

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 mars 2006 (02.03.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/021673 A2

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

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/002053

(22) Date de dépôt international : 8 août 2005 (08.08.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
04292013.2 6 août 2004 (06.08.2004) EP

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **NEU-ROLAB** [FR/FR]; 53 Boulevard du Général Martial Valin, F-75015 PARIS (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **LEPOR-RIER, Nathalie** [FR/FR]; 4 Place Louis Guilloard, F-14000 CAEN (FR). **HERROU, Michel** [FR/FR]; 8, rue Moulin, F-14210 GRAVUS (FR). **FELDBLUM, Sophie** [FR/FR]; 24, avenue de Suffren, F-75015 PARIS (FR). **SIMONIN, Pierre-Yves** [FR/FR]; 112, Boulevard Clemenceau, F-76600 LE HAVRE (FR). **CORNUEL, Jean-François** [FR/FR]; 21, rue du Départ, F-75014 PARIS (FR).

(74) Mandataires : **ORES, Béatrice** etc.; CABINET ORES, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 PARIS (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont requises

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MARKERS AND METHODS FOR PRENATAL SCREENING OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS

(54) Titre : MARQUEURS ET PROCEDES POUR LE DEPISTAGE PRENATAL D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

(57) Abstract: The invention concerns prenatal screening of chromosomal aberrations, more particularly, through identification of novel markers of chromosomal aberrations, in particular, trisomy 21, whereof the assay based on a body fluid of the pregnant woman enables, alone or in combination with other assays, the probability that the fetus suffers from a chromosomal aberration to be more accurately determined than that by currently used tests.

(57) Abrégé : Dépistage prénatal d'anomalies chromosomiques, plus particulièrement, par l'identification de nouveaux marqueurs d'anomalies chromosomiques, notamment de la trisomie 21, dont le dosage à partir d'un échantillon de fluide biologique de la femme enceinte permet, seul ou en combinaison avec d'autres dosages, de déterminer la probabilité que le fœtus soit atteint d'une anomalie chromosomique, avec une précision supérieure à celle des tests actuellement utilisés.

WO 2006/021673 A2

MARQUEURS ET PROCEDES POUR LE DEPISTAGE PRENATAL D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES

La présente invention concerne le dépistage prénatal d'anomalies chromosomiques. Plus particulièrement, l'invention est basée sur l'identification de nouveaux marqueurs d'anomalies chromosomiques, notamment de la trisomie 21, dont le dosage à partir d'un échantillon de fluide biologique de la femme enceinte permet, seul ou en combinaison avec d'autres dosages, de déterminer la probabilité que le fœtus soit atteint d'une anomalie chromosomique, avec une précision supérieure à celle des tests actuellement utilisés.

La trisomie 21 ou Syndrome de Down est la plus fréquente des anomalies chromosomiques viables. A l'origine de handicaps psychomoteurs, elle affecte une naissance sur 800, et sachant qu'environ 800 000 naissances sont observées en France, l'incidence est de 1000 enfants trisomiques par an.

Son phénotype caractéristique permet le diagnostic clinique à la naissance. Environ 40% des enfants atteints de trisomie 21 sont également porteurs de malformations, dont les plus fréquentes sont des cardiopathies congénitales. Leur espérance de vie est maintenant de plus de 50 ans.

Le risque de trisomie augmente avec l'âge maternel, surtout après 35 ans (croissance exponentielle). Le risque est également augmenté si l'un des parents est porteur d'une translocation équilibrée ou si le couple a déjà donné naissance à un enfant avec anomalie chromosomique. Les anomalies fœtales dépistées à l'échographie peuvent également conduire à la prescription d'un caryotype fœtal.

Le dépistage anténatal de la trisomie 21 consiste en l'étude du caryotype fœtal, soit sur cellules amniotiques, soit sur cellules trophoblastiques, soit sur sang de cordon. Le prélèvement est à risque de fausse couche. Le caryotype est un examen long qui se pratique en laboratoire spécialisé et autorisé par le Ministère de la Santé. Il est donc réservé à une population de femmes dites "à risque élevé d'anomalies chromosomiques".

La proportion de cas de trisomie 21 dépistés sur des critères d'âge maternel et de signes d'appel échographiques est actuellement d'environ un tiers. Cependant la prévalence de la trisomie 21 à la naissance n'a pas significativement diminuée en raison de l'augmentation régulière de l'âge moyen des femmes enceintes.

Depuis 1980, la prise en charge du caryotype fœtal par l'Assurance Maladie est fixée par voie réglementaire (Arrêté du 29 octobre 1991 paru au Journal officiel du 16 novembre 1991). Le caryotype fœtal est pris en charge financièrement en présence de l'une des indications suivantes :

- 5 1. Âge de la femme égal ou supérieur à 38 ans à la date du prélèvement
2. Anomalie chromosomique parentale
3. Antécédent, pour le couple, de grossesse(s) avec caryotype anormal
4. Diagnostic du sexe pour les maladies liées au sexe
5. Signes d'appel échographiques suivants : anomalies morphologiques du fœtus
- 10 démontrées, internes ou externes, retard de croissance intra-utérin avéré, anomalies de quantité de liquide amniotique.

Depuis quelques années, de nombreuses équipes cherchent donc à identifier un ou des marqueurs sériques mesurables dans le sang maternel et qui pourraient permettre une évaluation du risque sérique maternel sur une population
15 plus large.

En 1984, un premier marqueur sérique maternel de risque, l'alpha-fœtoprotéine (AFP), a été identifié : le taux d'AFP, en moyenne plus bas dans les grossesses avec trisomie 21, peut être utilisé pour calculer le risque de trisomie. En 1987, un autre marqueur, l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) s'est révélé
20 plus élevé dans les grossesses avec trisomie 21. Depuis, beaucoup d'autres marqueurs sériques de risque de trisomie 21 ont été identifiés.

Les marqueurs les plus étudiés ont été : l'hCG, l'AFP, l'oestriol non conjugué (uE3), la sous-unité β de l'hCG. Chaque marqueur utilisé individuellement est moins performant que son association à un ou plusieurs autres.

25 En France, une étude pilote nationale multicentrique et plusieurs études régionales ont été effectuées. La demande des femmes s'est progressivement affirmée et, en 1994, plus de 10% des femmes enceintes ont eu un dosage de marqueurs sériques.

Ainsi, en France, depuis 1997, les marqueurs sériques maternels
30 (hCG, uE3 et AFP) sont dosés et pris en charge par la Sécurité Sociale. Le test est coté B145 soit 39 euros 15. Un prélèvement de sang entre la 15^{ème} et la 18^{ème} semaine d'aménorrhée, pour le dosage d'au moins deux de ces marqueurs, est effectué,

permettant un calcul de risque tenant compte du risque *a priori* de l'âge de la mère modulé selon les valeurs observées de ces marqueurs. Le risque seuil considéré comme décisionnel pour proposer un dépistage prénatal (amniocentèse) est arbitrairement fixé à 1/250.

5 Le dosage des marqueurs sériques n'établit pas à lui seul le diagnostic de trisomie 21. C'est un test de dépistage qui permet d'estimer le risque de présence d'un enfant trisomique 21.

 L'évaluation du risque de trisomie 21 par dosage des marqueurs sériques chez les femmes qui le souhaitent est largement effectuée aujourd'hui. En
10 1998, une étude menée par l'INSERM permettait d'estimer le nombre de dosages à 572000 soit 76 % des naissances (certainement 85 % en 2004).

 Cette politique est également appliquée dans les autres pays européens et anglo-saxons où la fréquence de la trisomie 21 est la même.

 La sensibilité du dépistage est d'environ 60 % si le seuil de risque
15 choisi pour accéder à l'amniocentèse est de 1/250. Cela conduit à proposer une amniocentèse à environ 5 % des femmes enceintes. La valeur prédictive positive (spécificité) est de l'ordre de 1 à 2 %. La sensibilité du dépistage est meilleure, à taux d'amniocentèse égal, si les marqueurs sont plus discriminants et combinés entre eux. Les combinaisons les plus utilisées actuellement sont le triple test (hCG + AFP + uE3)
20 et les doubles tests, hCG + AFP ou hCG + uE3, ce dernier étant le meilleur.

 Les faux-positifs du dépistage sont les amniocentèses à caryotype normal. Le nombre de faux-positifs doit être réduit le plus possible du fait du risque de perte foetale après amniocentèse (environ 1 %). Par ailleurs, ils peuvent générer une grande anxiété chez les femmes dans l'attente des résultats du caryotype.

25 Les faux négatifs du dépistage sont les cas de trisomie 21 non dépistés. Ils aggravent le choc émotionnel au moment de la naissance. En effet, les couples ayant bénéficié d'un dosage de marqueurs sériques comprennent mal la notion de risque résiduel et pensent souvent que le test est un moyen diagnostique. L'échec du dépistage est alors durement ressenti.

30 Cette situation n'est pas satisfaisante dans la mesure où elle laisse passer 30 à 40 % des grossesses avec trisomie 21. Il faut trouver une technique visant à augmenter la sensibilité et la spécificité, réduire le nombre de procédures inutile-

ment invasives (faux positifs) et surtout réduire le nombre de faux négatifs (30 à 40 %).

D'autres procédures sont en cours d'évaluation et non remboursées par la Sécurité Sociale, notamment les marqueurs sériques du premier trimestre de la grossesse. Il s'agit de la protéine PAPP-A (*pregnancy associated plasma protein A*), de la sous-unité bêta libre de hCG et de la mesure de la clarté nucale à 12 semaines d'aménorrhée. Certaines équipes essayent également de mettre au point la mise en évidence de cellules fœtales ou de l'ADN fœtal libre dans le sang maternel sans parvenir aujourd'hui à un dépistage efficace.

Les performances des marqueurs sériques dépendent de la stratégie choisie : seuil de risque au-delà duquel une amniocentèse est proposée, nature des marqueurs utilisés, et type d'associations entre eux. Certaines combinaisons de marqueurs sont plus performantes que d'autres (Wald et al, Lancet, 2003, 8, 361, 855-6).

Une étude récente portant sur 120 000 grossesses a montré que les fœtus trisomiques 21 détectés en prénatal par les marqueurs sériques ou anomalies échographiques (clarté nucale) auraient avorté spontanément plus que les fœtus trisomiques non détectables par ces méthodes (Leporrier N. et al., BJOG, 2003, 110, 1, 18-21). Ceci diminue donc l'efficacité de ce dépistage et incite à rechercher d'autres bio-marqueurs plus performants.

Dans une démarche originale visant à découvrir de nouveaux biomarqueurs plus spécifiques de la trisomie 21, et/ou à déterminer un profil d'expression particulier, basé sur plusieurs molécules, les inventeurs ont conduit des études à partir de 280 sérums congelés de femmes enceintes avec fœtus trisomiques 21 (incluant celles qui ont été détectées et celles qui n'ont pas été détectées par les marqueurs sériques du second trimestre), et plus de 280 sérums témoins de femmes sans fœtus trisomiques 21 dont les issues sont connues.

Le placenta est une barrière entre la mère et le fœtus, mais il est prouvé que certaines molécules de petite masse moléculaire passent cette barrière. Les inventeurs ont donc choisi d'appliquer la technique protéomique dans le sérum des femmes enceintes, afin de déterminer un profil d'expression différentielle permettant de distinguer de façon quasi certaine celles avec fœtus trisomiques 21 par comparai-

son avec des sérums de femmes enceintes normales. Cette démarche, illustrée dans la partie expérimentale ci-après, leur a permis d'identifier plusieurs marqueurs permettant de distinguer de façon quasi certaine les sérums de femmes avec fœtus trisomiques 21 par comparaison avec des sérums de femmes enceintes portant des fœtus normaux.

La présente invention porte donc, en premier lieu, sur l'utilisation d'un ou plusieurs marqueur(s) choisi(s) parmi (i) les défensines neutrophiles humaines HNP-2, HNP-1 et HNP-3, et/ou (ii) les espèces moléculaires détectables en spectrométrie de masse avec une séparation de type échangeuse d'anions, aux poids moléculaires suivants : 4461.60 Da ; 4570.90 Da ; 4630.70 Da ; 4714.30 Da ; 4859.10 Da ; 8195.65 Da ; 8905.85 Da ; 9121.00 Da ; 9700.50 Da, et/ou (iii) les espèces moléculaires détectables en spectrométrie de masse avec une séparation de type hydrophobe, aux poids moléculaires suivants : 2625.47 Da ; 4068.5 Da ; 4075.95 Da ; 4084.3 Da ; 4084.7 Da ; 4093.13 Da ; 4320.79 Da ; 4642.66 Da ; 4658.47 Da ; 6419.80 Da ; 8107 Da ; 8124.5 Da ; 8140.5 Da ; 8155 Da ; 8269.10 Da ; 8338.80 Da ; 8610.30 Da, pour le diagnostic prénatal d'une anomalie fœtale.

Le terme "espèce moléculaire" désigne ici, entre autres, toute protéine, glycosylée ou non, phosphorylée ou non, tout complexe protéique, tout produit du métabolisme, ou tout fragment d'une quelconque de ces entités.

Les poids moléculaire indiqués ici ont été obtenus dans des conditions expérimentales spécifiées ci-dessous. Certaines technologies, différentes de celles utilisées par les inventeurs, utilisables pour mettre en œuvre l'invention, sont citées ci-après. Il est clair qu'une certaine variation est susceptible d'apparaître lors de l'utilisation de technologies et/ou d'appareillages différents. Néanmoins, il est également très clair que l'homme du métier est capable de transposer les résultats décrits dans la partie expérimentale ci-dessous à d'autres technologies, avec un taux de recouvrement satisfaisant, et d'identifier sans peine les signaux (pics, ...) correspondants aux marqueurs mis en évidence par les inventeurs. Du fait de cette variation liée aux technologies (et aux spécifications des fabricants d'appareils de spectrométrie, qui utilisent notamment des logiciels de traitement de l'information susceptibles d'entraîner des décalages de pics), les poids moléculaires indiqués ci-dessus doivent être entendus avec une précision de $\pm 20\%$, de préférence $\pm 10\%$,

voire $\pm 5\%$, et, dans de bonnes conditions, $\pm 1\%$. Il convient de noter que dans les conditions décrites dans la partie expérimentale ci-après, la mesure des poids moléculaires des différents marqueurs est reproductible, avec un coefficient de variation très inférieur à 10% , typiquement de l'ordre de $0,3$ à $0,5\%$, pour les marqueurs de poids moléculaire inférieur à 12000 Da. Une précision de $\pm 0,1\%$ est même obtenue jusqu'à 6000 Da. Du fait des calibrants utilisés, ce coefficient de variation est de l'ordre de 10 à 25% pour les marqueurs de poids moléculaire supérieur à 12000 Da. Comme précisé dans la partie expérimentale ci-dessous (titre C-3), le choix du calibrant n'influence pas les valeurs des intensités des pics observés. L'utilisation de calibrants différents de ceux utilisés par les inventeurs peut éventuellement conduire à une variation au niveau de la masse mesurée pour le marqueur, les pics correspondant à chacun des marqueurs restant toutefois toujours identifiables.

L'invention porte également sur un procédé de dépistage *in vitro* pour déterminer si une femme enceinte est porteuse d'un fœtus atteint d'une anomalie, comprenant une étape de détection ou de dosage, dans un échantillon biologique de ladite femme enceinte, d'au moins un marqueur sélectionné dans l'un quelconque des groupes (i) à (iii) définis ci-dessus.

Au sens de la présente invention, le mot "dosage" désigne une mesure quantitative ou semi-quantitative au sens large, par exemple une quantification relative d'un composé, par rapport au même composé dans un autre échantillon, ou par rapport à un autre composé dans le même échantillon. Ainsi, dans le présent texte, une comparaison de profils, obtenus par exemple par spectrométrie de masse, est assimilé à un "dosage".

Dans une mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, il comprend une étape de dosage d'au moins deux ou trois marqueurs, dont l'un au moins est sélectionné dans les groupes (i) et/ou (ii) et/ou (iii) ci-dessus, et l'autre ou les deux autres est (sont) sélectionné(s) soit dans ces mêmes groupes, soit parmi les marqueurs déjà caractérisés et utilisés aujourd'hui, constituant ici le groupe (iv), comprenant les marqueurs du second trimestre – l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG) ou sa sous-unité β libre, l'œstriol non conjugué (uE3), l' α -fœtoprotéine (AFP) et/ou l'inhibine A – ou du premier trimestre – sous-unité β libre d'hCG et/ou protéine

plasmatique associée à la grossesse (PAPP-A). Alternativement, un des dosages peut être remplacé par l'observation de la clarté nucale, au premier trimestre.

Par exemple, un "triple test amélioré", basé sur le dosage de hCG, uE3, et un des marqueurs cités ci-dessus, est partie intégrante de l'invention. Alternativement, le dosage d'un marqueur des groupes (i) à (iii) ci-dessus peut être combiné à un ou plusieurs autre(s) test(s) connu(s), comme par exemple l'examen de la clarté nucale.

Le procédé de l'invention implique une étape de dosage à partir d'un échantillon biologique provenant de la femme enceinte, lequel peut être constitué de n'importe quel fluide corporel, tel qu'un échantillon de sang, sérum, plasma, urines...

Selon différentes variantes de l'invention, le nombre de marqueurs sélectionnés parmi les molécules identifiées par les inventeurs peut être égal à 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou davantage, qu'il s'agisse de marqueurs sélectionnés dans les groupes (i), (ii), (iii) ou (iv) (au moins un des marqueurs étant sélectionné dans un des groupes (i) à (iii)). L'homme du métier déterminera le nombre de marqueurs à doser en fonction de contraintes d'efficacité (recherche d'un test le plus sensible et sélectif possible), et de contraintes économiques.

Dans une mise en œuvre préférée des procédés de l'invention, ces procédés comportent également, pour chaque marqueur dosé, une étape de comparaison de la concentration mesurée de ce marqueur dans l'échantillon biologique de la femme enceinte, à des valeurs de référence de la concentration de ce marqueur chez des femmes enceintes portant des fœtus normaux, et chez des femmes enceintes portant des fœtus atteints d'une anomalie chromosomique et/ou génétique connue, la comparaison étant indicatrice du risque que la femme enceinte porte un fœtus atteint d'une anomalie chromosomique et/ou génétique. Ces références seront choisies par l'homme du métier de façon à correspondre à l'âge gestationnel du prélèvement effectué chez la femme enceinte.

Dans une réalisation particulière des procédés de l'invention, illustrée dans les exemples, le dosage d'au moins un marqueur est effectué par spectrométrie de masse, par exemple par spectrométrie de masse à basse résolution ou à haute résolution.

Bien entendu, d'autres techniques de séparation, purification, ou de dosage peuvent être utilisées dans le cadre de l'invention. En particulier, deux types de technologies peuvent être envisagées pour développer un dispositif de diagnostic selon l'invention : la comparaison de profils, ou le dosage ponctuel des marqueurs. A titre d'exemples non limitatifs, on peut citer les techniques suivantes :

- Techniques de séparation : H.P.L.C., L.C. (*Liquid Chromatography*), C.E. (*Capillary Electrophoresis*) toutes technologies de type "microfluidique", gels bi- ou mono-dimensionnels, séparation en mode reverse (*reverse phase*) sur support solide plan ou non (*planar surface, bead surface*), les échantillons biologiques pouvant être ou non préalablement pré-fractionnés, par exemple sur membrane (Type Vivaspine de Vivascience mais aussi les spin columns de Millipore, Type Proteospin), et/ou déplétés ou non des protéines majoritaires (albumine, ovalbumine, immunoglobulines etc...), et/ou associés par affinité.

- Dosage par comparaison de profils (spectres de masse) : outre les technologies décrites dans la partie expérimentale, on peut citer à titre d'exemple de spectromètre de masse utilisable dans le cadre de l'invention, le système ClinProt™ développé par la société Bruker Daltonics, qui utilise des microparticules magnétiques avec une surface fonctionnalisée.

Dans le cadre des dosages par comparaison de profils, plusieurs méthodes de détection du signal peuvent être utilisées, seules ou en couplage avec des procédés séparatifs (Technologies TOF, laser-MS et MS-MS, ESI-MS, LC-MS, MALDI, tandem, Q-Trap etc.... SELDI-MS, SELDI-MS-MS, chémoluminescence (Mesoscale, Roche diagnostics), technologie Elecsys, fluorescence, ICAT, signal piezoélectrique, signal optique comme la "*surface plasmon resonance*" ou S.P.R., etc.), pour mettre en évidence et doser les molécules issues des profils, soit sous forme native, soit sous forme ionique (1+, 2+, 3+, 4+, 5+ etc...), applicables aux protéines, aux glycoprotéines et aux lipoprotéines.

Selon une mise en œuvre particulière du procédé de l'invention, ce procédé comprend une étape d'analyse d'au moins un spectre obtenu à partir d'un échantillon biologique provenant d'une femme enceinte ; selon cette variante, on mesure le signal d'au moins 2 pics choisis parmi (i) les pics correspondant aux défensines neutrophiles humaines HNP-2, HNP-1 et HNP-3, et/ou (ii) les pics observables

en spectrométrie de masse avec une séparation de type anionique, aux poids moléculaires suivants : 4461.60 Da ; 4570.90 Da ; 4630.70 Da ; 4714.30 Da ; 4859.10 Da ; 8195.65 Da ; 8905.85 Da ; 9121.00 Da ; 9700.50 Da, et/ou (iii) les pics observables en spectrométrie de masse avec une séparation de type hydrophobe, aux poids moléculaires suivants : 2625.47 Da ; 4068.5 Da ; 4075.95 Da ; 4084.3 Da ; 4084.7 Da ; 4093.13 Da ; 4320.79 Da ; 4642.66 Da ; 4658.47 Da ; 6419.80 Da ; 8107 Da ; 8124.5 Da ; 8140.5 Da ; 8155 Da ; 8269.10 Da ; 8338.80 Da ; et 8610.30 Da.

Comme expliqué plus haut, le terme "spectre" désigne ici n'importe quel type de spectre (de masse, MALDI, MALDI-TOF, SELDI, SELDI-TOF, *surface plasmon resonance*, chromatographie liquide, ICAT, ESI, ESI-TOF, etc), l'homme du métier sachant transposer les résultats présentés ci-après en spectrométrie de masse à une autre technologie et retrouver les pics pertinents. De même, le terme "signal" désigne toute observable (variable statistique) ou ratio d'observables, tels que l'intensité, le signal sur bruit, l'aire du Tof (*time of flight*), le Tof à mi-hauteur (*Tof Width*), la résolution, etc.

Parmi les marqueurs caractérisés par les inventeurs, trois ont été identifiés comme étant les défensines neutrophiles humaines HNP-2, HNP-1 et HNP-3, (voir partie expérimentale, D-9). Ces défensines sont surexprimées ou exprimées normalement chez les contrôles, et sous-exprimées en cas de trisomie 21 (fig. 15). Selon une mise en œuvre préférée du procédé de l'invention, au moins un des marqueurs pour lesquels le dosage est effectué est sélectionné parmi HNP-2, HNP-1 et HNP-3. Un taux élevé du marqueur en question est indicatif d'un fœtus sain, tandis qu'un taux bas est indicatif d'une probabilité élevée de trisomie 21.

De plus, et de façon particulièrement surprenante et intéressante, les inventeurs ont constaté que les ratios entre ces défensines HNP-2, HNP-1 et HNP-3 varient suivant que le fœtus est atteint du syndrome de Down ou non. Comme cela est détaillé dans la partie expérimentale ci-dessous (partie F), les ratios longitudinaux HNP-1/HNP-3 et HNP-2/HNP-3 sont statistiquement plus élevés en cas de trisomie 21 que lorsque la femme enceinte est porteuse d'un fœtus non trisomique. Ces ratios, particulièrement indicatifs, présentent en outre l'avantage d'être indépendants de la calibration de l'appareil de mesure. Les inventeurs ont par ailleurs constaté que les niveaux d'expression des défensines HNP2, HNP1 et HNP3, ainsi que les ratios entre

ces différents niveaux, ne sont corrélés ni avec l'âge de la femme enceinte, ni avec la semaine de grossesse, ni avec aucun des marqueurs utilisés actuellement (AFP, uE3 et HCG notamment), ni avec aucun des autres marqueurs identifiés dans les études rapportées ici.

5 Ainsi, selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de l'invention, le ratio entre les concentrations de HNP-3 et de HNP-1 et/ou HNP-2 dans l'échantillon est mesuré.

Bien entendu, ces ratios peuvent être mesurés à partir d'un spectre obtenu selon l'une quelconque des techniques citées ci-dessus. Il est également
10 possible de mesurer les ratios d'expression des défensines par une technique d'amplification d'acide nucléique, par exemple par RT-PCR quantitative ou semi-quantitative, à partir de l'échantillon biologique, ou à partir d'ARN extrait de cet échantillon. Des amorces utilisables pour cela sont par exemple décrites dans l'article de Linzmeier, R. M. et T. Ganz ("*Human defensin gene copy number polymorphisms: Comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23*" Genomics 2005).

De façon alternative, il est également possible de mesurer, dans l'échantillon biologique, la somme totale des défensines HNP-1, HNP-2 et HNP-3, qui sont toutes sous-exprimées en cas de trisomie 21. Selon une mise en œuvre particu-
20 lière du procédé de l'invention, le premier marqueur détecté est donc la somme des défensines HNP-2, HNP-1 et HNP-3. Cette détection peut en particulier être réalisée par des techniques immunologiques, par exemple par ELISA ou PCR.

De manière générale, l'utilisation d'une ou plusieurs défensines neutrophiles humaines choisies parmi HNP-1, HNP-2 et HNP-3 (également notées
25 HND-1, HND-2 et HND-3), comme marqueur(s) pour le diagnostic prénatal d'une anomalie chromosomique, est donc partie intégrante de la présente invention.

Comme évoqué ci-dessus, il est possible de mettre en œuvre les procédés de l'invention en effectuant un dosage ponctuel d'au moins certains marqueurs. A titre d'exemples non limitatifs de technologies utilisables pour cela
30 (lesquelles peuvent aussi être couplées aux technologies chromatographiques citées plus haut), on peut citer les technologies suivantes :

• Des anticorps peuvent être produits contre les marqueurs de l'invention, par n'importe quelle technique, y compris anticorps monoclonaux, synthèse chimique, production biologique (voie animale [exemple Bioprotein etc.], voie végétale [exemple Lemna – Biolex-Bayer, Meristems Therapeutics aussi etc...]).

5 Ils peuvent ensuite être utilisés, soit pour effectuer directement un immuno-dosage des marqueurs correspondants, soit pour purifier les marqueurs préalablement à leur dosage.

• Dosage par immuno-réaction (*Immuno Assay*, ou IA) : différentes technologies, connues de l'homme du métier, peuvent être envisagées, telles que

10 le *Sandwich ImmunoAssay* (Sandwich IA), l'interaction de surface (*Surface Plasma Resonance*, ou SPR), ou l'immuno-précipitation (par exemple par la technologie *Q-MAP* développée par Atto-Lab).

L'approche *Sandwich IA* se base sur la double reconnaissance du marqueur – ou antigène – par des anticorps spécifiques : les anticorps dits "de capture"

15 immobilisés sur le support choisi (plaque de micro-titration, bille magnétique...), et les anticorps dits "de détection", en solution et couplés à une molécule réactive, responsable de l'émission du signal de liaison (directement ou indirectement). Ce jeu d'anticorps spécifiques non recouvrant (*Pair Matched Antibodies*) constitue les réactifs communs aux différents systèmes de détection actuels.

20 Alternativement, la reconnaissance de l'antigène peut se faire en utilisant des aptamères, qui sont des séquences oligonucléotidiques (ADN ou ARN) simples brins sélectionnées *in vitro* pour leur capacité de liaison à une molécule donnée ; cette sélection peut se faire, par exemple, par la méthode SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) telle que décrite dans le Brevet US

25 5,270,163. Un aptamère fonctionnalisé peut, par exemple, être utilisé à la place d'un anticorps secondaire dans un test immunologique de type "*Sandwich ELISA*", comme décrit par Sumedha Jayasena (*Clinical Chemistry* 1999, 45(9) : 1628-50, Fig. 6). Les aptamères peuvent faire l'objet d'une optimisation par différentes modifications (Sumedha Jayasena, *supra*, Fig. 2). Il est notamment possible de modifier les apta-

30 mères de telle sorte que l'activation par UV après liaison de leur cible assure la liaison covalente de cette cible au support (*photoaptamères*).

Les différentes composantes d'un dispositif diagnostique de type immuno-réaction dépendent également du système de détection utilisé. Certains réactifs et supports utilisables pour mettre en œuvre l'invention sont résumés dans le Tableau 1 ci-dessous, ainsi que des exemples d'instrumentation adaptés.

