

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

(19) Organisation Mondiale de la  
Propriété Intellectuelle  
Bureau international



WIPO | PCT



(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2012/107530 A1**

(43) Date de la publication internationale  
16 août 2012 (16.08.2012)

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

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/EP2012/052234

(22) Date de dépôt international :  
9 février 2012 (09.02.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
1151022 9 février 2011 (09.02.2011) FR  
61/440,986 9 février 2011 (09.02.2011) US

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : **BIO-RAD INNOVATIONS** [FR/FR]; 3 Boulevard Raymond Poincaré, F-92430 Marnes La Coquette (FR). **ARIANA PHARMACEUTICALS** [FR/FR]; 28, rue du Docteur Finlay, F-75015 Paris (FR). **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). **ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS** [FR/FR]; 3, avenue Victoria, F-75004 Paris (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **WATELET, Bénédicte** [FR/FR]; Les Côteaux du Lac -, 4, rue de la Mairie - Villa n° 2, F-34980 Saint Clement De Riviere (FR). **ASSELAH, Tarik** [FR/FR]; 112, avenue du Général Michel Bizot, F-75012 Paris (FR). **BIECHE, Ivan** [FR/FR]; 12, esplanade des Courtieux, F-92150 Suresnes (FR). **BATXELLI, Isabelle, Catherine** [FR/FR]; N° 7 Lotissement Volte-Basse, Chemin de l'eau noire, F-30670 Aigues-Vives (FR). **JULLIAN, Nathalie** [FR/FR]; 60, rue Gabriel Peri, F-92120 Montrouge (FR). **VIDAUD, Michel** [FR/FR]; 11, rue Squeville, F-94120 Fontenay Sous Bois (FR). **MARCELLIN, Patrick** [FR/FR]; 176, rue Legendre, F-75017 Paris (FR). **LAUNE, Daniel** [FR/FR]; 5,

rue Pierre Couder, F-34790 Grabels (FR). **AFSHAR, Mohammad** [FR/FR]; 51, rue du Ranelagh, F-75016 Paris (FR). **MATHIEU, Eve, Laure** [FR/FR]; 205, avenue de Fès, Apt C36, F-34080 Montpellier (FR).

(74) Mandataires : **GUTMANN, Ernest** et al.; 3, rue Auber, F-75009 Paris (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, 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.

(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, MD, 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).

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

— relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii))

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h))
- avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : COMBINATION OF BIOMARKERS FOR DETECTING AND EVALUATING A HEPATIC FIBROSIS

(54) Titre : COMBINAISON DE BIOMARQUEURS POUR LA DÉTECTION ET L'ÉVALUATION D'UNE FIBROSE HÉPATIQUE

(57) Abstract : The application relates to means for determining the stage of hepatic tissue damage, in particular the hepatic fibrosis score, of individuals infected with one or more hepatitis viruses. The means of the invention implement in particular the assay of the expression levels of selected genes, said selected genes being: - SPP1, and - at least one gene among A2M and VIM, and - at least one gene among IL8, CXCL10 and ENG, and - optionally, at least one gene among the list of the following sixteen genes: IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9 and MMP1.

(57) Abrégé : La demande est relative à des moyens permettant de déterminer le stade d'atteinte tissulaire hépatique, notamment le score de fibrose hépatique, de sujets infectés par un ou des virus de l'hépatite. Les moyens de l'invention mettent notamment en œuvre le dosage des niveaux d'expression de gènes choisis, lesdits gènes choisis étant : - SPP1, et - au moins un gène parmi A2M et VIM, et - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et - optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants: IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.



WO 2012/107530 A1

**TITRE****Combinaison de biomarqueurs pour la détection et l'évaluation  
d'une fibrose hépatique**

5

**DOMAINE DE L'INVENTION**

La demande est relative aux fibroses hépatiques, plus particulièrement aux fibroses hépatiques qui peuvent être présentes chez un sujet infecté par un ou plusieurs virus de l'hépatite. La demande fournit des moyens qui permettent de détecter de telles fibroses hépatiques. Les moyens de l'invention sont plus particulièrement adaptés à la détermination fiable du stade d'atteinte tissulaire hépatique, notamment du score de fibrose hépatique.

15

**ARRIÈRE-PLAN DE L'INVENTION**

Diverses pathologies causent, ou conduisent à, des lésions tissulaires du foie, connues sous le nom de fibrose hépatique. Une fibrose hépatique résulte notamment d'une accumulation excessive de composés moléculaires de la matrice extracellulaire altérée dans le parenchyme hépatique.

Le stade d'atteinte tissulaire du foie, plus particulièrement la nature et l'étendue des lésions tissulaires hépatiques, est évalué par un score de fibrose hépatique, notamment par le système de score F Metavir, qui comprend 5 stades de F0 à F4 (*cf.* tableau 1 ci-dessous). La détermination du score de fibrose hépatique revêt un caractère primordial pour le praticien, puisqu'il s'agit d'un score pronostique.

En effet, c'est sur la base de cette détermination que le praticien décide d'administrer ou de ne pas administrer de traitement en vue de traiter ces lésions, ou à tout le moins en vue de pallier leurs effets. C'est également sur cette base que le praticien décide d'initier un traitement. Notamment, lorsque le score de fibrose hépatique est d'au plus F1, le praticien décide généralement de ne pas administrer de traitement, alors que, lorsque le score est d'au moins F2, il est préconisé d'administrer un traitement, et cela quelque soit le degré d'activité nécrotico-inflammatoire.

Or, les traitements susceptibles d'être administrés entraînent des effets secondaires majeurs pour le patient. Par exemple, le traitement à ce jour consensuel pour le traitement

des patients infectés par le virus de l'hépatite C (VHC) comprend notamment l'administration d'interféron standard ou pégylé sur une durée pouvant aller jusqu'à 48 semaines ou plus. Concernant l'interféron, les effets secondaires sont fréquents et nombreux. L'effet secondaire le plus fréquent est le syndrome pseudo-grippal (fièvre, arthralgies, céphalées, frissons). Les autres effets secondaires possibles sont : une asthénie, un amaigrissement, une perte modérée de cheveux, des troubles du sommeil, des troubles de l'humeur avec une irritabilité qui peut avoir des répercussions dans la vie quotidienne, des difficultés de concentration et une sécheresse cutanée. Certains effets secondaires rares peuvent être graves et doivent être anticipés comme les troubles psychiatriques. Une 5 dépression peut survenir dans environ 10 % des cas. Celle ci doit être dépistée et traitée car elle peut avoir des conséquences graves (tentative de suicide). Une dysthyroïdie peut se déclarer. Le traitement par interféron est en outre contre-indiqué pendant la grossesse. Concernant la ribavirine, le principal effet secondaire est l'anémie hémolytique. Une anémie conduit à un arrêt du traitement dans environ 5 % des cas. Une décompensation 15 d'une coronaropathie ou d'une cardiopathie sous jacente, liée à l'anémie, peut survenir. Une neutropénie est observée chez environ 20% des malades recevant l'association interféron pégylé et ribavirine, et représente la cause majeure de réduction de la dose d'interféron pégylé.

Le coût de ces traitements est également très élevé.

20 Dans ce contexte, pouvoir déterminer de manière fiable le score de fibrose hépatique d'un patient donné, et plus particulièrement pouvoir discriminer de manière fiable, pour un patient donné, un score de fibrose hépatique d'au plus F1 d'un score de fibrose hépatique d'au moins F2, est d'une importance cruciale pour le patient.

Les moyens actuellement disponibles pour déterminer le score de fibrose hépatique d'un 25 patient comprennent notamment l'examen anatomo-pathologique d'une ponction-biopsique hépatique (PBH). Cet examen permet une détermination suffisamment fiable du niveau de fibrose mais nécessite toutefois des précautions particulières liées au mode invasif du prélèvement. Pour être suffisamment fiable pour un patient donné, cet examen nécessite à tout le moins d'être réalisé sur un prélèvement de quantité suffisante 30 (prélèvement d'une longueur de 15 mm à l'aide d'une aiguille à PBH), et requiert une lecture par un anatomo-pathologiste confirmé. La PBH est un acte invasif et douloureux, et est associée à un taux de morbidité de 0,57%. Elle ne permet pas de suivre les patients de façon régulière pour évaluer la progression de la fibrose.

Il existe par ailleurs dans l'art antérieur des moyens qui ont l'avantage d'être non invasifs, tels que :

- Fibroscan<sup>TM</sup>, qui est un système d'imagerie du foie par élastographie transitoire, et tels que
- 5 - Fibrotest<sup>TM</sup>, Fibrometer<sup>TM</sup> et Hepascore<sup>TM</sup>, qui sont des algorithmes de classification multivariée combinant les valeurs de dosage de protéines sériques et éventuellement les valeurs de certains facteurs cliniques ;
- *cf.* WO 02/16949 A1 (au nom de Epigene), WO 2006/103570 A2 (au nom de Assistance Publique – Hôpitaux de Paris), WO 2006/082522 A1 (au nom de
- 10 Assistance Publique – Hôpitaux de Paris), ainsi que leurs contreparties nationales et régionales.

Le Fibrotest<sup>TM</sup> (commercialisé par BioPredictive ; Paris, France) met en œuvre les dosages de l'alpha-2-macroglobuline (A2M), de l'haptoglobine, de l'apolipoprotéine A1, de la bilirubinémie totale et de la gamma-glutamyl transpeptidase.

- 15 Le Fibrometer<sup>TM</sup> (commercialisé par BioLiveScale ; Angers, France) met en œuvre les mesures des plaquettes, de l'index de prothrombine, de l'aspartate amino-transférase, de l'alpha-2-macroglobuline (A2M), de l'acide hyaluronique, et de l'urée.

L'Hepascore<sup>TM</sup> met en œuvre les dosages de l'alpha-2-macroglobuline (A2M), de l'acide hyaluronique, de la bilirubine totale, de la gamma-glutamyl transpeptidase, et les facteurs

20 cliniques âge et sexe.

Fibroscan<sup>TM</sup> n'a pas la sensibilité suffisante pour différencier un score F1 d'un score F2 de fibrose (*cf.* par exemple, Castera *et al.* 2005, plus particulièrement la Figure 1A de cet article).

- 25 Par ailleurs, s'il semble maintenant établi que les tests, tels que Fibrotest<sup>TM</sup>, Fibrometer<sup>TM</sup>, Hepascore<sup>TM</sup>, permettent d'identifier de manière fiable une cirrhose hépatique, notamment celle liée au VHC, ces tests n'ont pas la capacité d'identifier de manière précise et fiable les stades plus précoces de fibrose, et n'ont notamment pas la capacité à différencier de manière fiable le stade F1 du stade F2 de fibrose pour un patient donné (*cf.* par exemple, Shaheen *et al.* 2007).

30

Il existe donc toujours un besoin pour des moyens permettant de déterminer de manière précise et fiable le stade d'atteinte tissulaire hépatique, plus particulièrement le score de fibrose hépatique d'un patient donné. Il existe plus particulièrement toujours un besoin clinique pour des moyens permettant de distinguer de manière fiable, pour un patient

donné, une fibrose absente, minime ou cliniquement non significative (score Metavir F0 ou F1), d'une fibrose modérée ou cliniquement significative (score Metavir F2 ou plus), plus particulièrement pour distinguer de manière fiable, pour un patient donné, une fibrose F1 (fibrose sans *septa*) d'une fibrose F2 (fibrose avec quelques septas). Il existe  
5 notamment toujours un besoin clinique pour des moyens permettant de détecter de manière fiable l'apparition des premiers septas.

L'invention objet de la demande propose des moyens qui permettent notamment de répondre à ces besoins.

10

### RÉSUMÉ DE L'INVENTION

La demande est relative aux fibroses hépatiques, notamment aux fibroses hépatiques qui peuvent être présentes chez un sujet qui est, ou a été, infecté par un ou plusieurs virus de l'hépatite, tels que notamment le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'hépatite B  
15 (VHB), le virus de l'hépatite D (VHD).

Les inventeurs ont identifié des gènes dont les niveaux d'expression sont des biomarqueurs du stade d'atteinte tissulaire hépatique, plus particulièrement du score de fibrose hépatique. Plus particulièrement, les inventeurs proposent d'établir le profil d'expression de ces gènes, et d'utiliser ce profil à titre de signature du stade d'atteinte  
20 tissulaire hépatique, plus particulièrement du score de fibrose hépatique.

La demande fournit des moyens qui sont spécialement adaptés à cet effet. Les moyens de l'invention mettent notamment en œuvre le dosage ou la mesure des niveaux d'expression de gènes choisis, lesdits gènes choisis étant :

- SPP1, et
- 25 - au moins un gène parmi A2M et VIM, et
- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et
- optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

30 Les moyens de l'invention comprennent notamment :

- des méthodes qui comprennent le dosage ou la mesure des niveaux d'expression de gènes choisis ;
- des produits ou réactifs qui sont spécialement adaptés au dosage ou à la mesure de ces niveaux d'expression de gènes ;

- des articles manufacturés, des compositions, des compositions pharmaceutiques, des kits, des tubes, des supports solides comprenant de tels produits ou réactifs, ainsi que
- des systèmes informatiques (notamment, produit programme d'ordinateur et dispositif informatique), qui sont spécialement adaptés à la mise en œuvre des moyens de l'invention.

### **BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES**

10 **Figure 1 :** Processus de classification du patient  $p$ , à partir des données cliniques et biologiques ( $x_p$ ) prédictrices du statut clinique  $y_p$ .

**Figure 2 :** Distribution d'un biomarqueur d'intérêt de l'invention, discrimination des deux populations cliniques (population des patients "sains" *versus* population des patients "pathologiques"), et représentation des caractéristiques diagnostiques associées (faux négatifs (FN), faux positifs (FP), vrais positifs (VP) et vrais négatifs (VN)), qui sont fixées en fonction du seuil de décision choisi par l'utilisateur.

**Figure 3 :** Tracé de la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) pour un biomarqueur d'intérêt de l'invention. Chaque valeur du seuil fixé (seuil A, seuil B) génère un couple de valeurs (Se, 1-Sp) que l'on reporte dans un graphique sur un plan orthonormé où les abscisses ( $x$ ) représentent ( $1-Sp$ ), variant de 0 à 1, et où les ordonnées ( $y$ ) représentent (Se).

**Figure 4 :** Représentation graphique sous forme de courbe ROC du test diagnostique parfait (aire sous la courbe où  $AUC = 1$ ) et du test diagnostique non informatif (aire sous la courbe où  $AUC = 0,5$ ).

25 **Figure 5 :** distribution des concentrations sériques des protéines A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 (*cf.* exemple 3).

### **DESCRIPTION DÉTAILLÉE DE L'INVENTION**

30 La demande est relative aux objets définis dans les revendications telles que déposées, aux objets décrits ci-dessous et aux objets illustrés en partie « exemples ».

Dans la demande, à moins que cela ne soit autrement spécifié, ou que le contexte n'en dicte autrement, tous les termes ont leur sens habituel dans le(s) domaine(s) concerné(s).

La demande est relative à des moyens pour détecter ou diagnostiquer une atteinte tissulaire du foie, notamment une fibrose hépatique. Les moyens de l'invention sont notamment adaptés à la détermination du stade ou degré d'atteinte tissulaire hépatique, plus particulièrement à la détermination du score de fibrose hépatique.

- 5 Les moyens de l'invention sont plus particulièrement adaptés aux fibroses hépatiques qui peuvent être présentes chez un sujet qui est, ou a été, infecté par un ou plusieurs virus de l'hépatite, tels que notamment par le virus de l'hépatite C (VHC) et/ou le virus de l'hépatite B (VHB) et/ou le virus de l'hépatite D (VHD), plus particulièrement par au moins le VHC (et, optionnellement, par le VHB et/ou le VHD).

10

La fibrose est la transformation fibreuse de certains tissus, à l'origine d'une augmentation du tissu conjonctif (tissu de soutien et de remplissage). Généralement, la fibrose intervient comme conséquence de l'inflammation chronique.

Le terme 'score de fibrose hépatique' reflète le stade d'avancement de la fibrose hépatique.

- 15 Le score de fibrose hépatique quantifie l'atteinte tissulaire du foie, notamment la nature, le nombre et l'intensité des lésions fibreuses du foie.

Les moyens de l'invention sont donc des moyens qui permettent de détecter, de quantifier, ou à tout le moins d'évaluer, l'atteinte tissulaire du foie d'un sujet.

- 20 Dans le domaine des fibroses hépatiques, différents systèmes de scores ont été établis et sont connus de la personne du métier, par exemple le score Metavir (notamment le score F de Metavir) ou le score d'Ishak (*cf.* Goodman 2007).

**Tableau 1 :** correspondance entre les scores de fibrose Metavir et les scores de fibrose Ishak

Stade de fibrose	Score de fibrose	
	Metavir	Ishak
Absence de fibrose	F0	F0
<b>Fibrose portale sans septa</b>	<b>F1</b>	<b>F1/F2</b>
<b>Fibrose portale et quelques septas</b>	<b>F2</b>	<b>F3</b>
Fibrose septale sans cirrhose	F3	F4
Cirrhose	F4	F5/F6

25

Sauf indication contraire, ou sauf à ce que le contexte n'en dicte autrement, les scores de fibrose hépatique indiqués dans la demande sont des scores F établis selon le système Metavir, et les termes « score », « score fibrotique », « score de fibrose », « score de fibrose hépatique » et termes similaires ont la signification clinique d'un score F Metavir, c'est-à-dire qu'ils qualifient, voire quantifient, l'atteinte tissulaire, plus particulièrement les lésions (ou fibrose), d'un foie.

Dans la demande, l'expression « au plus F1 » inclut un score de F1 ou F0, plus particulièrement un score de F1, et l'expression « au moins F2 » inclut un score de F2, F3 ou F4.

10

Avantageusement, les moyens de l'invention permettent de distinguer de manière fiable :

- une fibrose hépatique dont le score fibrotique selon le système Metavir est d'au plus F1 (absence de fibrose ou fibrose portale sans septa),
- d'une fibrose hépatique dont le score fibrotique selon le système Metavir est d'au moins F2 (fibrose portale avec quelques septas, fibrose septale sans cirrhose ou cirrhose).

15

Plus particulièrement, les moyens de l'invention permettent de distinguer de manière fiable :

- une fibrose hépatique dont le score fibrotique selon le système Metavir est F1 (fibrose portale sans septa),
- d'une fibrose hépatique dont le score fibrotique selon le système Metavir est F2 (fibrose portale avec quelques septas).

20

D'un point de vue clinique, les moyens de l'invention permettent de déterminer de manière fiable si la fibrose hépatique ne présente pas de septa, ou si cette fibrose comprend déjà des septas.

25

Le distinguo auquel les moyens de l'invention permettent d'accéder est cliniquement très utile.

En effet, lorsque la fibrose hépatique est absente ou n'en est à un stade où les septas ne sont pas encore apparus (score Metavir F0 ou F1), le praticien peut choisir de ne pas administrer de traitement au patient, jugeant par exemple qu'à ce stade de la fibrose hépatique, le rapport bénéfice/risque du traitement médicamenteux susceptible de lui être administré ne lui est pas favorable, alors que, lorsque la fibrose hépatique a atteint le stade septal (score Metavir F2, F3 ou F4), le praticien recommandera l'administration d'un

30

traitement médicamenteux pour bloquer ou au moins ralentir la progression de cette fibrose hépatique, afin de diminuer le risque d'évolution vers la cirrhose.

En permettant d'opérer ces distinguos de manière fiable, les moyens de l'invention permettent d'administrer à bon escient les traitements médicamenteux qui sont  
5 actuellement disponibles pour tenter de lutter contre, ou à tout le moins pallier, une fibrose hépatique. Comme ces traitements médicamenteux entraînent le plus souvent des effets secondaires majeurs pour le patient, les moyens de l'invention apportent des avantages très nets vis-à-vis de la santé générale du patient. C'est par exemple le cas lorsque ce  
10 traitement comprend l'administration d'interféron standard ou pégylé, soit en monothérapie (par exemple dans le cas de l'hépatite chronique virale B et de l'hépatite D), soit en association à la ribavirine (par exemple dans le cas de l'hépatite chronique C).  
C'est aussi le cas, lorsque le traitement doit être administré à long terme comme c'est le cas pour les analogues nucléosidiques et nucléotidiques dans le traitement de l'hépatite  
chronique B.

15

Les moyens de l'invention comprennent notamment :

- des méthodes qui comprennent le dosage ou la mesure des niveaux d'expression de gènes choisis (niveaux de transcription ou de traduction);
- des produits ou réactifs qui sont spécialement adaptés au dosage ou à la mesure de  
20 ces niveaux d'expression de gènes ;
- des articles manufacturés, des compositions, des compositions pharmaceutiques, des kits, des tubes, des supports solides comprenant de tels produits ou réactifs, ainsi que
- des systèmes informatiques (notamment, produit programme d'ordinateur et  
25 dispositif informatique), qui sont spécialement adaptés à la mise en œuvre des moyens de l'invention.

Selon un aspect de l'invention, une **méthode** de l'invention est une méthode pour détecter ou diagnostiquer une fibrose hépatique chez un sujet, notamment une méthode pour  
30 déterminer le score de fibrose hépatique de ce sujet.

La méthode de l'invention est plus particulièrement adaptée pour les sujets qui sont, ou ont été, infectés par un ou plusieurs virus de l'hépatite, tels que notamment par le virus de l'hépatite C (VHC) et/ou le virus de l'hépatite B (VHB) et/ou le virus de l'hépatite D (VHD), notamment par au moins le VHC.

Avantageusement, une méthode de l'invention peut être une méthode pour déterminer si le score fibrotique d'une fibrose hépatique est d'au plus F1 (score de F1 ou F0, plus particulièrement de F1) ou bien d'au moins F2 (score de F2, F3 ou F4), plus particulièrement si ce score est F1 ou F2 (scores exprimés selon le système Metavir).

Comme indiqué ci-dessus, il est préférable de n'administrer un traitement qu'aux patients présentant un score fibrotique Metavir supérieur à F1. Pour les autres patients, une simple surveillance est préférable à moyen terme (plusieurs mois à quelques années).

Par suite, la méthode de l'invention peut être considérée comme une méthode de traitement, plus particulièrement comme une méthode pour déterminer le moment auquel un traitement doit être administré au sujet. Ledit traitement peut notamment être un traitement visant à bloquer ou ralentir la progression de la fibrose hépatique, en éliminant le virus (notamment, dans le cas de l'hépatite C) et/ou en bloquant le virus (notamment dans le cas de l'hépatite B).

En effet, les moyens de l'invention permettent de déterminer de manière fiable le degré d'atteinte tissulaire du foie du sujet, plus particulièrement de déterminer la nature de ces lésions (fibrose absente ou sans septa *versus* fibrose septale). L'invention propose donc une méthode, comprenant le fait de :

- déterminer le score de fibrose hépatique d'un sujet à l'aide des moyens de l'invention, et
- si le score ainsi déterminé est un score fibrotique d'au moins F2 (selon le système de score Metavir), administrer à ce sujet un traitement visant à bloquer ou ralentir la progression de la fibrose hépatique (tel que interféron standard ou pégylé, en monothérapie, ou en plurithérapie, par exemple en association avec ribavirine).

Si le score ainsi déterminé est d'au plus F1 (score exprimé selon le système de score Metavir), le praticien peut choisir de ne pas administrer ce traitement.

Une caractéristique d'une méthode de l'invention est qu'elle comprend le fait de doser (ou mesurer) le niveau auquel des gènes choisis s'expriment dans l'organisme dudit sujet.

L'expression « niveau d'expression d'un gène » ou expression équivalente désigne ici tant le niveau auquel ce gène est transcrit en ARN, plus particulièrement en ARNm, que le niveau auquel est exprimée une protéine codée par ce gène.

Le terme « doser » ou « mesurer » ou terme équivalent est entendu selon son sens commun dans le domaine, et fait référence au fait de quantifier.

On peut doser le niveau de transcription (ARN) de chacun des desdits gènes, ou doser le niveau de traduction (protéine) de chacun desdits gènes, ou bien encore doser le niveau de transcription pour certains desdits gènes choisis et le niveau de traduction pour les autres de ces gènes choisis. Selon un mode de réalisation de l'invention, on dose soit le niveau de transcription soit le niveau de traduction de chacun desdits gènes choisis.

Le fait de doser (ou mesurer) le niveau de transcription d'un gène comprend le fait de quantifier des ARN transcrits de ce gène, plus particulièrement de déterminer la concentration d'ARN transcrits par ce gène (par exemple, la quantité de ces ARN rapportée à la quantité totale d'ARN initialement présente dans l'échantillon, telle que par exemple une valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$  ; cf. ci-dessous).

Le fait de doser (ou mesurer) le niveau de traduction d'un gène comprend le fait de quantifier des protéines codées par ce gène, plus particulièrement de déterminer la concentration en protéines codées par ce gène (par exemple, la quantité de cette protéine par volume de fluide biologique).

Certaines protéines codées par un gène de mammifère, notamment un gène humain, peuvent parfois subir des modifications post-traductionnelles telles que, par exemple, un clivage en polypeptides et/ou peptides. Le cas échéant, le fait de doser (ou mesurer) le niveau de traduction d'un gène peut alors comprendre le fait de quantifier ou de déterminer la concentration non pas de la ou des protéines elles-mêmes, mais d'une ou de formes post-traductionnelles de cette ou ces protéines, telles que par exemple, des polypeptides et/ou peptides qui sont des fragments spécifiques de cette ou ces protéines.

Pour doser ou mesurer le niveau d'expression d'un gène, l'on peut donc quantifier :

- des ARN transcrits de ce gène, ou
- des protéines exprimées par ce gène, ou des formes post-traductionnelles de telles protéines, telles que par exemple des polypeptides ou peptides qui sont des fragments spécifiques de ces protéines.

Conformément à l'invention, les gènes choisis sont :

- SPP1, et
- au moins un gène parmi A2M et VIM, et
- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

- optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

Les gènes ainsi choisis constituent une combinaison de gènes conforme à l'invention.

5 Des exemples de combinaisons de gènes conformes à l'invention sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Chacun de ces gènes est individuellement connu de la personne du métier, et est entendu conformément à sa signification dans le domaine. Un rappel de leurs identités respectives  
10 est présenté à titre indicatif dans le tableau 2 ci-dessous.

Aucun de ces gènes n'est un gène de virus de l'hépatite. Il s'agit de gènes de mammifères, plus particulièrement de gènes humains.

Chacun de ces gènes code pour une protéine non-membranaire, c'est-à-dire une protéine qui n'est pas ancrée dans une membrane cellulaire. La localisation *in vivo* de ces protéines  
15 est donc intracellulaire et/ou extracellulaire. Ces protéines sont potentiellement présentes dans un fluide biologique du sujet, tel que par exemple dans le sang, le sérum, le plasma ou l'urine, notamment dans le sang ou le sérum ou le plasma.

En sus des niveaux d'expression de gènes choisis parmi la liste de vingt-deux gènes de l'invention (SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2,  
20 CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1), une méthode conforme à la demande peut en outre comprendre le dosage d'un ou plusieurs facteurs biologiques autres que le niveau d'expression desdits gènes choisis, tel que :

- le dosage de métabolites intracorporels (par exemple, le cholestérol), et/ou le dosage  
25 d'éléments figurés du sang (par exemple les plaquettes), et/ou
- le dosage de la quantité de fer circulant, et/ou
- le dosage du niveau d'expression d'autres gènes de mammifères (plus particulièrement de gènes humains), par exemple pour doser le niveau de transcription de gènes qui sont ci-dessous listés en tant que « autres facteurs biologiques », tels que  
30 le gène codant l'alanine-amino-transférase (mesure de la concentration en ALT). Il s'agit toutefois de dosages optionnels.

Dans une méthode conforme à la demande, le nombre de gènes de mammifères (plus particulièrement de gènes humains), dont le niveau d'expression est dosé, et qui ne sont pas des gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (par exemple

ALT), est de préférence au maximum de 18, plus particulièrement de 14 ou moins, plus particulièrement de 11 ou moins, plus particulièrement de 6 ou moins, plus particulièrement de 4 ou 3 ou 2, plus particulièrement de 1 ou 0.

Par suite, en comptabilisant ces « autres » gènes de mammifères (plus particulièrement ces gènes humains), dont le niveau d'expression peut être éventuellement dosé, ainsi que le nombre maximal des vingt-deux gènes qui peuvent être des gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, le nombre total de gènes dont le niveau d'expression est dosé dans une méthode conforme à la demande, est de préférence de 3 à 40 gènes, plus particulièrement de 3 à 36, plus particulièrement de 3 à 33, plus particulièrement de 3 à 28, plus particulièrement de 3 à 26, plus particulièrement de 3 à 25, plus particulièrement de 3 à 24, plus particulièrement de 3 à 23, plus particulièrement de 3 à 22, plus particulièrement de 3 à 20, plus particulièrement de 3 à 21, plus particulièrement de 3 à 20, plus particulièrement de 3 à 19, plus particulièrement de 3 à 18, plus particulièrement de 3 à 17, plus particulièrement de 3 à 16, plus particulièrement de 3 à 15, plus particulièrement de 3 à 14, plus particulièrement de 3 à 13, plus particulièrement de 3 à 12, plus particulièrement de 3 à 11, plus particulièrement de 3 à 10, plus particulièrement de 3 à 9, plus particulièrement de 3 à 8, plus particulièrement de 3 à 7, plus particulièrement de 3 à 6, plus particulièrement de 3 à 5, par exemple de 3, 4 ou 5, notamment de 4 ou 5.

En outre, comme cela est présenté plus en détail ci-dessous, et comme cela est illustré en exemples, le nombre de gènes parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention peut avantageusement être inférieur à 22 : ce nombre peut plus particulièrement être de 3 à 10, plus particulièrement de 3 à 9, plus particulièrement de 3 à 8, plus particulièrement de 3 à 7, plus particulièrement de 3 à 6, plus particulièrement de 3 à 5, par exemple de 3, 4 ou 5, notamment de 4 ou 5.

La méthode de l'invention peut optionnellement comprendre le dosage du produit d'expression d'un ou plusieurs gènes non humains, plus particulièrement de gènes viraux tels que des gènes de virus de l'hépatite (plus particulièrement de VHC et/ou VHB et/ou VHD).

La méthode de l'invention peut optionnellement comprendre la détermination du ou des génotypes du ou des virus de l'hépatite dont le sujet est infecté.

La méthode de l'invention peut optionnellement comprendre la détermination d'un ou plusieurs facteurs cliniques dudit sujet tels que l'indice de sensibilité à l'insuline.

**Tableau 2 :**

<b>Symbole</b>	<b>Nom (en français) de la protéine codée</b>	<b>Nom (en anglais) de la protéine codée</b>	<b>Alias</b>	<b>Numéro d'accension NM</b>
<b>SPP1</b>	phosphoprotéine 1 sécrétée	secreted phosphoprotein 1	OPN ; BNSP ; BSPI ; ETA-1 ; MGC110940	NM_000582
<b>A2M</b>	alpha 2 macroglobuline	alpha-2-macroglobulin	CPAMD5 ; FWP007 ; S863-7 ; DKFZp779B086	NM_000014
<b>VIM</b>	vimentine	vimentin	FLJ36606	NM_003380
<b>IL8</b>	interleukine 8	interleukin-8	IL-8 ; CXCL8 ; GCP-1 ; GCPI ; LECT ; LUCT ; LYNAP ; MDNCF ; MONAP ; NAF ; NAP-1 ; NAP1	NM_000584
<b>CXCL10</b>	ligand 10 à chémokine (motif CXC)	C-X-C motif chemokine 10	C7 ; IFI10 ; INP10 ; IP-10 ; SCYB10 ; crg-2 ; gIP-10 ; mob-1	NM_001565
<b>ENG</b>	endogline	endoglin	CD105 ; ORW	NM_000118
<b>IL6ST</b>	transducteur de signal interleukin-6	interleukin-6 signal transducer	CD130 ; GP130 ; CDw130 ; IL6R- beta ; GP130-RAPS	NM_002184

**Table 2 (suite):**

<b>Symbole</b>	<b>Nom (en français) de la protéine codée</b>	<b>Nom (en anglais) de la protéine codée</b>	<b>Alias</b>	<b>Numéro d'accession NM</b>
<b>p14ARF</b> transcrit n°4 du gène <b>CDKN2A</b>	inhibiteur de kinase 2A cycline dépendent	cyclin-dependent kinase 2A inhibitor	CDKN2A (codant pour p14 et p16); CDKN2 ; MLM ; ARF ; p14 ; p16 ; p19 ; CMM2 ; INK4 ; MTS1 ; TP16 ; CD4I ; INK4a ; p16INK4 ; p16INK4a	NM_058195
<b>MMP9</b>	métallopeptidase 9 de matrice	matrix metallopeptidase 9	CLG4B ; GELB ; MANDP2	NM_004994
<b>ANGPT2</b>	angiopoïétine 2	angiopoietin-2	ANG2 ; AGPT2	NM_001147
<b>CXCL11</b>	ligand 11 à chémokine (motif CXC)	C-X-C motif chemokine 11	IP9 ; SCYB11 ; ITAC ; SCYB9B ; H174 ; IP-9 ; b-R1 ; I-TAC ; MGC102770	NM_005409
<b>MMP2</b>	métallopeptidase 2 de matrice	matrix metallopeptidase 2	CLG4 ; MONA ; TBE1 ; CLG4A ; MMPII	NM_004530
<b>MMP7</b>	métalloprotéinase 7 de matrice	matrix metallopeptidase 7	MPSL1 ; PUMP1 ; MMP-7 ; PUMP-1	NM_002423
<b>S100A4</b>	protéine A4 liant le calcium S100	protein S100-A4	FSP1	NM_019554

Table 2 (suite et fin):

Symbole	Nom (en français) de la protéine codée	Nom (en anglais) de la protéine codée	Alias	Numéro d'accèsion NM
<b>TIMP1</b>	inhibiteur 1 de métalloprotéinase	metalloproteinase inhibitor 1	RP1-230G1.3 ; CLGI ; EPA ; EPO ; FLJ90373 ; HCI ; TIMP	NM_003254
<b>CHI3L1</b>	protéine 1 de type chitinase-3	chitinase-3-like protein	GP39 ; ASRT7 ; YKL40 ; YYL-40 ; HC-gp39 ; HCGP-3P ; FLJ38139 ; DKFZp686N19119	NM_001276
<b>COL1A1</b>	chaîne alpha-1(I) du collagène	collagen alpha-1(I) chain	OI4	NM_000088
<b>CXCL1</b>	chimiokine 1 de la protéine alpha régulant la croissance (motif CXC)	growth-regulated alpha protein C-X-C motif chemokine 1	GRO ; GRO1 ; GROA ; MGSA ; SCYBIFS ; NAP-3 ; SCYB1 ; MGSA-a	NM_001511
<b>CXCL6</b>	ligand 6 à chémokine (motif CXC)	C-X-C motif chemokine 6	CKA-3 ; GCP-2 ; GCP2 ; SCYB6	NM_002993
<b>IHH</b>	protéine « <i>Indian Hedgehog</i> »	Indian hedgehog protein	BDA1 ; HHG2	NM_002181
<b>IRF9</b>	facteur de transcription 3G stimulé par interféron	interferon regulatory factor 9	ISGF3G ; p48 ; ISGF3	NM_006084
<b>MMP1</b>	métalloprotéinase 1 de matrice	matrix metalloproteinase-1	CLG ; CLGN	NM_002421

Le dosage (ou la mesure) du niveau d'expression desdits gènes choisis peut être fait dans un échantillon préalablement obtenu à partir dudit sujet, tel que :

- un échantillon biologique prélevé ou collecté dudit sujet, ou
- un échantillon comprenant des acides nucléiques (notamment des ARN) et/ou protéines et/ou polypeptides et/ou peptides dudit échantillon biologique, notamment un échantillon comprenant des acides nucléiques et/ou protéines et/ou polypeptides et/ou peptides qui ont été, ou sont susceptibles d'avoir été extraits et/ou purifiés dudit échantillon biologique, ou
- un échantillon comprenant des ADNc qui ont été, ou sont susceptibles d'avoir été obtenus par transcription inverse desdits ARN.

Un échantillon biologique collecté ou prélevé dudit sujet peut par exemple être un échantillon prélevé ou collecté, ou susceptible d'être prélevé ou collecté, à partir :

- d'un organe ou tissu interne dudit sujet, notamment de son foie ou de son parenchyme hépatique, ou
- d'un fluide biologique dudit sujet, tel que le sang, le sérum, le plasma ou l'urine, notamment d'un fluide intracorporel tel que le sang.

Un échantillon biologique collecté ou prélevé dudit sujet peut par exemple être un échantillon comprenant une portion de tissu dudit sujet, notamment une portion de tissu hépatique, plus particulièrement une portion de parenchyme hépatique.

Un échantillon biologique collecté ou prélevé dudit sujet peut par exemple être un échantillon comprenant des cellules qui ont été, ou sont susceptibles d'être, prélevées ou collectées d'un tissu dudit sujet, notamment d'un tissu hépatique, plus particulièrement des cellules hépatiques.

Un échantillon biologique collecté ou prélevé dudit sujet peut par exemple être un échantillon de fluide biologique, tel qu'un échantillon de sang, de sérum, de plasma ou d'urine, plus particulièrement un échantillon de sang ou de sérum ou de plasma. En effet, comme les gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention codent tous pour des protéines non-membranaires, le produit de leur expression peut notamment avoir une localisation extracellulaire.

Le prélèvement ou la collecte dudit échantillon biologique peut être fait par insertion d'un instrument de prélèvement, notamment par insertion d'une aiguille ou d'un cathéter, dans le corps dudit sujet. Cet instrument peut par exemple être inséré :

- dans un organe ou tissu interne dudit sujet, notamment dans son foie ou dans parenchyme hépatique, par exemple,

5 - pour prélever un échantillon de foie ou de parenchyme hépatique, ce prélèvement pouvant par exemple être fait par ponction biopsique hépatique (PBH), plus particulièrement par PBH par voie transjugulaire ou par voie transpariétale, ou

- pour prélever ou collecter des cellules à partir du compartiment hépatique (prélèvement de cellules, et non de tissu), plus particulièrement à partir du parenchyme hépatique, notamment pour prélever des cellules hépatiques, ce prélèvement ou cette collecte pouvant par exemple être fait par cyto-ponction hépatique ;

10 et/ou

- dans une veine, une artère ou un vaisseau dudit sujet pour prélever un fluide biologique dudit sujet, tel que du sang.

15 Les moyens de l'invention ne sont pas limités à une mise en œuvre sur une biopsie de tissu, notamment de tissu hépatique. Ils peuvent être mis en œuvre sur un échantillon obtenu, ou susceptible d'être obtenu par un prélèvement de taille ou volume nettement plus réduit qu'un échantillon de tissu, à savoir un échantillon qui se limite à quelques cellules. Les moyens de l'invention peuvent notamment être mis en œuvre sur un échantillon obtenu, ou susceptible d'être obtenu par cyto-ponction hépatique.

20 La quantité ou le volume de matière prélevé par cyto-ponction hépatique est beaucoup plus réduit que celui prélevé par PBH. Outre le gain immédiat pour le patient en termes de diminution d'invasivité de la technique de prélèvement et de diminution de la morbidité associée, la cyto-ponction hépatique présente l'avantage de pouvoir être répétée à des temps distincts sur le même patient (par exemple, pour déterminer l'évolution de la fibrose

25 hépatique entre deux instants), alors que la PBH ne peut être raisonnablement répétée sur le même patient. La cyto-ponction hépatique présente donc, contrairement à la PBH, l'avantage de permettre de suivre l'évolution clinique du patient.

Ainsi, conformément à l'invention, ledit échantillon biologique peut avantageusement être :

30 - un prélèvement ou une collecte de cellules à partir du compartiment hépatique (prélèvement ou collecte de cellules, et non de tissu), plus particulièrement à partir du parenchyme hépatique, c'est-à-dire un échantillon biologique obtenu, ou susceptible d'être obtenu par cyto-ponction hépatique ;

et/ou

- un prélèvement ou une collecte de fluide biologique dudit sujet, tel que du sang ou de l'urine, notamment du sang.

Le dosage (ou la mesure) peut être fait dans un échantillon biologique qui a été collecté ou  
5 prélevé dudit sujet, et qui a été plus avant transformé, par exemple :

- par extraction et/ou purification des acides nucléiques, notamment des ARN, plus particulièrement des ARNm, et/ou par transcription inverse de ces ARN, notamment de ces ARNm, ou
- par extraction et/ou purification des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides, ou  
10 par extraction et/ou purification d'une fraction protéique, telle que le sérum ou le plasma extrait du sang.

