROMIS 37-17-003	Témoin ColoNeg		0,68	0,52	0,66	0,63	0,63	0,53	0,42	0,62	0,55
PROMIS 37-17-004	Témoin ColoNeg		0,50	0,40	0,53	0,50	0,53	0,47	0,35	0,45	0,38
PROMIS 37-18-001	Témoin ColoNeg		0,45	0,36	0,40	0,45	0,41	0,45	0,33	0,26	0,25
PROMIS 37-18-003	Témoin ColoNeg		0,50	0,39	0,42	0,51	0,45	0,49	0,31	0,34	0,25
PROMIS 37-18-004	Témoin ColoNeg		0,32	0,26	0,32	0,43	0,41	0,37	0,30	0,24	0,30
PROMIS 37-18-005	Témoin ColoNeg		0,49	0,39	0,44	0,50	0,46	0,47	0,31	0,26	0,29
PROMIS 37-18-024	Témoin ColoNeg		0,43	0,36	0,45	0,48	0,49	0,47	0,31	0,32	0,39
PROMIS 37-19-006	Témoin ColoNeg		0,59	0,44	0,54	0,56	0,53	0,47	0,37	0,42	0,25
PROMIS 37-19-007	Témoin ColoNeg		0,42	0,31	0,37	0,45	0,41	0,42	0,29	0,23	0,24
PROMIS 37-20-004	Témoin ColoNeg		0,37	0,28	0,48	0,44	0,52	0,36	0,52	0,44	0,44
PROMIS 71-02-003	Témoin ColoNeg		0,31	0,24	0,39	0,36	0,42	0,36	0,31	0,30	0,33
PROMIS 71-04-003	Témoin ColoNeg		0,50	0,41	0,46	0,50	0,48	0,50	0,33	0,39	0,33
PROMIS 71-09-007	Témoin ColoNeg		0,41	0,35	0,36	0,47	0,42	0,43	0,35	0,28	0,33
PROMIS 71-10-001	Témoin ColoNeg		0,34	0,40	0,37	0,37	0,39	0,45	0,35	0,28	0,47
PROMIS 71-10-007	Témoin ColoNeg		0,41	0,34	0,47	0,48	0,51	0,40	0,45	0,41	0,50
PROMIS 71-11-001	Témoin ColoNeg		0,40	0,32	0,39	0,44	0,43	0,38	0,33	0,34	0,35
PROMIS 71-11-006	Témoin ColoNeg		0,41	0,33	0,37	0,43	0,40	0,41	0,31	0,27	0,25
PROMIS 71-11-008	Témoin ColoNeg		0,34	0,33	0,31	0,38	0,35	0,40	0,24	0,22	0,33
PROMIS 71-11-009	Témoin ColoNeg		0,50	0,43	0,44	0,49	0,45	0,50	0,35	0,34	0,32
Performances			Score 3 ^s	Score 4 ^t	Score 4 ^u	Score 4 ^v	Score 5 ^{wa}	Score 5 ^{wb}	Score 8 ^x	Score 3 sans prolidase ^y	Score 3 sans prolidase ^z
Seuil			0,76	0,73	0,75	0,74	0,75	0,63	0,58	0,88	0,81
Sensibilité %			73,5	75,2	76,1	77	77,9	82,3	83,2	51,3	47,8
Spécificité %			95,7	97,2	95,7	95,7	95,7	95,7	95,7	97,2	95,7
CCR invasif et Tis au-dessus du seuil			83	85	86	87	88	93	94	58	54
ColoNeg au-dessus du seuil			3	2	3	3	3	3	3	2	3

Tis: Patients atteints d'une tumeur in situ (carcinome intra-muqueux T0),
 CCR = patients atteints d'un cancer colorectal de stade TNM I à IV
 (Adénocarcinome), ColoNeg- = sujets sains, avec un test FOBT positif et une
 coloscopie totalement normale.

- 5 Score 3^s : association prolidase, LFABP, ACE
 Score 4^t : association prolidase, LFABP, ACE, CA19-9
 Score 4^u : association prolidase, LFABP, ACE, M2PK
 Score 4^v : association prolidase, LFABP, ACE, Timp1
 Score 5^{wa} : association prolidase, LFABP, ACE, M2PK, Timp1
 10 Score 5^{wb} : association prolidase, LFABP, ACE, PDI, CA19-9
 Score 8^x : association prolidase, LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9,
 Villine, G3PDH
 Score 3 sans prolidase^y : association LFABP, ACE, M2PK
 Score 3 sans prolidase^z : association ACE, M2PK, C19-9, Timp1.

15

**Exemple 6 : Détection des patients atteints de cancers colorectaux
 et de patients contrôles par le dosage MRM des marqueurs Alpha
 enolase, G3PDH, BIP, HSP71, Peroxy-5 et PDI**

- 20 Pour chacun de ces marqueurs, les scores ont été obtenus dans les
 mêmes conditions que celles utilisées pour l'obtention des scores de la
 prolidase et décrites à l'exemple 5 (Tableau 14).