5

Tableau 1 : les différentes composantes d'un dispositif diagnostique de type IA			
Système de détection	Réactifs (sauf anticorps ou aptamères de capture et de détection et tampons associés)	Support	Instrumentation (Photomultiplicateurs et caméras CCD pour les IFA, CLIA et ECLIA)
RIA (Radioimmuno Assay)	Radiolotopes (^{125} I)	Microplaques, Microbilles, Microbilles magnétiques.	Technicon Star System...
IFA (Immunofluorescent Assay), dont les techniques FP (Fluorescence Polarisation), TRF (Time Resolved Fluorescence) et FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)	fluorophores (Aqualite, Lanthanes, FITC, PE...)		DELTA (Perkin)...
CLIA (Chemiluminescence Assay)	Enzymes (AP, HRP...) Substrat (Acridium, Cryptate...)		Advia Centaur (Brahms), AxSym (Abbott), Immulite 2000 (DPC)...
ECLIA (Electrochemiluminescence Assay)	Substrat (Ruthenium)		Elecsys 2010 (Roche)...

Des puces à protéines peuvent être conçues pour déterminer des profils d'expression protéique choisis, impliquant les marqueurs souhaités. Cette technologie est présentée dans l'article de revue de Sydor et Nock (Proteome Science, 2003, June 10; 1(1) : 3). Bien entendu, l'homme du métier peut améliorer les technologies présentées dans cet article en utilisant ses connaissances générales dans ce domaine.

A titre d'exemples particuliers de technologies d'immuno-réaction innovantes utilisables dans le cadre de l'invention, on citera la technologie MAP (Luminex Corp), les *Bio Bar Codes* (Nanotechnologies Inc.), les marqueurs LumiPhos 530 et 480 (Lumigen), et la *RCA (Rolling-circle Amplification)*.

La technologie MAP (Luminex Corp) allie cytométrie de flux et microparticules sous un format de type IFA (*Immunofluorescent Assay*). Cette techno-

logie propose une analyse en double fluorescence. Le premier système de détection permet de capter la fluorescence émise par les billes de capture des marqueurs (à une bille correspondent un marqueur et une fluorescence) ; le second permet quant à lui la mesure de la fluorescence associée aux anticorps de détection, c'est-à-dire à la quantification des marqueurs.

Les *Bio Bar Codes* (Nanotechnologies Inc.) allient nanoparticules et scanométrie (Argent), introduisant un nouveau système de détection basé sur l'hybridation de sondes d'acides nucléiques uniques (identification des marqueurs) (*Nanoparticle-Based Bio-Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins*, Jwa Min Nam and al., *Science* 2003).

Les marqueurs LumiPhos 530 et 480 (Lumigen) combinent les systèmes de détections chemiluminescent et fluorescent, assurant par là une optimisation du signal.

La *RCA* (*Rolling-circle Amplification*) permet la détection de protéines avec une sensibilité de l'ordre de la zeptomole (10^{-21} moles). Cette technologie, décrite par Schweitzer *et al* (Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 29;97(18):10113-9), implique la polymérisation d'une longue chaîne d'ADN simple brin fixée à l'analyte (par exemple, un anticorps), à partir d'une matrice d'ADN circulaire. Cette technologie permet de minimiser les volumes d'échantillons et l'utilisation de matériels coûteux (anticorps monoclonaux et enzymes).

On notera également la possibilité d'utilisation de systèmes d'amplification du signal comme autre catégorie de réactif dans le cadre notamment des IFA et CLIA (ex : biotine/avidine).

Les marqueurs peuvent également être détectés par une technique d'amplification d'acide nucléique par polymérisation en chaîne (PCR ou autre technique).

L'invention permet de dépister des anomalies chromosomiques, en particulier le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome d'Edwards (trisomie 18), le syndrome de Patau (trisomie 13), le syndrome de Turner, le syndrome de Klinefelter, la monosomie X, le syndrome de l'X fragile, et le syndrome penta X et une délétion du bras long du chromosome 7, mais également d'autres anomalies congénitales, dépistées actuellement par échographie, par exemple le *Spina Bifida*. En

outre, l'invention peut être appliquée au dépistage de pathologies génétiques ou infectieuses (virale, bactérienne, ou parasitaire) ou métaboliques du fœtus, ou à la recherche d'un phénotype précis et en particulier du sexe du fœtus. L'invention est particulièrement adaptée au diagnostic prénatal du syndrome de Down.

5 La présente invention est applicable au dépistage prénatal au cours du second trimestre, ou plus précocement, au cours du premier trimestre de la grossesse.

Bien entendu, les connaissances de l'homme du métier lui permettent de compléter les procédés de l'invention, par exemple en tenant compte de l'âge de la
10 femme enceinte ou de toute autre variable (semaine de gestation, ...) utilisée comme critère d'ajustement.

Les procédés de dépistage selon l'invention peuvent également comporter une étape initiale de préparation de l'échantillon. Par exemple, cette étape peut comprendre un fractionnement en fonction de la masse des protéines, et/ou une
15 étape de déplétion en albumine ou autres protéines de transport, et/ou une étape de purification des protéines sur une surface préparative de type anionique et/ou hydrophobe.

La présente invention porte également sur une trousse de diagnostic prénatal d'anomalies chromosomiques, comprenant des moyens appropriés pour
20 mettre en œuvre un des procédés décrits plus haut.

L'homme du métier est capable de sélectionner, suivant les techniques de dosage et de détection qu'il souhaite utiliser pour mettre en œuvre l'invention, les éléments à intégrer dans une telle trousse de diagnostic : anticorps spécifiques, anticorps secondaires, aptamères, réactifs de détection (composés fluores-
25 cents, enzymes, anticorps modifiés pour utiliser la technologie *RCA*, ...), amorces et/ou sondes, etc... Il peut choisir au moins certains de ces éléments parmi les éléments mentionnés ci-dessus, et compléter la trousse, le cas échéant, à l'aide de ses connaissances générales et d'ouvrages de référence sur la purification, le dosage, ou la détection de molécules biologiques.

30 Une trousse de diagnostic prénatal selon l'invention peut par exemple comporter des anticorps spécifiques et/ou des aptamères d'un ou plusieurs marqueurs cités ci-dessus et/ou des amorces d'amplification ainsi que des sondes.

Bien entendu, dans une trousse qui contient plusieurs anticorps, aptamères ou amorces spécifiques de marqueurs, chaque anticorps, aptamère ou amorce est spécifique d'un seul marqueur. Lorsque ces composés sont en solution, chaque solution est de préférence spécifique d'un seul marqueur, ou d'un groupe de marqueurs associés (par exemple, les défensines HND-1, HND-2 et HND-3). A titre d'exemples d'anticorps qui peuvent être inclus dans une trousse selon l'invention, on peut citer les anticorps anti-HND tels que ceux commercialisés par Tebu-Bio SA (39 rue de Houdan, F-78612 Le Perray en Yvelines) sous la référence 038NCL-DEFENSIN (*Anti Neutrophil Defensins Mouse IgG1 Clone D21*, 1 ml).

Avantageusement, une trousse de diagnostic selon l'invention comprend, pour au moins un des marqueurs de l'invention, un jeu d'anticorps spécifiques non recouvrant, c'est-à-dire au moins deux anticorps capables de reconnaître simultanément le marqueur en question, ce qui permet de réaliser des tests d'immuno-réaction de type "sandwich".

Les anticorps, en particulier les anticorps dits "de capture", peuvent être immobilisés sur un support, et les anticorps dits "de détection" couplés à une molécule permettant la détection. Des exemples non limitatifs de supports et de molécules permettant la détection, utilisables dans le cadre de l'invention, sont mentionnés ci-dessus.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la stratégie expérimentale utilisée ;
- la figure 2 illustre une préparation schématique des échantillons ;
- la figure 3 résume les différentes conditions d'enregistrement, en fonction de la masse moléculaire des protéines à détecter ;
- la figure 4 illustre le schéma expérimental utilisé dans les études E1, E2, E3, E4 et E6 ;
- la figure 5 représente les spectres obtenus sur la zone spectrale 3000-20000 Daltons, en vues globales, pour le groupe contrôle, le groupe T21 et le groupe T18 ;

- les figures 6-8 illustrent les spectres centrés sur la zone 4000 Daltons (figure 6 : spectres en vues globales ; figure 7 : pseudo-gels ; figure 8 : spectres en vues décalées) ;
- les figures 9-11 illustrent les spectres centrés sur la zone 5000-6000 Daltons (figure 9 : spectres en vues globales ; figure 10 : pseudo-gels ; figure 11 : vues décalées) ;
- les figures 12 à 14 illustrent les spectres centrés sur la zone spectrale 3000-10000 Daltons (figure 12 : spectres en vues globales ; figure 13 : pseudo-gels ; figure 14 : vues décalées) ;
- la figure 15 illustre les spectres centrés sur la zone 3000-4000 Daltons (spectres en vues globales) ;
- les figures 16 à 18 illustrent les spectres centrés respectivement sur les zones 4000-5000 Daltons, 5000-7000 Daltons et 7000-10000 Daltons (spectres en vues globales) ;
- la figure 19 illustre les spectres en vues globales, normalisés et superposés par catégorie clinique, pour le groupe contrôle, le groupe T21, et le groupe T18, sur la zone spectrale 3000-10000 Daltons (étude E6) ;
- les figures 20 et 21 illustrent, pour la même zone spectrale que celle de la figure 19, les vues en pseudo-gels (figure 20) et les vues décalées (figure 21) uniquement pour le groupe contrôle et le groupe T21 ;
- les figures 22-24 présentent les spectres sur la zone spectrale 3000-2000 Daltons, respectivement en vues globales (spectres normalisés et superposés par catégorie clinique) pour les groupes contrôle, T21 et T18, en vues pseudo-gels pour les groupes contrôle et T21, et en vues décalées pour les mêmes groupes (étude E6) ;
- la figure 25 montre les spectres centrés sur la zone 6500, après normalisation par rapport à l'intensité du cluster PM6622 (études E4 et E5). Cette figure montre la superposition des spectres pour les catégories contrôle et T21 (étude E6) ;
- la figure 26 montre les spectres centrés sur la zone 6500 après normalisation sur le pic PM6622, (spectres normalisés et superposés par catégorie clinique), pour les groupes T21, contrôle, et T18. Sur cette figure, le pic référencé N correspond au cluster PM6622 et sert à normaliser les spectres ;

- les figures 27 à 30 montrent des exemples de statistiques de distribution des intensités de différents clusters, pour les groupes contrôle et T21 :
- . figure 27 : pic (cluster) PM3371, phase séparative anionique, tout pH > 4.
 - 5 . figure 28 : pic PM3442, phase séparative anionique, tout pH > 4.
 - . figure 29 : pic PM3486, phase séparative anionique, tout pH > 4. (PM est représenté par MW dans ces figures).
 - . figure 30 : pic PM6423, phase séparative hydrophobique, normalisation sur l'intensité du pic PM6620 (PM est représenté par MW dans cette figure) ;
 - 10 - la figure 31 montre les courbes ROC pour les marqueurs de poids moléculaires 3371, 3442, 3486, et 6423 Da (PM est représenté par MW dans cette figure) ;
 - la figure 32 montre le résultat d'une construction avec les logiciels Genecluster Version 1999 (Eisen M.) et Treeview Version 1.60 (Eisen M.) (Classification hiérarchique sur Jeu de Données de l'étude E6 (IC 95%), Surface Anionique Q10) ;
 - 15 - la figure 33 illustre l'analyse en composante principale pour les défensines (surface échangeuse d'anions Q10) ;
 - la figure 34 illustre la procédure d'identification des pics (clusters)
 - 20 PM6423, PM6439, PM6620 et PM6636 (PM est représenté par MW dans cette figure).
 - la figure 35 montre des spectres de masse acquis en conditions Q10, pH4, sérum brut, -80°C, pour la zone correspondant aux HNP, pour un groupe contrôle et un groupe de sérums de femmes porteuses de fœtus porteurs de la trisomie
 - 25 21.
 - la figure 36 présente les données statistiques relatives aux HNP, en signal sur bruit, sous forme de "boîtes à moustaches" (*box plots*). A : signal sur bruit de chaque pic. B : ratios longitudinaux des signaux/bruit.
 - les figures 37 et 38 présentent les distributions et courbes ROC
 - 30 binormales (*binormal Roc curve*) correspondant à chaque HNP (fig. 37A : HNP1 ; 37B : HNP2 ; 37C : HNP3) et à chaque ratio longitudinal entre deux HNP (fig. 38A : 1/2 ; 38B : 1/3 ; 38C : 2/3), le tout en signal/bruit. Pour ces figures, ainsi que les

figures 41, 49 et 50, le numéro du pic et son poids moléculaire (PM) sont indiqués, et les termes suivants sont utilisés : *Empirical AUC estimation* = estimation empirique de l'aire sous la courbe, qui est une estimation non paramétrique calculée sur les données continues du rapport signal sur bruit ; *TP rate* = taux de vrais positifs ; *FP rate* = taux de faux positifs ; *normal density* = densité normale ; *CTRL* = contrôle ; *DS* = syndrome de Down ; *mean* = moyenne ; *sd* = déviation standard.

- les figures 39 et 40 montrent des spectres de masse acquis dans les mêmes conditions que le spectre de la figure 35, centrés sur des zones différentes.

- la figure 41 présente les distributions et courbes ROC binormales associées aux pics autres que les HNP identifiés comme discriminants dans les conditions Q10, pH4, sérum brut, -80°C.

- la figure 42 résume les données (en signal/bruit) des pics pertinents (autres que les HNP) de l'étude NS502, sous forme de boîtes à moustaches (*box plots*). Les points isolés représentent les valeurs anormales (aberrantes), qui sortent de l'intervalle de confiance.

- les figures 43 à 48 présentent des spectres acquis en conditions de purification sur H50, pour certaines zones identifiées comme pertinentes dans les études NS526c et NS526d.

- les figures 49 et 50 présentent les données afférentes à chaque pic (de l'étude NS526c et de l'étude NS526d, respectivement), sous forme de courbes de distributions et de courbes ROC.

- les figures 51 et 52 montrent les résultats, sous forme de boîtes à moustaches (*box plots*), pour les marqueurs identifiés dans les études NS526c et NS526d.

- la figure 53 présente des spectres acquis avec un spectromètre de masse à haute résolution, dans les conditions spécifiées dans la partie H-2 ci-dessous. *Crude sera* = sérums bruts ; *native MW* = poids moléculaire natif.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLES**A - MATERIELS ET METHODES****A - 1 Echantillons Biologiques – Population d'Etude**

Recueillis rétrospectivement et prospectivement dans un cadre multicentrique, les échantillons biologiques de sang maternel ont été prélevés selon les recommandations et pratiques actuelles entre la 14^{ème} et la 25^{ème} semaine de grossesse, acheminés en procédure centralisée, conservés à + 4°C selon les procédures actuelles en vigueur, aliquotés et congelés à – 20°C (échantillons historiques).

Dans le but de vérifier la faisabilité en routine, la robustesse de la méthode, ainsi que la comparabilité des résultats entre différentes conditions de congélation, et en regard des futures procédures et recommandations du domaine, de nouveaux échantillons ont été recueillis sur la même base méthodologique clinique, acheminés à + 4°C, mais aliquotés et congelés directement à – 80°C (échantillons contemporains).

Dans tous les cas, les échantillons ont été stockés et congelés à – 80°C.

Les annotations suivantes, constituant les données cliniques et biologiques de chaque échantillon, ont été recueillies :

- Numéro de dossier,
- Date du prélèvement,
- Âge et poids de la mère
- Semaine de grossesse ajustée au nombre de jours de la semaine au prélèvement = nombre de jours de gestation
- Sexe du fœtus,
- Marqueurs Biologiques : hCG en UI/ml, uE3 en pg/ml, α -fœtoprotéine en UI/ml, les 3 convertis en multiple de la médiane (MoM = valeur mesurée/valeur médiane),
- Risque, calculé en fonction de l'âge de la femme enceinte et de ses données en MoM,
- Indication (âge, marqueurs, signes cliniques échographiques)
- Résultat du caryotype fœtal (techniques conventionnelles)

- Issue de la grossesse (naissance, IMG, MFIU mort fœtale *in utero*, éventuellement résultats anatomopathologiques).

Les échantillons dont l'issue est connue puisque les études ont été menées rétrospectivement ont été répartis en plusieurs groupes, dont un groupe de mères porteuses d'enfants normaux et un groupe de mères porteuses d'enfants atteints du Syndrome de Down (T21). La robustesse des études est par ailleurs renforcée par la présence de mères porteuses d'autres anomalies (Trisomie 18 ou Syndrome d'Edwards, Syndrome de Turner, Délétion terminale du bras long du chromosome 7 (del 7q)).

Dans le but de contrôler la validité interne des études, les échantillons ont été analysés en aveugle ou double aveugle dans les études cas-contrôle (afin de s'affranchir des biais de suivi pendant les analyses et des biais d'attrition).

Toutes les études rétrospectives l'ont été sur échantillons appariés (*cases and controls matched*), afin de s'affranchir des biais de confusion et rendre comparables les études. Un suivi longitudinal des expériences a été réalisé afin de contrôler la variabilité expérimentale (instrumentale et humaine). La taille des populations étudiées et la puissance requise assurent la validité externe des résultats.

A - 2 Matériels et Méthodes d'Analyse des Protéines

Toutes les recherches ont été réalisées en environnement de bonnes Pratiques de Laboratoire, ou B.P.L.(*G.L.P.*), en particulier :

Matériels et Consommables

Un spectromètre de masse de type PBS II c équipé du logiciel d'acquisition des spectres ProteinChip® Software V.3.1.1 et du Bio Marker Wizard (B.M.W) Software Version 3.1. (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA) a été utilisé.

En complément des études réalisées sur surface hydrophobe H50 (mélange de chaînes C6 à C12) avec le spectromètre de masse Ciphergen, les échantillons ont été passés sur un spectromètre de plus haute résolution, en l'occurrence un spectromètre Ultraflex Bruker (partie H-2 ci-dessous et figure 53).

Les inventeurs ont utilisé différentes surfaces de purification en approche avec et sans fractionnement, avec ou sans déplétion en albumine, en mode "reverse phase", en mode ciblé avec des anticorps, en mode étude des phosphoryla-

tions comme des glycosylations, dont les chimies de surface, d'interaction, et les matrices utilisées pour l'ionisation des protéines sont récapitulées dans le Tableau 2 ci-dessous. Les références indiquées sont, pour chaque surface, les références du fournisseur (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA).

Tableau 2			
Références	Propriétés des Surfaces	Chimie de surface	Catalogue
C553-0028	Hydrophobe & Cationique - H4	Groupe C16 + Groupes carboxylate	Janvier 2003
C553-0065 C554-0065	Hydrophobe - H50	Chaines C6 à C12	Septembre 2003
C553-0043	Phase normale - NP20	Oxide de silice	Janvier 2003
C553-0045	PS20	Groupe Epoxy	Janvier 2003
C553-0027 C554-0052	Anionique - SAX2 / LSAX30	Groupe Amine quaternaire	Janvier 2003
C573-0080	Anionique - Q10	Groupe Amine quaternaire	Septembre 2003
C553-0026 C554-0056	Cationique - WCX2 / LWCX30	Groupe carboxylate	Janvier 2003
C553-0075	Cationique - CM10	Groupe carboxylate	Septembre 2003
C553-0022 C554-0057	Métallique - IMAC3 / IMAC40	Acide nitrilotriacétique	Janvier 2003
C300-0001	Matrice - CHCA	Acide alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic	Janvier 2003
C300-0003	Matrice - EAM		Janvier 2003
C300-0002	Matrice - SPA	Acide sinapinique	Janvier 2003

5 La résolution et la précision en masse ont été vérifiées mensuellement, avant, pendant et après chaque expérience, dans le cadre de procédures de contrôle qualité mettant en œuvre des tests sur puce dorée en mode MALDI et sur puces à oxyde de silice en mode SELDI et utilisant les calibrants du Tableau 3 ci-après. Les références indiquées sont les références du fournisseur

10 (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, USA).

Tableau 3	
Références	Calibrants
C100-0004	Cytochrome C équin, Myoglobine de muscle équin, GAPDH de lapin, Albumine sérique bovine, Bêta-Galactosidase de <i>E. coli</i>
C100-0007	Hirudine BHVK, Cytochrome C bovin, Myoglobine de muscle équin, Anhydrase carbonique de globules rouges bovins, Enolase de <i>S. cerevisiae</i> , Albumine de sérum bovine IgG bovins
C100-0005	Arg8-Vasopressine, Somatostatine Chaîne bêta d'insuline bovine, Insuline humaine, Hirudine BHVK
C100-0002	Insuline bovine
C100-0001	Bêta-Lactoglobuline A bovine, Peroxydase de raifort

Les conditions expérimentales utilisées en routine dans un mode particulier (tampons, matrices, chimies de surfaces, pH de travail, Intensités laser) sont toujours réalisées en environnement contrôlé (20°C–25°C) ; elles sont listées

5 dans le Tableau 4 ci-après.

Tableau 4						
Référence	Chimie de Surface	Matrice	Tampon Hydratation (50 à 100µl)	pH	Tampon Incubation (100µl)	Laser (Cf. Fig. 3)
C553-0028	C 16 + Carboxylate	SPA	acetonitrile 5%	NA	acetonitrile 5%	Int 1
C553-0028	C 16 + Carboxylate	SPA	acetonitrile 5%	NA	acetonitrile 5%	Int 2
C553-0028	C 16 + Carboxylate	SPA	acetonitrile 5%	NA	acetonitrile 5%	Int 3
C553-0065 / C554-0065	C6 à C12	CHCA	acetonitrile 50%	7,4 physio	PBS 1X + 0,1% TFA	Int 1
C553-0065 / C554-0066	C6 à C13	CHCA	acetonitrile 50%	7,4 physio	PBS 1X + 0,1% TFA	Int 2
C553-0065 / C554-0067	C6 à C14	CHCA	acetonitrile 50%	7,4 physio	PBS 1X + 0,1% TFA	Int 3
C553-0022	Acide Nitroloacétique + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 1
C553-0023	Acide Nitroloacétique + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 2
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 1
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 2
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 3
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Cu	CHCA	CuSO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 4
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Ni	CHCA	NISO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 1
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Ni	CHCA	NISO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 2
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Ni	CHCA	NISO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 3
C554-0057	Acide Nitroloacétique + Hydrophobicité + Ni	CHCA	NISO4 100mM	7,4 physio	PBS 1X + 0,1 Triton X100	Int 4
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 1
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 2
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 3
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 1
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 2
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 3
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 1
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Tris Citrate 20mM	6	Tris Citrate + 0,1% Triton X100	Int 2
C554-0052	Groupe Amine Quaternaire + Latex	SPA	Tris Citrate 20mM	6	Tris Citrate + 0,1% Triton X100	Int 3
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 1
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 2
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 3
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	CHCA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 1
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	CHCA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 2
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	CHCA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 3
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 1
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	Phosphate Citrate 20mM	4	Phosphate Citrate 20mM+0,1% Triton X100	Int 2
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	Tris Citrate 20mM	6	Tris Citrate + 0,1% Triton X100	Int 1
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	Tris Citrate 20mM	6	Tris Citrate + 0,1% Triton X100	Int 2
C554-0056	Groupe Carboxylate + Latex	SPA	Tris Citrate 20mM	6	Tris Citrate + 0,1% Triton X100	Int 3
C553-0043	Oxyde de Silice	SPA	Hépès 1mM	7,4	Hépès 1mM	Int 1
C553-0043	Oxyde de Silice	SPA	Hépès 1mM	7,4	Hépès 1mM	Int 2
C553-0043	Oxyde de Silice	SPA	Hépès 1mM	7,4	Hépès 1mM	Int 3
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 1
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 2
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	PBS 1X	7,4 physio	PBS 1X	Int 3
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	Tris Citrate 20mM	5	Tris Citrate 20mM	Int 1
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	Tris Citrate 20mM	5	Tris Citrate 20mM	Int 2
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	Tris Citrate 20mM	5	Tris Citrate 20mM	Int 3
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	Tris-HCl 50mM	9	Tris-HCl 50mM	Int 1
C553-0026	Groupe Carboxylate	CHCA	Tris-HCl 50mM	9	Tris-HCl 50mM	Int 2

Pour les études ciblées, les anticorps monoclonaux suivants ont été utilisés :

- Anti-hCG et Bêta hCG, Référence RDI-CBL75 (*RDI Research Diagnostics Inc.*)
- 5 • Anti-Alpha-Foetoprotéine humaine, Référence RDI-TRK4F16-4A3 (*RDI Research Diagnostics Inc.*),
- Anti-PAPP-A, Référence RDI-TRK4P41-10E2 (*RDI Research Diagnostics Inc.*)

Stratégie Expérimentale utilisée

10 La stratégie expérimentale utilisée est schématisée à la figure 1.

Préparation des Echantillons

Sérums bruts ou natifs

Les échantillons conservés congelés depuis leur collecte, sont décongelés sur lit de glace pour analyse directe et/ou après purification préalable.

15 *Déplétion*

Les échantillons sont partiellement déplétés en protéines abondantes telles que l'albumine ou les immunoglobulines.

Enrichissement des protéines associées aux molécules de transport

Les protéines de transport et les molécules qui leur sont associées sont purifiées, augmentant de fait la concentration relative des molécules transportées dans la

20 fraction de l'échantillon analysée.

Sérums fractionnés en fonction de la masse native

Les échantillons bruts ou partiellement déplétés ou enrichis sont fractionnés en condition native par séparation en fonction de la masse des protéines.

25 *Synthèse de la préparation des échantillons*

La préparation des échantillons est présentée sous forme schématique à la figure 2.

Procédés de purification

Les échantillons ont été préparés selon différents degrés de fractionnement et purifiés par chromatographie de rétention sur phase solide de surface et/ou

30 chromatographie liquide.

Purification de type biochimique

Les propriétés biochimiques propres à chaque protéine sont utilisées afin de les séparer les unes des autres selon leurs charges apparentes de surface (propriétés ioniques) et leur hydrophobicité. Parallèlement, leur concentration relative
5 au sein de l'échantillon et/ou de la fraction analysée de l'échantillon est étudiée. Quatre approches différentes sont utilisées :

Chromatographie en phase normale

Cette approche chromatographique reposant sur l'utilisation d'oxyde de silice, permet de vérifier la qualité d'un échantillon et d'apprécier la concentration
10 relative d'une protéine. L'association se fait par l'intermédiaire d'arginines, de lysines, de sérines et de thréonines.

Chromatographie échangeuse d'anions

Un groupement fonctionnel chargé positivement (par exemple : amines quaternaires) est utilisé pour séparer les molécules ayant un caractère
15 anionique avéré (chargées négativement). Deux paramètres variables sont généralement explorés : le pH auquel la phase d'association-incubation a lieu et le degré de stringence de l'éluant utilisé.

Chromatographie échangeuse de cations

Un groupement fonctionnel chargé négativement (par exemple :
20 groupement carboxylate) est utilisé pour séparer les molécules ayant un caractère cationique avéré (chargées positivement). Comme pour la chromatographie échangeuse d'anions, différentes combinaisons expérimentales sont appliquées aux phases d'association et d'élution.

Interactions hydrophobiques

25 Les interactions hydrophobes libèrent l'eau structurée entourant des secteurs hydrophobes des biomolécules. Ceci a pour conséquence d'accroître l'entropie, rendant les interactions thermodynamiquement favorables. Une chromatographie utilisant une chaîne de carbones (par exemple : C₁₈) peut être utilisée. Les conditions d'association et d'élution dépendent du degré d'hydrophobicité de l'éluant
30 utilisé.

Purification ciblée

Deux schémas expérimentaux ont été utilisés pour une approche ciblée de la purification de protéines. Dans un premier cas, les caractéristiques biologiques des protéines à purifier révèlent des capacités d'association à un ligand
5 métallique et/ou chimique. Dans le second cas, l'identité de la protéine à isoler étant connue, permet d'employer une stratégie immunitaire, faisant dès lors appel à un anticorps spécifique de la protéine ciblée.

➤ Capture par affinité avec un ligand

Il s'agit d'une stratégie de purification reposant sur la forte affinité
10 d'une protéine pour un ligand chimique connu. Seules les protéines affines de ce ligand seront retenues sur la surface spécifiquement préparée à cet usage.

➤ Interactions anticorps-antigène

Il s'agit d'une stratégie de purification reposant sur la connaissance de la protéine ciblée et l'existence d'anticorps spécifiques de la cible. La très forte
15 affinité existant entre l'anticorps et la protéine contre laquelle il est dirigé est utilisée pour séparer la cible des autres protéines de l'échantillon. La purification simultanée de facteurs associés à la cible est possible.

