

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2012 (15.11.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/153078 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/53 (2006.01) *C07K 14/54* (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01) *C07K 14/56* (2006.01)

(74) Mandataire : GILLET, Raphaëlle; Cabinet Beau de Loménie, B.P. 7073, 51 Avenue Jean Jaurès, F-69301 Lyon Cedex 07 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2012/051075

(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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

(22) Date de dépôt international :
14 mai 2012 (14.05.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
11 54138 12 mai 2011 (12.05.2011) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I [FR/FR]; 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (FR). HOSPICES CIVILS DE LYON [FR/FR]; 3 Quai Des Celestins, F-69229 Lyon Cedex 02 (FR). INSERM (Institut National de la Recherche Médicale) [FR/FR]; 101 Rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NATAF, Serge [FR/FR]; 7 Rue André Chénier, F-69003 Lyon (FR). LACHUER, Joël [FR/FR]; 11 Allée des Acacias, F-01600 Trevoux (FR). WIERINCKX, Anne [FR/FR]; 31 Rue Hugues GUERIN, F-69008 Lyon (FR). ANDRODIAS-CONDEMINÉ, Géraldine [FR/FR]; 26 Cours Lafayette, F-69003 Lyon (FR).

Publiée :

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

(54) Title : METHOD OF *IN VITRO* DETERMINATION OF THE PRESENCE OF MULTIPLE SCLEROSIS OF PRIMATIVELY PROGRESSIVE FORM

(54) Titre : PROCEDE DE DETERMINATION *IN VITRO* DE LA PRESENCE D'UNE SCLEROSE EN PLAQUES A FORME PRIMITIVEMENT PROGRESSIVE

(57) Abstract : The invention relates to a method of *in vitro* determination of the presence of primitively progressive multiple sclerosis in a subject, comprising the detection of IL-29 and/or of the IL-28R α receptor in a biological sample to be tested arising from said subject and the comparison of the level detected with that of a reference sample. It also relates to the *in vitro* or *ex vivo* use of one or more compound(s) capable of detecting specifically IL-29 and/or the IL-28R α receptor so as to determine the presence of primitively progressive MS, as well as kits comprising such compound(s).

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé de détermination *in vitro* de la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive chez un sujet, comprenant la détection de l'IL-29 et/ou du récepteur IL-28R α dans un échantillon biologique à tester issu dudit sujet et la comparaison du niveau détecté avec celui d'un échantillon de référence. Elle concerne également l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un ou de plusieurs composé(s) capable(s) de détecter spécifiquement l'IL-29 et/ou le récepteur IL-28R α , pour déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive, ainsi que des kits comprenant de tel(s) composé(s).



WO 2012/153078 A1

**PROCEDE DE DETERMINATION *IN VITRO* DE LA PRESENCE
D'UNE SCLEROSE EN PLAQUES A FORME PRIMITIVEMENT
PROGRESSIVE**

5 La présente invention concerne le domaine médical, et notamment le diagnostic de la sclérose en plaques.

La sclérose en plaques (SEP) est une pathologie inflammatoire démyélinisante du système nerveux central touchant préférentiellement l'adulte jeune. L'étiologie de la SEP reste actuellement inconnue bien que l'existence de mécanismes autoimmuns soit largement admise.

10 L'hypothèse d'une origine virale de la SEP est régulièrement avancée mais aucune preuve formelle n'a pu être apportée dans ce sens. Le plus souvent, cette maladie évolue initialement par poussées partiellement ou totalement régressives : on parle de forme rémittente de la SEP. Toutefois, chez environ un tiers des patients, une évolution lentement

15 progressive fait suite à la phase rémittente et conduit à un handicap neurologique majeur : on parle de forme secondairement progressive. L'évolution bénigne des formes rémittentes de la SEP est possible (une seule poussée sans séquelles puis aucune autre manifestation) alors qu'elle est très rare dans les formes dites secondairement progressives.

20 Par ailleurs, 10 à 15 % des patients développent une forme d'emblée progressive : on parle alors de SEP primitivement progressive.

Le diagnostic de SEP se base sur un ensemble de critères cliniques, radiologiques et biologiques dits "critères de McDonald" dont la dernière réactualisation remonte à 2010 (Polman C.H. et. al., Ann Neurol

25 2012, 69 : 292-302). Dans ces recommandations de consensus, on rappelle que le diagnostic de SEP repose principalement sur la notion de dissémination des lésions dans le temps et dans l'espace. Cette dissémination peut être démontrée de manière optimale par les techniques d'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM). Par

30 ailleurs, la mise en évidence d'un profil oligoclonal des immunoglobulines dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) peut constituer un élément important du diagnostic. Ces recommandations stipulent que la maladie

de Devic (neuromyélie optique), longtemps considérée comme une forme particulière de SEP, doit aujourd'hui être reconnue comme une entité distincte de la SEP, diagnostiquée sur la base de critères spécifiques tels que, en particulier, la présence dans le sang d'auto-anticorps anti-Aquaporine 4.

Il n'existe pas actuellement de marqueur sérique de la SEP. Lors des premières manifestations cliniques, et quelle que soit la forme clinique de SEP, le diagnostic de SEP repose donc sur la combinaison d'éléments cliniques (examen et anamnèse), radiologique (Imagerie par Résonance Magnétique) et biologique (identification d'un profil oligoclonal des immunoglobulines dans le liquide céphalo-rachidien). Toutefois, il est relativement fréquent qu'une incertitude diagnostique persiste, notamment dans les cas de SEP primitivement progressive.

En effet, les formes primitivement progressives présentent un certain nombre de caractéristiques cliniques, radiologiques et biologiques les distinguant des formes rémittentes de SEP (Miller and Leary, 2007, Lancet Neurol., 8 : 903-912) : i) le début clinique de ces formes est généralement insidieux, il est plus tardif, l'évolution clinique est lentement progressive et, le plus souvent, sans poussée surajoutée, ii) le terrain est différent (sujets plus âgés, sex ratio équilibré alors qu'il est déséquilibré en défaveur des femmes dans les formes rémittentes ou secondairement progressives avec deux fois plus de femmes atteintes), iii) les anomalies ou lésions observées en imagerie cérébrale (IRM) sont habituellement peu nombreuses et moins marquées que dans les formes rémittentes ou secondairement progressives, iv) dans le LCR, le profil oligoclonal des immunoglobulines est parfois absent, rendant le diagnostic difficile à établir. Il est donc recommandé que le diagnostic de SEP primitivement progressive repose sur des critères spécifiques. Ceux-ci incluent notamment la constatation que la maladie est cliniquement parlante depuis une période d'au moins un an.

Quelle que soit la forme de SEP considérée (rémittente, secondairement progressive ou primitivement progressive), les scores

obtenus aux critères cliniques, biologiques et IRM de la SEP permettent de distinguer les SEP certaines, des SEP probables ou des SEP possibles. Le diagnostic de SEP est considéré comme certain si les critères de McDonald sont respectés. Si seulement une partie des critères est respectée on parle de SEP possible ou, pour certains auteurs, de SEP probable. Cette incertitude diagnostique a une incidence importante sur la qualité de la prise en charge thérapeutique des patients à SEP probable ou possible.

Outre les potentielles difficultés diagnostiques, le suivi thérapeutique des patients atteints de SEP est rendu difficile par l'absence de marqueur sérique permettant d'apprécier l'évolutivité ou l'activité de la maladie, à savoir la présence d'une SEP évolutive ou SEP active, c'est-à-dire d'une SEP qui nécessite un traitement de fond et/ou une surveillance étroite de l'évolution clinique et radiologique. En effet, quelle que soit la forme clinique de SEP (rémittente, secondairement progressive ou primitivement progressive), un large spectre d'évolution peut être observé, avec, aux deux extrêmes : i) les SEP peu ou pas évolutives qui sont très peu ou pas invalidantes malgré un temps d'évolution prolongé, ii) les SEP très évolutives qui se caractérisent par un handicap sévère d'installation rapide sur quelques mois ou années. Les critères d'évolutivité les plus souvent utilisés sont les suivants : i) la progression du score clinique EDSS (« *Expanded Disability Status Scale* ») en dehors des phases de poussées, ii) le nombre élevé de lésions nouvelles observées en IRM par rapport à un examen de référence, iii) le nombre élevé de lésions "actives" observées en IRM après injection de Gadolinium (on parle de lésions « réhaussées » par le Gadolinium).

