(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
26 septembre 2013 (26.09.2013)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/140103 A1

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/96* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2013/050624

(22) Date de dépôt international :
22 mars 2013 (22.03.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1252641 23 mars 2012 (23.03.2012) FR

(71) Déposants : **HOSPICES CIVILS DE LYON** [FR/FR]; 3 Quai des Celestins, F-69229 Lyon Cedex 02 (FR). **BIOMÉRIEUX** [FR/FR]; F-69280 Marcy-l'Etoile (FR).

(72) Inventeurs : **LEPAPE, Alain**; 26 rue Edouard Millaud, F-69230 Saint-Genis-Laval (FR). **VENET, Fabienne**; 105 Chemin du Milieu, F-01700 Beynost (FR). **VILLARS, Astrid**; 47 rue du Professeur Paul Sisley, F-69003 Lyon (FR). **MONNERET, Guillaume**; 131 Cours Albert Thomas, F-69003 Lyon (FR).

(74) Mandataires : **GILLET, Raphaëlle** et al.; Cabinet Beau de Lomenie, 51 avenue Jean Jaurès B.P. 7073, F-69301 Lyon Cedex 07 (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, 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, PA, 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.

(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).

Publiée :

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

WO 2013/140103 A1

(54) **Title** : PROCESS FOR DETERMINING THE SUSCEPTIBILITY TO NOSOCOMIAL INFECTIONS

(54) **Titre** : PROCÉDÉ DE DÉTERMINATION DE LA SUSCEPTIBILITÉ AUX INFECTIONS NOSOCOMIALES

(57) **Abstract** : The invention relates to a process for determining the susceptibility to nosocomial infections in a patient, comprising the measurement of the expression of sCD127 in a biological sample.

(57) **Abrégé** : L'invention concerne un procédé de détermination de la susceptibilité infections nosocomiales chez un patient, comprenant la mesure l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique.

PROCEDE DE DETERMINATION DE LA SUSCEPTIBILITE AUX INFECTIONS NOSOCOMIALES

La présente invention concerne le domaine médical en général, et en particulier le domaine de la réanimation.

Plus précisément, l'invention concerne un procédé de détermination de la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique ou SIRS, en particulier chez un patient en état septique, notamment sévère, et de préférence chez un patient en choc septique.

Les infections nosocomiales sont un problème de santé publique important. Les patients hospitalisés ont souvent, par nature, des défenses immunitaires diminuées ou altérées, du fait de pathologies portant directement atteinte à leurs compétences immunitaires, ou en raison de leur état général. Ces patients, et en particulier les personnes dénutries ou aux âges extrêmes de la vie (personnes âgées, nourrissons) sont spécialement sensibles aux infections en général, et en particulier à la survenue d'infections nosocomiales.

La prévalence des infections nosocomiales est nettement plus élevée dans les unités de réanimation que celle observée dans d'autres secteurs hospitaliers. L'incidence importante des infections nosocomiales dans ce secteur s'explique par la conjonction délétère de plusieurs facteurs de risque endogènes : une exposition du patient à des procédures invasives (ventilation artificielle, sondage urinaire, cathétérisme), la gravité des patients (ainsi que les comorbidités associées) et les thérapeutiques (transfusions multiples, sédation). Néanmoins malgré l'ensemble des mesures d'hygiène et de surveillance (risques exogènes) et la prise en compte de ces facteurs de risque endogènes, l'incidence des infections nosocomiales reste stable ou diminue modestement.

Déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales est donc essentiel pour pouvoir proposer une prise en charge personnalisée, et ainsi tenter de minimiser les risques additionnels de décès.

A la connaissance des inventeurs, le seul marqueur immunologique actuellement connu pour être associé à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales est le marqueur HLA-DR (Human Leukocyte Antigen-DR) dont l'expression sur les monocytes (mHLA-DR) est diminuée chez les patients qui développent des infections nosocomiales. Cependant, l'expression de ce marqueur, développée en cytométrie en flux nécessite un équipement particulier (cytomètre en flux), qui est non disponible sur les plateaux de biologie (usage reservé à des laboratoires spécialisés d'hématologie ou d'immunologie) et dont la standardisation d'utilisation n'est pas établie. La mesure de mHLA-DR ne peut donc pas être réalisée en routine.

Ainsi, il existe un réel besoin de disposer d'autres marqueurs immunologiques permettant de prévoir, facilement et rapidement, la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales. En effet, pouvoir identifier les sujets les plus à risque de contracter des infections nosocomiales permettrait de leur réserver des thérapeutiques préventives plus adaptées et ciblées.

C'est dans ce contexte que la présente invention se propose de fournir un nouveau biomarqueur prédictif d'un risque accru aux infections nosocomiales chez un patient, et notamment chez un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression (chirurgie, brulure, traumatisme...) générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), en particulier chez un patient en état septique, notamment sévère, et de préférence chez un patient en choc septique. L'étude du niveau d'expression de ce biomarqueur permet ainsi de déterminer, facilement et rapidement, la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales et de prendre les dispositions préventives nécessaires.

Selon un premier aspect, la présente invention a donc pour objet un procédé de détermination de la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient, comprenant les étapes suivantes :

- mesurer l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique issu dudit patient ou échantillon à tester,
- conclure à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales après comparaison de l'expression de sCD127 par rapport à une valeur de référence.

Le procédé de détermination de la susceptibilité aux infections nosocomiales selon l'invention est donc un procédé mis en oeuvre *in vitro* ou *ex vivo*.

Le sCD127 est la forme soluble ou plasmatique du CD127, récepteur de l'IL-7. Le CD127 ou chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 est une glycoprotéine de 75 kDa membre de la superfamille des récepteurs aux facteurs de croissance hématopoïétiques. Il est exprimé au niveau membranaire en association avec le CD132 (chaîne γ_c commune) pour former le récepteur de l'IL-7. Ce récepteur joue un rôle important dans la différenciation, la survie et la prolifération lymphocytaire. Le CD127 est constitué d'une partie extracellulaire de 219 acides aminés (aa), d'une partie transmembranaire de 25 aa et d'une partie intracytoplasmique de 195 aa. L'existence d'une forme soluble/plasmatique, nommée sCD127, générée par épissage alternatif de l'ARNm codant le CD127 a été décrite en 1990 par Goodwin RG *et al.*, *Cell,* 1990, **23**, 941-951, mais sa fonction biologique reste à ce jour mal connue.

On entend par « infection nosocomiale », toute infection, principalement bactérienne mais également virale et fongique, qui survient dans un établissement de santé au cours ou au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative), d'un patient, et qui n'était ni présente ni en incubation au début de la prise en charge. Lorsque l'état infectieux n'est pas connu avec précision au début de la prise en charge, un délai d'au moins 48 heures ou un délai supérieur à la période d'incubation est couramment accepté pour définir une infection nosocomiale.

Au sens de l'invention, on entend par « réponse inflammatoire systémique » ou « SIRS », une réponse associant au moins deux des critères suivants : Température > 38 °C ou < 36 °C, Fréquence cardiaque > 90/minute, Fréquence respiratoire > 20 / minute ou paCO2 <32 mmHg, Leucocytes > 12.000/mm3 ou < 4.000/mm3 (Bone *et al.*, *Chest*, 1992, 1644-1655.

Dans le cadre de l'invention, on entend par « sCD127 » la forme soluble ou forme circulante (encore nommée forme plasmatique ou sérique) du récepteur de l'IL-7, encore nommé chaîne alpha du récepteur de l'IL-7 ou IL7R ou IL7R-ALPHA ou IL7RA ou CDW127, et en particulier telle que décrite par Goodwin et al, Cell, 1990, **23**, 941-951 et dosée par Crawley et al, Journal of Immunology, 2010, **184**, 4679-4687.