Modes et Procédés d'Acquisition des Données

Introduction

20 Différents modes d'analyse des données sont utilisés. Les résultats issus des phases de purification par chromatographie liquide peuvent être visualisés directement lors des différentes phases d'élution des protéines par spectroscopie d'absorption, ou indirectement, par séparation par mobilité électrophorétique en conditions dénaturantes ou encore par spectrométrie de masse.

25 *Spectroscopie d'absorption*

L'enregistrement des données a lieu en sortie de colonne de chromatographie par insertion d'un spectrophotomètre UV ($\lambda = 280$ nm) en série avant le collecteur. L'absorption à cette longueur d'onde est principalement due au tryptophane et à la tyrosine.

30 *Electrophorèse dénaturante*

Les différentes fractions de protéines issues des étapes de fractionnement et de purification sont dénaturées par action d'agents dénaturants (détergents,

etc....) et dégradation thermique. Les protéines dénaturées migrent dans une phase poreuse (le gel) sous contrainte électrostatique. Leurs caractéristiques physico-chimiques (pI, masse, etc...) assurent une bonne séparation des différents produits.

Spectrométrie de masse

5 Les protéines ionisées sont séparées en fonction de leur masse par les technologies suivantes :

➤ Spectrométrie de masse par désorption laser

Les protéines sont déposées sur une surface active (spectrométrie de masse SELDI - *Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation*), ou passive (spectrométrie de masse MALDI - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*), associées à une matrice chimique permettant, sous vide, leur ionisation par un faisceau laser. Une fois ionisées, elles sont accélérées et dirigées sous contrainte électrostatique vers un détecteur placé à l'extrémité d'un tube sous vide. La vitesse à laquelle elles atteignent le détecteur (TOF - *Time of Flight*) est proportionnelle à la racine carrée de leur masse.

➤ Spectrométrie de masse par électrospray

Les protéines sont nébulisées puis ionisées sous l'action d'un gaz inerte en passant dans une aiguille très fine fortement chargée. L'analyseur est le plus souvent un "TOF" du même type que pour la spectrométrie de masse par désorption laser.

Méthodologie d'Enregistrement et d'Analyse des Spectres : Conditions Expérimentales d'enregistrement, d'optimisation et d'annotation

Les enregistrements et l'analyse des spectres sont effectués selon différents protocoles, qui dépendent de la surface et de l'appareillage (intensité laser, sensibilité en masse du détecteur, gain du détecteur, réglage du déflecteur). Ces paramètres sont optimisés en fonction de la zone de la gamme de masse à analyser.

Les facteurs de normalisation utilisés sont principalement le *Total Ion Courant* (TIC), certains marqueurs ayant une normalisation spécifique.

La figure 3 résume les différentes conditions d'enregistrement, en fonction de la masse moléculaire des protéines à détecter.

Lors des étapes préliminaires à l'analyse, les spectres et les clusters associés sont annotés selon deux procédures complémentaires, l'une automatique,

l'autre manuelle relevant de l'art du traitement du signal. Les deux procédures sont alors confrontées entre elles.

B – GENERALITES SUR LE MANAGEMENT DES DONNEES ET L'ANALYSE DES RESULTATS

5 Les résultats obtenus pour chaque groupe clinique sont analysés par confrontation et opposition directe. Différents schémas d'analyses statistiques sont utilisés : courbes montrant le nombre de vrais positifs (sensibilité) en fonction du nombre de faux positifs (1 – spécificité) (ROC - *Receiver Operating Characteristic*), analyse par composante principale (ACP), analyse par classification (CART - *Classi-*
10 *fication And Regression Tree*), corrélations, etc... L'ensemble, testé et validé, assure la robustesse des modèles prédictifs construits.

C – PREMIERE SERIE D'ETUDES EFFECTUEES

C – 1 Introduction

15 Plusieurs études ont été menées (E1, E2, E3, E4, E5, E6), ayant pour objectif d'optimiser la visualisation des protéines dans les zones spectrales expliquées précédemment, d'optimiser leur détection et l'analyse de leur comportement en fonction de leurs propriétés biochimiques intrinsèques et de leurs capacités d'interaction et d'association. Plusieurs conditions ont été définies en fonction des propriétés chimiques des surfaces ou des polymères, des tampons d'incubation, du pH,
20 des matrices dont la fonction est de ioniser les espèces et de faciliter leur désorption, donc leur séparation sous l'impulsion du laser (voir Tableau 2 plus haut décrivant les conditions utilisées).

Les caractéristiques principales de l'étude E6 sont :

- o Etude menée en aveugle
- 25 o Etude rétrospective/Cas Contrôle
- o Stockage des échantillons à l'Hôpital: -20°C & -80°C
- o Stockage des échantillons à Neurolab: -80°C

Trois populations ont été étudiées :

- o Contrôle = Groupe témoin
- 30 o DS = *Down Syndrome* = T21
- o ES = *Edward Syndrome* = T18

o Une quatrième population, constituée d'échantillons congelés et conservés à -80°C renforce la valeur des pics analysés.

Tableau 5 : codes	
Contrôle	9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, A16
DS	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8
ES	E3, E4, E5, E6
-80°C	A25, A26, A27, A28

Remarques : Les annotations de la population étudiée et les résultats du Triple Test (hCG, uE3, α feto protéine) (examen de référence) montrent que les patientes A1 et 3 n'ont pas été dépistées, les enfants sont nés atteints du Syndrome de Down (Trisomie 21).

Les échantillons sont appariés (Contrôle/DS) pour éviter les biais de confusion.

En raison de l'excellente reproductibilité des expériences menées dans les études E1 à E5 en triplicate, un spectre est enregistré par échantillon, sauf pour contrôler la reproductibilité intra-expérience (par exemple : les échantillons A7 et A15 qui ont été enregistrés en triplicate lors de l'étude E6).

Les propriétés de la population d'étude sont résumées dans le Tableau 6 suivant et présentent les codifications suivantes:

DS = *Down Syndrome* = T21

ES = *Edward Syndrome* = T18

DM = Donnée Manquante à la Date du Rapport

N/A = Non Applicable (prélèvements effectués en dehors de la période étudiée)

IMG = Interruption Médicale de Grossesse

PV = perdu de vue. Une partie des données est donc manquante.

Tableau 6 : Propriétés et Caractéristiques de la Population Etudiée (étude E6)											
Etat	Code	Age Maternel	Aménorrhée Sem + Jour	hCG	uE3	AFP	Risque	Resultats TT	Caryotype	Sexe	Issue
Contrôle	9	33	16+1	1.55	0.87	0.35	1/90	Faux +	Normal	M	Né
Contrôle	10	30	15+3	1.58	0.89	0.99	1/970	-	NA	M	Né
Contrôle	11	24	15+4	1.50	0.53	0.93	1/175	Faux +	Normal	M	Né
Contrôle	12	28	15+0	1.22	0.94	0.80	1/1900	-	NA	M	Né
Contrôle	13	26	15+4	2.37	0.63	1.03	1/116	Faux +	Normal	F	Né
Contrôle	14	28	16+0	2.24	0.72	0.66	1/95	Faux +	Normal	F	Né
Contrôle	15	22	17+1	1.76	0.74	0.54	1/182	Faux +	Normal	F	Né
Contrôle	16	33	17+1	1.68	0.94	0.87	1/510	-	Normal	F	Né
Contrôle	A9	33	16+4	1.46	0.88	0.74	1/332	-	NA	F	Né
Contrôle	A10	33	16+3	1.20	0.63	0.92	1/474	-	NA	PV	PV
Contrôle	A11	24	16+3	1.51	0.59	0.94	1/254	Faux +	Normal	F	PV
Contrôle	A12	27	15+2	1.34	0.32	1.06	1/431	-	Normal	M	Né
Contrôle	A13	36	14+6	1.97	0.45	0.86	1/11	Faux +	Normal	F	Né
Contrôle	A14	34	15+2	1.36	0.6	0.7	1/76	Faux +	Normal	M	Né
Contrôle	A15	38	17+5	1.80	0.94	1.37	1/239	Faux +	Normal	F	Né
Contrôle	A16	38	15+2	1.87	0.93	1.53	1/166	Faux +	Normal	M	Né
Malade	1	35	16+1	4.02	0.70	0.42	1/10	+	DS	M	IMG
Malade	2	27	15+5	4.02	0.42	1.07	1/8	+	DS	M	IMG
Malade	3	25	15+3	2.68	1.00	0.70	1/560	Faux -	DS	M	Né
Malade	4	32	15+0	2.22	1.26	0.77	1/660	Faux -	DS	M	IMG
Malade	5	31	15+4	2.22	0.62	1.32	1/126	+	DS	F	IMG
Malade	6	29	15+6	2.41	0.62	1.06	1/84	+	DS	F	IMG
Malade	7	36	17+1	3.99	0.46	1.12	1/5	+	DS	F	IMG
Malade	8	21	16+4	2.57	0.60	1.28	1/143	+	DS	F	IMG
Malade	A1	28	16+3	1.61	0.82	0.71	1/441	Faux -	DS	F	Né
Malade	A2	36	16+4	1.11	0.66	0.69	1/153	+	DS	M	Né
Malade	A3	30	15+4	3.46	0.52	1.33	1/17	+	DS	F	IMG
Malade	A4	31	16+4	1.49	0.31	0.56	1/37	+	DS	M	IMG
Malade	A5	34	16+3	3.87	0.63	0.48	1/5	+	DS	F	IMG
Malade	A6	30	16	2.39	0.55	0.36	1/10	+	DS	M	IMG
Malade	A7	38	17+2	1.29	1.26	0.61	1/310	Faux -	DS	F	IMG
Malade	A8	40	17	1.84	0.76	0.81	1/32	+	DS	M	IMG
Malade	E3	30	16	0.97	0.43	0.56	1/57	+	ES	M	IMG
Malade	E4	35	16+1	0.54	0.21	1.33	1/9400	Faux -	ES	F	IMG
Malade	E5	37	16+5	0.14	0.44	DM	1/2700	Faux -	ES	M	IMG
Malade	E6	37	15+2	0.42	0.64	0.54	1/590	Faux -	ES	M	IMG
Malade	A25	35	17+5	3.79	0.69	0.64	1/6	+	DS	M	IMG
Malade	A26	34	15+1	4.91	0.99	0.83	1/22	+	DS	F	IMG
Malade	A27	35	23+4	2.64	0.98	1.22	1/184	N/A	DS	M	IMG
Malade	A28	34	20	3.95	1.50	1.61	1/920	N/A	DS	F	IMG

Dans cette application particulière (conditions retenues documentées), les échantillons ont été soit analysés natifs non fractionnés, soit analysés fractionnés en fonction de la masse des protéines. Les éluats ont été utilisés soit natifs soit analysés après déplétion en albumine ou autres protéines de transport, puis séparés et purifiés selon deux modes, l'un anionique, l'autre hydrophobe. Un analyseur de type spectromètre de masse SELDI-TOF a été utilisé pour acquérir les informations spectrales.

Intérêt, Associativité et Purification sur surface anionique

Les spectres présentés sont obtenus sur surface séparative de type anionique. Les pics d'intérêt mentionnés sont présents à pH 4 et à toute valeur du pH supérieure à 4, dans la mesure où aucun phénomène d'agrégation ou de précipitation des protéines n'intervient à pH basique.

Intérêt, Associativité sur surface hydrophobe

Les spectres présentés sont obtenus sur surface séparative de type hydrophobe, après phase d'incubation et de lavage en tampon *Phosphate Buffer Saline* (PBS 1X) à pH 7,4 (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning : A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).

C – 2 Schéma Expérimental (études E1, E2, E3, E4 et E6)

La Figure 4 présente le schéma expérimental qui a été utilisé.

Lors d'études de type profilage, les inventeurs ont travaillé en conditions non dénaturantes comme en conditions dénaturantes. Des puces à protéines ont été préparées selon le mode opératoire suivant :

1. Insertion des barrettes dans les bioprocresseurs ; 2. Hydratation ou pré rinçage des spots avec 5 à 100 µl d'un tampon d'hydratation spécifique ; 3. Élimination du surnageant et Ajout de 100 µl d'un tampon d'incubation ; 4. Ajout de 1 µl de sérum par spot ; 5. Incubation 10 minutes à 1h45, 6. Elimination du surnageant ; 7. Lavage de la surface avec 100 µl d'un tampon de lavage spécifique ; 8. Elimination du surnageant ; 9. Ajout de la matrice (CHCA ou SPA) ; 10. Séchage.

Les puces à protéines sont insérées dans le spectromètre de masse ou tout autre appareil de lecture ou de séquençage approprié.

Les différentes conditions séparatives et de purification utilisées et leurs protocoles de préparation sont récapitulés dans le Tableau 2 ci-dessus.

Lors d'une autre étude en approche ciblée (de type phosphorylation ou utilisant un anticorps) (étude E2), les inventeurs ont préparé des puces à protéines avec des échantillons biologiques natifs non fractionnés ou fractionnés, selon le mode opératoire suivant :

1. Insertion des barrettes dans les bioprocresseurs ; 2. Hydratation ou pré rinçage des spots avec 20 µl du tampon d'hydratation spécifique, 2 fois 5 minutes

; 3. Association des molécules de capture ; 4. Elimination du surnageant et Ajout de 100 µl d'un tampon d'incubation, 3 fois 5 minutes ; 5. ajout de 1 µl de sérum sur chaque spot ; 6. Incubation 30 minutes ; 7. Elimination du surnageant ; 8. Lavage de la surface avec 3 fois 100 µl, 5 minutes, d'un tampon de lavage spécifique ; 9. Elimination du surnageant et lavage final avec 100 µl d'eau pure ; 10. Ajout de la matrice (CHCA ou SPA diluée au 1/10); 11. Séchage.

Les puces à protéines sont insérées dans le spectromètre de masse pour lecture selon les différentes intensités décrites plus haut et à la Fig. 3, ou dans tout autre appareil de lecture approprié, optimisé et réglé en conséquence. L'homme du métier choisira l'intensité du laser pour permettre de faire voler les protéines, en fonction de leur masse, de certaines de leurs propriétés physico-chimiques, et d'éventuelles interactions qu'elles établissent avec des partenaires. Les anticorps utilisés ont été décrits plus haut.

Les calibrants utilisés sur puce Phase Normale/Oxyde de silicium et en mode *Maldi* correspondent à ceux décrits dans le Tableau 3.

Lors de ces différentes études, la séparation avec fractionnement a été réalisée, générant les quatre fractions suivantes :

Fraction A : poids moléculaire ≤ 10 kDa

Fraction B : $10 \text{ kDa} < \text{poids moléculaire} \leq 50 \text{ kDa}$

Fraction C : $50 \text{ kDa} < \text{poids moléculaire} \leq 100 \text{ kDa}$

Fraction D : poids moléculaire $> 100 \text{ kDa}$

Le fractionnement en fonction de la masse a pour but d'augmenter la concentration relative de protéines d'une fraction par rapport à la concentration en protéines totales, sans pour autant modifier la concentration absolue des protéines séparées. Dans la fraction C, l'albumine est normalement retrouvée comme élément majoritaire, et peut être, le cas échéant, spécifiquement supprimée. Cette suppression n'a pas été effectuée dans les expériences décrites ici ; la suppression de l'albumine permettra de détecter un pic supplémentaire, correspondant à l' α -fétoprotéine, qui est pour l'instant masquée par le pic d'albumine.

Ces fractions ont été obtenues en utilisant des séparateurs de type Vivaspin 500 de la société Vivascience, avec 3 seuils de coupure distincts : 10, 50 et 100 kDa. La séparation par filtration sur membrane a lieu en PBS 1X, pH 7,4, en

- conditions non dénaturantes. Tout ce qui passe au travers de la membrane est de plus petite masse que le seuil de coupure, tout ce qui reste dans le volume mort au-dessus de la membrane est de masse supérieure au seuil de coupure. Les protéines restant dans la partie supérieure du Vivaspin 500 avec un seuil de coupure de 100 kDa ont donc une masse native $>$ à 100 kDa. Cela s'entend également pour les complexes multimériques hétérogènes aussi bien que homogènes.

C – 3 Instrumentation (Exemple: Etude E6 - Purification anionique)

Paramètres d'acquisition

Système d'acquisition : *Proteinchip Biomarker System* Type II.c

Tableau 7 : Paramètres généraux d'acquisition de l'Etude Principale (E6)	
Protocole d'enregistrement	Paramètres d'acquisition
1. Régler la masse élevée à 50000 Daltons, optimisée de 2500 Daltons à 15000 Daltons. 2. Régler l'intensité laser de départ à 170. 3. Régler la sensibilité du détecteur à 10. 4. Régler la masse du déflecteur à 2500 Daltons.	Instrument : Type: PBS IIc Serial Num: 2F359TC Acquisition : Fréquence du numériseur : 500.0 MHz Mode ionique : Positif Voltage de la source: 20000 V Voltage du détecteur: 2900 V Voltage de l'impulsion : 3000 V Durée de l'impulsion: 700 ns Focus de la masse : 8750.00 Da Mode déflecteur : Manuel Masse du déflecteur : 2500 Da
Statistiques d'enregistrement	
Tirs : Effectués : 2814 ; Conservés : 2680 ; Haut : 0 ; Bas : 0 Intensité : Basse : 170 ; Haute : 175 Sensibilité : Basse : 10 ; Haute : 10	
Période d'enregistrement	
Etude E6	

Tableau 8 : Paramètres spécifiques d'acquisition de l'Etude Principale (E6)			
Echantillons	Vide	Echantillons	Vide
A1	1.935e-007 Torr	1	2.072e-007 Torr
A2	1.673e-007 Torr	2	1.798e-007 Torr
A3	1.575e-007 Torr	3	1.673e-007 Torr
A4	1.575e-007 Torr	4	1.575e-007 Torr
A5	2.072e-007 Torr	5	1.673e-007 Torr
A6	1.798e-007 Torr	6	1.575e-007 Torr
A7 (1)	1.673e-007 Torr	7	1.477e-007 Torr
A7 (2)	1.380e-007 Torr	8	1.380e-007 Torr
A7 (3)	1.380e-007 Torr	9	1.935e-007 Torr
A8	1.575e-007 Torr	10	1.798e-007 Torr
A9	1.798e-007 Torr	11	1.673e-007 Torr
A10	1.673e-007 Torr	12	1.575e-007 Torr
A11	1.575e-007 Torr	13	1.575e-007 Torr
A12	1.477e-007 Torr	14	1.477e-007 Torr
A13	1.935e-007 Torr	15	1.380e-007 Torr
A14	1.935e-007 Torr	16	1.380e-007 Torr
A15 (1)	1.380e-007 Torr	E3	1.282e-007 Torr
A15 (2)	1.673e-007 Torr	E4	1.282e-007 Torr
A15 (3)	1.673e-007 Torr	E5	1.575e-007 Torr
A16	1.282e-007 Torr	E6	1.477e-007 Torr

Rapport de Normalisation des Spectres

Le procédé de normalisation "*Total Ion Current*" (TIC) permet pour chaque spectre de faire la moyenne des intensités, et ajuste les intensités moyennes de chaque spectre de sorte que les données soient normalisées.

Les paramètres de normalisation utilisés correspondaient à une normalisation "*Total Ion Current*" commençant à 3000, et se terminant à 20000, avec soustraction de la ligne de base, un coefficient de normalisation de 0.269112, et sans normalisation par rapport à la masse.

Tableau 9 : Rapport de Normalisation (Etude Principale – Séparation Anionique)							
Nom de l'échantillon	Facteur de normalisation	Utilisé en normalisation?	Avec TIC	Nom de l'échantillon	Facteur de normalisation	Utilisé en normalisation?	Avec TIC
A01	1,255852	oui	0,214286	1	2,450139	oui	0,109835
A02	1,664225	oui	0,161704	2	0,808214	oui	0,332971
A03	2,185387	oui	0,123142	3	1,07021	oui	0,251457
A04	1,291102	oui	0,208436	4	2,306647	oui	0,116668
A05	0,974679	oui	0,276103	5	0,743689	oui	0,361861
A06	0,648508	oui	0,414971	6	0,974983	oui	0,276017
A07	0,560603	oui	0,48004	7	2,918434	oui	0,092211
A07	1,307443	oui	0,205831	8	0,719411	oui	0,374073
A07	1,895244	oui	0,141993	9	0,975285	oui	0,275932
A08	0,821502	oui	0,327585	10	1,17547	oui	0,22894
A09	1,261377	oui	0,213348	11	2,192259	oui	0,122756
A10	0,751794	oui	0,35796	12	1,508624	oui	0,178382
A11	1,233307	oui	0,218204	13	1,387028	oui	0,194021
A12	1,249535	oui	0,21537	14	1,690433	oui	0,159197
A13	1,068304	oui	0,251906	15	1,568808	oui	0,171539
A14	0,600652	oui	0,448034	16	1,648534	oui	0,163243
A15	1,233057	oui	0,218248	E3	1,89569	oui	0,14196
A15	1,263684	oui	0,212958	E4	1,437991	oui	0,187144
A15	3,701159	oui	0,07271	E5	1,241774	oui	0,216716
A16	1,244716	oui	0,216204	E6	2,593202	oui	0,103776

Rapport de Calibration

La calibration est faite en fonction de la gamme de masses observée.

Dans la zone 3 à 20 kDa, trois calibrations sont utilisées, selon que le calibrant est :

- 5
 - Insuline bovine
 - Cytochrome C, bovin
 - β -Lactoglobuline-A, bovine

Par exemple entre 2.9 et 5.8 kDa, la calibration est faite sur les pics d'insuline (bovine) (5733.58+1H), et d'insuline bovine 2H+ (2866.79+1H).

10 Equation de calibration

L'équation de calibration utilisée est quadratique :

$$\frac{m/z}{U} = a(t - t_0)^2 + b$$

où m/z est le rapport masse sur charge, U le voltage de la source et t le temps de vol.

15 Paramètres d'acquisition (Exemple : Cas de l'insuline)

Deux conditions d'enregistrement des spectres, pour deux concentrations en insuline bovine, ont été utilisées.

Tableau 10 : conditions d'enregistrement	
Protocole d'enregistrement : Protocole 1, INSULINE Bovine	Paramètres d'acquisition
1. Régler la masse élevée à 50000 Daltons, optimisée de 1000 Daltons à 10000 Daltons. 2. Régler l'intensité laser de départ à 120. 3. Régler la sensibilité du détecteur à 10. 4. Régler la masse du déflecteur à "auto".	Instrument : Type: PBS Ilc Serial Num: 2F359TC Acquisition : Fréquence du numériseur : 500.0 MHz Mode ionique : Positif Voltage de la source: 20000 V Voltage du détecteur: 2900 V Voltage de l'impulsion : 3000 V Durée de l'impulsion: 564 ns Focus de la masse : 5500.00 Da Mode déflecteur : Auto Masse du déflecteur : 1000 Da
Statistiques d'enregistrement	
Tirs : Effectués : 682 ; Conservés : 620 ; Haut : 0 ; Bas : 0 Intensité : Basse : 120 ; Haute : 130 Sensibilité : Basse : 10 ; Haute : 10	
Période d'enregistrement	
Etude E6	

Résultats de l'acquisition après calibration (Cas de l'insuline)

Tableau 11				
Paramètres	Valeurs	Paramètres	Valeurs	$\frac{m/z}{U} = a(t - t_0)^2 + b$
a	$0.358981048675136 \times 10^{-3}$	t_0	1.11897791939812	
b	$8.2752735372077 \times 10^{-3}$	U	20000 V	

Après calibration, l'écart par rapport théorique est égal à 0.00 Dalton (i.e., précision supérieure à deux ordres de grandeur).

5 Rapport de clusterisation

Définition

Afin de comparer le niveau d'expression d'une protéine selon les échantillons, la clusterisation consiste à regrouper la valeur de l'intensité des pics correspondants à cette protéine pour l'ensemble des spectres enregistrés. Un *cluster* se définit donc comme un tableau retournant la valeur de l'intensité du pic considéré pour chaque spectre étudié.

Clusterisation

Trois groupes sont clusterisés simultanément pour pouvoir faire un comparatif ultérieur :

Contrôles (*Control*), DS (*Down Syndrome*) et ES (*Edward Syndrome*).

Les annotations ont été réalisées selon deux modes complémentaires, l'un manuel, par les expérimentateurs, l'autre automatique.

5 *Mode de clusterisation manuel*

Les pics sont manuellement annotés.

Les clusters sont ensuite complétés par recherche dans une fenêtre de $\pm 0,3\%$ de la valeur M+H d'un signal tel que signal/bruit = 2, sinon, le bruit de fond local est utilisé.

10 *Mode de clusterisation automatique*

La détection des pics obéit à 2 critères :

- o le rapport signal sur bruit doit être ≥ 10
- o le pic doit être présent dans 30 % des spectres.

15 Les clusters sont ensuite complétés par recherche dans une fenêtre de $\pm 0,3\%$ de la valeur M+H d'un signal tel que signal/bruit = 2, sinon, le bruit de fond local est utilisé.

Conclusion sur la zone Spectrale visualisée dans l'exemple choisi

Compte tenu de la qualité spectrale (bruit de fond, qualité du signal et du rapport signal/bruit) :

- 20
- la zone de visualisation est comprise entre 3 000 Da et 20 000 Da
 - la zone d'analyse est comprise entre 4 000 Da et 20 000 Da

La calibration est faite sur les pics d'Insuline (bovine) (5733.58+1H), et d'insuline bovine 2H+ (2866.79+1H). L'objectif est d'optimiser la zone de calibration comprise entre 2800 et 5750 Da. Entre 6 et 12 kDa, le cytochrome C (bovin) est utilisé pour calibrer. Entre 9 et 19 kDa, la β -lactoglobuline A (bovin) est utilisée pour calibrer.

25

Le choix du calibrant n'influence en aucune façon les valeurs des intensités. Leurs valeurs ne varient pas en fonction de la calibration utilisée. La calibration permet d'accroître la précision des valeurs des masses des pics enregistrés, sur une zone spectrale restreinte.

30

Outre les calibrants mentionnés plus haut, d'autres calibrants peuvent être utilisés. Le Tableau 12 ci-après présente une liste de calibrants qui peuvent être utilisés, ainsi que leur poids moléculaire.

Tableau 12	
Peptide / protéine	Poids moléculaire (Daltons)
Arg8-Vasopressine	1084,2474
Angiotensine I humaine	1296,5
[Glu ¹] Fibrinopeptide B	1570,6
Somatostatine	1637,9030
Dynorphine A (209-225) porcine	2147,5
ACTH (1-24) humaine	2933,5
β -endorphine humaine	3465,0
Chaîne β de l'insuline bovine	3495,9409
Insuline bovine	5733,6
Insuline humaine	5807,6533
Ubiquitine bovine	8564,8
Cytochrome C bovin	12230,9
Cytochrome C équin	12360,2
Superoxyde dismutase bovine	15591,4
Myoglobine équine	16951,1 ou 16951,5*
β -lactoglobuline A bovine	18363,3
GAPDH de lapin	35688,0
Péroxidase de raifort	43240,0
Sérum albumine bovine (BSA)	66410,0 ou 66433,0*
Hirudine BHVK	7033,6136
Conalbumine de poulet	77490,0
β -galactosidase de <i>E.coli</i>	116351,0
IgG bovine	147300,0

5 * : indication de poids moléculaire différente suivant les fournisseurs.

D - RESULTATS DE LA PREMIERE SERIE D'ETUDES

D – 1 Synthèse des Résultats Analytiques obtenus

Résultats Analytiques = Résolution Spectrale en Masse et en Intensité

10 Les inventeurs ont identifié des clusters d'intérêt (référencés dans les Tableaux 13 et 14) dans les données issues des spectres obtenus (un spectre par échantillon des populations des trois groupes Contrôle, DS (T21) et ES (T18), hors groupe -80°C, sauf cas particulier des échantillons A7 et A15, enregistrés en triplicate lors de l'étude E6). Le nombre de clusters annotés manuellement est réduit selon le

15 critère "présent dans au moins 30 % de la population spectrale".