Par exemple, lorsque l'échantillon biologique collecté ou prélevé est un fluide biologique tel que du sang ou de l'urine, cet échantillon peut, avant de réaliser le dosage ou la mesure,  
15 être transformé :

- par extraction d'acides nucléiques, notamment d'ARN, plus particulièrement d'ARNm, et/ou par transcription inverse de ces ARN, notamment de ces ARNm (le plus généralement, par extraction des ARN et transcription inverse de ces ARN), ou
- 20 - par séparation et/ou extraction de la fraction sérique, ou par extraction ou purification des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides sériques.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, ledit échantillon obtenu à partir dudit sujet comprend (par exemple dans une solution), ou est, un échantillon de fluide  
25 biologique dudit sujet, tel qu'un échantillon de sang, de sérum, de plasma ou d'urine, et/ou est un échantillon qui comprend (par exemple dans une solution) :

- des ARN, notamment des ARNm, susceptibles d'avoir été extraits ou purifiés d'un fluide biologique, tel que du sang ou de l'urine, notamment du sang ; et/ou des ADNc susceptibles d'avoir été obtenus par transcription inverse de tels ARN ; et/ou
- 30 - des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides susceptibles d'avoir été extraits ou purifiés d'un fluide biologique, tel que du sang ou de l'urine, notamment du sang, et/ou susceptibles d'avoir été codés par de tels ARN,  
de préférence,

- des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides susceptibles d'avoir été extraits ou purifiés d'un fluide biologique, tel que du sang ou de l'urine, notamment du sang, et/ou susceptibles d'avoir été codés par de tels ARN.

5 Lorsque ledit échantillon obtenu à partir dudit sujet comprend un échantillon biologique obtenu, ou susceptible d'être obtenu par prélèvement d'un fluide biologique, tel que du sang ou de l'urine, ou lorsque ledit échantillon obtenu à partir dudit sujet est issu, ou susceptible d'être issu d'un tel échantillon biologique par extraction et/ou purification de molécules contenues dans cet échantillon biologique, le dosage est de préférence un  
10 dosage de protéines et/ou polypeptides et/ou peptides, plutôt qu'un dosage d'acides nucléiques.

Lorsque l'échantillon biologique collecté ou prélevé est un échantillon comprenant une portion de tissu, notamment une portion de tissu hépatique, plus particulièrement une  
15 portion de parenchyme hépatique, tel que par exemple un échantillon biologique prélevé ou susceptible d'être prélevé par ponction biopsique hépatique (PBH), ou lorsque l'échantillon biologique collecté ou prélevé est un échantillon comprenant des cellules obtenues, ou susceptibles d'être obtenues à partir d'un tel tissu, tel que par exemple un échantillon collecté, ou susceptible d'être collecté, par cyto-ponction hépatique, cet  
20 échantillon biologique peut être transformé :

- par extraction d'acides nucléiques, notamment d'ARN, plus particulièrement d'ARNm, et/ou par transcription inverse de ces ARN, notamment de ces ARNm (le plus généralement, par extraction de ces ARN et transcription inverse de ces ARN), ou  
25 - par séparation et/ou extraction des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides.

Une étape de lyse des cellules, notamment de lyse des cellules hépatiques, contenues dans ledit échantillon biologique, peut être préalablement réalisée de sorte à rendre acides nucléiques, ou le cas échéant, protéines et/ou polypeptides et/ou peptides, directement accessibles à l'analyse.

30

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, ledit échantillon obtenu à partir dudit sujet est un échantillon de tissu dudit sujet, notamment de tissu hépatique, plus particulièrement de parenchyme hépatique, ou est un échantillon de cellules d'un tel tissu, et/ou est un échantillon qui comprend (par exemple dans une solution):

- des cellules hépatiques, plus particulièrement des cellules du parenchyme hépatique, par exemple des cellules obtenues, ou susceptibles d'être obtenues par dissociation des cellules d'une biopsie de tissu hépatique ou par cyto-ponction hépatique; et/ou
- des ARN, notamment des ARNm, susceptibles d'avoir été extraits ou purifiés de telles  
5 cellules ; et/ou
- des ADNc susceptibles d'avoir été obtenus par transcription inverse de tels ARN ; et/ou
- des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides susceptibles d'avoir été extraits ou purifiés de telles cellules, et/ou susceptibles d'avoir été codés par de tels ARN.

10

Conformément à l'invention, ledit sujet est un humain ou un animal non-humain, notamment un humain ou un mammifère non-humain, plus particulièrement un humain.

15 Du fait de la sélection particulière de gènes proposée par l'invention, le score de fibrose hépatique dudit sujet peut être déduit, ou déterminé à partir, des valeurs de dosage ou de mesure obtenues pour ledit sujet, notamment par induction statistique et/ou classification statistique (*cf.* Figure 1), par exemple vis-à-vis de cohortes de référence (pré-)établies selon leur score de fibrose hépatique.

20 En sus du fait de doser (ou mesurer) le niveau auquel des gènes choisis s'expriment dans l'organisme dudit sujet, une méthode de l'invention peut donc en outre comprendre une étape de déduction ou détermination du score de fibrose hépatique dudit sujet à partir des valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet. Cette étape de déduction ou détermination est une étape par laquelle les valeurs de dosage ou de mesure obtenues pour ledit sujet sont  
25 analysées pour en induire le score de fibrose hépatique dudit sujet.

La déduction ou détermination du score de fibrose hépatique dudit sujet peut être faite en comparant les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score  
30 de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance (c'est-à-dire pour attribuer audit sujet son score de fibrose hépatique).

Les dosages effectués sur ledit sujet et sur les individus des cohortes ou sous-populations de référence sont des dosages de niveaux d'expression (transcription ou traduction) de gènes.

5 Pour doser le niveau de transcription d'un gène, on dose son niveau de transcription en ARN. Un tel dosage peut par exemple comprendre la mesure de la concentration en ARN transcrits de chacun desdits gènes choisis, soit par mesure de la concentration de ces ARN, soit par mesure de la concentration des ADNc obtenus par transcription inverse de ces ARN. Le dosage d'acides nucléiques est bien connu de la personne du métier. Par  
10 exemple, le dosage d'ARN ou des ADNc correspondants peut se faire par amplification d'acide nucléique, notamment par PCR. Des réactifs sont décrits ci-dessous à cet effet (*cf.* exemple 1 ci-dessous). Des exemples d'amorces et sondes appropriés en sont également donnés (*cf.* par exemple tableau 17 ci-dessous). Les conditions d'amplification d'acides nucléiques peuvent être choisies par la personne du métier. Des exemples de conditions  
15 d'amplification sont donnés dans la partie « exemples » qui suit (*cf.* exemple 1 ci-dessous).

Pour doser le niveau de traduction d'un gène, on dose son niveau de traduction en protéines. Un tel dosage peut par exemple comprendre la mesure de la concentration en protéines traduites à partir de chacun desdits gènes choisis (par exemple, dosage des  
20 protéines dans la circulation générale, notamment dans le sérum). Le dosage de protéines est bien connu de la personne du métier. Par exemple, les protéines (et/ou polypeptides et/ou peptides) peuvent être dosées par ELISA ou par toute autre méthode immunométrique connue de la personne du métier ou par une méthode utilisant la spectrométrie de masse connue de la personne du métier.

25

De préférence, chaque dosage est réalisé au moins en duplicate.

Les valeurs de dosage sont des valeurs de concentration ou de proportion, ou des valeurs qui représentent une concentration ou une proportion. L'objectif est qu'au sein d'une  
30 même combinaison, les valeurs de dosage des niveaux d'expression de chacun desdits gènes choisis reflètent le plus précisément possible, à tout le moins l'une par rapport à l'autre, le degré auquel chacun de ces gènes est exprimé (degré de transcription ou degré de traduction), notamment en étant proportionnelles à ces degrés respectifs.

Par exemple, dans le cas du dosage du niveau d'expression d'un gène par dosage des ARN transcrits, c'est-à-dire dans le cas du dosage du niveau de transcription de ce gène, le dosage se fait généralement par amplification des ARN par transcription inverse et PCR (RT-PCR), et par mesure de valeurs de Ct (*Cycle threshold*).

- 5 Une valeur de Ct donne une mesure de la quantité initiale des ARN amplifiés (plus la valeur de Ct est faible, plus la quantité de ces acides nucléiques est élevée). Les valeurs de Ct mesurées pour un ARN cible ( $Ct_{\text{cible}}$ ) sont généralement rapportées à la quantité d'ARN total initialement présente dans l'échantillon, par exemple en déduisant de ce  $Ct_{\text{cible}}$  la valeur d'un Ct de référence ( $Ct_{\text{référence}}$ ), telle que la valeur de Ct qui a été mesurée dans les
- 10 mêmes conditions opératoires pour l'ARN d'un gène contrôle endogène dont le niveau d'expression est stable (par exemple un gène impliqué dans une cascade métabolique cellulaire, tel que RPLP0 ou TBP ; cf. exemple 1 ci-dessous).

Selon un mode de réalisation de l'invention, la différence ( $Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}}$ ), ou  $\Delta Ct$ , peut en outre être exploitée par la méthode connue sous le nom de méthode du  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak et

15 Schmittgen 2001 ; Schmittgen et Livak 2008), sous la forme :

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})}$$

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'étape i), le dosage des niveaux auxquels chacun desdits gènes choisis sont transcrits est réalisée par :

- amplification, d'un fragment des ARN transcrits par chacun desdits gènes choisis, par

20 exemple par transcription inverse et PCR de ces fragments d'ARN, pour obtenir les valeurs de Ct de chacun de ces ARN,

- optionnellement, normalisation de chacune de ces valeurs de Ct par rapport à la valeur de Ct obtenue pour l'ARN d'un gène contrôle endogène, tel que RPLP0 ou TBP, par exemple par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ,

25 - optionnellement, transformation Box-Cox desdites valeurs normalisées de Ct.

Dans le cas du dosage du niveau d'expression d'un gène par dosage des protéines exprimées par ce gène, c'est-à-dire dans le cas du dosage du niveau de traduction de ce gène, le dosage se fait généralement par une méthode immuno-métrique à l'aide

30 d'anticorps spécifiques, et par expression des mesures ainsi faites en quantités pondérales ou en unités internationales, à l'aide d'une gamme étalon. Des exemples d'anticorps spécifiques sont indiqués dans le tableau 14 ci-dessous. Une valeur de dosage du niveau de traduction d'un gène peut par exemple être exprimée en quantité de cette protéine par

volume de fluide biologique, par exemple, par volume de sérum (par exemple, en mg/mL ou en µg/mL ou en ng/mL ou en pg/mL).

Si souhaité ou requis, la distribution des valeurs de dosage obtenues pour les individus  
5 d'une cohorte peut être lissée, de sorte à la rapprocher d'une loi gaussienne.

A cet effet, les valeurs de dosage obtenues sur les individus de cette cohorte, par exemple les valeurs obtenues par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ , peuvent être transformées par une transformation de type Box-Cox (Box et Cox, 1964 ; cf. tableaux 8, 9, 11 et 13 ci-dessous ; cf. exemples 2 et 3 ci-dessous).

10

La demande est donc notamment relative à une méthode *in vitro* pour déterminer le score de fibrose hépatique d'un sujet, plus particulièrement d'un sujet infecté par un ou des virus de l'hépatite, tels que par le VHC et/ou le VHB et/ou le VHD, notamment par au moins le VHC, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

15 i) dans un échantillon préalablement obtenu à partir dudit sujet, doser le niveau auquel des gènes choisis sont transcrits ou traduits, lesdits gènes choisis étant :

- SPP1, et

- au moins un gène parmi A2M et VIM, et

- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

20

- optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1,

et

ii) comparer les valeurs de dosage de chacun desdits gènes choisis obtenues pour ledit  
25 sujet, à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

La comparaison de l'étape ii) peut notamment être faite en combinant les valeurs de  
30 dosage (ou de mesure) obtenues pour ledit sujet dans un modèle de classification multivariée.

Un tel modèle de classification multivariée compare (de manière combinée) les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance, par exemple en lui attribuant une valeur de sortie indicatrice du score de fibrose hépatique dudit sujet.

Un tel modèle de classification multivariée peut être construit, notamment préalablement construit, en faisant une comparaison inter-cohorte des valeurs de dosage obtenues pour lesdites cohortes de référence ou des distributions de ces valeurs de dosage.

Plus particulièrement, un tel modèle de classification multivariée peut être construit, notamment préalablement construit, en dosant ou mesurant les niveaux d'expression desdits gènes choisis dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, et en analysant ces valeurs de dosage, ou leur distribution, par une méthode statistique multivariée pour construire un modèle de classification multivariée qui induit ou détermine un score de fibrose hépatique à partir des valeurs de niveaux d'expression desdits gènes choisis.

Si les valeurs dosées pour ledit sujet comprennent, en sus des valeurs de dosage des niveaux de transcription ou de traduction desdits gènes choisis, la ou les valeurs d'un ou plusieurs autres facteurs, tels que un ou plusieurs facteurs virologiques et/ou un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou plusieurs des autres facteurs biologiques (cf. ci-dessous et dans les exemples), le modèle de classification est bien sûr construit, notamment préalablement construit, en dosant ou mesurant les mêmes valeurs dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, et en analysant ces valeurs, ou leur distribution, par une méthode statistique multivariée pour construire un modèle de classification multivariée qui induit ou détermine un score de fibrose hépatique à partir de ces valeurs.

Par exemple, un modèle peut être construit par une fonction mathématique, une technique non paramétrique, une procédure de classification heuristique ou encore une approche de prédiction probabiliste. Un exemple typique de classification fondée sur la quantification du niveau d'expression de biomarqueurs consiste en la discrimination de sujets "sains" versus "malades". La formalisation de ce problème consiste en  $m$  échantillons indépendants, décrits par  $n$  variables aléatoires. Chaque individu  $i$  ( $i = 1, \dots, m$ ) est caractérisé par un vecteur  $x_i$  décrivant les  $n$  valeurs caractéristiques:

$$x_{ij}, \quad i=1, \dots, m \quad j=1, \dots, n$$

Ces valeurs caractéristiques peuvent par exemple représenter des valeurs d'expression génique et/ou des intensités de données protéiques et/ou des intensités de données métaboliques et/ou des données cliniques.

- 5 Chaque échantillon  $x_i$  est associé à une valeur discrète  $y_i$ , représentant le statut clinique de l'individu  $i$ . A titre d'exemple,  $y_i = 0$  si le patient  $i$  a un score de fibrose hépatique F1,  $y_i = 1$  si le patient  $i$  a un score de fibrose hépatique F2.

Un modèle offre une règle décisionnelle (par exemple, une fonction mathématique, un algorithme ou une procédure), qui utilise l'information disponible depuis  $x_i$  pour prédire  $y_j$  dans chaque échantillon observé. L'objectif est d'utiliser ce modèle afin de prédire le statut clinique du patient  $p$ , à savoir  $y_p$ , à partir des valeurs biologiques et/ou cliniques disponibles, à savoir  $x_p$ .

10

Un processus de classification du patient  $p$  est schématisé sur la Figure 1.

- 15 Différents modèles de classification multivariée sont connus de la personne du métier (cf. Hastie, Tibishirani et Friedman, 2009 ; Falissard, 2005 ; Theodoridis et Koutroumbos 2009).

Ils sont généralement construits par traitement et interprétation des données selon, par exemple :

- 20 - une méthode d'analyse statistique multivariée, par exemple :
- une fonction mathématique linéaire ou non linéaire, notamment une fonction mathématique linéaire, tel qu'une fonction générée par la méthode mROC (méthode ROC multivariée), ou
  - une méthode ROC (*Receiver Operating Characteristics*) ;

25

  - une méthode de régression, linéaire ou non linéaire, comme par exemple la régression logistique ;
  - une méthode PLS-DA (*Partial Least Squares – Discriminant Analysis*) ;
  - une méthode LDA (*Linear Discriminant Analysis*) ;

30
- une méthode par apprentissage ou intelligence artificielle, par exemple, un algorithme d'apprentissage ou d'intelligence artificielle, une méthode de classification non paramétrique, ou heuristique, ou de prédiction probabiliste, telle que :
- un arbre décisionnel ; ou
  - une méthode de type *boosting*, fondée sur des classifieurs binaires (ex : *Adaboost*) ou une méthode liée au *boosting* (*bagging*) ; ou

- une méthode des k plus proches voisins (*k-nearest neighbors* ou KNN), ou plus généralement la méthode des k plus proches voisins pondérés (*weighed k-nearest neighbors* ou WKNN), ou
- une méthode (par exemple, un algorithme) Machines à Vecteurs de support (*Support Vector Machine* ou SVM) ; ou
- une forêt aléatoire (*Random Forest* ou RF); ou
- un réseau bayésien ; ou
- un réseau de neurones (*Neural Network*) ; ou
- un treillis de Galois (ou *Formal Concept Analysis*).

10

Les règles décisionnelles des modèles de classification multivariée peuvent par exemple être fondées sur une formule mathématique du type  $y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$  où  $f$  est une fonction mathématique linéaire ou non linéaire (régression logistique, mROC, par exemple), ou sur un algorithme d'apprentissage automatique ou d'intelligence artificielle dont les caractéristiques consistent en une série de paramètres de réglage identifiés comme étant les plus efficaces pour la discrimination des sujets (par exemple, KNN, WKNN, SVM, RF).

La méthode ROC multivariée (mROC) est une généralisation de la méthode ROC (*Receiver Operating Characteristic*) (cf. Reiser et Faraggi 1997 ; Su et Liu 1993, Shapiro, 1999). Elle calcule l'aire sous la courbe ROC (*Area Under the Curve* ou AUC) relative à une combinaison linéaire de biomarqueurs et/ou de transformations de biomarqueurs (dans le cas d'une normalisation), sous l'hypothèse d'une distribution normale multivariée. La méthode mROC a notamment été décrite dans Kramar *et al.* 1999 et Kramar *et al.* 2001. Référence est également faite aux exemples ci-dessous, notamment au point 2 de l'exemple 1 ci-dessous (modèle mROC).

Le logiciel mROC version 1.0, disponible commercialement auprès des concepteurs (A. Kramar, A. Fortune, D. Farragi et B. Reiser) peut par exemple être utilisé pour construire un modèle mROC.

Andrew Kramar et Antoine Fortune peuvent être contactés auprès de, ou via, l'Unité de Biostatistique du Centre Régional de Lutte contre le Cancer (CRLC) Val d'Aurelle - Paul Lamarque (208, rue des Apothicaires ; Parc Euromédecine ; 34298 Montpellier Cedex 5 ; France).

David Faraggi et Benjamin Reiser peuvent être contactés auprès du, ou via le, Département de Statistique de l'Université de Haifa (Mount Carmel ; Haifa 31905 ; Israël).

La famille des méthodes d'intelligence artificielle ou d'apprentissage automatique est une  
5 famille d'algorithmes qui, au lieu de procéder à une généralisation explicite, comparent les  
exemples d'un nouveau problème avec les exemples considérés en apprentissage et qui  
ont été stockés en mémoire. Ces algorithmes construisent directement les hypothèses à  
partir des exemples d'apprentissage eux-mêmes. Un exemple simple de ce type  
d'algorithme est l'algorithme des  $k$  plus proches voisins (*k-nearest neighbors* ou KNN), et  
10 une de ses extensions possibles connue sous le nom d'algorithme des  $k$  plus proches  
voisins pondérés (*weighted k nearest neighbors* ou WKNN) (Hechenbichler et Schliep,  
2004).

Dans le contexte de classification d'une nouvelle observation  $x$ , l'idée fondatrice simple  
est de faire voter les plus proches voisins de cette observation. La classe (ou statut  
15 clinique) de  $x$  est déterminée en fonction de la classe majoritaire parmi les  $k$  plus proches  
voisins de l'observation  $x$ .

Des bibliothèques de fonctions spécifiques KKNN sont disponibles par exemple dans le  
logiciel R (<http://www.R-project.org/>). Le logiciel R a été initialement développé par  
John Chambers et les laboratoires Bell (*cf.* Chambers 2008). La version actuelle de cette  
20 suite logicielle est la version 2.11.1. Le code source est disponible librement sous les  
termes de la licence publique générale « Free Software Foundation's GNU », sur le site  
<http://www.R-project.org/>. Ce logiciel peut être utilisé pour construire un modèle WKNN.  
Référence est également faite aux exemples ci-dessous, notamment au point 2 de  
l'exemple 1 ci-dessous (modèle WKNN).

25 Une Forêt Aléatoire (*Random Forest* ou RF) est constituée d'un ensemble d'arbres  
simples de prévision, chacun étant capable de produire une réponse lorsqu'on lui présente  
un sous-ensemble de prédicteurs (Breiman 2001 ; Liaw et Wiener 2002). Les calculs sont  
réalisés avec le logiciel R. Ce logiciel peut être utilisé pour construire des modèles RF.

Référence est également faite aux exemples ci-dessous, notamment au point 2 de  
30 l'exemple 1 ci-dessous (modèle RF).

Un réseau de neurones est constitué d'un graphe pondéré orienté dont les nœuds  
symbolisent les neurones. Le réseau est construit à partir d'exemples de chaque classe (par  
exemple, F2 versus F1), et est ensuite utilisé pour déterminer à quelle classe appartient un

nouvel élément ; *cf.* Intrator et Intrator 1993, Riedmiller et Braun 1993, Riedmiller 1994, Anastasiadis *et. al.* 2005 ; *cf.* <http://cran.r-project.org/web/packages/neuralnet/index.html>.

Le logiciel R librement disponible sur <http://www.r-project.org/>, (version 1.3 de *Neuralnet*, écrit par Stefan Fritsch et Frauke Guenther, suivant le travail de Marc Suling) peut par exemple être utilisé pour construire un réseau de neurones.

Référence est également faite aux exemples ci-dessous, notamment au point 2 de l'exemple 1 ci-dessous (modèle NN).

La comparaison de ladite étape ii) peut donc être notamment réalisée en suivant une méthode, et/ou en utilisant un algorithme ou un logiciel :

- mROC,
- KNN, WKNN, plus particulièrement WKNN,
- RF, ou
- NN,

plus particulièrement mROC.

Chacun de ces algorithmes, logiciels ou méthodes permet de construire un modèle de classification multivariée, à partir des valeurs de dosage de chacune des dites cohortes de référence, et de combiner les valeurs de dosage obtenues sur ledit sujet dans ce modèle pour en induire son score fibrotique.

20

Selon un mode de réalisation de l'invention, le modèle de classification multivariée mis en œuvre dans la méthode de l'invention est exprimé par une fonction mathématique, linéaire ou non linéaire, plus particulièrement une fonction linéaire (par exemple, un modèle mROC). Le score de fibrose hépatique dudit sujet est alors induit par combinaison des dites valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet dans cette fonction mathématique, notamment une fonction linéaire ou non linéaire, pour obtenir une valeur de sortie, plus particulièrement une valeur numérique de sortie, indicatrice du score de fibrose hépatique dudit sujet.

25

Selon un mode de réalisation de l'invention, le modèle de classification multivariée mis en œuvre dans la méthode de l'invention est un modèle par apprentissage ou intelligence artificielle, un modèle de classification non paramétrique, ou heuristique, ou de prédiction probabiliste (par exemple, un modèle WKNN, RF ou NN). Le score de fibrose hépatique dudit sujet est alors induit par combinaison des dites valeurs de dosage obtenues pour ledit

30

sujet dans un modèle de classification non paramétrique, ou heuristique, ou de prédiction probabiliste (par exemple, un modèle WKNN, RF ou NN), pour obtenir une valeur de sortie, plus particulièrement une étiquette de sortie, indicatrice du score de fibrose hépatique dudit sujet.

5

De manière alternative ou complémentaire, ladite comparaison de l'étape ii) peut comprendre le fait de comparer les valeurs des dosages du niveau d'expression desdits gènes choisis obtenues pour ledit sujet, à au moins une valeur de référence qui discrimine entre une fibrose hépatique dont le score fibrotique Metavir est d'au plus F1 et une fibrose hépatique dont le score fibrotique Metavir est d'au moins F2, pour classer le score de fibrose hépatique dudit sujet dans le groupe des scores fibrotiques d'au plus F1 selon le système de scores Metavir, ou dans le groupe des scores fibrotiques d'au moins F2 selon le système de scores Metavir.

Par exemple, les valeurs des dosages du niveau d'expression desdits gènes choisis peuvent être comparées à leurs valeurs de référence dans :

- 15 - une sous-population d'individus qui sont de la même espèce que ledit sujet, qui, de préférence, sont infectés par le ou les mêmes virus de l'hépatite que ledit sujet, et qui présentent un score de fibrose hépatique d'au plus F1 selon le système de scores Metavir, et/ou
- 20 - une sous-population d'individus de sujets qui sont de la même espèce que ledit sujet, qui, de préférence, sont infectés par le ou les mêmes virus de l'hépatite que ledit sujet, et qui présentent un score de fibrose hépatique d'au moins F2 selon le système de scores Metavir,

ou à une valeur de référence qui représente la combinaison de ces valeurs de référence.

25 Une valeur de référence peut par exemple être :

- la valeur du dosage du niveau d'expression de chacun desdits gènes choisis dans chacun des individus pour chacune des sous-populations ou cohortes de référence, ou
- un critère de position, par exemple la moyenne ou la médiane, ou un quartile, ou le minimum, ou le maximum de ces valeurs dans chacune de ces sous-populations ou cohortes de référence, ou
- 30 - une combinaison de ces valeurs ou moyennes. ou médiane, ou quartile, ou minimum, ou maximum.

La ou les valeurs de référence utilisées doivent permettre de discriminer les différents scores de fibrose hépatique.

Il peut par exemple s'agir d'un seuil de décision ou de prédiction, établi en fonction de la distribution des valeurs de dosage desdits gènes dans chacune desdites sous-populations ou cohortes, et en fonction des niveaux de sensibilité (Se) et de spécificité (Spe) fixés par l'utilisateur (*cf.* Figure 2 et ci-dessous ;  $Se = VP / (VP + FN)$  et  $Sp = VN / (VN + FP)$ , avec VP = le nombre de vrais positifs, FN = le nombre de faux négatifs, VN = le nombre de vrais négatifs, FP = le nombre de faux positifs). Ce seuil de décision ou prédiction peut notamment être un seuil optimal qui attribue un poids équitable à la sensibilité (Se) et à la spécificité (Spe), tel que le seuil maximisant l'indice de Youden (J) défini par  $J = Se + Spe - 1$ .

Alternativement ou complémentaiement, il peut y avoir comparaison à plusieurs valeurs de référence. C'est notamment le cas lorsque les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet sont comparées à leurs valeurs dans chacune desdites sous-populations ou cohortes de référence, par exemple à l'aide d'une méthode de classification par apprentissage automatique ou par intelligence artificielle.

Ainsi, la comparaison de l'étape ii) peut par exemple être faite comme suit :

- choisir les niveaux de sensibilité (Se) et spécificité (Spe) que l'on souhaite donner à la méthode,
- établir une fonction mathématique, linéaire ou non linéaire, notamment une fonction mathématique linéaire (par exemple, par la méthode mROC), à partir des valeurs de dosage desdits gènes dans chacune desdites sous-populations ou cohortes, et calculer le seuil de décision ou prédiction associé à cette fonction du fait des choix de niveaux de sensibilité (Se) et spécificité (Spe) faits (par exemple, en calculant le seuil maximisant l'indice de Youden),
- combiner les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet dans cette fonction mathématique, pour obtenir une valeur de sortie, qui, comparée audit seuil de décision ou prédiction, permet d'attribuer un score de fibrose hépatique audit sujet, c'est-à-dire de classer ledit sujet dans celle de ces sous-populations ou cohortes de référence, vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

L'invention repose notamment sur la démonstration que, lorsqu'ils sont pris en combinaison, les niveaux d'expression de :

- SPP1, et
  - au moins un gène parmi A2M et VIM, et
  - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et
  - optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :
- 5 IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1,  
sont des biomarqueurs qui donnent une « signature » du score de fibrose hépatique.

La personne du métier disposant d'une combinaison de gènes décrite par l'invention est en  
10 mesure de construire un modèle de classification multivariée, notamment un modèle  
d'analyse statistique multivariée (par exemple une fonction mathématique linéaire ou non  
linéaire) ou un modèle d'apprentissage ou d'intelligence artificielle (par exemple, un  
algorithme d'apprentissage ou d'intelligence artificielle), à l'aide de ses connaissances  
générales dans le domaine des techniques et moyens statistiques, notamment dans le  
15 domaine du traitement et de l'interprétation statistiques de données, plus particulièrement  
de données biologiques.

Un modèle de classification multivariée peut par exemple être construit, notamment  
préalablement construit, comme suit :

- 20 a) pour une population d'individus qui sont de la même espèce que ledit sujet,  
et qui, de préférence, sont infectés par le ou les mêmes virus de l'hépatite que  
ledit sujet, déterminer le score de fibrose hépatique de chacun desdits individus  
de la population, et les classer en sous-populations selon leur score de fibrose  
hépatique, constituant ainsi des cohortes de référence établies selon leur score  
25 de fibrose hépatique ;
- b) dans au moins un échantillon préalablement obtenu à partir de chacun  
desdits individus (la nature de cet échantillon étant de préférence identique à  
celle de l'échantillon dudit sujet), doser le niveau de transcription ou de  
traduction de chacun desdits gènes choisis ;
- 30 c) faire une comparaison inter-cohorte des valeurs de dosage obtenues à l'étape  
b), ou de la distribution de ces valeurs de dosage, (par exemple par analyse  
statistique multivariée), pour construire un modèle de classification multivariée,  
qui induit une valeur de score de fibrose hépatique (ou une valeur

représentative d'un tel score) à partir de la combinaison des niveaux de transcription, ou le cas échéant de traduction, desdits gènes choisis.

Si ledit ou lesdits sujets dont on cherche à déterminer le score de fibrose hépatique présentent cette fibrose du fait d'une affection chronique hépatique particulière connue, par exemple, du fait d'une infection par le virus de l'hépatite C (VHC), on utilise  
5 davantage des individus de situation clinique comparable. Par exemple, si la fibrose dudit ou desdits sujets dont le score de fibrose hépatique doit être déterminé est exclusivement due à une infection par le virus de l'hépatite C (VHC), on choisit de préférence des individus qui sont infectés par un VHC, et on exclut de préférence les  
10 individus dont la fibrose hépatique, ou son évolution, peut être ou avoir été influencée par des facteurs autres que le VHC, tels qu'une (co-)infection par un autre virus (par exemple, virus de la immunodéficience humaine (VIH), virus de l'hépatite B), une consommation d'alcool excessive, une hémochromatose, une hépatite auto-immune, la maladie de Wilson, une déficience en  $\alpha$ -1 antitrypsine, une angiocholite sclérosante primitive, une cirrhose  
15 biliaire primitive. On choisit de préférence des individus qui n'ont pas encore reçu de traitement destiné à traiter leur fibrose hépatique ou son origine. Les individus sont par ailleurs choisis de sorte à constituer une cohorte statistiquement acceptable, ne présentant pas de biais particulier, notamment pas de biais clinique particulier. L'objectif est de construire un modèle de classification multivariée qui soit le plus pertinent possible d'un  
20 point de vue statistique.

De préférence, les cohortes ou sous-populations d'individus qui sont utilisées pour mesurer des valeurs de dosage ou déterminer des distributions de valeurs de dosage auxquelles vont être comparées les valeurs de dosage obtenues sur ledit sujet, et/ou pour  
25 construire les modèles de classification multivariée, comprennent le plus d'individus possibles.

Si le nombre d'individus est trop faible, la comparaison ou le modèle construit peut ne pas être suffisamment fiable et généralisable en vue des applications médicales visées.

Notamment, on utilisera des cohortes ou sous-populations qui comprennent chacune au moins 30 individus, par exemple au moins 40 individus, de préférence au moins 50  
30 individus, plus particulièrement au moins 70 individus, de manière encore plus particulière au moins 100 individus.

De préférence, un nombre comparable d'individus est présent dans chaque cohorte ou sous-population. Par exemple, le nombre d'individus d'une cohorte ou sous-population ne

dépasse pas le seuil de 3 fois le nombre d'individus d'une autre cohorte, plus particulièrement le seuil de 2,5 fois le nombre d'individus d'une autre cohorte.

Lorsque l'analyse statistique menée utilise une fonction mathématique, telle que par exemple dans le cas d'une méthode mROC, le nombre d'individus requis par cohorte peut éventuellement être de l'ordre de 20 à 40 individus par cohorte de référence. Dans le cas  
5 d'une méthode d'analyse par apprentissage automatique, telle qu'une méthode KNN, WKNN, RF ou NN, il est préférable d'avoir au moins 30 individus par cohorte, de préférence au moins 70 individus, de manière encore plus particulière au moins 100 individus.

10 Dans les exemples qui suivent, le nombre total d'individus compris dans l'ensemble des cohortes (cohorte de score F1 et cohorte de score F2) est de plus de 150.

Pour déterminer le score de fibrose hépatique d'un individu, et par suite, affecter cet individu à une cohorte de référence, la personne du métier peut mettre en œuvre tout moyen qu'elle juge approprié. Par exemple, une ponction biopsie hépatique (PBH) peut  
15 être pratiquée sur ledit individu, le tissu hépatique ainsi prélevé peut alors être analysé par examen anatomo-pathologique, pour déterminer le score de fibrose hépatique de cet individu (par exemple, au plus F1 ou au moins F2). Comme les scores de chaque individu sont utilisés comme base d'analyse statistique, et non comme diagnostic individuel de l'individu, les moyens de mesure de score utilisés peuvent éventuellement être les moyens  
20 de l'art antérieur, tels que le test Fibrotest®, Fibrometrer® ou Hepascore®. Il est néanmoins préféré d'utiliser l'examen anatomo-pathologique d'un échantillon de PBH, car, contrairement aux tests Fibrotest®, Fibrometrer® ou Hepascore®, cet examen est capable de discriminer un score de fibrose hépatique d'au plus F1 d'un score d'au moins F2.

25 Bien qu'il faille bien sûr limiter le nombre d'échantillons pris sur un même individu, notamment en cas de ponction biopsie hépatique, plusieurs échantillons peuvent être collectés sur un même individu. Dans ce cas, les résultats de dosage des différents échantillons d'un même individu sont considérés dans leur moyenne résultante ; il n'est pas considéré qu'ils puissent être équivalents à des valeurs de dosage obtenues sur des  
30 individus distincts.

La comparaison des valeurs de dosage des niveaux d'expression desdits gènes choisis dans chacune desdites cohortes peut se faire par tout moyen connu de la personne du métier. Elle se fait généralement par traitement et interprétation statistiques des valeurs de dosage des niveaux d'expression desdits gènes choisis, qui ont été mesurées pour chacune

desdites cohortes. Cette comparaison statistique multivariée permet de construire un modèle de classification multivariée qui induit une valeur de score de fibrose hépatique à partir de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis, plus particulièrement un modèle de classification multivariée qui utilise une combinaison des  
5 niveaux d'expression desdits gènes choisis pour discriminer selon le score de fibrose hépatique.

Une fois que ledit modèle de classification multivariée est construit, il peut être utilisé pour l'analyse des valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet, et surtout être ré-utilisé pour l'analyse du dosage d'autres sujets ultérieurs. Ainsi, le ledit modèle de classification  
10 multivariée peut être établi de manière indépendante du dosage effectué pour ledit ou lesdits sujets, et peut être préalablement construit.

Si besoin en était, plutôt que de constituer des cohortes et réunir les données des individus qui les constituent, la personne du métier peut, pour construire des exemples de modèles de classification multivariée conformes à l'invention, utiliser, à titre d'individus de  
15 cohortes, les sujets qui sont décrits en partie exemples ci-dessous, et peut, à titre de données d'individus de cohortes (en l'occurrence, cohortes F1 et F2), utiliser les données qui sont présentées pour ces sujets dans les exemples ci-dessous, plus particulièrement :

- en tableau 22 et/ou en tableau 23, qui présentent les valeurs de dosage d'un groupe de 20 patients (10 patients F1 et 10 patients F2) pour les gènes A2M, CXCL10,  
20 IL8, SPP1, VIM ; et/ou
- en tableau 25 et/ou en tableau 26 et/ou en tableau 27 et/ou en tableau 28 ci-dessous, qui présentent les valeurs de dosage d'un groupe de 158 patients (102 patients F1 et 56 patients F2) pour chacun des gènes qui peuvent être choisis conformément à l'invention.

25 Il est préférable d'utiliser les données des tableaux 25 et/ou 26 et/ou 27 et/ou 28, qui portent sur un groupe de 158 patients, plutôt que de n'utiliser que celles des tableaux 22 et/ou 23, qui ne portent que sur 20 patients.

Pour les 158 patients dont les valeurs de dosage des niveaux d'expression de tous les gènes susceptibles d'être choisis conformément à l'invention sont présentées en tableaux  
30 25, 26, 27 et 28 ci-dessous, les valeurs de facteurs cliniques, de facteurs virologiques et de facteurs biologiques autres que les niveaux d'expression desdits gènes choisis sont en outre présentées en tableau 24 ci-dessous.

De préférence, ledit modèle de classification multivariée est un système particulièrement discriminant. Avantageusement, ledit modèle de classification multivariée présente une aire sous la courbe ROC (ou AUC) et/ou une valeur d'erreur LOOCV particulière(s).

L'acronyme « AUC » désigne *Area Under the Curve*, c'est-à-dire l'aire sous la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*). L'acronyme « LOOCV » désigne *Leave-One-Out-Cross-Validation*, cf. Hastie, Tibishirani et Friedman, 2009.

La caractéristique d'AUC vient notamment s'appliquer aux modèles de classification multivariée, qui sont définis par une fonction mathématique, comme par exemple les modèles utilisant une méthode mROC de classification.

Les modèles d'intelligence artificielle ou d'apprentissage automatique multivariés ne sont quant à eux pas à proprement parler définis par une fonction mathématique. Néanmoins, dès lors qu'ils impliquent un seuil décisionnel (*threshold*), ils peuvent être appréhendés au moyen d'une courbe ROC, et donc d'un calcul d'AUC. C'est par exemple le cas des modèles utilisant une méthode RF (*Random Forest*). En effet, dans le cas de la méthode RF, une courbe ROC peut être calculée à partir des prédictions des échantillons OOB (*Out-Of-Bag*, ou « hors-du-sac » selon la traduction en langue française).

Ceux des modèles d'intelligence artificielle ou d'apprentissage automatique multivariés, qui ne pourraient être caractérisés par une valeur d'AUC, peuvent par contre, comme tous les autres modèles d'intelligence artificielle ou d'apprentissage automatique multivariés, être caractérisés par la valeur du paramètre « erreur de classification » qui leur est associée, telle que par exemple la valeur de l'erreur LOOCV.

Ladite valeur particulière d'AUC peut notamment être d'au moins 0,60, d'au moins 0,61, d'au moins 0,66, plus particulièrement d'au moins 0,69, d'au moins 0,70, d'au moins 0,71, d'au moins 0,72, d'au moins 0,73, d'au moins 0,74, encore plus particulièrement d'au moins 0,75, encore plus particulièrement d'au moins 0,76, encore plus particulièrement d'au moins 0,77, notamment d'au moins 0,78, d'au moins 0,79, d'au moins 0,80 (de préférence, avec un intervalle de confiance à 95% à au plus  $\pm 11\%$ , plus particulièrement à moins de  $\pm 10,5\%$ , encore plus particulièrement à moins de  $\pm 9,5\%$ , notamment à moins de  $\pm 8,5\%$ ) ; cf. par exemple, tableaux 5, 7, 11, 13 ci-dessous.

Avantageusement, ladite valeur particulière d'erreur LOOCV est d'au plus 30%, au plus 29%, au plus 25%, au plus 20%, au plus 18%, au plus 15%, au plus 14%, au plus 13%, au plus 12%, au plus 11%, au plus 10%, au plus 9%, au plus 8%, au plus 7%, au plus 6%, au plus 5%, au plus 4%, au plus 3%, au plus 2%, au plus 1%.

Les performances diagnostiques d'un biomarqueur sont généralement caractérisées selon au moins un des deux indices suivants :

- 5 - la sensibilité (Se), qui représente sa capacité à détecter la population dite "pathologique" constituée d'individus dits "cas" (en l'occurrence, les patients dont le score de fibrose hépatique est F2 ou plus) ;
- la spécificité (Sp ou Spe), qui représente sa capacité à détecter la population dite "saine", constituée des patients dits "contrôles" (en l'occurrence, les patients dont le score de fibrose hépatique est F1 ou moins).

10 Lorsqu'un biomarqueur génère des valeurs continues (par exemple, des valeurs de concentration), différentes positions de seuil prédictif (*Prediction Threshold* ou PT) peuvent être définies afin d'assigner un échantillon à la classe positive (test positif :  $y = 1$ ). La comparaison de la concentration du biomarqueur à la valeur PT permet de classer le sujet dans la cohorte à laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

15 Par exemple, si l'on considère une cohorte d'individus qui présentent un score fibrotique d'au moins F2 et une cohorte d'individus un score fibrotique d'au plus F1, et si l'on considère un sujet ou patient p, dont le stade clinique doit être déterminé, pour lequel la valeur de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis est V (V étant égal à Z dans le cas des modèles mROC), la règle décisionnelle est la suivante :

20 - lorsque la valeur moyenne de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis dans la cohorte des individus "F2 ou plus" est supérieure à celle de la cohorte des individus "F1 ou moins" (*cf.* graphe du haut de la Figure 2) :

- si  $V \geq PT$  : le test est positif, un score fibrotique "F2 ou plus" est assigné audit patient p,

25 - si  $V < PT$  : le test est négatif, un score fibrotique "F1 ou moins" est assigné audit patient p,

ou

- lorsque la valeur moyenne de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis dans la cohorte des individus "F2 ou plus" est inférieure à celle de la cohorte des  
30 individus "F1 ou moins" :

- si  $V \leq PT$  : le test est positif, un score fibrotique "F2 ou plus" est assigné audit patient p,

- si  $V > PT$  : le test est négatif, un score fibrotique "F1 ou moins" est assigné audit patient p.