Tableau 17

Patient	Classe	Stade	Alpha- Enclase Dose Ratio Unité Arbitraire	Alpha- Enclase Score	G3PDH Dose Ratio Unité Arbitraire	G3PDH Score	BIP Dose Ratio Unité Arbitraire	BIP Score	HSP71 Dose Ratio Unité Arbitraire	HSP71 Score	Peroxy-5 Dose Ratio Unité Arbitraire	Peroxy-5 Score	PDI Dose Ratio Unité Arbitraire	PDI Score
CBSE011	Tis	T0	0,184	0,816	0,454	18,773	0,059	0,802	0,010	0,418	0,023	0,807	0,070	0,799
CLSP234	Tis	T0	0,100	0,443	0,275	0,711	0,052	0,909	0,015	0,635	0,012	0,426	0,062	0,893
CLSP286	Tis	T0	0,247	17,540	0,507	20,986	0,049	0,971	0,024	16,098	0,032	17,608	0,052	16,988
CLSP300	Tis	T0	0,092	0,407	0,215	0,555	0,043	17,840	0,008	0,328	0,012	0,406	0,040	22,285
CLSP315	Tis	T0	0,071	0,316	0,147	0,381	0,043	17,852	0,006	0,244	0,012	0,400	0,059	0,941
CLSP367	Tis	T0	0,000	0,000	0,693	28,701	0,060	0,796	0,028	18,715	0,035	19,042	0,083	0,668
CLSP724	Tis	T0	0,254	18,070	0,654	27,083	0,058	0,816	0,030	20,193	0,022	0,751	0,074	0,753
CNSE003	Tis	T0	0,123	0,546	0,256	0,661	0,050	0,960	0,010	0,407	0,032	17,676	0,053	16,737
CNSE004	Tis	T0	0,140	0,620	0,264	0,683	0,045	16,792	0,007	0,309	0,019	0,648	0,054	16,584
GHB015	Tis	T0	0,277	19,689	0,698	28,877	0,056	0,854	0,013	0,541	0,045	24,993	0,068	0,817
GHB036	Tis	T0	0,308	21,894	0,569	23,570	0,044	17,400	0,020	0,847	0,036	19,646	0,053	16,734
CBSE001	CCR	I	0,218	0,966	0,377	0,976	0,049	0,979	0,017	0,716	0,027	0,913	0,062	0,891
CBSE016	CCR	I	0,139	0,618	0,274	0,710	0,059	0,800	0,010	0,418	0,027	0,912	0,068	0,821
CLSP047	CCR	I	0,061	0,269	0,226	0,586	0,049	0,969	0,008	0,333	0,024	0,815	0,047	18,797
CLSP162	CCR	I	0,116	0,513	0,406	16,810	0,056	0,847	0,014	0,602	0,007	0,227	0,065	0,851
CLSP196	CCR	I	0,090	0,401	0,223	0,576	0,057	0,842	0,010	0,438	0,023	0,789	0,063	0,886
CLSP224	CCR	I	0,122	0,543	0,281	0,726	0,054	0,884	0,012	0,498	0,023	0,791	0,058	0,953
CLSP235	CCR	I	0,058	0,256	0,028	0,071	0,032	23,467	0,003	0,128	0,015	0,509	0,030	29,846
CLSP263	CCR	I	0,159	0,706	0,587	24,283	0,066	0,716	0,026	17,775	0,020	0,690	0,080	0,695
CLSP340	CCR	I	0,266	18,897	0,426	17,617	0,087	0,549	0,031	21,062	0,028	0,955	0,093	0,598
CLSP344	CCR	I	0,113	0,503	0,327	0,847	0,057	0,832	0,011	0,467	0,016	0,557	0,060	0,930
CLSP364	CCR	I	0,147	0,652	0,347	0,897	0,084	0,569	0,015	0,625	0,031	16,834	0,093	0,596
CLSP376	CCR	I	0,165	0,731	0,359	0,928	0,071	0,668	0,015	0,624	0,020	0,702	0,098	0,567

GHBD003	CCR	I		0,000	0,204	0,529	0,062	0,761	0,010	0,425	0,017	0,584	0,074	0,748
GHBD094	CCR	I		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0
CLSP075	CCR	II	0,132	0,585	0,243	0,628	0,057	0,840	0,011	0,441	0,024	0,810	0,059	0,935
CLSP076	CCR	II	0,101	0,448	0,238	0,616	0,049	0,966	0,010	0,411	0,017	0,597	0,059	0,936
CLSP080	CCR	II	0,081	0,361	0,199	0,516	0,065	0,734	0,010	0,432	0,019	0,639	0,075	0,739
CLSP096	CCR	II	0,133	0,589	0,133	0,343	0,052	0,917	0,008	0,335	0,016	0,535	0,062	0,896
CLSP110	CCR	II	0,116	0,514	0,206	0,533	0,044	17,162	0,007	0,308	0,019	0,651	0,050	17,881
CLSP117	CCR	II	0,231	16,410	0,628	25,978	0,070	0,678	0,037	24,949	0,028	0,970	0,101	0,553
CLSP130	CCR	II	0,120	0,533	0,208	0,537	0,050	0,945	0,007	0,286	0,012	0,420	0,060	0,931
CLSP133	CCR	II	0,058	0,256	0,152	0,394	0,043	17,692	0,006	0,273	0,008	0,267	0,049	18,147
CLSP143	CCR	II	0,083	0,370	-0,167	-0,433	0,051	0,937	0,006	0,251	0,013	0,445	0,042	21,119
CLSP147	CCR	II	0,116	0,517	0,227	0,587	0,054	0,886	0,014	0,569	0,015	0,517	0,048	18,569
CLSP154	CCR	II	0,116	0,516	0,241	0,622	0,045	17,058	0,012	0,497	0,019	0,642	0,057	0,981
CLSP155	CCR	II	0,077	0,344	0,194	0,502	0,054	0,882	0,008	0,321	0,022	0,742	0,061	0,910
CLSP157	CCR	II	0,093	0,413	0,476	19,720	0,074	0,639	0,007	0,292	0,036	19,859	0,059	0,949
CLSP165	CCR	II	0,130	0,579	0,210	0,542	0,044	17,288	0,007	0,294	0,016	0,552	0,050	17,712
CLSP170	CCR	II	0,086	0,380	0,365	0,944	0,055	0,864	0,010	0,420	0,014	0,493	0,068	0,818
CLSP173	CCR	II	0,157	0,697	0,391	16,186	0,049	0,971	0,010	0,414	0,033	18,412	0,065	0,861
CLSP177	CCR	II	0,314	22,303	0,742	30,716	0,072	0,658	0,023	0,960	0,070	38,215	0,131	0,424
CLSP178	CCR	II	0,178	0,788	0,369	0,954	0,061	0,776	0,017	0,693	0,020	0,685	0,062	0,896
CLSP179	CCR	II	0,069	0,307	0,150	0,388	0,053	0,899	0,007	0,285	0,017	0,576	0,070	0,794
CLSP186	CCR	II	0,085	0,378	0,104	0,270	0,060	0,798	0,010	0,430	0,016	0,556	0,062	0,896
CLSP194	CCR	II	0,109	0,484	0,253	0,655	0,060	0,787	0,008	0,338	0,022	0,758	0,053	16,847
CLSP201	CCR	II	0,115	0,511	0,127	0,328	0,053	0,897	0,012	0,498	0,023	0,778	0,100	0,556
CLSP207	CCR	II	0,075	0,331	0,096	0,249	0,041	18,380	0,006	0,242	0,015	0,509	0,061	0,918
CLSP209	CCR	II	0,101	0,449	0,237	0,613	0,046	16,569	0,013	0,530	0,016	0,551	0,054	16,512
CLSP220	CCR	II	0,095	0,420	0,352	0,911	0,041	18,783	0,009	0,398	0,016	0,544	0,059	0,945
CLSP222	CCR	II	0,144	0,639	0,318	0,822	0,044	17,177	0,014	0,598	0,030	16,469	0,063	0,887
CLSP253	CCR	II	0,098	0,437	0,200	0,517	0,042	18,236	0,009	0,366	0,022	0,743	0,054	16,627
CLSP256	CCR	II	0,142	0,629	0,375	0,969	0,053	0,906	0,016	0,660	0,022	0,744	0,070	0,797
CLSP280	CCR	II	0,138	0,613	0,790	32,707	0,062	0,771	0,039	25,938	0,037	20,417	0,074	0,746