Tableau 13 : Synthèse Phase Analytique						
Expériences		Zone d'analyse	Mode de Clusterisation	Nombre de Clusters identifiés	Nombre de clusters retenus	Nombre de Spectres Analysés
Phase séparative anionique	E6	4-20 kDa	Manuel	156	29 (18.6 %)	40
			Automatique	8	7 (87.5 %)	
	E1-E5	3-10 kDa	Manuel	40	39 (97.5 %)	32
			Automatique	6	6 (100 %)	
Interaction hydrophobique	E6	3-10 kDa	Manuel	140	31 (22.2 %)	34
			Automatique	17	17 (100 %)	
		3-20 kDa	Manuel	164	54 (32.9 %)	34
			Automatique	35	34 (97.2 %)	

Tableau 14 : Liste des clusters retenus				
CLUSTERS	Phase séparative anionique		Interaction hydrophobique E6	Présence d'un signal sur des échantillons congelés à -80°C
	E6	Cumul E1-E5		
PM3061			+	-
PM3101			+	+
PM3156			+	+
PM3166			+	+
PM3181			+	+
PM3214			+	+
PM3223			+	+
PM3233			+	+
PM3313			+	+
PM3320	+	-		+
PM3321			+	-
PM3371#	+	+		+
PM3394			+	-
PM3400	+	-		+
PM3442#	+	+		+
PM3486#	+	+		+
PM3504			+	+
PM3678			+	+
PM3705			+	+
PM3815	+	-		++
PM3846	+	-		++
PM4059			+	+
PM4067			+	+
PM4110	+	-		+
PM4111			+	+
PM4152#	+	+		+
PM4168#	+	+		+
PM4186	+	+		+
PM4197			+	-
PM4201#	+	+		+
PM4217#	-	+		+
PM4279			+	+
PM4286			+	+
PM4295			+	+
PM4300#	+	+		+
PM4317			+	+
PM4332	+	+		+
PM4349			+	+
PM4410			+	+
PM4412	-	+		+
PM4463			+	+
PM4470			+	+
PM4530	-	+		+
PM4583			+	+
PM4650			+	+
PM4682#			+	-
PM4706			+	+
PM4722			+	+
PM4816			+	+
PM4821	+	+		+
PM4860	-	+		+

PM4893	-	+		+
PM4935	-	+		+
PM5008	-	+		+
PM5033			+	+
PM5222	-	+		+
PM5625#			+	+
PM5630	-	+		+
PM5695#	+	+		+
PM5712	-	+		+
PM5720			+	-
PM5756			+	+
PM5793	-	+		+
PM5799			+	+
PM5982	-	+		+
PM6222#	+	+		+
PM6299	+	+		+
PM6423#			+	+
PM6430	-	+		+
PM6439#			+	+
PM6461			+	+
PM6470	-	+		+
PM6482			+	+
PM6548	-	+		+
PM6605			+	+
PM6620#				+
PM6624	-	+		+
PM6636#			+	+
PM6659			+	+
PM6679			+	+
PM6764			+	+
PM6782			+	-
PM6808	-	+		+
PM6937	+	+		+
PM7019	-	+		+
PM7020			+	+
PM7652	-	+		+
PM8112			+	+
PM8176	+	+		+
PM8206	+	+		+
PM8220			+	-
PM8226	-	+		+
PM8558	-	+		+
PM8563			+	+
PM8581			+	-
PM8594	+	+		+
PM8627			+	+
PM8691			+	+
PM8695				+
PM8717			+	+
PM8809			+	+
PM8872			+	+
PM8917			+	+
PM8929			+	+
PM9291			+	+
PM9358	+	+		+

PM9360#			+	+
PM9401			+	-
PM9407			+	+
PM9617			+	-
PM10051			+	-
PM11093			+	-
PM11369	+	N/A		+
PM12434	+	N/A		+
PM12575	+	N/A		+
PM12862			+	-
PM13313	+	N/A		+
PM13316			+	+
PM14027	+	N/A		+
PM14035#			+	+
PM14430			+	-
PM16672	+	N/A		+
PM16995.56	+	N/A		
PM17262#			+	+
PM17348.75	+	N/A		+
PM17386			+	+
PM17581.18	+	N/A		+
PM18901.94	+	N/A		+
PM19139.2	+	N/A		+
PM19558.27	+	N/A		+
PM19624.73	+	N/A		+
PM19845.94	+	N/A		+

Légende du Tableau 14 :

+* : Critère de sélection des clusters moins stringent appliqué à la phase séparative par interactions hydrophobiques : -> [% présent Groupe Contrôle] + [% présent Groupe T21] >= 30

5 ++ : Cluster présentant un signal sur des échantillons stockés à -80°C, 10 fois plus important qu'avec des échantillons stockés à -20°C.

: Clusters présentés ultérieurement à titre d'exemple

- : pas d'observation

10 Les clusters définis au Tableau 14 correspondent aux marqueurs de la liste (i) ci-dessus.

D – 2 Qualité des données et observations

15 Plusieurs critères qualitatifs permettent de juger de la qualité des données. On peut citer, à titre d'exemples, la reproductibilité des spectres obtenus pour un même échantillon, les écarts de temps de vol (proportionnels à la masse des protéines analysées) observés pour un même cluster, les paramètres de normalisation des spectres, ou encore la valeur du rapport signal sur bruit, les coefficients de variation souvent très inférieurs à 10% etc...

Le Tableau 15 montre un exemple de bonne reproductibilité de la valeur du TOF (donc de la masse réelle observée) et de la qualité du rapport signal sur bruit sur les Etudes E1 à E6.

5 Le Tableau 16, présenté également à titre d'exemple, indique pour quelques clusters observés lors des expériences de l'étude E6, le temps de vol (TOF), la valeur p du cluster et pour chaque groupe (Contrôle, T21, T18), les intensités moyenne, minimale et maximale ainsi que la déviation standard sur l'intensité.

Tableau 15 : Expérience Q10 cumulé E1 à E5 / Mode d'annotation automatique
TABLEAU PARTIEL PRESENTE A TITRE D'EXEMPLE

Tableau 15 : Expérience Q10 cumul E1 à E5 / Mode d'annotation automatique TABLEAU PARTIEL PRESENTE A TITRE D'EXEMPLE																				
Définition du cluster						Validité du cluster				Qualité du signal Rapport Signal sur Bruit										
Cluster	Masse Moyenne des substances (Calibration selon le cytochrome C Bovin	Mode d'annotation	Numéro du cluster	Calibrant	Représentation du cluster				Temps de vol				Minimum	25% percentile	Médiane	75% percentile	Maximum	Moyenne	Déviation standard	Erreur standard
					% annotations manuelles	% pics détectés lors de la clusterisation	TOF (μs)	Deviation (ns)	Minimum (μs)	Maximum (μs)										
PM4152	4151,00 /	Automatique	1	Insuline Bovine (50% de la population spectrale) / Cytochrome C Bovin	N/A	100.00	24,67	16,93	24,65	24,69	2,50	20,87	38,47	67,56	179,62	55,92	52,20	9,23		
	4163,88 /																			
PM4168	4166,38 /		2		N/A	72.00	24,71	16,91	24,69	24,74	1,17	5,82	15,69	24,07	43,79	15,74	10,99	1,94		
PM4186	4179,04 /		3		N/A	66.67	24,76	18,29	24,74	24,79	0,78	3,67	13,60	32,66	112,80	20,69	24,02	4,25		
PM4300	4184,41 /		4		N/A	100.00	25,10	16,63	25,08	25,13	4,34	7,92	13,19	19,40	26,75	13,63	6,48	1,15		
PM4821	4196,54 /		5		N/A	100.00	26,56	17,11	26,54	26,59	7,06	15,08	18,00	25,15	35,94	19,66	7,13	1,26		
PM8594	4300,03 /		6	Cytochrome C Bovin	N/A	85.71	35,44	16,95	35,42	35,47	1,04	4,39	6,44	11,81	25,56	8,27	5,02	0,89		
	4311,45 /																			
	4817,60 /																			
	4823,26 /																			
	8590,93																			

Tableau 16 : Etude principale E6 / Séparation hydrophobique / Rapport sur les Intensités / Annotations Automatiques / Normalisation selon le clusterPM6620															
TABLEAU PARTIEL PRESENTE A TITRE D'EXEMPLE															
Cluster	N° Cluster	TOF (µs)	Valeur p	Contrôle			T21			T18					
				Moyenne	Standard déviation	Min	Max	Moyenne	Déviati on standard	Min	Max	Moyenne	Déviati on standard	Min	Max
PM3156	1	21.54	0.457208	4.45	4.12	-0.46	13.73	5.90	5.95	1.04	22.23	2.56	1.68	0.99	4.49
PM3215	2	21.73	0.009008	8.24	1.68	5.80	13.67	10.16	2.05	6.88	13.96	9.18	3.17	5.24	12.84
PM4410	11	25.43	0.295773	5.68	5.58	2.56	27.60	5.37	3.09	2.63	14.80	4.41	1.47	3.16	6.53
PM4463	12	25.59	0.179243	8.32	4.96	1.82	18.69	8.94	4.70	2.58	19.42	7.48	4.73	3.13	12.41
PM4470	13	25.61	0.0982	9.37	4.13	3.04	16.95	10.98	6.06	4.37	29.35	9.05	3.32	5.07	11.99
PM4650	14	26.11	0.103567	6.08	5.20	1.17	21.43	8.89	16.22	1.42	70.95	6.10	3.09	2.67	9.92
PM5033	15	27.16	0.006125	2.99	2.11	0.71	8.97	4.47	8.59	0.86	38.29	3.49	1.47	2.04	5.53
PM5625	16	28.70	0.044947	3.38	3.96	0.51	16.82	1.76	0.90	0.46	3.70	0.98	0.36	0.60	1.34
PM5756	17	29.04	0.005933	8.41	3.26	4.09	16.07	10.91	7.23	2.71	33.55	8.96	6.19	5.05	18.13
PM5799	18	29.15	0.010931	10.11	4.50	4.86	20.92	12.99	8.19	3.96	38.00	9.28	5.33	5.10	17.04
PM6423	19	30.68	0.004728	13.35	2.05	9.74	19.41	16.51	2.88	12.15	24.46	14.32	4.01	9.41	19.21
PM6439	20	30.72	0.188758	14.73	3.46	8.00	20.73	21.24	15.24	9.88	78.67	17.08	6.40	9.78	25.13
PM6620	21	31.14	0.288472	28.31	0.07	28.24	28.57	28.29	0.03	28.23	28.38	28.29	0.01	28.27	28.30
PM6636	22	31.18	0.552805	23.09	4.62	16.10	35.12	24.67	7.12	15.34	47.82	28.92	6.58	23.60	38.16
PM6659	23	31.23	0.024619	7.35	1.08	5.52	9.41	8.82	2.31	5.71	15.44	9.75	1.38	8.64	11.76
PM7020	24	32.07	0.063323	6.00	4.30	1.58	19.43	4.21	1.97	1.32	7.88	2.43	0.46	2.03	2.91
PM8112	25	34.47	0.073538	1.52	1.12	0.05	3.45	3.64	7.49	0.14	32.68	2.27	2.33	0.05	4.44
PM8563	26	35.41	0.012477	9.92	9.13	4.20	44.52	11.84	8.61	5.18	41.52	10.54	6.65	5.48	19.92
PM8627	27	35.54	0.006125	16.10	5.60	8.25	30.85	22.41	14.89	10.09	73.99	17.95	11.28	10.78	34.71
PM8691	28	35.67	0.012396	23.91	8.73	12.95	43.53	32.12	20.38	13.57	99.68	22.72	12.74	13.67	41.61
PM8809	29	35.91	0.115651	8.15	3.41	5.16	20.22	10.57	6.68	5.19	33.76	7.45	3.03	4.82	11.81
PM8929	30	36.15	0.010007	7.83	2.32	4.69	12.39	10.67	6.37	5.86	32.45	7.77	1.84	5.02	8.88
PM9291	31	36.87	0.325234	4.34	2.26	1.75	11.24	6.11	8.93	1.70	40.62	3.89	1.59	2.18	5.70
PM9360	32	37.01	0.170855	8.94	5.65	2.31	25.13	6.76	3.71	2.20	18.58	4.08	0.21	3.90	4.38
PM14035	33	45.28	0.175758	4.79	3.58	0.67	14.43	3.04	1.71	0.62	6.05	1.61	0.35	1.14	1.97
PM17262	34	50.19	0.008505	4.80	1.57	2.22	8.55	6.94	4.57	2.97	23.46	5.07	3.03	2.97	9.57
PM17386	35	50.37	0.020274	5.77	2.17	2.71	10.50	8.12	5.11	3.28	26.12	5.41	2.98	3.40	9.83

D – 3 Spectres et Figures

Profils obtenus par séparation et purification de type anionique Q10 – étude E6:

La figure 5 montre les spectres obtenus sur la zone spectrale 3000-20000 Daltons, en vues globales, pour le groupe contrôle, le groupe T21 et le groupe T18. Les spectres normalisés y sont superposés par catégorie clinique.

Les figures 6, 7 et 8 montrent, respectivement, les vues spectrales (spectres normalisés et superposés par catégorie clinique), les vues en pseudo-gels, et les spectres en vues décalées (étude E6), centrés sur la zone 4000 Da.

Les figures 9, 10 et 11 montrent, respectivement, les vues spectrales (spectres normalisés et superposés par catégorie clinique), les vues en pseudo-gels, et les spectres en vues décalées (étude E6), centrés sur la zone 5000-6000 Da.

Profils obtenus par séparation de type anionique Q10 : E1 à E5

Ces profils sont montrés sur les figures 12 à 18, pour les deux catégories cliniques (contrôles et T21).

Les figures 12 à 14 montrent les spectres centrés sur la zone spectrale 3000-10000 Daltons, respectivement en vues globales (spectres normalisés et superposés par catégorie clinique), vue pseudo-gel, et vues décalées (E1 à E5). La figure 15 montre les spectres centrés sur la zone spectrale 3000-4000 Daltons (E1 à E5). Les figures 16 à 18 montrent les spectres, normalisés et superposés par catégorie clinique, centrés respectivement sur les zones 4000-5000 Daltons, 5000-7000 Daltons, et 7000-10000 Daltons (études E1 à E5).

Profils obtenus par séparation selon l'hydrophobicité des protéines H50 (étude E6)

Ces profils sont présentés dans les figures 19 à 26.

D – 4 Exemples de statistiques de distribution des intensités dans les groupes

Les figures 27 à 30 montrent des exemples de statistiques de distributions des intensités de différents clusters, pour les groupes contrôle et T21.

D – 5 Exemples de Courbes ROC construites à partir des Aires sous la courbe des Intensités brutes

Les aires sous la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristic*) des pics d'intérêts, calculées à partir des intensités brutes, sont plus grandes que 0,50, et peuvent atteindre 0,95.

La figure 31 montre les courbes ROC pour les marqueurs de poids moléculaires 3371, 3442, 3486, et 6423 Da.

D – 6 Exemple de Classification Hiérarchique sur Dataset E6 et Anionique

La figure 32 montre le résultat d'une construction avec les logiciels
5 Genecluster Version 1999 (Eisen M.) et Treeview Version 1.60 (Eisen M.) (Classification hiérarchique sur Jeu de Données de l'étude E6 (IC 95%), Surface Anionique Q10).

Méthode de construction : Ajustement des données par transformation logarithmique puis normalisation dans l'ordre, selon les spectres puis les clusters.
10 Puis clusterisation hiérarchique simultanément sur les clusters et les spectres par corrélation de Spearman.

Résultats : Excellente discrimination des Groupes contrôle ("bleu") , T21 ("rouge"), Délétion 7q (Série C), T18 (série E), Série T21 -80°C ("noire"), Série Contrôle -80°C ("verte").

15 D – 7 Exemple d'Analyse en Composante Principale sur Datasets des études E2 à E5 et Anionique

Les logiciels utilisés sont le logiciel Stata SE 8 et le logiciel *Ciphergen Express* Version 1.0. Les deux logiciels confirment les résultats.

Les valeurs propres (ou Valeurs de Eigen) confirment la présence et
20 le poids moléculaire des pics identifiés comme étant des défensines dont les masses sont : PM3371, PM3442 et PM3486.

Les résultats sont montrés sur la figure 33.

D – 8 Résultats cliniques et applications pour le dépistage

Les résultats obtenus pour les pics dans la zone 3000 Daltons, sur
25 surface anionique Q10, sont présentés dans le Tableau 17. Ces trois pics sont sous-exprimés ou absents dans le groupe T21, traduisant une baisse importante de l'immunité, et exprimés normalement ou sur-exprimés dans le groupe contrôle. Une étude plus approfondie des résultats permettra de déterminer le seuil de détection pour ces trois pics, qui sont corrélés et dépendants, tel qu'au moins un signe négatif parmi
30 les trois ou un signe positif parmi les trois signe la maladie ou l'absence de maladie, respectivement. Les résultats présentés dans le Tableau 17 présentent une variabilité

pour ces trois pics, principalement liée au fait qu'ils ont été obtenus avec des échantillons conservés à -20°C, présentant une certaine dégradation.

Le Tableau 18 ci-après présente les résultats et applications pour les pics dans la zone 4000 – 9000 Daltons, sur surface anionique Q10.

5 Le Tableau 19 montre les résultats et applications pour les pics dans la zone 4000 -17500 Daltons, sur surface hydrophobe H50.

Tableau 17 : Sélection des échantillons / Phase séparative anionique, pH > 4 / Clusters PM3371, PM3442 et PM3486				
Echantillons	Groupe	Q10 cumul E1 - E5		
		PM3371	PM3442	PM3486
1	DS	-	-	-
2	DS	-	-	-
4	DS	-	-	+
5	DS	-	-	-
6	DS	-	-	+
7	DS	-	-	-
8	DS	-	-	-
A1	DS	-	-	-
A2	DS	-	+	+
A2	DS	+	+	+
A3	DS	-	-	+
A4	DS	+	+	-
A5	DS	-	-	-
A6	DS	-	-	-
A7	DS	-	-	-
A8	DS	-	-	-
9	Contrôle	+	+	+
10	Contrôle	-	+	+
12	Contrôle	+	+	+
13	Contrôle	+	-	+
14	Contrôle	+	+	+
15	Contrôle	+	+	+
16	Contrôle	+	+	+
A9	Contrôle	-	-	-
A10	Contrôle	+	+	+
A10	Contrôle	+	+	+
A11	Contrôle	-	-	-
A12	Contrôle	-	-	-
A13	Contrôle	+	+	-
A14	Contrôle	+	+	+
A15	Contrôle	+	+	+
A16	Contrôle	-	-	+
Aire sous la courbe ROC		0,8164	0,8555	0,8164
Erreur Standard		0,07572	0,06688	0,07419
Intervalle de confiance (95%)		0,6680 à 0,9649	0,7244 à 0,9866	0,6710 à 0,9619
Valeur P		0,002279	0,0006092	0,002279

Tableau 18 : Sélection des échantillons par clusters / Phase séparative anionique, pH > 4 / Quelques exemples																
Echan- tilions	Groupes	Q10 cumulé E1 à E5										Etude principale E6				
		PM4152	PM4168	PM4186	PM4201	PM4300	PM5695	PM6222	PM4152	PM4186	PM4201	PM4300	PM5695	PM6222		
1	DS	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+		
2	DS	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
3	DS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+	-	+		
4	DS	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-		
5	DS	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+		
6	DS	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+		
7	DS	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+		
8	DS	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
A1	DS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
A2	DS	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-		
A2	DS	+	+	-	-	-	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
A3	DS	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-		
A4	DS	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-		
A5	DS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-		
A6	DS	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
A7	DS	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+		
A7	DS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	-	+	+	-	+		
A7	DS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	-	+	+	-	+		
A8	DS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+		
9	Contrôle	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+		
10	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-		
11	Contrôle	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+	+	+	+		
12	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+		
13	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+		
14	Contrôle	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+		
15	Contrôle	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+		
16	Contrôle	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+		
A9	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+		
A10	Contrôle	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+		
A10	Contrôle	+	+	-	-	+	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A		
A11	Contrôle	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+		
A12	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-		
A13	Contrôle	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+		
A14	Contrôle	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+		

Echantillons		Tableau 18 : Sélection des échantillons par clusters / Phase séparative anionique, pH > 4 / Quelques exemples													
		Etude principale E6													
		Q10 cumulé E1 à E5													
Groupes		PM4152	PM4168	PM4186	PM4201	PM4300	PM5695	PM6222	PM4152	PM4168	PM4186	PM4201	PM4300	PM5695	PM6222
A15	Contrôle	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
A15	Contrôle	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+	-	+	+
A15	Contrôle	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	+	+	+	+	+	+	+
A16	Contrôle	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
A25	Absent 80°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Absent	Absent	Présent	Absent	Absent
A26	Absent 80°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Présent	Absent	Présent	Présent	Absent	Absent	Absent
A27	Absent 80°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Présent	Présent	Absent	Absent	Présent	Présent	Absent
A28	Absent 80°C	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	Présent	Absent	Présent	Présent	Absent	Présent	Absent
Aire sous la courbe ROC		0,5820	0,6055	0,6055	0,6758	0,5781	0,5820	0,5781	0,5772	0,5401	0,5401	0,5648	0,6790	0,6543	0,6080
Erreur Standard		0,1050	0,1029	0,1029	0,09707	0,1057	0,1042	0,1043	0,09804	0,1003	0,09832	0,09735	0,09221	0,09370	0,09568
Intervalle de confiance (95%)		0,3761 to 0,7880	0,4037 to 0,8072	0,4037 to 0,8072	0,4855 to 0,8661	0,3710 to 0,7853	0,3777 to 0,7864	0,3736 to 0,7826	0,3850 to 0,7694	0,3435 to 0,7368	0,3474 to 0,7329	0,3740 to 0,7557	0,4982 to 0,8598	0,4706 to 0,8380	0,4204 to 0,7956
Valeur P		0,4287	0,3089	0,3089	0,08995	0,4510	0,4287	0,4510	0,4290	0,6809	0,6809	0,5065	0,06656	0,1137	0,2682

Tableau 19 : Sélection des échantillons par clusters / Phase séparative hydrophobique / Quelques exemples										
Echantillons	Groupes	PM4682	PM5625	PM6423#	PM6439#	PM6620	PM6636#	PM9360	PM14035	PM17262
1	DS	+	-	-	+	-	+	-	-	+
2	DS	-	-	+	+	-	-	-	+	+
3*	DS	+	-	+	+	-	+	+	-	+
4	DS	-	+	+	-	+	-	-	-	-
5	DS	-	-	+	-	+	-	-	-	+
6	DS	-	-	-	-	+	-	-	-	+
7	DS	-	-	+	+	-	+	+	-	+
8	DS	-	+	-	-	+	-	-	+	+
A1*	DS	-	-	+	+	-	+	-	+	-
A2	DS	-	-	+	+	-	+	-	+	+
A3	DS	-	-	+	-	+	-	-	+	+
A4*	DS	-	-	+	-	-	-	-	+	+
A5	DS	-	-	+	+	+	-	-	-	+
A6	DS	-	+	+	-	-	-	+	-	+
A7	DS	-	-	+	-	-	+	-	-	-
A7	DS	-	-	+	+	+	+	+	-	+
A7	DS	-	-	+	+	+	+	+	-	+
A8	DS	-	-	+	+	-	+	-	+	+
9	Contrôle	+	-	-	-	+	-	-	-	+
10	Contrôle	+	+	-	-	-	-	+	+	-
11*	Contrôle	-	+	-	-	+	+	+	+	-
12	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	+
13	Contrôle	+	+	+	-	-	+	+	+	+
14	Contrôle	-	+	-	+	+	-	+	+	+
15	Contrôle	+	+	-	-	-	+	+	+	-
16	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-
A9*	Contrôle	+	-	-	+	+	+	-	-	+
A10	Contrôle	-	-	-	+	+	-	-	-	+
A11	Contrôle	+	+	+	+	+	-	-	+	+
A12*	Contrôle	+	+	-	+	-	+	+	-	-
A13	Contrôle	+	-	-	-	+	-	-	-	+
A14	Contrôle	+	+	-	-	+	-	+	+	-

Tableau 19 : Sélection des échantillons par clusters / Phase séparative hydrophobique / Quelques exemples											
Echantillons	Groupes	PM4682	PM5625	PM6423#	PM6439#	PM6620	PM6636#	PM9360	PM14035	PM17262	
A15	Contrôle	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A15	Contrôle	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
A15	Contrôle	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
A16	Contrôle	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
A25	-80°C	Absent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent
A26	-80°C	Absent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent
A27	-80°C	Absent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent
A28	-80°C	Absent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent
Aire sous la courbe ROC		0,8133	0,7111	0,6000	0,6265	0,7111	0,8622	0,6756	0,7600	0,5644	
Erreur Standard		0,08624	0,09526	0,1076	0,09633	0,09793	0,06877	0,09850	0,08770	0,1089	
Intervalle de confiance (95%)		0,6443 to 0,9824	0,5244 to 0,8979	0,3891 to 0,8109	0,4377 to 0,8154	0,5191 to 0,9031	0,7274 to 0,9970	0,4824 to 0,8687	0,5881 to 0,9319	0,3510 to 0,7779	
Valeur P		0,003469	0,04887	0,3507	0,1946	0,04887	0,0007292	0,1014	0,01528	0,5476	

: Critères sélectifs obtenus après normalisation des clusters par rapport à l'intensité du cluster PM6620

* : Echantillons utilisés exclusivement pour tester les critères de sélection

D – 9 Purification et Identification : quelques exemplesPurification

Parmi diverses combinaisons testées, surfaces de séparation et de purification, conditions de purification etc., on peut citer les suivantes :

Tableau 20 : Conditions de purification / Quelques exemples												
Séparation en fonction de la masse native	50 kDa < PM < 100 kDa					PM > 100 kDa					Sérum brut	
	Oxyde de silice	Hydrophobe pH et conditions C ₆ -C ₁₈	Approche ciblée	Amine quaternaire		Oxyde de silice	Hydrophobe pH et conditions C ₆ -C ₁₈	Approche ciblée	Amine quaternaire		Approche ciblée	Sérum brut
				pH4	pH8				pH4	pH8		
Conditions de séparation												
PM3371	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
PM3442	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
PM3486	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
PM6423	*	+	-	-	*	+	+	-	-	-	+	+
PM6439	*	+	-	-	*	+	+	-	-	-	+	+
PM6620	*	+	-	-	*	+	+	-	-	-	+	+
PM6636	*	+	-	-	*	+	+	-	-	-	+	+

.* : Signal fortement perturbé par la présence massive d'albumine. Expériences après déplétion de l'albumine en cours.

Identification Clusters PM3371, PM3442 et PM3486*Considérations sur la masse native*

Ces trois peptides ont des propriétés biophysicochimiques corrélées. Ils sont présents dans une fraction native des échantillons telle que la masse des produits soit comprise entre 50 et 100 kDa ou supérieure à 100 kDa. Il s'agit donc de peptides associés à une ou plusieurs protéines, tel que la masse des complexes ainsi constitués soit supérieure à 50 kDa. Une approche ciblée a permis d'identifier une association possible des HNPs à : l'albumine, l' α -foetoprotéine, et/ou des immunoglobulines G.

10 *Considérations sur la phosphorylation*

Ces peptides se retrouvent dans une approche ciblée utilisant le gallium comme molécule d'affinité. L'affinité des acides aminés phosphorylés pour le gallium (Posewitz MC, Tempst P., *Immobilized gallium(III) affinity chromatography of phosphopeptides*. Anal Chem. 1999 Jul 15; 71(14):2883-92.) étant reconnu, il est donc possible d'émettre l'hypothèse que soit ces peptides, soit l'une des molécules qui leur sont associées, possèdent un ou plusieurs acides aminés phosphorylés.

Considérations sur les écarts de masses et possible identification

Il s'agit de considérations sur l'écart de masse entre deux des trois peptides.

20 $PM3442 - PM3371 = 71 \text{ Da} \rightarrow \text{alanine (A)}$

$PM3486 - PM3371 = 115 \text{ Da} \rightarrow \text{acide aspartique (D)}$

$PM3486 - PM3442 = 44 \text{ Da} \rightarrow \text{remplacement d'un acide aspartique (D) par une alanine (A)}.$

25 Issues des banques de données, seules les séquences des défensines neutrophiles humaines (*Human Neutrophil Defensins*, ou HNPs) correspondent aux critères énoncés (voir Tableau 21).

Tableau 21 : Séquence d'acides aminés des α -Defensines (HNP-1, HNP-2 et HNP-3)			
Noms	Séquence d'acides aminés	Poids Moléculaires (Da)	Différence par rapport à HNP-2
Défensine-2 neutrophile humaine	-CYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	3371.01	-
Défensine-1 neutrophile humaine	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	3442.09	A
Défensine-3 neutrophile humaine	DCYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLWAFCC	3486.10	D

Identification des clusters PM6423, PM6439, PM6620 et PM6636 :

Considérations sur la masse native

Ces quatre peptides ont des propriétés biophysicochimiques corrélées. Ils sont présents dans une fraction native des échantillons telle que la masse des produits soit comprise entre 50 et 100 kDa ainsi que dans une fraction de masse native supérieure à 100 kDa. Il s'agit donc de peptides associés à plusieurs protéines distinctes, tels que la masse des complexes ainsi constitués soit comprise entre 50 et 100 kDa, ou supérieure à 100 kDa.

Considérations sur les écarts de masses et possible identification

Il s'agit de considération sur l'écart de masse entre deux des quatre peptides.