En particulier, les séquences nucléiques de référence pour sCD127 selon l'invention sont de préférence les suivantes : Ensembl : ENSG00000168685, HPRD-ID : 00893 Séquence nucléotidique : NM_002185.2, Vega genes : OTTHUMG00000090791.

Par ailleurs, les séquences protéiques de référence pour sCD127 selon l'invention sont de préférence les suivantes : NP_002176 XP_942460 ; version : NP_002176.2 GI:28610151.

L'échantillon à tester dans le cadre du procédé de l'invention est un échantillon biologique provenant du patient chez qui on souhaite déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales. En particulier, un tel échantillon biologique est choisi parmi ceux susceptibles de contenir le marqueur sCD127.

La présente invention présente une application particulièrement préférée chez les patients hospitalisés en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique ou SIRS. Par conséquent, l'échantillon biologique mis en œuvre dans le cadre du procédé de l'invention est de préférence issu d'un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression (chirurgie, brulure, traumatisme...) générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), en particulier issu d'un patient en état septique,

notamment sévère, et en particulier issu d'un patient en choc septique. De manière particulièrement préférée, l'échantillon biologique mis en œuvre dans le cadre du procédé de l'invention est issu d'un patient en choc septique.

Selon un premier mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention permet de déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales, c'est-à-dire conclure à un risque accru de développer une infection nosocomiale ou à une suceptibilité accrue aux infections nosocomiales, lorsqu'une surexpression de sCD127 est mise en évidence dans l'échantillon à tester par rapport à une première valeur de référence.

Par « surexpression », on entend une augmentation statistiquement significative du niveau d'expression.

Dans ce mode de réalisation, la première valeur de référence peut correspondre au niveau d'expression de sCD127 mesuré dans un échantillon biologique issu d'un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique ou SIRS dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale, notamment d'un patient en état septique dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale, et de préférence d'un patient en choc septique dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale. Dans ce cas, cette mesure de l'expression de sCD127 qui constitue la première valeur de référence est de préférence effectuée en parallèle, c'est-à-dire en même temps que la mesure de l'expression de sCD127 qui est faite dans l'échantillon issu du patient chez qui on cherche à déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales, bien que le prélèvement de l'échantillon de référence ait été effectuée antérieurement à celui de l'échantillon à tester.

Cette première valeur de référence peut également correspondre à une valeur moyenne du niveau d'expression de sCD127 qui est mesuré sur un pool d'échantillons issu de patients hospitalisés en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS) dont on sait qu'ils n'ont pas

développé d'infection nosocomiale, notamment de patients en état septique dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale, et de préférence de patients en choc septique dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale. Dans ce cas, cette mesure de l'expression de sCD127 qui constitue la première valeur de référence est de préférence effectuée préalablement à la mesure de l'expression de sCD127 qui est faite dans l'échantillon issu du patient chez qui on cherche à déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales, bien que le prélèvement des échantillons de référence destinés à être « poolés » ait été effectué antérieurement à celui de l'échantillon à tester.

Dans ce premier mode de réalisation préféré, et notamment pour déterminer la susceptiblité aux infections nosocomiales d'un patient en choc septique, la mesure de l'expression de sCD127 dans l'échantillon à tester et le cas échéant dans l'échantillon biologique utilisé pour obtenir la première valeur de référence, c'est-à-dire lorsque la première valeur de référence est obtenue à partir d'un échantillon biologique, est réalisée dans les 10 jours ou à 10 jours (J10) après le choc septique, de préférence dans les 7 jours ou à 7 jours (J7) après le choc septique, de manière encore préférée dans les 4 jours ou à 4 jours (J4) après le choc septique, et en particulier dans les 3 jours ou à 3 jours (J3) après le choc septique.

Selon un deuxième mode de réalisation préféré, le procédé de l'invention permet de déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales, c'est-à-dire conclure à un risque accru de développer une infection nosocomiale ou à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales, lorsque l'expression de sCD127 qui est mesurée dans l'échantillon à tester n'est pas significativement diminuée par rapport à une deuxième valeur de référence. De manière particulièrement préférée, il est conclut à un risque accru de développer une infection nosocomiale si l'expression de sCD127 qui est mesurée dans l'échantillon à tester n'est pas diminuée de plus de 25 %, et en particulier pas diminuée de plus de 20 %, par rapport à cette deuxième valeur de référence.

Cette deuxième valeur de référence peut correspondre au niveau d'expression de sCD127 mesuré dans un échantillon biologique issu du même dit patient lors d'un prélèvement antérieur, c'est-à-dire dans un échantillon biologique qui a été prélevé antérieurement par rapport à l'échantillon à tester. Par « antérieurement » ou « antérieur », on entend de manière plus précoce dans le temps ou préalablement au prélèvement de l'échantillon à tester.

Dans ce deuxième mode de réalisation préféré, et notamment pour déterminer la susceptiblité aux infections nosocomiales d'un patient en choc septique, la mesure de l'expression de sCD127 dans l'échantillon à tester est réalisée environ ou à 10 jours (J10) après le choc septique, de préférence environ ou à 7 jours (J7) après le choc septique, de préférence encore environ ou à 4 jours (J4) après le choc septique.

Le prélèvement antérieur peut par exemple être effectué dans les ou à 48h après le choc septique et au moins 24h avant celui de l'échantillon à tester, et de préférence le prélèvement antérieur est effectué dans les ou à 48h après le choc septique et celui de l'échantillon à tester est effectué dans les 48h qui suivent le prélèvement antérieur ou à 48h après le prélèvement antérieur.

Ainsi, dans tous les cas, avant la mesure de l'expression de sCD127 proprement dite dans l'échantillon à tester, le procédé de l'invention peut comprendre l'obtention préalable de la valeur de référence, que ce soit la première valeur de référence ou la deuxième valeur de référence, à laquelle le niveau d'expression qui sera détecté dans l'échantillon à tester pourra être comparé afin de conclure à un risque accru ou non de développer des infections nosocomiales chez le patient duquel est issu l'échantillon à tester.

C'est donc à ces valeurs de référence, que ce soit la première valeur de référence ou la deuxième valeur de référence, obtenues préalablement ou en même temps, que sera comparée la valeur de l'expression de sCD127 qui est mesurée dans l'échantillon à tester.

L'échantillon sur lequel le procédé de l'invention est mis en œuvre, encore nommé ici échantillon à tester, peut être d'origine animale ou humaine, et de préférence humaine.

Par conséquent, l'échantillon à tester peut être de différentes natures. En particulier, cet échantillon est un fluide biologique, par exemple choisi parmi 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 et le liquide de lavage broncho-alvéolaire.

De préférence, l'échantillon à tester issu dudit patient est un échantillon de plasma ou de sérum.

Les échantillons à partir desquels peuvent être déterminées les valeurs de référence, que ce soit la première valeur de référence ou la deuxième valeur de référence, encore nommés « échantillons de référence », peuvent être de différentes natures et notamment de nature biologique tel que mentionné ci-dessus s'agissant de l'échantillon à tester (fluides biologiques). Avantageusement, ces échantillons biologiques sont de même nature que celle de l'échantillon biologique à tester ou tout du moins d'une nature compatible pour constituer une référence quant à la détection et/ou la quantification de l'expression de sCD127.

Pour obtenir la première valeur de référence en particulier, ces échantillons sont de préférence issus de personnes ayant les mêmes caractéristiques ou une majorité de caractéristiques communes, notamment du même sexe et/ou d'un âge similaire ou identique et/ou de même origine ethnique, avec celles du sujet ou patient chez qui on souhaite déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales. L'échantillon de référence peut également dans ce cas être constitué par tout échantillon, biologique ou non biologique, qui a été préalablement calibré pour contenir une valeur moyenne de sCD127 qui correspond au niveau qui a été mesuré sur un pool d'échantillons biologiques issus de patients, hospitalisés en réanimation et/ou ayant subi une agression, tell que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS) dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale, notamment de patients en état

septique dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale, et de préférence de patients en choc septique dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale. Dans ce cas, et selon une variante particulièrement préférée, l'échantillon de référence est issu d'un ou de patients en choc septique dont on sait qu'il(s) n'a(ont) pas développé d'infection nosocomiale.