CLSP296	CCR	II	0,085	0,379	0,187	0,483	0,045	16,965	0,013	0,566	0,012	0,407	0,057	0,967
CLSP310	CCR	II	0,119	0,529	0,254	0,657	0,059	0,800	0,010	0,430	0,018	0,627	0,056	0,985
CLSP327	CCR	II	0,133	0,590	0,395	16,366	0,063	0,755	0,014	0,589	0,021	0,724	0,059	0,947
CLSP333	CCR	II	0,098	0,434	0,351	0,908	0,065	0,727	0,014	0,575	0,023	0,775	0,086	0,649
CLSP341	CCR	II	0,189	0,841	0,476	19,687	0,064	0,746	0,017	0,696	0,016	0,558	0,062	0,891
CLSP346	CCR	II	0,263	18,663	0,482	19,932	0,089	0,537	0,019	0,803	0,028	0,951	0,101	0,549
CLSP347	CCR	II	0,284	20,164	0,609	25,215	0,083	0,574	0,015	0,648	0,029	0,997	0,100	0,558
CLSP380	CCR	II	0,177	0,786	0,618	25,586	0,060	0,797	0,021	0,884	0,028	0,977	0,086	0,647
CNSE002	CCR	II	0,099	0,439	0,216	0,558	0,064	0,747	0,009	0,377	0,021	0,736	0,069	0,805
GHBDO21	CCR	II	0,111	0,492	0,212	0,548	0,051	0,937	0,010	0,405	0,021	0,735	0,067	0,831
GHBDO43	CCR	II	0,087	0,388	0,188	0,487	0,047	16,085	0,007	0,292	0,014	0,471	0,059	0,942
GHBDO64	CCR	II	0,101	0,447	0,331	0,856	0,061	0,776	0,010	0,418	0,024	0,818	0,061	0,913
GHBDO66	CCR	II	0,118	0,522	0,293	0,757	0,052	0,920	0,010	0,400	0,010	0,342	0,061	0,909
GHBDO75	CCR	II	0,122	0,540	0,211	0,545	0,049	0,973	0,008	0,327	0,019	0,659	0,069	0,805
GHBDO87	CCR	II	0,095	0,420	0,134	0,347	0,051	0,930	0,006	0,267	0,012	0,416	0,055	16,074
GHBDO90	CCR	II	0,079	0,351	0,118	0,305	0,068	0,702	0,011	0,441	0,015	0,516	0,087	0,642
GHBDO96	CCR	II	0,046	0,206	0,083	0,214	0,048	0,990	0,003	0,142	0,016	0,544	0,047	18,998
GHBDO100	CCR	II		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0
GHBDO103	CCR	II	0,128	0,567	0,377	0,975	0,054	0,874	0,013	0,556	0,021	0,706	0,075	0,737
CBSE023	CCR	III	0,272	19,346	0,682	28,243	0,049	0,969	0,020	0,840	0,034	18,866	0,063	0,889
CLSP044	CCR	III	0,143	0,634	0,328	0,849	0,068	0,696	0,012	0,510	0,039	21,613	0,071	0,779
CLSP074	CCR	III	0,099	0,439	0,218	0,564	0,044	17,414	0,009	0,382	0,049	27,042	0,058	0,952
CLSP078	CCR	III		0,0	0,163	0,421	0,048	0,993	0,011	0,448	0,030	16,472	0,055	16,083
CLSP081	CCR	III	0,183	0,814	0,412	17,065	0,059	0,804	0,016	0,677	0,031	17,187	0,067	0,835
CLSP098	CCR	III	0,000	0,000	0,445	18,408	0,038	19,881	0,009	0,385	0,023	0,806	0,041	21,746
CLSP174	CCR	III	0,269	19,133	0,446	18,447	0,083	0,570	0,028	18,599	0,060	33,217	0,107	0,520
CLSP227	CCR	III	0,116	0,517	0,226	0,584	0,042	18,049	0,010	0,436	0,037	20,495	0,073	0,762
CLSP233	CCR	III	0,088	0,391	0,193	0,499	0,033	22,944	0,007	0,295	0,014	0,480	0,053	16,726
CLSP255	CCR	III	0,077	0,341	0,204	0,528	0,051	0,929	0,008	0,326	0,024	0,811	0,059	0,941
CLSP289	CCR	III	0,143	0,634	0,290	0,749	0,050	0,946	0,012	0,498	0,017	0,590	0,062	0,895
CLSP320	CCR	III	0,049	0,218	0,233	0,603	0,053	0,894	0,011	0,442	0,011	0,376	0,052	17,187