- PM6636 – PM6620 = 16 Da → Possible hydrolyse d'une proline en hydroxyproline
- PM6636 – PM6439 = 197 Da +/- 1Da → valine + proline (196 Da) ou Proline + Thréonine (198 Da)
- PM6636 – PM6423 = 181 Da +/- 1Da → Pas de combinaison d'acides aminés
- PM6620 – PM6439 = 181 Da +/- 1Da → Pas de combinaison d'acides aminés
- PM6620 – PM6423 = 197 Da +/- 1Da → valine + proline (196 Da) ou proline + thréonine (198 Da)
- PM6439 – PM6423 = 16 Da → Possible hydrolyse d'une proline en hydroxyproline

Ces considérations sont résumées dans la figure 34.

E – CONCLUSIONS SUR LA PREMIERE SERIE D'ETUDES

Les résultats relatifs à 19 marqueurs discriminants des populations Contrôle et T21 sont présentés ci-dessus. L'ensemble des marqueurs présentés au Tableau 14 peuvent être inclus dans des combinaisons, entre eux, ou en combinaison avec le triple test ou bien avec un ou deux marqueurs du triple test. Ces marqueurs, sur-exprimés ou sous-exprimés, dans le groupe contrôle ou dans le groupe malade, présentent tous un intérêt diagnostic.

En particulier, les pics de masse PM 3371, PM3442, PM 3486, identifiés comme des défensines, sont sous-exprimés dans les groupe T21 et sur-exprimés ou normalement exprimés chez les contrôles.

Les pics de masse PM 6423, PM 6439, PM6620, PM6636, sont identifiables deux à deux à une hydrolyse d'une proline en hydroxyproline (+16 Da).

F – ETUDES COMPLEMENTAIRES SUR L'UTILISATION DES DEFENSINES COMME MARQUEURS DE DIAGNOSTIC

Des études complémentaires visant à confirmer la pertinence des défensines HNP-2, HNP-1 et HNP-3 comme marqueurs de diagnostic prénatal du syndrome de Down ont été réalisées. Différentes conditions expérimentales ont été utilisées. En particulier, les inventeurs ont fait varier le pH de travail et testé différentes conditions de fractionnement (fraction C ou échantillon sérum natif).

Ces études ont montré que bien que les défensines soient théoriquement visualisables à pH=7,4, elles ne sont en réalité détectables qu'à un pH inférieur à 5. Ceci est probablement dû au fait qu'au moins une partie de ces défensines est complexée à l'alpha-fœtoprotéine et/ou à l'albumine.

Par ailleurs, les inventeurs ont calculé les ratios longitudinaux (*i.e.*, entre 2 pics d'un même spectre) entre les intensités des pics correspondants aux différentes HNPs. De façon remarquable, ils ont observé, uniquement en condition de sérum natif, une différence significative de ces ratios, suivant qu'il s'agit d'un échantillon d'une femme porteuse d'un fœtus atteint de trisomie 21 ou d'une femme porteuse d'un fœtus sain.

Les résultats de trois de ces études sont présentés ci-après, ainsi qu'aux figures 35 à 38. Les études dont les résultats sont présentés en détail ont été

réalisées à partir de trois ensembles de données (*datasets*). Elles sont identifiées comme suit :

5

- NS502 : purification anionique Q10/Sérum natif/pH=4/-80°C, à partir des échantillons listés dans le Tableau 22 ci-après,
- NS503 : idem que NS503, mais pH=5, et
- NS403CDsf : purification anionique Q10/Fraction C du sérum /pH=4, à partir des échantillons listés dans le Tableau 23 ci-après

Tableau 22 : DATASET NS502 POPULATION TESTEE (Q10/Anion Exchange/Natiff/Ph4/-80°C)

Tableau 22 : DATASET NS502 POPULATION TESTEE (Q10/Anion Exchange/Natif/Ph4/-80°C)															
N° Echantillon	Date Prélèvement	Statut	Age	poids	sem+	hcg_uil	MoMhcg	ue3_pg	MoMue3	atp_uil	MoMatp	risque	Caryotype	Issue	Autres Informations
F	20 11 02	CTRL	27	15+0	26.6	0.83	860	1.42	21.8	0.87	1/10000				filie BP
F14	12 03 03	CTRL	39	74	15+5	25.60	1.04	640	0.86	22.70	0.87	1/320	46,XX		filie BP
F4	22 03 04	CTRL	34		14+4	16	0.43	650	1.27	24.4	1.00	1/8400	45,XX,der(13;14)		filie BP
F5	30 03 04	CTRL	27		14+2	27.2	0.67	350	0.79	17.7	0.77	1/3300			filie BP
M10	26/11/2004	CTRL	35,00	46	16+1	43.90	1.57	720,0	0.74	36,10	1,00	241	46,XX		filie BP
M11	27/11/2004	CTRL	32,00	62	16+4	58,80	2,65	1010,0	1,00	50,20	1,53	550			filie BP
M12	27/11/2004	CTRL	38,00	52	15+4	19,00	0,61	470,0	0,59	25,10	0,80	242	46,XX		filie BP
M13	27/11/2004	CTRL	30,00	54	14	16,20	0,33	410,0	1,12	22,90	1,00	10000			filie BP
M14	28/11/2004	CTRL	28,00	79	15+6	59,70	2,65	780,0	1,03	22,20	0,88	420			filie BP
M15	28/11/2004	CTRL	36,00		16+2	10,40	0,42	690,0	0,72	23,60	0,71	1100			garçon BP
M16	27/11/2004	CTRL	29,00		16+2	44,50	1,95	520,0	0,55	29,20	0,91	86	46,XY		garçon BP
M17	27/11/2004	CTRL	24,00	59	17	13,50	0,65	1340,0	1,18	41,30	1,15	10000			filie BP
M18	27/11/2004	CTRL	30,00	52	16+6	20,30	0,89	1340,0	1,18	29,10	0,77	6500			garçon BP
M19	26/11/2004	CTRL	32,00	74	17+2	13,40	0,77	1340,0	1,19	39,50	1,22	10000			filie BP
M5	26/11/2004	CTRL	25,00		17+4	11,30	0,64	1190,0	0,94	46,30	1,22	10000			filie BP
M7	26/11/2004	CTRL	25,00	58	17+1	18,50	0,91	550,0	0,47	40,90	1,11	670			filie BP
M8	26/11/2004	CTRL	29,00		21+2	13,60	1,05	3710,0	1,68	93,10	1,69	0			garçon BP
M9	26/11/2004	CTRL	28,00	71	15+5	20,70	0,82	700,0	0,92	28,10	1,05	8200			garçon BP
F1	18 02 04	DS	32		14+6	109,8	3,28	310	0,54	13,1	0,51	1/5	47,XY,+21	marqueurs	dysmorphie
F10	23 03 04	DS	39		15+0	101,8	3,21	580	0,94	18,3	0,70	1/21	47,XY,+21	âge	IMG
F11	25 03 04	DS	40		16+1	16,8	0,71	620	0,68	24,8	0,79	1/235	47,XX,+21	âge	IMG
F12	02 04 04	DS	23		16+2	67,5	2,95	600	0,64	33,4	1,04	1/71	47,XY,+21	clarté nucale	IMG
F13	29 04 04	DS	32		15+0	57,9	1,82	420	0,68	11,1	0,42	1/40	47,XX,+21	clarté nucale	IMG
F2	28 01 04	DS	27		15+1	67,9	2,24	400	0,63	18,5	0,73	1/68	47,XX,+21	marqueurs	dysmorphie
F3	30 03 04	DS	28		17+5	48,3	2,8	33	0,02	51,77	1,34	1/41	46,XX,der(14;21)	{(14;21)mat	pas d'anapath
F6	02 05 04	DS	34		14+2	209,4	5,18	490	1,12	18,3	0,79	1/91	47,XX,+21	hygroma	IMG fille
F7	09 03 04	DS	39		16+4	92,3	4,29	810	0,79	31,8	0,95	1/5	47,XX,+21	âge	IMG
F8	16 03 04	DS	34	65	17+3	84	4,59	1040	0,86	22,3	0,62	1/5	47,XY,+21	marqueurs	IMG
F9	22 03 04	DS	32	60	20+0	30,6	2,12	1380	0,72	36,6	0,72	1/81	47,XY,+21	marqueurs	IMG
M1	28/09/2004	DS	31		20	36,8	2,69	2870	1,5	115,8	2,36	2800	47,XY,+21		IMG
M2	15/12/2004	DS	38,00		17+3	48,70	2,68	650,0	0,52	42,80	1,15	8	47,XX,+21		IMG
M3	06/01/2005	DS	44,00	69	17+2	42,90	2,37	910,0	0,79	22,00	0,65	5	47,XX,+21		IMG
M6	26/11/2004	DS	31,00	81	16+3	27,30	1,41	870,0	0,98	13,20	0,49	480	47,XX,+21	fémur court	IMG

Tableau 23 : DATASET NS403CDsf POPULATION TESTEE (Q10/Anion Exchange/fraction C/Ph=4)

Groupe	N° échantillon	Hosp Code	Date prelev.	Age	Poids	Semaine	Jour	Gestation J	hCG UI	Hcg MoM	uE3 pg	uE3	AFP UI	AFP MoM	Risk R4	sexe	Issue	Caryotype	Anapath
CTRL	9	41 284 014	12/07/01	33	.	16	1	113	37.3	1.55	740	0.87	11.1	0.35	1/90	M		46,XY	
CTRL	10	41 281 019	09/07/01	30	78	15	3	108	41.8	1.58	550	0.89	23.6	0.99	1/970	M			
CTRL	12	41 205 063	16/05/01	28	66	15	0	105	40.3	1.22	520	0.94	20.1	0.80	1/1900	M			
CTRL	13	41 125 034	23/03/01	26	57	15	4	109	72.1	2.37	450	0.63	30.8	1.03	1/116	F		46,XX	
CTRL	14	41 276 009	07/07/01	28	61	16	0	112	57.5	2.24	590	0.72	20.3	0.66	1/95	F		46,XX	
CTRL	15	41 262 046	26/06/01	22	60	17	1	120	37.2	1.76	810	0.74	19.5	0.54	1/182	F		46,XX	
CTRL	16	41 174 040	26/04/01	33	53	17	1	120	37.8	1.68	1060	0.94	33.6	0.87	1/510	F			
CTRL	A9	119933	19/01/99	33	.	16	4	116	31.50	1.46	900.00	0.88	24.90	0.74	1/332	F			filie BP
CTRL	A10	49494010	07/12/99	33	.	16	3	115	26.60	1.20	620.00	0.63	30.20	0.92	1/474	M			
CTRL	A11	113591	28/07/98	29	.	16	3	115	33.60	1.51	580.00	0.59	30.87	0.94	1/254	F		45,XX	
CTRL	A12	116833	27/10/99	27	.	15	2	107	39.70	1.34	220.00	0.32	29.40	1.06	1/431	M		46,XY	garçon BP
CTRL	A13	41084032	22/02/01	36	.	14	6	104	71.10	1.97	240.00	0.45	21.80	0.86	1/11	F		46,XX	filie BP
CTRL	A14	113742	28/07/98	34	.	15	2	107	43.10	1.36	370.00	0.60	18.08	0.70	1/76	M		46,XY	garçon BP
CTRL	A15	113512	22/07/98	38	.	17	5	124	31.40	1.80	1 240	0.94	52.95	1.37	1/239	F		46,XX	filie BP
CTRL	A16	40022037	07/01/00	38	.	15	2	107	57.20	1.87	570.00	0.93	42.15	1.53	1/166	M		46,XY	garçon BP
DS	1	40 233 027	07/06/00	35	.	16	1	113	96.5	4.02	540	0.70	13.17	0.42	1/10	M	IMG	47,XY,+21	pas de malformation
DS	2	40 351 013	28/08/00	27	56	15	5	110	118.2	4.02	300	0.42	32.9	1.07	1/8	M	IMG	47,XY,+21	oedeme nuque
DS	4	41 282 050	10/07/01	32	52	15	0	105	82.4	2.22	750	1.26	21.9	0.77	1/660	M	IMG	47,XY,+21	tétraplogie fœtal
DS	5	42 114 001	14/03/02	31	57	15	4	109	67.6	2.22	440	0.62	39.5	1.32	1/126	F	IMG	47,XX,+21	oedeme nuque
DS	6	42 041 032	21/01/02	29	54	15	6	111	68.9	2.41	500	0.62	33.9	1.06	1/84	F	IMG	47,XX,+21	CIV haute
DS	7	40 364 001	07/09/00	36	.	17	1	120	80.2	3.99	450	0.46	40.2	1.12	1/5	F	IMG	47,XX,+21	CIV
DS	8	42 394 032	25/09/02	21	78	16	4	116	51.3	2.57	560	0.60	36.2	1.28	1/143	F	IMG	47,XX,+21	pas de malformation
DS	A1	119929	22/01/99	29	.	16	3	115	35.70	1.61	810.00	0.82	23.38	0.71	1/441	F		47,XX,+21	née
DS	A2	49494032	08/12/99	36	.	16	4	116	24.00	1.11	680.00	0.66	23.30	0.69	1/153	M		47,XY,+21	né (CIV-CIA)
DS	A3	114172	14/08/98	30	.	15	4	109	95.00	3.46	400.00	0.52	38.40	1.33	1/17	F	IMG	47,XX,+21	
DS	A4	116783	27/10/98	31	.	16	4	116	34.00	1.49	290.00	0.31	18.70	0.56	1/37	M	IMG	47,XX,+21	
DS	A5	41153015	07/04/01	34	65	16	3	115	88.90	3.87	560.00	0.63	15.10	0.48	1/5	F	IMG	47,XX,+21	
DS	A6	113608	28/07/98	30	.	16	1	113	66.00	2.39	480.00	0.55	11.00	0.36	1/10	M	IMG	47,XX,+21	
DS	A7	40411009	01/09/00	38	.	17	2	121	25.30	1.29	1 390	1.26	22.40	0.61	1/310	F	IMG	47,XX,+21	
DS	A8	40526003	21/12/00	40	.	17	9	128	37.70	1.84	810.00	0.76	28.80	0.81	1/32	M	IMG	47,XX,+21	

BP= bien portant

Les résultats de ces études sont présentés dans les Tableaux 24 à 29 ci-après, dans lesquels les abréviations et/ou anglicismes suivants sont utilisés : IC ou CI = intervalle de confiance ; Dataset = jeu de données ; Obs. = nombre d'échantillons observés ; GC ou CG = groupe contrôle ; SD ou DS ou S. Down = syndrome de
5 Down ; Err. Std. = erreur standard ; SN = signal sur bruit ; Moy. = moyenne ; AUC = *Area under curve*, ou aire sous la courbe ; var AUC = variance des AUC ; pAUC (8%) = *Partial Area Under Curve*, on a imposé un taux de faux positifs (FP) de 8% au Dataset.

Tableau 24 : Statistiques Descriptives HNP

HNP2		Obs.		PM (Substance Masse)		
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD	Cluster N°	Err. Std.
2005	Native ph5, -80	NS503 (N=33)	18	15	1	0.24
2005	Native ph4, -80	NS502 (N=33)	18	15	3	0.23
2003 CD	Fraction C, ph4	NS403 (N=30)	15	15	1	0.44
HNP1			Obs.			
			n=GC	n=SD	Cluster N°	Err. Std.
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	2	0.31
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	4	0.22
2003 CD	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	2	0.43
HNP3			Obs.			
			n=GC	n=SD	Cluster N°	Err. Std.
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	3	0.41
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	5	0.35
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	3	0.44

Suite du tableau 24											
HNP2			Obs.		Cluster N°	Intensité moyenne du cluster				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	1	2.88	(1.53 - 4.22)	2.23	(1.25 - 3.21)	1	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	3	9.74	(6.60 - 12.87)	7.26	(5.12 - 9.41)	0.373	
2003 CD	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	1	9.76	(3.67 - 15.85)	2.90	(2.05 - 3.74)	0.01	
HNP1			Obs.		Cluster N°	Intensité moyenne du cluster				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	2	3.59	(1.76 - 5.42)	2.54	(1.06 - 4.02)	0.169	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	4	8.92	(5.29 - 12.56)	6.52	(3.64 - 9.39)	0.04	
2003 CD	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	2	10.65	(4.33 - 16.97)	3.14	(2.11 - 4.18)	0.001	
HNP3			Obs.		Cluster N°	Intensité moyenne du cluster				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	3	2.91	(0.60 - 5.23)	1.09	(0.55 - 1.63)	0.492	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	5	5.99	(2.96 - 9.02)	2.33	(1.25 - 3.41)	0.112	
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	3	9.96	(3.87 - 16.06)	2.86	(1.86 - 3.85)	0.060	
HNP2			Obs.		Cluster N°	Moyenne du cluster (SN)				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	1	2.65	(1.73 - 3.57)	2.36	(1.44 - 3.28)	0.49	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	3	16.36	(11.50 - 21.23)	13.28	(9.83 - 16.73)	0.025	
2003 CD	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	1	15.47	(3.24 - 27.69)	4.08	(2.98 - 5.18)	0.06	
HNP1			Obs.		Cluster N°	Moyenne du cluster (SN)				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	2	3.37	(1.92 - 4.82)	2.59	(1.22 - 3.96)	0.49	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	4	14.84	(9.47 - 20.21)	11.65	(6.72 - 16.57)	0.04	
2003 CD	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	2	16.90	(4.08 - 29.73)	4.34	(2.98 - 5.70)	0.06	
HNP3			Obs.		Cluster N°	Moyenne du cluster (SN)				Test de la médiane	
Date	Condition	Dataset	n=GC	n=SD		Moy. GC	[95% IC]	Moy. SD	[95% IC]	p value	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	3	2.48	(0.88 - 4.07)	1.16	(0.61 - 1.70)	0.49	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	5	9.75	(5.00 - 14.50)	4.24	(2.16 - 6.31)	0.112	
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	3	15.52	(3.65 - 27.38)	3.90	(2.76 - 5.05)	0.06	

Tableau 25 : AUC Estimations (données continues et Estimation Non Paramétrique)											
AUC Estimation Empirique (Variable: Masse / Charge) (m/z)						HNP2					
Date	Condition	Dataset	GC	S. DOWN	Cluster N°	m/z	SD	Auc (10)	Var(auc)	pAuc (8%)	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	1	3374.70	1.40	0.55	0.00	0.47	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18	15	3	3375.90	1.30	0.51	0.00	0.43	
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	1	3389.80	2.40	0.64	0.00	0.56	
AUC Estimation Empirique (Variable: Masse / Charge) (m/z)						HNP1					
Date	Condition	Dataset	GC	S. DOWN	Cluster N°	m/z	SD	Auc (10)	Var(auc)	pAuc (8%)	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	2	3445.50	1.80	0.56	0.00	0.48	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18	15	4	3447.10	1.30	0.62	0.01	0.54	
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	2	3461.00	2.40	0.72	0.01	0.64	
AUC Estimation Empirique (Variable: Masse / Charge) (m/z)						HNP3					
Date	Condition	Dataset	GC	S. DOWN	Cluster N°	m/z	SD	Auc (10)	Var(auc)	pAuc (8%)	
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	3	3489.00	2.40	0.58	0.00	0.50	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18	15	5	3489.90	2.00	0.67	0.01	0.59	
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	3	3503.80	2.40	0.71	0.01	0.63	

Tableau 26 : Statistiques Descriptives Ratios													
ratio1/3													
Date	Condition	Dataset	Obs.		Ratio des intensités moyennes								p Mann_Whitney
					n=GC	n=SD	Moy. GC	Std. Error	[95% IC]	Moy. SD	Std. Error	[95% IC]	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	18	15	2.77	0.91	(0.84 - 4.69)	3.87	0.70	(2.37 - 5.37)	0.01
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	18	15	2.06	0.42	(1.17 - 2.95)	2.11	0.31	(1.45 - 2.77)	0.35
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	15	15	1.13	0.08	(0.97 - 1.30)	1.13	0.07	(0.98 - 1.28)	0.92
ratio1/2													
Date	Condition	Dataset	Obs.		Ratio des intensités moyennes								p Mann_Whitney
					n=GC	n=SD	Moy. GC	Std. Error	[95% IC]	Moy. SD	Std. Error	[95% IC]	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	18	15	0.87	0.06	(0.75 - 0.99)	0.84	0.10	(0.62 - 1.06)	0.39
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	18	15	1.17	0.10	(0.96 - 1.39)	1.11	0.22	(0.64 - 1.58)	0.25
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	15	15	1.14	0.03	(1.07 - 1.20)	1.08	0.09	(0.89 - 1.28)	0.2372
ratio2/3													
Date	Condition	Dataset	Obs.		Ratio des intensités moyennes								p Mann_Whitney
					n=GC	n=SD	Moy. GC	Std. Error	[95% IC]	Moy. SD	Std. Error	[95% IC]	
2005	Native ph4 -80	NS502 (N=33)	18	15	18	15	3.37	1.04	(1.17 - 5.57)	5.8	1.59	(2.39 - 9.21)	0.01
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18	15	18	15	1.73	0.31	(1.07 - 2.39)	2.27	0.40	(1.42 - 3.12)	0.21
2003 CDsf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15	15	15	15	0.99	0.05	(0.89 - 1.10)	1.13	0.10	(0.91 - 1.35)	0.42

Tableau 27 : Estimation sur données continues (en signal sur bruit) pAUC de 8% signifie Partial Area Under Curve; on a imposé un taux de faux positifs (FP) de 8% au Dataset. L'AUC, la variance des AUC, et la PAUC ont été calculées avec un intervalle de confiance (IC) de 95%									
<i>AUC Estimation Empirique</i>				<i>Ratio1/2 (Variable: Signal sur bruit) (SN)</i>					
Date	Condition	Dataset	GC SD	Auc (05)	Std. Err.	[95% IC]	pAuc (8%)		
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18 15	0.38	0.11	(0.17 - 0.60)	0.30		
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18 15	0.41	0.11	(0.20 - 0.62)	0.33		
2003 CDSf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15 15	0.37	0.11	(0.15 - 0.59)	0.29		
<i>AUC Estimation Empirique</i>				<i>Ratio1/3 (Variable: Signal sur bruit) (SN)</i>					
Date	Condition	Dataset	GC SD	Auc (05)	Std. Err.	[95% IC]	pAuc (8%)		
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18 15	0.60	0.11	(0.39 - 0.80)	0.52		
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18 15	0.76	0.09	(0.59 - 0.93)	0.68		
2003 CDSf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15 15	0.51	0.11	(0.29 - 0.73)	0.43		
<i>AUC Estimation Empirique</i>				<i>Ratio2/3 (Variable: Signal sur bruit) (SN)</i>					
Date	Condition	Dataset	GC SD	Auc (05)	Std. Err.	[95% IC]	pAuc (8%)		
2005	Native ph5 -80	NS503 (N=33)	18 15	0.63	0.10	(0.43 - 0.83)	0.55		
2005	Native ph4 -80	NS502 (N= 33)	18 15	0.77	0.09	(0.59 - 0.95)	0.69		
2003 CDSf	Fraction C ph4	NS403 (N=30)	15 15	0.59	0.11	(0.37 - 0.81)	0.51		

Tableau 28 : test de la médiane

Tableau 28 : test de la médiane			
Groupes confondus			
	NS403 CDsf	NS502	NS503
ratio13	0.03	0.11	0.06
ratio12	1.00	0.71	0.26
ratio23	1.00	0.11	0.71
Contrôle			
	NS403 CDsf	NS502	NS503
ratio13	0.13	0.29	0.34
ratio12	0.62	1.00	0.62
ratio23	0.62	1.00	0.62
Syndrome de Down			
	NS403 CDsf	NS502	NS503
ratio13	0.62	0.12	0.61
ratio12	1.00	0.28	0.61
ratio23	1.00	0.01	0.61

Tableau 29 : TEST DE SCREENING UNIVARIÉS SUR DONNÉES BINOMIALES AVEC HNP ou RATIOS
(Datasets NS503 / NS502 / NS403CDsf) avec variable SN

Tableau 29 : TEST DE SCREENING UNIVARIÉS SUR DONNÉES BINOMIALES AVEC HNP ou RATIOS (Datasets NS503 / NS502 / NS403CDsf) avec variable SN							
Critère de Jugement Principal Signal sur bruit (SN) ou Intensité				Résultat Diagnostic (SN)			
Sur Effectif Total							
Dataset NS502 (n=30)		HNP			Ratios		
<i>N° de Cluster du Dataset</i>		<i>Cluster 3</i>	<i>Cluster 4</i>	<i>Cluster 5</i>	<i>(Ratio Longitudinal HNPx / HNPy)</i>		
<i>95% IC Exact</i>		<i>HNP2</i>	<i>HNP1</i>	<i>HNP3</i>	<i>Ratio12</i>	<i>Ratio13</i>	<i>Ratio23</i>
Sensibilité	Se	0.73	0.79	0.84	0.88	0.92	0.96
Spécificité	Sp	0.73	0.90	0.62	0.70	0.58	0.51
Positive Predictive Value	PPV	0.77	0.75	0.87	0.85	0.92	0.96
Negative Predictive Value	NPV	0.75	0.77	0.85	0.86	0.92	0.95
<i>95% Simel CI's</i>							
Likelihood ratio (+)	LR+	2.15	1.95	4.11	3.14	6.2	10.5
Likelihood ratio (-)	LR-	1.95	2.15	1.23	1.36	0.92	0.73
<i>Note: Pour cette étude cas-contrôle sur effectif total, nous avons supprimé du dataset analysé les échantillons M8 M9 M16. Les effectifs sont donc de 15 CTRL et 15 S. Down</i>							
Sur Effectif Commun avec							
NS526							
Dataset NS502 (n=22)		HNP			Ratios		
<i>N° de Cluster du dataset</i>		<i>Cluster 3</i>	<i>Cluster 4</i>	<i>Cluster 5</i>	<i>(Ratio Longitudinal HNPx / HNPy)</i>		
<i>95% Exact CI (UP)</i>		<i>HNP2</i>	<i>HNP1</i>	<i>HNP3</i>	<i>Ratio 12</i>	<i>Ratio 13</i>	<i>Ratio 23</i>
Sensibilité	Se	0.73	0.84	0.88	0.84	0.92	0.96
Spécificité	Sp	0.69	0.74	0.64	0.67	0.56	0.50
Positive Predictive Value	PPV	0.73	0.74	0.82	0.8	0.89	0.93
Negative Predictive Value	NPV	0.78	0.84	0.89	0.85	0.93	0.96
<i>95% Simel CI's</i>							
Likelihood ratio (+)	LR+	2.22	2.23	3.39	2.94	5.53	8.31
Likelihood ratio (-)	LR-	1.8	1.73	1.22	1.42	0.92	0.74
<i>Les Effectifs sont de 11 CTRL et 11 S. Down</i>							

Les figures 35 à 38 présentent les résultats de l'étude statistique NS502, réalisée sur échantillons natifs, conservés à -80°C, en séparation anionique sur surface Q10, en condition de pH=4 (conditions optimales pour obtenir des ratios longitudinaux indicatifs).

5 Dans les conditions de l'étude NS502, les ratios des intensités des pics HNP-1/HNP-3, et HNP-2/HNP-3 sont des marqueurs particulièrement discriminants pour détecter les femmes enceintes susceptibles de porter un fœtus atteint du syndrome de Down. Ceci présente l'avantage considérable de pouvoir obtenir une excellente reproductibilité des résultats, en s'affranchissant d'éventuels problèmes de
10 calibration et en s'affranchissant d'éventuels problèmes de variabilité du signal, défini tant en masse qu'en intensité ou signal sur bruit ou toute autre variable (par exemple : aire du tof ou *Tof area*, ½ hauteur du tof ou *tof width*, avec le tof étant représentatif de la masse de la substance). Les inventeurs ont par ailleurs constaté que les niveaux d'expression des défensines HNP2, HNP1 et HNP3, ainsi que les ratios entre ces
15 différents niveaux, ne sont corrélés ni avec l'âge de la femme enceinte, ni avec la semaine de grossesse, ni avec aucun des marqueurs utilisés actuellement (AFP, uE3 et HCG notamment), ni avec aucun des autres marqueurs identifiés dans les études rapportées ici (purification Q10 ou H50).

20 **G - ETUDES COMPLEMENTAIRES UTILISANT DES SURFACES ANIONIQUES POUR L'IONISATION DES PROTEINES**

L'étude statistique NS502 a également permis d'identifier d'autres pics pertinents en terme de diagnostic du syndrome de Down. Ces pics sont listés dans le tableau 30 ci-après.

Tableau 30 : autres pics visibles en purifiant les échantillons par échange d'anions, potentiellement utilisables pour le diagnostic prénatal du SD				
Etude statistique	Conditions expérimentales	Pic N°	moyenne m/z	Déviati on standard
NS502 (N=33, dont 18 contrôles et 15 S. Down)	-80°C, sérum natif. Q10, Ph4, CHCA, Ammonium Acetate, Laser 160 Baseline Auto	15	4461.60	1.60
		17	4570.90	1.60
		18	4630.70	1.40
		19	4714.30	1.60
		21	4859.10	1.80
		44	8195.65	3.70
		50	8905.85	2.70
		51	9121.00	3.00
		54	9700.50	3.80
		60	12435.3	5

Parmi ces pics (ou clusters), les pics à 4859.10 Da et à 8195.65 Da correspondent respectivement aux pics à 4860 Da et 8206 Da identifiés dans les études préliminaires (voir Tableau 14 ci-dessus).