Pour obtenir la deuxième valeur de référence en particulier, l'échantillon de référence est un échantillon biologique issu du même dit patient, c'est-à-dire du patient chez qui on souhaite déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales et dont est issu l'échantillon à tester, mais obtenu à partir d'un prélèvement antérieur, c'est-à-dire d'un échantillon biologique qui a été prélevé antérieurement dans le temps par rapport à l'échantillon à tester.

Au sens de la présente invention, le terme « mesurer l'expression » s'entend être une mesure *in vitro* ou *ex vivo*. Par ailleurs, ce terme entend désigner la détection et la quantification de sCD127 au niveau protéique. 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 détermination de la présence et/ou la mesure de l'expression de la protéine sCD127. A titre d'exemple de méthode de mesure de l'expression de la protéine sCD127, on peut notamment citer celle décrite par Crawley *et al*, *Journal of Immunology*, 2010, 184, 4679-4687.

En particulier, la mesure du niveau d'expression de sCD127 est réalisée à l'aide d'outils ou de réactifs qui sont spécifiques de sCD127 et qui permettent, directement ou indirectement, de déterminer sa présence et/ou de quantifier son niveau d'expression.

Parmi les outils ou réactifs capable(s) de détecter et/ou quantifier sCD127, on peut notamment citer des anticorps spécifiques, polyclonaux ou monoclonaux, de préférence monoclonaux, ou des fragments ou dérivés de ceux-ci, par exemple des anticorps « *single chain* » Sv.

Parmi ces outils ou réactifs, on préféra notamment ceux qui sont spécifiques de la forme soluble du récepteur de l'IL-7, c'est-à-dire qui ne

reconnaissent pas CD127 qui est la forme cellulaire/membranaire non soluble de ce récepteur. On peut néanmoins utiliser des outils ou réactifs qui reconnaissent à la fois la forme soluble ou sCD127 et la forme cellulaire du récepteur de l'IL-7 ou CD127, tant qu'il est possible de distinguer ces deux formes par un autre moyen, comme par exemple la nature de l'échantillon analysé (par exemple, plasma ou sérum *versus* échantillon biologique contenant des cellules ou sang total).

Lorsque la détection et/ou la quantification de sCD127 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.

De manière particulièrement avantageuse, l'expression de sCD127 est mesurée au niveau protéique, et de préférence à l'aide d'une technique ELISA.

Selon l'invention, et en particulier dans ce mode de réalisation particulier, le niveau d'expression de sCD127 est de préférence mesuré à l'aide d'anticorps anti-sCD127, monoclonaux ou polyclonaux, et notamment d'anticorps monoclonaux anti-sCD127. A titre d'exemple, on peut notamment citer les anticorps monoclonaux anti-CD127 humain R34.34 commercialisés par la société Beckman Coulter® ou les anticorps polyclonaux anti-CD127 commercialisés par la société R&D Systems®.

Toutes les indications et préférences mentionnées ci-dessus s'agissant de la mesure de l'expression de sCD127 s'appliquent indifféremment que ce soit pour la mesure de cette expression dans l'échantillon à tester et dans l'échantillon de référence.

Selon un deuxième aspect, la présente invention a également pour objet l'utilisation de la mesure, *in vitro* ou *ex vivo*, de l'expression de sCD127 pour déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales.

De manière préférée, cette utilisation est particulièrement avantageuse pour déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales d'un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire

systémique ou SIRS, en particulier d'un patient en état septique, notamment sévère, et de préférence d'un patient en choc septique. De préférence, l'utilisation selon l'invention permet de déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales d'un patient en choc septique.

Par ailleurs, dans le cadre de l'utilisation selon l'invention, l'expression de sCD127 est de préférence mesurée au niveau protéique, et en particulier à l'aide d'une technique ELISA.

En particulier, l'expression de sCD127 peut être mesurée à l'aide d'anticorps anti-sCD127, monoclonaux ou polyclonaux, et de préférence d'anticorps monoclonaux anti-sCD127. Les anticorps cités ci-dessus peuvent également être utilisés pour ce deuxième aspect de l'invention.

Plus largement, tous les modes de réalisation préférés qui sont mentionnés ci-dessus concernant le procédé et leurs combinaisons constituent également des modes de réalisation préférés s'agissant de l'utilisation.

Selon un troisième aspect, la présente invention a aussi pour objet un kit pour la mesure, *in vitro* ou *ex vivo*, de l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique, comprenant :

- des outils ou réactifs spécifiques permettant de mesurer l'expression de sCD127 dans ledit échantillon biologique, et
- un échantillon contrôle positif qui est un échantillon calibré pour contenir la quantité de sCD127 qui correspond à la quantité moyenne mesurée dans un pool d'échantillons de patients dont on sait qu'ils ont développé une infection nosocomiale, et/ou un échantillon contrôle négatif qui est un échantillon calibré pour contenir la quantité de sCD127 qui correspond à la quantité moyenne mesurée dans un pool d'échantillons de patients dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale.

Ainsi, le kit selon l'invention comprend des outils ou réactifs spécifiques permettant de mesurer l'expression de sCD127 dans ledit échantillon biologique, et au moins un échantillon contrôle.

Le kit selon l'invention permet en particulier de déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient, et notamment chez un patient en choc septique.

De préférence, les outils ou réactifs spécifiques permettant de mesurer l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique qui sont présents dans le kit de l'invention permettent de détecter et/ou de quantifier l'expression de sCD127, que ce soit au niveau protéique ou au niveau de l'activité de sCD127, et de préférence au niveau protéique.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, le kit de l'invention contient des anticorps anti-sCD127, monoclonaux ou polyclonaux, et en particulier des anticorps monoclonaux.

Un autre échantillon contrôle positif peut également être un échantillon issu d'un patient dont on sait qu'il a développé une infection nosocomiale. De même, un autre échantillon contrôle négatif peut également être un échantillon issu d'un patient dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale. Que ce soit pour un contrôle positif ou négatif ce type d'échantillon contrôle est de préférence issu d'un ou de plusieurs patient(s) hospitalisé(s) en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), notamment d'un ou de plusieurs patient(s) en état septique, et de préférence d'un ou de plusieurs patient(s) en choc septique. Par exemple, le kit peut contenir un échantillon contrôle négatif issu d'un ou de plusieurs patient(s) hospitalisé(s) en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), dont on sait qu'il(s) n'a(ont) pas développé d'infection nosocomiale, en particulier issu d'un ou de plusieurs patient(s) en choc septique dont on sait qu'il(s) n'a(ont) pas développé d'infection nosocomiale.

De manière préférée, le kit comprend à la fois un échantillon contrôle positif et un échantillon contrôle négatif, et en particulier choisis chacun parmi les échantillons calibrés tels que définis ci-dessus.

L'invention couvre également l'utilisation d'un kit selon l'invention pour réaliser le procédé de l'invention, et en particulier pour déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales, de préférence chez un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), en particulier chez un patient en état septique, notamment sévère, et de préférence un patient en choc septique. De préférence, l'utilisation du kit selon l'invention permet de déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient en choc septique.

Tous les modes de réalisation préférés qui sont mentionnés ci-dessus concernant le procédé et leurs combinaisons constituent également des modes de réalisation préférés s'agissant du kit selon l'invention et de son utilisation.