En particulier, un marqueur sérique d'évolutivité serait un outil utile pour décider : i) de la mise en place ou de la poursuite de traitements de fonds aux effets secondaires importants (traitements immunosuppresseurs en particulier), ii) de la fréquence à laquelle le suivi clinique et radiologique doit être réalisé. Par ailleurs, un tel marqueur sérique d'évolutivité présenterait un intérêt spécifique dans les formes

primitivement progressives car l'évolution clinique y est le plus souvent d'aggravation très lente, difficilement évaluable par le seul suivi clinique et l'activité radiologique y est faible (relative stabilité dans le temps des lésions observées en IRM cérébrale) rendant l'IRM peu utile au suivi évolutif de la maladie. Ainsi, dans les formes primitivement progressives, on peut considérer que tout retard à l'établissement initial du diagnostic et/ou à l'évaluation de l'évolutivité de la maladie peut avoir pour conséquence un retard à la mise en route d'un traitement de fond potentiellement efficace.

En conséquence, chez les patients à SEP certaine, l'absence de marqueur biologique signant la présence d'une SEP évolutive, limite les possibilités d'ajustement des traitements actuellement disponibles ; le problème se posant de manière particulièrement aiguë pour les SEP à forme primitivement progressive compte tenu de ses particularités clinique et radiologique.

Il existe donc un réel besoin clinique de marqueur(s) sérique(s) permettant de déterminer la présence d'une SEP qui, éventuellement associés aux critères existants, permettraient d'établir : i) la présence d'une SEP de manière certaine, notamment chez les patients pour lesquels une SEP probable ou possible a été définie sur la base des critères radiologiques et/ou cliniques existants, et en particulier dans les cas de SEP à forme primitivement progressive (SEP dont le diagnostic est le plus difficile à établir) ii) le caractère évolutif de la SEP chez des patients à SEP certaine, notamment chez les patients présentant une forme primitivement ou secondairement progressive.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont tenté d'analyser la présence d'un ensemble de cytokines dans le sérum de patients SEP et de sujets contrôles présentant des pathologies neurologiques autres que la SEP. Jusqu'à alors, aucune de ces études n'a permis d'identifier une cytokine ou un groupe de cytokines dont la présence dans le sang signerait la présence d'une SEP de manière certaine, dès la phase initiale

de la maladie, en particulier dans les cas de formes primitivement progressive.

5 A ce jour, il n'existe donc pas de marqueur biologique sanguin pour déterminer la présence d'une sclérose en plaques de manière certaine, en particulier dans les cas de formes primitivement progressive, ni pour déterminer le caractère évolutif de cette maladie. C'est dans ce contexte que les inventeurs ont découvert ce qui fait l'objet de la présente invention.

10 Les Interférons (IFNs) jouent un rôle central dans les réponses immunes innées et adaptatives. Ils sont regroupés au sein de trois grandes familles : les IFNs de type I, l'IFN de type II et les IFNs de types III.

15 Les IFNs de type I (IFN- α et IFN- β) sont synthétisés par différents types cellulaires immuns (cellules dendritiques plasmacytoïdes essentiellement) ou non immuns (fibroblastes) en réponse notamment à toute infection virale induisant la stimulation de récepteurs TLR ("*Toll-Like Receptor*"). Ces IFNs provoquent la synthèse d'un ensemble de molécules à activité antivirale parmi lesquelles les molécules IFI44 (*interferon-induced protein 44*), IRF-1 (*interferon responsive factor 1*), IRF9
20 (*interferon responsive factor 9*) et IFIT3 (*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3*).

25 L'IFN de type II correspond à l'IFN- γ et est principalement synthétisé par les lymphocytes-T et les cellules NK ("*Natural Killer*") au cours de pathologies inflammatoires, infectieuses ou néoplasiques. L'IFN- γ est un puissant activateur macrophagique qui induit la synthèse de molécules pro-inflammatoires (chémokines, cytokines pro-inflammatoires) et de molécules de surface en rapport avec la présentation antigénique (molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, molécules de co-stimulation).

30 Les IFNs de type III, découverts au début des années 2000, regroupent 3 molécules qui sont : l'interféron- $\lambda 1$ ou IL-29, l'interféron- $\lambda 2$ ou IL-28a et l'interféron- $\lambda 3$ ou IL-28b (Sheppard *et al.*, 2003, Nat.

Immuno., 4 :63-8). Ces trois molécules partagent un récepteur commun de structure dimérique formé par : i) la chaîne beta du récepteur à l'IL-10 (IL-10R β) et ii) une chaîne alpha nommée IL-28R α . Comme les IFNs de type I, les IFNs de type III sont principalement synthétisés en réponse à une infection virale et induisent la production de molécules à propriété anti-virale qui sont similairement induites par les interférons de type I et de type III. Par ailleurs, les IFNs de type III, et en particulier l'IL-29, exercent une activité pro-inflammatoire présentant des analogies avec celle de l'Interféron- γ (Pekarek *et al.*, 2007, *Genes Immun.*, 8 : 177-80).

L'expression du récepteur aux IFNs de type III a été mise en évidence dans différents types cellulaires immuns ou non immuns chez la souris et chez l'homme. Parmi ceux-ci, les neurones infectés, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales peuvent notamment être cités. Malgré son rôle important dans la réponse immune, peu de travaux ont étudié l'expression des IFNs de type III chez l'homme, sans doute en raison du faible nombre de kits commerciaux actuellement développés et de leur très récente mise sur le marché (kits disponibles depuis 2009). A la connaissance des inventeurs, l'existence d'une élévation sérique d'un IFN de type III au cours d'une pathologie humaine a été mise en évidence, par exemple dans le cas de l'IL-29, chez les patients présentant une allergie respiratoire (rhinite ou asthme), ou chez des patients souffrants de lupus érythémateux disséminé (LED).

Selon un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé de détermination *in vitro* de la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive chez un sujet, comprenant, voire consistant en, les étapes suivantes :

- a) détection d'un ou de plusieurs marqueur(s) choisi(s) parmi l'IL-29 et le récepteur IL-28R α , dans un échantillon biologique à tester issu dudit sujet,
- b) comparer le niveau détecté avec celui d'un échantillon de référence ;

la mise en évidence d'une différence significative de niveau détecté dans l'échantillon à tester par rapport à celui de l'échantillon de référence étant associée à la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive chez ledit sujet.

5 La mise en évidence d'une variation significative dans le niveau détecté d'au moins un des marqueurs de l'invention, à savoir l'IL-29 ou l'IL-28R α dans l'échantillon à tester permet de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive chez un sujet, et en particulier la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, c'est-à-dire d'en
10 affirmer le caractère évolutif, à savoir la nécessité de la mise en place d'un traitement de fond et/ou de sa poursuite et/ou d'une surveillance étroite de l'évolution clinique et/ou radiologique.

 Le procédé de l'invention permet en particulier de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive chez un sujet dont on
15 suppose qu'il est atteint de cette forme de SEP sur la base du contexte clinique et/ou radiologique. Ce procédé permet donc tout particulièrement de confirmer un diagnostic encore incertain qui aurait été provisoirement établi en utilisant les données cliniques et/ou radiologiques, notamment dans le cas de SEP probable ou possible à forme primitivement
20 progressive.

 De plus, dans le cas de sujets ayant déjà eu des symptômes ou signes cliniques de la maladie, le procédé de l'invention permet également de confirmer la présence d'une SEP primitivement progressive à caractère évolutif (SEP primitivement progressive évolutive), c'est-à-dire
25 d'une SEP primitivement progressive qui nécessite la mise en place d'un traitement de fond et/ou d'un suivi clinique et/ou radiologique étroit.

 Ainsi, l'expression « déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive ou d'une SEP à forme primitivement progressive » ou « présence d'une SEP primitivement progressive ou d'une
30 SEP à forme primitivement progressive » selon l'invention définit à la fois :

 i) la mise en évidence d'une SEP primitivement progressive de manière certaine (SEP certaine à forme primitivement progressive), et

notamment chez les patients pour lesquels une SEP primitivement progressive probable ou possible a été définie sur la base des critères radiologiques et/ou cliniques existants, et

- 5 ii) la mise en évidence du caractère évolutif de la SEP primitivement progressive (SEP primitivement progressive évolutive) chez des patients dont on sait déjà qu'ils sont atteints d'une SEP certaine à forme primitivement progressive.

10 D'une manière générale, le procédé selon l'invention permet de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive chez un sujet, même si celui-ci est déjà sous traitement de fond, comme par exemple un traitement immunosuppresseur ou immunomodulateur.

15 De manière préférée, le procédé selon l'invention comprend, voire consiste en, la détection de l'IL-29 dans l'échantillon à tester pour déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive chez un sujet, et de préférence la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive.