- 5 Les pics mentionnés dans le Tableau 30 ont également été validés par analyse visuelle des spectres. Les spectres montrant les pics à 8195.7Da et à 8905.9Da, surexprimés en cas de trisomie 21, sont présentés aux figures 39 et 40, respectivement. Les courbes ROC associées à tous les pics mentionnés au Tableau 30 font l'objet de la figure 41.

10 **H - ETUDES COMPLEMENTAIRES UTILISANT DES SURFACES HYDROPHOBES POUR L'IONISATION DES PROTEINES**

H-1. Etudes complémentaires sur surface H50

- 15 Plusieurs études complémentaires ont été réalisées en purifiant les échantillons sur surface hydrophobe H50. Les résultats de deux de ces études sont présentés ici. Les échantillons à partir desquels ces études ont été réalisées sont listés dans le Tableau 31 ci-après, et les pics pertinents identifiés sont résumés dans le Tableau 32.

Tableau 31 : DATASET NS526 – POPULATION TESTEE – H50 Natif –80°C														
N° Echantillon	Date Prélèvement	Statut	Age	poids sem+	hcg_uj	MoMhcg	ue3_pg	MoMue3	afp_uj	MoMafp	risque	Caryotype	Issue	Autres Informations
M10	26/11/2004	CTRL	35,00	46	16+1	43,90	1,57	720,0	0,74	36,10	1,00	241		filie BP
M11	27/11/2004	CTRL	32,00	62	16+4	58,80	2,65	1010,0	1,00	50,20	1,53	550		filie BP
M12	27/11/2004	CTRL	38,00	52	15+4	19,00	0,61	470,0	0,59	25,10	0,80	242		filie BP
M13	27/11/2004	CTRL	30,00	54	14	16,20	0,33	410,0	1,12	22,90	1,00	0		filie BP
M14	28/11/2004	CTRL	28,00	79	15+6	59,70	2,65	780,0	1,03	22,20	0,88	420		filie BP
M15	28/11/2004	CTRL	36,00	57	16+2	10,40	0,42	690,0	0,72	23,60	0,71	1100		garçon BP
M16	27/11/2004	CTRL	29,00		16+2	44,50	1,95	520,0	0,55	29,20	0,91	86		garçon BP
M17	27/11/2004	CTRL	24,00	59	17	13,50	0,65	1340,0	1,18	41,30	1,15	0		filie BP
M18	27/11/2004	CTRL	30,00	52	16+6	20,30	0,89	1340,0	1,18	29,10	0,77	6500		garçon BP
M5	26/11/2004	CTRL	25,00		17+4	11,30	0,64	1190,0	0,94	46,30	1,22	0		filie BP
M9	26/11/2004	CTRL	28,00	71	15+5	20,70	0,82	700,0	0,92	28,10	1,05	8200		garçon BP
F1	18 02 04	DS	32		14+6	109,8	3,28	310	0,54	13,1	0,51	1/5	IMG	dysmorphie
F10	23 03 04	DS	39		15+0	101,8	3,21	580	0,94	18,3	0,70	1/21	IMG	
F11	25 03 04	DS	40		16+1	16,8	0,71	620	0,68	24,8	0,79	1/235	IMG	
F12	02 04 04	DS	23		16+2	67,5	2,95	600	0,64	33,4	1,04	1/71	IMG	
F13	29 04 04	DS	32		15+0	57,9	1,82	420	0,68	11,1	0,42	1/40	IMG	
F2	28 01 04	DS	27		15+1	67,9	2,24	400	0,63	18,5	0,73	1/68	IMG	dysmorphie
F3	30 03 04	DS	28		17+5	48,3	2,8	33	0,02	51,77	1,34	1/41	IMG	pas d'anapath
F6	02 05 04	DS	34		14+2	209,4	5,18	490	1,12	18,3	0,79	1/91	IMG	
F7	09 03 04	DS	39		16+4	92,3	4,29	810	0,79	31,8	0,95	1/5	IMG	
F8	16 03 04	DS	34	65	17+3	84	4,59	1040	0,86	22,3	0,62	1/5	IMG	
M6	26/11/2004	DS	31,00	81	16+3	27,30	1,41	870,0	0,98	13,20	0,49	480	IMG	

Tableau 32 : pics identifiés en purification sur surface hydrophobe et spectromètre de masse Ciphergen						
Conditions expérimentales	Dataset	GC	S. Down	Pic N°	Moyenne m/z	Déviat ion standard
H50 Eau Acetonitrile 5% SPA Laser 170 Baseline Auto	NS526c (N=22)	11	11	8	4068.11	1.43
				9	4075.90	1.11
				11	4084.69	0.80
				29	4084.69	1.20
				35	8104.60	0.80
				36	8124.69	2.08
				37	8140.33	2.27
				38	8156.66	1.21
H50 Acetonitrile 5% SPA Laser 180 Baseline 10	NS526d (N=22)	11	11	1	2625.47	0.62
				20	4069.20	1.48
				21	4076.05	0.93
				24	4083.95	0.18
				25	4084.70	0.50
				26	4093.13	1.63
				30	4320.79	1.18
				42	4642.66	1.50
				43	4658.47	1.47
				45	6419.80	1.90
				58	8109.15	2.46
				59	8124.47	2.68
				60	8140.61	2.70
				61	8154.11	1.72
				62	8269.10	6.70
				63	8338.80	6.70
				66	8610.30	8.70

Parmi ces pics (ou clusters), les pics à environ 4068.5 Da, 4320.79 Da, 4619.80 Da, 8107 Da, 8269.10 Da et 8610.30 Da correspondent respectivement aux pics à 4067 Da, 4317 Da, 6423 Da, 8112 Da, 8263 Da, et 8627 Da identifiés dans les études préliminaires (voir Tableau 14 ci-dessus), et le doublet à 4642.66 Da et 4658.47 Da correspond au pic à 4650 Da identifié initialement.

Les données statistiques relatives à ces pics et à leur utilisation comme marqueurs potentiels pour le diagnostic prénatal du syndrome de Down sont présentées dans les Tableaux 33 à 36 ci-après.

Les valeurs diagnostiques concernant ces marqueurs sont indiquées dans les Tableaux 37 et 38, dans lesquels sont utilisées les abréviations suivantes : PPV = *Positive Predictive Value* ; NPV = *Negative Predictive Value*; LR+ = *Likelihood ratio(+)*; LR- = *Likelihood ratio(-)*.

Tableau 33 : statistiques descriptives (masse moléculaire)						
Dataset	GC	SD	Pic N°	Moyenne	Déviati on standard	[95% Intervalle de Confiance]
NS526c (N=22)	11	11	8	4067.10	0.31	(4066.46 - 4067.74)
			9	4074.89	1.11	(4074.40 - 4075.38)
			11	4083.68	0.17	(4083.33 - 4084.04)
			29	6418.6	0.25	(6418.07 - 6419.12)
			36	8123.69	0.44	(8122.76 - 8124.61)
			37	8139.33	0.48	(8138.32 - 8140.33)
			38	8155.65	0.26	(8155.11 - 8156.18)
NS526d (N=22)	11	11	1	2624.46	0.13	(2624.18 - 2624.73)
			20	4068.19	0.31	(4067.54 - 4068.85)
			21	4075.04	0.20	(4074.63 - 4075.46)
			24	4082.94	0.04	(4082.86 - 4083.02)
			25	4084.75	0.11	(4084.51 - 4084.99)
			26	4092.12	0.35	(4091.40 - 4092.85)
			30	4319.79	0.25	(4319.26 - 4320.31)
			42	4641.65	0.32	(4640.98 - 4642.31)
			43	4657.46	0.31	(4656.81 - 4658.12)
			58	8108.14	0.53	(8107.05 - 8109.23)
			59	8123.47	0.57	(8122.28 - 8124.66)
			60	8139.60	0.58	(8138.40 - 8140.80)
			61	8153.11	0.37	(8152.34 - 8153.87)
			62	8269.09	1.43	(8266.12 - 8272.06)
			63	8338.75	1.44	(8335.77 - 8341.74)
			66	8610.28	1.85	(8606.43 - 8614.13)

NB : Les pics 36, 37 et 38 de l'étude NS526c représentent des protéines multichargées correspondant aux protéines révélées par les pics 8, 9 et 11 de cette même étude. De même, les pics 59, 60 et 61 de l'étude NS526d correspondent aux pics 20, 21 et 24.

Tableau 34 : Statistiques Descriptives et Test de U- Mann Whitney (non paramétrique) sur Critère de jugement SN et sur les Datasets NS526c / NS526d ; autres marqueurs que HNP										
Dataset	GC	SD	Cluster N°	Moy. GC	Déviat standard	[95% IC]	Moy. S. Down	Déviat standard	[95% IC]	P Mann- Whitney
NS526c (N=22)	11	11	8	1.63	0.23	(1.11 - 2.15)	0.94	0.12	(0.68 - 1.20)	0.03
			9	2.77	0.57	(1.50 - 4.03)	1.02	0.14	(0.71 - 1.33)	0.01
			11	3.64	0.92	(1.59 - 5.69)	1.94	0.53	(0.75 - 3.13)	0.08
			29	8.08	0.39	(7.22 - 8.94)	14.37	2.01	(9.90 - 18.85)	0.01
			36	18.01	4.21	(8.62 - 27.40)	7.30	1.08	(4.90 - 9.70)	0.01
			37	23.27	6.35	(9.12 - 37.42)	11.30	3.35	(3.83 - 18.77)	0.02
			38	10.11	2.30	(4.99 - 15.23)	6.56	2.45	(1.10 - 12.03)	0.07
			1	4.68	0.40	(3.80 - 5.56)	4.47	0.82	(2.64 - 6.30)	0.18
NS526d (N=22)	11	11	20	2.99	0.45	(1.98 - 4.00)	1.42	0.38	(0.57 - 2.27)	0.02
			21	3.27	0.41	(2.35 - 4.19)	1.60	0.30	(0.94 - 2.26)	0.00
			24	4.31	0.64	(2.88 - 5.73)	2.22	0.65	(0.78 - 3.66)	0.03
			25	4.89	0.96	(2.75 - 7.03)	3.95	1.38	(0.88 - 7.02)	0.16
			26	2.14	0.38	(1.30 - 2.99)	1.74	0.55	(0.51 - 2.97)	0.20
			30	4.41	0.45	(3.42 - 5.40)	7.37	1.18	(4.74 - 9.99)	0.05
			42	6.50	1.59	(2.96 - 10.05)	9.84	1.94	(5.53 - 14.15)	0.18
			43	4.43	1.01	(2.18 - 6.67)	7.64	1.57	(4.13 - 11.15)	0.14
			58	21.47	2.79	(15.24 - 27.70)	10.74	2.57	(5.03 - 16.46)	0.02
			59	27.83	3.67	(19.64 - 36.01)	15.27	2.66	(9.34 - 21.19)	0.02
			60	31.36	4.90	(20.44 - 42.28)	22.02	5.44	(9.90 - 34.14)	0.11
			61	16.22	2.90	(9.76 - 22.68)	12.13	3.84	(3.58 - 20.69)	0.16
			62	5.02	0.58	(3.73 - 6.30)	3.47	0.85	(1.59 - 5.36)	0.06
			63	5.69	0.80	(3.90 - 7.48)	3.54	0.95	(1.42 - 5.65)	0.02
			66	27.26	1.92	(22.98 - 31.54)	36.97	4.15	(27.72 - 46.22)	0.05

Tableau 35 : Test de la médiane (non paramétrique) sur Critère de jugement Intensité et sur Datasets NS526c / NS526d Autres marqueurs que HNP						
Dataset	GC	SD	Pic N°	Moyenne m/z	Déviat° standard	Test de la médiane p Pearson Chi2
NS526c (N=22)	11	11	8	4068.11	1.43	0.01
			9	4075.90	1.11	0.03
			11	4084.69	0.80	0.03
			29	6418.60	1.20	0.01
			35	8104.60	0.80	0.003
			36	8124.69	2.08	0.01
			37	8140.33	2.27	0.01
			38	8156.66	1.21	0.01
			1	2625.47	0.62	0.01
			20	4069.20	1.48	0.00
NS526d (N=22)	11	11	21	4076.05	0.93	0.00
			24	4083.95	0.18	0.01
			25	4084.70	0.50	0.01
			26	4093.13	1.63	0.09
			30	4320.79	1.18	0.03
			42	4642.66	1.50	0.09
			43	4658.47	1.47	0.09
			45	6419.80	1.90	0.09
			58	8109.15	2.46	0.00
			59	8124.47	2.68	0.03
			60	8140.61	2.70	0.03
			61	8154.11	1.72	0.03
			62	8269.10	6.70	0.01
			63	8338.80	6.70	0.01
			66	8610.30	8.70	0.01

Tableau 36 : Calcul des Roc AUC (CJ : m/z) (non paramétrique) sur sélection Dataset NS526c / NS526d Autres marqueurs que HNP									
Dataset	GC	SD	Pic N°	Moyenne m/z	Déviat° standard	AUC (10)	Var (AUC)	pAUC (8%)	
NS526c (N=22)	11	11	8	4068.11	1.43	0.23	0.02	0.15	
			9	4075.90	1.11	0.24	0.02	0.17	
			11	4084.69	0.80	0.24	0.02	0.17	
			29	6418.60	1.20	0.81	0.03	0.74	
			35	8104.60	0.80	0.20	0.03	0.14	
			36	8124.69	2.08	0.20	0.03	0.14	
			37	8140.33	2.27	0.18	0.03	0.14	
			38	8156.66	1.21	0.28	0.03	0.20	
			1	2625.47	0.62	0.25	0.00	0.18	
			20	4069.20	1.48	0.20	0.03	0.12	
NS526d (N=22)	11	11	21	4076.05	0.93	0.67	0.02	0.59	
			24	4083.95	0.18	0.10	0.03	0.07	
			25	4084.70	0.50	0.28	0.03	0.22	
			26	4093.13	1.63	0.62	0.03	0.54	
			30	4320.79	1.18	0.88	0.04	0.80	
			42	4642.66	1.50	0.71	0.03	0.63	
			43	4658.47	1.47	0.76	0.03	0.68	
			58	8109.15	2.46	0.18	0.02	0.13	
			59	8124.47	2.68	0.21	0.02	0.16	
			60	8140.61	2.70	0.28	0.01	0.22	
			61	8154.11	1.72	0.24	0.03	0.18	
			62	8269.10	6.70	0.17	0.03	0.13	
			63	8338.80	6.70	0.14	0.02	0.13	
			66	8610.30	8.70	0.80	0.01	0.72	

Dans ce Tableau 36 figurent des pics pour lesquels l'AUC est supérieure à 0,6, ce qui indique une surexpression significative, mais également des pics pour lesquels l'AUC est inférieure à 0,4. Ceci correspond à une sous-expression, également discriminante. Dans ce dernier cas, les courbes ROC présentées aux figures 5 49 et 50 sont inversées (graphe de la sensibilité en fonction de la spécificité, au lieu de la sensibilité en fonction de 1-spécificité), selon la pratique classique en la matière.

Tableau 37 : Résultats Diagnostiques (variable ou CJ : SN ou Intensité) (binormal)														
Dataset NS526c (n=30)														
N° de Pic du Dataset	Pic 8	Pic 9	Pic 11	Pic 29	Pic 35	Pic 36	Pic 37	Pic 38						
M/Z	4068.11	4075.90	4084.69	6418.60	8104.60	8124.69	8140.33	8156.66						
95% CI Exact														
Sensibilité	Se	0.80	0.80	0.80	0.80	0.70	0.80	0.80						
Spécificité	Sp	0.75	0.75	0.75	0.92	0.83	0.83	0.83						
Valeur prédictive positive	PPV	0.73	0.73	0.73	0.89	0.78	0.80	0.80						
Valeur prédictive négative	NPV	0.82	0.82	0.82	0.85	0.77	0.83	0.83						
IC 95% de Simel														
Ratio de probabilité (+)	LR+	3.20	3.20	3.20	9.67	4.20	4.80	4.80						
Ratio de probabilité (-)	LR-	0.27	0.27	0.27	0.22	0.36	0.24	0.24						

Tableau 38 : Résultats Diagnostiques (variable ou CJ : SN ou Intensité) (binormal)																								
Dataset NS526d (n=30)																								
N° de Pic du Dataset	Pic 1	Pic 20	Pic 21	Pic 24	Pic 25	Pic 26	Pic 30	Pic 42	Pic 43	Pic 58	Pic 59	Pic 60	Pic 61	Pic 62	Pic 63	Pic 66								
M/Z	2625.47	4069.20	4076.05	4083.95	4084.70	4093.13	4320.79	4642.66	4658.47	8109.15	8124.47	8140.61	8154.11	8269.10	8338.80	8610.30								
95% CI Exact																								
Sensibilité	Se	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8								
Spécificité	Sp	0.83	0.75	0.92	0.83	0.75	0.83	0.75	0.75	0.83	0.83	0.83	0.75	0.75	1 (100%)	0.83								
Valeur prédictive positive	PPV	0.8	0.73	0.89	0.8	0.73	0.8	0.73	0.73	0.82	0.78	0.8	0.73	0.73	1	0.8								
Valeur prédictive négative	NPV	0.83	0.82	0.85	0.83	0.82	0.83	0.82	0.82	0.91	0.77	0.83	0.82	0.82	0.86	0.83								
IC 95% de Simel																								
Ratio de probabilité (+)	LR+	4.8	3.2	9.6	4.8	3.2	4.8	3.2	3.2	5.4	4.2	4.8	3.2	3.2	FP = 0	4.8								
Ratio de probabilité (-)	LR-	0.24	0.27	0.22	0.24	0.27	0.24	0.27	0.27	0.12	0.36	0.24	0.27	0.27	0.2	0.24								

Note: Pour cette étude cas-contrôle sur effectif total, les échantillons M8 M9 M16 ont été supprimés du dataset analysé.

Les effectifs sont donc 15 CTRL et 15 DS.

Les figures 43 à 48 montrent des spectres sur lesquels apparaissent certains des pics mentionnés ci-dessus dans les cas de purification sur H50. Les figures 49 et 50 présentent les données afférentes à chaque pic (de l'étude NS526c et de l'étude NS526d, respectivement), sous forme de courbes de distributions et de courbes ROC. Les figures 51 et 52 montrent les résultats pour ces nouveaux marqueurs, sous forme de boîtes à moustaches. Les points en-dehors des boîtes représentent les points aberrants.

H-2. Etudes complémentaires sur surface C8-C18, en utilisant un spectromètre de masse à haute résolution

Les résultats obtenus dans les études NS526c et NS526d exposées ci-dessus ont également été confirmés par des études complémentaires réalisées en utilisant un spectromètre de masse de haute résolution. Ces expériences ont permis de confirmer que les marqueurs identifiés dans les études présentées dans la partie H-1 ci-dessus sont pertinents, indépendamment de la technologie utilisée.

Les conditions d'obtention des spectres présentés à la figure 53 (étude NP0408-LEP) sont les suivantes :

- purification sur surface hydrophobe C8 ou C18, en utilisant les kits MB-HIC référencés 223324 (C8) et 223325 (C18) dans le catalogue Bruker.

- Matrice : Matrice HCCA Bruker

- Spectromètre : Ultraflex Bruker

- Protocole expérimental et acquisitions : voir Tableau 39 ci-dessous.

Tableau 39 : Paramètres d'acquisition communs aux différents spectres C8 et C18	
HighVoltageSupplies:IonSource1 = 25000	
HighVoltageSupplies:IonSource2 = 23400	
HighVoltageSupplies:Lens = 6000	
HighVoltageSupplies:Reflector = 26300	
HighVoltageSupplies:Reflector2 = 14000	
HighVoltageSupplies:Polarity = 0	
HighVoltageSupplies:LinearDetector = 1693	
HighVoltageSupplies:PieDelay = 0	
Digitizer:Timebase = 1	
Digitizer:BandWidthLimit = 3	
Digitizer:ElectronicGainLevel = 2	
MassRange:MassStart = 880	
MassRange:MassEnd = 25118.9	
MassRange:Mode = 1	
MatrixSuppression:Mode = 2	
MatrixSuppression:DeflectionConstant = 0.0554137	
MatrixSuppression:CutOffMass = 900	
MatrixSuppression:GateStrength = 1	
CID:Switch = 0	
Calibration = 'V3.0CCalibrator 1 1 0 0 -2147483648 2147483647 V1.0CHPCData Order 0 vCoeff V1.0VectorDouble 0 c2 0 c0 0 minMass 0 maxMass 0 bUse 0 endCHPCData V3.0CTOFCalibrationConstants 26271 0.9999999999999999 420.24145676678 1315083.8221388 -0.019237097616266 2 V3.0CTOFCalibrationConstants 0 0 0 0 -1 '	

- Il apparaît sur les spectres présentés à la figure 53 que les pics identifiés avec le spectromètre à basse résolution sont identifiables également avec un spectromètre à haute résolution. Bien entendu, l'utilisation d'un spectromètre à plus haute résolution entraîne parfois la démultiplication de pics qui correspondaient à des pics confondus en basse résolution. Les correspondances établies entre les pics observés en basse résolution et ceux observés en haute résolution sont détaillées dans les Tableaux 40 et 41 ci-dessous.

Tableau 40 : correspondances entre les pics observés dans les études NS526c et NP0408-LEP											
	Ciphergen			Bruker							
	Mass	Ctrl > T21	T21 > Ctrl.	C8		C18		Fractions	Ctrl > T21	T21 > Ctrl	
				Mass	Fractions	Mass	Fractions				
NS526c	4067	X		4068	N	-	-	-	X		
	4074	X		4068	D (P+A)	-	-	-		X	
	4083	X		-	-	-	-	-			
	6418.6		X	6418	N	6418	N	N		X	
					6420	D	6418	D	D	~	X
					6418	D (P+A)	6418	D (P-A)	D (P-A)	X	X
	8123.7			8127.35	D (P+A)	8124.86	D	D		X	
		X			8125	N	8125	N	N		X
					8127.66	D	8125.59	D (P+A)	D (P+A)		X
	8139.3	X		8140	D	8140	N	N	~	X	
8155.6	X		-	-	8142.61	D	D	X			

Notations communes aux Tableaux 40 et 41 : N = Natif ; X = Condition de sélection ; ~ = intensités égales ; - = pic absent des spectres ; D = fraction D = Protéines ou complexes protéiques de masses natives supérieures à 100 kDa ; D(P+A) = Fraction D, protéines associées à l'albumine ; D(P-A) = Fraction D, déplétée en protéines.

Tableau 41 : correspondances entre les pics observés dans les études NS526d et NP0408-LEP										
	Ciphergen				Bruker					
	Mass	Ctrl > T21	T21 > Ctrl	C8		C18		Fractions	Ctrl > T21	T21 > Ctrl
				Mass	Fractions	Mass	Fractions			
NS526d	2624.5	X		2620	N	2620	N	N	X	
				2620	D	2620	D	D	X	
				2630	D				X	
				2620	D (P-A)	2620	D (P-A)	D (P-A)	X	
	4068.2	X		4068	N	-		-	X	X
	4075	X		4068	D (P+A)	-		-		
	4082.9	X		-	-	-		-		
				-	-	-		-		
	4092.1	X		4092	N	4092	N	N	X	
				4092	D	4092	D	D	X	
				4092	D (P-A)	4092	D (P-A)	D (P-A)	X	X
	4319.8		X	-	-	-		-		
				4641	N	4641	N	N	~	X
	4641.6	X		4643	D	4641	D	D	~	~
				4643	D (P-A)	4641	D (P-A)	D	~	~
	4657.5		X	4654	D	-		-		X
	8108.1	X		8108	D (P+A)	-		-		X
				8125	N	8125	N	N	X	X
	8123.5	X		8127.66	D	8124.86	D	D	X	X
				8127.35	D (P+A)	8125.59	D (P+A)	D (P+A)	X	X
	8139.6	X		8140	D	8140	D	N	~	~
	8153.1	X		-	-	8142.61	D	D	X	X

I – EXEMPLES DE COMBINAISONS DE MARQUEURS

A titre illustratif, le Tableau 42 présente les performances (sensibilité, spécificité *etc.*) d'une association de deux ratios entre les défensines HNP, et d'une association de ces mêmes ratios avec l'hcg, sur le jeu de données NS502. Bien
 5 entendu, d'autres associations, potentiellement encore plus spécifiques et sensibles, peuvent être réalisées entre les différents marqueurs identifiés par les inventeurs.

Tableau 42 : exemple de combinaison de marqueurs pour établir un test de diagnostic prénatal de la trisomie 21				
Dataset NS502 (n=30)				
Combinaison		Ratio13 + Ratio23	Ratio13 + Ratio23 avec hcg (ui)	Triple test actuel
95% CI Exact				
Sensibilité	Se	92.30%	90.40%	70%
Spécificité	Sp	80.40%	81.60%	93%
Roc	AUC	0.84	0.835	
Positive Predictive Value	PPV	79.80%	80.10%	
Negative Predictive Value	NPV	92.50%	91.20%	
95% Simel CI's				
• Likelihood ratio (+)	LR+	3.76	4.1	
Likelihood ratio (-)	LR-	0.645	0.524	

REVENDICATIONS

1. Procédé de dépistage prénatal *in vitro* d'anomalies chromosomiques, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection, dans un échantillon biologique provenant d'une femme enceinte, d'au moins un premier marqueur choisi
5 parmi : (i) les défensines neutrophiles humaines HNP-2, HNP-1 et HNP-3, et/ou (ii) les espèces moléculaires détectables en spectrométrie de masse avec une séparation de type échangeuse d'anions, aux poids moléculaires suivants : 4461.60 Da ; 4570.90 Da ; 4630.70 Da ; 4714.30 Da ; 4859.10 Da ; 8195.65 Da ; 8905.85 Da ; 9121.00 Da ; 9700.50 Da, et/ou (iii) les espèces moléculaires détectables en spectrométrie de masse
10 avec une séparation de type hydrophobe, aux poids moléculaires suivants : 2625.47 Da ; 4068.5 Da ; 4075.95 Da ; 4084.3 Da ; 4084.7 Da ; 4093.13 Da ; 4320.79 Da ; 4642.66 Da ; 4658.47 Da ; 6419.80 Da ; 8107 Da ; 8124.5 Da ; 8140.5 Da ; 8155 Da ; 8269.10 Da ; 8338.80 Da ; 8610.30 Da, ledit procédé comprenant également une étape de détection d'au moins un deuxième marqueur choisi parmi les groupes (i), (ii) ou (iii),
15 ou parmi le groupe (iv) constitué par l'hormone gonadotrophine chorionique (hCG); la sous-unité β de l'hCG; l'œstriol non conjugué (uE3); l'alpha-fœtoprotéine (AFP), l'inhibetine A; et la protéine plasmatique associée à la grossesse (PAPP-A).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la détection, dans un échantillon biologique provenant d'une femme enceinte, d'au moins
20 trois, de préférence au moins quatre marqueurs indépendants choisis parmi les groupes (i) à (iv).

3. Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de comparaison de la concentration de chacun des marqueurs détectés, à des valeurs de référence de la concentration de ces marqueurs
25 chez des femmes enceintes portant des fœtus normaux, et chez des femmes enceintes portant des fœtus atteints d'une anomalie chromosomique et/ou génétique connue.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend une étape d'analyse d'au moins un spectre obtenu à partir d'un échantillon biologique provenant d'une femme enceinte, et en ce que l'on mesure
30 le signal d'au moins 2 pics choisis parmi (i) les pics correspondant aux défensines neutrophiles humaines HNP-2, HNP-1 et HNP-3, et/ou (ii) les pics observables en spectrométrie de masse avec une séparation de type anionique, aux poids moléculaires

suivants : 4461.60 Da ; 4570.90 Da ; 4630.70 Da ; 4714.30 Da ; 4859.10 Da ; 8195.65 Da ; 8905.85 Da ; 9121.00 Da ; 9700.50 Da, et/ou (iii) les pics observables en spectrométrie de masse avec une séparation de type hydrophobe, aux poids moléculaires suivants : 2625.47 Da ; 4068.5 Da ; 4075.95 Da ; 4084.3 Da ; 4084.7 Da ; 4093.13 Da ;
5 4320.79 Da ; 4642.66 Da ; 4658.47 Da ; 6419.80 Da ; 8107 Da ; 8124.5 Da ; 8140.5 Da ; 8155 Da ; 8269.10 Da ; 8338.80 Da ; et 8610.30 Da.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'on mesure le ratio entre les concentrations de HNP-3 et de HNP-1 et/ou HNP-2 dans l'échantillon.