Diverses autres caractéristiques ressortent de la description faite ci-dessous en référence aux figures annexées qui montrent, à titre d'exemples non limitatifs, des formes de réalisation de l'objet de l'invention et dans lesquelles :

- la **figure 1** représente la concentration d'IL-7 plasmatique chez 35 patients en choc septique aux jours 1-2 (1-2) et 3-4 (3-4) et 30 sujets sains « HV » (A) et la comparaison de ces résultats selon les groupes de patients « NS » ou « S » (figure 1B) et les groupes de patients « NI » ou « No NI » (figure 1C).

  ** $p<0,005$ vs. « HV » – U-test Mann Whitney ;.

- la **figure 2** représente l'expression de CD127 sur les cellules T $CD4^+$ (figure 2A) et sur les cellules T $CD8^+$ (figure 2B) chez 35 patients en choc septique aux jours 1-2 et 3-5 et 30 sujets sains « HV ».

  * $p<0,05$ vs « HV » – U-test Mann Whitney ; § $p<0,05$ – évolution dans le temps dans un même groupe de patients – *Wilcoxon paired t-test.*

- la **figure 3** représente la concentration de sCD127 plasmatique chez 35 patients en choc septique aux jours 1-2 et 3-4 et 30 sujets sains (figure 3A) et la comparaison de ces résultats selon les groupes de

patients « NS » ou « S » (figure 3B) et les groupes de patients « NI » ou « No NI » (figure 3C).

# p<0,05 ## p<0,005 vs « No NI » – U-test Mann Whitney ; § p<0,05 §§ p<0,005 – évolution dans le temps dans un même groupe de patients – *Wilcoxon paired t-test.*

- la **figure 4** représente l'expression du marqueur HLA-DR chez 35 patients en choc septique aux jours 1-2 et 3-4 et 30 sujets sains selon les groupes de patients « NI » ou « No NI ».

METHODES

Mesure de la concentration en IL-7 plasmatique

La concentration d'IL-7 plasmatique a été mesurée grâce à un kit utilisant la technique LUMINEX™ commercialisé par la société Bio-Rad (Bio-Plex Pro Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays : BioPlex Pro Reagent kit, Bio-Rad #171-304070 et SinglePlex IL-7) en suivant les instructions du fournisseur.

Mesure de l'expression cellulaire du récepteur de l'IL-7 (CD127)

Brièvement, 50µl de sang total est incubé en présence de 5µl d'Ac anti-CD4 couplé Phycoérythine-TexasRed (ECD) (BeckmanCoulter #6604727) ou de 5µl d'Ac anti-CD8 couplé ECD (BeckmanCoulter #737659) ainsi que 10µl d'Ac anti-CD127 couplé à la phycoérythrine (PE) (BeckmanCoulter #IM1980U) pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Les globules rouges sont ensuite lysés grâce à une lyse hypotonique et les cellules fixées grâce à une lyse automatique réalisée sur un automate TQ-Prep (BeckmanCoulter). L'expression membranaire du CD127 à la surface des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ est enfin mesurée par cytométrie en flux.

Dosage de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 (sCD127) par ELISA

« Coating »

Un tampon de « coating » a été préparé pour contenir 0,8 g Na_2CO_3, 1,4 g $NaHCO_3$, 0,1 g NaN_3 dans 500 ml d'eau (pH 9.6).

100 µL d'anticorps (Ac) de capture (anticorps monoclonal de souris anti-CD127 humain R34.34, Beckman Coulter®) dilués dans du tampon de

« coating » (ont été déposés par puits dans une plaque ([Ac] = 8 µg/mL). La plaque a ensuite été recouverte pour être incubée à 4°C pendant une nuit.

Le contenu des puits a ensuite été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec au moins 300µL de tampon de lavage PBS-Tween$_{20}$ 0,05%. Tout le liquide a soigneusement été enlevé à chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque a été retournée sur du papier absorbant afin d'éliminer toutes les traces de tampon.

« Blocking »

La fixation non spécifique a été bloquée à l'aide de 150 µL de tampon de blocage par puits (10% sérum de bovin fœtal (FBS)/PBS-Tween$_{20}$ 0,05%), puis la plaque a été incubée pendant 1h à 37°C.

De nouveau, le contenu des puits a été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec au moins 300µL de tampon de lavage PBS-Tween$_{20}$ 0,05%. Tout le liquide a soigneusement été enlevé à chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque a été retournée sur du papier absorbant afin d'éliminer toutes les traces de tampon.

Échantillons et contrôles

Une gamme étalon a été réalisée avec recombinant human IL-7Rα / CD127 Fc chimera (R&D Systems - Catalog Number: 306-IR) dilué dans du tampon de dilution PBS 5 % FCS, comme décrit dans le **tableau 1** ci-dessous et conformément à C. Janot-Sardet *et al. Journal of Immunological Methods*, 2010, 28, 115-123.

Tableau 1

	rh IL-7Rα / CD127 Fc chimera							
[c] (ng/mL)	500	250	125	62.5	31.25	15.7	7.85	0
Diluant (µL)	0	100	100	100	100	100	100	100
Solution à 500 ng/mL (µL)	100	100	Dilutions successives					0

100 µL d'échantillon ou de contrôle (solution de CD127 Fc chimera reconstitué extemporanément et aliquoté à des concentrations de 60ng/ml et

10ng/ml) ont été ajoutés dans chaque puits, puis la plaque a été incubée pendant 1h à 37°C.

De nouveau, le contenu des puits a été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec au moins 300µL de tampon de lavage PBS-Tween$_{20}$ 0,05%. Tout le liquide a soigneusement été enlevé à chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque a été retournée sur du papier absorbant afin d'éliminer toutes les traces de tampon.

Anticorps de détection

100 µL d'anticorps de détection (anticorps de chèvre polyclonal anti-CD127 biotinylé reconstitués avec 1 mL de TBS-BSA 1%, R&D Systems®) dilués dans du PBS/5 %FBS ont été ajoutés dans chaque puits ([Ac] = 200 ng/mL), puis la plaque a été incubée pendant 1h à 37°C.

A nouveau, le contenu des puits a été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec au moins 300µL de tampon de lavage PBS-Tween$_{20}$ 0,05%. Tout le liquide a soigneusement été enlevé à chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque a été retournée sur du papier absorbant afin d'éliminer toutes les traces de tampon.

Révélation

100 µL de Streptavidin-HRP ont été ajoutés dans chaque puits ([Streptavidin-HRP] = 8 µL/mL). La plaque a ensuite été recouverte pour être incubée pendant 30 min à température ambiante.

A nouveau, le contenu des puits a été aspiré et les puits ont été lavés 3 fois avec au moins 300µL de tampon de lavage PBS-Tween$_{20}$ 0,05%. Tout le liquide a soigneusement été enlevé à chaque lavage. Après le dernier lavage, la plaque a été retournée sur du papier absorbant afin d'éliminer toutes les traces de tampon. A cette étape de lavage, les puits ont été imbibés avec le tampon de lavage 1 à 2 min avant aspiration.

Les deux flacons de la solution de substrat colorimétrique TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, bioMérieux #XX7LF1UC) ont été mélangés volume à volume. 100 µL de cette solution de substrat ont été déposés dans chaque puits, La plaque a ensuite été recouverte pour être incubée pendant 30 min à température ambiante.

Enfin, la lecture de la plaque a été effectuée par mesure de l'absorbance à 450 nm.

Mesure de l'expression monocytaire de HLA-DR

La mesure a été réalisée par la technique de cytométrie en flux, à l'aide d'un marquage direct en sang total prélevé sur EDTA.

Les deux anticorps suivants ont été incubés avec 50 µL de sang total (30 minutes à température ambiante et à l'obscurité) :

- 5 µL d'anticorps anti-CD14, couplés fluoresceine (Beckman Coulter Immunotech, - Réf. : IM0645), permettant d'identifier les monocytes parmi les leucocytes)

-10 µL d'anticorps anti-HLA-DR, couplés phycoérythrine (Becton Dickinson – Réf. : 347401), permettant de quantifier l'expression de HLA-DR à la surface des cellules.