CLSP324	CCR	III	0,278	19,717	0,504	20,843	0,051	0,939	0,029	19,513	0,032	17,559	0,070	0,799
CLSP383	CCR	III	0,120	0,533	0,369	0,955	0,062	0,761	0,016	0,662	0,017	0,596	0,068	0,822
CLSP384	CCR	III	0,129	0,573	0,400	16,566	0,063	0,758	0,018	0,768	0,018	0,617	0,097	0,571
CNSE001	CCR	III	0,174	0,772	0,245	0,634	0,049	0,961	0,011	0,447	0,028	0,955	0,050	17,903
CNSE016	CCR	III	0,182	0,809	0,267	0,691	0,066	0,722	0,012	0,509	0,023	0,789	0,137	0,405
CNSE017	CCR	III	0,094	0,418	0,088	0,228	0,041	18,482	0,005	0,209	0,017	0,600	0,038	23,266
CSEM015	CCR	III	0,092	0,408	0,121	0,314	0,049	0,965	0,006	0,235	0,009	0,300	0,048	18,344
CSEM029	CCR	III	0,084	0,373	0,158	0,409	0,052	0,906	0,009	0,377	0,022	0,752	0,044	20,098
GHB004	CCR	III		0,0	0,055	0,141	0,053	0,905	0,005	0,192	0,011	0,388	0,069	0,804
GHB017	CCR	III	0,103	0,459	0,270	0,700	0,058	0,815	0,011	0,479	0,015	0,501	0,069	0,809
GHB034	CCR	III	0,235	16,711	0,787	32,590	0,050	0,947	0,029	19,769	0,028	0,979	0,060	0,925
GHB042	CCR	III	0,128	0,568	0,244	0,630	0,055	0,861	0,007	0,285	0,038	20,725	0,070	0,794
GHB045	CCR	III	0,051	0,228	0,108	0,278	0,050	0,942	0,008	0,325	0,011	0,363	0,087	0,642
GHB089	CCR	III	0,113	0,502	0,189	0,490	0,048	0,990	0,005	0,220	0,014	0,474	0,051	17,437
GHB0105	CCR	III	0,110	0,487	0,252	0,652	0,048	0,996	0,007	0,274	0,012	0,423	0,084	0,665
CBSE012	CCR	IV	0,090	0,400	0,078	0,202	0,047	16,281	0,007	0,297	0,009	0,312	0,051	17,288
CBSE026	CCR	IV	0,182	0,809	0,290	0,751	0,068	0,700	0,012	0,520	0,022	0,773	0,077	0,718
CLSP156	CCR	IV	0,181	0,802	0,682	28,221	0,055	0,869	0,025	17,075	0,025	0,845	0,053	16,789
CLSP159	CCR	IV	0,171	0,759	0,289	0,749	0,052	0,907	0,014	0,585	0,123	67,466	0,065	0,858
CLSP167	CCR	IV	0,095	0,422	0,233	0,603	0,042	18,288	0,009	0,377	0,017	0,587	0,049	18,280
CLSP260	CCR	IV	0,246	17,461	0,384	0,994	0,057	0,830	0,015	0,635	0,030	16,454	0,061	0,906
CLSP334	CCR	IV	0,283	20,085	0,571	23,624	0,076	0,624	0,026	17,141	0,036	19,787	0,076	0,734
CLSP357	CCR	IV	0,161	0,713	0,455	18,843	0,086	0,553	0,021	0,896	0,024	0,815	0,091	0,614
CLSP365	CCR	IV	0,179	0,796	0,248	0,642	0,063	0,750	0,011	0,473	0,017	0,594	0,082	0,680
CLSP366	CCR	IV	0,169	0,751	0,408	16,904	0,064	0,743	0,018	0,770	0,026	0,901	0,070	0,797
GHB022	CCR	IV	0,246	17,501	0,291	0,753	0,058	0,825	0,012	0,514	0,016	0,539	0,084	0,665
GHB071	CCR	IV	0,518	36,822	0,512	21,194	0,046	16,552	0,025	16,504	0,043	23,621	0,061	0,905
CLSP197	CCR	NA		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0
HGED005	Témoins ColoNeg		0,236	16,744	0,304	0,786	0,062	0,767	0,017	0,726	0,028	0,967	0,082	0,678
PROMIS 21-01-005	Témoins ColoNeg		0,111	0,491	0,199	0,515	0,050	0,960	0,007	0,300	0,011	0,389	0,066	0,846
PROMIS 21-01-006	Témoins ColoNeg		0,109	0,482	0,123	0,317	0,054	0,879	0,012	0,503	0,009	0,313	0,061	0,913