10 6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le premier marqueur détecté est la somme des défensines HNP-2, HNP-1 et HNP-3.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que les défensines sont détectées par une technique immunologique.

15 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le niveau d'expression des défensines dans l'échantillon est mesuré par amplification semi-quantitative ou quantitative d'acide nucléique.

20 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que les anomalies chromosomiques dépistées sont sélectionnées dans le groupe constitué par le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome d'Edwards (trisomie 18), le syndrome de Patau (trisomie 13), le syndrome de Turner, le syndrome de Klinefelter, le syndrome de l'X fragile, et le syndrome penta X.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'une anomalie chromosomique faisant l'objet du dépistage est le syndrome de Down.

25 11. Utilisation d'une ou plusieurs défensines neutrophiles humaines choisies parmi HND-1, HND-2 et HND-3, comme marqueur(s) pour le diagnostic prénatal d'une anomalie chromosomique.

12. Trousse de diagnostic prénatal d'anomalies chromosomiques, comprenant des moyens nécessaires à la mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10.

30 13. Trousse selon la revendication 12, comprenant des anticorps et/ou des aptamères spécifiques d'un ou plusieurs marqueurs sélectionnés parmi les marqueurs cités dans la revendication 1.

14. Trousse selon la revendication 12 ou la revendication 13, comprenant, pour au moins un des marqueurs cités dans la revendication 1, un jeu d'anticorps spécifiques non recouvrant.

5 15. Trousse selon la revendication 14, dans laquelle le jeu d'anticorps spécifiques non recouvrant comprend un anticorps de capture, immobilisé sur un support, et un anticorps de détection.

16. Trousse selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, comprenant des amorces pour l'amplification d'acides nucléiques codant pour les défensines HNP-1 et/ou HNP-2 et/ou HNP-3.

10 17. Trousse selon la revendication 16, comprenant en outre au moins une sonde pour détecter le(s) produit(s) d'amplification d'acide nucléique.

1 / 90

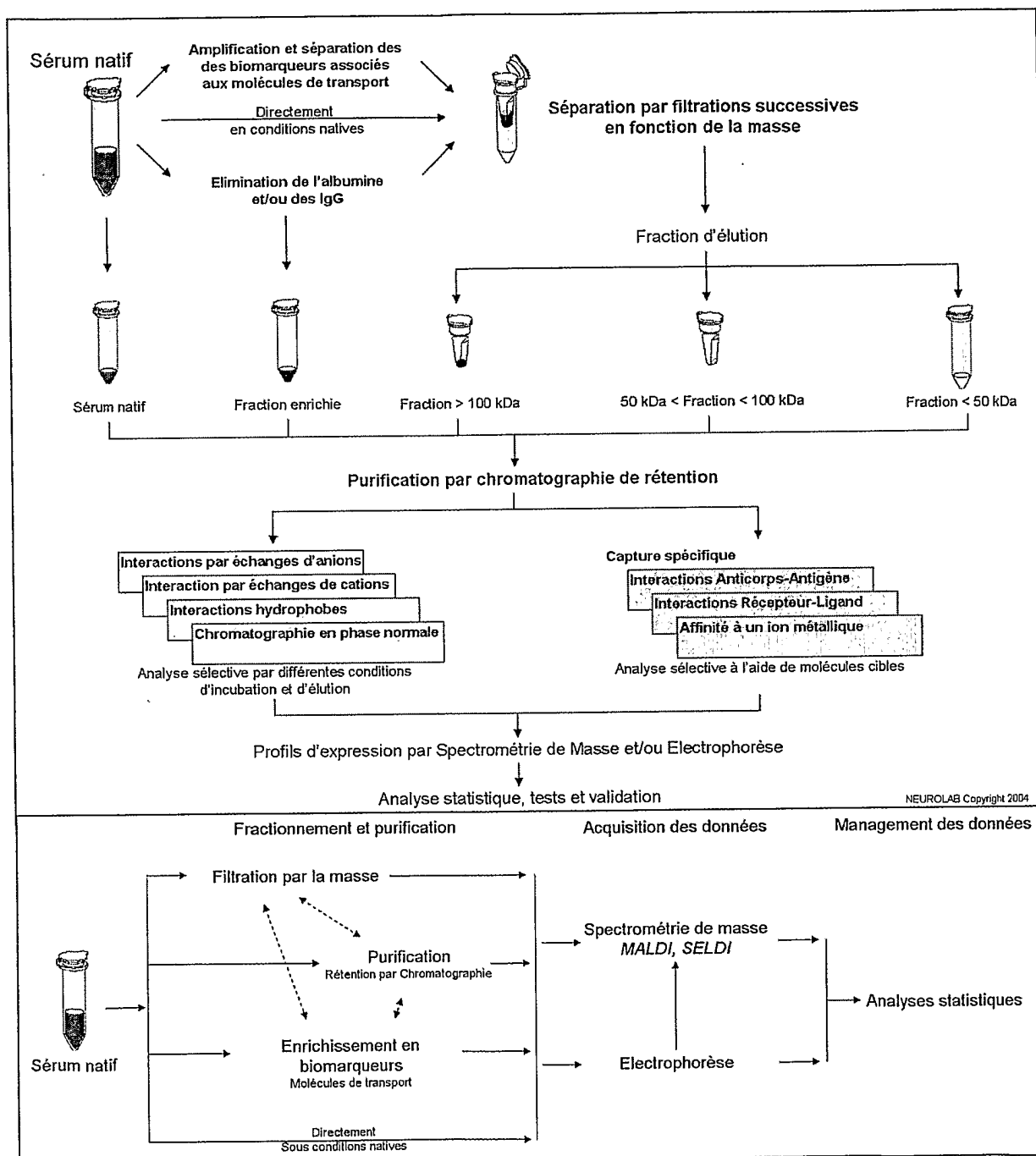


Fig. 1

2 / 90

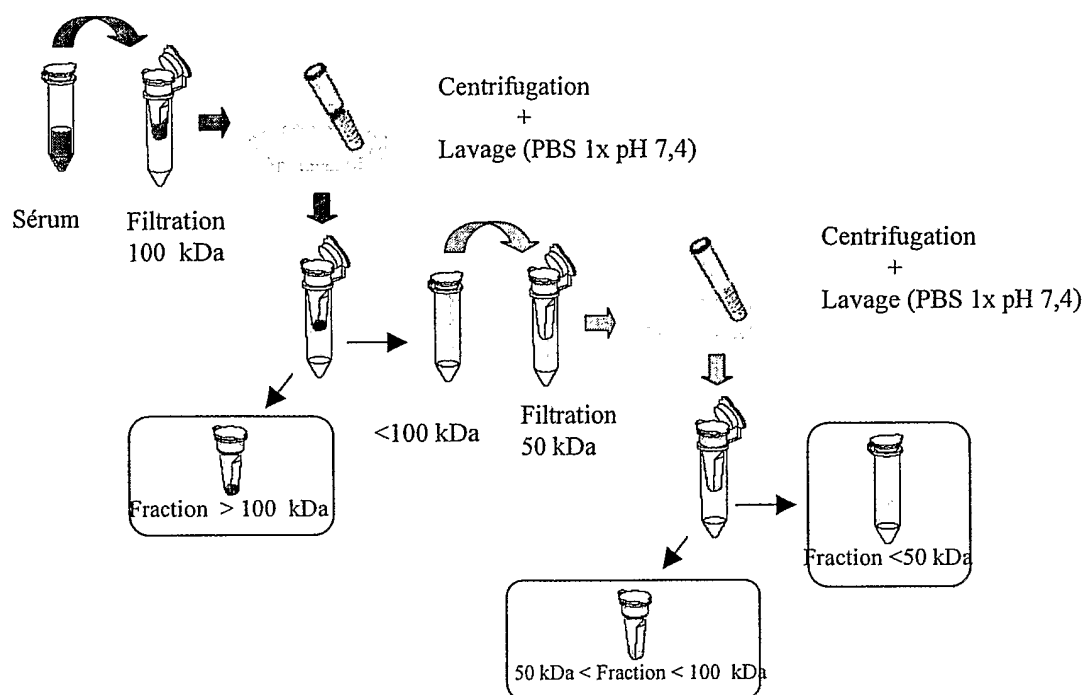
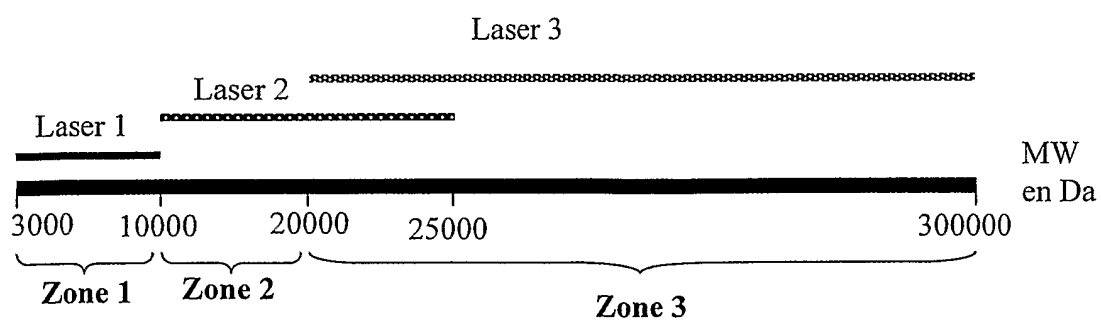