Les globules rouges ont ensuite été éliminés : lyse par ajout de 1 ml de solution de lyse (commercialisée par la société Becton Dickinson sous la référence 349202) diluée (1/10) (15 minutes à température ambiante et à l'obscurité).

Les cellules ont ensuite été analysées sur un cytométre de flux (FC500 – Beckman Coulter).

Les résultats sont exprimés en % de cellules positives, le seuil de positivité étant défini grâce à un contrôle isotypique (Mouse IgG2a PE Becton Dickinson – Réf. : 349053).

RESULTATS

Des échantillons de plasma ont été prélevés sur 35 patients en choc septique aux jours 1-2 (J1-2) et 3-4 (J3-4) après choc septique, puis ont été stockés (cohorte rétrospective). Différents paramètres ou marqueurs ont été mesurés tels que les concentrations d'IL-7 et de sCD127 plasmatiques, et l'expression de CD127 sur les cellules T $CD4^+$, et l'expression de HLA-DR sur les monocytes. A 28 jours après admission en réanimation pour choc septique, 13 patients n'ont pas survécu (« NS ») soit 37 % alors que 22 patients ont survécu (« S ») sur les 35 patients. Par ailleurs, 6 patients ont

contracté une infection nosocomiale (« NI ») soit 17 %, alors que 29 patients sont restés exempt de toute épisode nosocomiale (« No NI »).

Les mêmes mesures ont également été effectuées sur 30 sujets sains volontaires (HV).

Les résultats obtenus ont été comparés à l'aide d'un test U Mann Whitney au sein de ces différentes populations de sujets ou patients et sont regroupés sur les figures 1 à 4 annexées.

Ces résultats montrent que la concentration d'IL-7 plasmatique est significativement diminuée (à J1-2, mais ce n'est pas significatif à J3-4 chez les patients qui développent une infection secondaire par rapport aux patients qui n'ont rencontré aucun épisode nosocomial (figure 1C), alors qu'elle reste inchangée entre les patients survivants « S » ou non-survivants « NS ».

De plus, l'expression cellulaire du récepteur de l'IL-7 (CD127) est conservée après choc septique (figure 2A et 2B), et sans aucune différence entre les patients survivants « S » ou non-survivants « NS » ou les patients qui ont développé une infections nosocomiale « NI » ou pas « No NI » (résultats non représentés).

La légère augmentation de la concentration plasmatique de la forme soluble du récepteur de l'IL-7 ou sCD127 observée au début du choc septique n'est pas statistiquement significative et revient à des valeurs « normales » avec le temps (figure 3A).

En revanche, alors que la concentration plasmatique de sCD127 reste inchangée entre les patients survivants « S » ou non-survivants « NS » (figure 3B), on observe une augmentation marquée de la concentration plasmatique de sCD127 chez les patients « NI » qui ont présenté une infection nosocomiale par rapport aux patients « No NI » qui n'ont pas contracté d'infection nosocomiale (figure 3C).

Par ailleurs, on observe également que la concentration plasmatique du sCD127 n'évolue pas dans le temps (entre J1-2 et J3-4) chez les patients « NI » qui ont présenté une infection nosocomiale, contrairement aux

patients « No NI » qui n'ont pas contracté d'infection nosocomiale (figure 3C).

A titre de comparaison, l'étude de l'expression du marqueur de l'art antérieur HLA-DR sur la même cohorte de patients n'a pas permis de mettre en évidence la diminution de l'expression de ce marqueur entre les patients « NI » qui ont présenté une infection nosocomiale et les patients « No NI » qui n'ont pas contracté d'infection nosocomiale (figure 4), contrairement à ce qui est clairement établi dans l'art antérieur.

Cette différence, probablement liée à la taille de la cohorte présentement étudiée qui est plus petite par rapport à celle des cohortes analysées dans les études de l'art antérieur, permet de mettre en évidence la pertinence du marqueur sCD127 par rapport à HLA-DR. En effet, malgré la taille de la cohorte qui a été étudiée ici, les résultats montrent que l'étude de l'expression de sCD127 selon l'invention est informative quant à la susceptibilité des patients aux infections nosocomiales.

En conséquence, l'ensemble de ces résultats démontrent que la mesure de l'expression de sCD127 est un marqueur immunologique utile pour déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales, et en particulier des patients hospitalisés en réanimation et/ou ayant subi une agression (chirurgie, brulure, traumatisme...) générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), et en particulier des patients en état septique, notamment sévère, et de préférence des patients en choc septique.

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 de la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient, comprenant les étapes suivantes :

- mesurer l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique issu dudit patient ou échantillon à tester,
- conclure à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales après comparaison de l'expression de sCD127 par rapport à une valeur de référence.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est issu d'un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique ou SIRS, en particulier issu d'un patient en état septique, notamment sévère.

3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est issu d'un patient en choc septique.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est conclut à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales lorsqu'une surexpression de sCD127 est mise en évidence dans l'échantillon à tester par rapport à une première valeur de référence.

5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la première valeur de référence correspond au niveau d'expression de sCD127 mesuré dans un échantillon biologique issu d'un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique ou SIRS dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale, notamment d'un patient en état septique dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale, ou bien correspond à une valeur moyenne du niveau d'expression de sCD127 qui est mesuré sur un pool d'échantillons issu de tels patients.

6. Procédé selon les revendications 4 ou 5, caractérisé en ce que la première valeur de référence correspond au niveau d'expression de sCD127 mesuré dans un échantillon biologique issu d'un patient en choc septique dont on sait qu'il n'a pas développé d'infection nosocomiale, ou bien

correspond à une valeur moyenne du niveau d'expression de sCD127 qui est mesuré sur un pool d'échantillons issu de tels patients.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, caractérisé en ce que la mesure de l'expression de sCD127 dans l'échantillon à tester et le cas échéant dans l'échantillon biologique utilisé pour obtenir la première valeur de référence est réalisée dans les 10 jours ou à 10 jours (J10) après le choc septique, de préférence dans les 7 jours ou à 7 jours (J7) après le choc septique, de manière encore préférée dans les 4 jours ou à 4 jours (J4) après le choc septique, et en particulier dans les 3 jours ou à 3 jours (J3) après le choc septique.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il est conclut à une susceptibilité accrue aux infections nosocomiales lorsque l'expression de sCD127 qui est mesurée dans l'échantillon à tester n'est pas significativement diminuée par rapport à une deuxième valeur de référence, de préférence lorsque l'expression de sCD127 qui est mesurée dans l'échantillon à tester n'est pas diminuée de plus de 25 %, et de préférence pas diminuée de plus de 20 %, par rapport à cette deuxième valeur de référence.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que la deuxième valeur de référence correspond au niveau d'expression de sCD127 mesuré dans un échantillon biologique issu du même dit patient lors d'un prélèvement antérieur, c'est-à-dire dans un échantillon biologique qui a été prélevé antérieurement par rapport à l'échantillon à tester.

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 3, et 8 ou 9, caractérisé en ce que la mesure de l'expression de sCD127 dans l'échantillon à tester est réalisée à environ ou 10 jours (J10) après le choc septique, de préférence à environ ou 7 jours (J7) après le choc septique, de préférence encore à environ ou 4 jours (J4) après le choc septique.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le prélèvement antérieur est effectué dans les ou à 48h après le choc septique et au moins 24h avant celui de l'échantillon à tester.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 et 11, caractérisé en ce que le prélèvement antérieur est effectué dans les ou à 48h après le choc septique et celui de l'échantillon à tester est effectué dans les 48h qui suivent le prélèvement antérieur ou à 48h après le prélèvement antérieur.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon à tester issu dudit patient est un échantillon de plasma ou de sérum.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'expression de sCD127 est mesurée au niveau protéique, de préférence à l'aide d'une technique ELISA.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'expression de sCD127 est mesurée à l'aide d'anticorps anti-sCD127, et notamment d'anticorps monoclonaux anti-sCD127.