Comme la combinaison de biomarqueurs de l'invention est effectivement discriminante, les distributions, supposées gaussiennes, de la combinaison de biomarqueurs dans chaque population d'intérêt (par exemple, dans la cohorte "F2 ou plus" et dans la cohorte "F1 ou moins") se différencient nettement. Il convient alors de définir la valeur seuil optimale qui confèrera à cette combinaison de biomarqueurs les meilleures performances diagnostiques. En effet, pour un seuil donné PT, les valeurs suivantes peuvent être calculées (cf. Figure 2) :

- le nombre de vrais positifs : VP ;
- le nombre de faux négatifs : FN ;
- le nombre de faux positifs : FP ;
- le nombre de vrais négatifs : VN.

Les calculs des paramètres de sensibilité (Se) et spécificité (Sp) se déduisent des formules suivantes :

$$Se = VP / (VP + FN) ;$$

$$Sp = VN / (VN + FP).$$

La sensibilité peut donc être considérée comme étant la probabilité que le test soit positif sachant que le score F Metavir de sujet testé est au moins F2 ; et la spécificité peut être considérée comme étant la probabilité que le test soit négatif sachant que le score F Metavir de sujet testé est au plus F1.

Une courbe ROC peut être utilisée pour visualiser le pouvoir prédictif du biomarqueur (ou pour l'approche multivariée, le pouvoir prédictif de la combinaison de biomarqueurs intégrés dans le modèle) pour différentes valeurs PT (Swets 1988). Chaque point de la courbe représente la Sensibilité versus (1-Spécificité) pour une valeur spécifique PT.

Par exemple, si les concentrations du biomarqueur d'intérêt varient de 0 à 35, différentes valeurs PT peuvent être successivement positionnées à 0,5 ; 1 ; 1,5 ; ... ; 35. Ainsi, pour chaque valeur PT, les échantillons testés sont classifiés, la sensibilité et la spécificité sont calculées et les points résultants sont reportés sur un graphique (cf. Figure 3).

Plus la courbe ROC est proche de la première diagonale (droite reliant le coin bas gauche au coin haut droit), plus les performances discriminantes du modèle sont pauvres (cf. Figure 4). Un test à fort pouvoir discriminant occupera la partie supérieure gauche du

graphique. Un test peu discriminant avoisinera la première diagonale du graphique. L'aire sous la courbe ROC (AUC) est un bon indicateur de performance diagnostique. Celle-ci varie de 0,5 (biomarqueur non discriminant) à 1 (biomarqueur parfaitement discriminant). La valeur 0,70 induit un biomarqueur discriminant.

- 5 Une courbe ROC peut être approximée par deux principales techniques : paramétrique et non paramétrique (Shapiro 1999). Dans le premier cas, les données sont supposées suivre une distribution statistique spécifique (par exemple, gaussienne), qui est alors ajustée aux données observées pour produire une courbe ROC lissée. Des approches non paramétriques considèrent l'estimation de Se et (1-Sp) à partir des données observées. La
- 10 courbe ROC empirique résultante n'est pas une fonction mathématique lissée, mais une courbe constante par morceaux.

- Le choix du seuil ou du seuil optimal, noté  $\delta$  (delta), dépend des priorités de l'utilisateur en termes de sensibilité et spécificité. Dans le cas de poids équitables attribués aux sensibilité et spécificité, ce dernier peut être défini comme le seuil maximisant l'indice de
- 15 Youden ( $J = Se + Sp - 1$ ).

Avantageusement, les moyens de l'invention permettent d'atteindre :

- une sensibilité [ $Se = VP / (VP + FN)$ ] d'au moins 67% (ou plus), et/ou
  - une spécificité [ $Sp = VN / (VN + FP)$ ] d'au moins 67% (ou plus).
- 20 Dans le cadre de l'invention, la sensibilité est une caractéristique particulièrement importante, dans la mesure où le besoin clinique prioritaire est l'identification des patients dont le score F Metavir est d'au moins F2.

- Par suite, et de manière avantageuse, la demande est plus particulièrement relative aux moyens de l'invention qui atteignent, ou permettent d'atteindre, une sensibilité de 67% ou
- 25 plus.

Plus particulièrement, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre, une sensibilité de 67% ou plus et une spécificité de 67% ou plus.

- C'est la sélection particulière de gènes proposée par l'invention qui permet d'atteindre ces scores de sensibilité et/ou spécificité, plus particulièrement ces scores de sensibilité, de
- 30 manière encore plus particulière ces scores de sensibilité et spécificité.

Ainsi, selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le score de fibrose hépatique dudit sujet est induit :

- avec une sensibilité d'au moins 67% (ou plus) et/ou une spécificité d'au moins 67% (ou plus),
  - plus particulièrement avec une sensibilité d'au moins 67% (ou plus),
  - de manière encore plus particulière avec une sensibilité d'au moins 67% (ou plus)
- 5 et une spécificité d'au moins 67% (ou plus).

Conformément à l'invention, la sensibilité peut être d'au moins 67%, d'au moins 68%, d'au moins 69%, d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 10 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité des combinaisons des niveaux de transcription ou de traduction de ces gènes présentées en tableaux 5, 7, 11 et 13 ci-dessous).

Alternativement ou complémentaiement, la spécificité peut être d'au moins 67%, d'au 15 moins 68%, d'au moins 69%, d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de spécificité des combinaisons des niveaux de transcription ou de traduction de ces gènes présentées en tableaux 5, 7, 11 et 13 ci-dessous).

20

Toutes les combinaisons de ces seuils de sensibilité et de ces seuils de spécificité sont explicitement incluses dans le contenu de la demande (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous).

Par exemple, la sensibilité peut être d'au moins 71%, d'au moins 73%, ou d'au moins 25 75%, et la spécificité d'au moins 70% ou un seuil plus élevé (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20 à 24, 26, 27 et 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité et de spécificité des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 18 à 24, 26 à 27, 29 de niveaux de transcription présentées en tableau 5 ci-dessous, et les caractéristiques de sensibilité et de 30 spécificité des combinaisons n° 4 et 16 de niveaux de transcription présentées en tableau 11 ci-dessous).

Plus particulièrement, toutes les combinaisons comprenant au moins la combinaison d'un seuil de sensibilité et d'un seuil de spécificité sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

Alternativement ou complémentaiement à ces caractéristiques de sensibilité et/ou spécificité, les Valeurs de Prédiction Négative (VPN) atteintes, ou susceptibles d'être atteintes, par les moyens de l'invention sont particulièrement élevées.

5 La VPN est égale à  $VN / (VN+FN)$ , avec VN = Vrais Négatifs et FN = Faux Négatifs, et représente donc la probabilité que le sujet testé soit au plus F1, sachant que le test de l'invention est négatif (le résultat donné par le test est : score de F1 ou moins).

Conformément à l'invention, la VPN peut être d'au moins 80%, d'au moins 81%, d'au moins 82%, d'au moins 83%, d'au moins 84% (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de VPN des combinaisons des niveaux de transcription ou de traduction de ces gènes présentées en tableaux 5, 7, 11, 13 ci-dessous).

Ici encore, c'est la sélection particulière de gènes proposée par l'invention qui permet d'atteindre ces niveaux de VPN.

15

Par exemple, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 71%, d'au moins 73%, ou d'au moins 75%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins 81% ou d'au moins 82%.

20 (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20 à 24, 26, 27 et 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, spécificité et de VPN des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 18, 19, 20 à 24, 26, 27 et 29 de niveaux de transcription présentées en tableau 5 ci-dessous, et les caractéristiques de sensibilité, de spécificité et de VPN des combinaisons n° 4 et 16 de  
25 niveaux de transcription présentées en tableau 11 ci-dessous).

Plus particulièrement, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 73%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins  
30 81% ou d'au moins 82%,

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 10, 13, 19, 21, 23 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, spécificité et VPN de la combinaison des niveaux de transcription de ces gènes présentées en tableaux 5 et 11 ci-dessous).

Plus particulièrement, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 75%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins 81% ou d'au moins 82%,

5 (cf., par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7 et 13 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, spécificité et VPN de la combinaison des niveaux de transcription de ces gènes présentées en tableaux 5 et 11 ci-dessous).

10 Toutes les combinaisons de seuils de VPN et/ou de seuils de sensibilité et/ou de seuils de spécificité sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

Plus particulièrement, toutes les combinaisons comprenant au moins la combinaison d'un seuil de sensibilité et d'un seuil de VPN sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

15

Alternativement ou complémentaiement à ces caractéristiques de sensibilité et/ou spécificité et/ou de VPN, les Valeurs de Prédiction Positive (VPP) atteintes, ou susceptibles d'être atteintes, par les moyens de l'invention sont particulièrement élevées.

20 La VPP est égale à  $VP / (VP + FP)$  avec VP = les Vrais Positifs et FP = Faux Positifs, et représente donc la probabilité que le sujet testé soit au moins F2, sachant que le test de l'invention est positif (le résultat du test est : score de F2 ou plus).

25 Conformément à l'invention, la VPP peut être d'au moins 50%, ou d'au moins 55%, ou d'au moins 56%, ou d'au moins 57%, ou d'au moins 58%, ou d'au moins 59% ou d'au moins 60% (cf., par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de VPP des combinaisons des niveaux de transcription ou de traduction de ces gènes présentées en tableaux 5, 7, 11, 13 ci-dessous).

Ici encore, c'est la sélection particulière de gènes proposée par l'invention qui permet d'atteindre ces niveaux de VPP.

30

Par exemple, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 71%, d'au moins 73%, ou d'au moins 75%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins 81% ou d'au moins 82%, et/ou une VPP d'au moins 55%, ou d'au moins 57%,

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 16, 18, 19, 20 à 24, 26, 27 et 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, spécificité, VPN et VPP des combinaisons n° 1, 4, 7, 9 à 11, 13, 14, 18, 19, 20 à 24, 26, 27 et 29 de niveaux de transcription présentées en tableau 5 ci-dessous, et les caractéristiques de sensibilité, de spécificité, VPN et VPP des combinaisons n° 4 et 16 de niveaux de transcription présentées en tableau 11 ci-dessous).

Plus particulièrement, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 73%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins 81% ou d'au moins 82%, et/ou une VPP d'au moins 57%,

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 10, 13, 19, 21, 23 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, de spécificité, VPN et VPP, de la combinaison des niveaux de transcription de ces gènes présentées en tableaux 5 et 11 ci-dessous).

Plus particulièrement, les moyens de l'invention atteignent, ou permettent d'atteindre :

- une sensibilité d'au moins 75%, et
- une spécificité d'au moins 70% (ou un seuil plus élevé), et/ou une VPN d'au moins 81% ou d'au moins 82%, et/ou une VPP d'au moins 57%,

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7 et 13 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques de sensibilité, de spécificité, VPN et VPP de la combinaison des niveaux de transcription de ces gènes présentées en tableaux 5 et 11 ci-dessous).

Toutes les combinaisons de seuils de VPP et/ou VPN et/ou de seuils de sensibilité et/ou de seuils de spécificité sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

Plus particulièrement, toutes les combinaisons comprenant au moins la combinaison d'un seuil de sensibilité et d'un seuil de VPP sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

30

Plus particulièrement, toutes les combinaisons comprenant au moins un desdits seuils de VPN et/ou au moins un desdits seuils de sensibilité, plus particulièrement au moins un desdits seuils de VPN et un desdits seuils de sensibilité, plus particulièrement au moins un

desdits seuils de VPN et un desdits seuils de sensibilité et un desdits seuils de spécificité, sont incluses dans la demande.

Les tableaux 5, 7, 11 et 13 présentés ci-dessous donnent des illustrations :

- 5        - de valeurs d'aire sous la courbe ROC (AUC),  
          - de valeurs de sensibilité et/ou spécificité, plus particulièrement de sensibilité, de  
          manière encore plus particulière de sensibilité et spécificité,  
          - de valeurs de Valeur Prédictive Négative (VPN) et/ou Valeur Prédictive Positive  
          (VPP), plus particulièrement de VPN, de manière encore plus particulière de VPN  
10        et VPP,

atteintes par des combinaisons de gènes conformes à l'invention (tableaux 5 et 11 :  
combinaisons de niveaux de transcription ; tableaux 7 et 13 : combinaisons de niveaux de  
traduction).

- 15        Les combinaisons prédictives de l'invention comprennent des combinaisons des niveaux  
d'expression de gènes, choisis comme ci-dessus indiqué.

Comme indiqué plus en détail ci-dessous, et comme illustré dans les exemples ci-dessous  
(*cf.* exemples 2c, 2d, 3b) ci-dessous), il peut néanmoins être choisi de faire intervenir dans  
ces combinaisons un ou plusieurs facteurs autres que les niveaux d'expression de ces  
20        gènes, pour combiner cet ou ces autres facteurs et les niveaux d'expression des gènes  
choisis en une règle décisionnelle.

Cet ou ces autres facteurs sont préférablement choisis de sorte à construire un modèle de  
classification dont le pouvoir prédictif est encore amélioré par rapport au modèle qui ne  
comprendrait pas cet ou ces autres facteurs.

- 25        En sus du niveau d'expression desdits gènes choisis, on peut également mesurer ou doser  
un ou plusieurs autres facteurs, tels qu'un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou  
plusieurs facteurs virologiques et/ou un ou plusieurs facteurs biologiques autres que le  
niveau d'expression desdits gènes choisis.

La(les) valeur(s) de cet(ces) autre(s) facteur(s) peuvent alors être prises en compte pour  
30        construire le modèle de classification multivariée, et peuvent ainsi conduire à des  
performances de classification encore améliorées, plus particulièrement à des  
caractéristiques de sensibilité et/ou spécificité et/ou VPN et/ou VPP augmentées.

Par exemple, si l'on compare les valeurs présentées pour la combinaison n°16 ou n°4 en  
tableaux 5 et 11 ci-dessous, on constate que plusieurs des valeurs d'AUC, Se, Spe, VPN et

VPP, plus particulièrement les valeurs d'AUC, Se, VPN, augmentent lorsqu'à la combinaison des niveaux de transcription desdits gènes choisis, sont outre combinés d'autres facteurs, notamment d'autres facteurs biologiques.

De même, si l'on compare les valeurs présentées pour la combinaison n°16 en tableaux 7  
5 et 13 ci-dessous, on constate que plusieurs des valeurs d'AUC, Se, Spe, VPN et VPP, plus particulièrement les valeurs les valeurs d'AUC, Spe et VPN, augmentent lorsqu'à la combinaison des niveaux de traduction desdits gènes choisis, sont outre combinés d'autres facteurs, notamment d'autres facteurs biologiques.

Avantageusement, lorsque qu'un ou plusieurs autres facteurs sont combinés à une  
10 combinaison de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, au moins l'une des caractéristiques d'AUC (le cas échéant, d'erreur LOOCV), de sensibilité, de spécificité, de VPN et de VPP, s'en trouve améliorée.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la valeur particulière d'AUC associée à une telle combinaison améliorée est d'au moins 0,70, d'au moins 0,71, d'au moins 0,72, d'au  
15 moins 0,73, plus particulièrement d'au moins 0,74, encore plus particulièrement d'au moins 0,75, encore plus particulièrement d'au moins 0,76, encore plus particulièrement d'au moins 0,77, notamment d'au moins 0,78, d'au moins 0,79, d'au moins 0,80 (de préférence, avec un intervalle de confiance à 95% à au plus  $\pm 11\%$ , plus particulièrement à moins de  $\pm 10,5\%$ , encore plus particulièrement à moins de  $\pm 9,5\%$ , notamment à moins  
20 de  $\pm 8,5\%$ ) ; *cf.* par exemple, tableaux 5, 11 et 13 ci-dessous.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la valeur de seuil de spécificité associée à telle combinaison améliorée est d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au  
moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les caractéristiques  
25 de spécificité des combinaisons des niveaux de transcription de ces gènes présentées en tableaux 11 et 13 ci-dessous).

Comme précédemment indiqué, et comme illustré ci-dessous, les moyens de l'invention font intervenir le dosage du niveau d'expression de :

- 30
- SPP1, et
  - au moins un gène parmi A2M et VIM, et
  - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

- optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

5 Conformément à l'invention, le nombre total de gènes ainsi choisis dont le niveau d'expression est dosé est donc d'au moins trois.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ce nombre total de gènes ainsi choisis est de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou 22, plus particulièrement de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, de manière plus particulière de 3, 4, 5, 6, 7, de manière encore plus  
10 particulière de 3, 4, 5 ou 6. Avantageusement, ce nombre de gènes choisis est de 3, 4 ou 5, notamment de 4 ou 5 (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n°1 à 29 du tableau 3 ci-dessous).

Selon un mode de réalisation, le nombre total de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-  
15 deux gènes de l'invention est de 3, 4, 5 ou 6 gènes, plus particulièrement de 4 ou 5 gènes, avec:

- une sensibilité d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% ; et/ou avec
- une spécificité d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% ; et/ou avec  
20
- une VPN d'au moins 80%, d'au moins 81%, d'au moins 82%, d'au moins 83%, d'au moins 84% ;

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous).

Par exemple, la demande vise un nombre de 3, 4, 5 ou 6 gènes choisis parmi ladite liste de  
25 vingt-deux gènes de l'invention, plus particulièrement de 4 ou 5 gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, avec:

- une sensibilité d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% ; et/ou avec
- une spécificité d'au moins 70%, d'au moins 71%, d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% ;  
30

plus particulièrement, un nombre de 3, 4, 5 ou 6 gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, plus particulièrement de 4 ou 5 gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, avec une sensibilité d'au moins 70%, d'au moins 71%,

d'au moins 72%, d'au moins 73%, d'au moins 74%, d'au moins 75% (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1 à 29 du tableau 3 ci-dessous).

5 Toutes les combinaisons de nombre total de gènes choisis et/ou de seuil de sensibilité et/ou de seuil de spécificité et/ou de seuil de VPN et/ou de seuil de VPP ci-dessus indiquées sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

Plus particulièrement, le nombre total de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention est de 3, 4, 5 ou 6 gènes, plus particulièrement de 4 ou 5 gènes, avec:

- 10
- une sensibilité d'au moins 73% ; et/ou avec
  - une spécificité d'au moins 70% ; et/ou avec
  - une VPN d'au moins 83% ;

(*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 10, 13, 19, 21, 23 du tableau 3 ci-dessous).

- 15 Plus particulièrement, le nombre total de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention est de 3, 4, 5 ou 6 gènes, plus particulièrement de 4 ou 5 gènes, avec:
- une sensibilité d'au moins 75% ; et/ou avec
  - une spécificité d'au moins 70% ; et/ou avec
  - une VPN d'au moins 83% ;

20 (*cf.*, par exemple, gènes choisis des combinaisons n° 1, 4, 7, 13 du tableau 3 ci-dessous).

Les gènes qui sont choisis conformément à l'invention sont :

- SPP1, et
- au moins un gène parmi A2M et VIM, et
- 25 - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et
- optionnellement, au moins un gène parmi les seize gènes suivants : IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

30 Le choix de gènes est fait selon les exigences ou souhaits de performances à atteindre, par exemple en fonction de la sensibilité et/ou spécificité et/ou VPN et/ou VPP que l'on souhaite ou désire atteindre. Bien entendu, plus le nombre de gènes choisis est faible, plus la mise en œuvre des moyens de l'invention est simple.

Tous les choix possibles de gènes sont explicitement inclus dans la demande.

De manière similaire à ce qui a été indiqué ci-dessus pour les seuils de sensibilité, les seuils de spécificité, les seuils de VPN, les seuils de VPP, et le nombre total de gènes choisis, toutes les combinaisons de gènes choisis dans chacune des listes de gènes et/ou de  
 5 nombres totaux de gènes choisis et/ou de seuils de sensibilité et/ou de seuils de spécificité et/ou de seuils de VPN et/ou de seuils de VPP sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

Comme les gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention sont :

- 10                   - SPP1, et  
                       - au moins un gène parmi une première liste de gènes formée par A2M et VIM,  
                       et  
                       - au moins un gène parmi une deuxième liste de gènes formée par IL8,  
                       CXCL10 et ENG, et  
 15                   - optionnellement, au moins un gène parmi une troisième liste de gènes formée  
                       par les seize gènes suivants : IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11,  
                       MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH,  
                       IRF9, MMP1,

on peut donc, en sus de SPP1, choisir :

- 20                   - un ou deux gènes parmi A2M et VIM (première liste de gènes), et  
                       - un, deux ou trois gènes parmi IL8, CXCL10 et ENG (deuxième liste de gènes), et  
                       - de zéro à seize gènes, par exemple, zéro, un, deux ou trois gènes, notamment zéro,  
                       un ou deux gènes parmi ladite troisième liste de seize gènes (liste optionnelle).

25                   Alternativement ou complémentirement, on choisit :

- zéro, un, deux ou trois gènes, plus particulièrement zéro, un ou deux gènes, parmi la liste  
 des seize gènes optionnels ; et/ou

- un nombre total de gènes choisis de quatre ou cinq gènes ;

*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 29 du tableau 3 ci-dessous.

30

Avantageusement, on choisit :

- SPP1, et
- un ou deux gènes parmi A2M et VIM, plus particulièrement au moins A2M, et

- un, deux ou trois gènes parmi IL8, CXCL10 et ENG, plus particulièrement au moins IL8, et
- zéro, un, deux ou trois gènes parmi ladite liste optionnelle de seize gènes, plus particulièrement zéro, un ou deux gènes parmi cette liste.

5

Parmi les gènes de la première liste, on peut choisir A2M et/ou VIM. On peut donc choisir :

- A2M, ou
- VIM, ou
- 10 - A2M et VIM,

par exemple, au moins A2M, c'est-à-dire :

- A2M, ou
- A2M et VIM ;

*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 28 du tableau 3 ci-dessous.

15

Alternativement ou complémentaiement, parmi les gènes de la deuxième liste, on peut choisir IL8 et/ou CXCL10 et/ou ENG. Avantagement, on choisit au moins IL8, c'est-à-dire :

- IL8, ou
- 20 - IL8 et CXCL10, ou
- IL8 et ENG, ou
- IL8 et CXCL10 et ENG ;

*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 18 et 22 à 29 du tableau 3 ci-dessous.

25 Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit au moins A2M dans la première liste comme ci-dessus indiqué et/ou au moins IL8 dans la deuxième liste comme ci-dessus indiqué (*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 29 du tableau 3 ci-dessous).

Alternativement ou complémentaiement, parmi les gènes de la troisième liste, c'est-à-dire  
30 parmi la liste des seize gènes optionnels, on peut notamment choisir zéro, un, deux ou trois gènes, plus particulièrement zéro, un ou deux gènes.

Plus particulièrement, on peut choisir zéro, un, deux ou trois gènes, notamment zéro, un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit :

- au moins A2M dans la première liste, et/ou au moins IL8 dans la deuxième liste, et
  - zéro gène parmi la troisième liste, c'est-à-dire parmi la liste des seize gènes optionnels, ou un ou plusieurs gènes parmi cette liste des seize gènes optionnels, parmi lesquels au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1 (par exemple, un ou deux de ces gènes), plus particulièrement au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4 (par exemple, un ou deux de ces gènes) ;
- cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 17, 19 à 23, 25, 27, plus particulièrement les combinaisons n°1 à 17, 19 à 23 du tableau 3 ci-dessous.

10

Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit :

- A2M ou au moins A2M dans la première liste de gènes, et
  - zéro, un, deux ou trois gènes, plus particulièrement zéro, un ou deux gènes, parmi la liste des seize gènes optionnels, et
- 15 - un nombre total de gènes choisis de quatre ou cinq gènes ;
- cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 28 du tableau 3 ci-dessous.

Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit :

- IL8 ou au moins IL8 dans la deuxième liste de gènes, et
- 20 - zéro, un, deux ou trois gènes, plus particulièrement zéro, un ou deux gènes, parmi la liste des seize gènes optionnels, et
- un nombre total de gènes choisis pour l'ensemble de la combinaison de quatre ou cinq gènes ;
- cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 18 et 22 à 29 du tableau 3 ci-dessous.

25

Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit :

- A2M ou au moins A2M dans la première liste, et/ou IL8 ou au moins IL8 dans la deuxième liste, et
  - zéro gène parmi la troisième liste, c'est-à-dire la liste des seize gènes optionnels, ou un ou plusieurs gènes parmi cette liste des seize gènes optionnels, parmi lesquels au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1 (par exemple, un ou deux de ces gènes), plus particulièrement au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4 (par exemple, un ou deux de ces gènes), et
- 30

- un nombre total de gènes choisis pour l'ensemble de la combinaison de quatre ou cinq gènes ;

*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 17, 19 à 23, 25, 27, plus particulièrement les combinaisons n°1 à 17, 19 à 23 du tableau 3 ci-dessous.

5

Selon un mode de réalisation de l'invention, on choisit :

- A2M ou au moins A2M dans la première liste de gènes, et

- IL8 ou au moins IL8 dans la deuxième liste de gènes, et/ou MMP9 ou au moins MMP9 parmi la liste des seize gènes optionnels,

10 - le nombre total de gènes choisis parmi la liste des seize gènes optionnels étant de zéro, un ou deux gènes (par exemple MMP9, ou MMP9 et p14ARF), et

- un nombre total de gènes choisis pour l'ensemble de la combinaison étant de quatre ou cinq gènes ;

*cf.* par exemple, les combinaisons n°1 à 18, 19, 21, et 22 à 29 du tableau 3 ci-dessous.

15

Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits gènes choisis sont :

- SPP1, et

- A2M, ou au moins A2M parmi A2M et VIM, et

- IL8, ou au moins IL8 parmi IL8, CXCL10 et ENG,

20 - optionnellement, au moins un gène parmi la liste de seize gènes ci-dessus mentionnée ;

*cf.* par exemple, les combinaisons de gènes n°1 à 18 et 22 à 28 présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

25 Selon un mode de réalisation, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention sont :

- SPP1, et

- A2M, ou au moins A2M parmi A2M et VIM, et

- CXCL10 et/ou ENG, ou au moins CXCL10 et/ou ENG parmi IL8, CXCL10 et

30

ENG, et

- optionnellement, au moins un gène parmi la liste de seize gènes ci-dessus mentionnée ;

*cf.* par exemple, les combinaisons de gènes n°4, 7, 8, 13, 16, 18, 19, 20, 21, 25, 28 présentées dans le tableau 3 ci-dessous, plus particulièrement les combinaisons de gènes n°19 à 21.

Selon un mode de réalisation, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention sont :

- SPP1, et
- A2M, ou au moins A2M parmi A2M et VIM, et
- CXCL10 et/ou ENG, ou au moins CXCL10 et/ou ENG parmi IL8, CXCL10 et ENG, et
- optionnellement, MMP9 ou au moins MMP9 parmi ladite liste de seize gènes (par exemple, MMP9 et p14ARF) ;

*cf.* par exemple, les combinaisons de gènes n°4, 19 et 21 présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention peuvent être définis comme étant :

- SPP1, et
- au moins un gène parmi A2M et VIM, et
- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et
- optionnellement, au moins un gène parmi la liste des seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4,  
TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1,

tout en comprenant au moins :

- A2M, et
- IL8 et/ou MMP9 ;

*cf.* par exemple, les combinaisons de gènes n°1 à 19 et 21 à 28 présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

Selon un mode de réalisation, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention peuvent être :

- SPP1, et
- au moins un gène parmi A2M et VIM, de préférence A2M ou au moins A2M parmi A2M et VIM, et
- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

- optionnellement, au moins un gène parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1.

Lorsque lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention comprennent au moins un gène parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1, ils  
5 peuvent en outre comprendre au moins un gène parmi ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, TIMP1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

Voir, par exemple, les combinaisons de gènes n°1 à 6, 8 à 9, 11 à 12, 14 à 17, 19, 21 à 23, 25 à 27 présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

10 Selon un mode de réalisation, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention peuvent être :

- SPP1, et

- au moins un gène parmi A2M et VIM, de préférence A2M ou au moins A2M parmi A2M et VIM, et

15 - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

- optionnellement, au moins un gène parmi IL6ST, MMP9, S100A4.

Lorsque lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention comprennent au moins un gène parmi IL6ST, MMP9, S100A4, ils peuvent en outre  
20 comprendre au moins un gène parmi p14ARF, CHI3L1, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, TIMP1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

Voir, par exemple, les combinaisons de gènes n°1 à 6, 8 à 9, 11 à 12, 14 à 17, 19, 21 à 23 présentées dans le tableau 3 ci-dessous.

25 Par exemple, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention comprennent, ou sont :

- SPP1, A2M, IL8, CHI3L1 et IL6ST (combinaison n°1) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, ANGPT2 et IL6ST (combinaison n°2) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP2 (combinaison n°3) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, VIM et CXCL10 (combinaison n°4) ; ou

30 - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP9 (combinaison n°5) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP1 (combinaison n°6) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, VIM, et ENG (combinaison n°7) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et IL6ST, (combinaison n°8) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, CXCL1 et IL6ST (combinaison n°9) ; ou

- SPP1, A2M, IL8 et VIM (combinaison n°10) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, COL1A1 et IL6ST (combinaison n°11) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL11 et IL6ST (combinaison n°12) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et ENG (combinaison n°13) ; ou
- 5 - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et TIMP1 (combinaison n°14) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, IHH et IL6ST (combinaison n°15) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et S100A4 (combinaison n°16) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP7 (combinaison n°17) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, ENG et CXCL11 (combinaison n°18) ; ou
- 10 - SPP1, A2M, ENG et MMP9 (combinaison n°19) ; ou
- SPP1, A2M, CXCL10 et ENG (combinaison n°20) ; ou
- SPP1, A2M, CXCL10, p14ARF et MMP9 (combinaison n°21) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL6 et IL6ST (combinaison n°22) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et S100A4 (combinaison n°23) ; ou
- 15 - SPP1, A2M, IL8, ANGPT2 et MMP7 (combinaison n°24) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et p14ARF (combinaison n°25) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et TIMP1 (combinaison n°26) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et p14ARF (combinaison n°27) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et IRF9 (combinaison n°28) ; ou
- 20 - SPP1, IL8, VIM et MMP2 (combinaison n°29).

Plus particulièrement, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention comprennent, ou sont :

- SPP1, A2M, IL8, CHI3L1 et IL6ST, (combinaison n°1) ; ou
- 25 - SPP1, A2M, IL8, VIM et CXCL10 (combinaison n°4) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, VIM, et ENG (combinaison n°7) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et VIM (combinaison n°10) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et ENG (combinaison n°13) ; ou
- SPP1, A2M, ENG et MMP9 (combinaison n°19) ; ou
- 30 - SPP1, A2M, CXCL10, p14ARF et MMP9 (combinaison n°21) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et S100A4 (combinaison n°23).

De manière similaire à ce qui a été indiqué ci-dessus pour les seuils de sensibilité, les seuils de spécificité, les seuils de VPN, le nombre total de gènes choisis, le nombre de

gènes choisis dans chacune des listes de gènes, toutes les combinaisons de choix de gènes et/ou de nombres de gènes choisis dans chacune des listes de gènes et/ou de nombres totaux de gènes choisis et/ou de seuils de sensibilité et/ou de seuils de spécificité et/ou de seuils de VPN sont explicitement incluses dans le contenu de la demande.

5

Vingt-neuf exemples de combinaisons de gènes conformes à l'invention sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous.

Des exemples de modèles de classification multivariée ont été construits pour chacune de ces combinaisons de gènes.

10

Les tableaux 4, 6, 10 et 12 ci-dessous en présentent des exemples (en l'occurrence, modèles mROC avec fonction linéaire Z) :

15

- tableaux 4 et 10 : combinaison des niveaux de transcription des gènes (dosage des ARN, en l'occurrence des ARN contenus dans un échantillon contenant des acides nucléiques susceptibles d'être obtenus à partir d'un prélèvement contenant une portion de parenchyme hépatique ou des cellules d'un tel tissu);
- tableaux 6 et 12 : combinaison des niveaux de traduction des gènes (dosage des protéines, en l'occurrence des protéines sériques).

Pour chacune des fonctions Z des tableaux 4, 6, 10 et 12 :

20

- la valeur de l'aire sous la courbe ROC (AUC),
- un exemple de seuil décisionnel PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ), et les valeurs de sensibilité (Se, en %), spécificité (Spe, en %), valeurs prédictives négatives (VPN, en %) et valeurs prédictives positives (VPP, en %) associées,

25

sont présentés en tableaux 5, 7, 11 et 13 respectivement.

$VPN = VN / (VN + FN)$  avec VN = Vrais Négatifs et FN = Faux Négatifs ;

$VPP = VP / (VP + FP)$  avec VP = les Vrais Positifs et FP = Faux Positifs.

30

Par exemple, dans le cadre d'une détection F2 versus F1, la VPN représente la probabilité pour le sujet testé soit F1 sachant que le test est négatif (résultat donné par le test = score F1) ; et la VPP représente la probabilité pour que le sujet testé soit F2 sachant que le test est positif (résultat donné par le test = score F2).

**Tableau 3 : vingt-neuf exemples de combinaisons de niveaux d'expression de gènes**

n° de la combinaison	Gènes choisis							
	A2M	CHI3L1	IL6ST	IL8	MMP2	SPP1	VIM	SPP1
1	A2M	CHI3L1	IL6ST	IL8	MMP2	SPP1	VIM	SPP1
2	A2M	ANGPT2	IL6ST	IL8	MMP2	SPP1	VIM	SPP1
3	A2M	IL6ST	IL8	MMP2	SPP1	VIM	SPP1	SPP1
4	A2M	CXCL10	IL8	SPP1	VIM	SPP1	SPP1	SPP1
5	A2M	IL6ST	IL8	MMP9	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
6	A2M	IL6ST	IL8	MMP1	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
7	A2M	ENG	IL8	SPP1	VIM	SPP1	VIM	VIM
8	A2M	CXCL10	IL6ST	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
9	A2M	CXCL1	IL6ST	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
10	A2M	IL8	SPP1	VIM	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
11	A2M	COL1A1	IL6ST	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
12	A2M	CXCL11	IL6ST	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
13	A2M	CXCL10	ENG	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
14	A2M	IL6ST	IL8	SPP1	TIMP1	SPP1	SPP1	SPP1
15	A2M	IHH	IL6ST	IL8	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
16	A2M	CXCL10	IL8	S100A4	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1
17	A2M	IL6ST	IL8	MMP7	SPP1	SPP1	SPP1	SPP1

**Tableau 3 (suite et fin) : vingt-neuf exemples de combinaisons de niveaux d'expression de gènes**

n° de la combinaison	Gènes choisis									
	A2M	CXCL11	ENG	IL8	SPP1	A2M	CXCL10	ENG	IL8	SPP1
18	A2M	CXCL11	ENG	IL8	SPP1					
19	A2M	ENG	MMP9	SPP1						
20	A2M	CXCL10	ENG	SPP1						
21	A2M	p14ARF	CXCL10	MMP9	SPP1					
22	A2M	CXCL6	IL6ST	IL8	SPP1					
23	A2M	IL8	S100A4	SPP1						
24	A2M	ANGPT2	IL8	MMP7	SPP1					
25	A2M	p14ARF	CXCL10	IL8	SPP1					
26	A2M	IL8	SPP1	TIMP1						
27	A2M	p14ARF	IL8	SPP1						
28	A2M	CXCL10	IL8	IRF9	SPP1					
29	IL8	MMP2	SPP1	VIM						

**Tableau 4 : exemples de modèles de classification (en l'occurrence, modèles mROC) combinant des niveaux de transcription (transcrits ARN, en l'occurrence ARN contenus dans un prélèvement de tissu ou cellules hépatiques)**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Fonction Z combinant les niveaux de transcription (ARN) des gènes choisis	nom de la fonction
1	$Z = 0,400 \times A2M^t + 0,003 (-CH3L1) + 0,363 \times (-IL6ST)^t + 0,015 \times IL8 + 0,438 \times SPP1^t$	Z1ARN
2	$Z = 0,404 \times A2M^t + 0,062 \times ANGPT2 + 0,414 \times (-IL6ST)^t + 0,015 \times IL8 + 0,316 \times SPP1^t$	Z2ARN
3	$Z = 0,392 \times A2M^t + 0,396 \times (-IL6ST)^t + 0,021 \times IL8 + 0,104 \times MMP2^t + 0,271 \times SPP1^t$	Z3ARN
4	$Z = 0,297 \times A2M^t - 0,046 \times CXCL10 + 0,020 \times IL8 + 0,274 \times SPP1^t + 0,253 \times VIM^t$	Z4ARN
5	$Z = 0,407 \times A2M^t + 0,406 \times (-IL6ST)^t + 0,013 \times IL8 + 0,038 \times MMP9 + 0,309 \times SPP1^t$	Z5ARN
6	$Z = 0,406 \times A2M^t + 0,389 \times (-IL6ST)^t + 0,021 \times IL8 + 0,195 \times (-MMP1) + 0,332 \times SPP1^t$	Z6ARN
7	$Z = 0,230 \times A2M^t + 0,204 \times ENG^t + 0,012 \times IL8 + 0,262 \times SPP1^t + 0,177 \times VIM^t$	Z7ARN
8	$Z = 0,414 \times A2M^t - 0,013 \times CXCL10 + 0,373 \times (-IL6ST)^t + 0,023 \times IL8 + 0,335 \times SPP1^t$	Z8ARN
9	$Z = 0,401 \times A2M^t + 0,062 \times CXCL1 + 0,392 \times (-IL6ST)^t + 0,019 \times IL8 + 0,305 \times SPP1^t$	Z9ARN
10	$Z = 0,259 \times A2M^t + 0,012 \times IL8 + 0,267 \times SPP1^t + 0,227 \times VIM^t$	Z10ARN
11	$Z = 0,427 \times A2M^t - 0,137 \times COL1A1^t + 0,369 \times (-IL6ST)^t + 0,020 \times IL8 + 0,397 \times SPP1^t$	Z11ARN
12	$Z = 0,397 \times A2M^t + 0,033 \times CXCL11^t + 401 \times (-IL6ST)^t + 0,020 \times IL8 + 0,321 \times SPP1^t$	Z12ARN
13	$Z = 0,238 \times A2M^t - 0,050 \times CXCL10 + 0,531 \times ENG^t + 0,023 \times IL8 + 0,320 \times SPP1^t$	Z13ARN
14	$Z = 0,373 \times A2M^t + 0,389 \times (-IL6ST)^t + 0,020 \times IL8 + 0,309 \times SPP1^t + 0,105 \times TIMP1^t$	Z14ARN

**Tableau 4 (suite et fin) : exemples de modèles de classification (en l'occurrence, modèles mROC) combinant des niveaux de transcription (transcrits ARN, en l'occurrence ARN contenus dans un prélèvement de tissu ou cellules hépatiques)**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Fonction Z combinant les niveaux de transcription (ARN) des gènes choisis	nom de la fonction
15	$Z = 0,412 \times A2M^t + 0,001 \times IHH + 0,413 \times (-IL6ST)^t + 0,027 \times IL8 + 0,327 \times SPP1^t$	Z15ARN
16	$Z = 0,360 \times A2M^t - 0,047 \times CXCL10 + 0,025 \times IL8 + 0,332 \times S100A4 + 0,272 \times SPP1^t$	Z16ARN
17	$Z = 0,399 \times A2M^t + 0,406 \times (-IL6ST)^t + 0,017 \times IL8 + 0,540 \times MMP7 + 0,328 \times SPP1^t$	Z17ARN
18	$Z = 0,242 \times A2M^t - 0,094 \times CXCL11^t + 0,477 \times ENG^t + 0,016 \times IL8 + 0,323 \times SPP1^t$	Z18ARN
19	$Z = 0,221 \times A2M^t + 0,371 \times ENG^t + 0,028 \times MMP9 + 0,316 \times SPP1^t$	Z19ARN
20	$Z = 0,239 \times A2M^t - 0,029 \times CXCL10 + 0,489 \times ENG^t + 0,333 \times SPP1^t$	Z20ARN
21	$Z = 0,303 \times A2M^t + 2,807 \times p14ARF^t - 0,033 \times CXCL10 + 0,040 \times MMP9 + 0,359 \times SPP1^t$	Z21ARN
22	$Z = 0,406 \times A2M^t - 0,001 \times CXCL6 + 0,384 \times (-IL6ST)^t + 0,021 \times IL8 + 0,298 \times SPP1^t$	Z22ARN
23	$Z = 0,313 \times A2M^t + 0,016 \times IL8 + 0,280 \times S100A4 + 0,272 \times SPP1^t$	Z23ARN
24	$Z = 0,291 \times A2M^t + 0,072 \times ANGPT2 + 0,014 \times IL8 - 0,822 \times MMP7 + 0,361 \times SPP1^t$	Z24ARN
25	$Z = 0,305 \times A2M^t + 3,153 \times p14ARF - 0,038 \times CXCL10 + 0,020 \times IL8 + 0,368 \times SPP1^t$	Z25ARN
26	$Z = 0,256 \times A2M^t + 0,013 \times IL8 + 0,360 \times SPP1^t + 0,084 \times TIMP1^t$	Z26ARN
27	$Z = 0,274 \times A2M^t + 2,545 \times p14ARF + 0,013 \times IL8 + 0,357 \times SPP1^t$	Z27ARN
28	$Z = 0,298 \times A2M^t - 0,035 \times CXCL10 + 0,020 \times IL8 + 0,079 \times IRF9^t + 0,375 \times SPP1^t$	Z28ARN
29	$Z = 0,015 \times IL8 - 0,047 \times MMP2^t + 0,340 \times SPP1^t + 0,297 \times VIM^t$	Z29ARN

**Tableau 5 : AUC des fonctions Z du tableau 4, exemple de seuil PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ) pour ces fonctions, et valeurs de Se, Spe, VPN, VPP associées**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Nom de la fonction (cf. tableau 4 ci-dessus)	AUC	AUC limite inférieure	AUC limite supérieure	Seuil choisi ( $\delta$ )	Se	Spe	VPN	VPP
1	Z1ARN	0,8	0,72	0,862	0,561	75	72	84	60
2	Z2ARN	0,79	0,708	0,854	0,999	70	73	81	59
3	Z3ARN	0,788	0,706	0,853	0,68	70	74	81	60
4	Z4ARN	0,787	0,705	0,852	-0,764	75	70	83	58
5	Z5ARN	0,787	0,704	0,851	0,941	70	72	81	58
6	Z6ARN	0,787	0,705	0,851	0,79	70	70	80	56
7	Z7ARN	0,786	0,703	0,851	-0,605	75	70	83	57
8	Z8ARN	0,786	0,73	0,85	0,753	70	70	80	55
9	Z9ARN	0,786	0,703	0,85	0,874	71	70	81	56
10	Z10ARN	0,785	0,701	0,851	-0,699	73	70	83	57
11	Z11ARN	0,785	0,701	0,85	0,82	71	70	81	56
12	Z12ARN	0,785	0,702	0,85	0,797	70	73	81	59
13	Z13ARN	0,784	0,702	0,848	-0,301	75	70	83	57
14	Z14ARN	0,784	0,701	0,849	0,649	71	72	82	58
15	Z15ARN	0,784	0,702	0,849	0,88	70	70	80	55

**Tableau 5 (suite et fin) : AUC des fonctions Z du tableau 4, exemple de seuil PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ) pour ces fonctions, et valeurs de Se, Spe, VPn, VPP associées**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Nom de la fonction (cf. tableau 4 ci-dessus)	AUC	AUC limite inférieure	AUC limite supérieure	Seuil choisi ( $\delta$ )	Se	Spe	VPn	VPP
16	Z16ARN	0,783	0,7	0,848	0,321	70	75	81	60
17	Z17ARN	0,783	0,701	0,848	0,838	70	70	80	56
18	Z18ARN	0,781	0,698	0,846	-0,066	71	70	81	56
19	Z19ARN	0,779	0,694	0,845	-0,222	73	70	83	57
20	Z20ARN	0,779	0,695	0,845	-0,327	71	70	81	57
21	Z21ARN	0,778	0,692	0,845	-0,162	73	70	83	57
22	Z22ARN	0,786	0,703	0,851	0,778	71	70	81	56
23	Z23ARN	0,777	0,692	0,844	0,236	73	70	83	57
24	Z24ARN	0,775	0,689	0,842	-0,133	71	70	81	56
25	Z25ARN	0,775	0,691	0,842	-0,181	70	70	80	55
26	Z26ARN	0,773	0,688	0,841	-0,354	71	70	81	57
27	Z27ARN	0,771	0,685	0,839	-0,132	71	71	82	58
28	Z28ARN	0,771	0,685	0,838	-0,39	70	70	81	56
29	Z29ARN	0,759	0,671	0,829	-1,202	71	70	81	56

**Tableau 6 : exemples de modèles de classification (en l'occurrence, modèles mROC) combinant des niveaux de traduction (protéines, en l'occurrence protéines sériques)**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Fonction Z combinant les niveaux de traduction (protéine sérique) des gènes choisis	Nom de la fonction
16	$Z = 0,241 \times A2M^t + 0,137 \times CXCL10^t + 0,001 \times IL8^t + 0,062 \times SPP1^t + 0,226 \times SI00A4^t$	Z16prot

**Tableau 7 : AUC de la fonction Z du tableau 6, exemple de seuil PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ) pour cette fonction, et valeurs de Se, Spe, VPP, VPN, VPP associées (cf. exemple 3a) ci-dessous)**

n° de combinaison de gènes (cf. tableau 3 ci-dessus)	Nom de la fonction (cf. tableau 6 ci-dessus)	AUC	AUC limite inférieure	AUC limite supérieure	Seuil choisi ( $\delta$ )	Se	Spe	VPN	VPP
16	Z16PROT	0,694	0,612	0,765	2,905	68	67	81	50

Dans le tableau 4 ci-dessus, les échantillons des individus ayant permis de construire le modèle de classification (fonction Z) étaient des prélèvements de tissu ou cellules hépatiques, et c'est le niveau de transcription ARN des gènes choisis qui a été mesuré. Les valeurs de dosage sont donc celles obtenues sur des échantillons contenant des ARN d'un échantillon biologique susceptible d'être obtenu par PBH ou par cyto-ponction hépatique (par exemple, par extraction des ARN de cet échantillon biologique).