20 Au sens de la présente invention, le terme « détection » ou « détecter » signifie une détection *in vitro* ou *ex-vivo*. Par ailleurs, ces termes entendent désigner à la fois la mise en évidence de la présence et/ou la quantification de ces marqueurs au niveau nucléique ou au niveau protéique, mais également au niveau de l'activité spécifique de ces marqueurs. A cet effet, toute méthode de détection et/ou de quantification bien connue de l'homme du métier peut être utilisée pour la mise en œuvre de l'invention, que ce soit en rapport avec la

25 détermination de la présence et/ou de l'expression et/ou de l'activité spécifique de ces marqueurs. En particulier, lorsque la détection et/ou la quantification de ces marqueurs est réalisée au niveau nucléique, et en particulier à partir d'ARN ou d'ADNc, celle-ci peut notamment être réalisée par analyse PCR, par hybridation micro-arrays ou Northern-blot.

30 Lorsque la détection et/ou la quantification de ces marqueurs est réalisée au niveau protéique, les techniques standards telles que le Western-Blot, ELISA, RIA, IRMA, FIA, CLIA, ECL, cytométrie de flux ou immunocytologie

peuvent être utilisées. Lorsque c'est l'activité spécifique de ces marqueurs qui est mise en évidence et/ou quantifiée, celle-ci pourra par exemple être déterminée par analyse de la capacité de l'échantillon biologique testé à inhiber l'effet cytopathique exercé par un virus (par exemple le

5 Vesicular Somatic Virus aussi nommé VSV) sur une lignée cellulaire humaine sensible à ce virus (par exemple la lignée cellulaire HEP2 dans le cas du virus VSV) tel que décrit par Olivier et al., 2009, *J Immunol Methods*, vol. 351, p.41-45.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la détection

10 du ou des marqueurs est réalisée au niveau protéique, et en particulier à l'aide de la technique ELISA.

De manière particulièrement avantageuse, la présente invention concerne la détermination de la présence d'une SEP primitivement progressive à l'aide du procédé de l'invention comprenant, voire consiste

15 en, la détection de l'IL-29 dans l'échantillon à tester, et de préférence la détection de l'IL-29 au niveau protéique.

De manière encore plus préférée, la présente invention concerne un procédé de détermination *in vitro* de la présence d'une SEP primitivement progressive chez un sujet comprenant la détection de l'IL-

20 29 au niveau protéique dans un échantillon de sang, et en particulier de sérum, ou du liquide céphalo-rachidien issu dudit sujet.

Au sens de la présente invention, les termes et expressions « marqueur », « marqueur de l'invention » ou « marqueur d'intérêt » désigne tout matériel biologique qui correspond à la présence,

25 l'expression et/ou l'activité de l'IL-29 et/ou de l'IL-28R α . Ledit matériel biologique peut notamment consister en des protéines, de l'acide désoxyribonucléique (ADN) ou de l'acide ribonucléique (ARN), et notamment des ARN messagers.

Dans le cadre de l'invention, la détection du ou des marqueur(s)

30 d'intérêt, IL-29 et/ou IL-28R α , entend concerner la détection du marqueur sous toutes ses formes de synthèse et/ou de maturation, que ce soit variant, précurseur, isoforme etc, du moment que ces formes sont

spécifiques du marqueur concerné correspondant, c'est-à-dire qu'elles ne peuvent correspondre à un autre marqueur.

Ainsi, pour la présente invention, le ou les « marqueur(s) », « marqueur(s) de l'invention » ou « marqueur(s) d'intérêt »
5 correspondent de préférence aux séquences de référence mentionnées ci-dessous, mais également à toute séquence qui correspond à une autre forme lors de la synthèse et/ou de la maturation du marqueur codé par ces séquences de références, telle que variant, précurseur, isoforme etc, tant que cette séquence est spécifique du marqueur en question.

10 Pour les différents marqueurs selon l'invention, les séquences nucléiques de référence sont les suivantes :

-IL-29 : séquence de référence NCBI: NM_172140.1, et

-IL-28R α : séquence de référence NCBI: NM_170743.2.

S'agissant de l'IL-29 en particulier, des exemples de « variant, précurseur ou isoforme » sont notamment toute séquence nucléique qui
15 présente plus de 86 % d'homologie avec la séquence dont elle est l'homologue, c'est-à-dire la séquence nucléique de référence ci-dessus correspondant à l'IL-29, et de préférence qui présente une homologie d'au moins 90 %, d'au moins 95 %, d'au moins 98 % ou d'au moins 99
20 % avec cette séquence de référence.

Pour les différents marqueurs selon l'invention, les séquences protéiques de référence sont les suivantes :

-IL-29 : séquence de référence NCBI: NP_742152.1, et

-IL-28R α : séquence de référence GenBank: AAI01409.1.

S'agissant de l'IL-29 en particulier, des exemples de « variant, précurseur ou isoforme » sont notamment toute séquence protéique qui
25 présente plus de 95 % d'homologie avec la séquence dont elle est l'homologue, c'est-à-dire la séquence protéique de référence ci-dessus correspondant à l'IL-29, et de préférence qui présente une homologie d'au moins 96 %, d'au moins 97 %, d'au moins 98 % ou d'au moins 99
30 % avec cette séquence de référence.

S'agissant de l'IL-28R α en particulier, des exemples de « variant, précurseur ou isoforme » sont notamment toute séquence, nucléique ou protéique, qui présente au moins 90 % d'homologie avec la séquence dont elle est l'homologue, c'est-à-dire les séquences nucléique ou protéique de référence respectives ci-dessus correspondant à l'IL-28R α , et de préférence qui présente une homologie d'au moins 95 %, d'au moins 97 %, d'au moins 98 % ou d'au moins 99 % avec ces séquences de référence.

Le terme « homologie » se réfère à la similarité qui est calculée par alignement optimal entre deux séquences. La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives, lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

Le pourcentage d'homologie peut être calculé par l'homme du métier en utilisant les méthodes qui sont connues dans le domaine, et en particulier le programme informatique de comparaison de séquences tel que celui de la suite BLAST (Altschul et al., *Nucleic Acid Research*, 1997, 25, 3389-3402).

Au sens de la présente invention, on entend par « substitution conservative », toute substitution d'une base par une autre qui conduit à l'obtention d'une protéine identique en séquence, en particulier du fait de la dégénérescence du code génétique, ou toute substitution d'un résidu par un autre qui présente des propriétés chimiques ou physiques similaires (taille, charge, polarité etc) qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

En plus de la détection d'un ou de plusieurs des marqueurs d'intérêt, le procédé de l'invention peut également comprendre la détection conjointe d'un ou de plusieurs autres marqueurs biologiques de la SEP, sans que cela ne soit pour autant nécessaire pour pouvoir déterminer la présence de la maladie dans le cadre de l'invention. Ainsi, le procédé peut comprendre la détection conjointe d'un ou de plusieurs

marqueurs d'intérêt selon l'invention avec un ou plusieurs autres marqueurs biologiques de la SEP connu(s) dans le domaine.

Au sens de la présente invention, on entend par « échantillon à tester », tout échantillon biologique susceptible de contenir le ou les marqueurs à détecter et provenant du sujet ou du patient chez qui on souhaite déterminer la présence d'une sclérose en plaques.

Par conséquent, l'échantillon biologique à tester utilisé dans le cadre du procédé selon l'invention peut être de différente nature. En particulier, l'échantillon biologique à tester est choisi parmi les fluides biologiques tels que le sang, le sang total (tel que collecté de la voie veineuse, c'est-à-dire contenant les cellules blanches et rouges, les plaquettes et le plasma), le sérum, le plasma, l'urine, le liquide synovial, le liquide céphalo-rachidien, la lymphe, ainsi que les tissus tels que le tissu cérébral ou le tissu nerveux ou encore des cellules isolées à partir d'un tel tissu, du moment qu'elles contiennent le ou les marqueurs d'intérêt.

De préférence, l'échantillon biologique à tester est choisi parmi le sang, et en particulier le sérum, et le liquide céphalo-rachidien.

Le niveau du ou des marqueurs qui est détecté dans l'échantillon biologique à tester est alors comparé à celui détecté dans un échantillon de référence.

Dans le cadre de l'invention, l'échantillon de référence peut être tout échantillon biologique issu d'un sujet sain ou d'un pool de sujets sains, en particulier non atteint(s) ou suspecté(s) d'être atteint(s) de SEP. L'échantillon de référence peut également être issu du même sujet que celui dont est issu l'échantillon à tester mais correspondre à un stade antérieur du suivi du patient. Par exemple, effectué lors d'un prélèvement précédent dans le cadre du suivi qui est mis en place pour le patient concerné.