PROMIS 21-01-009	Témoïn ColoNeg		0,091	0,403	0,094	0,242	0,077	0,615	0,012	0,501	0,023	0,791	0,073	0,760
PROMIS 21-01-011	Témoïn ColoNeg		0,042	0,187	0,135	0,350	0,067	0,708	0,006	0,263	0,012	0,416	0,080	0,698
PROMIS 21-01-012	Témoïn ColoNeg		0,155	0,687	0,252	0,653	0,070	0,676	0,012	0,499	0,020	0,693	0,071	0,786
PROMIS 21-02-001	Témoïn ColoNeg		0,140	0,620	0,387	1,000	0,072	0,664	0,010	0,415	0,020	0,698	0,108	0,516
PROMIS 21-02-003	Témoïn ColoNeg		0,045	0,198	0,119	0,307	0,062	0,766	0,005	0,227	0,013	0,439	0,068	0,813
PROMIS 21-02-004	Témoïn ColoNeg			0,0	0,386	0,999	0,088	0,543	0,024	1,000	0,025	0,871	0,137	0,406
PROMIS 21-02-006	Témoïn ColoNeg		0,072	0,320	0,382	0,988	0,043	17,748	0,025	16,545	0,029	1,000	0,047	18,985
PROMIS 21-02-008	Témoïn ColoNeg		0,085	0,379	0,178	0,460	0,057	0,833	0,081	54,590	0,010	0,338	0,070	0,794
PROMIS 21-02-011	Témoïn ColoNeg		0,072	0,319	0,164	0,425	0,064	0,747	0,008	0,316	0,010	0,339	0,063	0,887
PROMIS 21-02-014	Témoïn ColoNeg		0,075	0,331	0,128	0,330	0,048	0,993	0,009	0,397	0,011	0,388	0,063	0,888
PROMIS 21-02-016	Témoïn ColoNeg		0,142	0,631	0,239	0,618	0,062	0,773	0,008	0,327	0,016	0,551	0,085	0,654
PROMIS 21-03-004	Témoïn ColoNeg		0,101	0,448	0,159	0,412	0,066	0,717	0,008	0,346	0,018	0,613	0,069	0,801
PROMIS 21-03-013	Témoïn ColoNeg		0,136	0,604	0,194	0,501	0,051	0,938	0,011	0,476	0,016	0,540	0,056	0,994
PROMIS 21-03-015	Témoïn ColoNeg		0,079	0,349	0,108	0,279	0,059	0,804	0,009	0,359	0,010	0,339	0,070	0,791
PROMIS 21-04-002	Témoïn ColoNeg		0,110	0,489	0,327	0,845	0,048	1,000	0,013	0,543	0,011	0,381	0,073	0,765
PROMIS 21-04-006	Témoïn ColoNeg		0,172	0,762	0,278	0,720	0,051	0,932	0,011	0,450	0,021	0,729	0,056	0,996
PROMIS 21-04-007	Témoïn ColoNeg		0,057	0,253	0,147	0,381	0,071	0,672	0,009	0,378	0,015	0,514	0,071	0,780
PROMIS 21-04-008	Témoïn ColoNeg		0,223	0,988	0,211	0,545	0,073	0,651	0,011	0,471	0,015	0,511	0,078	0,709
PROMIS 21-04-009	Témoïn ColoNeg		0,086	0,380	0,137	0,354	0,070	0,677	0,010	0,402	0,014	0,494	0,095	0,587
PROMIS 21-04-013	Témoïn ColoNeg		0,055	0,245	0,058	0,151	0,068	0,701	0,006	0,264	0,007	0,227	0,073	0,762
PROMIS 21-07-004	Témoïn ColoNeg		0,094	0,416	0,131	0,340	0,061	0,777	0,008	0,353	0,018	0,614	0,087	0,642
PROMIS 21-12-001	Témoïn ColoNeg		0,199	0,881	0,242	0,626	0,056	0,845	0,007	0,292	0,016	0,553	0,073	0,757
PROMIS 21-12-007	Témoïn ColoNeg		0,090	0,400	0,073	0,189	0,042	18,020	0,005	0,214	0,011	0,364	0,056	1,000
PROMIS 21-12-011	Témoïn ColoNeg		0,097	0,430	0,141	0,365	0,067	0,713	0,008	0,328	0,014	0,492	0,077	0,718
PROMIS 21-22-001	Témoïn ColoNeg		0,089	0,394	0,155	0,402	0,079	0,602	0,008	0,327	0,023	0,793	0,080	0,694
PROMIS 21-22-006	Témoïn ColoNeg		0,065	0,290	0,118	0,306	0,052	0,923	0,006	0,246	0,008	0,267	0,065	0,856
PROMIS 21-22-008	Témoïn ColoNeg		0,113	0,500	0,226	0,584	0,065	0,737	0,010	0,409	0,017	0,579	0,083	0,674
PROMIS 37-03-004	Témoïn ColoNeg		0,116	0,514	0,257	0,664	0,061	0,774	0,014	0,568	0,021	0,725	0,068	0,822
PROMIS 37-04-001	Témoïn ColoNeg		0,128	0,568	0,248	0,641	0,068	0,700	0,011	0,455	0,015	0,530	0,105	0,532
PROMIS 37-04-005	Témoïn ColoNeg		0,067	0,296	0,083	0,215	0,060	0,794	0,007	0,285	0,011	0,375	0,082	0,680
PROMIS 37-05-008	Témoïn ColoNeg		0,162	0,720	0,327	0,845	0,055	0,867	0,014	0,588	0,019	0,657	0,064	0,870