16. Utilisation de la mesure, *in vitro* ou *ex vivo*, de l'expression de sCD127 pour déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales.

17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit patient est un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS), en particulier d'un patient en état septique, notamment sévère.

18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que ledit patient est un patient en choc septique.

19. Utilisation selon la revendication 17 ou 18, caractérisée en ce que l'expression de sCD127 est mesurée au niveau protéique, de préférence à l'aide d'une technique ELISA.

20. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 16 à 19, caractérisé en ce que l'expression de sCD127 est mesurée à l'aide d'anticorps anti-sCD127, de préférence d'anticorps monoclonaux anti-sCD127.

21. Kit pour la mesure, *in vitro* ou *ex vivo,* de l'expression de sCD127 dans un échantillon biologique, comprenant :

- des outils ou réactifs spécifiques permettant de mesurer l'expression de sCD127 dans ledit échantillon biologique, et
- un échantillon contrôle positif qui est un échantillon calibré pour contenir la quantité de sCD127 qui correspond à la quantité moyenne mesurée dans un pool d'échantillons de patients dont on sait qu'ils ont développé une infection nosocomiale, et/ou un échantillon contrôle négatif qui est un échantillon calibré pour contenir la quantité de sCD127 qui correspond à la quantité moyenne mesurée dans un pool d'échantillons de patients dont on sait qu'ils n'ont pas développé d'infection nosocomiale.

22. Kit selon la revendication 21, caractérisé en ce que lesdits outils ou réactifs spécifiques permettent de détecter et/ou de quantifier l'expression de sCD127, et de préférence au niveau protéique.

23. Utilisation d'un kit tel que défini à l'une quelconque des revendications 21 à 22 pour déterminer la susceptibilité d'un patient aux infections nosocomiales, ledit patient étant un patient hospitalisé en réanimation et/ou ayant subi une agression, telle que chirurgie, brulure, traumatisme..., générant une réponse inflammatoire systémique (SIRS).

24. Utilisation d'un kit selon la revendication 23 pour déterminer la susceptibilité aux infections nosocomiales chez un patient en choc septique.

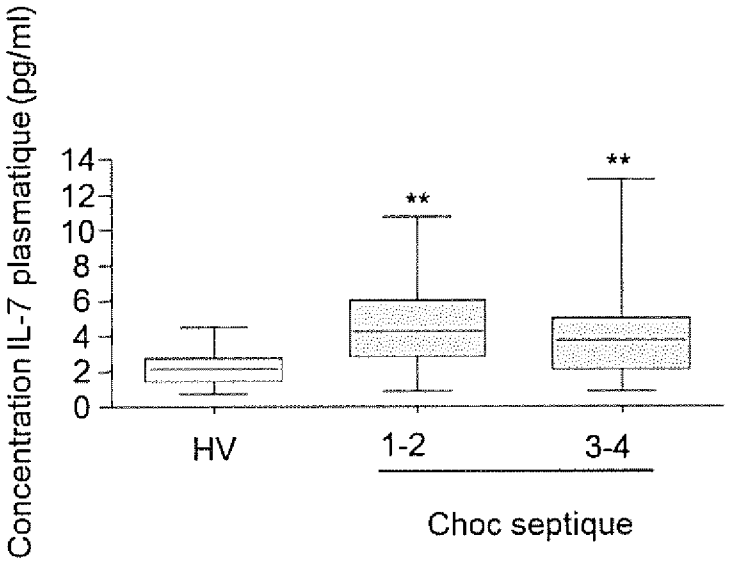

Concentration IL-7 plasmatique (pg/ml)
14
12
10
8
6
4
2
0
**
**
HV
1-2
3-4
Choc septique

FIG. 1A

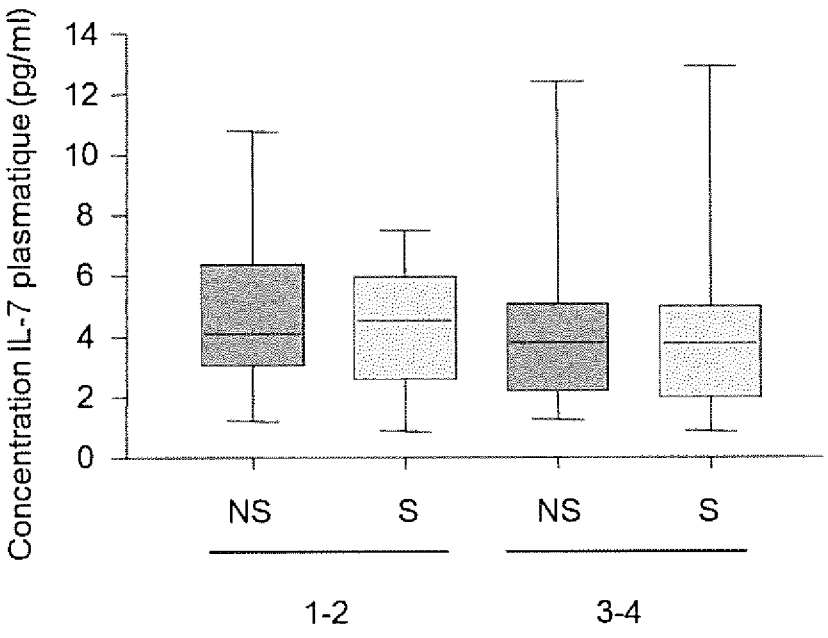

Concentration IL-7 plasmatique (pg/ml)
14
12
10
8
6
4
2
0
NS
S
NS
S
1-2
3-4

FIG. 1B

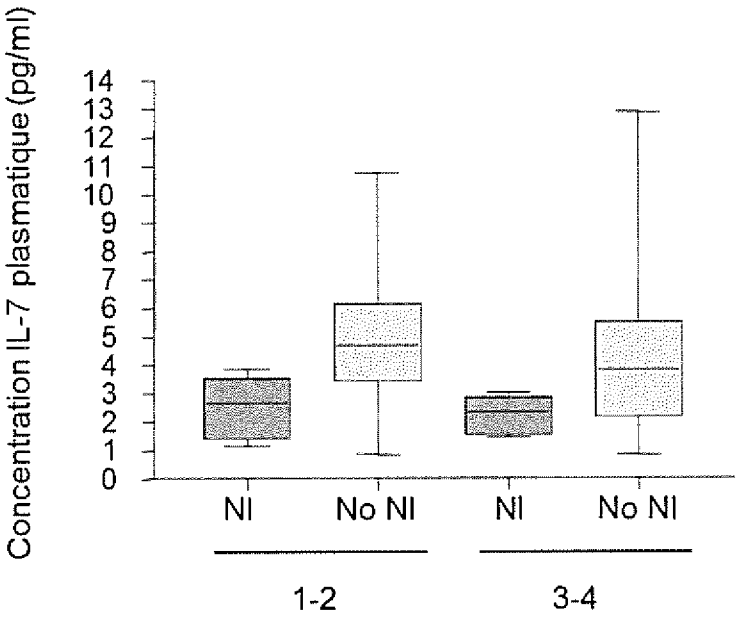

Concentration IL-7 plasmatique (pg/ml)
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
Nl
No Nl
Nl
No Nl
1-2
3-4