L'échantillon de référence peut également être constitué par tout échantillon, biologique ou non biologique, qui a été préalablement calibré pour contenir une valeur moyenne du ou des marqueur(s) à détecter qui

correspond au niveau qui a été détecté sur un pool d'échantillons biologiques issus de sujets sains ou du même sujet mais correspondant à un stade antérieur. Ainsi, avant la détection du ou des marqueurs proprement dite dans l'échantillon à tester, le procédé de l'invention peut
5 comprendre l'obtention préalable de cette valeur moyenne, et à laquelle le niveau qui sera détecté dans l'échantillon à tester pourra être comparé afin de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive selon l'invention.

Lorsqu'il est biologique, l'échantillon de référence peut être de
10 différentes natures et notamment choisi parmi les échantillons biologiques qui sont mentionnés ci-dessus concernant l'échantillon à tester (fluide, tissu, cellules, etc). De préférence, l'échantillon de référence qui est utilisé selon l'invention est un échantillon biologique de même nature (fluide, tissu, cellules etc) que celui de l'échantillon biologique à tester ou
15 d'une nature compatible pour constituer une référence quant à la détection des marqueurs à détecter.

En outre, les échantillons à tester et de référence qui sont comparés pour la détection des marqueurs sont de préférence issus de personnes ayant les mêmes caractéristiques ou une majorité de
20 caractéristiques communes, notamment du même sexe et/ou d'un âge similaire ou identique et/ou de même origine ethnique.

Dans le cas de l'utilisation d'un échantillon de référence préalablement calibré comme indiqué ci-dessus, cet échantillon sera bien évidemment choisi en fonction du ou des marqueur(s) testé(s), c'est-à-
25 dire que l'échantillon de référence sera calibré pour le ou les marqueur(s) que l'on cherche à détecter dans l'échantillon à tester.

Selon l'invention, la mise en évidence d'une différence significative de niveau détecté du ou des marqueurs d'intérêt dans l'échantillon à tester par rapport à celui de l'échantillon de référence est associée à la
30 présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive, et permet ainsi de poser le diagnostic d'une SEP certaine à forme primitivement progressive.

De manière préférée, cette différence permet d'affirmer le caractère évolutif de cette forme de la maladie. Dans ce cas particulier, et en plus de ceux mentionnés ci-dessus, l'échantillon de référence peut également correspondre à celui de patients atteints de SEP jugée non-
5 évolutive ou non-active, et en particulier de SEP primitivement progressive jugée non-évolutive ou non-active sur la base des critères cliniques et/ou radiologiques pertinents pour cette forme de la maladie.

La différence observée lors de la mise en œuvre du procédé de l'invention peut être une augmentation. Dans le cadre de l'invention, une
10 augmentation définit à la fois la détection d'un niveau significativement supérieur dans l'échantillon à tester par rapport à celui détecté dans l'échantillon de référence ou bien une présence dans l'échantillon à tester par rapport à une absence dans l'échantillon de référence.

La différence observée peut également être une diminution. Dans
15 le cadre de l'invention, une diminution définit à la fois la détection d'un niveau significativement inférieur dans l'échantillon à tester par rapport à celui détecté dans l'échantillon de référence ou bien une absence dans l'échantillon à tester par rapport à une présence dans l'échantillon de référence.

20 Ainsi, et comme mentionné ci-dessus, la détection au sens de l'invention peut aussi bien revêtir un aspect qualitatif que quantitatif.

Cependant, il est à noter que l'absence de différence significative du niveau détecté dans l'échantillon à tester par rapport à l'échantillon de référence ne permet pas d'exclure l'existence d'une SEP primitivement
25 progressive, évolutive ou non chez le sujet testé.

Bien évidemment, l'absence d'un marqueur d'intérêt dans un des échantillons ou le niveau détecté dépendra de différents facteurs, et notamment de la technique de détection utilisée et de sa sensibilité, de la nature des échantillons analysés, du type de détection choisi (protéique,
30 nucléique, activité, etc).

Dans le cadre de l'invention, un « niveau significativement inférieur ou supérieur » peut correspondre à l'absence de détection dans

l'échantillon testé par comparaison à un niveau détectable dans l'échantillon de référence ou au contraire à l'absence de détection dans l'échantillon de référence par comparaison à un niveau détectable dans l'échantillon testé. Alternativement, un « niveau significativement inférieur ou supérieur » peut correspondre à un niveau inférieur ou supérieur d'au moins un facteur 2 par rapport au niveau détecté dans l'échantillon de référence, de préférence inférieur ou supérieur d'au moins un facteur 3 par rapport au niveau d'expression détecté dans l'échantillon de référence.

10 Selon une variante préférée de l'invention, la mise en évidence d'une augmentation du niveau d'IL-29 dans l'échantillon biologique à tester par rapport à l'échantillon de référence est associée à la présence d'une SEP primitivement progressive, et de préférence à la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les
15 sujets chez lesquels le diagnostic de SEP certaine est déjà posé.

 Selon une autre variante de la présente invention, la mise en évidence d'une diminution du niveau du récepteur IL-28R α dans l'échantillon biologique à tester par rapport à l'échantillon de référence est associée à la présence d'une SEP primitivement progressive, et de
20 préférence à la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez lesquels le diagnostic de SEP certaine est déjà posé.

 Selon encore une autre variante, le procédé de l'invention peut être défini comme comprenant, voire consistant en, les étapes de
25 détection de la présence ou de l'augmentation du niveau d'IL-29 et/ou de détection de la diminution du niveau du récepteur IL-28R α ou de son absence dans l'échantillon biologique à tester par rapport à l'échantillon de référence, étant entendu que cette présence ou augmentation et/ou cette diminution ou absence est(sont) associée(s) à la présence d'une
30 SEP primitivement progressive, et de préférence à la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez lesquels le diagnostic de SEP certaine est déjà posé.

Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci a pour objet l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un composé ou d'un réactif ou d'une pluralité de composés ou de réactifs capable(s) de détecter spécifiquement un ou plusieurs marqueur(s) choisi(s) parmi l'IL-29 et le
5 récepteur IL-28R α , pour déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive, et de préférence la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez lesquels le diagnostic de SEP certaine est déjà posé.

Selon un mode de réalisation préférée, la présence d'une SEP
10 primitivement progressive, et de préférence la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez lesquels le diagnostic de SEP certaine est déjà posé, est déterminée par l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un composé ou d'un réactif ou d'une pluralité de composés ou de réactifs capable(s) de détecter
15 spécifiquement l'IL-29.

Parmi les composés ou réactifs capable(s) de détecter spécifiquement un ou plusieurs des marqueurs susmentionnés, on peut notamment citer des anticorps spécifiques ou des fragments ou dérivés de ceux-ci, par exemple des anticorps « *single chain* » Sv, mais aussi des
20 peptides ou encore des acides nucléiques ou des fragments de ceux-ci tels que des amorces (ou *primer*) ou couples d'amorces spécifiques qui détectent et/ou amplifient le gène correspondant au(x) marqueur(s) choisi(s), des sondes, des constructions anti-sens, des ARNi, des ribozymes etc correspondant au(x) marqueur(s) choisi(s).

25 Les modes de réalisation préférés qui sont mentionnés ci-dessus concernant le procédé constituent également des modes de réalisation préférés s'agissant de cette utilisation.

Selon un dernier aspect, la présente invention a pour objet une trousse ou kit pour la détermination *in vitro* de la présence d'une sclérose
30 en plaques primitivement progressive, et de préférence la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez

lesquels le diagnostic de SEP certaine à forme primitivement progressive est déjà posé.

Cette trousse comprend :

- un ou plusieurs composés ou réactifs capable(s) chacun de détecter spécifiquement un marqueur choisi(s) parmi l'IL-29 et le récepteur IL-28R α ,
- un échantillon témoin positif, et éventuellement
- un échantillon témoin négatif.

Les modes de réalisation préférés qui sont mentionnés ci-dessus concernant le ou les composés ou réactifs capable(s) de détecter spécifiquement le ou les marqueur(s) d'intérêt constituent également des modes de réalisation préférés s'agissant de la trousse ou kit selon l'invention.

En particulier, le kit de l'invention contient au moins un composé ou réactif capable de détecter spécifiquement l'IL-29. Il peut en outre contenir un composé capable de détecter spécifiquement l'IL-28R α .

L'échantillon témoin positif est de préférence un échantillon biologique issu d'un patient ou d'un pool de patients atteints de SEP primitivement progressive, et de préférence atteints de SEP certaine à forme primitivement progressive. Il peut également correspondre à un échantillon biologique issu d'un ou de plusieurs patients atteints d'une SEP primitivement progressive évolutive, et en particulier de SEP certaine à forme primitivement progressive et dont le caractère évolutif a été préalablement confirmé sur la base des critères cliniques et/ou radiologiques pertinents pour cette forme de la maladie.