Dans le tableau 4 ci-dessus, le nom de chacun des gènes indiqués à titre de variables dans une fonction Z (par exemple, pour la fonction Z de la combinaison n°1 : A2M, CHI3L1, IL6ST, IL8 et SPP1) symbolise la valeur de dosage d'un produit de transcription (ARN) de ce gène, c'est-à-dire la quantité d'ARN du gène concerné rapportée à la quantité totale d'ARN initialement contenue dans l'échantillon, plus particulièrement la valeur de Ct qui a été mesurée pour les transcrits de ce gène et qui a été normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ . Si l'on utilise le symbole BMQ (biomarqueur) pour désigner de manière générique chacune de ces variables, on peut alors considérer que  $BMQ =$  la valeur obtenue pour l'ARN de ce gène par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$  (*cf.* exemple 1 ci-dessous).

Dans le tableau 6 ci-dessus, les échantillons des individus ayant permis de construire le modèle de classification (fonction Z) étaient des prélèvements sanguins, et c'est le niveau de traduction (protéine) des gènes choisis qui a été mesuré. Les valeurs de dosage sont donc celles obtenues sur des échantillons contenant des protéines d'un échantillon biologique susceptible d'être obtenu par prélèvement sanguin (par exemple, par séparation et récolte de la fraction sérique de ce prélèvement sanguin).

Dans le tableau 6 ci-dessus, le nom de chacun des gènes indiqués à titre de variables dans une fonction Z (pour la fonction Z de la combinaison n°16 : A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4) symbolise la valeur de dosage du produit de traduction de ce gène (produit protéique), c'est-à-dire la concentration en ce produit de traduction, plus particulièrement, la concentration de la protéine codée par ce gène mesurée dans un fluide biologique du patient, tel que le sérum. Si l'on utilise le symbole BMQ (biomarqueur) pour désigner de manière générique chacune de ces variables, on peut alors considérer que  $BMQ =$  la concentration obtenue pour le produit de transcription de ce gène (*cf.* exemple 3 ci-dessous).

Dans les tableaux 4 et 6 ci-dessus, l'exposant  $t$  associé à une valeur BMQ (« BMQ<sup>t</sup> ») indique une transformation Box-Cox ( $\text{BMQ}^t = (\text{BMQ}^\lambda - 1)/\lambda$ ) ; cf. Box et Cox, 1964.

Le tableau 8 ci-dessous indique une liste des gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser les valeurs de dosage de niveaux de transcription (ARN) mesurées (en l'occurrence, A2M, ENG, SPP1, VIM, IRF9, CXCL11, TIMP1, MMP2, IL6ST, TIMP1, COL1A1, MMP1), par exemple par une normalisation Box-Cox, et présente un exemple de valeur de paramètre Box-Cox ( $\lambda$ ) utilisable dans les fonctions Z indiquées au tableau 4 ci-dessus.

10

**Tableau 8 :** liste des gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser les valeurs de dosage mesurées (notamment, les dosages des niveaux de transcription ARN, plus particulièrement lorsque ces ARN sont susceptibles d'être issus d'un prélèvement de tissu ou cellules hépatiques), par exemple par une normalisation Box-Cox, et exemple de valeurs de paramètre Box-Cox ( $\lambda$ ) utilisables dans les fonctions Z indiquées au tableau 4 ci-dessus.

15

Gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser la valeur du niveau de transcription (ARN)	Exemple de valeur de paramètre Box-Cox ( $\lambda$ ) utilisable pour les fonctions Z du tableau 4 ci-dessus
A2M	0,33
ENG	0,08
SPP1	0,12
VIM	-0,23
IRF9	0,17
CXCL11	0,06
TIMP1	0,02
MMP2	-0,03
IL6ST	0
TIMP1	0,02
COL1A1	0,24
MMP1	0,02

Le tableau 9 ci-dessous indique une liste des gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser les valeurs de dosage de niveaux de traduction (protéine) mesurées (en l'occurrence, A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4), par exemple par une normalisation

20

Box-Cox, et présente un exemple de valeur de paramètre Box-Cox ( $\lambda$ ) utilisable dans les fonctions Z indiquées au tableau 6 ci-dessus.

**Tableau 9 :** liste des gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser les valeurs de dosage mesurées (notamment, les dosages des niveaux de traduction protéique, plus particulièrement lorsque ces protéines sont susceptibles d'être issus d'un prélèvement de sang, sérum ou plasma), par exemple par une normalisation Box-Cox, et exemple de valeurs de paramètre Box-Cox ( $\lambda$ ) utilisables dans les fonctions Z indiquées au tableau 6 ci-dessus.

10

<b>Gènes, pour lesquels il est conseillé de normaliser la valeur du niveau de traduction (protéine)</b>	<b>Exemple de valeur de paramètre Box-Cox (<math>\lambda</math>) utilisables pour les fonctions Z du tableau 6 ci-dessus</b>
A2M	0,46
CXCL10	0,08
IL8	0,05
SPP1	0,43
S100A4	-0,15

En sus des niveaux d'expression desdits gènes choisis, les moyens de l'invention peuvent en outre comprendre la combinaison d'un ou plusieurs facteurs autres que les niveaux d'expression desdits gènes choisis, tels que :

- 15 - un ou plusieurs facteurs cliniques, tels que :
- sexe (féminin F ou masculin M),
  - âge à la date du prélèvement (Age), par exemple, âge à la date de la PBH, âge à la date de la cytoponction hépatique, âge à la date du prélèvement de sang, de sérum, de plasma ou d'urine),
  - 20 ○ âge du patient à la date de la contamination,
  - indice de masse corporelle (IMC),
  - indice de sensibilité à l'insuline (HOMA),
  - diabète,
  - consommation d'alcool,
  - 25 ○ degré de stéatose,

- mode de contamination,
- activité Metavir ;

et/ou

- un ou plusieurs facteurs virologiques, tels que :

- 5 ○ génotype viral,
- durée de l'infection,
- charge virale mesurée chez le patient à la date du début du traitement (charge virale à J0),
- charge virale mesurée chez le patient à la date du prélèvement ;

10 et/ou

- un ou plusieurs facteurs biologiques autres que les niveaux d'expression desdits gènes choisis, qui peuvent notamment être choisis parmi des concentrations, teneurs ou taux en protéines intracorporelles, des concentrations, teneurs ou taux en métabolites intracorporels, des concentrations, teneurs ou taux en éléments figurés du sang, des
- 15 mesures représentatives de la quantité de fer circulant, de tels que :

- concentration en haptoglobine (Hapto),
- concentration en apolipoprotéine A1 (ApoA1),
- teneur en bilirubine totale (BLT),
- concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT),
- 20 ○ concentration en aspartate aminotransférase (AST),
- concentration en alanine aminotransférase (ALT),
- teneur en plaquettes (PLQ),
- taux de prothrombine (TP),
- teneur en cholestérol HDL (Chol-HDL),
- 25 ○ teneur en cholestérol total,
- concentration en ferritine (Ferritine),
- teneur glycémique (glycémie),
- concentration en peptide C,
- teneur en insuline (insulinémie),
- 30 ○ concentration en triglycérides (TG),
- teneur en albumine,
- coefficient de saturation en fer de la transferrine (CS),
- concentration en phosphatase alcaline (PAL).

Cet ou ces autres facteurs peuvent être mesurés sur un échantillon de nature différente de celui utilisé pour mesurer les niveaux d'expression desdits gènes choisis. Par exemple, l'échantillon biologique pour la mesure des niveaux d'expression desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention peut être un échantillon de PBH ou de cyto-ponction hépatique, et l'échantillon biologique pour la mesure des valeurs desdits autres facteurs peut être un échantillon de fluide biologique, tel que sang, plasma ou sérum ou urine. De même, la nature du niveau d'expression mesuré peut être différente ; par exemple, pour la mesure du niveau d'expression desdits gènes choisis, on peut mesurer les niveaux de leur transcription en ARN, alors que, pour ceux desdits autres facteurs qui sont des facteurs biologiques, le niveau d'expression mesuré sera généralement une concentration protéique.

Avantageusement, cet ou ces autres facteurs sont ou comprennent un ou plusieurs facteurs parmi :

- 15 - les facteurs cliniques suivants :
  - sexe (féminin F ou masculin M),
  - âge à la date du prélèvement,
  - indice de masse corporelle (IMC),
  - indice de sensibilité à l'insuline (HOMA),
  - 20 ○ diabète,
  - consommation d'alcool,
  - degré de stéatose ;

et/ou

- les facteurs virologiques suivants :
  - 25 ○ génotype viral,
  - durée de l'infection ;

et/ou

- les facteurs biologiques suivants :
  - concentration en haptoglobine (Hapto),
  - 30 ○ concentration en apolipoprotéine A1 (ApoA1),
  - teneur en bilirubine totale (BLT),
  - concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT),
  - concentration en aspartate aminotransférase (AST),
  - concentration en alanine aminotransférase (ALT),

- teneur en plaquettes (PLQ),
- taux de prothrombine (TP),
- teneur en cholestérol total,
- teneur en cholestérol HDL (Chol-HDL),
- 5 ○ concentration en ferritine (Ferritine),
- teneur glycémique (glycémie),
- concentration en peptide C,
- concentration en triglycérides (TG).

10 Le dosage de certains de ces facteurs pourrait parfois être considéré comme le dosage du niveau de traduction (mesure de la concentration protéique) d'un gène autre qu'un gène choisi conformément à l'invention (par exemple ALT).

Le nombre de gènes dont le niveau d'expression est dosé, et qui ne sont pas des gènes choisis conformément à la demande (par exemple gène codant ALT), est de préférence au  
 15 maximum de 18, plus particulièrement de 14 ou moins, plus particulièrement de 11 ou moins, plus particulièrement de 6 ou moins, plus particulièrement de 4 ou 3 ou 2, plus particulièrement de 1 ou 0.

Avantageusement, cet ou ces autres facteurs sont ou comprennent un ou plusieurs facteurs  
 20 biologiques, notamment un ou plusieurs facteurs parmi les facteurs biologiques suivants :

- concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT),
- concentration en alanine aminotransférase (ALT),
- concentration en ferritine (Ferritine),
- concentration en triglycérides (TG),
- 25 plus particulièrement, un ou plusieurs facteurs parmi les facteurs biologiques suivants :
  - concentration en alanine aminotransférase (ALT),
  - concentration en triglycérides (TG).

Alternativement ou complémentairement, ce ou ces facteurs peuvent plus particulièrement être ou comprendre le facteur clinique âge à la date du prélèvement (Age).

30 Les exemples 2c), 2d) et 3b) ci-dessus donnent une illustration de telles combinaisons.

Les exemples 2c), 2d) et 3b) ci-dessus donnent également des exemples de modèle de classification multivariée (en l'occurrence, des modèles mROC) pour des combinaisons faisant intervenir :

- les niveaux d'expression (dosage des ARN ou des protéines) de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, ainsi que
- des facteurs biologiques autres que le niveau d'expression de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (en l'occurrence, plusieurs facteurs parmi concentration en triglycérides (TG), concentration en alanine aminotransférase (ALT), concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT), concentration en ferritine), et,
- éventuellement, un facteur clinique (en l'occurrence, le facteur clinique âge à la date du prélèvement).

10

Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention sont, ou comprennent A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus), et la combinaison de la valeur de leurs niveaux respectifs d'expression (dosage des ARN ou des protéines, notamment des ARN hépatiques ou des protéines sériques) est en outre combinée à au moins un ou plusieurs facteurs biologiques autres que les niveaux d'expression de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, notamment à au moins un ou plusieurs facteurs biologiques parmi :

- concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT),
- concentration en alanine aminotransférase (ALT),
- concentration en triglycérides (TG),
- optionnellement, concentration en ferritine (Ferritine),

plus particulièrement à au moins un ou plusieurs de ces facteurs biologiques et en outre un ou plusieurs facteurs cliniques (tel que âge à la date du prélèvement).

25 Les exemples 2c) et 3b) ci-dessous donnent une illustration de telles combinaisons.

Selon un mode de réalisation de l'invention, lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention sont, ou comprennent A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et VIM (combinaison n°4 dans le tableau 3 ci-dessus), et la combinaison de la valeur de leurs niveaux respectifs d'expression (plus particulièrement, dosage des ARN, notamment des ARN hépatiques) est en outre combinée à au moins un ou plusieurs facteurs biologiques autres que le niveaux d'expression de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, notamment à au moins un ou plusieurs facteurs biologiques parmi :

- concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT),

- concentration en alanine aminotransférase (ALT),
- concentration en triglycérides (TG),
- concentration en ferritine (Ferritine).

L'exemple 2d) ci-dessous donne une illustration de telles combinaisons.

5

Des exemples de modèles de classification multivariée pour de telles combinaisons comprennent les fonctions linéaires  $Z$  (modèles mROC) présentées dans les tableaux 10 et 12 suivants (*cf.* également, exemples 2c), 3b) et 2d) ci-dessous).

Dans le tableau 10 ci-dessous, les échantillons des individus ayant permis de construire le modèle de classification (fonction  $Z$ ) étaient des prélèvements de tissu ou cellules hépatiques, et c'est le niveau de transcription ARN des gènes choisis qui a été mesuré. Comme pour le tableau 4 ci-dessus, le nom de chacun des gènes indiqués à titre de variables dans une fonction  $Z$  (par exemple, pour la fonction  $Z$  de la combinaison n°16 : A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4) symbolise la valeur de dosage d'un produit de transcription (ARN) de ce gène, c'est-à-dire la quantité d'ARN du gène concerné rapportée à la quantité totale d'ARN initialement contenue dans l'échantillon, plus particulièrement la valeur de Ct qui a été mesurée pour les transcrits de ce gène et qui a été normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ .

Dans le tableau 12 ci-dessous, les échantillons des individus ayant permis de construire le modèle de classification (fonction  $Z$ ) étaient des prélèvements sanguins, et c'est le niveau de traduction (protéine) des gènes choisis qui a été mesuré. Comme pour le tableau 6 ci-dessus, le nom de chacun des gènes indiqués à titre de variables dans une fonction  $Z$  (pour la fonction  $Z$  de la combinaison n°16 : A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4) symbolise la valeur de dosage du produit de traduction de ce gène (produit protéique), c'est-à-dire la concentration en ce produit de traduction, plus particulièrement, la concentration de la protéine codée par ce gène mesurée dans un fluide biologique du patient, tel que le sérum. Les tableaux 11 et 13 suivants présentent des exemples de valeurs de paramètres lambda des transformées Box-Cox utilisables pour les fonctions  $Z$  des tableaux 10 et 12, donnent l'AUC de ces fonctions  $Z$ , et indiquent un exemple de valeur seuil PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden,  $\delta$ ), ainsi que les valeurs de Se, Sp, VPN et VPP associées.

Ainsi, selon un mode de réalisation de l'invention,

- les gènes choisis à l'étape i) sont les gènes de l'une desdites combinaisons n°1 à n°29, par exemple les gènes de la combinaison n°16 ou n°4,
  - à l'étape i), on dose le niveau auquel chacun de ces gènes choisis sont transcrits ou traduits,
- 5 - on détermine la valeur de plusieurs autres facteurs autres que le niveaux d'expression de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, parmi lesquels au moins les facteurs suivants :
- concentration en alanine aminotransférase (ALT),
  - concentration en triglycérides (TG),
- 10 - optionnellement, concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT) et/ou concentration en ferritine (Ferritine) et/ou âge à la date du prélèvement,
- les valeurs des autres facteurs ainsi déterminées et les valeurs de dosage obtenues à l'étape i) étant alors combinées ensemble à l'étape ii) pour être comparées à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans lesdites cohortes de référence.

**Tableau 10 : combinaison de gènes choisie conforme à l'invention (dosage de leurs niveaux de transcription en ARN), combinée en outre à d'autres facteurs**

Gènes choisis et nature du niveau d'expression mesuré pour ces gènes	Autres facteurs	Exemple de modèle de classification multivariée (modèle mROC)	Nom de la fonction
<b>combinaison n°16</b> du tableau 3 ci-dessus	<b>ARN (&amp;)</b>  <b>Age</b> <b>GGT</b> (protéine) <b>ALT</b> (protéine) <b>TG</b> (protéine) <b>Ferritine</b> (protéine)	$Z = 0,272 \times A2M^t - 0,032 \times CXCL10 + 0,058 \times IL8 + 0,419 \times SPP1^t + 0,012 \times S100A4^t + 0,025 \times Age^t + 0,566 \times TG^t + 3,874 \times ALT^t - 0,039 \times Ferritine^t$	<b>Z16ARNsupp</b>
<b>combinaison n°4</b> du tableau 3 ci-dessus	<b>ARN (&amp;)</b>  <b>GGT</b> (protéine) <b>ALT</b> (protéine) <b>TG</b> (protéine) <b>Ferritine</b> (protéine)	$Z = 0,315 \times A2M^t - 0,043 \times CXCL10 + 0,058 \times IL8 + 0,383 \times SPP1^t + 0,064 \times VIM^t + 0,56 \times TG^t + 3,657 \times ALT^t + 0,188 \times GGT^t - 0,05 \times Ferritine^t$	<b>Z4ARNsupp</b>

(&) : plus particulièrement, ARN contenus dans un prélèvement de tissu ou cellules hépatiques

5 Age = âge à la date du prélèvement ;

GGT = concentration en gamma glutamyl transpeptidase dans le sérum ;

ALT = concentration en alanine aminotransférase dans le sérum ;

TG = concentration en triglycérides (TG) dans le sérum ;

Ferritine = concentration en ferritine dans le sérum.

**Tableau 11 : pour les fonctions du tableau 10, exemple de valeur de paramètre lambda, valeurs d'AUC, exemples de seuils PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ) pour ces fonctions, et valeurs de Se, Spe, VPN, VPP associées**

Nom de la fonction	Exemple de valeur du paramètre lambda (*)	AUC	AUC limite inférieure	AUC limite supérieure	Seuil ( $\delta$ )	Se	Spe	VPN	VPP
<b>Z16ARNsupp</b> (cf. tableau 10)	0,21 pour A2M	0,840	0,760	0,897	8,014	72	82	85	67
	0,04 pour SPP1								
	0,48 pour S100A4								
	0,79 pour Age								
	-0,22 pour TG								
	-0,41 pour ALT								
0,15 pour Ferritine									
<b>Z4ARNsupp</b> (cf. tableau 10)	0,21 pour A2M	0,841	0,764	0,896	7,016	80	71	88	59
	0,04 pour SPP1								
	-0,26 pour VIM								
	-0,22 pour TG								
	-0,41 pour ALT								
	-0,12 pour GGT								
0,15 pour Ferritine									

5 (\*) paramètre lambda des transformations Box-Cox [ $BMQ^{\lambda} = (BMQ^{\lambda} - 1)/\lambda$ ]

**Tableau 12 : combinaison de gènes choisis conforme à l'invention (dosage de leurs niveaux de traduction en protéines), combinée en outre à d'autres facteurs**

Gènes choisis et nature du niveau d'expression mesuré pour ces gènes	Autres facteurs	Exemple de modèle de classification multivariée (modèle mROC)	Nom de la fonction
<b>combinaison n°16</b> du tableau 3 ci-dessus	<b>Age</b> <b>GGT</b> (protéine) <b>ALT</b> (protéine) <b>TG</b> (protéine)	$Z = 0,2 \times A2M^{\dagger} + 0,05 \times CXCL10^{\dagger} - 0,026 \times IL8^{\dagger} + 0,051 \times SPP1^{\dagger} + 0,204 \times S100A4^{\dagger} + 0,020 \times Age^{\dagger} + 0,266 \times TG^{\dagger} + 3,354 \times ALT^{\dagger} + 0,141 \times GGT^{\dagger}$	<b>Z16PROTsupp</b>

(§) : plus particulièrement, protéines contenues dans un prélèvement sanguin, en l'occurrence dans la partie sérique de ce prélèvement

5 Age = âge à la date du prélèvement ;

GGT = concentration en gamma glutamyl transpeptidase dans le sérum ;

ALT = concentration en alanine aminotransférase dans le sérum ;

TG = concentration en triglycérides (TG) dans le sérum ;

Ferritine = concentration en ferritine dans le sérum.

**Tableau 13 : pour la fonction du tableau 12, exemple de paramètres lambda, valeur d'AUC, exemple de seuil PT (en l'occurrence, seuil maximisant l'indice de Youden  $\delta$ ) pour cette fonction, et valeurs de Se, Spe, VPN, VPP associées**

Nom de la fonction	Exemple de valeur du paramètre lambda (*)	AUC	AUC limite inférieure	AUC limite supérieure	Seuil ( $\delta$ )	Se	Spe	VPN	VPP
<b>Z16PROTsupp</b> (cf. tableau 12)	0,46 pour A2M 0,08 pour CXCL10 0,05 pour IL8 0,43 pour SPP1 -0,15 pour S100A4 0,9 pour Age -0,27 pour TG -0,13 pour GGT -0,47 pour ALT	0,743	0,666	0,809	8,792	67	72	83	52

5 (\*) paramètre lambda des transformations Box-Cox [ $BMQ^l = (BMQ^{\lambda} - 1)/\lambda$ ]

Le facteur « activité Metavir » est une évaluation semi-quantitative de l'activité de l'hépatite tenant compte de la nécrose parcellaire et de la nécrose lobulaire, par exemple suivant la méthode décrite dans Bedossa *et al.* 1996, dont le résultat est un score de 0 à 3 :

A0 : sans activité,

5 A1 : activité minimale,

A2 : activité modérée,

A3 : activité sévère.

Le facteur « stéatose » est une évaluation semi-quantitative du pourcentage d'hépatocytes contenant des vacuoles de stéatose lors de la lecture de la biopsie en anatomo-pathologie, par exemple selon le système de scores suivants :

Grade 0 : <1% des hépatocytes atteints,

Grade 1 : 1-33% des hépatocytes atteints,

Grade 2 : 33-66% des hépatocytes atteints,

Grade 3 : > 66% des hépatocytes atteints.

15 Cet ou ces autres facteurs peuvent être associés, à titre de co-variables, à la combinaison de niveaux d'expression desdits gènes choisis. Les valeurs de ces facteurs et niveaux d'expression peuvent par exemple être combinées dans un modèle de classification multivariée combinant à la fois les paramètres relatifs aux niveaux d'expression desdits gènes choisis et les paramètres relatifs à ce ou ces facteurs (*cf.* exemples 2c) ; 2d) et 3b) 20 ci-dessous).

Selon un aspect complémentaire de l'invention, la demande est relative à des produits ou réactifs pour la détection et/ou la détermination et/ou le dosage des niveaux d'expression desdits gènes choisis, et à des articles manufacturés, des compositions, des compositions pharmaceutiques, des kits, des tubes, des supports solides comprenant de tels réactifs, 25 ainsi qu'à des systèmes informatiques (notamment, produit programme d'ordinateur et dispositif informatique), qui sont spécialement adaptés à la mise en œuvre d'une méthode de l'invention.

30 La demande est notamment relative à un **réactif** qui détecte de manière spécifique un produit de transcription (ARN) d'un desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, ou un produit de traduction d'un desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (protéine, ou forme post-traductionnelle de cette protéine, telle que fragment spécifique de cette protéine).

La demande est notamment relative à des réactifs qui détectent de manière spécifique chacun des produits de transcription (ARN) desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, ou chacun des produits de traduction desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (protéine, ou forme post-  
5 traductionnelle de cette protéine, telle que fragment spécifique de cette protéine).

Avantageusement, un ensemble de tels réactifs est formé, qui détecte chacun desdits produits de transcription desdits gènes choisis et/ou qui détecte chacun desdits produits de traduction desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, c'est-à-dire un ensemble de réactifs qui détecte de manière spécifique au moins un produit  
10 d'expression pour chacun de ces gènes.

De préférence, lesdits réactifs non seulement détectent spécifiquement un produit de transcription ou traduction, mais permettent également de le quantifier.

La demande est notamment relative à un **article manufacturé** comprenant lesdits réactifs  
15 comme produit de combinaison (ou sous forme combinée, ou en préparation combinée), notamment pour leur utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps. Cet article manufacturé peut par exemple se présenter sous forme d'un ensemble de réactifs, ou d'un kit.

Bien entendu les caractéristiques de combinaisons de gènes choisies décrites ci-dessus, ainsi que celles illustrées ci-dessus, s'appliquent aux réactifs de l'invention *mutatis*  
20 *mutandis*.

Lesdits réactifs peuvent par exemple s'hybrider de manière spécifique à l'ARN desdits gènes choisis et/ou à l'ADNc correspondant à ces ARN (en conditions au moins stringentes d'hybridation), ou se lier de manière spécifique aux protéines codées par  
25 lesdits gènes choisis (ou à des fragments spécifiques de ces protéines), par exemple selon une réaction de type antigène-anticorps.

Des conditions au moins stringentes d'hybridation sont connues de la personne du métier.

Il peut par exemple s'agir des conditions suivantes :

- pour une hybridation sur filtre : dans 5xSSC, 2% dodecyl sulfate de sodium (SDS),  
30 100 microgrammes/mL d'ADN simple-brin à 55-65°C pendant 8 heures, et lavage dans 0,2xSSC et 0,2% SDS à 60-65°C pendant trente minutes ;
- pour une hybridation par PCR : les conditions de PCR indiquées en exemple 1 ci-dessous.

Lesdits réactifs de l'invention peuvent notamment être :

- des acides nucléiques (ADN, ARN, ARNm, ADNc), y compris des aptamères oligonucléotidiques, optionnellement marqués pour permettre leur détection, notamment avec des marqueurs fluorescents bien connus de la personne du métier, ou
- 5 - des ligands de protéines, tels que des protéines, polypeptides ou peptides, par exemple des aptamères, et/ou des anticorps ou fragments d'anticorps.

Les acides nucléiques de l'invention peuvent par exemple être des amorces et/ou des sondes (*cf.* SEQ ID NO : 1 à 44 dans le tableau 17 ci-dessous), notamment des paires d'amorces (*cf.* les paires d'amorces indiquées dans le tableau 17 ci-dessous). Pour chacun desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, la personne du métier peut construire une paire d'amorces et/ou une sonde qui s'hybrident spécifiquement à ce gène. Un article manufacturé de l'invention peut donc comprendre le nombre d'amorces et/ou sondes nécessaire à la détection des ARN ou ADNc de chacun desdits gènes choisis.

La séquence des acides nucléiques de l'invention peut par exemple être constituée de 9 à 40 nucléotides, plus particulièrement de 10 à 30 nucléotides, plus particulièrement de 14 à 29 nucléotides, plus particulièrement de 19 à 24 nucléotides.

Les séquences des amorces d'une même paire peuvent par exemple être les séquences d'un fragment de la séquence d'un desdits gènes choisis et d'un fragment de sa séquence complémentaire (*cf.* tableau 2 indiquant les numéros d'accèsion de séquences de ces gènes). L'une et/ou l'autre de ces deux séquences d'amorces peuvent ne pas être strictement identiques à la séquence d'un fragment du gène ou de sa séquence complémentaire ; l'une et/ou l'autre de ces deux séquences d'amorces peuvent :

- 25 - en dériver par une ou plusieurs substitutions et/ou additions et/ou délétions nucléotidiques, plus particulièrement par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques, et/ou présenter une identité de séquence d'au moins 80%, ou d'au moins 85%, ou d'au moins 90%, ou d'au moins 95% avec la séquence de ce fragment ou de sa séquence complémentaire (identité calculée sur la plus longue des deux séquences alignées – alignement optimal),
- 30 - dans la mesure où la paire d'amorces en résultant a conservé la capacité à s'hybrider spécifiquement à un desdits gènes choisis.

Une paire d'amorces de l'invention présente avantageusement un delta Tm de 1°C environ ou moins. Selon un mode de réalisation de l'invention, une paire d'amorces de l'invention cible un amplicon de 70 à 120 pb environ (c'est-à-dire que l'amorce sens et l'amorce anti-sens s'hybrident à des positions telles sur l'acide nucléique cible, que l'amplicon produit par élongation de ces amorces hybridées a une longueur de 70 à 120 pb environ).

Des exemples de telles amorces et paires d'amorces sont présentées dans le tableau 17 ci-dessous (SEQ ID NO: 1 à 44, formant 22 paires d'amorces).

La séquence d'une sonde de l'invention, peut par exemple être :

- la séquence d'un fragment de la séquence d'un desdits gènes choisis (*cf.* tableau 2 indiquant les numéros d'accèsion de séquences de ces gènes), ledit fragment s'hybridant de manière spécifique à la séquence de ce gène ;
  - une séquence :
    - o qui dérive de la séquence d'un tel fragment par une ou plusieurs substitutions et/ou additions et/ou délétions nucléotidiques, plus particulièrement par une ou plusieurs substitutions nucléotidiques, et/ou une séquence qui présente une identité de séquence d'au moins 80%, ou d'au moins 85%, ou d'au moins 90%, ou d'au moins 95% avec la séquence de ce fragment ou de sa séquence complémentaire (identité calculée sur la plus longue des deux séquences alignées -alignement optimal-), mais
    - o qui a conservé la capacité à s'hybrider spécifiquement à un desdits gènes choisis ;
- et/ou
- une séquence complémentaire de telles séquences.

Une sonde de l'invention peut notamment être une sonde pour amplification en temps réel, destinée à être utilisée avec une paire d'amorces de l'invention. Alternativement, la détection en PCR en temps réel peut utiliser des molécules dites intercalantes (par exemple ; SYB green) qui ont la propriété de s'intercaler dans les structures doubles brins.

Les ligands de l'invention qui se lient de manière spécifique aux protéines codées par les gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (ou à des fragments spécifiques de ces protéines) peuvent être par exemple des protéines, polypeptides ou peptides, par exemple des aptamères, ou des anticorps ou fragments d'anticorps.

Pour chacun desdits gènes choisis, la personne du métier peut produire un tel ligand.

Des anticorps peuvent par exemple être produits par immunisation d'un mammifère non-humain (tel qu'un lapin) par une protéine codée par ledit gène choisi, ou par un fragment antigénique d'une telle protéine, éventuellement associée ou couplée à un adjuvant d'immunisation (tel qu'un adjuvant de Freund ou tel que KLH -*keyhole limpet*  
5 *hemocyanin*-), par exemple par injection intrapéritonéale ou sous-cutanée, et par collecte des anticorps ainsi obtenus dans le sérum dudit mammifère.

Des anticorps monoclonaux peuvent être produits selon une technique d'hybridation lymphocytaire (hybridomes) telle que la technique de Köhler and Milstein 1975 (*cf.* également US 4 376 110), la technique d'hybridomes à cellules B humaines (Kosbor *et al.*  
10 1983; Cole *et al.* 1983), ou la technique d'immortalisation des lymphocytes à l'aide du virus d'Epstein-Barr -EBV- (Cole *et al.* 1985). De tels anticorps peuvent par exemple être des IgG, IgM, IgE, IgA, IgD ou toute sous-classe de ces immunoglobulines.

Des anticorps modifiés par génie génétique peuvent être produits, tels que des anticorps recombinant, chimères, humanisés par greffage d'un ou plusieurs CDR -*Complementary*  
15 *Determining Region*-.

Les anticorps mis en œuvre dans l'invention peuvent être des fragments d'anticorps ou des dérivés artificiels de tels fragments, dans la mesure où ces fragments ou dérivés présentent ladite propriété de liaison spécifique. De tels fragments peuvent par exemple être des fragments Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fab/c, scFv (*single chain Fragment variable*).

20 Des exemples d'anticorps sont donnés dans le tableau 14 suivant.

**Tableau 14 : exemples d'anticorps spécifiques**

Gène codant	Anticorps	Exemple de fournisseur	Référence catalogue du produit
<b>A2M</b>	Anticorps polyclonal de chèvre anti-alpha 2 macroglobuline humaine, 100 µg	<b>R&amp;D systems</b> 77, boulevard Vauban 59041 Lille Cedex France	AF1938
<b>SPP1</b>	Anticorps polyclonal de chèvre anti-ostéopontine humaine, 100 µg	<b>R&amp;D systems</b>	AF1433
<b>VIM</b>	Anticorps polyclonal de lapin anti-vimentine, 1mL (0,2 mg/mL)	<b>Abcam</b> 24, rue Louis Blanc 75010 Paris ; France	ab15248-1
<b>p14ARF</b> transcrit n°4 du gène <b>CDKN2A</b>	Anticorps polyclonal de lapin anti-CDKN2A/p14ARF, 100 µL (1 mg/mL)	<b>Abcam</b>	ab53031-100
<b>CXCL10</b>	Anticorps polyclonal anti-CXCL10/IP-10 humain (IgG de chèvre)	<b>R&amp;D systems</b>	AB-266-PB
<b>CXCL11</b>	Anticorps monoclonal (clone 87328) anti-CXCL11/I-TAC humaine (IgG2A de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB672

**Tableau 14 (suite) : exemples d'anticorps spécifiques**

<b>Gène codant</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Exemple de fournisseur</b>	<b>Référence catalogue du produit</b>
<b>ENG</b>	Anticorps monoclonal anti-ENG produit chez la souris (clone 4C11)	<b>Sigma-Aldrich</b>	WH0002022M1
<b>IL8</b>	Anticorps monoclonal anti-IL8 produit chez la souris (clone 6G4)	<b>Sigma-Aldrich</b>	WH0003576M5
<b>IRF9</b>	Anticorps anti-facteur de transcription IRF9	<b>Abcam</b>	ab56677
<b>MMP2</b>	Anticorps anti-MMP2 [EP1329Y]	<b>Abcam</b>	ab51127
<b>MMP9</b>	Anticorps anti-MMP9	<b>Abcam</b>	ab7299
<b>S100A4</b>	Anticorps polyclonal de lapin anti-S100A4, 250 µL (0,72 mg/mL)	<b>Abcam</b>	ab27957-250
<b>TIMP1</b>	Anticorps anti-TIMP1	<b>Abcam</b>	ab77847
<b>ANGPT2</b>	Anticorps monoclonal anti-angiopoïétine 2 humaine (clone 180102), (IgG2B de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB0983

**Tableau 14 (suite et fin) : exemples d'anticorps spécifiques**

<b>Gène codant</b>	<b>Anticorps</b>	<b>Exemple de fournisseur</b>	<b>Référence catalogue du produit</b>
<b>IL6ST</b>	Anticorps monoclonal anti-gp130 humaine (clone 29104), (IgG1 de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB2281
<b>CXCL1</b>	Anticorps monoclonal anti-CXCL1/GRO alpha humaine (IgG2B de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB275
<b>COL1A1</b>	Anticorps polyclonal anti-COL1A1 produit chez le lapin	<b>Sigma-Aldrich</b>	HPA011795
<b>IHH</b>	Anticorps polyclonal de lapin anti-IHH	<b>Abcam</b>	ab39634
<b>CHI3L1</b>	Anticorps polyclonal anti-CHI3L1 produit chez le lapin	<b>Sigma-Aldrich</b>	AV51929
<b>MMP1</b>	Anticorps monoclonal anti-Pro-MMP1 humaine (clone 36660), (IgG1 de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB900
<b>MMP7</b>	Anticorps monoclonal anti-Pro-MMP7 humaine (clone 6A4), (IgG1 de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB907
<b>CXCL6</b>	Anticorps monoclonal anti-CXCL6/GC2 humaine (clone 60910), (IgG1 de souris)	<b>R&amp;D systems</b>	MAB333

D'autres exemples de moyens de dosage des niveaux de transcription de gènes choisis (A2M, CXCL10, CXCL8, SPP1, S100A4) sont par ailleurs présentés dans le tableau 29 ci-dessous (kits d'immuno-essai).

- 5 Lesdits réactifs peuvent en outre comprendre un marqueur pour leur détection (par exemple, un fluorophore).

Lesdits réactifs peuvent être sous la forme de composition(s), de composition(s) pharmaceutique(s), par exemple dans un(des) tube(s) ou dans un(des) puit(s) d'une plaque d'amplification d'acide nucléique

- 10 Lesdits réactifs peuvent être en mélange, ou sous formes distinctes ou physiquement séparées l'une de l'autre.