FIG. 1C

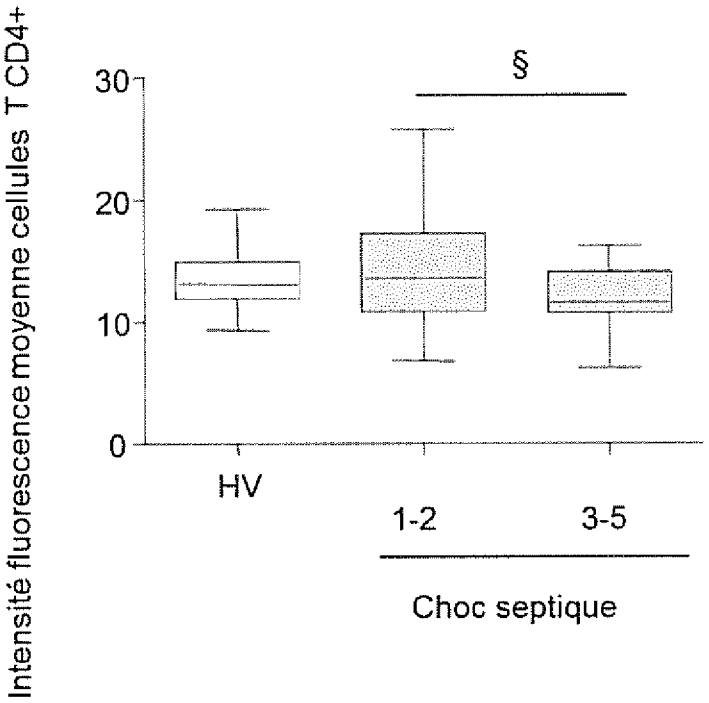

Intensité fluorescence moyenne cellules T CD4+
30
20
10
0
§
HV
1-2
3-5
Choc septique

FIG. 2A

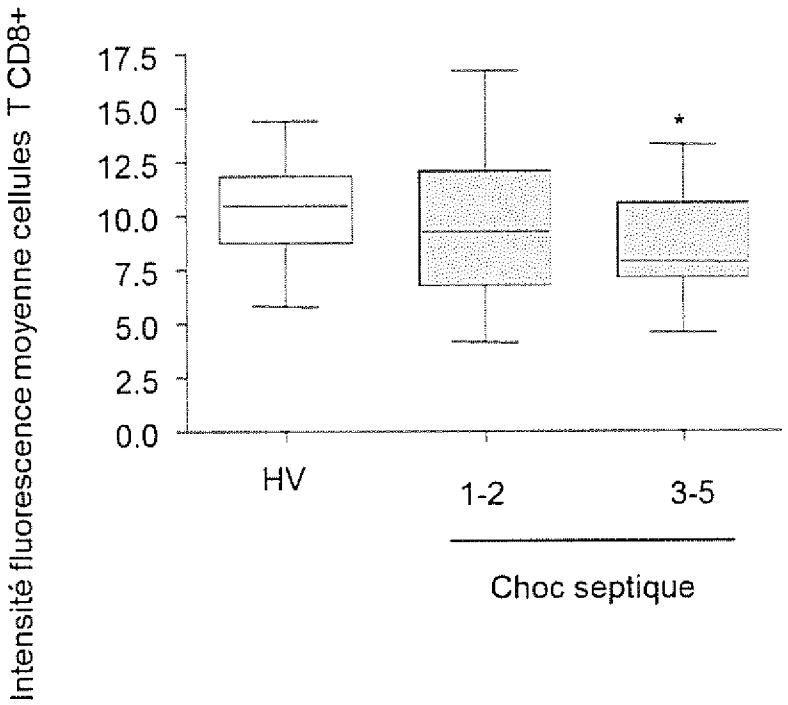

Intensité fluorescence moyenne cellules T CD8+
17.5
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
*
HV
1-2
3-5
Choc septique