De même que pour l'échantillon de référence mentionné ci-dessus, l'échantillon témoin positif peut également être constitué par tout échantillon, biologique ou non biologique, qui a été préalablement calibré pour contenir une valeur moyenne du ou des marqueur(s) à détecter qui correspond au niveau moyen qui a été détecté sur un pool d'échantillons biologiques issus de patients atteints de SEP certaine à forme primitivement progressive ou sur un pool d'échantillons biologiques issus

de patients atteints de SEP certaine à forme primitivement progressive et dont le caractère évolutif a été préalablement confirmé.

L'échantillon témoin négatif est en particulier un échantillon qui ne contient pas le ou les marqueur(s) choisi(s), comme par exemple un échantillon de sujet sain, ou un échantillon, biologique ou non biologique, pour lequel la détection du ou des marqueur(s) choisi(s) est ou a été rendue impossible. Dans ce cas, la méthode utilisée pour empêcher la détection du ou des marqueur(s) d'intérêt dans l'échantillon témoin négatif sera adaptée à la méthode de détection utilisée pour l'échantillon à tester dans le cadre du procédé de l'invention. Par exemple, si le marqueur d'intérêt est détecté pour sa présence au niveau protéique, la méthode utilisée pour rendre impossible la détection dudit marqueur dans l'échantillon témoin négatif sera une méthode permettant d'empêcher la détection de la protéine en question, sans pour autant empêcher la présence du gène et/ou du messenger codant cette protéine. De même, si le marqueur d'intérêt est détecté pour la mise en évidence de l'activité d'une protéine, alors la méthode utilisée pour rendre impossible la détection de l'activité de cette protéine dans l'échantillon témoin négatif sera une méthode permettant de rendre cette protéine inactive, sans pour autant empêcher l'expression du gène codant cette protéine et/ou la présence de la protéine elle-même tant que son activité est indétectable.

Les échantillons témoins positif et témoin négatif peuvent être de différentes natures. Sur ce point, les modes de réalisation préférés qui sont mentionnés ci-dessus concernant la nature de l'échantillon à tester et de l'échantillon de référence constituent également des modes de réalisation préférés s'agissant des échantillons témoins positif et témoin négatif contenus dans la trousse ou kit selon l'invention.

Le kit ou trousse de l'invention est un kit apte et destiné à la détermination de la présence d'une SEP primitivement progressive selon l'invention. Ainsi, il peut en outre comprendre des instructions d'utilisation des différents constituants du kit ou de la trousse permettant de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive selon

l'invention, et de préférence d'une SEP primitivement progressive évolutive. Cette trousse permet donc de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive et de préférence la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez
5 lesquels le diagnostic de SEP certaine à forme primitivement progressive est déjà posé.

En particulier, ces instructions indiquent dans quelle mesure la détection du ou des marqueur(s) concerné(s) permet d'établir la présence d'une SEP primitivement progressive selon l'invention. De préférence ces
10 instructions indiquent dans quelle mesure la mise en évidence d'une différence significative du niveau du ou des marqueur(s) détecté(s) dans l'échantillon à tester permet de conclure à la présence d'une SEP primitivement progressive, et de préférence à la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive, notamment pour les sujets chez
15 lesquels le diagnostic de SEP certaine à forme primitivement progressive est déjà posé, comme détaillé notamment ci-dessus concernant le procédé de l'invention.

Diverses autres caractéristiques ressortent de la description faite ci-dessous qui montrent, à titre d'exemples non limitatifs, des formes de
20 réalisation de l'objet de l'invention.

EXEMPLES

Analyse transcriptomique

Afin d'identifier un marqueur sérique diagnostique de la SEP nous avons développé une approche originale qui consiste en l'analyse
25 transcriptomique large (analyse par "*Gene Array*") de macrophages dérivés du sang.

Deux groupes appariés en âge et en sexe ont été étudiés :

- sujets sains (témoins ; n = 3),
- patients atteints de forme primitivement progressive de SEP prélevés
30 au moment du diagnostic et ne suivant pas de traitement (patients SEP ; n = 3)

D'après le suivi ultérieur des patients après les prélèvements, les patients SEP analysés dans cette étude présentent tous une forme jugée évolutive de la maladie car: i) le recours à un traitement immunosuppresseur a été nécessaire dans les 3 ans qui ont suivis le
5 prélèvement, ii) la pente d'aggravation du handicap dans les 3 ans s'est avérée égale ou supérieure à celle attendue pour cette forme de SEP, sur la base des données épidémiologiques connues.

Les cellules mononucléées des patients et des sujets témoins ont été isolées sur gradient de ficoll et stockées à -80°C dans la collection
10 "NeuroBioTec" du Centre de Ressources Biologiques des Hospices Civils de Lyon. Parmi les dizaines de prélèvements de cette nature stockés à NeuroBioTec, l'analyse rétrospective des dossiers cliniques a ensuite permis de sélectionner 3 patients atteints de formes primitivement progressive et dont l'évolution ultérieure attestait de l'évolutivité au
15 moment du prélèvement.

Les cellules ont été ensuite décongelées et cultivées en présence de M-CSF ("*macrophage colony-stimulating factor*") pendant 7 jours. Puis, les cellules surnageantes ont été éliminées, permettant ainsi d'obtenir une population de cellules adhérentes constituée à plus de 95% de
20 macrophages (cette méthode de culture a été validée par immunomarquage d'au moins 10 cultures macrophagiques avec les anticorps anti-CD11b ou anti-CD68). Les ARNm totaux ont ensuite été extraits puis étudiés par la technique de "*gene array*" sur la plateforme d'analyse ProfileXpert (Plateforme de biologie moléculaire de l'Institut
25 Fédératif des Neurosciences de Lyon). Le niveau d'expression de près de 30 000 gènes a ainsi pu être comparé entre les deux groupes.

Pour chaque comparaison, seuls les gènes exprimés dans l'ensemble des échantillons ont été pris en compte soit un total de près de 15 000 gènes. Une moyenne d'expression a été établie pour chaque
30 gène, puis des comparaisons de moyennes ont été réalisées et seules les variations d'un facteur supérieur ou égal à 2 ont été retenues. Par ailleurs, dans chaque groupe étudié (Témoins vs SEP), les gènes pour

lesquelles les valeurs inter-échantillons ont été jugées trop importantes ont été exclus de l'analyse (gènes pour lesquels le rapport de la moyenne des valeurs sur l'écart-type était supérieur ou égal à 2).

5 L'analyse comparative des résultats de *gene array* obtenus dans les deux groupes a ainsi permis d'identifier 194 gènes différentiellement exprimés d'un facteur au moins égal à 2 dont 154 gènes augmentés d'un facteur au moins égal à 2 et 40 gènes diminués d'un facteur au moins égal à 2 chez les patients SEP par rapport aux témoins.

10 Parmi les 154 gènes augmentés d'un facteur au moins égal à 2, 15 sont des gènes immuns (le caractère immun de ces gènes a été établi sur la base de la littérature et du logiciel DAVID). De façon surprenante 4 des 15 gènes immuns surexprimés sont des gènes de réponse aux IFNs de type I ou III (ISG pour « *Interferon Stimulated Genes* »). Il s'agit par ordre décroissant d'expression différentielle de : IFI44 (*interferon-induced protein 44*)(7^{ième} position/154, 1^{ième} position/15 gènes immuns), IRF-1
15 (*interferon regulatory factor 1*)(9^{ième} position/154, 2^{ième} position/15 gènes immuns), IFIT3 (*interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*)(17^{ième} position/154, 4^{ième} position/15 gènes immuns) et IRF-9
(*interferon regulatory factor 9*)(148^{ième} position/154, 15^{ième} position/15
20 gènes immuns) (**Tableau 1**).