PROMIS 37-06-001	Témoigné ColoNeg		0,131	0,582	0,111	0,288	0,071	0,673	0,010	0,419	0,014	0,478	0,079	0,703
PROMIS 37-09-002	Témoigné ColoNeg		0,089	0,394	0,210	0,544	0,059	0,801	0,008	0,335	0,013	0,431	0,069	0,808
PROMIS 37-11-001	Témoigné ColoNeg		0,088	0,391	0,188	0,486	0,055	0,860	0,006	0,255	0,010	0,350	0,062	0,890
PROMIS 37-11-002	Témoigné ColoNeg		0,081	0,361	0,256	0,661	0,053	0,898	0,009	0,375	0,009	0,317	0,060	0,932
PROMIS 37-11-011	Témoigné ColoNeg		0,066	0,293	0,287	0,742	0,049	0,964	0,006	0,250	0,007	0,245	0,082	0,677
PROMIS 37-11-016	Témoigné ColoNeg		0,092	0,409	0,146	0,378	0,064	0,742	0,007	0,283	0,017	0,588	0,073	0,766
PROMIS 37-12-002	Témoigné ColoNeg		0,077	0,342	0,255	0,660	0,069	0,690	0,007	0,297	0,015	0,511	0,078	0,715
PROMIS 37-13-003	Témoigné ColoNeg		0,070	0,311	0,135	0,348	0,062	0,769	0,008	0,318	0,009	0,317	0,077	0,719
PROMIS 37-13-006	Témoigné ColoNeg		0,106	0,469	0,141	0,365	0,053	0,890	0,007	0,296	0,014	0,469	0,065	0,853
PROMIS 37-13-008	Témoigné ColoNeg		0,127	0,566	0,360	0,931	0,075	0,632	0,016	0,670	0,013	0,436	0,074	0,754
PROMIS 37-14-009	Témoigné ColoNeg		0,071	0,314	0,071	0,183	0,053	0,899	0,011	0,478	0,009	0,297	0,070	0,793
PROMIS 37-14-018	Témoigné ColoNeg		0,044	0,193	0,066	0,169	0,051	0,924	0,004	0,149	0,012	0,415	0,065	0,850
PROMIS 37-14-021	Témoigné ColoNeg		0,053	0,235	0,067	0,174	0,052	0,912	0,004	0,158	0,006	0,199	0,074	0,749
PROMIS 37-15-002	Témoigné ColoNeg		0,746	52,949	0,137	0,356	0,072	0,658	0,008	0,319	0,011	0,366	0,084	0,661
PROMIS 37-15-006	Témoigné ColoNeg		0,065	0,290	0,136	0,353	0,061	0,778	0,005	0,229	0,006	0,218	0,067	0,831
PROMIS 37-16-001	Témoigné ColoNeg		0,084	0,372	0,423	17,500	0,075	0,635	0,017	0,729	0,025	0,869	0,085	0,655
PROMIS 37-17-001	Témoigné ColoNeg		0,090	0,400	0,242	0,626	0,059	0,804	0,011	0,453	0,020	0,699	0,085	0,655
PROMIS 37-17-003	Témoigné ColoNeg		0,052	0,230	0,167	0,431	0,064	0,740	0,004	0,155	0,013	0,463	0,098	0,569
PROMIS 37-17-004	Témoigné ColoNeg		0,098	0,435	0,134	0,347	0,076	0,625	0,010	0,431	0,008	0,273	0,071	0,780
PROMIS 37-18-001	Témoigné ColoNeg		0,076	0,335	0,197	0,511	0,056	0,857	0,011	0,462	0,026	0,899	0,069	0,801
PROMIS 37-18-003	Témoigné ColoNeg		0,062	0,275	0,179	0,463	0,055	0,864	0,009	0,359	0,012	0,429	0,061	0,915
PROMIS 37-18-004	Témoigné ColoNeg		0,064	0,285	0,257	0,664	0,061	0,774	0,007	0,283	0,012	0,421	0,066	0,843
PROMIS 37-18-005	Témoigné ColoNeg		0,057	0,251	0,143	0,369	0,054	0,887	0,007	0,312	0,011	0,383	0,071	0,782
PROMIS 37-18-024	Témoigné ColoNeg		0,047	0,207	0,090	0,233	0,056	0,843	0,008	0,351	0,026	0,887	0,063	0,888
PROMIS 37-19-006	Témoigné ColoNeg		0,047	0,209	0,117	0,304	0,070	0,682	0,006	0,261	0,008	0,284	0,095	0,585
PROMIS 37-19-007	Témoigné ColoNeg		0,071	0,313	0,117	0,302	0,062	0,772	0,006	0,237	0,016	0,547	0,064	0,870
PROMIS 37-20-004	Témoigné ColoNeg		0,125	0,554	0,365	0,943	0,069	0,693	0,012	0,492	0,039	21,553	0,082	0,680
PROMIS 71-02-003	Témoigné ColoNeg		0,051	0,226	0,167	0,432	0,070	0,684	0,007	0,289	0,012	0,402	0,067	0,833
PROMIS 71-04-003	Témoigné ColoNeg		0,128	0,569	0,152	0,392	0,058	0,817	0,022	0,903	0,055	30,325	0,066	0,839
PROMIS 71-09-007	Témoigné ColoNeg		0,090	0,401	0,251	0,648	0,057	0,837	0,012	0,509	0,024	0,820	0,072	0,769
PROMIS 71-10-001	Témoigné ColoNeg			0,0	0,192	0,497	0,091	0,525	0,013	0,560	0,015	0,505	0,083	0,671