FIG. 2B

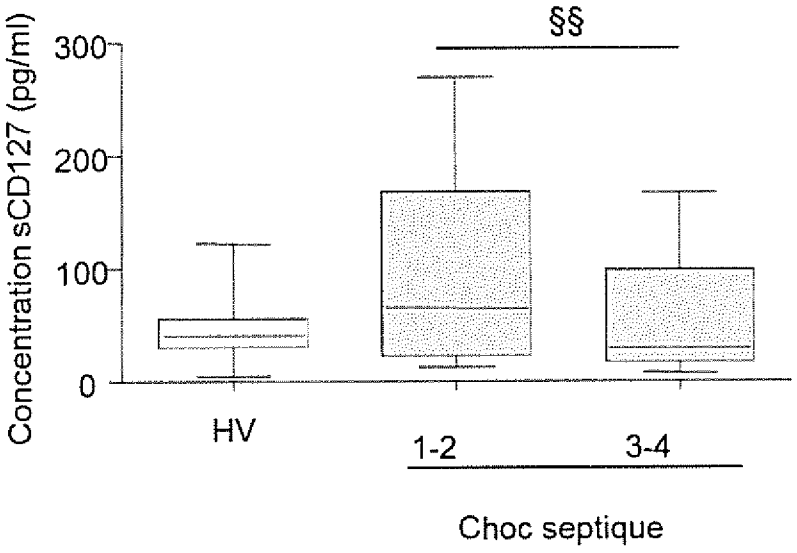

Concentration sCD127 (pg/ml)
300
200
100
0
§§
HV
1-2
3-4
Choc septique

FIG. 3A

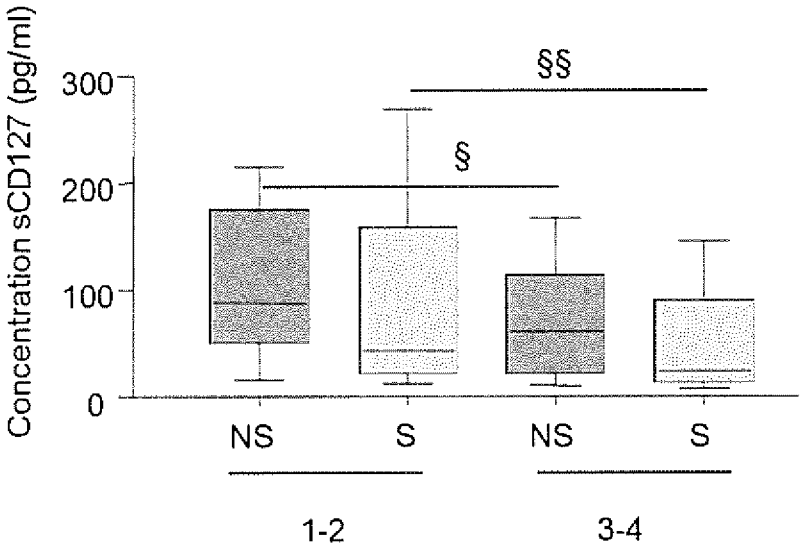

Concentration sCD127 (pg/ml)
300
200
100
0
§§
§
NS
S
NS
S
1-2
3-4

FIG. 3B

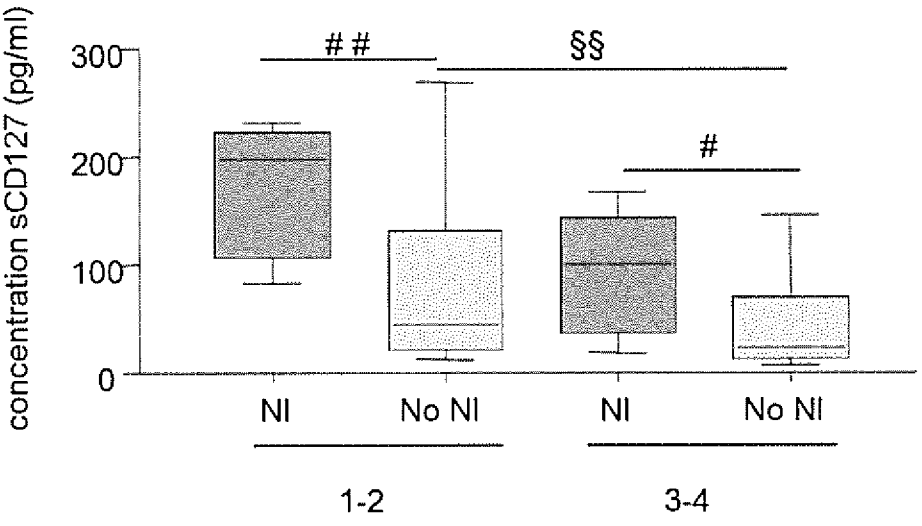

concentration sCD127 (pg/ml)
300
200
100
0
# #
§§
#
Nl
No Nl
Nl
No Nl
1-2
3-4

FIG. 3C

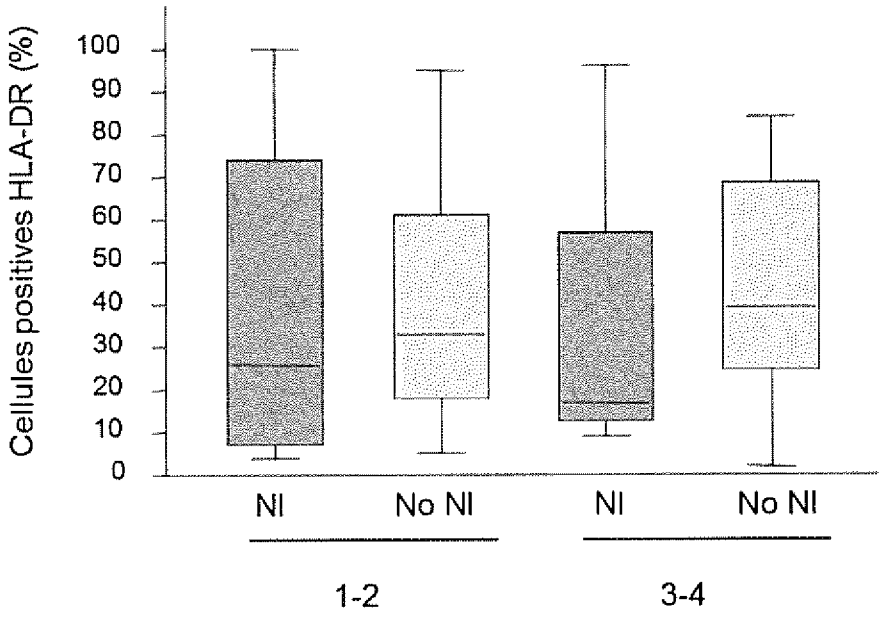

Cellules positives HLA-DR (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
NI
No NI
NI
No NI
1-2
3-4

FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/050624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/53 G01N33/68 G01N33/96
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 941 240 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; HOSPICES CIVILS LYON [FR]) 23 July 2010 (2010-07-23) the whole document abstract page 2, line 12 - line 19 claims 1,6 -----	1-24
A	WO 2010/082004 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; HOSPICES CIVILS LYON [FR]; CAZALIS MARIE-ANGELIQUE) 22 July 2010 (2010-07-22) the whole document abstract page 4, line 6 - line 14 claims 1-5, 10-11 ----- -/--	1-24

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
27 May 2013	06/06/2013

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

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHERON A ET AL: "Diminution de l'expression monocytaire de HLA-DR et risque d'infection hospitaliere", ANNALES FRANCAISES D'ANESTHESIE ET DE REANIMATION, MASSON, PARIS, FR, vol. 29, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 368-376, XP027070333, ISSN: 0750-7658, DOI: 10.1016/J.ANNFAR.2010.02.015 [retrieved on 2010-05-01] the whole document abstract	1-24
A	CAROLINE LANDELLE ET AL: "Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock", INTENSIVE CARE MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 36, no. 11, 23 July 2010 (2010-07-23) , pages 1859-1866, XP019836871, ISSN: 1432-1238 the whole document abstract	1-24
A	FABIENNE VENET ET AL: "Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions", CRITICAL CARE, vol. 15, no. 5, 1 January 2011 (2011-01-01), page 231, XP055049942, ISSN: 1364-8535, DOI: 10.1056/NEJMcibr1004371 the whole document abstract	1-24
A	FABIENNE VENET ET AL: "Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127â) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients", INTENSIVE CARE MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 35, no. 4, 23 October 2008 (2008-10-23), pages 678-686, XP019699367, ISSN: 1432-1238 the whole document abstract	1-24

-/--

1

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Abstracts", INFLAMMATION RESEARCH ; OFFICIAL JOURNAL OF: THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF INFLAMMATION SOCIETIES THE EUROPEAN HISTAMINE RESEARCH SOCIETY, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 59, no. 1, 25 February 2010 (2010-02-25), pages 9-166, XP019792915, ISSN: 1420-908X abstract A 84 on page 32 -----	1-24

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2013/050624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2941240 A1	23-07-2010	NONE	
WO 2010082004 A1	22-07-2010	CN 102301008 A	28-12-2011
		EP 2379752 A1	26-10-2011
		JP 2012514993 A	05-07-2012
		KR 20110111491 A	11-10-2011
		US 2011250592 A1	13-10-2011
		WO 2010082004 A1	22-07-2010

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2013/050624

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N33/53 G01N33/68 G01N33/96
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 941 240 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; HOSPICES CIVILS LYON [FR]) 23 juillet 2010 (2010-07-23) le document en entier abrégé page 2, ligne 12 - ligne 19 revendications 1,6	1-24
A	WO 2010/082004 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]; HOSPICES CIVILS LYON [FR]; CAZALIS MARIE-ANGELIQUE) 22 juillet 2010 (2010-07-22) le document en entier abrégé page 4, ligne 6 - ligne 14 revendications 1-5, 10-11	1-24

-/--

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

[X] 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	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
27 mai 2013	06/06/2013

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Gall-Truchot, A

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	CHERON A ET AL: "Diminution de l'expression monocytaire de HLA-DR et risque d'infection hospitaliere", ANNALES FRANCAISES D'ANESTHESIE ET DE REANIMATION, MASSON, PARIS, FR, vol. 29, no. 5, 1 mai 2010 (2010-05-01), pages 368-376, XP027070333, ISSN: 0750-7658, DOI: 10.1016/J.ANNFAR.2010.02.015 [extrait le 2010-05-01] le document en entier abrégé	1-24
A	CAROLINE LANDELLE ET AL: "Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock", INTENSIVE CARE MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 36, no. 11, 23 juillet 2010 (2010-07-23), pages 1859-1866, XP019836871, ISSN: 1432-1238 le document en entier abrégé	1-24
A	FABIENNE VENET ET AL: "Clinical review: flow cytometry perspectives in the ICU - from diagnosis of infection to monitoring of injury-induced immune dysfunctions", CRITICAL CARE, vol. 15, no. 5, 1 janvier 2011 (2011-01-01), page 231, XP055049942, ISSN: 1364-8535, DOI: 10.1056/NEJMcibr1004371 le document en entier abrégé	1-24
A	FABIENNE VENET ET AL: "Increased circulating regulatory T cells (CD4+CD25+CD127â) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients", INTENSIVE CARE MEDICINE, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 35, no. 4, 23 octobre 2008 (2008-10-23), pages 678-686, XP019699367, ISSN: 1432-1238 le document en entier abrégé	1-24

-/--

1

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	"Abstracts", INFLAMMATION RESEARCH ; OFFICIAL JOURNAL OF: THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF INFLAMMATION SOCIETIES THE EUROPEAN HISTAMINE RESEARCH SOCIETY, BIRKHÄUSER-VERLAG, BA, vol. 59, no. 1, 25 février 2010 (2010-02-25), pages 9-166, XP019792915, ISSN: 1420-908X abstract A 84 on page 32 -----	1-24

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2013/050624

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2941240 A1	23-07-2010	AUCUN	
WO 2010082004 A1	22-07-2010	CN 102301008 A	28-12-2011
		EP 2379752 A1	26-10-2011
		JP 2012514993 A	05-07-2012
		KR 20110111491 A	11-10-2011
		US 2011250592 A1	13-10-2011
		WO 2010082004 A1	22-07-2010