Par ailleurs, parmi les 15 gènes immuns surexprimés, on trouve la présence d'un seul récepteur cytokinique : la chaîne alpha du récepteur à l'IL-10)(15^{ième} position/154, 3^{ième} position/15 gènes immuns). Il faut noter
25 que la chaîne alpha du récepteur à l'IL-10 est spécifique au récepteur à l'IL-10 et est à distinguer de la chaîne beta du récepteur à l'IL-10 qui est partagée par plusieurs récepteurs cytokiniques (récepteur à l'IL-10, récepteur aux IFNs de type III et récepteur à l'IL-22 notamment). Bien que des gènes de réponse aux IFNs de type I ou III soient augmentés chez les patients SEP, les récepteurs aux IFN de type I, IFNAR1
30 (*interferon alpha, beta and omega receptor 1*) et IFNAR2 (*interferon alpha, beta and omega receptor 2*) ne figurent pas parmi les 154 gènes augmentés. En revanche, la chaîne alpha du récepteur aux IFN de type

III, l'IL28R α , est l'un des 3 gènes immuns diminués chez les patients SEP par rapport aux sujets témoins (**Tableau 1**). Ainsi, parmi les 40 gènes diminués d'un facteur au moins égal à 2 chez les patients SEP par rapport aux Témoins, on identifie 3 gènes immuns qui sont : la chaîne alpha du récepteur aux IFN de type III (l'IL28R α), la chaîne beta du récepteur à la cytokine IL-17E (cytokine encore nommée IL-25) et l'intégrine CD61 (**Tableau 1**).

Tableau 1

<u>Rapport > 2 (gènes dont le niveau d'expression est augmenté d'un facteur au moins égal à 2)</u>	
154 gènes dont 15 gènes immuns incluant, par ordre décroissant d'expression différentielle :	
* IFI44 (7 ^{ième} position/154, X 3,11)	
* IRF-1 (9 ^{ième} position/154, X 3,03)	
* IL-10R alpha (15 ^{ième} position/154, X 2,81)	
* IFIT3 (17 ^{ième} position/154, X 2,71)	
* IRF-9 (148 ^{ième} position/154, X 2,01)	
<u>Rapport < 0,5 (gènes dont le niveau d'expression est diminué d'un facteur au moins égal à 2)</u>	
40 gènes dont 3 gènes immuns :	
* IL28-R alpha	
* IL-17E R	
* CD61	

Dosages ELISA

Des dosages de l'IL-28, de l'IL-29 et de l'IFN-alpha ont été réalisés sur des prélèvements de sera congelés et conservés au sein de la collection "NeuroBioTec" du Centre de Ressources Biologiques des Hospices Civils de Lyon. Des kits commerciaux vendus par Biolegend (Ozyme) ont été utilisés pour doser l'IL-28 α (IFN- λ 2)(Ref kit : 435507) et l'IL-29 (IFN- λ 1)(Ref Kit : 435607). Un kit commercial « Verikine TM

human interferon alpha » de chez "PBL Interféron Source" distribué par Tebu Bio a été utilisé pour doser l'IFN α (Ref kit : 41105).

Les sera dérivés des populations suivantes ont été analysées :

- 50 sujets témoins sains ;
- 5 - 10 patients atteints de glioblastome (tumeur maligne primitive du cerveau s'accompagnant d'une réaction inflammatoire) ;
- 10 patients atteints de pathologies neuro-inflammatoires autres que la SEP (maladie de Devic, vascularite, ADEM (*Acute Disseminated EncephaloMyelitis*, myélite) ;
- 10 - 16 patients atteints d'une forme primitivement progressive de SEP, sans traitement au moment du prélèvement ;
- 12 patients atteints d'une forme primitivement progressive de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Cellcept, Endoxan, Elsep, Imurel) ;
- 15 - 21 patients atteints d'une forme rémittente de SEP, sans traitement au moment du prélèvement ;
- 74 patients atteints d'une forme rémittente de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Rebif 44, Avonex, Rebif 22, Betaferon, Tysabri, Copaxone, Cellcept, Imurel) ;
- 20 - 26 patients atteints d'une forme secondairement progressive de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Cellcept, Endoxan, Methotrexate, Endoxan, Imurel).

Les résultats ont montré l'absence d'IL-28 α détectable dans l'ensemble des sera testés dérivant de sujets témoins sains (n = 10) ou de patients SEP atteints d'une forme primitivement progressive de SEP, sans traitement au moment du prélèvement (n = 16). Dans le groupe glioblastome, 2 patients présentaient des taux détectables d'IL-28, respectivement à 38,23 pg/ml et 18,25 pg/ml.

L'IFN α s'est révélé indétectable dans les seras dérivant des groupes de patients suivants (**Tableau 2**) :

- patients atteints d'une forme rémittente de SEP, sans traitement au moment du prélèvement (n = 21)

- patients atteints d'une forme rémittente de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Rebif 44, Avonex, Rebif 22, Betaferon, Tysabri, Copaxone, Cellcept, Imurel)(n = 74) ;

5 - patients atteints d'une forme secondairement progressive de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Cellcept, Endoxan, Methotrexate, Endoxan, Imurel)(n = 26).

10 En revanche, L'IFN α s'est révélé détectable chez 2 patients sur 10 atteints d'une pathologie neuro-inflammatoire autre que la SEP (11 pg/ml, 9 pg/ml), chez 3 sujets témoins sains sur 40 testés (14 pg/ml, 305 pg/ml, 21 pg/ml) et chez 2 patients sur 12 atteints d'une forme primitivement progressive, suivant un traitement au moment du prélèvement (69 pg/ml, 19 pg/ml)(**Tableau 2**).

Tableau 2

	Détection sérique d'IFN α
SEP rémittente* (n = 95)	0
SEP secondairement progressive** (n = 26)	0
SEP primitivement progressive*** (n = 12)	2 (16,6%)
Pathologies neuro-inflammatoires autres que la SEP (n = 10)	2 (20%)
Témoins sains (n = 40)	3 (7,5%)

15 * SEP rémittentes sans traitement de fond au moment du prélèvement (n = 21) ou suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (n = 74).

** SEP secondairement progressives suivant un traitement de fond au moment du prélèvement.

20 *** SEP primitivement progressives suivant un traitement de fond au moment du prélèvement.

L'IL-29 s'est révélée indétectable chez 49 des 50 sujets témoins sains et les seras dérivant des groupes de patients suivants (**Tableau 3**) :

- patients atteints d'une forme rémittente de SEP, sans traitement au moment du prélèvement (n = 21) ;

5 - patients atteints d'une forme rémittente de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Rebif 44, Avonex, Rebif 22, Betaferon, Tysabri, Copaxone, Cellcept, Imurel)(n = 74) ;

- patients atteints d'une forme secondairement progressive de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (Cellcept, Endoxan, Methotrexate, Endoxan, Imurel)(n = 26) ;

10 - patients atteints de pathologies neuro-inflammatoires autres que la SEP (maladie de Devic, vascularite, ADEM (*Acute Disseminated EncephaloMyelitis*, myélite), et

- patients atteints de glioblastome (n = 10).

15 L'IL-29 s'est révélée détectable chez un sujet témoin sain sur 50 sera testés (2364 pg/ml), chez 3 patients sur 16 atteints d'une forme primitivement progressive de SEP, sans traitement au moment du prélèvement (290 pg/ml, 396 pg/ml, 478 pg/ml) et chez 3 patients sur 12 atteints d'une forme primitivement progressive de SEP, suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (349 pg/ml, 173 pg/ml, 190 pg/ml)(**Tableau 3**).

20

Tableau 3

	Détection sérique d'IL-29
SEP rémittente* (n = 95)	0
SEP secondairement progressive** (n = 26)	0
SEP primitivement progressive*** (n = 28)	6 (21,4%)
Pathologies neuro-inflammatoires autres que la SEP (n = 10)	0
Gliome (n = 10)	0
Témoins sains (n = 50)	1 (2%)

* SEP rémittentes sans traitement de fond au moment du prélèvement (n = 21) ou suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (n = 74).

** SEP secondairement progressives suivant un traitement de fond au moment du prélèvement.

5 *** SEP primitivement progressives sans traitement de fond au moment du prélèvement (n = 16) ou suivant un traitement de fond au moment du prélèvement (n = 12).

Par conséquent, ces résultats démontrent que :

10 i) l'IL-29 est un marqueur sérique diagnostique de la SEP à forme primitivement progressive, que les patients suivent ou non un traitement au moment du prélèvement ;

ii) l'IL-28 α n'est pas détectable dans les SEP à forme primitivement progressive et ne peut donc servir de marqueur diagnostique pour ces formes de SEP ;

15 iii) l'IFN α est détectable dans les formes primitivement progressive de SEP mais l'est également dans un pourcentage non négligeable de sujets témoins sains (7,5 %) ou de patients atteints de pathologies neuro-inflammatoires autres que la SEP (20 %) ; l'IFN α ne peut donc servir de marqueur diagnostique pour les SEP à forme
20 primitivement progressive ;

iv) l'IL-29 peut servir de marqueur d'évolutivité chez les patients SEP à forme primitivement progressive suivant un traitement de fond.

25 En conclusion, le dosage d'IL-29 dans le sang peut donc être utilisé comme marqueur diagnostique ou comme marqueur d'évolutivité de la SEP à forme primitivement progressive.