Lesdits réactifs peuvent être fixés à un support solide, par exemple un support en polymère, en plastique, notamment en polystyrène, en verre ou en silicium.

- 15 Lesdits réactifs peuvent être attachés directement ou indirectement audit support solide, par exemple *via* un agent de liaison ou de capture qui est attaché au support solide. Cet agent de liaison ou de capture peut comprendre une partie fixée audit support solide et une partie qui comprend un ligand qui se lie de manière spécifique à un desdits gènes choisis. Un tel ligand peut par exemple être un anticorps, un anticorps monoclonal, notamment un
- 20 anticorps humain tel qu'une IgG, IgM ou IgA, ou un fragment d'un tel anticorps ayant conservé la spécificité de liaison.

Ledit support solide peut par exemple être une plaque en plastique, notamment en polystyrène, comprenant plusieurs puits d'analyse, telle qu'une plaque de titrage ou microtitrage protéique, par exemple, une plaque ELISA.

- 25 Ledit support solide peut encore être des microbilles magnétiques ou non, pour micro-titrages, par exemple selon la technique décrite par Luminex.

Ledit support solide peut par exemple être une puce à acide nucléique, à protéine ou à peptide, par exemple une puce en plastique, verre ou silicium.

- 30 Lesdits réactifs peuvent ne pas être fixés à un support solide et peuvent par exemple être contenus dans une solution, telle qu'un tampon, par exemple pour leur conservation jusqu'à utilisation. Plus particulièrement, les réactifs peuvent être des acides nucléiques non liés à un support solide, dont la séquence nucléotidique est adaptée à l'amplification spécifique (cas d'amorces ou de paires d'amorces) et/ou à l'hybridation spécifique (cas de

sondes) du produit de transcription (ARN) d'un desdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention.

5 En sus de réactifs qui détectent les produits de transcription ou de traduction de gènes de mammifères, plus particulièrement de gènes humains, et notamment de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, un article manufacturé conforme à la demande peut optionnellement comprendre d'autres réactifs, par exemple des réactifs permettent de doser ou déterminer un ou plusieurs facteurs virologiques et/ou un ou plusieurs facteurs cliniques.

10 Par exemple, un article manufacturé conforme à la demande peut comprendre des réactifs qui détectent de manière spécifique un ou des virus de l'hépatite, et/ou son ou leur génotype.

Selon un mode de réalisation, la demande est relative à un article manufacturé comprenant des réactifs en préparation combinée pour leur utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, lesdits réactifs étant constitués :

- de réactifs qui détectent de manière spécifique (de préférence, qui détectent de manière spécifique et permettent de quantifier) chacun des produits de transcription ou de traduction de 3 à 40 gènes de mammifères, plus particulièrement de 3 à 40 gènes humains, (par exemple, en s'hybridant de manière spécifique à l'ARN de ces gènes et/ou à l'ADNc obtenu par transcription inverse de ces ARN, ou en se liant de manière spécifique aux protéines codées par ces gènes), lesdits 3 à 40 gènes de mammifères, ou, le cas échéant, lesdits 3 à 40 gènes humains, comprenant lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention,

25 et

- optionnellement, de réactifs qui détectent de manière spécifique (de préférence qui détectent de manière spécifique et permettent de quantifier) un virus de l'hépatite et/ou le génotype d'un virus de l'hépatite.

Dans cet article manufacturé, le nombre de gènes de mammifères, plus particulièrement de gènes humains dont les produits de transcription ou de traduction peuvent être détectés est de 3 à 40, plus particulièrement de 3 à 36, plus particulièrement de 3 à 33, plus particulièrement de 3 à 28, plus particulièrement de 3 à 26, plus particulièrement de 3 à 25, plus particulièrement de 3 à 24, plus particulièrement de 3 à 23, plus particulièrement de 3 à 22, plus particulièrement de 3 à 20, plus particulièrement de 3 à 21, plus

particulièrement de 3 à 20, plus particulièrement de 3 à 19, plus particulièrement de 3 à 18, plus particulièrement de 3 à 17, plus particulièrement de 3 à 16, plus particulièrement de 3 à 15, plus particulièrement de 3 à 14, plus particulièrement de 3 à 13, plus particulièrement de 3 à 12, plus particulièrement de 3 à 11, plus particulièrement de 3 à 10, plus particulièrement de 3 à 9, plus particulièrement de 3 à 8, plus particulièrement de 3 à 7, plus particulièrement de 3 à 6, plus particulièrement de 3 à 5, par exemple de 3, 4 ou 5, notamment de 4 ou 5.

Les gènes de mammifères, plus particulièrement les gènes humains, dont les produits de transcription ou de traduction peuvent être détectés par les réactifs contenus dans l'article manufacturé de la demande comprennent lesdits gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, et optionnellement d'autres gènes, qui ne sont pas des gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention, mais dont le produit d'expression, plus particulièrement, de traduction peut être d'intérêt, tels que les gènes ici listés en tant que « autres facteurs biologiques » (par exemple, le gène codant l'alanine-amino-transférase).

Le nombre de gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention est au maximum de 22 gènes (SPP1, et au moins un gène parmi A2M et VIM, et au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et optionnellement, au moins un gène parmi la liste de seize gènes). Avantagement, ce nombre peut être inférieur à 22 : ce nombre peut plus particulièrement être de 3 à 10, plus particulièrement de 3 à 9, plus particulièrement de 3 à 8, plus particulièrement de 3 à 7, plus particulièrement de 3 à 6, plus particulièrement de 3 à 5, par exemple de 3, 4 ou 5, notamment de 4 ou 5.

Dans l'article manufacturé de la demande, le nombre de réactifs qui détectent de manière spécifique le produit d'expression de gènes de mammifère (plus particulièrement de gènes humains) qui ne sont pas des gènes choisis parmi ladite liste de vingt-deux gènes de l'invention (par exemple, un réactif détectant de manière spécifique ALT), est de préférence au maximum de 18, plus particulièrement de 14 ou moins, plus particulièrement de 11 ou moins, plus particulièrement de 6 ou moins, plus particulièrement de 4 ou 3 ou 2, plus particulièrement de 1 ou 0.

Ledit article manufacturé peut donc par exemple être :

- un ou des tubes,
- un kit, notamment un kit comprenant un ou des tubes,

- un support solide, par exemple, en plastique, polystyrène, verre, silicium ou polymère, ou comprenant un matériau magnétique tel que de l'oxyde de fer, tel que :
  - une plaque en plastique comprenant plusieurs puits d'analyse telle que :
    - 5           ▪ une plaque d'amplification d'acide nucléique comportant des puits destinés à recevoir un échantillon biologique et un mélange réactionnel d'amplification d'acide nucléique,
    - une plaque de titrage ou microtitrage protéique, plus particulièrement une plaque ELISA,
  - 10       ○ des microbilles magnétiques (par exemple, des microbilles faites à partir d'oxyde de fer, et recouvertes d'un polymère auquel les protéines ou polypeptides peuvent adhérer ou être attachées par couplage chimique) ;
  - une puce à acide nucléique, à protéine, à polypeptide ou à peptide.
  
- 15   Optionnellement, l'article manufacturé de l'invention comprend en outre des instructions (par exemple, une feuille d'instructions) pour doser le niveau d'expression desdits gènes choisis sur un échantillon biologique collecté ou obtenu dudit sujet, plus particulièrement pour mettre en œuvre une méthode de l'invention.  
Ledit article manufacturé peut en outre comprendre un ou plusieurs des éléments
- 20   suivants :
  - un instrument pour le prélèvement dudit échantillon, notamment :
    - une aiguille et/ou une seringue, plus particulièrement une aiguille et/ou une seringue pour le prélèvement d'un liquide intracorporel, tel que du sang, et/ou
    - 25       ○ une aiguille adaptés à la cyto-ponction hépatique, par exemple une aiguille de diamètre 18 à 22G), et/ou
    - une aiguille et/ou un cathéter et/ou un pistolet à biopsie adaptés à la PBH ;
  - un produit programme d'ordinateur ou logiciel, notamment un produit programme d'ordinateur ou logiciel d'analyse statistique, par exemple un produit programme
  - 30   d'ordinateur de l'invention tel que ci-dessous décrit ;
  - des réactifs d'extraction d'ARN ;
  - une transcriptase inverse ;
  - une polymérase, par exemple une Taq polymérase ;
  - des nucléotides (dNTP).

La demande est notamment relative audit article manufacturé, ou auxdits réactifs, pour leur utilisation dans une méthode pour détecter ou diagnostiquer une hépatopathie qui comporte une atteinte tissulaire du foie, plus particulièrement une fibrose hépatique, plus  
5 particulièrement pour déterminer le score de fibrose hépatique d'un sujet, avantageusement pour déterminer si la fibrose hépatique d'un sujet a un score de fibrose Metavir d'au plus F1 ou bien d'au moins F2.

La demande est notamment relative audit article manufacturé, ou auxdits réactifs, pour leur utilisation dans une méthode de l'invention.

10 Cette utilisation peut notamment comprendre :

- le prélèvement d'un échantillon biologique dudit sujet, notamment par insertion d'une aiguille ou cathéter dans le corps dudit sujet, et
- la mise en œuvre desdits réactifs dans ladite méthode sur cet échantillon biologique, ou sur un échantillon comprenant des acides nucléiques et/ou protéines et/ou polypeptides  
15 et/ou peptides extraits ou purifiés dudit échantillon biologique, ou sur un échantillon comprenant des ADNc susceptibles d'avoir été obtenus par transcription inverse desdits acides nucléiques.

Cette utilisation peut par exemple comprendre :

- le prélèvement d'un échantillon biologique dudit sujet, optionnellement transformé  
20 par :
  - o extraction ou purification des ARN dudit échantillon prélevé et, optionnellement par transcription inverse des ARN extraits, ou par
  - o extraction ou purification de ses protéines dudit échantillon prélevé, et
- la mise en œuvre desdits réactifs de l'invention sur cet échantillon biologique  
25 optionnellement transformé.

Ledit prélèvement d'échantillon biologique peut être fait par insertion d'un instrument de prélèvement, notamment par insertion d'une aiguille ou d'un cathéter, dans le corps dudit sujet.

L'insertion de l'instrument de prélèvement est notamment faite pour prélever du fluide  
30 intracorporel dudit sujet (tel que par exemple du sang) et/ou une portion de tissu hépatique dudit sujet (par exemple par PBH) et/ou des cellules hépatiques dudit sujet (par exemple par cyto-ponction hépatique).

Cet instrument peut donc par exemple être inséré :

- dans une veine, une artère ou un vaisseau sanguin dudit sujet pour prélever du sang dudit sujet ; et/ou
- dans le foie dudit sujet, pour prélever un échantillon de parenchyme hépatique, c'est-à-dire pour faire une ponction biopsie hépatique (PBH), par exemple par voie transjugulaire ou par voie transpariétale ; et/ou
- à travers la peau jusqu'au foie dudit sujet, de sorte à faire une cyto-ponction hépatique.

La demande est notamment relative audit article manufacturé, ou auxdits réactifs, pour leur utilisation dans une méthode pour le traitement d'une hépatopathie qui comporte une atteinte tissulaire du foie, plus particulièrement une fibrose hépatique.

Cette utilisation peut notamment comprendre :

- la mise en œuvre desdits réactifs dans une méthode de l'invention pour déterminer le score de fibrose hépatique dudit sujet, et
- le fait d'administrer audit sujet un traitement visant à bloquer la progression de la fibrose hépatique, tel que interféron standard ou pégylé, en monothérapie, ou en plurithérapie associant ribavirine, si le sujet présente un score de fibrose hépatique qui, lorsqu'il est exprimé selon le système Metavir, est d'au moins F2.

Cette utilisation peut par exemple comprendre :

- la mise en œuvre desdits réactifs de l'invention sur échantillon biologique qui a été prélevé dudit sujet, et qui optionnellement a été transformé, par exemple :
  - par extraction et/ou purification des ARN dudit échantillon prélevé et, optionnellement par transcription inverse des ARN extraits, ou
  - par extraction et/ou purification des protéines et/ou polypeptides et/ou peptides dudit échantillon prélevé,
- pour détecter ou diagnostiquer une hépatopathie qui comporte une fibrose hépatique, plus particulièrement pour déterminer le score de fibrose hépatique dudit sujet, avantageusement pour déterminer si la fibrose hépatique dudit sujet a un score de fibrose Metavir :
  - d'au plus F1 (c'est-à-dire une fibrose hépatique sans septa), ou bien
  - d'au moins F2 (c'est-à-dire une fibrose hépatique avec septas),
- optionnellement, dans le cas d'une hépatopathie impliquant un virus de l'hépatite, notamment un VHC et/ou un VHB et/ou un VHD, notamment au moins un VHC, déterminer le génotype de ce virus, et

- le fait d'administrer un traitement visant à bloquer ou ralentir la progression de la fibrose hépatique, si le sujet présente un score de fibrose Metavir d'au moins F2.

Cette méthode peut en outre comprendre le fait de ne pas administrer ce traitement si, ou tant que, ce score est d'au plus F1.

- 5 Ledit traitement peut par exemple être un traitement par interféron standard ou interféron pégylé, en monothérapie, ou en plurithérapie associant un ou plusieurs autres principes actifs, notamment de la ribavirine et/ou un inhibiteur de protéase virale et/ ou inhibiteur de polymérase virale (par exemple, en combinaison thérapeutique, notamment en bithérapie ou trithérapie).
- 10 Ce traitement peut par exemple être :
- interféron alpha-2b pégylé (tel que PEG-INTRON®, Schering Plough Corporation, Kenilworth, NJ) à une dose d'environ 1,5 g/kg/semaine, et ribavirine (REBETOL® ; Schering Plough Corporation, Kenilworth, NJ) à une dose de 800 à 1200 mg/kg/jour (si l'hépatopathie implique un VHC de génotype 2 ou 3, une dose d'environ 800
- 15 mg/kg et par jour est généralement conseillée), ou
- interféron alpha-2a pégylé (tel que PEGASYS® ; Roche Corp., F. Hoffmann-La Roche Ltd. ; Basel, Suisse) à une concentration de 180 g/kg/semaine et ribavirine (COPEGUS®, Roche Corp. ; F. Hoffmann-La Roche Ltd. ; Basel, Suisse) à raison de 1000 à 1200 mg/kg/jour.
- 20 La durée du traitement peut par exemple être d'au moins 24 semaines, par exemple de 24 semaines pour une hépatopathie à VHC de génotype 2 ou 3, ou de 48 semaines pour une hépatopathie à VHC de génotype 1, 4 ou 5, ou pour un patient non-répondeur au traitement au bout de 24 semaines.
- La demande est également relative à un médicament ou association médicamenteuse
- 25 destiné au traitement d'une hépatopathie comportant une atteinte tissulaire du foie, plus particulièrement une fibrose hépatique (tel que interféron standard ou interféron pégylé, en monothérapie, ou en plurithérapie associant un ou plusieurs autres principes actifs, notamment de la ribavirine), pour son utilisation dans la méthode de traitement de l'invention.
- 30 Dans la demande, le terme hépatopathie est entendu dans son sens ordinaire, à savoir une atteinte du foie, plus particulièrement une atteinte tissulaire du foie, plus particulièrement des lésions du foie, notamment une fibrose hépatique.

L'invention s'adresse plus particulièrement aux hépatopathies chroniques (agressions chroniques du foie de 6 mois ou plus).

Différentes maladies causent et /ou conduisent à des lésions du foie, telles qu'une fibrose hépatique. Peuvent notamment être citées :

- 5 - les hépatites chroniques virales (notamment l'hépatite chronique B, l'hépatite chronique C, l'hépatite chronique D ;
- les stéatoses et stéato-hépatites (associées au syndrome métabolique, à l'obésité, au diabète).
- les hépatites alcooliques ;
- 10 - l'hématochromatose génétique et les surcharges en fer secondaire
- Les maladies auto-immunes ;
- les maladies biliaires (cirrhose biliaire primitive et cholangie sclérosante primitive) ;
- les intoxications par médicament ou substance toxique ;
- des maladies métaboliques.
- 15 L'invention est plus particulièrement adaptée aux hépatites virales, notamment aux hépatites à virus C (VHC) et/ou à virus B (VHB) et/ou à virus D (VHD), notamment aux hépatites virales à au moins VHC (et optionnellement à VHB et/ou VHD).

La demande est également relative à un **produit programme d'ordinateur**, destiné à être  
20 stocké dans une mémoire d'une unité de traitement, ou sur un support mémoire amovible destiné à coopérer avec un lecteur de ladite unité de traitement. Le produit programme d'ordinateur de l'invention comprend des instructions pour la mise en œuvre d'une méthode de l'invention, notamment pour la mise en œuvre d'une analyse statistique adaptée à la mise en œuvre d'une méthode de l'invention (notamment adaptée à l'analyse  
25 statistique multivariée des niveaux d'expression desdits gènes choisis) et/ou pour la construction d'un modèle de classification multivariée adapté à la mise en œuvre d'une méthode de l'invention.

La demande est également relative à une **installation informatique**, un dispositif informatique, ou ordinateur, comprenant une unité de traitement dans la mémoire de  
30 laquelle sont stockés ou enregistrés :

- un produit programme d'ordinateur de l'invention, et, optionnellement,
- des dosages, ou des valeurs de dosage, des niveaux d'expression (transcription et/ou traduction) desdits gènes choisis.

Le terme "comprenant", avec lequel "incluant" ou "contenant" est synonyme, est un terme ouvert, et n'exclut pas la présence d'un ou plusieurs élément(s), ingrédient(s) ou étape(s) de méthode additionnel(s) qui ne serait(seraient) pas explicitement indiqué(s), tandis que le terme "consistant" ou "constitué" est un terme fermé, qui exclut la présence de tout autre élément additionnel, étape, ou ingrédient qui ne serait pas explicitement exposé. Le

5 terme "consistant essentiellement" ou "essentiellement constitué" est un terme partiellement ouvert, qui n'exclut pas la présence d'un ou plusieurs élément(s), ingrédient(s) ou étape(s) additionnel(s), dans la mesure où cet(ces) élément(s), ingrédient(s) ou étape(s) additionnel(s) n'affecte(nt) pas matériellement les propriétés de

10 base de l'invention.

Par conséquent, le terme "comprenant" (ou "comprend(comprennent)") inclut les termes "consistant", "constitué", aussi bien que les termes "consistant essentiellement" et "essentiellement constitué".

15 Dans le but de faciliter la lecture de la demande, la description a été séparée en divers paragraphes, sections et modes de réalisation. Il ne doit pas être considéré que ces séparations déconnectent la substance d'un paragraphe, section ou mode de réalisation, de celle d'un autre paragraphe, section ou mode réalisation. Au contraire, la description englobe toutes les combinaisons possibles des différents paragraphes, sections, phrases et

20 modes de réalisations qu'elle contient.

Le contenu des références bibliographiques citées dans la demande est spécifiquement incorporé par référence dans le contenu de la demande.

Les exemples qui suivent sont donnés à titre purement illustratif. Ils ne limitent en aucune

25 façon l'invention.

## EXEMPLES

### EXEMPLE 1 : CONSTRUCTION DE MODELES DE CLASSIFICATION

30

#### 1. Populations et patients, détermination du score de fibrose hépatique, dosage du niveau d'expression de gènes :

Les biopsies de foie ont été réalisées à partir d'une cohorte de patients adultes suivis à l'Hôpital Beaujon (Clichy, France), présentant une hépatite chronique suite à une infection par le virus de l'Hépatite C (VHC). Les biopsies ont été immédiatement stockées à -80°C en vue de l'extraction des ARN totaux, et traitées avec de la paraffine pour des études  
5 histologiques.

L'étude réalisée a été approuvée par le Comité Ethique local, conformément à la Déclaration d'Helsinki et tous les patients ont donné leur consentement éclairé par écrit. Les ponctions biopsies hépatiques ont été réalisées en respectant les bonnes pratiques  
10 cliniques, et l'histologie a été interprétée par un anatomo-pathologiste avec le score d'activité et fibrose (score Metavir).

#### Présentation des patients

15 Le diagnostic clinique d'infection par le virus de l'hépatite C des patients sélectionnés a été établi sur la base de la détection d'anticorps dirigés contre des protéines du VHC et de la détection d'ARN circulant du VHC.

La sérologie du VHC de dépistage a été réalisée par le test de quantification de l'ARN de  
20 VHC VERSANT® HCV-RNA 3.0 (bDNA) ASSAY de la société Siemens Healthcare Diagnostics (limite de quantification = 615 – 7 690 000 UI/mL).

Les patients sont des patients infectés par le virus de l'hépatite C. Afin d'établir une cohorte homogène et parfaitement représentative de la pathologie exemplifiée, les patients  
25 susceptibles de présenter des affections chroniques hépatiques d'origines autres que le virus de l'hépatite C (telles qu'une affection chronique hépatique due à une infection par le virus de l'hépatite B) ont été exclus de l'étude.

D'autres critères d'exclusion ont en outre été appliqués, à savoir consommation d'alcool excessive, hémochromatose, hépatite auto-immune, maladie de Wilson, déficience en  $\alpha$ -1  
30 antitrypsine, angiocholite sclérosante primitive, cirrhose biliaire primitive, la prise antérieure d'un traitement anti-VHC. Les patients ayant déjà bénéficié d'un traitement antiviral dans le cadre du suivi de leur hépatite chronique C ont également été exclus de l'étude.

Le stade de fibrose hépatique a été déterminé par l'examen anatomo-pathologique d'un prélèvement de tissus hépatiques (ponction biopsique hépatique ou PBH). Cet examen a été réalisé par deux lectures indépendantes par un anatomo-pathologiste confirmé. Le

5 Le stade de fibrose hépatique a été défini selon la classification METAVIR ainsi que selon la classification Ishak (*cf.* tableau 1 ci-dessus, pour la correspondance entre les deux systèmes de score).

Un échantillon de sérum a été prélevé sur chacun des patients inclus dans l'étude dans un délai de +/- 6 mois par rapport à la date de la biopsie.

10

Deux cent quarante-quatre patients ont été sélectionnés sur la base de leur stade de fibrose hépatique déterminée selon les classifications METAVIR et Ishak. Les deux cent quarante-quatre patients sélectionnés présentent un score de fibrose Métavir F1 ou F2, et/ou un score de fibrose Ishak F1/F2 ou F3.

15

Le tableau 15 ci-dessous présente les données cliniques, biologiques et virologiques des patients ainsi sélectionnés.

**Tableau 15 :**

Données cliniques, biologique et virologiques	Patients	Patients F1	Patients F2
Cohorte (n)	244	162	82
homme (%)/ femme (%)	114 (47)/130(53)	69(43)/93(57)	45(55)/37(45)
Age			
moyenne $\pm$ SD	50,2 $\pm$ 11.1	50 $\pm$ 10,5	50,5 $\pm$ 12,1
Min-Max	18-71	21-71	18-70
Source d'infection (n(%))			
- Transfusion sanguine	62 (25)	41(25)	21(26)
- Toxicomanie	49 (20)	34 (21)	15 (18)
- Inconnue	133 (55)	87 (54)	46 (56)
Alanine aminotransférase (ALT)			
UI /L :			
moyenne $\pm$ SD	92 $\pm$ 78	87 $\pm$ 89	101 $\pm$ 55
Min-Max	22-647	22-510	32-647
Génotypes VHC, n (%)			
- 1	135 (55,3)	81 (50)	54(65,9)
- 2	27 (11,1)	23 (14,2)	4 (4,9)
- 3	26 (10,7)	15 (9,3)	11 (13,4)
- 4	49 (20,1)	38 (23,4)	11 (13,4)
- 5	4 (1,6)	3 (1,9)	1 (1,2)
- 6	2 (0,8)	1 (0,6)	1 (1,2)
- Inconnu	1 (0,4)	1 (0,6)	0 (0)
Nombre de copies virales par mL de sérum : Moyenne (Min-Max)	2,28.10 <sup>6</sup> (3,2.10 <sup>3</sup> -1,9.10 <sup>8</sup> )	1,83.10 <sup>6</sup> (3,1.10 <sup>4</sup> -1,9.10 <sup>8</sup> )	3,28.10 <sup>6</sup> (3,2.10 <sup>3</sup> - 5,9.10 <sup>7</sup> )

UI = Unité Internationale

Les niveaux d'expression des gènes ont été dosés sur chacune des 244 biopsies (1 biopsie par patient).

## 5 Traitement des échantillons

Les biopsies hépatiques ont été broyées dans de l'azote en utilisant un pilon et un mortier en céramique (broyage 100% manuel).

La poudre a été récupérée à l'aide d'un scalpel (Swann Morton 22, Référence 0208).

10

### a) Extraction des ARN

La poudre ainsi obtenue a été solubilisée dans 1 mL de RNable® Réf. GEXEXT00, Laboratoires Eurobio, France, auquel ont été ajoutés 100 µL de chloroforme.

15 Le mélange obtenu a été placé dans la glace ou à 4°C pendant 5 minutes puis a été centrifugé à 13 000 g pendant 15 minutes.

La phase supérieure aqueuse contenant les ARN a été récupérée dans un tube neuf et 1 volume d'isopropanol y a été ajouté.

20 Le tube a été agité par retournement et a été placé à 4°C toute la nuit, puis a été centrifugé à 13 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant a été éliminé, et le culot contenant les ARN a été repris dans un volume d'éthanol à 70% (préparé extemporanément) et à nouveau centrifugé.

Le culot de précipité d'ARN obtenu a été séché à l'air libre pendant environ 1 heure, puis dissout dans 15 µL d'eau puis stocké à -80°C.

### 25 b) Dosage des ARN

L'évaluation de la concentration des ARN extraits a été réalisée par la mesure de la densité optique par un spectromètre (Nanodrop), et a été vérifiée après un cycle de congélation/décongélation.

Les ARN extraits ont ensuite été dilués pour obtenir une solution à 50 ng/µL.

30 Les contrôles qualités de l'ARN ont été réalisés par PCR temps réel (*cf.* ci-dessous), par ciblage d'un gène contrôle (dit endogène), à expression ubiquitaire, pour vérifier que l'ARN n'a pas été dégradé (en l'occurrence, ciblage de RPLP0).

Etape de transcription inverse (Reverse Transcription ou RT) :

La transcription inverse a été réalisée sur 200 ng d'ARN dans un mélange réactionnel réalisé dans un volume de 20 µL comprenant les réactifs suivants :

5

**Tableau 16 :**

Réactif et référence produit	Solution de départ	Volume
Transcriptase inverse SUPERScript II RNase H, Invitrogen, réf: 18064014	200 U/µL	0,5 µL
Tampon SUPER SCRIPT 5X Invitrogen, réf : 18064014	-	4,0 µL
RNasin Promega, réf: N2111	40 U/µL	0,5 µL
DTT	100 mM	2,0 µL
Les 4 dNTP GE Healthcare, réf: 28406552	10 mM	1µL
Amorces Pd(N) RANDOMS HEXAMERS 50 (A260) units, 51 Perbio, réf : MB216601	0,5 µg/µL	6,0 µL
ARN	50 ng/µL	4,0 µL
H <sub>2</sub> O		QSP 20 µL

Les réactions de transcription inverse ont été effectuées aux températures suivantes :

- 10
- à 20°C pendant 10 minutes, puis
  - à 42°C pendant 30 minutes, et
  - à 99°C pendant 5 minutes.

A ce stade, les mélanges réactionnels ont été congelés, ou aliquotés, ou directement utilisés pour une amplification par PCR temps réel.

15

Etape de PCR en temps réel quantitative (PCRq) :

L'amplification a été réalisée en utilisant un light Cycler® 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Les résultats sont générés par le logiciel light Cycler® Software 4.05/ 4.1.

- 5 La technologie Light Cycler® permet le suivi en continu de l'apparition des produits d'amplification grâce à l'émission d'une quantité de fluorescence proportionnelle à la quantité de produit amplifié, elle-même dépendante de la quantité de cibles initialement présentes dans l'échantillon à analyser. La quantification (en valeurs relatives) de l'expression génique est réalisée par la méthode connue sous le nom de  $2^{-\Delta Ct}$  ( $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{référence}})}$ ); cf. Livak et Schmittgen 2001 ; Schmittgen et Livak 2008), exploitant les valeurs de « Cycle Threshold » ou Ct déterminées par l'appareil de PCR quantitative en temps réel. Plus la valeur de Ct est faible, plus la quantité initiale d'ARN transcrit est élevée.

15 Les mélanges réactionnels et le protocole utilisés sont décrits dans la notice de la trousse light Cycler® 480 SYBR Green I Master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne ; US 4,683,202 ; US 4,683,195 ; US 4,965,188 ; US 6,569,627).

Après l'étape de transcription inverse, les mélanges réactionnels (cDNAs) ont été dilués au  $1/40^{\text{ème}}$  (pour la vérification de la qualité) ou au  $1/100^{\text{ème}}$  (pour les gènes cibles) avant leur utilisation en PCRq.

20 Pour chaque gène, les PCRq ont été réalisées dans un volume réactionnel de 10  $\mu\text{L}$  sur une plaque à 384 puits :

- 5  $\mu\text{L}$  de la réaction de transcription inverse diluée au  $1/40^{\text{ème}}$  (ou au  $1/100^{\text{ème}}$ ) ;
- 4,8  $\mu\text{L}$  de mélange réactionnel de la trousse light Cycler® 480 SYBR Green I Master mix
- 25 - 0,1  $\mu\text{L}$  d'une solution à 50 $\mu\text{M}$  pour chacune des deux amorces, soit un volume final de 0,5  $\mu\text{M}$  pour chaque amorce.

Les mélanges réactionnels sont généralement préparés pour des plaques de 384 puits.

Les amorces suivantes ont été utilisées :

**Tableau 17 :**

<b>Symbole</b>	<b>Amorce sens</b>	<b>SEQ ID NO :</b>	<b>Amorce antisens</b>	<b>SEQ ID NO :</b>
<b>A2M</b>	GCAAAGTAAAAACCAAGGCTTCCA	<b>1</b>	TCCAGTCAATTCCACCACCTGTTC	<b>2</b>
<b>SPP1</b>	TCGCAGACCTGACATCCAGTACC	<b>3</b>	CCATTCAACTCCTCGCTTTCCAT	<b>4</b>
<b>VIM</b>	CTCCCTCTGGTTGATACCCACTC	<b>5</b>	AGAAAGTTTCGTTGATAACCTGTCCA	<b>6</b>
<b>CXCL10</b>	CTGACTCTAAGTGGCAATTC AAGGAG	<b>7</b>	GGTTGATTACTAATGCTGATGCAGG	<b>8</b>
<b>IL8</b>	CACCGGAAGGAACCATCTCACTGT	<b>9</b>	TCCTTGGCAAAAACCTGCACCTTCA	<b>10</b>
<b>ENG</b>	CACAACATGCAGATCTGGACCACT	<b>11</b>	TGGGAGCTTGAAGCCACGAA	<b>12</b>
<b>ANGPT2</b>	ACGTGAGGATGGCAGCGTT	<b>13</b>	GAAAGGGTTACCCAAAATCCCACCTTAT	<b>14</b>
<b>p14ARF</b>	GGTTTTTCGTGGTTCACATCCC	<b>15</b>	CCCATCATCATGACCTGGTCTT	<b>16</b>
<b>CHI3L1</b>	GACCACAGGCCATCACAGTCC	<b>17</b>	TGTACCCACACAGCATAGTCAGTGTT	<b>18</b>
<b>COL1A1</b>	CCTCCGGCTCCTGCTCCTCTT	<b>19</b>	GGCAGTTCTTGGTCTCGTCACA	<b>20</b>
<b>CXCL1</b>	TCGAAAAGATGCTGAACAGTGACA	<b>21</b>	CTTCAGGAACAGCCACCAGTGA	<b>22</b>
<b>CXCL6</b>	GTTTACGGGTTACGCTGAGAGTAAA	<b>23</b>	CGTTCCTCAGGGGAGGCTACCA	<b>24</b>
<b>CXCL11</b>	GTGTGCTACAGTTGTTCAAGGCTT	<b>25</b>	CTCAATAATCTGCCACTTTCACCTGCT	<b>26</b>

**Tableau 17 (suite et fin) :**

Symbole	Amorce sens	SEQ ID NO :	Amorce antisens	SEQ ID NO :
IHH	AGGCCGGCTTTGACTGGGTGTATT	27	GCGGCCGAGTGTCTGGACTT	28
IL6ST	CCTGCCTGTGACTTTCAAGCTACT	29	CATTCCACCCAAAAGCATGTTATCT	30
IRF9	GGCCGCATGGATGTTGCTGAG	31	TCTGAGTCCCCTGGCTGGCCAGA	32
MMP1	GGCTTGAAGCTGCITACGAAITTT	33	ACAGCCCAGTACTTATTCCTTTTGA	34
MMP2	ACTGCGGTTTTCTCGAATCCA	35	GGTATCCATCGCCATGCTCC	36
MMP7	AGTGGGAACAGGCTCAGGACTATC	37	GGTAGGCCAAAAGAAATTTTGTGCATC	38
MMP9	CGGCTTGCCCTGGTGCAGT	39	CGTCCCGGGGTGTAGAGTCTCTCG	40
S100A4	CTCGGGCAAAGAGGGGTGACAA	41	GCTTCACTCTGTCTCTTTTCCCCCAA	42
TIMP1	GAGCCCTGGCTTCTGGCA	43	GCCCTGATGACGAGGTCTGGAA	44
RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAACT	45	CCATCAGCACCCACAGCCTT	46

Les PCRq ont été réalisées suivant les conditions de température suivantes :

- une étape d'initiation de la dénaturation à 95°C pendant 10 minutes ;
- 50 cycles de :

- 5           - dénaturation à 95°C pendant 15 secondes ;
- hybridation / élongation à 65°C pendant 30 secondes.

Chaque échantillon cible est amplifié en duplicate.

Afin de s'affranchir des variations des quantités initiales d'ARN total d'un échantillon à l'autre, on réalise en parallèle sur le même échantillon l'amplification en duplicate des  
10 ARN d'un gène utilisé comme contrôle endogène, tel qu'un gène impliqué dans des cascades métabolique cellulaires, par exemple RPLP0 (aussi connu sous le nom 36B4 ; Genbank accession NM\_001002) ou TBP (Genbank accession NM\_003194). En l'occurrence, c'est le gène RPLP0 qui a été ici utilisé comme contrôle endogène.

La qualité de l'extraction d'ARN faite à partir des 244 biopsies a été évaluée sur la base de  
15 la valeur de Ct du gène de référence RPLP0. La classification a été réalisée de la façon suivante :

- Ct RPLP0 inférieur à 22 : qualité ARN très bonne ;
- Ct RPLP0 de 22 à 24 : qualité ARN bonne ;
- Ct RPLP0 supérieur à 24 et inférieur à 26 : qualité ARN moyenne ;
- 20           - Ct RPLP0 supérieur ou égal à 26 : qualité ARN mauvaise.

Afin d'augmenter la fiabilité des analyses bio-statistiques, seules les données provenant d'extraction d'ARN de très bonne qualité (Ct RPLP0 < 22) ont été retenues, soit 158 biopsies (64,8% des 244 échantillons).

La quantité de transcrits d'un gène cible a été déduite du Ct (« *Cycle threshold* ») qui  
25 correspond au nombre de cycles de PCR nécessaire pour obtenir un signal de fluorescence significatif. Les échantillons cibles ont été normalisés sur la base de leur contenu en RPLP0 (ou, le cas échéant, en TBP), conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ .

Les valeurs de dosage des biomarqueurs ou BMQ (concentration en ARN, en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ) obtenues pour chacun des 158 patients  
30 sont présentées dans les tableaux 24 à 27 ci-dessous.