PROMIS 71-10-007	Témoins ColoNeg		0,225	1,000	0,433	17,902	0,070	0,681	0,012	0,523	0,012	0,424	0,084	0,663
PROMIS 71-11-001	Témoins ColoNeg		0,141	0,628	0,264	0,684	0,074	0,641	0,010	0,432	0,017	0,577	0,093	0,599
PROMIS 71-11-006	Témoins ColoNeg		0,109	0,485	0,179	0,462	0,080	0,592	0,008	0,339	0,011	0,361	0,075	0,742
PROMIS 71-11-008	Témoins ColoNeg		0,046	0,206	0,077	0,199	0,075	0,637	0,009	0,362	0,016	0,551	0,084	0,663
PROMIS 71-11-009	Témoins ColoNeg		0,067	0,299	0,123	0,318	0,058	0,820	0,007	0,299	0,012	0,398	0,074	0,754
Performances			Alpha-Enolase Score		G3PDH Score		BIP Score		HSP71 Score		Peroxy-5 Score		PDI Score	
Seuil			0,988		0,999		1		1		1		0,996	
Sensibilité %			15,0		27,4		21,2		11,5		21,2		25,7	
Spécificité %			97,1		97,1		97,1		97,1		97,1		98,6	
CCR+ au-dessus du seuil			17		31		24		13		24		29	
ColoNeg au-dessus du seuil			2		2		2		2		2		1	

REVENDICATIONS

1. Procédé de diagnostic, in vitro, du cancer colorectal chez un patient, par la détermination de la présence de la prolidase, dans un échantillon biologique du patient.

5 2. Procédé de diagnostic précoce, in vitro, du cancer colorectal chez un patient, par la détermination de la présence de la prolidase, dans un échantillon biologique du patient.

3. Procédé de détection, dans un échantillon biologique d'un patient, d'une tumeur Tis colorectale, par la détermination de la présence de la prolidase, dans un échantillon biologique du patient.

4. Procédé de détection, dans un échantillon biologique d'un patient, d'un adénome colorectal, par la détermination de la présence de la prolidase, dans un échantillon biologique du patient.

5. Procédé de dépistage, in vitro, d'un cancer colorectal dans une population par détermination de la présence de la prolidase dans un échantillon biologique d'un individu.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le patient est suspecté de cancer, par exemple de cancer colorectal.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'on détecte la prolidase et/ou au moins un traceur représentatif de la prolidase et choisi parmi des peptides, des acides nucléiques, des anticorps, dans ledit échantillon biologique.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase et on met en évidence une variation de son expression.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on met en évidence une diminution de l'expression de la prolidase.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase et celle d'au moins un marqueur choisi parmi les marqueurs suivants :

- ACE; Aminoacylase 1; Apolipoprotéine A1; Apolipoprotéine A2; Beta 2 Microglobuline; CA242; CA50; CA72-2; CA19-9; Calgranuline C; Calréticuline; CCSA-3 (colon cancer specific antigen) ; CCSA-4; CD24; CD26; Cripto-1; Cytokératine 20; Epithelial-Cadhérine; Ezrine; Galectine-3; GST Pi (GSTP1); HSP60; Intelectine-1; Intestinal Fatty Acid-Binding Protein; Keratine type I Cytoskeletal 18; Keratine type I Cytoskeletal 19; Keratine type II

- Cytoskeletal 8; Leucocyte Elastase Inhibitor, associé ou non à la Protéinase 3 (PRN3) ; Liver Fatty Acid-Binding Protein; L-Lactate Deshydrogénase Chaîne B (LDHB); Maspine; MIF; MUC5AC; Ostéopontine; Plastine-I; Protéasome 20S; (Pro)défensine-A5; (Pro)défensine-A6; Protéine Disulfide Isomérase (PDI);
- 5 Pyruvate kinase M2-PK; Regenerating Islet-Derived Protein 3 Alpha; S100A8; S100A9; Testostérone; TIMP-1; Translationally-Controlled Tumor Protein; Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1; Tumor-Associated Calcium Signal Transducer 1; Villine; Vimentine; Heat Shock cognate 71 kDa (HSP71), BIP (GRP-78), Peroxiredoxin-5, Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
- 10 (G3PDH) ; Alpha-Enolase ;
- ADN méthylé dans le sang, de préférence l'ADN méthylé du gène AXL4 (Aristaless-like Homeobox-4 Gene Methylation) ou l'ADN méthylé du gène Septin-9;
 - des altérations spécifiques de fragments d'ADN dans les selles comme
- 15 des mutations spécifiques de l'ADN dans les selles ou des altérations spécifiques du profil de méthylation de l'ADN dans les selles;
- haptoglobine dans les selles ;
 - hémoglobine humaine dans les selles.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'on
- 20 détermine la présence de la prolidase et celle d'au moins un marqueur choisi parmi L-FABP, CA19-9, ACE, Béta-2 Microglobuline, Timp1, M2PK, HSP60, (Pro)defensine A6, BIP (GRP78), G3PDH, Gal3, PDI, ApoA1 et ApoA2,
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase et celle d'au moins les associations
- 25 suivantes de marqueurs :
- ACE et CA19-9,
 - LFABP et PDI,
 - L-FABP, CA19-9 et ACE,
 - LFABP, ACE et Timp1,
 - 30 LFABP, ACE et M2PK,
 - LFABP, CA19-9, ACE et PDI
 - LFABP, ACE, M2PK et Timp1,
 - LFABP, ACE, CA19-9 et PDI.
 - LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9 et PDI.
 - 35 LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine et PDI.
 - LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, G3PDH et PDI.

LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine et G3PDH.

LFABP, ACE, M2PK, Timp1, CA19-9, Villine, G3PDH et PDI.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique du patient est choisi parmi le sang, le sérum, le plasma, les urines, la salive, le tissu et les selles.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est distant de la tumeur et est de préférence choisi parmi le sang, le sérum et le plasma.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase par une technique de spectrométrie de masse.