L'invention n'est pas limitée aux exemples décrits et représentés car diverses modifications peuvent y être apportées sans sortir de son cadre.

REVENDICATIONS

1. Procédé de détermination *in vitro* de la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive chez un sujet, comprenant, voire consistant en, les étapes suivantes :

5 a) détection d'un ou de plusieurs marqueur(s) choisi(s) parmi l'IL-29 et le récepteur IL-28R α , dans un échantillon biologique à tester issu dudit sujet,

 b) comparer le niveau détecté avec celui d'un échantillon de référence ;

10 la mise en évidence d'une différence significative de niveau détecté dans l'échantillon à tester par rapport à celui de l'échantillon de référence étant associée à la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive chez ledit sujet.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la mise
15 en évidence d'une augmentation du niveau d'IL-29 dans l'échantillon biologique à tester par rapport à l'échantillon de référence est associée à la présence d'une SEP primitivement progressive.

3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la mise en évidence d'une diminution du niveau du récepteur
20 IL-28R α dans l'échantillon biologique à tester par rapport à l'échantillon de référence est associée à la présence d'une SEP primitivement progressive.

4. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend, voire consiste en, la détection de l'IL-29
25 dans l'échantillon à tester.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la mise en évidence d'une différence significative de niveau détecté dans l'échantillon à tester par rapport à celui de l'échantillon de référence est associée à la présence d'une SEP
30 primitivement progressive évolutive chez ledit sujet.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique à tester est choisi parmi le sang et le liquide céphalo-rachidien.

5 **7.** Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon de référence est un échantillon biologique issu d'un sujet sain ou d'un pool de sujets sains.

8. Utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un composé ou d'un réactif ou d'une pluralité de composés ou de réactifs capable(s) de détecter spécifiquement un ou plusieurs marqueur(s) choisi(s) parmi l'IL-29 et le
10 récepteur IL-28R α , pour déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive.

9. Utilisation selon la revendication 8, pour déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive évolutive.

10. Utilisation selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisée en ce que ledit composé ou réactif ou ladite pluralité de
15 composés ou de réactifs est(sont) capable(s) de détecter spécifiquement l'IL-29.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisée en ce que ledit ou lesdits composé(s) ou réactif(s) est(sont)
20 choisi(s) parmi des anticorps spécifiques ou des fragments ou dérivés de ceux-ci, des peptides ou des acides nucléiques ou des fragments de ceux-ci.

12. Trousse ou kit pour la détermination *in vitro* de la présence d'une sclérose en plaques primitivement progressive, comprenant :

25 - un ou plusieurs composés ou réactifs capable(s) chacun de détecter spécifiquement un marqueur choisi(s) parmi l'IL-29 et le récepteur IL-28R α ,

- un échantillon témoin positif, et éventuellement
- un échantillon témoin négatif.

30 **13.** Trousse ou kit selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'échantillon témoin positif est un échantillon biologique issu d'un patient

ou d'un pool de patients atteints de SEP primitivement progressive ou d'une SEP primitivement progressive évolutive.

- 5 **14.** Trousse ou kit selon la revendication 12 ou la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend en outre des instructions d'utilisation des différents constituants du kit ou de la trousse permettant de déterminer la présence d'une SEP primitivement progressive, et de préférence d'une SEP primitivement progressive évolutive.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/051075

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/53 G01N33/566 C07K14/54 C07K14/56
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 C07K

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, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/066002 A2 (UNIV NEW JERSEY MED [US]; KOTENKO SERGEI [US]; GALLAGHER GRANT [US]) 14 August 2003 (2003-08-14) the whole document page 29, pages 132,133 pages 177,193 claim 26 pages 15-30 pages 174-193 claims 1-35 ----- -/-	1-14

☒ 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

11 July 2012

Date of mailing of the international search report

18/07/2012

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

Boiangiu, Clara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/051075

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2010/316608 A1 (SUPPIAH VIJAYAPRAKASH [AU] ET AL) 16 December 2010 (2010-12-16) the whole document paragraphs [0003], [0005], [0009], [0012], [0027] paragraphs [0019] - [0055], [0079], [0097]; claims 1-101 -----	1-14
Y	WO 02/02627 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]) 10 January 2002 (2002-01-10) the whole document -----	1-14
Y	US 2007/020227 A1 (SHEPPARD PAUL O [US]) 25 January 2007 (2007-01-25) the whole document -----	1-14
Y	WO 2005/023862 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; BRADY LOWELL J [US]; KLUCHER KEVIN M [US]; CHAN) 17 March 2005 (2005-03-17) the whole document -----	1-14
Y	WO 02/086087 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]) 31 October 2002 (2002-10-31) the whole document -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/051075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03066002	A2	14-08-2003	AU 2003215136 A1 02-09-2003
		US 2009220511 A1 03-09-2009	
		US 2011171173 A1 14-07-2011	
		US 2012114603 A1 10-05-2012	
		WO 03066002 A2 14-08-2003	

US 2010316608	A1	16-12-2010	CN 102459651 A 16-05-2012
		EP 2443257 A1 25-04-2012	
		SG 176818 A1 30-01-2012	
		US 2010316608 A1 16-12-2010	
		WO 2010144946 A1 23-12-2010	

WO 0202627	A2	10-01-2002	AT 360696 T 15-05-2007
		AT 404670 T 15-08-2008	
		AU 7178601 A 14-01-2002	
		BR 0112119 A 06-05-2003	
		CA 2413258 A1 10-01-2002	
		CN 1443240 A 17-09-2003	
		DE 60128093 T2 27-12-2007	
		DK 1294888 T3 20-08-2007	
		DK 1717316 T3 08-12-2008	
		EP 1294888 A2 26-03-2003	
		EP 1717316 A1 02-11-2006	
		EP 1939293 A2 02-07-2008	
		EP 2132984 A2 16-12-2009	
		ES 2286128 T3 01-12-2007	
		ES 2311253 T3 01-02-2009	
		JP 4377126 B2 02-12-2009	
		JP 2004502419 A 29-01-2004	
		RU 2292394 C2 27-01-2007	
		US 2002039763 A1 04-04-2002	
		US 2004146988 A1 29-07-2004	
		US 2005014228 A1 20-01-2005	
		US 2005106680 A1 19-05-2005	
		US 2005106682 A1 19-05-2005	
		US 2007042468 A1 22-02-2007	
		US 2007043209 A1 22-02-2007	
		US 2007048841 A1 01-03-2007	
		US 2007049736 A1 01-03-2007	
		US 2008102490 A1 01-05-2008	
		US 2008214788 A1 04-09-2008	
		US 2009069274 A1 12-03-2009	
		US 2009326204 A1 31-12-2009	
		US 2010222266 A1 02-09-2010	
		US 2011054148 A1 03-03-2011	
		US 2011172170 A1 14-07-2011	
		WO 0202627 A2 10-01-2002	

US 2007020227	A1	25-01-2007	AU 2006272937 A1 01-02-2007
		CA 2616004 A1 01-02-2007	
		EP 1909821 A2 16-04-2008	
		JP 2009502800 A 29-01-2009	
		US 2007020227 A1 25-01-2007	
		US 2010298230 A1 25-11-2010	
		US 2011177024 A1 21-07-2011	
		WO 2007013944 A2 01-02-2007	