**Tableau 24 : données cliniques, biologiques et virologiques**

Données cliniques, biologiques et virologiques	<b>Patients</b>	<b>Patients F1</b>	<b>Patients F2</b>
<b>n</b>	158	102	56
<b>Sexe</b> : mâle (%) / femelle (%)	71 (45) / 87 (55)	41 (40) / 61 (60)	30 (54) / 26 (46)
<b>Age</b> [moyenne $\pm$ déviati on standard (Min-Max)]	48,3 $\pm$ 11,0 (19 - 71)	51,2 $\pm$ 11,2 (19 - 71)	46,7 $\pm$ 11,0 (24 - 70)
<b>Source d'infection</b> [n(%)]			
transfusion sanguine	37 (23)	23 (23)	14 (25)
toxicomanie	33 (21)	23 (23)	10 (18)
inconnue	88 (56)	56 (55)	32 (57)
<b>Alanine aminotransférase</b> (ALT) UI/L [moyenne $\pm$ déviati on standard (Min-Max)]	85 $\pm$ 60 (22 - 458)	75 $\pm$ 48 (22 - 299)	104 $\pm$ 73 (36 - 458)

**Tableau 24 (suite et fin) : données cliniques, biologiques et virologiques**

Données cliniques, biologiques et virologiques	Patients	Patients F1	Patients F2
<b>Génotypes VHC</b> [n(%)]			
1	86 (54)	49 (48)	37 (66)
2	21 (13)	18 (18)	3 (5)
3	15 (9)	9 (9)	6 (11)
4	31 (20)	23 (23)	8 (14)
5	2 (1)	1 (1)	1 (2)
6	2 (1)	1 (1)	1 (2)
inconnu	1 (1)	1 (1)	0 (0)
<b>Nombre de copies virales par mL de sérum :</b> moyenne (Min-Max)	$6,2 \cdot 10^6$ ( $3,2 \cdot 10^3 - 1,9 \cdot 10^8$ )	$6,5 \cdot 10^6$ ( $4,8 \cdot 10^4 - 1,9 \cdot 10^8$ )	$5,8 \cdot 10^6$ ( $3,2 \cdot 10^3 - 5,9 \cdot 10^7$ )

**Tableau 25 : valeurs BMQ des patients pour les gènes SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	SPP1	A2M	VIM	IL8	CXCL10	ENG
1	F1	0,228	3,387	0,346	4,332	0,574	1,141
8	F1	0,050	4,141	0,170	0,000	1,297	1,371
9	F1	0,071	1,495	0,117	0,625	2,078	0,997
11	F1	0,242	4,014	0,360	2,971	1,860	1,454
16	F1	0,105	1,352	0,120	1,237	0,000	0,388
22	F1	0,133	1,676	0,176	6,791	0,346	0,674
25	F1	0,054	6,543	0,167	1,546	0,357	1,597
26	F1	0,755	8,754	0,380	0,923	2,370	1,899
32	F1	0,167	3,399	0,125	4,515	0,549	1,157
33	F1	0,551	3,643	0,256	69,878	17,692	0,946
38	F1	0,143	1,347	0,177	0,967	2,780	1,000
40	F1	0,117	2,151	0,142	0,423	4,857	1,014
41	F1	0,277	1,653	0,129	1,264	0,333	0,163
46	F1	0,200	5,081	0,221	3,362	4,141	1,094
48	F1	0,100	0,509	0,119	1,805	2,567	0,880
56	F1	0,129	4,790	0,232	4,088	3,193	0,901
65	F1	0,196	5,205	0,124	2,218	1,003	1,010
66	F1	0,779	2,289	0,161	1,847	0,700	1,177
69	F1	0,223	1,664	0,068	2,936	0,509	0,901
74	F1	0,067	2,063	0,119	5,772	1,765	0,674
83	F1	0,156	2,959	0,166	4,918	6,255	1,400
86	F1	0,124	3,446	0,179	3,789	2,858	1,266
88	F1	0,157	1,597	0,087	0,766	0,735	0,667
91	F1	0,224	3,543	0,171	0,595	1,641	1,079
95	F1	0,069	3,931	0,116	3,118	0,264	0,727
98	F1	0,163	1,173	0,089	3,717	0,292	0,847
105	F1	0,176	0,383	0,079	2,017	0,149	0,782
107	F1	0,324	1,414	0,173	0,443	0,727	1,613
109	F1	0,092	0,644	0,082	1,610	1,275	0,722
113	F1	0,144	2,558	0,133	1,725	0,434	0,798
116	F1	0,094	1,537	0,228	0,792	18,316	1,343
125	F1	0,010	0,382	0,063	1,421	0,234	0,241
126	F1	0,158	2,204	0,074	0,450	0,460	1,039
134	F1	0,390	1,270	0,108	3,028	0,345	0,633
135	F1	0,048	0,690	0,115	8,625	1,032	0,425
139	F1	0,067	1,079	0,087	0,410	1,197	0,664

**Tableau 25 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	SPP1	A2M	VIM	IL8	CXCL10	ENG
141	F1	0,066	1,664	0,059	2,615	1,352	0,362
143	F1	0,089	1,873	0,343	1,184	0,301	0,732
144	F1	0,269	1,899	0,113	1,206	1,676	0,655
145	F1	0,438	5,315	0,235	5,681	0,626	1,347
146	F1	0,029	0,153	0,331	0,509	0,027	0,465
151	F1	0,034	1,597	0,075	0,297	1,288	0,406
152	F1	0,074	1,892	0,074	0,887	1,068	0,818
153	F1	0,128	2,297	0,064	1,004	0,200	0,509
154	F1	0,168	3,204	0,089	2,011	0,639	0,616
155	F1	0,199	2,918	0,072	0,694	1,324	1,007
157	F1	0,044	1,939	0,076	1,257	3,182	0,465
159	F1	0,449	5,897	0,117	4,345	1,853	0,599
161	F1	0,187	2,949	0,082	0,707	0,256	0,622
163	F1	0,700	5,959	0,076	3,998	2,258	0,570
164	F1	0,378	1,395	0,084	2,616	0,745	0,766
165	F1	0,176	0,901	0,043	0,757	0,033	0,593
167	F1	0,147	5,483	0,111	4,209	2,354	1,474
169	F1	0,009	0,914	0,042	0,415	0,574	0,637
170	F1	0,066	2,639	0,060	1,308	0,083	0,509
171	F1	0,530	4,213	0,089	6,820	0,664	0,505
172	F1	0,066	1,873	0,086	0,000	0,774	0,838
175	F1	0,231	1,966	0,134	10,676	0,257	0,697
178	F1	0,211	3,824	0,089	0,671	1,057	0,886
182	F1	0,055	1,821	0,059	0,544	0,236	0,793
189	F1	0,182	3,031	0,073	0,828	3,771	0,963
210	F1	0,043	2,338	0,073	0,325	0,355	0,448
214	F1	0,031	3,694	0,071	1,456	5,637	0,766
216	F1	0,030	1,404	0,042	0,844	0,333	0,349
217	F1	0,026	1,815	0,085	1,033	1,068	0,674
219	F1	0,101	2,990	0,088	0,577	1,688	0,707
223	F1	0,052	2,042	0,043	2,416	1,429	0,437
224	F1	0,241	2,250	0,090	2,211	1,025	1,007
226	F1	0,060	1,017	0,095	0,000	0,735	0,737
227	F1	0,079	2,181	0,052	1,629	0,336	0,695
229	F1	0,136	6,521	0,093	2,709	14,074	0,835
235	F1	0,078	3,294	0,047	0,787	0,597	0,603

**Tableau 25 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	SPP1	A2M	VIM	IL8	CXCL10	ENG
240	F1	0,150	5,011	0,110	2,478	7,336	0,865
241	F1	0,052	0,624	0,036	0,865	0,750	0,457
243	F1	0,105	4,199	0,120	4,407	1,449	1,028
244	F1	0,299	9,318	0,093	1,121	2,828	0,956
245	F1	0,049	0,388	0,336	0,517	0,211	0,586
246	F1	0,125	4,708	0,069	1,103	5,598	1,007
247	F1	0,174	2,000	0,076	1,916	1,682	0,603
248	F1	0,080	4,127	0,056	1,969	1,185	0,337
249	F1	0,106	0,669	0,026	0,402	0,105	0,236
250	F1	0,068	2,858	0,038	0,848	0,367	0,434
257	F1	0,065	3,160	0,094	0,000	0,476	0,853
263	F1	0,068	3,375	0,262	1,506	0,607	0,868
264	F1	0,066	2,437	0,133	1,856	3,106	0,678
265	F1	0,012	0,771	0,037	0,000	0,454	0,722
269	F1	0,041	1,469	0,098	1,135	1,602	0,671
273	F1	0,014	1,169	0,061	0,973	0,519	0,732
275	F1	0,075	2,129	0,069	3,144	0,416	0,674
276	F1	0,116	0,395	0,087	5,860	0,284	0,633
277	F1	0,033	1,072	0,060	4,183	0,195	0,413
285	F1	0,158	2,107	0,132	3,584	0,611	0,993
286	F1	0,179	1,297	0,209	7,950	1,275	0,892
297	F1	0,016	2,313	0,110	7,908	3,422	0,983
305	F1	0,026	0,850	0,072	6,873	0,241	0,519
337	F1	0,074	0,801	0,039	4,015	0,174	0,395
338	F1	0,036	3,352	0,153	2,986	0,441	1,218
339	F1	0,074	4,056	0,094	3,178	0,722	1,449
340	F1	0,043	6,431	0,246	5,234	4,547	2,648
351	F1	0,029	1,181	0,081	4,623	0,180	0,818
357	F1	0,099	2,858	0,139	4,456	0,853	1,253
361	F1	0,077	5,560	0,135	10,793	0,787	0,807
2	F2	2,979	7,235	0,572	4,613	1,939	2,428
6	F2	0,210	6,821	0,149	34,819	8,225	1,653
7	F2	0,366	1,693	0,190	4,161	1,548	0,880
10	F2	0,366	4,272	0,280	1,632	3,519	1,270
12	F2	2,219	4,377	0,516	9,754	6,821	2,189
13	F2	0,168	1,000	0,131	5,083	1,905	0,678

**Tableau 25 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	SPP1	A2M	VIM	IL8	CXCL10	ENG
14	F2	0,239	1,664	0,149	1,802	0,457	1,169
17	F2	0,209	11,672	0,214	2,986	3,272	1,815
20	F2	0,203	7,438	0,186	2,584	0,061	1,424
23	F2	0,821	7,013	0,344	7,993	2,151	1,361
27	F2	0,653	3,283	0,443	8,377	1,032	0,990
28	F2	0,678	4,112	0,247	7,404	9,781	1,129
31	F2	0,168	1,682	1,490	6,551	1,324	1,979
34	F2	0,067	3,329	0,085	0,806	0,184	1,007
39	F2	0,936	3,972	0,177	0,000	1,257	1,133
42	F2	0,142	3,294	0,075	2,525	1,361	0,815
43	F2	0,235	1,840	0,195	4,416	1,424	0,930
44	F2	0,202	4,547	0,242	0,000	2,878	1,218
45	F2	0,599	3,931	0,470	3,963	2,219	3,042
50	F2	0,081	5,408	0,250	2,339	0,451	1,526
55	F2	0,747	3,193	0,109	8,586	0,809	0,553
58	F2	0,275	2,676	0,191	5,677	1,283	1,248
60	F2	0,154	1,121	0,118	1,219	1,711	1,636
63	F2	0,110	7,413	0,254	1,073	6,940	1,000
67	F2	0,299	3,986	0,133	5,520	0,563	0,956
72	F2	0,232	0,880	0,115	2,042	0,257	0,917
75	F2	0,702	16,000	0,410	5,710	8,846	2,136
76	F2	0,148	5,205	0,227	0,506	4,392	0,997
80	F2	0,462	1,939	0,147	6,084	2,751	0,914
87	F2	1,575	7,413	0,271	12,800	9,815	1,972
90	F2	0,150	7,781	0,263	1,357	2,196	1,586
92	F2	0,033	0,693	0,096	1,853	0,618	0,568
97	F2	0,144	1,087	0,134	1,234	0,459	0,722
114	F2	0,662	4,925	0,408	3,995	15,889	2,979
148	F2	0,115	4,908	0,151	6,687	5,046	1,464
160	F2	0,340	3,745	0,138	6,966	1,548	0,502
166	F2	0,973	0,313	0,545	0,895	0,003	0,835
168	F2	0,068	2,612	0,172	5,740	0,538	0,742
174	F2	0,505	4,228	0,112	12,409	3,106	0,997
176	F2	0,232	4,959	0,072	1,981	1,039	0,714
177	F2	0,146	5,389	0,102	0,825	2,378	0,959
179	F2	0,262	6,476	0,087	3,246	2,799	0,724

**Tableau 25 (suite et fin) : valeurs BMQ des patients pour les gènes SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

<b>Patient</b>	<b>Statut (F1 ou F2)</b>	<b>SPP1</b>	<b>A2M</b>	<b>VIM</b>	<b>IL8</b>	<b>CXCL10</b>	<b>ENG</b>
185	F2	0,269	1,409	0,052	0,963	0,388	0,593
194	F2	0,088	6,892	0,123	2,131	0,920	0,678
213	F2	0,241	6,105	0,089	14,082	3,758	0,986
218	F2	0,406	6,298	0,134	2,276	1,390	0,969
225	F2	0,129	3,127	0,057	5,396	2,166	0,620
232	F2	0,599	8,969	0,177	8,744	5,187	1,014
237	F2	0,201	7,701	0,053	1,224	0,605	1,106
239	F2	0,296	4,423	0,113	2,604	3,084	1,057
279	F2	0,002	2,136	0,058	11,209	0,204	0,557
294	F2	0,056	1,919	0,092	7,272	0,753	0,700
298	F2	0,063	2,395	0,076	10,422	0,369	0,530
325	F2	0,056	3,668	0,108	4,756	1,306	1,113
333	F2	0,014	8,282	0,168	7,291	6,589	1,102
343	F2	0,238	4,213	0,189	7,357	1,873	1,157

**Tableau 26 : valeurs BMQ des patients pour les gènes IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	IL6ST	p14ARF	MMP9	ANGPT2	CXCL11	MMP2
1	F1	0,101	0,000	7,336	1,772	0,168	0,204
8	F1	0,488	0,000	0,568	2,107	1,079	0,109
9	F1	0,213	0,026	0,853	4,228	0,082	0,077
11	F1	0,190	0,036	3,138	2,078	0,892	0,159
16	F1	0,049	0,003	1,091	1,061	0,420	0,064
22	F1	0,069	0,344	5,897	2,021	0,149	0,111
25	F1	0,155	0,009	0,244	1,952	0,031	0,095
26	F1	0,175	0,031	1,288	4,807	0,307	0,332
32	F1	0,143	0,027	3,053	5,081	0,175	0,180
33	F1	0,376	0,000	1,218	1,853	2,648	0,267
38	F1	0,236	0,013	0,595	4,611	0,441	0,083
40	F1	0,316	0,029	0,611	3,643	0,850	0,069
41	F1	0,060	0,024	1,834	0,997	0,094	0,141
46	F1	0,174	0,032	10,411	1,469	0,202	0,210
48	F1	0,115	0,034	1,197	3,681	0,572	0,060
56	F1	0,167	0,000	0,236	1,860	0,396	0,085
65	F1	0,093	0,038	2,612	3,531	0,345	0,096
66	F1	0,085	0,041	1,419	1,149	0,153	0,229
69	F1	0,124	0,000	0,933	1,828	0,183	0,109
74	F1	0,203	0,037	3,021	1,759	0,419	0,197
83	F1	0,307	0,020	2,888	2,685	0,662	0,111
86	F1	0,127	0,034	4,469	3,824	0,405	0,226
88	F1	0,144	0,000	2,158	2,454	0,144	0,040
91	F1	0,068	0,019	2,908	0,540	0,261	0,058
95	F1	0,129	0,037	2,594	2,378	0,066	0,104
98	F1	0,102	0,020	0,222	1,625	0,099	0,093
105	F1	0,042	0,023	0,717	1,613	0,023	0,005
107	F1	0,154	0,005	1,283	2,751	0,060	0,247
109	F1	0,070	0,011	1,235	1,602	0,126	0,100
113	F1	0,146	0,047	0,344	2,129	0,100	0,156
116	F1	0,177	0,132	0,000	8,056	1,735	0,128
125	F1	0,074	0,010	0,161	0,826	0,042	0,013
126	F1	0,076	0,025	0,798	1,464	0,074	0,061
134	F1	0,015	0,007	1,091	0,276	0,036	0,030
135	F1	0,067	0,011	1,121	1,809	0,195	0,027
139	F1	0,074	0,018	0,143	0,103	0,116	0,099

**Tableau 26 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	IL6ST)	p14ARF	MMP9	ANGPT2	CXCL11	MMP2
141	F1	0,067	0,025	3,238	0,180	0,766	0,024
143	F1	0,117	0,009	1,297	0,176	0,444	0,078
144	F1	0,128	0,012	0,653	0,366	0,597	0,142
145	F1	0,253	0,038	3,317	0,498	0,131	0,245
146	F1	0,032	0,028	0,534	0,143	0,007	1,352
151	F1	0,120	0,008	0,292	0,181	0,123	0,043
152	F1	0,188	0,012	0,444	0,403	0,165	0,029
153	F1	0,076	0,006	1,361	0,124	0,065	0,014
154	F1	0,263	0,017	0,093	0,312	0,182	0,018
155	F1	0,106	0,023	1,094	0,104	0,235	0,025
157	F1	0,156	0,019	0,473	0,534	0,898	0,029
159	F1	0,253	0,026	4,469	0,073	0,186	0,049
161	F1	0,171	0,013	0,853	0,097	0,061	0,038
163	F1	0,282	0,022	0,841	0,033	0,188	0,012
164	F1	0,188	0,007	0,758	0,097	0,166	0,041
165	F1	0,107	0,013	0,249	0,044	0,045	0,007
167	F1	0,160	0,035	3,618	0,041	0,390	0,057
169	F1	0,200	0,015	0,529	0,029	0,033	0,029
170	F1	0,162	0,010	0,507	0,042	0,007	0,046
171	F1	0,098	0,016	1,197	0,047	0,246	0,051
172	F1	1,741	0,000	8,664	0,000	0,147	0,030
175	F1	0,116	0,013	0,821	0,120	0,124	0,022
178	F1	0,202	0,016	0,345	0,088	0,087	0,024
182	F1	0,063	0,005	1,046	0,054	0,080	0,049
189	F1	0,202	0,015	0,127	0,076	0,300	0,052
210	F1	0,134	0,010	0,361	0,031	0,124	0,009
214	F1	0,157	0,005	0,247	0,132	0,379	0,039
216	F1	0,039	0,014	0,324	0,173	0,069	0,006
217	F1	0,454	0,006	0,053	1,521	0,092	0,053
219	F1	0,114	0,010	0,155	0,676	0,231	0,023
223	F1	0,112	0,009	0,053	0,702	0,277	0,031
224	F1	0,207	0,015	1,137	1,558	0,256	0,053
226	F1	0,314	0,013	1,711	1,315	0,208	0,036
227	F1	0,134	0,012	0,438	2,676	0,059	0,052
229	F1	0,257	0,022	1,061	1,490	2,454	0,027
235	F1	0,151	0,012	0,183	4,155	0,324	0,040

**Tableau 26 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	IL6ST	p14ARF	MMP9	ANGPT2	CXCL11	MMP2
240	F1	0,355	0,023	0,940	0,862	1,608	0,051
241	F1	0,169	0,009	0,582	0,940	0,115	0,018
243	F1	0,240	0,039	0,766	1,580	0,338	0,075
244	F1	0,631	0,037	0,722	2,549	0,574	0,064
245	F1	0,219	0,005	0,212	1,670	0,050	0,637
246	F1	0,215	0,012	0,182	0,593	0,315	0,053
247	F1	0,202	0,005	1,064	0,717	0,626	0,028
248	F1	0,151	0,007	3,605	0,247	0,184	0,033
249	F1	0,177	0,009	0,135	0,547	0,061	0,021
250	F1	0,041	0,000	0,350	1,209	0,079	0,022
257	F1	0,194	0,009	0,177	1,145	0,275	0,021
263	F1	0,354	0,003	0,351	2,395	0,277	0,030
264	F1	0,133	0,017	0,509	0,712	0,380	0,053
265	F1	0,047	0,009	0,291	0,923	0,024	0,008
269	F1	0,240	0,014	0,207	0,555	0,280	0,019
273	F1	0,238	0,004	0,091	0,584	0,135	0,015
275	F1	0,122	0,006	0,371	0,790	0,053	0,022
276	F1	0,115	0,007	1,165	0,267	0,084	0,054
277	F1	0,277	0,011	0,076	0,576	0,062	0,008
285	F1	0,122	0,011	0,774	0,859	0,101	0,053
286	F1	0,138	0,008	0,480	2,858	0,354	0,071
297	F1	0,205	0,012	0,590	1,202	0,521	0,035
305	F1	0,092	0,008	0,337	0,712	0,149	0,024
337	F1	0,116	0,000	0,163	0,463	0,059	0,013
338	F1	0,151	0,005	2,346	0,904	0,076	0,067
339	F1	0,313	0,006	0,804	1,952	0,182	0,093
340	F1	0,342	0,008	0,396	2,462	0,357	0,272
351	F1	0,206	0,000	0,332	2,204	0,111	0,014
357	F1	0,241	0,004	0,113	1,735	0,203	0,058
361	F1	0,144	0,004	1,014	0,653	0,148	0,094
2	F2	0,214	0,000	2,908	3,494	0,620	0,584
6	F2	0,601	0,000	36,002	20,749	0,490	0,152
7	F2	0,087	0,000	2,266	2,007	0,360	0,059
10	F2	0,049	0,012	1,772	12,553	0,712	0,136
12	F2	0,148	0,034	1,873	1,670	0,695	0,495
13	F2	0,050	0,037	0,460	2,049	0,225	0,014

**Tableau 26 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	IL6ST	p14ARF	MMP9	ANGPT2	CXCL11	MMP2
14	F2	0,048	0,029	6,364	1,602	0,075	0,169
17	F2	0,261	0,039	4,332	2,000	0,349	0,171
20	F2	0,142	0,028	3,127	2,959	0,184	0,052
23	F2	0,207	0,148	1,320	2,144	0,440	0,296
27	F2	0,090	0,077	1,439	1,035	0,198	0,246
28	F2	0,080	0,137	12,168	1,053	1,106	0,166
31	F2	0,131	0,044	1,279	2,732	0,644	0,124
34	F2	0,067	0,016	0,826	2,266	0,025	0,125
39	F2	0,159	0,000	1,784	3,329	0,144	0,290
42	F2	0,075	0,000	0,563	0,644	0,174	0,045
43	F2	0,108	0,038	2,676	2,049	0,378	0,264
44	F2	0,282	0,020	1,464	3,375	1,361	0,137
45	F2	0,286	0,068	8,515	5,081	0,927	0,326
50	F2	0,044	0,039	8,369	0,662	0,050	0,232
55	F2	0,086	0,065	0,986	1,647	0,164	0,132
58	F2	0,120	0,062	3,630	1,602	0,234	0,200
60	F2	0,191	0,000	2,594	10,339	0,222	0,076
63	F2	0,200	0,015	0,177	1,439	0,486	0,068
67	F2	0,098	0,068	1,682	3,010	0,146	0,129
72	F2	0,073	0,012	1,079	3,329	0,047	0,064
75	F2	0,175	0,121	1,091	3,732	1,790	0,491
76	F2	0,360	0,004	0,829	2,078	0,476	0,273
80	F2	0,116	0,041	0,969	0,648	0,425	0,046
87	F2	0,184	0,035	3,972	1,986	0,611	0,202
90	F2	0,176	0,017	4,611	3,918	0,301	0,198
92	F2	0,063	0,014	0,616	0,543	0,146	0,036
97	F2	0,077	0,017	1,227	4,000	0,089	0,064
114	F2	0,253	0,070	12,817	4,773	5,205	0,642
148	F2	0,363	0,072	0,551	0,525	0,351	0,125
160	F2	0,189	0,040	7,490	0,021	0,543	0,045
166	F2	0,054	0,000	8,515	0,000	0,007	0,278
168	F2	0,136	0,053	4,807	0,146	0,103	0,094
174	F2	0,100	0,047	1,137	0,000	0,688	0,034
176	F2	0,137	0,013	0,532	0,040	0,182	0,049
177	F2	0,158	0,032	0,502	0,064	0,387	0,033
179	F2	0,268	0,023	0,428	0,054	0,685	0,026

**Tableau 26 (suite et fin) : valeurs BMQ des patients pour les gènes IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	IL6ST	p14ARF	MMP9	ANGPT2	CXCL11	MMP2
185	F2	0,132	0,005	0,432	0,023	0,100	0,036
194	F2	0,138	0,023	1,257	0,061	0,191	0,050
213	F2	0,254	0,030	0,304	0,043	0,432	0,018
218	F2	0,108	0,017	0,057	4,405	0,257	0,113
225	F2	0,059	0,025	0,568	0,409	0,361	0,011
232	F2	0,419	0,036	1,809	1,699	0,886	0,138
237	F2	0,140	0,000	0,378	6,080	0,236	0,084
239	F2	0,290	0,034	0,620	1,094	0,502	0,057
279	F2	0,132	0,007	0,273	1,206	0,071	0,014
294	F2	0,211	0,010	0,260	1,404	0,087	0,020
298	F2	0,182	0,007	0,218	0,590	0,093	0,020
325	F2	0,162	0,011	1,449	1,039	0,228	0,090
333	F2	0,662	0,050	1,329	0,911	1,257	0,075
343	F2	0,173	0,006	2,445	1,490	0,186	0,126

**Tableau 27 : valeurs BMQ des patients pour les gènes MMP7, S100A41, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1****(Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

<b>Patient</b>	<b>Statut (F1 ou F2)</b>	<b>MMP7</b>	<b>S100A41</b>	<b>TIMP1</b>	<b>CHI3L1</b>	<b>COL1A1</b>	<b>CXCL1</b>
1	F1	0,150	1,338	0,252	0,547	0,727	2,329
8	F1	0,023	0,821	0,347	1,912	0,295	1,474
9	F1	0,018	0,979	0,198	0,009	0,226	0,151
11	F1	0,129	2,505	0,626	1,145	0,465	0,871
16	F1	0,007	1,083	0,121	0,011	0,151	0,200
22	F1	0,010	0,451	0,168	1,231	0,204	0,549
25	F1	0,005	0,717	0,288	1,459	0,637	0,448
26	F1	0,002	1,459	0,807	1,227	1,821	2,505
32	F1	0,026	1,000	0,383	1,366	0,446	0,688
33	F1	0,000	0,669	0,540	0,495	0,553	4,257
38	F1	0,023	0,877	0,195	0,856	0,184	0,409
40	F1	0,019	0,478	0,136	0,201	0,151	0,154
41	F1	0,009	0,880	0,263	0,017	0,369	0,555
46	F1	0,073	1,185	0,551	0,338	2,078	0,815
48	F1	0,006	0,821	0,241	0,313	0,227	0,296
56	F1	0,034	0,683	0,204	0,350	0,354	0,000
65	F1	0,033	1,161	0,296	0,051	0,344	0,429
66	F1	0,073	1,125	0,285	0,151	0,901	0,760
69	F1	0,020	0,471	0,176	0,191	0,325	0,536
74	F1	0,058	0,507	0,207	0,379	0,246	1,490
83	F1	0,020	0,933	0,244	0,801	0,790	0,431
86	F1	0,049	2,078	0,514	0,973	0,512	0,753
88	F1	0,065	0,572	0,158	0,065	0,293	0,252
91	F1	0,100	1,061	0,298	1,137	0,563	0,265
95	F1	0,029	0,683	0,245	0,688	0,470	0,285
98	F1	0,014	0,541	0,173	0,009	0,277	0,362
105	F1	0,010	0,580	0,166	0,012	0,387	0,187
107	F1	0,020	0,437	0,242	0,085	0,753	0,280
109	F1	0,012	0,940	0,182	0,350	0,378	0,247
113	F1	0,011	0,613	0,174	0,074	0,320	0,568
116	F1	0,007	1,014	0,388	0,712	0,514	0,396
125	F1	0,009	0,370	0,078	0,000	0,121	0,130
126	F1	0,017	0,467	0,276	0,178	0,177	0,503
134	F1	0,012	0,529	0,137	0,091	0,220	0,290
135	F1	0,021	1,032	0,133	0,247	0,149	0,669
139	F1	0,009	0,493	0,186	0,370	0,210	0,184

**Tableau 27 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes MMP7, S100A41, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	MMP7	S100A41	TIMP1	CHI3L1	COL1A1	CXCL1
141	F1	0,036	1,042	0,142	0,275	0,139	0,148
143	F1	0,021	0,607	0,228	0,184	0,246	0,252
144	F1	0,013	0,807	0,111	0,136	0,328	0,295
145	F1	0,237	1,380	0,232	0,225	1,079	1,454
146	F1	0,000	1,231	0,033	0,011	0,376	0,191
151	F1	0,013	0,607	0,076	0,226	0,260	0,071
152	F1	0,029	0,132	0,032	0,074	0,255	0,331
153	F1	0,003	0,226	0,140	0,106	0,278	0,213
154	F1	0,074	0,966	0,125	0,378	0,313	0,142
155	F1	0,008	1,181	0,284	0,277	0,382	0,251
157	F1	0,016	0,269	0,091	0,010	0,252	0,212
159	F1	0,124	0,669	0,135	0,164	0,382	0,267
161	F1	0,063	0,267	0,098	0,054	0,176	0,523
163	F1	0,051	0,000	0,184	1,380	0,578	0,519
164	F1	0,073	0,676	0,143	0,012	0,426	0,428
165	F1	0,013	0,362	0,088	0,035	0,061	0,104
167	F1	0,092	0,787	0,979	6,320	1,079	0,904
169	F1	0,029	0,295	0,136	0,004	0,168	0,062
170	F1	0,022	0,419	0,094	0,135	0,168	0,191
171	F1	0,093	0,904	0,184	0,232	0,440	0,838
172	F1	0,285	0,742	0,206	0,387	0,221	0,338
175	F1	0,292	0,678	0,222	1,145	0,258	0,787
178	F1	0,082	0,398	0,164	0,028	0,275	0,329
182	F1	0,019	0,481	0,170	0,022	0,325	0,207
189	F1	0,023	0,798	0,475	1,469	0,253	0,683
210	F1	0,035	0,434	0,088	0,111	0,090	0,055
214	F1	0,008	0,490	0,198	0,171	0,362	0,457
216	F1	0,013	0,454	0,089	0,082	0,102	0,110
217	F1	0,017	0,374	0,151	0,008	0,122	0,529
219	F1	0,022	0,534	0,158	0,023	0,164	0,221
223	F1	0,004	0,476	0,189	0,467	0,153	0,121
224	F1	0,042	0,856	0,177	0,277	0,865	0,829
226	F1	0,011	0,305	0,082	0,033	0,128	0,566
227	F1	0,021	0,169	0,045	0,012	0,070	0,136
229	F1	0,029	1,098	0,221	0,090	0,367	0,671
235	F1	0,019	0,229	0,108	0,943	0,134	0,225

**Tableau 27 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes MMP7, S100A41, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	MMP7	S100A41	TIMP1	CHI3L1	COL1A1	CXCL1
240	F1	0,026	0,710	0,310	0,252	0,418	0,818
241	F1	0,035	0,283	0,071	0,044	0,156	0,516
243	F1	0,076	0,599	0,306	1,986	0,618	1,320
244	F1	0,167	0,378	0,350	0,315	0,616	0,543
245	F1	0,002	5,152	0,785	0,030	4,014	0,719
246	F1	0,046	0,578	0,380	2,732	0,662	0,714
247	F1	0,067	0,434	0,188	0,033	0,340	0,337
248	F1	0,055	0,369	0,101	0,055	0,242	0,541
249	F1	0,006	0,135	0,268	1,699	0,121	0,072
250	F1	0,219	0,234	0,095	0,559	0,176	1,371
257	F1	0,015	0,237	0,167	0,275	0,195	0,444
263	F1	0,046	0,344	0,131	0,001	0,062	0,398
264	F1	0,023	0,518	0,250	0,146	0,473	0,099
265	F1	0,000	0,130	0,060	0,004	0,004	0,000
269	F1	0,013	0,559	0,116	4,925	0,150	0,176
273	F1	0,008	0,339	0,140	0,020	0,180	0,146
275	F1	0,022	0,366	0,159	0,576	0,092	0,117
276	F1	0,011	0,470	0,112	0,745	0,139	0,275
277	F1	0,014	0,418	0,055	0,102	0,087	0,077
285	F1	0,029	0,478	0,249	0,049	0,145	0,557
286	F1	0,037	0,572	0,228	0,639	0,252	0,127
297	F1	0,005	0,002	0,140	0,162	0,115	0,651
305	F1	0,037	0,241	0,121	0,245	0,107	0,286
337	F1	0,009	0,135	0,090	0,129	0,035	0,076
338	F1	0,026	0,370	0,277	0,116	0,483	0,338
339	F1	0,031	0,457	0,215	0,013	0,419	0,193
340	F1	0,099	0,812	0,465	0,239	0,847	0,336
351	F1	0,063	0,419	0,176	0,024	0,142	0,272
357	F1	0,017	0,478	0,255	0,057	0,669	0,204
361	F1	0,052	0,549	0,233	0,144	0,976	0,874
2	F2	0,151	1,664	0,631	0,460	1,828	4,891
6	F2	1,197	0,532	0,415	0,798	0,521	0,346
7	F2	0,072	1,189	0,245	0,082	0,408	1,181
10	F2	0,000	1,248	0,333	0,208	0,553	1,521
12	F2	0,119	2,868	0,787	0,914	2,412	1,429
13	F2	0,000	1,177	0,118	0,402	0,075	1,490

**Tableau 27 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes MMP7, S100A41, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	MMP7	S100A41	TIMP1	CHI3L1	COL1A1	CXCL1
14	F2	0,015	1,253	0,293	0,000	0,000	0,416
17	F2	0,006	0,883	0,616	0,401	0,288	0,467
20	F2	0,047	0,664	0,418	0,058	0,012	0,319
23	F2	0,020	0,862	0,856	0,092	0,657	1,500
27	F2	0,017	1,886	0,305	1,210	0,908	1,210
28	F2	0,042	1,753	0,710	3,719	0,188	0,375
31	F2	0,016	1,240	0,402	0,106	0,193	1,007
34	F2	0,003	0,398	0,197	0,124	0,334	0,094
39	F2	0,024	0,923	0,275	0,350	0,693	0,676
42	F2	0,012	0,416	0,199	0,429	0,174	0,226
43	F2	0,032	1,521	0,361	0,246	0,491	0,956
44	F2	0,035	1,400	0,305	0,235	0,258	0,540
45	F2	0,027	2,395	0,758	0,125	0,793	2,289
50	F2	0,009	1,210	0,396	0,166	1,892	0,747
55	F2	0,024	0,576	0,232	2,558	0,432	0,953
58	F2	0,024	0,664	0,211	0,386	0,807	0,413
60	F2	0,036	0,719	0,171	0,086	0,543	0,651
63	F2	0,023	0,880	0,310	3,084	0,175	0,420
67	F2	0,065	0,983	0,228	0,188	0,529	0,601
72	F2	0,025	0,620	0,207	0,244	0,374	0,067
75	F2	0,094	1,729	1,682	2,990	2,732	1,257
76	F2	0,050	0,859	0,415	5,579	0,671	0,844
80	F2	0,044	0,824	0,192	0,369	0,646	0,678
87	F2	0,093	1,575	0,639	1,564	1,288	1,735
90	F2	0,104	1,113	0,449	0,570	0,868	0,776
92	F2	0,017	0,874	0,185	0,025	0,113	0,157
97	F2	0,053	0,648	0,081	0,249	0,378	0,388
114	F2	0,165	2,211	0,609	0,807	1,439	3,494
148	F2	0,069	0,410	0,333	0,405	1,028	1,459
160	F2	0,110	1,083	0,228	0,370	0,536	1,165
166	F2	0,021	3,797	0,041	0,237	1,257	0,175
168	F2	0,102	1,253	0,212	0,432	0,883	1,366
174	F2	0,074	1,400	0,372	4,332	0,976	1,729
176	F2	0,051	0,467	0,173	0,437	0,454	0,732
177	F2	0,039	0,877	0,164	0,026	0,296	0,263
179	F2	0,036	0,563	0,255	0,114	0,523	0,366

**Tableau 27 (suite et fin) : valeurs BMQ des patients pour les gènes MMP7, S100A41, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	MMP7	S100A41	TIMP1	CHI3L1	COL1A1	CXCL1
185	F2	0,059	0,357	0,097	0,032	0,270	0,514
194	F2	0,030	0,422	0,209	0,346	0,309	1,072
213	F2	0,105	0,660	0,475	5,028	0,444	0,886
218	F2	0,144	0,719	0,326	0,431	0,859	0,853
225	F2	0,168	1,025	0,386	2,639	0,434	0,766
232	F2	0,139	0,920	0,521	2,313	0,760	1,952
237	F2	0,188	0,605	0,232	0,275	0,534	0,438
239	F2	0,042	0,238	0,195	0,184	0,570	1,310
279	F2	0,012	0,192	0,125	0,000	0,004	0,105
294	F2	0,019	0,312	0,133	0,296	0,068	0,311
298	F2	0,000	0,006	0,133	0,006	0,060	0,152
325	F2	0,010	0,660	0,237	0,089	0,221	0,366
333	F2	0,249	0,646	0,403	0,262	0,361	0,555
343	F2	0,022	0,470	0,152	0,015	0,574	0,292

**Tableau 28 : valeurs BMQ des patients pour les gènes CXCL6, IHH, IRF9, MMP1  
(Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	CXCL6	IHH	IRF9	MMP1
1	F1	7,863	0,259	0,120	0,000
8	F1	0,760	0,727	0,227	0,243
9	F1	3,084	0,212	0,176	0,044
11	F1	3,986	0,339	0,213	0,000
16	F1	1,608	0,044	0,109	2,828
22	F1	13,454	1,129	0,182	0,409
25	F1	0,737	0,155	0,102	0,000
26	F1	2,549	0,173	0,362	0,020
32	F1	20,821	0,847	0,177	0,509
33	F1	22,706	0,000	0,308	0,000
38	F1	1,057	0,166	0,254	0,042
40	F1	2,107	0,737	0,191	0,000
41	F1	4,807	0,162	0,082	0,000
46	F1	9,254	0,105	0,354	0,129
48	F1	1,091	0,164	0,192	0,061
56	F1	3,668	0,071	0,182	0,019
65	F1	1,772	0,292	0,334	0,073
66	F1	4,993	0,142	0,184	0,107
69	F1	3,719	0,742	0,142	0,000
74	F1	2,403	0,142	0,333	0,133
83	F1	10,411	0,124	0,302	0,000
86	F1	15,137	0,211	0,248	0,080
88	F1	3,117	0,271	0,159	0,000
91	F1	9,190	0,157	0,120	0,195
95	F1	4,925	0,221	0,092	0,082
98	F1	4,141	0,236	0,144	0,000
105	F1	2,858	0,307	0,121	0,000
107	F1	6,845	0,697	0,225	0,000
109	F1	3,411	0,352	0,149	0,000
113	F1	4,362	0,269	0,122	0,076
116	F1	2,523	0,176	0,525	0,000
125	F1	0,000	0,000	0,037	0,000
126	F1	47,177	0,153	0,115	0,027
134	F1	1,548	0,112	0,056	0,000
135	F1	6,409	0,000	0,074	0,133
139	F1	1,075	0,072	0,130	0,000

**Tableau 28 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes CXCL6, IHH, IRF9, MMP1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	CXCL6	IHH	IRF9	MMP1
141	F1	0,486	0,230	0,163	0,140
143	F1	2,114	0,235	0,093	0,036
144	F1	0,717	0,266	0,093	0,040
145	F1	26,723	0,356	0,273	0,000
146	F1	18,831	0,027	0,028	0,000
151	F1	0,454	0,000	0,132	0,035
152	F1	4,112	0,121	0,084	0,022
153	F1	0,045	0,100	0,092	0,000
154	F1	2,042	0,286	0,091	0,021
155	F1	0,776	0,203	0,148	0,063
157	F1	0,032	0,249	0,135	0,157
159	F1	3,249	0,166	0,246	0,055
161	F1	8,785	0,529	0,062	0,055
163	F1	6,892	0,184	0,128	0,025
164	F1	5,502	0,155	0,126	0,000
165	F1	4,377	0,050	0,059	0,074
167	F1	2,121	0,233	0,187	0,086
169	F1	1,357	0,271	0,053	0,109
170	F1	1,659	0,444	0,079	0,027
171	F1	23,344	0,109	0,136	0,057
172	F1	30,169	9,747	0,106	0,037
175	F1	1,279	0,126	0,136	0,055
178	F1	20,252	0,336	0,160	0,037
182	F1	2,235	0,173	0,067	0,057
189	F1	4,098	0,117	0,247	0,000
210	F1	1,537	0,119	0,111	0,032
214	F1	1,129	0,117	0,214	0,036
216	F1	0,060	0,108	0,047	0,093
217	F1	0,664	0,256	0,091	0,089
219	F1	4,317	0,050	0,140	0,057
223	F1	0,892	0,072	0,166	0,107
224	F1	1,329	0,131	0,163	0,027
226	F1	0,380	0,232	0,180	0,146
227	F1	0,369	0,415	0,100	0,000
229	F1	1,297	0,057	0,221	0,000
235	F1	1,061	0,141	0,119	0,066

**Tableau 28 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes CXCL6, IHH, IRF9, MMP1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	CXCL6	IHH	IRF9	MMP1
240	F1	1,619	0,324	0,186	0,000
241	F1	1,553	0,310	0,064	0,016
243	F1	10,520	0,114	0,098	0,093
244	F1	4,056	0,134	0,252	0,069
245	F1	0,785	0,018	0,058	0,064
246	F1	5,979	0,211	0,187	0,071
247	F1	1,945	0,107	0,094	0,109
248	F1	18,063	0,238	0,039	0,000
249	F1	1,125	0,242	0,091	0,000
250	F1	0,572	0,288	0,076	0,187
257	F1	0,000	0,215	0,091	0,000
263	F1	1,479	0,058	0,052	0,034
264	F1	8,456	0,164	0,211	0,071
265	F1	1,333	0,312	0,039	0,000
269	F1	0,000	0,099	0,079	0,058
273	F1	0,588	0,405	0,063	0,084
275	F1	0,182	0,061	0,029	0,000
276	F1	0,760	0,198	0,049	0,000
277	F1	0,000	0,093	0,082	0,000
285	F1	0,280	0,218	0,096	0,099
286	F1	0,653	0,316	0,111	0,107
297	F1	0,681	0,255	0,085	0,236
305	F1	0,298	0,279	0,033	0,064
337	F1	0,133	0,301	0,031	0,067
338	F1	0,467	0,165	0,038	0,036
339	F1	0,405	0,349	0,089	0,125
340	F1	0,771	0,367	0,201	0,041
351	F1	0,237	0,075	0,089	0,000
357	F1	2,042	0,419	0,060	0,049
361	F1	0,332	0,242	0,049	0,000
2	F2	6,409	0,309	0,486	0,265
6	F2	68,832	2,918	0,343	0,114
7	F2	5,579	0,182	0,132	0,000
10	F2	4,790	0,000	0,374	0,000
12	F2	16,622	0,405	0,285	0,862
13	F2	1,035	0,057	0,131	0,000

**Tableau 28 (suite) : valeurs BMQ des patients pour les gènes CXCL6, IHH, IRF9, MMP1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	CXCL6	IHH	IRF9	MMP1
14	F2	2,181	0,207	0,092	0,000
17	F2	1,474	0,257	0,399	0,000
20	F2	3,745	0,137	0,168	0,096
23	F2	3,784	0,278	0,294	0,150
27	F2	6,727	0,049	0,125	0,115
28	F2	8,664	0,323	0,219	0,000
31	F2	13,642	0,719	0,310	0,104
34	F2	3,668	0,261	0,086	0,000
39	F2	4,028	0,616	0,206	0,000
42	F2	1,003	0,345	0,129	0,000
43	F2	6,892	0,150	0,134	0,000
44	F2	2,266	0,264	0,326	0,122
45	F2	6,298	1,028	0,339	0,463
50	F2	2,979	0,491	0,219	0,103
55	F2	5,426	0,075	0,149	0,000
58	F2	6,233	0,422	0,358	0,000
60	F2	11,713	0,667	0,269	0,000
63	F2	3,053	0,144	0,283	0,236
67	F2	3,618	0,000	0,115	0,126
72	F2	5,187	0,514	0,064	0,225
75	F2	9,221	0,174	0,497	0,000
76	F2	13,177	0,648	0,276	0,074
80	F2	3,681	0,120	0,119	0,193
87	F2	12,906	0,216	0,388	0,053
90	F2	7,781	0,478	0,247	0,000
92	F2	0,624	0,200	0,083	0,000
97	F2	1,469	0,199	0,136	0,024
114	F2	11,081	0,416	0,963	0,000
148	F2	7,621	0,140	0,132	0,072
160	F2	10,483	0,171	0,167	0,055
166	F2	0,511	0,000	0,020	0,000
168	F2	2,313	0,209	0,093	0,113
174	F2	9,918	0,418	0,241	0,081
176	F2	10,375	0,347	0,127	0,049
177	F2	2,219	0,127	0,228	0,112
179	F2	5,483	0,158	0,214	0,028

**Tableau 28 (suite et fin) : valeurs BMQ des patients pour les gènes CXCL6, IHH, IRF9, MMP1 (Ct normalisé conformément à la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ )**

Patient	Statut (F1 ou F2)	CXCL6	IHH	IRF9	MMP1
185	F2	1,753	0,148	0,091	0,021
194	F2	5,696	0,184	0,198	0,079
213	F2	2,878	0,081	0,272	0,080
218	F2	3,506	0,107	0,149	0,031
225	F2	3,352	0,056	0,095	0,109
232	F2	47,340	0,074	0,208	0,000
237	F2	41,499	0,197	0,190	0,000
239	F2	6,190	0,247	0,219	0,000
279	F2	0,412	0,088	0,047	0,051
294	F2	0,150	0,262	0,084	0,090
298	F2	0,000	0,253	0,023	0,107
325	F2	0,622	0,768	0,136	0,000
333	F2	1,185	0,250	0,115	0,250
343	F2	0,712	0,220	0,081	0,000

## **2. Comparaison des valeurs de dosage des sous-populations F1 et F2 pour établir un modèle de classification**

Les valeurs de dosage obtenues au §1. ci-dessus pour les sous-populations F1 et F2 ont été comparées entre elles pour construire un modèle de classification qui, à partir de la combinaison de ces valeurs, induit un score de fibrose hépatique.