16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase par la technique LC-MRM-MS qui combine la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase par une technique immunologique.

18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'on détermine la présence de la prolidase en associant une technique immunologique et une technique de spectrométrie de masse.

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 à 18, caractérisé en ce qu'on détecte un peptide ou un mélange de peptides choisis parmi les peptides de séquence SEQ ID NO : 1 à 3.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'on détecte les peptides de la prolidase en suivant les transitions listées dans le tableau 1.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce que l'on suit la transition 400.2/686.3 du peptide de SEQ ID NO : 1, et la transition du peptide lourd correspondant, pour déterminer la présence de la prolidase.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 21, caractérisé en ce que l'on suit la transition 452.7/662.2 du peptide de SEQ ID NO : 5, et la transition du peptide lourd correspondant, pour déterminer la présence de l'Alpha-Enolase.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 22, caractérisé en ce que l'on suit les transitions 699,4/557,4; 699,4/685,4;

699,4/784,5 du peptide de SEQ ID NO : 6, et la transition du peptide lourd correspondant, pour déterminer la présence de la protéine BIP (GRP78).

24. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 23, selon lequel on suit les transitions 403,2/550,3 et 403,2/706,3 du peptide de SEQ ID NO : 12 ou la transition 435,3/657,2 du peptide de SEQ ID NO : 10, et les transitions des peptides lourds correspondants, pour déterminer la présence de la G3PDH.

25. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 24, selon lequel on suit la transition 494,6/793,4 du peptide de SEQ ID NO : 15, et la transition du peptide lourd correspondant, pour déterminer la présence de l'HSP71 (HSC70).

26. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 25, selon lequel on suit les transitions 496,3/407,3; 496,3/522,3; 496,3/635,4 du peptide du peptide de SEQ ID NO : 17, et les transitions du peptide lourd correspondant, pour déterminer la présence de la PDI.

27. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 26, dans le dépistage, le diagnostic précoce, le suivi thérapeutique, le pronostic et le diagnostic des rechutes dans le cadre du cancer colorectal.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2014/050176A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/574
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)
G01N

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, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/104595 A2 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 2 December 2004 (2004-12-02) claim 18 page 77 - page 80 page 79, line 20 - line 23 ----- -/--	1,2,5-8, 13,14,27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 March 2014

Date of mailing of the international search report

10/04/2014

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

Hoff, Céline

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2014/050176

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	QUINT P S ET AL: "W1876 Stool Protein Markers for Colorectal Cancer: Identification of High-Abundance Candidates By Mass Spectroscopy", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 136, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages A-745, XP026113982, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(09)63435-1 [retrieved on 2009-05-01] the whole document -----	1,15
A	WO 2009/019367 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; ATAMAN-OENAL YASEMIN [FR]; CHARRIER JEAN-PHILIPPE) 12 February 2009 (2009-02-12) the whole document -----	1-27
A	MARZANNA CECHOWSKA-PASKO ET AL: "Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue", INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, vol. 87, no. 4, 23 August 2006 (2006-08-23), pages 289-296, XP055071808, ISSN: 0959-9673, DOI: 10.1111/j.1365-2613.2006.00486.x the whole document -----	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2014/050176

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004104595 A2	02-12-2004	EP 1629282 A2	01-03-2006
		WO 2004104595 A2	02-12-2004

WO 2009019367 A2	12-02-2009	AU 2008285556 A1	12-02-2009
		CA 2693096 A1	12-02-2009
		CN 101796414 A	04-08-2010
		EP 2171468 A2	07-04-2010
		FR 2919065 A1	23-01-2009
		JP 2010533852 A	28-10-2010
		US 2010136572 A1	03-06-2010
		WO 2009019367 A2	12-02-2009

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050176

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N33/574
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

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, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2004/104595 A2 (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 2 décembre 2004 (2004-12-02) revendication 18 page 77 - page 80 page 79, ligne 20 - ligne 23 ----- -/-	1,2,5-8, 13,14,27



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"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)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"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

"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

"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

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

28 mars 2014

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/04/2014

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hoff, Céline

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	QUINT P S ET AL: "W1876 Stool Protein Markers for Colorectal Cancer: Identification of High-Abundance Candidates By Mass Spectroscopy", GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 136, no. 5, 1 mai 2009 (2009-05-01), pages A-745, XP026113982, ISSN: 0016-5085, DOI: 10.1016/S0016-5085(09)63435-1 [extrait le 2009-05-01] le document en entier -----	1,15
A	WO 2009/019367 A2 (BIOMERIEUX SA [FR]; ATAMAN-OENAL YASEMIN [FR]; CHARRIER JEAN-PHILIPPE) 12 février 2009 (2009-02-12) le document en entier -----	1-27
A	MARZANNA CECHOWSKA-PASKO ET AL: "Enhanced prolidase activity and decreased collagen content in breast cancer tissue", INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, vol. 87, no. 4, 23 août 2006 (2006-08-23), pages 289-296, XP055071808, ISSN: 0959-9673, DOI: 10.1111/j.1365-2613.2006.00486.x le document en entier -----	1-27

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2014/050176

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004104595 A2	02-12-2004	EP 1629282 A2	01-03-2006
		WO 2004104595 A2	02-12-2004

WO 2009019367 A2	12-02-2009	AU 2008285556 A1	12-02-2009
		CA 2693096 A1	12-02-2009
		CN 101796414 A	04-08-2010
		EP 2171468 A2	07-04-2010
		FR 2919065 A1	23-01-2009
		JP 2010533852 A	28-10-2010
		US 2010136572 A1	03-06-2010
		WO 2009019367 A2	12-02-2009