WO 2005023862	A2	17-03-2005	AT 388963 T 15-03-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/051075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		AU 2004270652 A1	17-03-2005
		CA 2534907 A1	17-03-2005
		DE 602004012424 T2	30-04-2009
		DK 1668031 T3	30-06-2008
		EP 1668031 A2	14-06-2006
		EP 2251352 A1	17-11-2010
		EP 2251353 A1	17-11-2010
		ES 2303132 T3	01-08-2008
		JP 4808157 B2	02-11-2011
		JP 2007528719 A	18-10-2007
		JP 2011200252 A	13-10-2011
		US 2005037012 A1	17-02-2005
		US 2007041936 A1	22-02-2007
		US 2007041975 A1	22-02-2007
		US 2007042469 A1	22-02-2007
		US 2007042470 A1	22-02-2007
		US 2007042471 A1	22-02-2007
		US 2007043210 A1	22-02-2007
		US 2007048274 A1	01-03-2007
		US 2007048275 A1	01-03-2007
		US 2007048276 A1	01-03-2007
		US 2007048277 A1	01-03-2007
		US 2007048843 A1	01-03-2007
		US 2007048844 A1	01-03-2007
		US 2007049737 A1	01-03-2007
		US 2007053875 A1	08-03-2007
		US 2007054374 A1	08-03-2007
		US 2007054375 A1	08-03-2007
		US 2007054376 A1	08-03-2007
		US 2007054377 A1	08-03-2007
		US 2007055051 A1	08-03-2007
		US 2007055052 A1	08-03-2007
		US 2007055053 A1	08-03-2007
		US 2007055054 A1	08-03-2007
		US 2007059313 A1	15-03-2007
		US 2007059804 A1	15-03-2007
		US 2007065406 A1	22-03-2007
		US 2007066810 A1	22-03-2007
		US 2007073044 A1	29-03-2007
		US 2007117967 A1	24-05-2007
		US 2007154446 A1	05-07-2007
		US 2007166282 A1	19-07-2007
		US 2007172923 A1	26-07-2007
		US 2008279816 A1	13-11-2008
		US 2010104531 A1	29-04-2010
		US 2012004161 A1	05-01-2012
		WO 2005023862 A2	17-03-2005
WO 02086087	A2	31-10-2002	
		AT 403726 T	15-08-2008
		AT 482272 T	15-10-2010
		AU 2002307510 A1	05-11-2002
		BR 0205083 A	20-07-2004
		CA 2441958 A1	31-10-2002
		CN 1620510 A	25-05-2005
		CN 101531715 A	16-09-2009
		DK 1501936 T3	08-12-2008
		EP 1501936 A2	02-02-2005
		EP 1942187 A1	09-07-2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/051075

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		ES 2311622 T3	16-02-2009
		JP 4350950 B2	28-10-2009
		JP 2005506052 A	03-03-2005
		RU 2321594 C2	10-04-2008
		WO 02086087 A2	31-10-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051075

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. G01N33/53 G01N33/566 C07K14/54 C07K14/56
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 C07K

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, WPI Data

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 03/066002 A2 (UNIV NEW JERSEY MED [US]; KOTENKO SERGEI [US]; GALLAGHER GRANT [US]) 14 août 2003 (2003-08-14) le document en entier page 29, pages 132,133 pages 177,193 revendication 26 pages 15-30 pages 174-193 revendications 1-35 ----- -/-	1-14



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

11 juillet 2012

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

18/07/2012

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

Boiangiu, Clara

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051075

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	US 2010/316608 A1 (SUPPIAH VIJAYAPRAKASH [AU] ET AL) 16 décembre 2010 (2010-12-16) le document en entier alinéas [0003], [0005], [0009], [0012], [0027] alinéas [0019] - [0055], [0079], [0097]; revendications 1-101 -----	1-14
Y	WO 02/02627 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]) 10 janvier 2002 (2002-01-10) le document en entier -----	1-14
Y	US 2007/020227 A1 (SHEPPARD PAUL O [US]) 25 janvier 2007 (2007-01-25) le document en entier -----	1-14
Y	WO 2005/023862 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]; BRADY LOWELL J [US]; KLUCHER KEVIN M [US]; CHAN) 17 mars 2005 (2005-03-17) le document en entier -----	1-14
Y	WO 02/086087 A2 (ZYMOGENETICS INC [US]) 31 octobre 2002 (2002-10-31) le document en entier -----	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051075

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03066002	A2	14-08-2003	AU 2003215136 A1	02-09-2003
			US 2009220511 A1	03-09-2009
			US 2011171173 A1	14-07-2011
			US 2012114603 A1	10-05-2012
			WO 03066002 A2	14-08-2003

US 2010316608	A1	16-12-2010	CN 102459651 A	16-05-2012
			EP 2443257 A1	25-04-2012
			SG 176818 A1	30-01-2012
			US 2010316608 A1	16-12-2010
			WO 2010144946 A1	23-12-2010

WO 0202627	A2	10-01-2002	AT 360696 T	15-05-2007
			AT 404670 T	15-08-2008
			AU 7178601 A	14-01-2002
			BR 0112119 A	06-05-2003
			CA 2413258 A1	10-01-2002
			CN 1443240 A	17-09-2003
			DE 60128093 T2	27-12-2007
			DK 1294888 T3	20-08-2007
			DK 1717316 T3	08-12-2008
			EP 1294888 A2	26-03-2003
			EP 1717316 A1	02-11-2006
			EP 1939293 A2	02-07-2008
			EP 2132984 A2	16-12-2009
			ES 2286128 T3	01-12-2007
			ES 2311253 T3	01-02-2009
			JP 4377126 B2	02-12-2009
			JP 2004502419 A	29-01-2004
			RU 2292394 C2	27-01-2007
			US 2002039763 A1	04-04-2002
			US 2004146988 A1	29-07-2004
			US 2005014228 A1	20-01-2005
			US 2005106680 A1	19-05-2005
			US 2005106682 A1	19-05-2005
			US 2007042468 A1	22-02-2007
			US 2007043209 A1	22-02-2007
			US 2007048841 A1	01-03-2007
			US 2007049736 A1	01-03-2007
			US 2008102490 A1	01-05-2008
			US 2008214788 A1	04-09-2008
			US 2009069274 A1	12-03-2009
			US 2009326204 A1	31-12-2009
			US 2010222266 A1	02-09-2010
			US 2011054148 A1	03-03-2011
			US 2011172170 A1	14-07-2011
			WO 0202627 A2	10-01-2002

US 2007020227	A1	25-01-2007	AU 2006272937 A1	01-02-2007
			CA 2616004 A1	01-02-2007
			EP 1909821 A2	16-04-2008
			JP 2009502800 A	29-01-2009
			US 2007020227 A1	25-01-2007
			US 2010298230 A1	25-11-2010
			US 2011177024 A1	21-07-2011
			WO 2007013944 A2	01-02-2007

WO 2005023862	A2	17-03-2005	AT 388963 T	15-03-2008

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/051075

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
		AU 2004270652 A1	17-03-2005
		CA 2534907 A1	17-03-2005
		DE 602004012424 T2	30-04-2009
		DK 1668031 T3	30-06-2008
		EP 1668031 A2	14-06-2006
		EP 2251352 A1	17-11-2010
		EP 2251353 A1	17-11-2010
		ES 2303132 T3	01-08-2008
		JP 4808157 B2	02-11-2011
		JP 2007528719 A	18-10-2007
		JP 2011200252 A	13-10-2011
		US 2005037012 A1	17-02-2005
		US 2007041936 A1	22-02-2007
		US 2007041975 A1	22-02-2007
		US 2007042469 A1	22-02-2007
		US 2007042470 A1	22-02-2007
		US 2007042471 A1	22-02-2007
		US 2007043210 A1	22-02-2007
		US 2007048274 A1	01-03-2007
		US 2007048275 A1	01-03-2007
		US 2007048276 A1	01-03-2007
		US 2007048277 A1	01-03-2007
		US 2007048843 A1	01-03-2007
		US 2007048844 A1	01-03-2007
		US 2007049737 A1	01-03-2007
		US 2007053875 A1	08-03-2007
		US 2007054374 A1	08-03-2007
		US 2007054375 A1	08-03-2007
		US 2007054376 A1	08-03-2007
		US 2007054377 A1	08-03-2007
		US 2007055051 A1	08-03-2007
		US 2007055052 A1	08-03-2007
		US 2007055053 A1	08-03-2007
		US 2007055054 A1	08-03-2007
		US 2007059313 A1	15-03-2007
		US 2007059804 A1	15-03-2007
		US 2007065406 A1	22-03-2007
		US 2007066810 A1	22-03-2007
		US 2007073044 A1	29-03-2007
		US 2007117967 A1	24-05-2007
		US 2007154446 A1	05-07-2007
		US 2007166282 A1	19-07-2007
		US 2007172923 A1	26-07-2007
		US 2008279816 A1	13-11-2008
		US 2010104531 A1	29-04-2010
		US 2012004161 A1	05-01-2012
		WO 2005023862 A2	17-03-2005
WO 02086087	A2	31-10-2002	
		AT 403726 T	15-08-2008
		AT 482272 T	15-10-2010
		AU 2002307510 A1	05-11-2002
		BR 0205083 A	20-07-2004
		CA 2441958 A1	31-10-2002
		CN 1620510 A	25-05-2005
		CN 101531715 A	16-09-2009
		DK 1501936 T3	08-12-2008
		EP 1501936 A2	02-02-2005
		EP 1942187 A1	09-07-2008

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

PCT/FR2012/051075

Document brevet cité
au rapport de recherche

Date de publication

Membre(s) de la
famille de brevet(s)

Date de publication

ES	2311622	T3	16-02-2009
JP	4350950	B2	28-10-2009
JP	2005506052	A	03-03-2005
RU	2321594	C2	10-04-2008
WO	02086087	A2	31-10-2002