Un modèle de classification peut par exemple être obtenu en suivant une méthode d'analyse statistique multivariée, ou une méthode d'analyse mathématique multivariée.

### 10 Modèles mROC :

Une méthode d'analyse mathématique multivariée appropriée est la méthode mROC (méthode *Receiver Operating Characteristic* multivariée).

En utilisant les valeurs de dosage obtenues au §1. ci-dessus pour les sous-populations F1 et F2, des modèles mROC ont été construits comme décrit dans Kramar *et al.* 1999 et Kramar *et al.* 2001. A cet effet, le logiciel mROC version 1.0, disponible commercialement auprès des concepteurs (Andrew Kramar, Antoine Fortune, David Farragi, Benjamin Reiser) a été utilisé.

Andrew Kramar et Antoine Fortune peuvent être contactés auprès de, ou via, l'Unité de Biostatistique du Centre Régional de Lutte contre le Cancer (CRLC) Val d'Aurelle - Paul Lamarque (208, rue des Apothicaires ; Parc Euromédecine ; 34298 Montpellier Cedex 5 ; France).

David Faraggi et Benjamin Reiser peuvent être contactés auprès du, ou via le, Département de Statistique de l'Université de Haifa (Mount Carmel ; Haifa 31905 ; Israël).

A partir des données de dosage entrées, la méthode mROC génère une règle décisionnelle sous la forme d'une fonction linéaire  $[Z = f(\text{BMQ}_1, \text{BMQ}_2, \text{BMQ}_3, \dots)]$  du type  $Z = \alpha \cdot \text{BMQ}_1 + \beta \cdot \text{BMQ}_2 + \gamma \cdot \text{BMQ}_3 \dots$ ,

où  $\text{BMQ}_1, \text{BMQ}_2, \text{BMQ}_3 \dots$  sont les valeurs de dosage des niveaux d'expression de chacun des gènes choisis, et

l'utilisateur identifie la valeur de référence ou seuil ( $\delta$ ) qui confère les meilleures performances à cette combinaison.

Cette fonction et ce seuil constituent un modèle de classification multivariée.

La fonction  $f$  calculée par la méthode mROC a ensuite été appliquée aux valeurs de dosage du niveau d'expression des gènes  $BMQ_1, BMQ_2, BMQ_3 \dots$  mesurées pour un sujet test  $p$ . La valeur  $Z$  calculée pour un sujet test  $p$  a ensuite été comparée au seuil  $\delta$ .

- 5 Par exemple, lorsque la valeur moyenne de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis dans la cohorte « F2 » est supérieure à celle de la cohorte des individus « F1 » (*cf.* graphe du haut de la Figure 2) :

- si  $Z \geq \delta$ , le test est positif (sujet "pathologique") : il est déclaré que le sujet  $p$  présente un score de fibrose hépatique F2 ;

- 10 - si  $Z < \delta$ , le test est négatif (sujet "sain") : il est déclaré que le sujet  $p$  présente un score de fibrose hépatique F1.

Inversement, lorsque la valeur moyenne de la combinaison des niveaux d'expression desdits gènes choisis dans la cohorte « F2 » est inférieure à celle de la cohorte des individus « F1 »

- 15 - si  $Z \geq \delta$ , le test est négatif (sujet "sain") : il est déclaré que le sujet  $p$  présente un score de fibrose hépatique F1 ;

- si  $Z < \delta$ , le test est positif (sujet "pathologique") : il est déclaré que le sujet  $p$  présente un score de fibrose hépatique F2.

20 Modèles WKNN :

Une méthode d'analyse statistique multivariée appropriée est la méthode WKNN (*Weighed k Nearest Neighbors*).

- 25 En utilisant les valeurs de dosage obtenues au §1. ci-dessus pour les sous-populations F1 et F2, des modèles WKNN ont été construits comme décrit dans Hechenbichler et Schliep 2004.

Schématiquement, une méthode WKNN attribue chaque nouveau cas  $(y, x)$  à la classe  $l$  de poids maximal dans un voisinage à  $k$  voisins selon la formule :

$$l = \max_r \left( \sum_{i=1}^k K(D(x, x_{(i)})) I(y_{(i)} = r) \right)$$

- 30 où  $r$  représente l'indice des classes cliniques d'intérêt (en l'occurrence score de fibrose hépatique F1 ou F2), et est égal à 0 ou 1.

Pour construire les modèles WKNN, le logiciel R (bibliothèque WKNN), librement disponible sur <http://www.r-project.org/>, a été utilisé. Les paramètres de réglage suivants ont été utilisés :

- Kernel (K) : epanechnikov,
- 5 - Distance (D) : 2,
- Nombre de voisins (k) : 3,

ou

- Kernel (K) : triangulaire,
- Distance (D) : 2,
- 10 - Nombre de voisins (k) : 6.

Les modèles WKNN ainsi construits ont ensuite été utilisés pour déterminer le score de fibrose hépatique des sujets, en entrant les valeurs de dosage de ces sujets dans les modèles WKNN ainsi construits.

- 15 Les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes choisis d'un sujet test  $p$  ont été comparées à celles de ces voisins ( $k$ ). Le modèle WKNN calcule le poids devant être attribué à la classe « score F1 » et celui devant être attribué à la classe « score F2 » pour ce sujet  $p$ . Le sujet  $p$  est alors classé par le modèle WKNN dans la classe majoritaire (par exemple, dans la classe « score F2 » si les poids des classes F1 et F2 calculés par la
- 20 méthode WKNN étaient de 0,3 et 0,7, respectivement).

#### Modèles à forêt aléatoire :

- En utilisant les valeurs de dosage obtenues au §1. ci-dessus pour les sous-populations F1
- 25 et F2, des modèles à forêt aléatoires (*Random Forest* ou RF) ont été construits comme décrit dans Breiman 2001, Liaw et Wiener 2002.

A cet effet, le logiciel R, librement disponible sur <http://www.r-project.org/>, a été utilisé.

Les paramètres de réglage suivants ont été utilisés :

- NumberOfTrees = 500 ;
- 30 - NumberOfDescriptors = Sqrt(D).

Les données numériques listées dans le fichier sortie de R permettent d'évaluer les signatures avec le calcul des paramètres suivants : Vrai Positif (VP), Faux Positif (FP), Vrai Négatif (VN) et Faux Négatif (FN) (*cf.* ci-dessous).

Les données extraites du fichier sortie des modèles RF ainsi construits ont présenté la forme suivante :

“OOB estimate of error rate: 34.18%

*Confusion matrix:*

5		<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>Class. error</i>
	<i>F1</i>	71	31	0.3039216
	<i>F2</i>	23	33	0.4107143

*ROC score (out-of-bag data): 0.673”*

- 10 OOB est l’acronyme de *Out-Of-Bag*, et représente une évaluation de l’erreur. Ces données sorties indiquent directement les valeurs des paramètres VP (nombre de patients F2 qui ont été classés F2), FP (nombre de patients F1 qui ont été classés F2), VN (nombre de patients F1 qui ont été classés F1) et FN (nombre de patients F2 qui ont été classés F1).
- 15 Pour l’exemple présenté ci-dessus, on peut lire que :  
 VP = 33 ; FP = 31 ; VN = 71 et FN = 23.

Les valeurs de sensibilité (Se), de spécificité (Spe), de Valeur Prédictive Positive (VPP), et de Valeur Prédictive Négative (VPN) sont calculées par les formules suivantes :

- 20  $Se = VP / (VP + FN)$  ;  
 $Sp = VN / (VN + FP)$  ;  
 $VPP = VP / (VP + FP)$  ;  
 $VPN = VN / (VN + FN)$ .

- Les données sorties indiquent également de manière directe le taux d’erreur et le score  
 25 ROC du modèle construit.

- Les modèles RF ainsi construits ont ensuite été utilisés pour déterminer le score de fibrose hépatique de sujets tests. Les valeurs de dosage des niveaux d’expression des gènes de ces sujets tests ont été entrées dans un modèle RF, lequel génère des données sorties comme  
 30 ci-dessus présentées, et classe le sujet testé dans la classe « score F1 » ou « score F2 ».

Modèles à réseaux de neurones :

Une autre méthode d'analyse statistique multivariée appropriée est une méthode à réseaux de neurones. Schématiquement, un réseau de neurones comprend un graphe pondéré orienté dont les nœuds symbolisent les neurones. Le réseau est construit à partir des valeurs de dosage des sous-populations (en l'occurrence, F2 versus F1), et est ensuite  
 5 utilisé pour déterminer à quelle classe (en l'occurrence, F1 ou F2) appartient un nouvel élément (en l'occurrence, un patient test p).

En utilisant les valeurs de dosage obtenues au §1. ci-dessus pour les sous-populations F1 et F2, des modèles à réseaux de neurones ont été construits comme décrit dans Intrator et  
 10 Intrator 1993, Riedmiller et Braun 1993, Riedmiller 1994, Anastasiadis *et. al.* 2005 ; *cf.* <http://cran.r-project.org/web/packages/neuralnet/index.html>.

A cet effet, le logiciel R, librement disponible sur <http://www.r-project.org/>, a été utilisé (version 1.3 de *Neuralnet*, écrit par Stefan Fritsch et Frauke Guenther, suivant le travail de Marc Suling).

15 Les options de calcul suivantes ont été utilisées :

« *NumberOfHiddenNodes = 1 et 2*

*WeightDecayfactor = 0.001*

*CrossValidate = True*

*CrossValidationFolds = 5*

20 *MaxNumberIterations = 2000*

*MaxNumberWeights=2000* ».

Pour chacune des combinaisons, la matrice de confusion est extraite sous une forme du type suivant :

25 « *Cross-validation results (5-fold):*

	<i>Nodes</i>	<i>Decay</i>	<i>ROC</i>	<i>Score Best</i>
<i>1</i>	<i>1</i>	<i>0.001</i>	<i>0.7033</i>	
<i>2</i>	<i>2</i>	<i>0.001</i>	<i>0.7305</i>	<i>***</i>

*Contingency Table (best CV model):*

30

	<i>Predicted</i>	
<i>Actual</i>	<i>F2</i>	<i>F1</i>
<i>F2</i>	<i>25</i>	<i>19</i>
<i>F1</i>	<i>12</i>	<i>51</i>

Dans cet exemple, on observe que le meilleur modèle est le modèle 2, signalé par « \*\*\* » dans la colonne « ScoreBest ».

Ces données sorties indiquent directement les valeurs des paramètres VP (nombre de patients F2 qui ont été classés F2), FP (nombre de patients F1 qui ont été classés F2), VN (nombre de patients F1 qui ont été classés F1) et FN (nombre de patients F2 qui ont été classés F1). Pour l'exemple présenté ci-dessus, on peut lire que :

5 VP = 25, FP = 12, VN = 51, FN = 19.

Les paramètres d'évaluation, tels que la sensibilité (Se), la spécificité (Spe), la Valeur Prédicative Positive (VPP) et la Valeur Prédicative Négative (VPN), sont calculés (cf. formules de Se, Spe, VPP et VPN ci-dessus).

10

Le score ROC est extrait directement du fichier de sortie sur la ligne identifiée par « \*\*\* » qui correspond au meilleur modèle. Le taux d'erreur est calculé par la formule suivante :

$$\text{Class\_err} = (\text{FP} + \text{FN}) / (\text{FP} + \text{VP} + \text{FN} + \text{VN}).$$

15

Les modèles à réseau de neurones ainsi construits ont ensuite été utilisés pour déterminer le score de fibrose hépatique de sujets tests. Les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes de ces sujets tests ont été entrées dans un modèle à réseau de neurones, lequel génère des données sorties comme ci-dessus présentées, et classe le sujet testé dans la classe « score F1 » ou « score F2 ».

20

### **3. Exemples de modèles de classification obtenus :**

Les inventeurs ont ainsi identifié des gènes dont les niveaux d'expression constituent des biomarqueurs qui, lorsqu'ils sont pris en combinaison, sont pertinents pour déterminer le degré de fibrose hépatique d'un sujet.

25

Ces gènes sont les vingt-deux gènes suivants : SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10, ENG, IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

De manière particulièrement avantageuse, il peut être observé que ces vingt-deux gènes sont tous des gènes non-membranaires, c'est-à-dire des gènes qui codent pour une protéine dont la localisation est intracellulaire et/ou extracellulaire, et qui est donc susceptible d'être détectée dans un fluide biologique du sujet, tel que le sang.

30

Les inventeurs ont en outre identifié que les combinaisons les plus pertinentes comprennent toutes plusieurs gènes choisis parmi un sous-groupe de six gènes, à savoir SPP1, A2M, VIM, IL8, CXCL10 et ENG, plus particulièrement :

- au moins deux gènes parmi SPP1, A2M et VIM, et
- 5 - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG.

Les inventeurs ont ainsi identifié que des combinaisons particulièrement pertinentes comprennent les combinaisons répondant aux caractéristiques suivantes :

- au moins deux gènes parmi SPP1, A2M et VIM,
- au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG,
- 10 - optionnellement au moins un gène parmi les seize gènes suivants :  
IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1,  
COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1.

A titre illustratif, des exemples de combinaisons de biomarqueurs appropriées comprennent notamment les 29 combinaisons de biomarqueurs (combinaisons des niveaux  
15 d'expression des gènes) présentées dans le tableau 3 ci-dessus, en partie descriptive.

Des exemples de modèles de classification qui peuvent être mis en œuvre avec ces combinaisons de marqueurs sont présentés dans :

- les tableaux 4, 5, 8 ci-dessus,
- les tableaux 6, 7, 9 ci-dessus,
- 20 - les tableaux 10, 11 ci-dessus,
- les tableaux 12, 13 ci-dessus,

(en l'occurrence, exemples de modèles mROC).

D'autres exemples de modèles de classification peuvent être construits à partir de la méthode mROC, ou d'une autre méthode de classification (par exemple, méthode WKNN  
25 ou RF ou à réseau de neurones ; *cf.* paragraphe 2 ci-dessus).

Les combinaisons prédictives de l'invention sont des combinaisons des niveaux d'expression de gènes, choisis comme ci-dessus indiqué.

Il peut néanmoins être choisi de faire intervenir dans ces combinaisons un ou plusieurs facteurs autres que les niveaux d'expression de ces gènes, pour combiner cet ou ces autres  
30 facteurs et les niveaux d'expression des gènes choisis en une règle décisionnelle.

Cet ou ces autres facteurs sont préférablement choisis de sorte à construire un modèle de classification dont le pouvoir prédictif est encore amélioré par rapport au modèle qui ne comprendrait pas cet ou ces autres facteurs.

Cet ou ces autres facteurs peuvent par exemple être des facteurs cliniques, biologiques, virologiques, par exemple :

- un ou plusieurs facteurs cliniques, tels que sexe (féminin F ou masculin M), âge à la date du prélèvement (âge à PBH), indice de masse corporelle (IMC), indice de sensibilité à l'insuline (HOMA), diabète, consommation d'alcool, degré de stéatose, mode de contamination, activité Metavir ;

et/ou

- un ou plusieurs facteurs biologiques, tels que concentration en haptoglobine (Hapto), concentration en apolipoprotéine A1 (ApoA1), teneur en bilirubine totale (BLT), concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT), concentration en aspartate aminotransférase (AST), concentration en alanine aminotransférase (ALT), teneur en plaquettes (PLQ), taux de prothrombine (TP), teneur en cholestérol HDL (Chol-HDL), teneur en cholestérol total, concentration en ferritine, teneur glycémique (glycémie), concentration en peptide C, teneur en insuline, concentration en triglycérides (TG), teneur en albumine, coefficient de saturation en fer de la transferrine (CS), concentration en phosphatase alcaline (PAL) ;

et/ou

- un ou plusieurs facteurs virologiques, tels que génotype viral, durée de l'infection, charge virale mesurée chez le patient à la date du début du traitement (charge virale à J0), charge virale mesurée chez le patient à la date du prélèvement (charge virale à PBH).

**EXEMPLE 2 : ARN de ponction biopsie hépatique (PBH) / applications des modèles construits à des patients tests**

25

**a) exemple d'application de la combinaison des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, SPP1, CXCL10, IL8, S100A4 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus) :**

- 30 L'AUC relative à la combinaison des niveaux d'expression des gènes A2M, SPP1, CXCL10, IL8, S100A4 calculée sur la population d'étude complète de l'exemple 1 (n = 158 patients) est de 0,783 (cf. tableau 5 ci-dessus).

Par la méthode mROC (*cf.* exemple 1 ci-dessus), le seuil maximisant l'indice de Youden ( $\delta$ ) est de 0,321 (*cf.* tableau 5 ci-dessus). Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes : sensibilité (Se) = 70% ; spécificité (Sp) = 76% (*cf.* tableau 5 ci-dessus).

5

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

$$Z = 0,360 \times A2M^t - 0,047 \times CXCL10 + 0,025 \times IL8 + 0,332 \times S100A4 + 0,272 \times SPP1^t$$

(fonction Z16ARN ; *cf.* tableau 4 ci-dessus), où :

10 - A2M, CXCL10, IL8, S100A4 et SPP1 sont les valeurs de dosage des biomarqueurs BMQ, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes indiqués (en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ), et où

15 - l'exposant t (ici porté par A2M et SPP1) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :

$$BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1) / \lambda.$$

Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,33 pour A2M et de 0,12 pour SPP1 (*cf.* tableau 8 ci-dessus).

Si  $Z \geq 0,321$  : le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.

20 Si  $Z < 0,321$  : le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

Un exemple de prédiction sur 20 sujets (patients humains) est donné dans le tableau 18 ci-dessus, qui présente les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes choisis (valeurs BMQ obtenues par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$  ; *cf.* exemple 1 ci-dessus).

25 Un ou plusieurs facteurs cliniques, biologiques et virologiques peuvent être combinés aux cinq biomarqueurs indiqués ci-dessus (niveaux d'expression de cinq gènes), et conduire à une règle décisionnelle dont le pouvoir prédictif est encore supérieur à celui de la règle ci-dessus présentée.

30 Les tableaux 19 à 21 suivants présentent des exemples de tels facteurs cliniques, biologiques et virologiques, ainsi que leurs valeurs pour les sujets tests du tableau 18.

ND = non déterminé

**Tableau 18 : exemple d'application d'un modèle de classification basé sur la combinaison des niveaux d'expression des gènes A2M, SPP1, CXCL10, IL8, S100A4 (combinaison n°16 du tableau 3 ci-dessus)**

n° du sujet test	score de fibrose hépatique établi par PBH	modèle mROC (seuil = 0,321)							prédiction mROC
		A2M	CXCL10	IL8	S100A4	SPP1	Z		
8	F1	4,141	1,297	0,000	0,821	0,050	0,179	0	
9	F1	1,495	2,078	0,625	0,979	0,071	-0,220	0	
16	F1	1,352	0,000	1,237	1,083	0,105	-0,032	0	
22	F1	1,676	0,346	6,791	0,451	0,133	0,019	0	
38	F1	1,347	2,780	0,967	0,877	0,143	-0,174	0	
40	F1	2,151	4,857	0,423	0,478	0,117	-0,260	0	
41	F1	1,653	0,333	1,264	0,880	0,277	0,181	0	
48	F1	0,509	2,567	1,805	0,821	0,100	-0,569	0	
69	F1	1,664	0,509	2,936	0,471	0,223	0,032	0	
74	F1	2,063	1,765	5,772	0,507	0,067	-0,104	0	
177	F2	5,389	2,378	0,825	0,877	0,146	0,543	1	
179	F2	6,476	2,799	3,246	0,563	0,262	0,730	1	
194	F2	6,892	0,920	2,131	0,422	0,088	0,548	1	
213	F2	6,105	3,758	14,082	0,660	0,241	0,929	1	
218	F2	6,298	1,390	2,276	0,719	0,406	0,910	1	
225	F2	3,127	2,166	5,396	1,025	0,129	0,378	1	
232	F2	8,969	5,187	8,744	0,920	0,599	1,304	1	
237	F2	7,701	0,605	1,224	0,605	0,201	0,855	1	
239	F2	4,423	3,084	2,604	0,238	0,296	0,382	1	
343	F2	4,213	1,873	7,357	0,470	0,238	0,556	1	

**Tableau 19 (données cliniques) :**

n° sujet	sexe	âge à PBH	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	indice de sensibilité à l'insuline (HOMA)	diabète	consommation d'alcool (g/jour)	degré de stéatose	mode de contamination	activité Metavir
8	F	55	23	1,6	Non	0	0	Transfusion	1
9	M	31	25	1,3	Non	0	0	ND	1
16	M	34	23	0,8	Non	0	0	Nosocomiale	1
22	F	56	26	3,9	Non	0	1	Nosocomiale	1
38	F	45	27	1,5	Non	30	0	Toxicomanie	0
40	F	42	24	1,4	Non	0	1	Toxicomanie	1
41	M	49	26	2,2	Non	0	1	ND	1
48	F	52	40	3,6	Oui	0	1	ND	1
69	M	48	23	1,3	Non	0	0	Toxicomanie	1
74	F	51	27	1,4	Non	0	0	ND	1
83	F	51	26	ND	Non	ND	2	ND	1
177	M	51	26	1,6	Non	10	1	Toxicomanie	1
179	M	47	21	1,2	Non	0	0	Toxicomanie	1
194	F	62	19	1,3	Non	0	0	Transfusion	1
213	F	68	40	1,5	Non	0	1	Nosocomiale	1
218	M	54	20	1,7	Non	0	1	Transfusion	1
225	M	71	27	18,0	Oui	0	1	ND	2
232	F	57	35	4,1	Non	0	2	Transfusion	1
237	M	68	24	0,8	Oui	0	0	Nosocomiale	1
239	F	46	24	1,2	Non	0	0	Transfusion	1
333	F	60	19	ND	Non	0	1	Transfusion	1
343	F	19	22	ND	Non	0	1	Néo-natale	1

**Tableau 20 (données virologiques) :**

n° patient	génotype Viral	durée de l'infection (années)	charge virale à PBH (copies/mL . 10 <sup>3</sup> )
8	1	24	3975
9	4	ND	1509
16	4	ND	179
22	1	33	1116
38	1	17	5641
40	3	21	1823
41	4	ND	8286
48	2	ND	4911
69	1	25	13267
74	4	ND	2101
83	1	ND	1579
177	1	23	4743
179	4	25	5986
194	1	24	5051
213	1	41	2677
218	1	24	3706
225	3	ND	5406
232	1	18	2117
237	1	ND	1408
239	1	22	2476
333	1	40	2383
343	1	ND	305

**Tableau 21 (données biologiques) :**

n° sujet	A2M (g/L)	Hapto (g/L)	Apo A1 (g/L)	BLT ( $\mu\text{mol/L}$ )	GGT (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	PLQ ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	TP (%)	Chol-HDL (mmol/L)
8	3,13	1,29	1,63	7	28	60	98	293	100	1,27
9	1,84	0,92	1,58	12	82	40	63	209	100	1,28
16	2,57	0,82	1,42	11	34	78	157	186	100	1,08
22	3,52	0,93	2	14	50	74	119	175	95	0,66
38	1,78	0,93	2,24	10	70	33	42	265	100	1,89
40	1,69	0,86	1,99	6	22	43	79	288	100	0,58
41	2,83	1,8	1,37	20	23	35	64	207	93	1,1
48	1,78	1,83	2,01	11	53	32	48	270	100	1,95
69	2,41	1,81	1,66	9	30	40	64	224	100	1,27
74	1,72	1,08	1,51	16	25	43	40	211	91	1,49
83	ND	ND	ND	13	82	78	95	232	101	ND
177	4,14	0,97	1,49	14	153	41	76	210	102	1,06
179	3,26	0,36	1,4	13	105	34	36	217	100	1,27
194	3,5	0,82	1,75	10	24	72	94	157	92	1,55
213	3,7	0,23	1,82	11	102	71	89	246	96	1,35
218	2,99	0,45	1,67	18	47	25	41	194	90	1,46
225	3,6	0,47	1,64	13	64	52	49	268	96	1,17
232	3,23	0,95	2,09	8	90	115	212	196	97	1,86
237	2,63	1,21	1,66	14	24	44	49	226	98	1,44
239	2,56	0,98	2,62	9	47	103	164	291	100	2,49
333	3,38	0,63	1,44	16	51	119	191	159	100	ND
343	2,69	0,65	1,44	17	22	26	38	332	92	ND

**Suite et fin du Tableau 21 (données biologiques) :**

n° sujet	ferritine (µg/L)	glycémie (mmol/L)	peptide C (ng/mL)	insuline (µUI/mL)	TG (mmol/L)	albumine (g/L)	CS (%)	cholestérol total (mmol/L)	PAL (U/L)
8	ND	5	1,94	7,1	0,99	47	ND	5,4	69
9	99	4,5	1,9	6,7	1,04	48	59	4,4	59
16	101	5	1,2	3,5	1,49	59	19	4,8	61
22	390	5,2	3,2	16,7	0,8	44	27	3,7	93
38	39	5,4	1,9	6,1	0,76	43	30	5,4	58
40	24	4,4	1,7	7,1	1,19	45	17	4,7	49
41	178	4,7	2,6	10,3	1	42	37	5,0	56
48	92	6,7	2,33	12,0	0,66	42	19	6,5	173
69	178	4,2	1,99	6,8	1,74	57	35	7,2	61
74	14	3	1,89	10,2	0,86	45	17	5,3	55
83	71	5,6	ND	ND	0,76	44	37	3,68	97
177	339	4,8	2,29	7,6	0,76	46	46	4,7	36
179	41	4,8	1,77	5,7	0,39	48	15	3,3	57
194	129	4,3	1,66	6,7	0,91	48	38	5,2	33
213	172	4,6	1,93	7,5	0,73	42	30	3,3	83
218	156	5,6	2,35	6,7	1,03	40	48	4,3	44
225	26	14,5	4,39	27,9	1,01	48	16	4,6	93
232	399	5	4,73	18,6	0,98	42	28	4,9	64
237	20	8,3	0,73	2,3	0,85	41	29	5,0	58
239	170	4,6	1,81	5,6	0,93	50	29	6,6	97
333	259	4,5	ND	ND	1,26	51	42	4,5	96
343	305	4,3	ND	ND	ND	44	29	ND	41

**b) exemple d'application de la combinaison des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, VIM (combinaison n°4 dans le tableau 3 ci-dessus) :**

L'AUC relative à la combinaison des niveaux d'expression des gènes **A2M, CXCL10, IL8, SPP1, VIM** calculée sur la population d'étude complète de l'exemple 1 (n = 158 patients) est de 0,787 (*cf.* tableau 5 ci-dessus). Par la méthode mROC (*cf.* exemple 1), le seuil maximisant l'indice de Youden ( $\delta$ ) pour cette combinaison est de -0,764 (*cf.* tableau 5 ci-dessus). Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes : Sensibilité (Se) = 75% ; spécificité (Spe) = 70% (*cf.* tableau 5 ci-dessus).

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

10  $Z = 0,297 \times A2M^t - 0,046 \times CXCL10 + 0,020 \times IL8 + 0,274 \times SPP1^t + 0,253 \times VIM^t$   
(fonction Z4ARN ; *cf.* tableau 4 ci-dessus), où :

- A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et VIM sont les valeurs de dosage des biomarqueurs BMQ, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes indiqués (en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ), et

15 - l'exposant t (ici porté par A2M, SPP1 et VIM) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :  $BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1) / \lambda$ .

Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,33 pour A2M, 0,12 pour SPP1 et -0,23 pour VIM (*cf.* Tableau 8 ci-dessus).

Si  $Z \geq -0,764$  : le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.

Si  $Z < -0,764$  : le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

Un exemple de prédiction sur 20 sujets (patients humains) est donné dans le tableau 22 ci-dessus, qui présente les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes choisis (valeurs BMQ obtenues par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$  ; *cf.* exemple 1 ci-dessus).

Un ou plusieurs facteurs cliniques, biologiques et virologiques peuvent être combinés aux cinq marqueurs indiqués ci-dessus (niveaux d'expression de cinq gènes), et conduire à une règle décisionnelle dont le pouvoir prédictif est encore supérieur à celui de la règle ci-dessus présentée.

30 Les tableaux 19 à 21 ci-dessus présentent des exemples de tels facteurs cliniques, biologiques et virologiques, ainsi que leurs valeurs pour les patients tests du tableau 22.

**Tableau 22 : exemple d'application d'un modèle de classification basé sur la combinaison des niveaux d'expression des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et VIM (combinaison n°4 du tableau 3 ci-dessus)**

n° du sujet test	score de fibrose hépatique établi par PBH	modèle mROC (seuil = -0,764)							prédiction mROC
		A2M	CXCL10	IL8	SPP1	VIM	Z		
8	F1	4,141	1,297	0,000	0,050	0,170	-0,764	0	
9	F1	1,495	2,078	0,625	0,071	0,117	-1,281	0	
16	F1	1,352	0,000	1,237	0,105	0,120	-1,112	0	
38	F1	1,347	2,780	0,967	0,143	0,177	-1,029	0	
40	F1	2,151	4,857	0,423	0,117	0,142	-1,100	0	
41	F1	1,653	0,333	1,264	0,277	0,129	-0,815	0	
48	F1	0,509	2,567	1,805	0,100	0,119	-1,510	0	
69	F1	1,664	0,509	2,936	0,223	0,068	-1,116	0	
74	F1	2,063	1,765	5,772	0,067	0,119	-1,049	0	
83	F1	2,959	6,255	4,918	0,156	0,166	-0,821	0	
177	F2	5,389	2,378	0,825	0,146	0,102	-0,654	1	
179	F2	6,476	2,799	3,246	0,262	0,087	-0,462	1	
194	F2	6,892	0,920	2,131	0,088	0,123	-0,456	1	
213	F2	6,105	3,758	14,082	0,241	0,089	-0,335	1	
218	F2	6,298	1,390	2,276	0,406	0,134	-0,148	1	
232	F2	8,969	5,187	8,744	0,599	0,177	0,218	1	
237	F2	7,701	0,605	1,224	0,201	0,053	-0,599	1	
239	F2	4,423	3,084	2,604	0,296	0,113	-0,547	1	
333	F2	8,282	6,589	7,291	0,014	0,168	-0,716	1	
343	F2	4,213	1,873	7,357	0,238	0,189	-0,267	1	

**c) combinaison des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus), combinée en outre à un facteur clinique et à des facteurs biologiques :**

5

Un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou plusieurs facteurs biologiques et/ou un ou plusieurs facteurs virologiques peuvent être combinés aux niveaux d'expression de gènes sélectionnés conformément à l'invention (en l'occurrence, niveaux de transcription ARN mesurés dans un échantillon de PBH), et ainsi conduire à une règle décisionnelle dont le

10 pouvoir prédictif est encore supérieur à celui de la seule combinaison desdits niveaux d'expression.

Par exemple, la combinaison :

- des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4
- 15 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus ; *cf.* exemple 2a ci-dessus) mesurés sur les ARN d'un échantillon de PBH,
- de la valeur du facteur clinique « âge à la date du prélèvement » (Age), en l'occurrence âge à la date de la PBH, et
- des valeurs des (autres) facteurs biologiques suivants :
- 20     ○ concentration en triglycérides (TG ; concentration protéique dans le sérum),
- concentration en alanine aminotransférase (ALT ; concentration protéique dans le sérum),
- concentration en ferritine (Ferritine ; concentration protéique dans le sérum),

conduit à une règle décisionnelle dont l'aire sous la courbe ROC (AUC), calculée sur la

25 population d'étude complète de l'exemple 1 (n = 158 patients), est de 0,840 (alors qu'elle est de 0,783, lorsque la combinaison des niveaux d'expression des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4 est utilisée seule, sans être combinée au facteur clinique et aux autres facteurs biologiques ci-dessus indiqués).

30 Par la méthode mROC (*cf.* exemple 1), le seuil maximisant l'indice de Youden ( $\delta$ ) pour cette combinaison est de 8,014 (*cf.* tableau 11 ci-dessus).

Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes :

Sensibilité (Se) = 72% ; spécificité (Spe) = 82% (*cf.* tableau 11 ci-dessus).

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

$$Z = 0,272 \times A2M^t - 0,032 \times CXCL10 + 0,058 \times IL8 + 0,419 \times SPP1^t + 0,012 \times S100A4^t + 0,025 \times Age^t + 0,566 \times TG^t + 3,874 \times ALT^t - 0,039 \times Ferritine^t$$

(fonction Z16ARNsupp ; cf. tableau 10 ci-dessus), où :

5 - A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 sont les valeurs de dosage BMQ des biomarqueurs, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes indiqués (en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ) mesurés sur les ARN d'un échantillon de PBH,

- Age est l'âge du patient à la date du prélèvement,

10 - TG, ALT, et Ferritine sont les valeurs des facteurs biologiques indiqués (concentrations protéiques dans le sérum), et

- l'exposant t (ici porté par A2M, SPP1, S100A4, Age, TG, ALT et Ferritine) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :

15  $BMQ^t = (BMQ^t - 1) / \lambda$ .

Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,21 pour A2M, 0,04 pour SPP1, 0,48 pour S100A4, 0,79 pour Age, -0,22 pour TG, -0,41 pour ALT et 0,15 pour Ferritine (cf. tableau 11 ci-dessus).

Si  $Z \geq 8,014$  : le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.

20 Si  $Z < 8,014$  : le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

**d) combinaison des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, VIM (combinaison n°4 dans le tableau n°3 ci-dessus), combinée en outre à des facteurs biologiques :**

25 Un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou plusieurs facteurs biologiques et/ou un ou plusieurs facteurs virologiques peuvent être combinés aux niveaux d'expression de gènes sélectionnés conformément à l'invention (en l'occurrence, niveaux de transcription ARN mesurés dans un échantillon de PBH), et ainsi conduire à une règle décisionnelle dont le

30 pouvoir prédictif est encore supérieur à celui de la seule combinaison desdits niveaux d'expression.

Par exemple, la combinaison :

- des niveaux d'expression (ARN) des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, VIM combinaison n°4 dans le tableau 3 ci-dessus ; cf. exemple 2b ci-dessus) (en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ) mesurés sur les ARN d'un échantillon de PBH, et
  - 5 - des valeurs des (autres) facteurs biologiques suivants :
    - concentration en triglycérides (TG ; concentration protéique dans le sérum),
    - concentration en alanine aminotransférase (ALT ; concentration protéique dans le sérum),
    - 10 ○ concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT ; concentration protéique dans le sérum),
    - concentration en ferritine (Ferritine ; concentration protéique dans le sérum),
- conduit à une règle décisionnelle dont l'aire sous la courbe ROC (AUC), calculée sur la population d'étude complète de l'exemple 1 (n = 158 patients), est de 0,841 (contre 0,787 lorsque la combinaison des niveaux d'expression des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, VIM est utilisée seule, sans être combinée aux autres facteurs biologiques ci-dessus indiqués).

Par la méthode mROC (cf. exemple 1), le seuil maximisant l'indice de Youden pour cette combinaison est de 7,016 (cf. tableau 11 ci-dessus).

Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes :

20 Sensibilité (Se) = 80% ; spécificité (Spe) = 71% (cf. tableau 11 ci-dessus).

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

$$Z = 0,315 \times A2M^t - 0,043 \times CXCL10 + 0,058 \times IL8 + 0,383 \times SPP1^t + 0,064 \times VIM^t + 0,56 \times TG^t + 3,657 \times ALT^t + 0,188 \times GGT^t - 0,05 \times Ferritine^t$$

(fonction Z4ARNsupp ; cf. tableau 10 ci-dessus), où :

- 25 - A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et VIM sont les valeurs de dosage BMQ des biomarqueurs, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes indiqués (en l'occurrence valeur de Ct normalisée par la méthode du  $2^{-\Delta Ct}$ ) mesurés sur les ARN d'un échantillon de PBH,
- TG, ALT, GGT et Ferritine sont les valeurs des facteurs biologiques indiqués (concentrations protéiques dans le sérum), et
- 30 - l'exposant t (ici porté par A2M, SPP1, VIM, TG, ALT, GGT, Ferritine) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :

$BMQ = (BMQ^{\lambda} - 1) / \lambda$ .

Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,21 pour A2M, 0,04 pour SPP1, -0,26 pour VIM, -0,22 pour TG, -0,41 pour ALT, -0,12 pour GGT et 0,15 pour Ferritine (cf. tableau 11 ci-dessus).

- 5 Si  $Z \geq 7,016$  : le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.  
Si  $Z < 7,016$  : le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

**EXEMPLE 3 : Protéines sériques / constructions de modèles et applications à des patients tests**

10 **a) exemple de construction d'un modèle de classification multivariée à partir de la combinaison des niveaux d'expression sérique des protéines A2M, SPP1, CXCL10, IL8 et S100A4 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus) :**

- 15 Les niveaux d'expression des protéines A2M, SPP1, CXCL10, IL8 et S100A4 ont été mesurés dans le sérum de 228 patients qui, selon l'analyse d'une PBH prélevée sur chacun de ces patients, présentent :
- pour 149 d'entre eux : une fibrose de score F2 selon le système de score fibrotique Metavir (cohorte F2),
  - 20 - pour 79 d'entre eux : une fibrose de score F1 selon le système de score fibrotique Metavir (cohorte F1).

Les dosages protéiques ont été réalisés à l'aide des kits indiqués dans le tableau 29 ci-dessus, en suivant les recommandations du fabricant.

Tableau 29 : kits pour les dosages protéiques

Marqueurs	A2M (Alpha-2-Macroglobuline)	CXCL10/IP10	CXCL8/IL-8	SPP1 (Ostéopontine)	S100A4
<b>Kit EIA</b>	Human alpha2-Macroglobulin ELISA Quantitation Kit	Quantikine Human CXCL10/IP10 Immunoassay	Quantikine Human CXCL8/IL-8 Immunoassay	Quantikine Human Osteopontin Immunoassay	S100A4 ELISA Kit Circulex
<b>Fournisseur</b>	GenWay	R&D Systems	R&D Systems	R&D Systems	MBL International
<b>Référence</b>	40-288-20008F	DIP100	D8000C	DOST00	CY-8059
<b>Type d'ELISA</b>	Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich
<b>Types d'échantillons</b>	Sérum ou autres liquides biologiques	Sérum, plasma, salive, milieu de culture cellulaire	Sérum, plasma, milieu de culture cellulaire	Surmeant de culture cellulaire, lait maternel, urine et plasma	Extrait cellulaire, milieu de culture tissulaire et autres milieux biologiques
<b>Prise d'essai</b>	100µL (dilution 1/10000 )	75µL	50µL	50µL (dilution 1/25)	100µL (dilution -> 1/6)
<b>Phase solide</b>	pAc de lapin anti-A2M	mAc anti-IP10	mAc anti-IL8	mAc anti-SPP1	pAc anti-S100A4
<b>Conjugué</b>	pAc de lapin-HRP anti-A2M	pAc-HRP anti-IP10	pAc-HRP anti-IL8	pAc-HRP anti-SPP1	pAc-HRP anti-S100A4
<b>Sensibilité</b>	2,7 ng/mL	1,67 pg/mL	3,5 pg/mL	0,011 ng/mL	0,24 ng/mL
<b>Gamme de détection</b>	2,7-2000 ng/mL	7,8-500 pg/mL	31,2-2000 pg/mL	0,312-20 ng/mL	0,78-50 ng/mL

**Tableau 29 (suite et fin) : kits pour les dosages protéiques**

Marqueurs	A2M (Alpha-2-Macroglobuline)	CXCL10/IP10	CXCL8/IL-8	SPP1 (Ostéopontine)	S100A4
<b>Spécificité</b>	A2M humaine	IP10 native et recombinante, pas de réaction croisée avec BLC/BCA-1, ENA-78, GCP-2, GROa, GROg, IFN-g, IL-8, IL-8 ( <i>endothelial cell-derived</i> ), I-TAC, MIG, NAP-2, SDF-1a, SDF-1b humain recombinant, BLC/BCA-1, CRG-2 (IP-10), GCP-2, KC, MIG, SDF-1a souris recombinant et IL-8 porc recombinante	IL8 humaine et recombinante, pas de réaction croisée avec ANG, AR, CNTF, b-ECGF, EGF, Epo, FGF acide, FGF basique, FGF-4, FGF-5, FGF-6, G-CSF, GM-CSF, GROa, GROb, GROg, sgp130, HB-EGF, HGF, I-309, IFN-g, IGF-I, IGF-II, IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-1 sRI	Ostéopontine native et recombinante, pas de réaction croisée avec l'entérokinase humaine, MMP-3, MMP-7, la thrombine et avec l'ostéopontine de souris et de bœuf	S100A4, pas de réaction croisée avec S100P, S100A12

pAc = anticorps polyclonal

mAc = anticorps monoclonal

La distribution des concentrations sériques des protéines A2M, SPP1, CXCL10, IL8 et S100A4 selon le score de fibrose hépatique est présentée en Figure 5.

L'AUC relative à la combinaison des niveaux d'expression des protéines A2M, SPP1, CXCL10, IL8 et S100A4 calculée sur la population d'étude de 228 patients est de 0,694 (cf. tableau 7 ci-dessus).

Par la méthode mROC (cf. exemple 1), le seuil maximisant l'indice de Youden pour cette combinaison est de 2,905 (cf. tableau 7 ci-dessus).

Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes :

Sensibilité (Se) = 68% ; spécificité (Spe) = 67% (cf. tableau 7 ci-dessus).

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

$$Z = 0,241 \times A2M^t + 0,137 \times CXCL10^t + 0,001 \times IL8^t + 0,062 \times SPP1^t + 0,226 \times S100A4^t$$

(fonction Z16PROT ; cf. tableau 6 ci-dessus), où :

- A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 sont les valeurs de dosage BMQ des biomarqueurs, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux d'expression des gènes indiqués (en l'occurrence, concentration des protéines dans le sérum), et

- l'exposant t (ici porté par A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :

$$BMQ^t = (BMQ^{\lambda} - 1) / \lambda.$$

Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,46 pour A2M, 0,08 pour CXCL10, 0,05 pour IL8, 0,43 pour SPP1 et -0,15 pour S100A4 (cf. tableau 9 ci-dessus).

Si  $Z \geq 2,905$ , le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.

Si  $Z < 2,905$ , le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

Un exemple de prédiction sur 20 sujets (patients humains) est donné dans le tableau 19 ci-dessous, qui présente les valeurs de dosage (BMQ) des niveaux d'expression sérique des gènes choisis.

Un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou plusieurs facteurs biologiques et/ou un ou plusieurs facteurs virologiques peuvent être combinés aux niveaux d'expression sérique de protéines sélectionnées conformément à l'invention, et conduire à une règle décisionnelle dont le pouvoir prédictif peut être encore supérieur à celui de la règle ci-dessus présentée.

Les tableaux 19 à 21 ci-dessus présentent des exemples de tels facteurs cliniques, biologiques et virologiques, ainsi que leurs valeurs pour les patients tests du tableau 23.

**Tableau 23 : exemple d'application d'un modèle de classification basé sur la combinaison des niveaux d'expression sérique des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 (combinaison n°16 du tableau 3 ci-dessus)**

n° du sujet test	Score de fibrose hépatique établi par PBH	modèle mROC (seuil = 2,905)							
		A2M (mg/mL)	CXCL10 (pg/mL)	SPP1 (ng/mL)	IL8 (pg/mL)	S100A4 (ng/mL)	Z	Prédiction mROC	
9	F1	4,21	317,93	28,8	5,34	14,0420	2,4553	0	
11	F1	4,02	461,77	51	23,72	53,3067	2,8731	0	
18	F1	4	846,53	26,1	8,16	10,9538	2,5901	0	
21	F1	4,09	306,3	45,3	6,18	105,0504	2,8299	0	
22	F1	4,04	529,67	46,1	9,29	54,8824	2,8752	0	
26	F1	7,25	150,84	27,9	10,13	9,0630	2,5111	0	
32	F1	3,2	149,56	10,6	6,46	500,0294	2,3834	0	
35	F1	3,05	241,65	29,2	34,83	19,5252	2,3126	0	
38	F1	2,93	419,56	31,3	3,65	265,5756	2,7441	0	
40	F1	2,16	660,26	26,7	3,93	70,2605	2,5494	0	

**Tableau 23 (suite et fin) : exemple d'application d'un modèle de classification basé sur la combinaison des niveaux d'expression sérique des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et S100A4 (combinaison n°16 du tableau 3 ci-dessus)**

n° du sujet test	Score de fibrose hépatique établi par PBH	modèle mROC (seuil = 2,905)							Z	Prédiction mROC
		A2M (mg/mL)	CXCL10 (pg/mL)	SPP1 (ng/mL)	IL8 (pg/mL)	S100A4 (ng/mL)				
2	F2	9,19	268,86	29,9	7,87	127,2983		3,1541	1	
6	F2	14,45	564,09	53,4	7,87	8,4328		3,4643	1	
10	F2	5,02	692,35	34,4	5,9	41,7101		2,9172	1	
17	F2	7,16	430,95	39	7,87	44,3571		3,0504	1	
23	F2	13,8	338,51	38,3	16,07	93,5798		3,5387	1	
27	F2	6,79	522	45,6	18,62	85,1345		3,1905	1	
28	F2	7,14	643,05	27,7	10,13	392,9496		3,2816	1	
43	F2	6,19	557,47	51,9	16,92	492,5924		3,3739	1	
44	F2	8,21	496,77	45,4	20,89	19,3361		3,1003	1	
50	F2	9,15	403,28	22,7	8,44	303,4538		3,2592	1	

**b) combinaison des niveaux d'expression dans le sérum des protéines A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4 (combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus), combinée en outre à un facteur clinique et à des facteurs biologiques :**

5

Un ou plusieurs facteurs cliniques et/ou un ou plusieurs facteurs biologiques et/ou un ou plusieurs facteurs virologiques peuvent être combinés aux niveaux d'expression sériques de gènes sélectionnés conformément à l'invention (protéines sériques), et ainsi conduire à une règle décisionnelle dont le pouvoir prédictif est encore supérieur à celui de la seule

10

combinaison desdits niveaux d'expression sérique.

Par exemple, la combinaison :

- des niveaux sériques de traduction des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4 (*cf.* exemple 3a ; combinaison n°16 dans le tableau 3 ci-dessus),
- 15 - de la valeur du facteur clinique « âge à la date du prélèvement », en l'occurrence âge à la date de du prélèvement de sérum (Age), et
- des valeurs des (autres) facteurs biologiques suivants :
  - o concentration en triglycérides (TG ; concentration protéique dans le sérum),
  - 20 o concentration en alanine aminotransférase (ALT ; concentration protéique dans le sérum),
  - o concentration en gamma glutamyl transpeptidase (GGT ; concentration protéique dans le sérum),

20

conduit à une règle décisionnelle dont l'aire sous la courbe ROC (AUC), calculée sur la population d'étude complète de l'exemple 3a (n = 228 patients), est de 0,743 (alors qu'elle est de 0,694, lorsque la combinaison des niveaux sériques de traduction des gènes A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4 est utilisée seule, sans être combinée au facteur clinique et aux autres facteurs biologiques ci-dessus indiqués; *cf.* exemple 3a) ci-dessus).

25

30 Par la méthode mROC (*cf.* exemple 1), le seuil maximisant l'indice de Youden pour cette combinaison est de 8,792 (*cf.* tableau 13 ci-dessus).

Pour le choix de ce seuil, les performances de la combinaison sont les suivantes :

Sensibilité (Se) = 67% ; spécificité (Spe) = 72% (*cf.* tableau 13 ci-dessus).

Un exemple de règle décisionnelle est la règle suivante :

$$Z = 0,2 \times A2M^t + 0,05 \times CXCL10^t - 0,026 \times IL8^t + 0,051 \times SPP1^t + 0,204 \times S100A4^t + 0,020 \times Age^t + 0,266 \times TG^t + 3,354 \times ALT^t + 0,141 \times GGT^t$$

(fonction Z16PROTsupp ; cf. tableau 12 ci-dessus), où :

- A2M, CXCL10, IL8, SPP1 et VIM sont les valeurs de dosage BMQ des biomarqueurs, c'est-à-dire les valeurs de dosage des niveaux sériques de traduction des gènes indiqués (concentration des protéines dans le sérum),
- Age est l'âge du patient à la date du prélèvement,
- TG, ALT et GGT sont les valeurs des facteurs biologiques indiqués (concentrations protéiques dans le sérum), et
- l'exposant t (ici porté par A2M, CXCL10, IL8, SPP1, S100A4, Age, TG, ALT, GGT) indique que la valeur à appliquer dans la règle décisionnelle est la transformée Box-Cox (Box et Cox, 1964) de la valeur de dosage du niveau d'expression (BMQ) du gène considéré, afin de la normaliser selon la formule suivante :

$$BMQ^t = (BMQ^\lambda - 1) / \lambda.$$

- Dans l'exemple de règle décisionnelle ci-dessus indiquée, les paramètres  $\lambda$  sont de 0,46 pour A2M, 0,08 pour CXCL10, 0,05 pour IL8, 0,43 pour SPP1 et -0,15 pour S100A4, 0,9 pour Age, -0,27 pour TG, -0,13 pour GGT et -0,47 pour ALT (cf. tableau 13 ci-dessus).
- Si  $Z \geq 8,792$ , le test diagnostique est positif (prédiction mROC = 1), le sujet est déclaré 'F2'.
- Si  $Z < 8,792$ , le test est négatif (prédiction mROC = 0), le sujet est déclaré 'F1'.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anastasiadis et al. 2005** ; *New globally convergent training scheme based on the resilient propagation algorithm*. Neurocomputing 64: 253-270.
- 5 **Bedossa, Poynard**, pour le groupe Metavir français, **1996**. *An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C*. Hepatology 24: 289-93.
- Box et Cox 1964** ; *An analysis of transformations*. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 26: 211-243.
- 10 **Breiman 2001** ; *Random Forests*. Machine Learning 45 : 5-32.
- Castera et al. 2005** ; *Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C*; Gastroenterology 128:343–50.
- Chambers 2008** ; *Software for data analysis : programming with R*. Springer, New York,
- 15 ISBN 978-0-387-75935-7.
- Cole et al. 1983** ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030.
- Cole et al. 1985** ; *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96.
- Dalgaard 2008** ; *Introductory statistics with R*, 2<sup>nd</sup> edition, Springer, ISBN 978-0-387-79053.
- 20 **Falissard 2005** ; *Comprendre et utiliser les statistiques dans les sciences de la vie*, Masson.
- Goodman 2007** ; *Grading and staging systems for inflammation and fibrosis in chronic liver diseases*. Journal of Hepatology 47: 598–607.
- 25 **Hechenbichler et Schliep 2004** ; *weighed k-nearest-neighbor techniques and ordinal classification*. Sonderforschungsbereich 386, paper 399.
- Hastie, Tibishirani et Friedman, 2009** ; “*The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference and Prediction*”, 2<sup>nd</sup> Edition, Springer.
- Ikata et Gentleman 1996** ; *R : a language for data analysis and graphics*. Journal of
- 30 computational and graphical statistics 5: 299-314.
- Intrator et Intrator 1993** ; *Using Neural Nets for Interpretation of Nonlinear Models*. Proceedings of the Statistical Computing Section, San Francisco: American Statistical Society (eds), pages 244-249.
- Köhler and Milstein 1975** ; Nature 256: 495-497.

- Kosbor et al. 1983** ; Immunology Today 4: 72.
- Kramar et al. 1999** ; *Critères ROC généralisés pour l'évaluation de plusieurs marqueurs tumoraux*. Revue d'Epidémiologie et Santé Publique 47 :376-383.
- Kramar et al. 2001** ; *mROC: a computer program for combining tumour markers in predicting disease states*. Computer methods and programs in biomedicine 66: 199-207.
- 5 **Liaw et Wiener 2002** ; *Classification and regression by Random Forest*. R. News 2.3: 18-22.
- Livak et Schmittgen 2001** ; *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods 25: 402-408.
- 10 **Riedmiller 1994** ; *Rprop - Description and Implementation Details*. Technical Report. University of Karlsruhe.
- Riedmiller et Braun 1993** ; *A direct adaptive method for faster backpropagation learning: the RPROP algorithm*. Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks (ICNN), San Francisco, pages 586-591.
- 15 **Reiser et Faraggi 1997** ; *Confidence intervals for the generalized ROC criterion*. Biometrics 53: 644-652.
- Schmittgen et Livak 2008** ; *Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method*. Nature Protocols 3(6) : 1101-1108.
- Shaheen et al. 2007** ; *FibroTest and FibroScan for the prediction of hepatitis C-related fibrosis : a systematic review of diagnostic test accuracy*; Am. J. Gastroenterol. 102(11) : 2589-2600.
- 20 **Shapiro 1999** ; *The interpretation of diagnostic tests*. Statistical Methods in Medical Research, 8: 113-134.
- Su et Liu 1993** ; *Linear combinations of multiple diagnostic markers*. Journal of the American Statistical Association 88: 1350-1355.
- 25 **Swets 1988** ; *Measuring the accuracy of diagnostic systems*. Science 240, 1285-1293.
- Theodoridis et Koutroumbos 2009** ; *Pattern Recognition*. Academic Press, Elsevier. US 4 376 110 (au nom de Hybritech Inc.).
- WO 02/16949 A1** (au nom de Epigene).
- 30 **WO 2006/103570 A2** (au nom de Assistance Publique – Hôpitaux de Paris).
- WO 2006/082522 A1** (au nom de Assistance Publique – Hôpitaux de Paris).

## REVENDEICATIONS

1. **Méthode *in vitro*** pour déterminer le score de fibrose hépatique d'un sujet infecté par un ou des virus de l'hépatite, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

5 i) dans un échantillon préalablement obtenu à partir dudit sujet, doser les niveaux auxquels des gènes choisis sont transcrits ou traduits, lesdits gènes choisis dont on dose les niveaux de transcription ou de traduction étant la combinaison de gènes suivante :

- SPP1, et

- au moins un gène parmi A2M et VIM, et

10 - au moins un gène parmi IL8, CXCL10 et ENG, et

- de zéro à seize gènes parmi la liste des seize gènes suivants : IL6ST, p14ARF, MMP9, ANGPT2, CXCL11, MMP2, MMP7, S100A4, TIMP1, CHI3L1, COL1A1, CXCL1, CXCL6, IHH, IRF9, MMP1,

15 ii) comparer les valeurs de dosage de chacun desdits gènes choisis obtenues pour ledit sujet, à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

20 2. La méthode de la revendication 1, dans laquelle la comparaison de l'étape ii) est faite en combinant les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet dans un modèle de classification multivariée, qui compare ces valeurs à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

25

3. La méthode de la revendication 1 ou 2, dans laquelle la comparaison de l'étape ii) est faite en combinant les valeurs de dosage obtenues pour ledit sujet dans un modèle de classification multivariée préalablement construit comme suit :

30 a) pour une population d'individus qui sont de la même espèce que ledit sujet, et qui sont infectés par le ou les mêmes virus de l'hépatite que ledit sujet, déterminer le score de fibrose hépatique de chacun desdits individus de la population, et les classer en sous-populations selon leur score de fibrose hépatique, constituant ainsi des cohortes de référence établies selon leur score de fibrose hépatique ;

- b) dans au moins un échantillon qui a été préalablement obtenu à partir de chacun desdits individus, dont la nature est identique à celle de l'échantillon dudit sujet, doser le niveau de transcription ou de traduction de chacun desdits gènes choisis ;
- 5 c) faire une comparaison inter-cohorte des valeurs de dosage obtenues à l'étape b), ou de la distribution de ces valeurs de dosage, pour construire un modèle de classification multivariée, qui induit une valeur de score de fibrose hépatique à partir de la combinaison des niveaux de transcription, ou le cas échéant de traduction, desdits gènes choisis.
- 10
4. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, qui est une méthode pour déterminer si la fibrose hépatique dudit sujet a un score fibrotique Metavir d'au plus F1 ou bien d'au moins F2, et dans laquelle lesdites cohortes sont :
- une cohorte d'individus dont la fibrose hépatique a un score de fibrotique Metavir d'au plus F1, et
  - 15 - une cohorte d'individus dont la fibrose hépatique a un score fibrotique Metavir d'au moins F2.
5. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la
- 20 comparaison de l'étape ii) est réalisée par combinaison desdites valeurs de dosage obtenues à l'étape i) dans une fonction mathématique, notamment une fonction linéaire ou non linéaire, plus particulièrement une fonction linéaire, pour obtenir une valeur de sortie indicatrice du score de fibrose hépatique dudit sujet.
- 25 6. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la comparaison de l'étape ii) est réalisée par combinaison desdites valeurs de dosage obtenues à l'étape i) dans un modèle d'apprentissage automatique multivarié, par exemple un modèle de classification non paramétrique multivariée, un modèle heuristique multivarié, ou un modèle de prédiction probabiliste multivariée, pour obtenir une valeur
- 30 de sortie indicatrice du score de fibrose hépatique dudit sujet.
7. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans laquelle le classement dudit sujet dans celle de ces cohortes de référence vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance est fait avec :

- une sensibilité (Se) d'au moins 67%, d'au moins 68%, d'au moins 69%, d'au moins 70%, ou d'au moins 71%, ou d'au moins 72%, ou d'au moins 73%, ou d'au moins 74%, ou d'au moins 75% ; et/ou avec une
  - spécificité (Sp) d'au moins 67%, d'au moins 68%, d'au moins 69%, d'au moins 70%, ou 5 d'au moins 71%, ou d'au moins 72%, ou d'au moins 73%, ou d'au moins 74%, ou d'au moins 75% ; et/ou avec
  - une Valeur Prédictive Négative (VPN) d'au moins 80%, ou d'au moins 81%, ou d'au moins 82%, ou d'au moins 83% ou d'au moins 84% ; et/ou avec
  - une Valeur Prédictive Positive (VPP) d'au moins 50%, ou d'au moins 55%, ou d'au 10 moins 56%, ou d'au moins 57%, ou d'au moins 58%, ou d'au moins 59% ou d'au moins 60% ;
- de préférence avec au moins avec ladite VPN et/ou ladite sensibilité, plus particulièrement avec au moins ladite VPN et ladite sensibilité et ladite spécificité.

- 15 8. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle ledit modèle de classification multivariée présente une aire sous la courbe ROC (AUC) d'au moins 0,60, d'au moins 0,61, d'au moins 0,66, plus particulièrement d'au moins 0,69, encore plus particulièrement d'au moins 0,70, d'au moins 0,71, d'au moins 0,72, d'au moins 0,73, d'au moins 0,74, plus particulièrement d'au moins 0,75, encore plus particulièrement d'au 20 moins 0,76, encore plus particulièrement d'au moins 0,77, notamment d'au moins 0,78, d'au moins 0,79 , d'au moins 0,80.

9. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, dans laquelle lesdits gènes choisis à l'étape i) comprennent A2M et/ou IL8.

25

10. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans laquelle :
- le nombre total desdits gènes choisis à l'étape i) est de quatre ou cinq ; et/ou dans laquelle
  - lesdits gènes choisis à l'étape i) ne comprennent qu'un ou deux gène(s) parmi ladite liste 30 de seize gènes, ou n'en comprennent pas.

11. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle lesdits gènes choisis à l'étape i) comprennent, ou sont :

- SPP1, A2M, IL8, CHI3L1 et IL6ST (combinaison n°1) ; ou

- SPP1, A2M, IL8, ANGPT2 et IL6ST (combinaison n°2) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP2 (combinaison n°3) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, VIM et CXCL10 (combinaison n°4) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP9 (combinaison n°5) ; ou
  - 5 - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP1 (combinaison n°6) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, VIM, et ENG (combinaison n°7) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et IL6ST, (combinaison n°8) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL1 et IL6ST (combinaison n°9) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8 et VIM (combinaison n°10) ; ou
  - 10 - SPP1, A2M, IL8, COL1A1 et IL6ST (combinaison n°11) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL11 et IL6ST (combinaison n°12) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et ENG (combinaison n°13) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et TIMP1 (combinaison n°14) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, IHH et IL6ST (combinaison n°15) ; ou
  - 15 - SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et S100A4 (combinaison n°16) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, IL6ST et MMP7 (combinaison n°17) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, ENG et CXCL11 (combinaison n°18) ; ou
  - SPP1, A2M, ENG et MMP9 (combinaison n°19) ; ou
  - SPP1, A2M, CXCL10 et ENG (combinaison n°20) ; ou
  - 20 - SPP1, A2M, CXCL10, p14ARF et MMP9 (combinaison n°21) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL6 et IL6ST (combinaison n°22) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8 et S100A4 (combinaison n°23) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, ANGPT2 et MMP7 (combinaison n°24) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et p14ARF (combinaison n°25) ; ou
  - 25 - SPP1, A2M, IL8 et TIMP1 (combinaison n°26) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8 et p14ARF (combinaison n°27) ; ou
  - SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et IRF9 (combinaison n°28) ; ou
  - SPP1, IL8, VIM et MMP2 (combinaison n°29).
- 30 12. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, dans laquelle, en sus de SSP1, lesdits gènes choisis à l'étape i) comprennent :
- A2M, et
  - IL8 et/ou MMP9, de préférence IL8,

ou

- A2M et/ou IL8, et
- zéro gène parmi ladite liste de seize gènes, ou un ou plusieurs gènes parmi ladite liste de seize gènes, parmi lesquels au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4, p14ARF, CHI3L1, plus particulièrement zéro gène parmi ladite liste de
- 5 seize gènes ou un ou plusieurs gènes parmi ladite liste de seize gènes, parmi lesquels au moins un ou deux gènes parmi IL6ST, MMP9, S100A4.

13. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, dans laquelle lesdits gènes choisis à l'étape i) comprennent, ou sont :

- 10 - SPP1, A2M, IL8, CHI3L1 et IL6ST (combinaison n°1) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, VIM et CXCL10 (combinaison n°4) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, VIM, et ENG (combinaison n°7) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et VIM (combinaison n°10) ; ou
- SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et ENG (combinaison n°13) ; ou
- 15 - SPP1, A2M, ENG et MMP9 (combinaison n°19) ; ou
- SPP1, A2M, CXCL10, p14ARF et MMP9 (combinaison n°21) ; ou
- SPP1, A2M, IL8 et S100A4 (combinaison n°23).

14. La méthode selon l'une quelconque des revendication 11 à 13, dans laquelle :

- 20 - les gènes choisis à l'étape i) sont les gènes de l'une desdites combinaisons n°1 à n°29,
- à l'étape i), on dose les niveaux auxquels chacun de ces gènes choisis sont transcrits, et
- la comparaison de l'étape ii) est réalisée en combinant lesdites valeurs de dosage obtenues à l'étape i) dans la fonction linéaire Z qui est indiquée pour cette combinaison de gènes dans le tableau 4, et, optionnellement, par comparaison de la valeur de sortie ainsi
- 25 obtenue au seuil  $\delta$  indiqué pour cette fonction Z dans le tableau 5.

15. La méthode selon l'une quelconque des revendication 11 à 13, dans laquelle :

- les gènes choisis à l'étape i) sont SPP1, A2M, IL8, CXCL10 et S100A4 (combinaison n°16),
- 30 - à l'étape i), on dose les niveaux auxquels ces gènes choisis sont traduits, et
- la comparaison de l'étape ii) est réalisée en combinant lesdites valeurs de dosage obtenues à l'étape i) dans la fonction linéaire Z qui est indiquée pour cette combinaison de

gènes dans le tableau 6, et, optionnellement, par comparaison de la valeur de sortie ainsi obtenue au seuil  $\delta$  indiqué pour cette fonction Z dans le tableau 7.

16. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, dans laquelle :

- 5 - en sus de doser le niveau auquel les gènes choisis à l'étape i) sont transcrits ou traduits, on dose, mesure ou détermine, pour ledit sujet, la valeur de :
- 10 - un ou plusieurs facteur(s) clinique(s), tels qu'un ou plusieurs facteur(s) clinique(s) choisis(s) parmi : sexe, âge à la date du prélèvement, indice de masse corporelle, indice de sensibilité à l'insuline, diabète, consommation d'alcool, degré de stéatose, mode de contamination, activité Metavir ; et/ou
  - un ou plusieurs facteur(s) virologique(s), tels qu'un ou plusieurs facteur(s) virologique(s) choisis(s) parmi : génotype viral, durée de l'infection, charge virale mesurée chez le patient à la date du début du traitement, charge virale mesurée chez le patient à la date du prélèvement ; et/ou
  - 15 - un ou plusieurs facteur(s) biologique(s) autre(s) que les niveaux de transcription ou de traduction desdits gènes choisis, tels qu'un ou plusieurs facteur(s) biologique(s) choisis(s) parmi : concentration en haptoglobine, concentration en apolipoprotéine A1, teneur en bilirubine totale, concentration en gamma glutamyl transpeptidase, concentration en aspartate aminotransférase, concentration en alanine aminotransférase (ALT), teneur en plaquettes, taux de prothrombine, teneur en cholestérol HDL, teneur en cholestérol total, concentration en ferritine, teneur glycémique, concentration en peptide C, teneur en insuline, concentration en triglycérides, teneur en albumine, coefficient de saturation en fer de la transferrine, concentration en phosphatase alcaline,
  - 20 et dans laquelle
  - à l'étape ii), on compare la(les) valeur(s) de cet(ces) facteur(s) et les valeurs de dosage du niveau de transcription ou traduction desdits gènes choisis à l'étape i), à leurs valeurs, ou à la distribution de leurs valeurs, dans des cohortes de référence pré-établies selon leur score de fibrose hépatique, pour classer ledit sujet dans celle de ces cohortes de référence
  - 30 vis-à-vis de laquelle il a la plus forte probabilité d'appartenance.

17. La méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, dans laquelle ledit échantillon préalablement obtenu à partir dudit sujet est :

- un échantillon biologique préalablement prélevé dudit sujet, ou
  - un échantillon comprenant des acides nucléiques et/ou protéines et/ou polypeptides et/ou peptides extraits ou purifiés dudit échantillon biologique, ou
  - un échantillon comprenant des ADNc susceptibles d'avoir été obtenus par
- 5 transcription inverse desdits acides nucléiques,

lesdits acides nucléiques étant de préférence des ARN, notamment des ARNm,

ledit échantillon biologique étant de préférence :

- un échantillon biologique de tissu ou de cellules préalablement prélevé ou collecté du foie dudit sujet, par exemple par préalable ponction biopsique hépatique ou par
- 10 préalable cyto-ponction hépatique, ou
- un échantillon de fluide biologique dudit sujet, tel qu'un échantillon de sang, de sérum, de plasma ou d'urine.

**18. Article manufacturé** comprenant des réactifs en préparation combinée pour leur utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, lesdits réactifs étant constitués :

15

- de réactifs qui détectent de manière spécifique chacun des produits de transcription ou de traduction de 3 à 40 gènes humains, lesdits 3 à 40 gènes humains comprenant lesdits gènes choisis conformément à l'une quelconque des revendications 1 à 17, et optionnellement

d'autres gènes humains,

20 et

- optionnellement, de réactifs qui détectent de manière spécifique un ou des virus de l'hépatite et/ou le ou les génotypes de virus de l'hépatite.

**19. Article manufacturé** comprenant des réactifs en préparation combinée pour leur utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, lesdits réactifs comprenant des réactifs qui détectent de manière spécifique chacun des produits de transcription ou de traduction de gènes choisis conformément à l'une quelconque des revendications 1 à 17.

25

**20. Article manufacturé** comprenant des réactifs en préparation combinée pour leur utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans une méthode pour le traitement d'une hépatopathie qui comporte une atteinte tissulaire du foie d'un sujet, plus particulièrement pour le traitement d'une fibrose hépatique, lesdits réactifs comprenant

30

des réactifs qui détectent de manière spécifique chacun des produits de transcription ou de traduction de gènes choisis conformément à l'une quelconque des revendications 1 à 17.

21. L'article manufacturé de l'une quelconque des revendications 18 à 20, dans lequel  
5 lesdits réactifs sont des acides nucléiques qui s'hybrident de manière spécifique à l'ARN desdits gènes choisis conformément à l'une quelconque des revendications 1 à 17, et/ou à l'ADNc obtenu par transcription inverse de ces ARN, ou sont des protéines, polypeptides ou peptides qui se lient de manière spécifique aux protéines codées par lesdits gènes choisis.

10

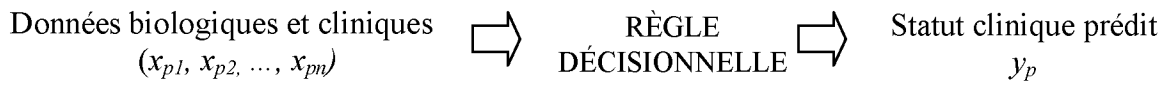
22. L'article manufacturé de l'une quelconque des revendications 18 à 21, dans lequel lesdits réactifs sont des amorces d'amplification et/ou des sondes acides nucléiques, ou sont des anticorps ou fragments d'anticorps ou des aptamères protéiques, polypeptidiques ou peptides.

15

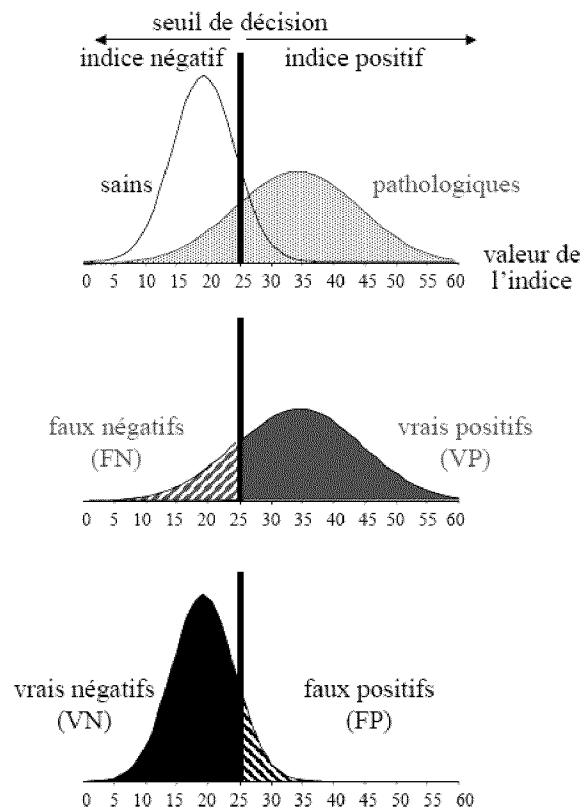
23. L'article manufacturé de l'une quelconque des revendications 18 à 22, dans lequel lesdits réactifs sont contenus dans un ou des tubes, ou dans les puits d'une plaque d'amplification d'acide nucléique destinée à recevoir un échantillon contenant des acides nucléiques et un mélange réactionnel d'amplification d'acide nucléique, ou dans les puits  
20 d'une plaque de titrage protéique, plus particulièrement une plaque de microtitrage protéique, par exemple une plaque ELISA, ou sur des microbilles ou sur une puce pour la détection et la quantification d'acides nucléiques, protéines, polypeptides ou peptides.

**24. Produit programme d'ordinateur**, destiné à être stocké dans une mémoire d'une  
25 unité de traitement, ou sur un support mémoire amovible destiné à coopérer avec un lecteur de ladite unité de traitement, caractérisé en ce qu'il comprend des instructions pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

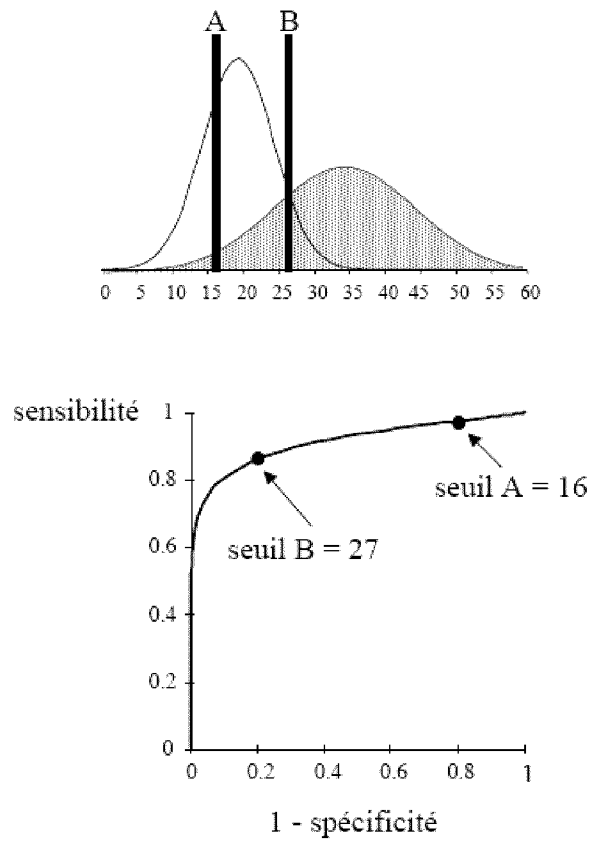
**25. Dispositif informatique**, comprenant une unité de traitement dans la mémoire de  
30 laquelle sont stockés un produit programme d'ordinateur selon la revendication 24, et des valeurs de dosage des niveaux de transcription et/ou de traduction desdits gènes choisis tels que définis à l'une quelconque des revendications 1 à 17.



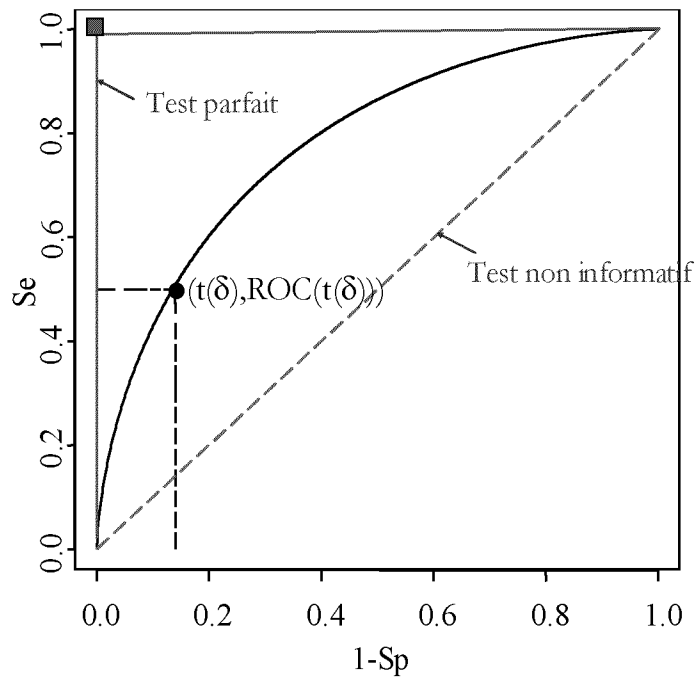
**FIGURE 1**



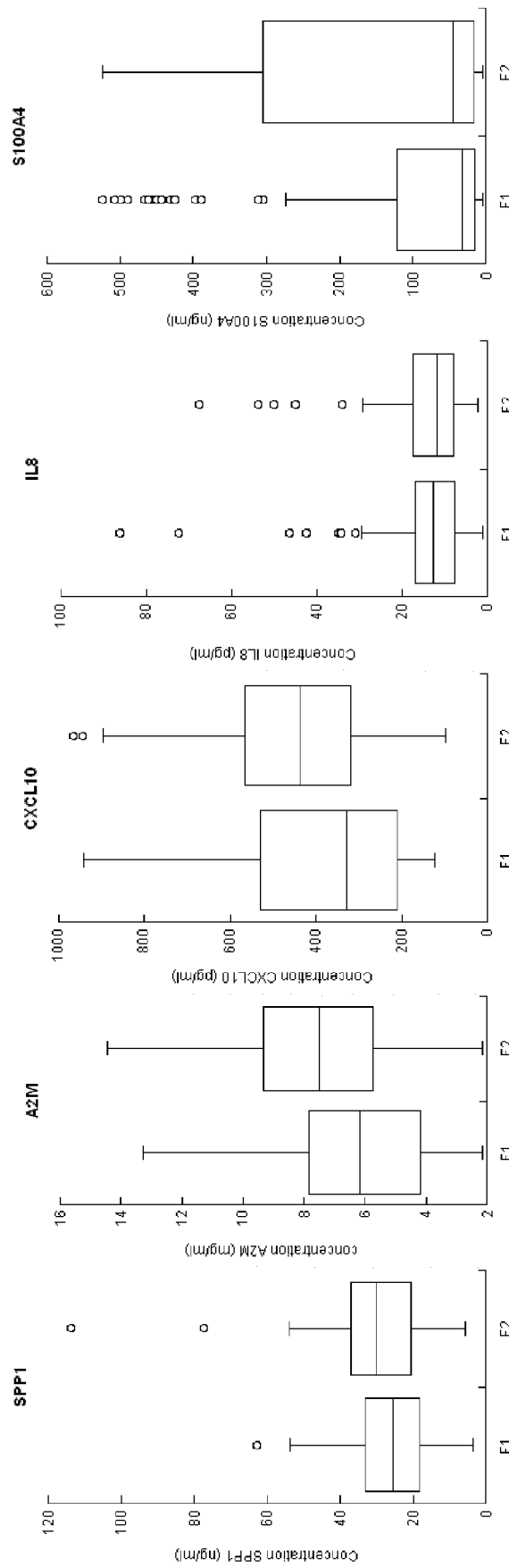
**FIGURE 2**



**FIGURE 3**



**FIGURE 4**



**FIGURE 5**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/EP2012/052234

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

**B. FIELDS SEARCHED**  
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q  
  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/203553 A1 (ABDEEN SUAD M [KW] ET AL) 12 August 2010 (2010-08-12) abstract, fig. 1, [0010]-[0013], claims 1-18 -----	1-25
X	US 6 631 330 B1 (POYNARD THIERRY [FR]) 7 October 2003 (2003-10-07) abstract, col. 1, l. 44-62, col. 2, l. 61-67 jusqu'à col. 4, l. 22, col. 7, l. 3-17, col. 8, l. 34-50), fig. 4 -----	1-25
A	US 2010/136579 A1 (TSENG TZU-LING [TW] ET AL) 3 June 2010 (2010-06-03) abstract -----	1-25
A	US 2010/041069 A1 (LEDERKREMER GERARDO ZELMAR [IL]) 18 February 2010 (2010-02-18) abstract, [0058] -----	1-25
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

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

Date of the actual completion of the international search  29 May 2012	Date of mailing of the international search report  25/06/2012
--	--

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  Lapopin, Laurence
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2012/052234

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2007/172907 A1 (VOLKER MICHAEL [DE] ET AL) 26 July 2007 (2007-07-26) abstract, [0020]-[0047] -----	1-25
A	SHIN HYOUNG DOO ET AL: "SPP1 polymorphisms associated with HBV clearance and HCC occurrence", INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY, vol. 36, no. 5, October 2007 (2007-10), pages 1001-1008, XP002668356, ISSN: 0300-5771, DOI: 10.1093/IJE/DYM093 the whole document -----	1-25
A	SCHMILOVITZ-WEISS HEMDA ET AL: "Serum globulin levels in predicting the extent of hepatic fibrosis in patients with recurrent post-transplant hepatitis C infection.", CLINICAL TRANSPLANTATION, vol. 21, no. 3, May 2007 (2007-05), pages 391-397, XP002668362, ISSN: 0902-0063 the whole document -----	1-25

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2012/052234
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010203553	A1	12-08-2010	NONE
US 6631330	B1	07-10-2003	IL 154566 A 29-04-2010 US 6631330 B1 07-10-2003
US 2010136579	A1	03-06-2010	CN 102301237 A 28-12-2011 TW 201027073 A 16-07-2010 US 2010136579 A1 03-06-2010 WO 2010065541 A2 10-06-2010
US 2010041069	A1	18-02-2010	NONE
US 2007172907	A1	26-07-2007	NONE

<p>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE                  INV. C12Q1/68                  ADD.</p>		
<p>Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB</p>		
<p>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</p>		
<p>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)                  C12Q</p>		
<p>Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche</p>		
<p>Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)                  EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS</p>		
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</p>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2010/203553 A1 (ABDEEN SUAD M [KW] ET AL) 12 août 2010 (2010-08-12) abstract, fig. 1, [0010]-[0013], claims 1-18 -----	1-25
X	US 6 631 330 B1 (POYNARD THIERRY [FR]) 7 octobre 2003 (2003-10-07) abstract, col. 1, l. 44-62, col. 2, l. 61-67 jusqu'à col. 4, l. 22, col. 7, l. 3-17, col. 8, l. 34-50), fig. 4 -----	1-25
A	US 2010/136579 A1 (TSENG TZU-LING [TW] ET AL) 3 juin 2010 (2010-06-03) abrégé -----	1-25
A	US 2010/041069 A1 (LEDERKREMER GERARDO ZELMAR [IL]) 18 février 2010 (2010-02-18) abstract, [0058] -----	1-25
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
<p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&amp;" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  29 mai 2012		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  25/06/2012
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  Lapopin, Laurence

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 2007/172907 A1 (VOLKER MICHAEL [DE] ET AL) 26 juillet 2007 (2007-07-26) abstract, [0020]-[0047] -----	1-25
A	SHIN HYOUNG DOO ET AL: "SPP1 polymorphisms associated with HBV clearance and HCC occurrence", INTERNATIONAL JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY, vol. 36, no. 5, octobre 2007 (2007-10), pages 1001-1008, XP002668356, ISSN: 0300-5771, DOI: 10.1093/IJE/DYM093 le document en entier -----	1-25
A	SCHMILOVITZ-WEISS HEMDA ET AL: "Serum globulin levels in predicting the extent of hepatic fibrosis in patients with recurrent post-transplant hepatitis C infection.", CLINICAL TRANSPLANTATION, vol. 21, no. 3, mai 2007 (2007-05), pages 391-397, XP002668362, ISSN: 0902-0063 le document en entier -----	1-25

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2012/052234

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2010203553	A1	12-08-2010	AUCUN
US 6631330	B1	07-10-2003	IL 154566 A 29-04-2010 US 6631330 B1 07-10-2003
US 2010136579	A1	03-06-2010	CN 102301237 A 28-12-2011 TW 201027073 A 16-07-2010 US 2010136579 A1 03-06-2010 WO 2010065541 A2 10-06-2010
US 2010041069	A1	18-02-2010	AUCUN
US 2007172907	A1	26-07-2007	AUCUN