Fig. 2

Enregistrements et Optimisation

Conditions d'enregistrement



Zones de dépouillement

Fig. 3

3 / 90

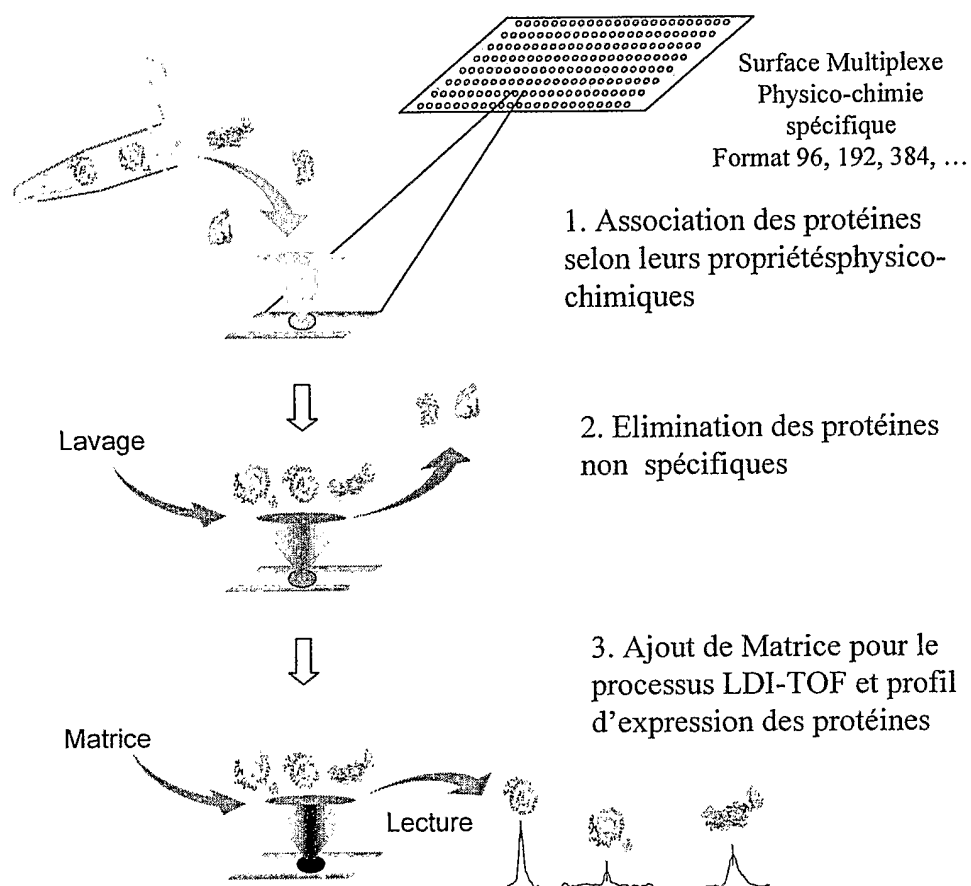


Fig. 4

4 / 90

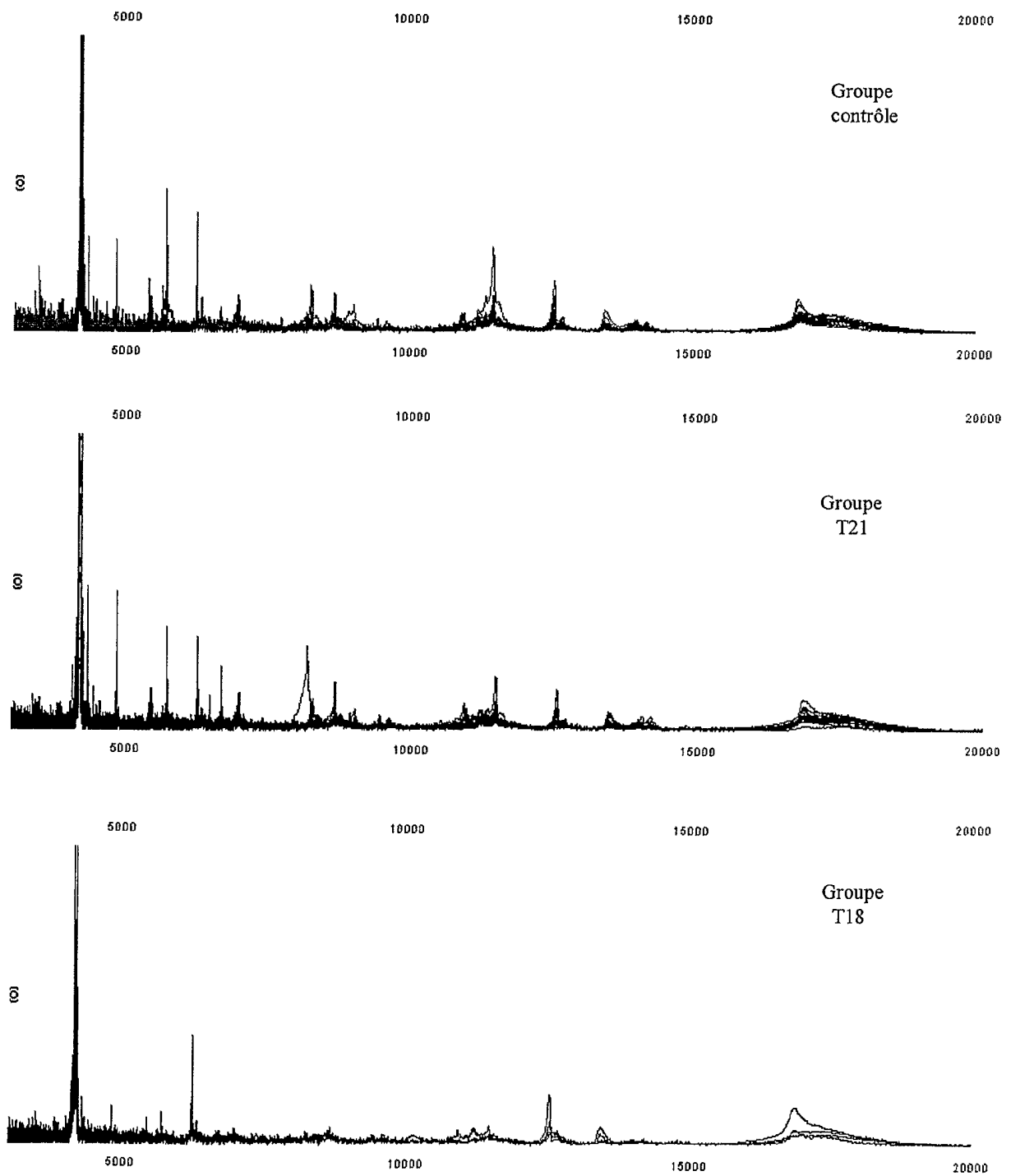


Fig. 5

5 / 90

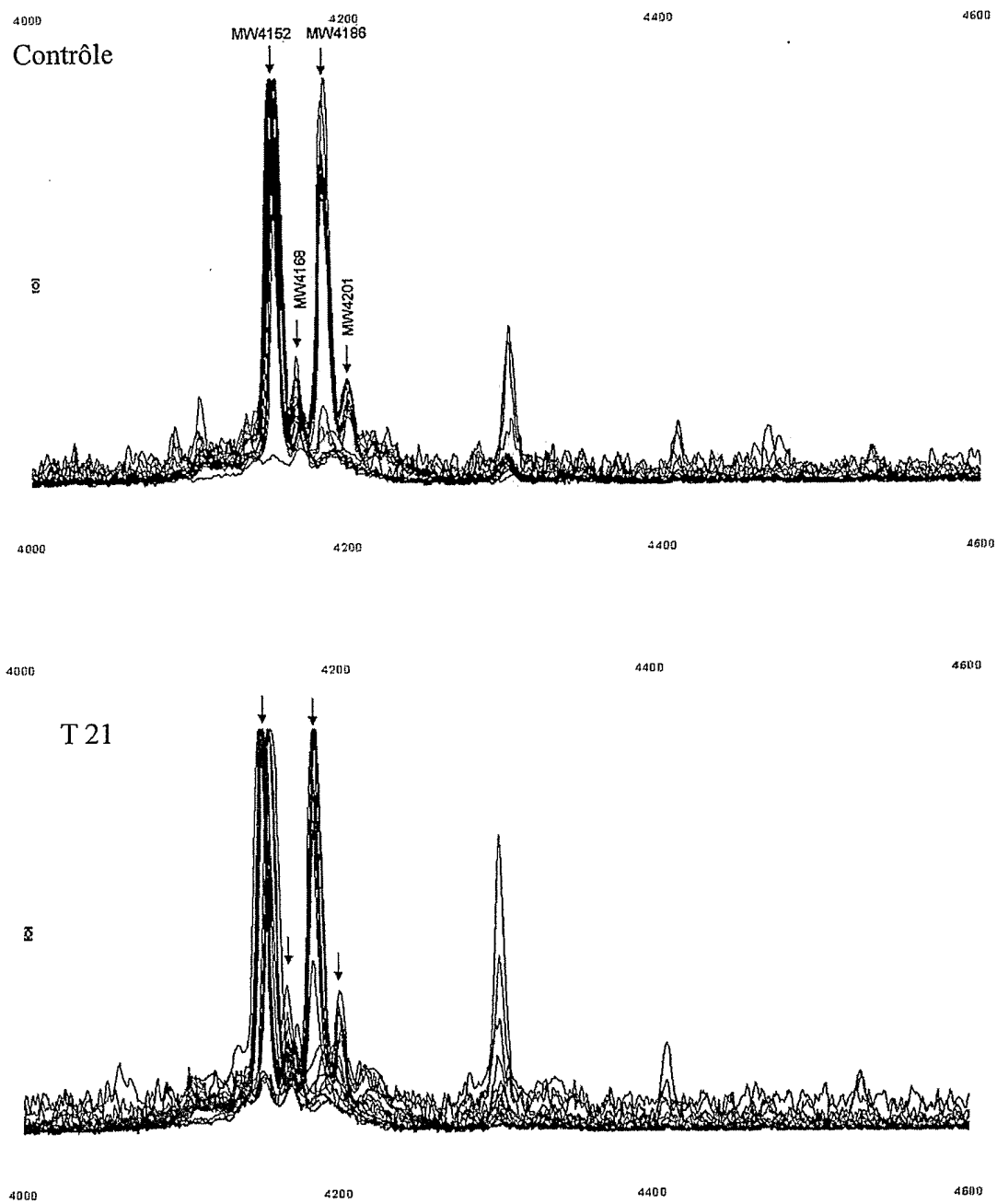


Fig. 6

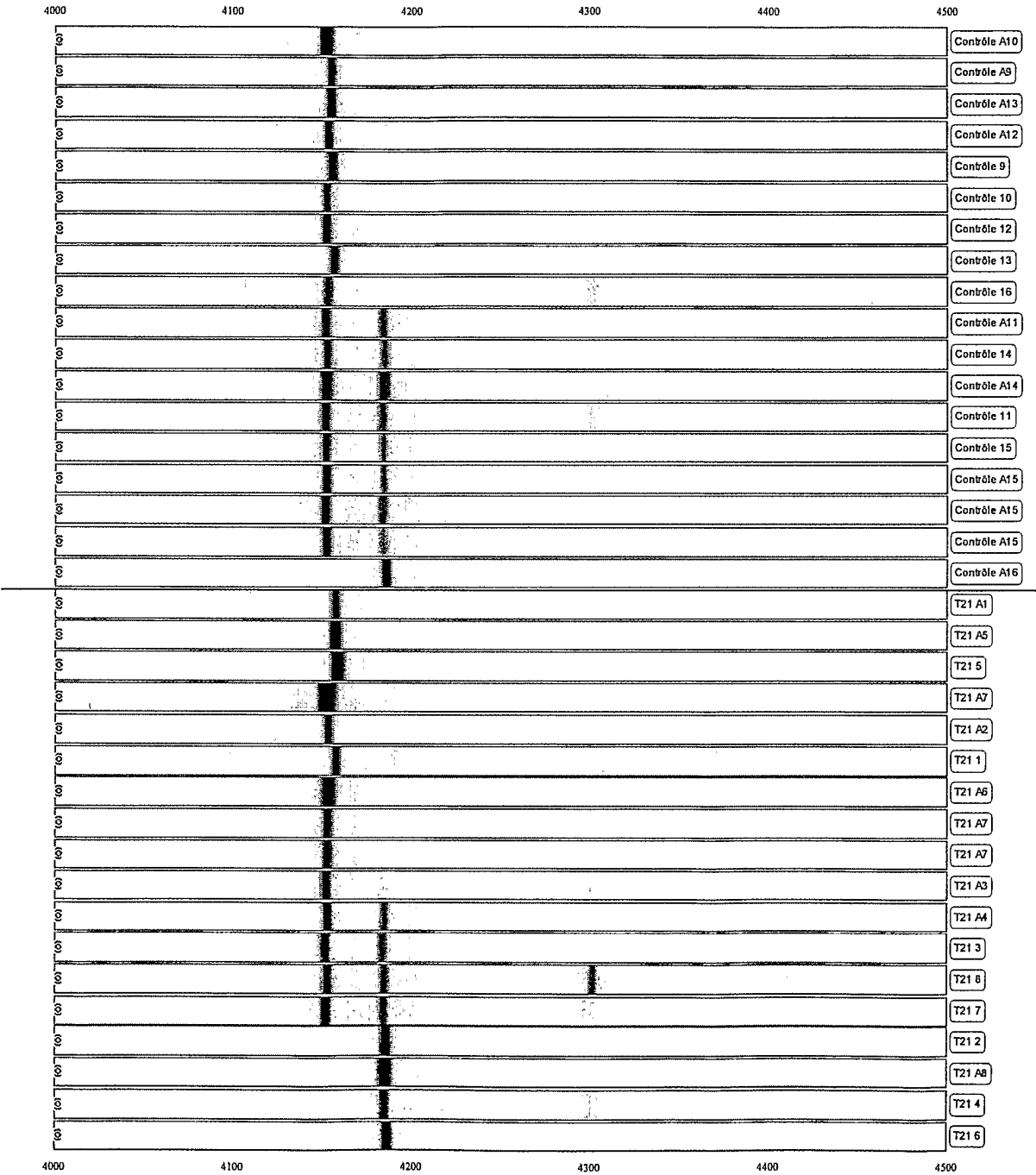


Fig. 7

7 / 90

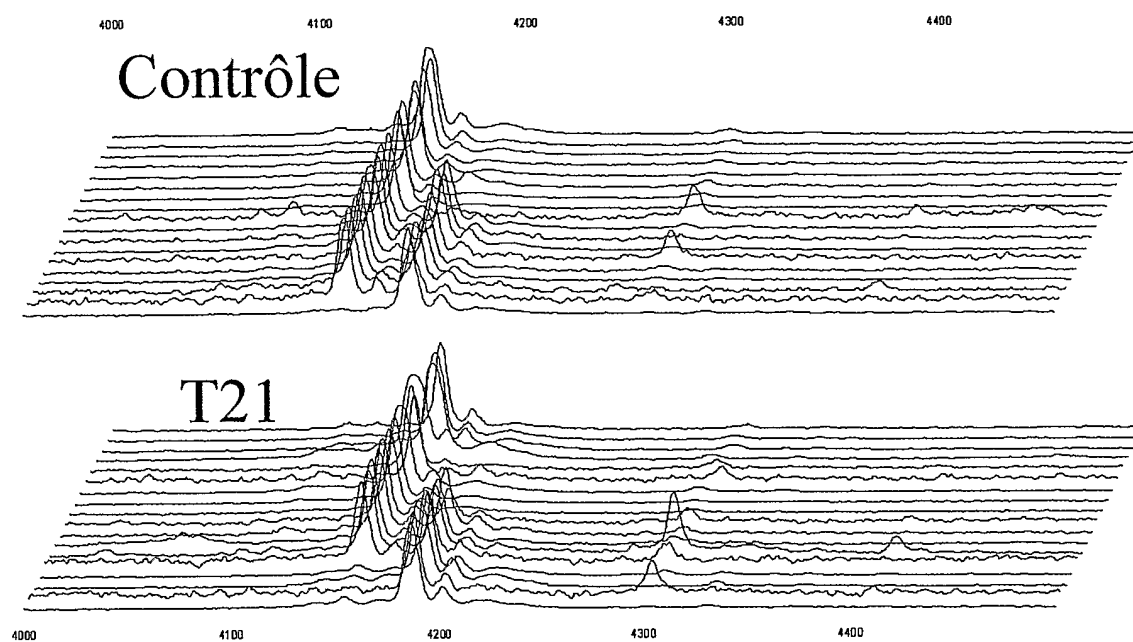


Fig. 8

8 / 90

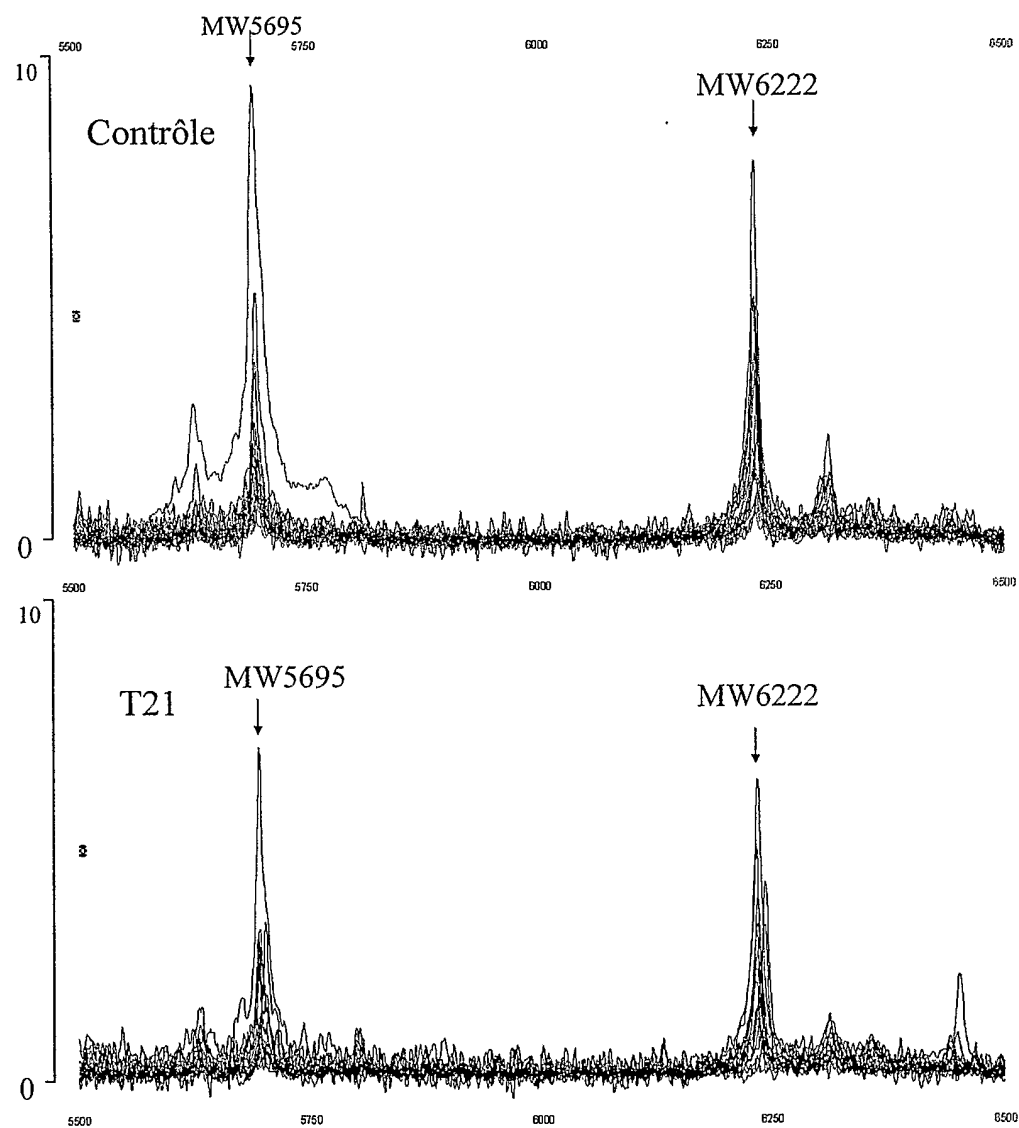


Fig. 9

9 / 90

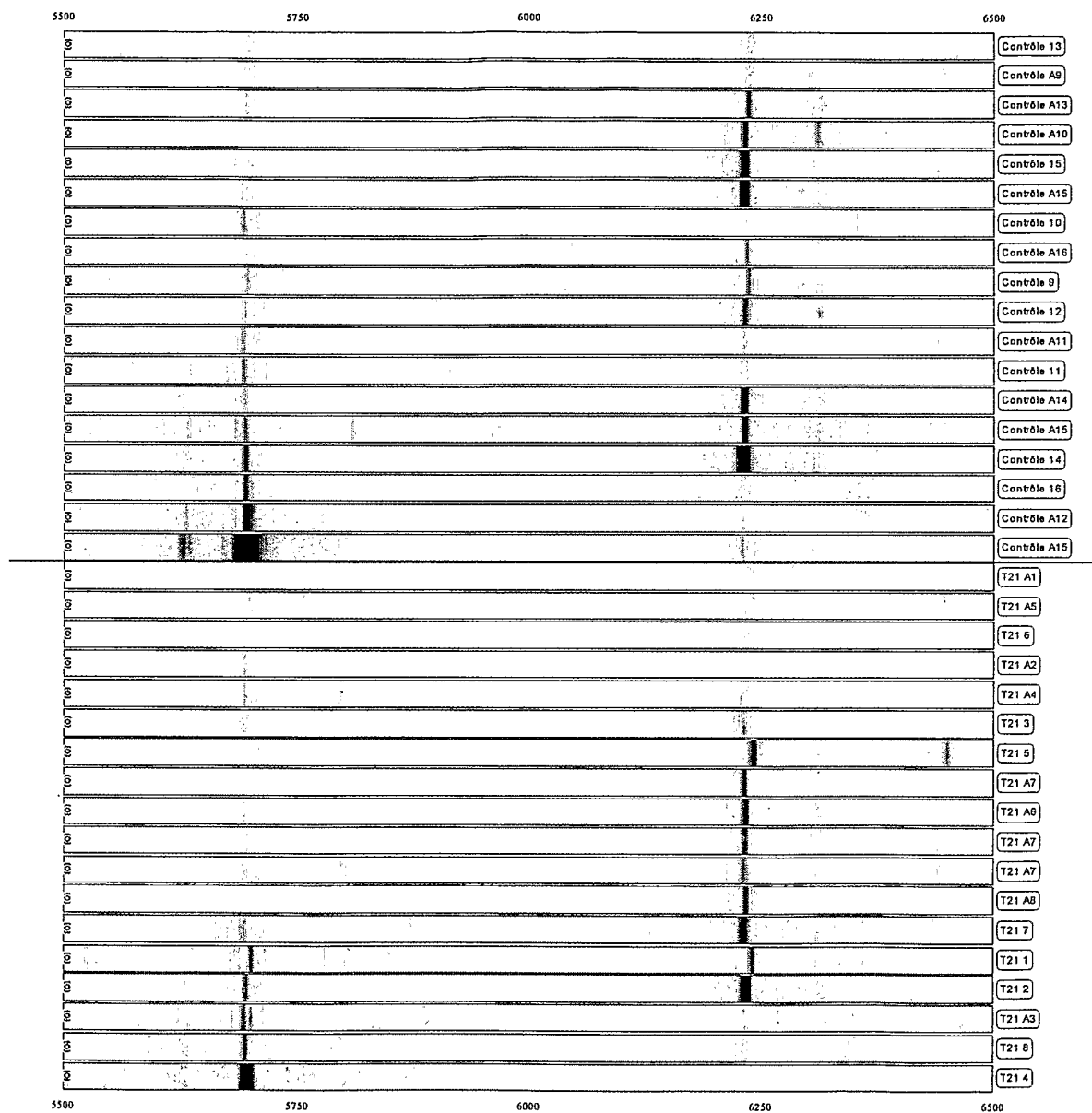


Fig. 10

10 / 90

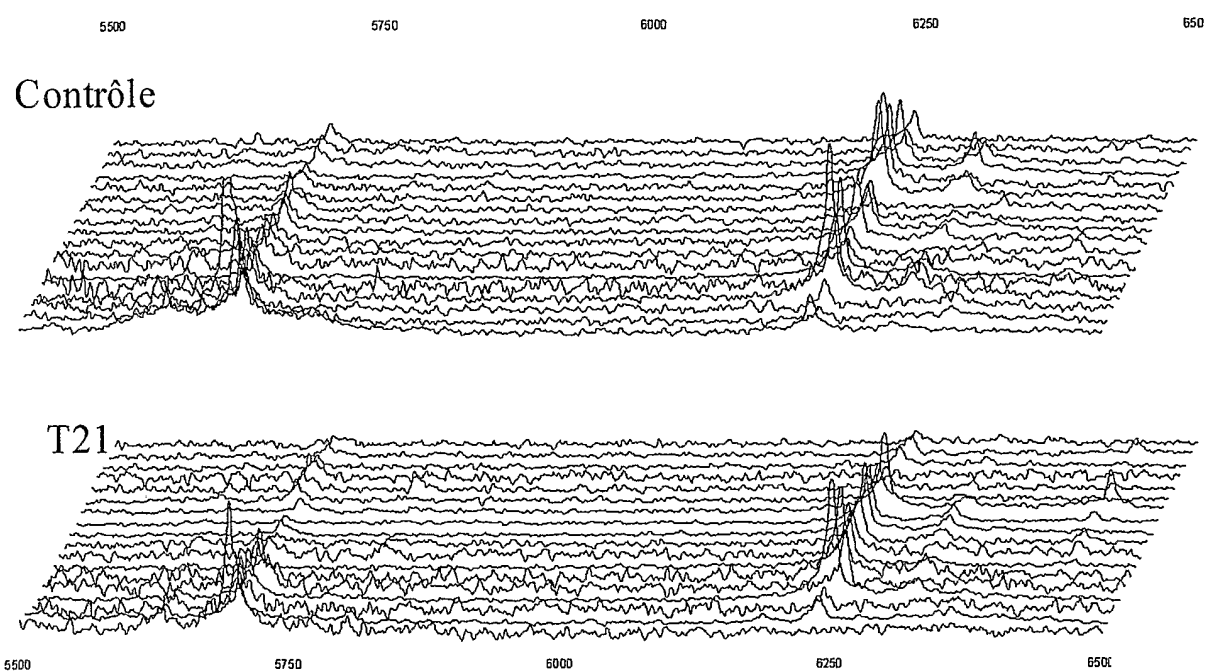


Fig. 11

11 / 90

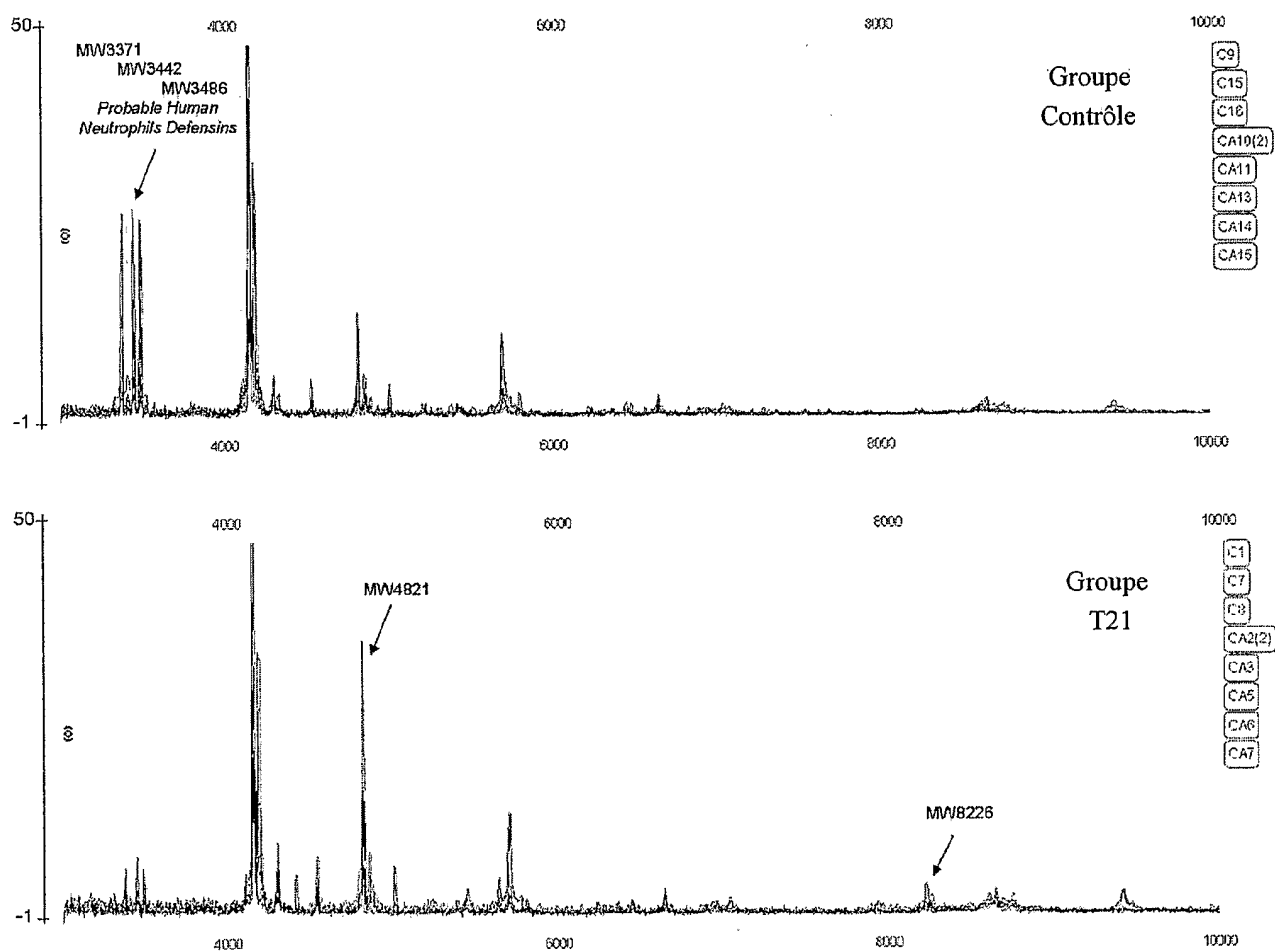


Fig. 12

12 / 90

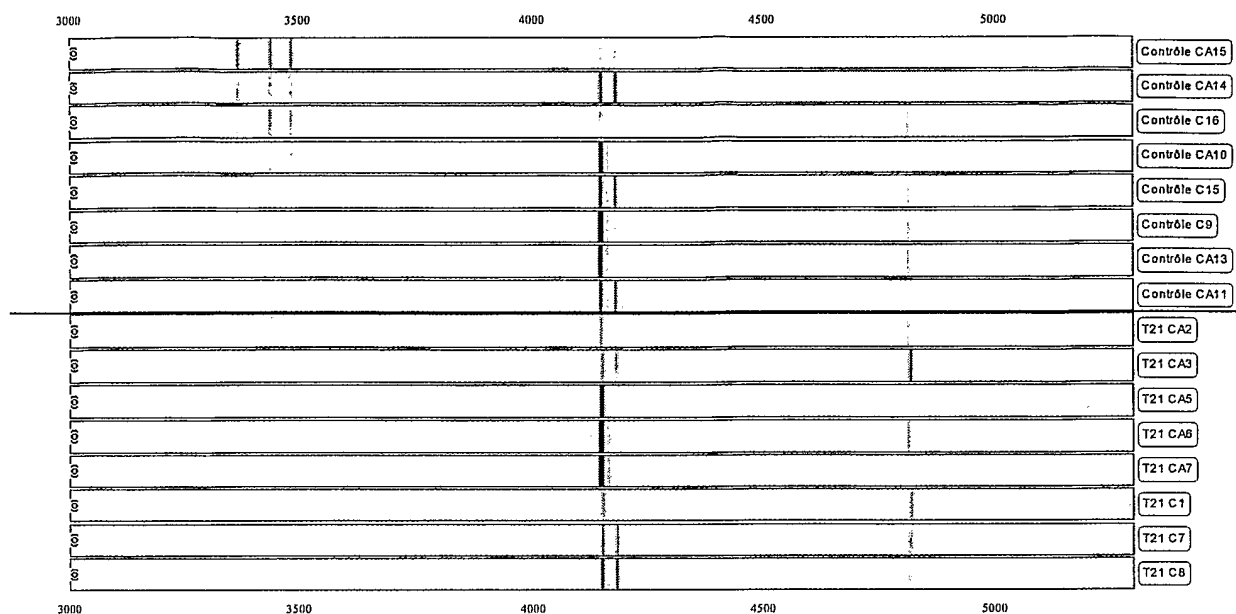


Fig. 13

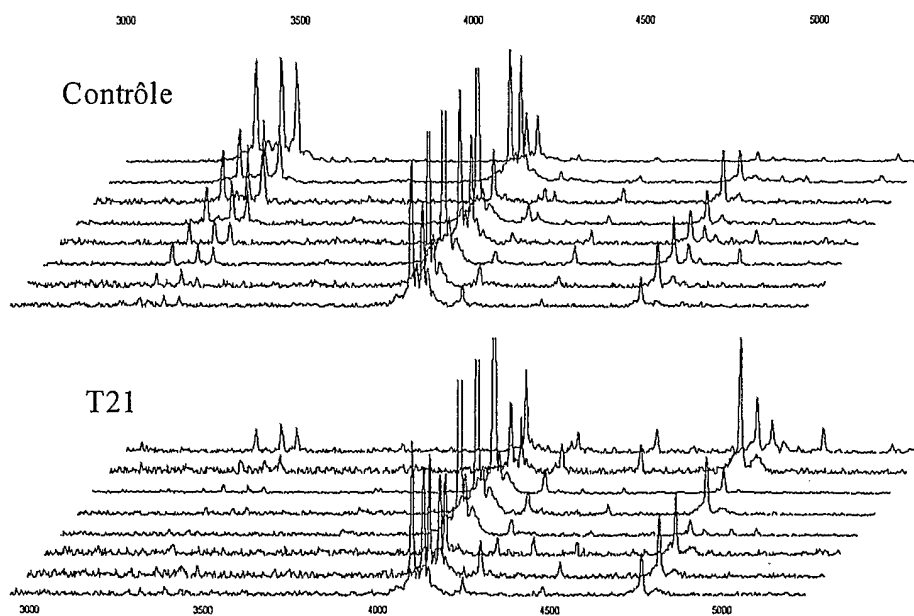


Fig. 14

13 / 90

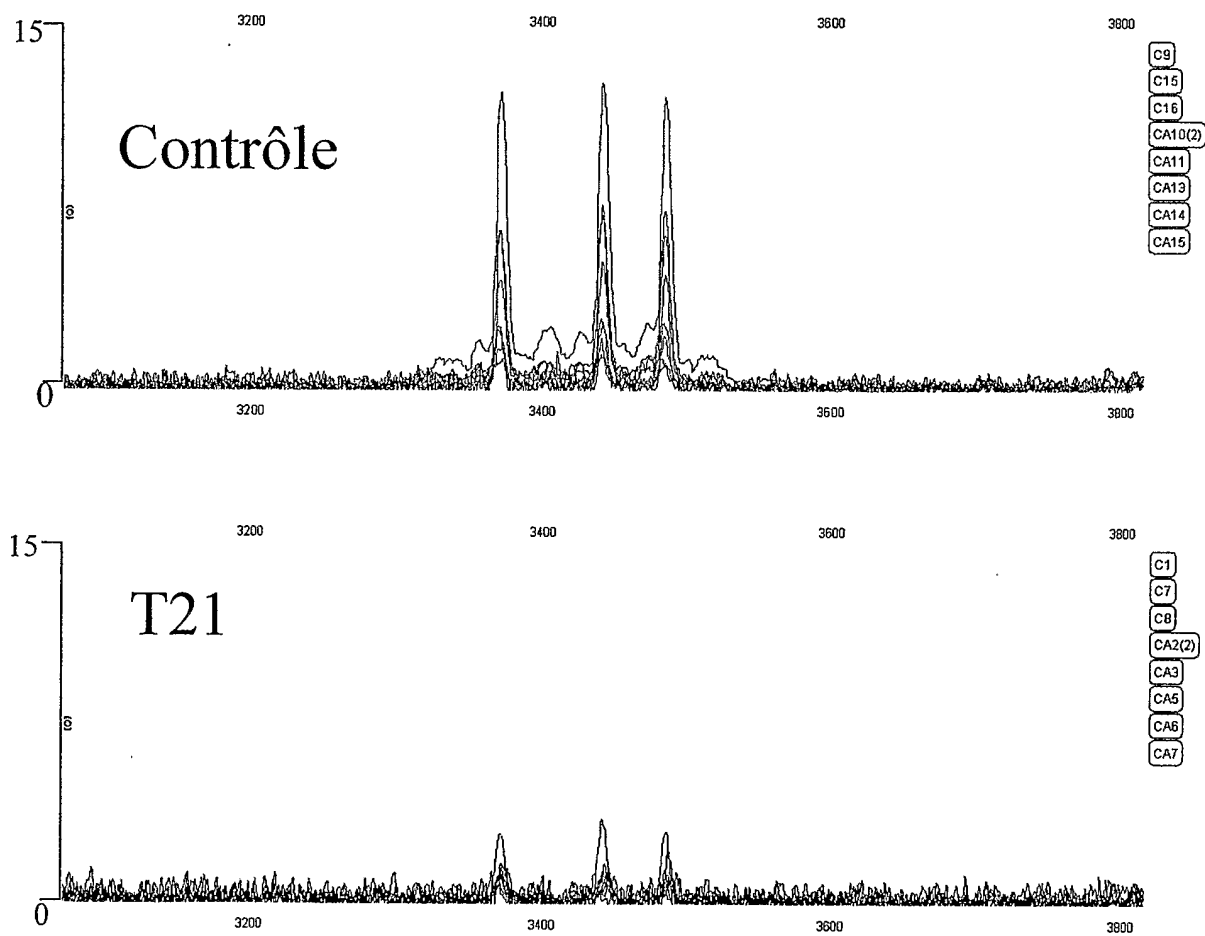


Fig. 15

14 / 90

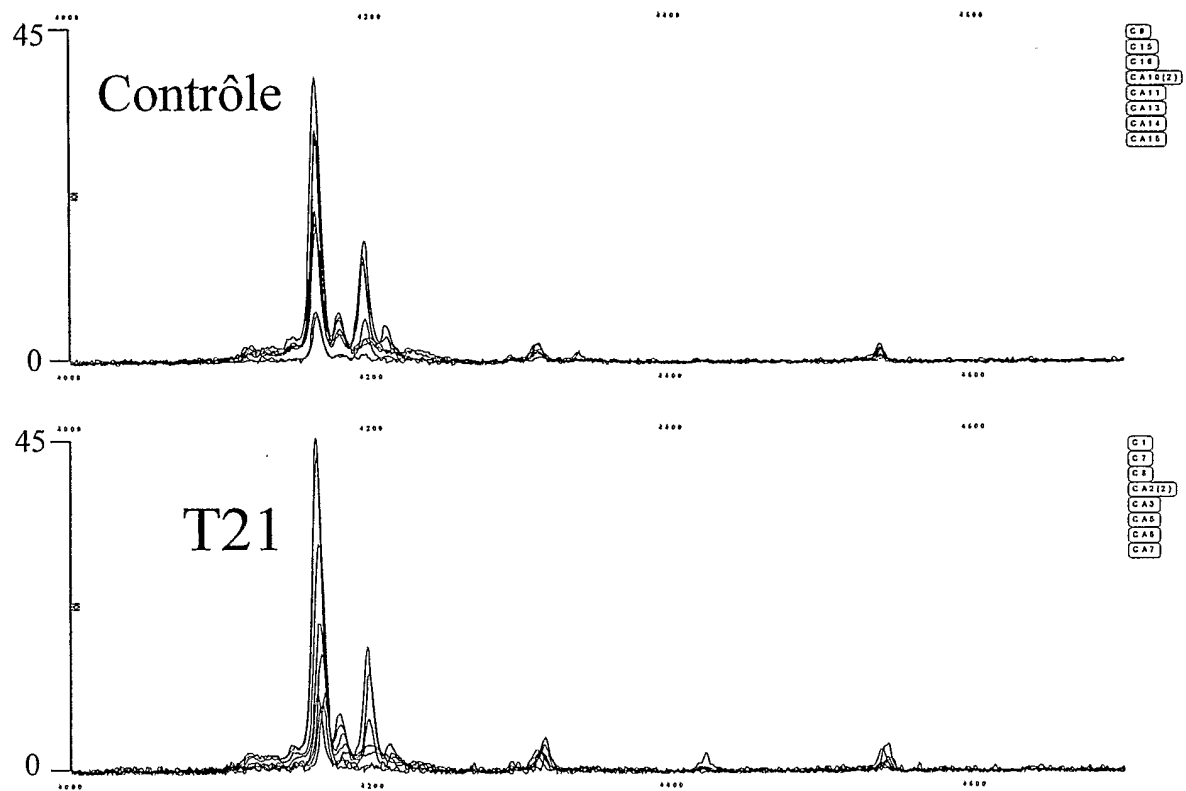


Fig. 16

15 / 90

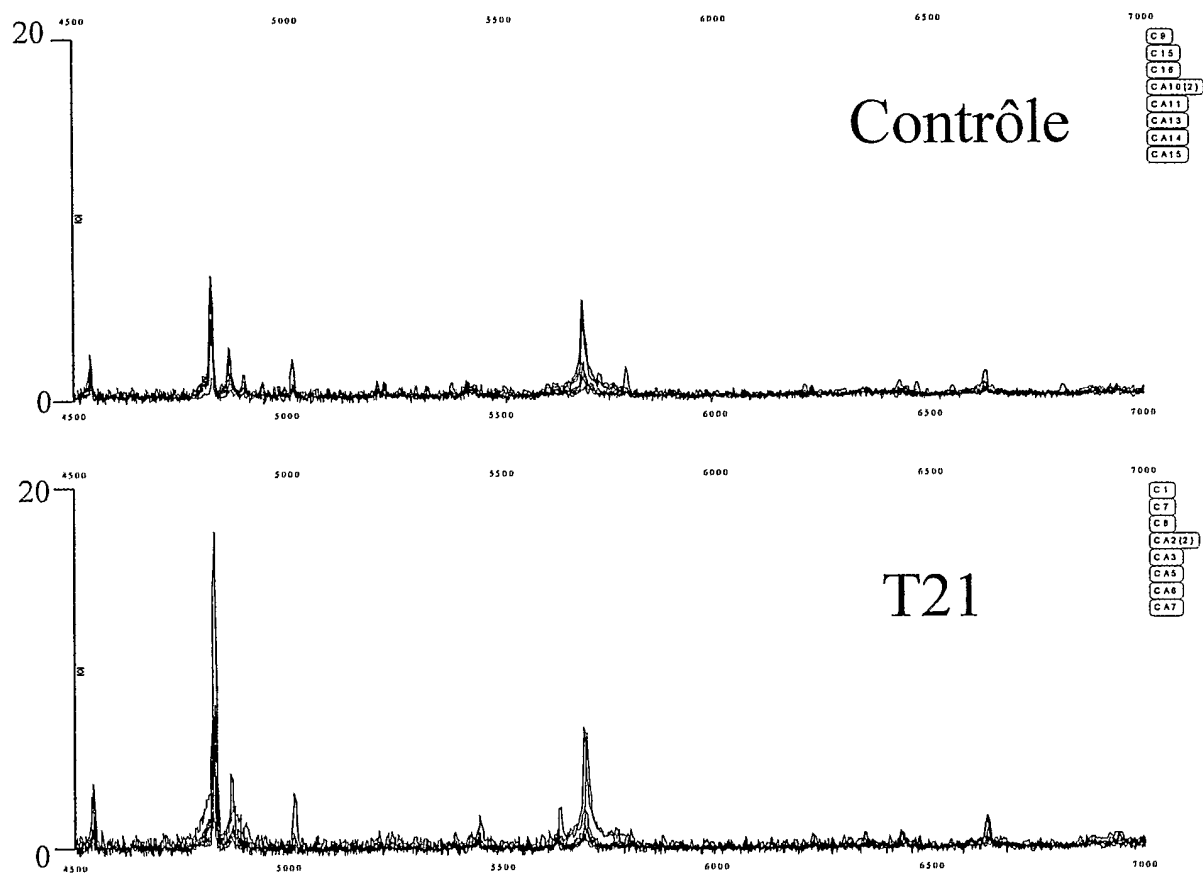


Fig. 17

16 / 90

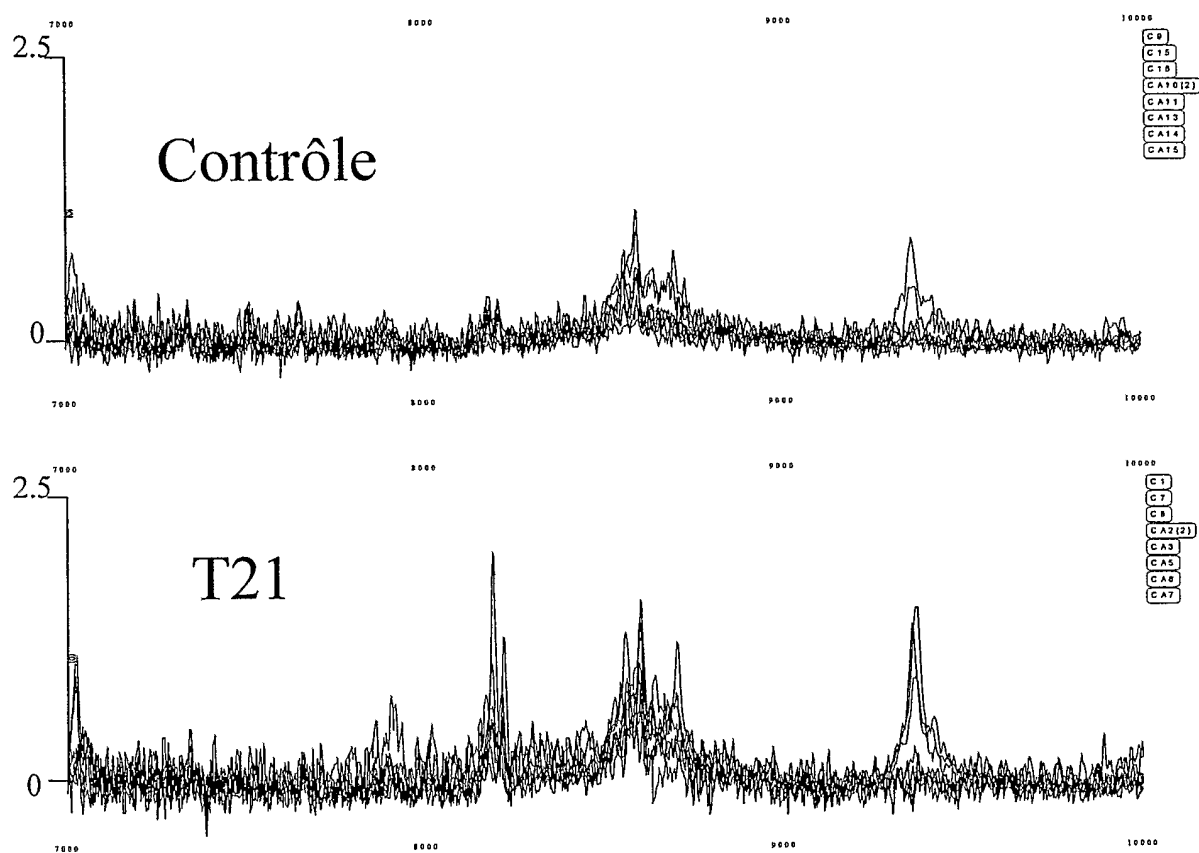


Fig. 18

17 / 90

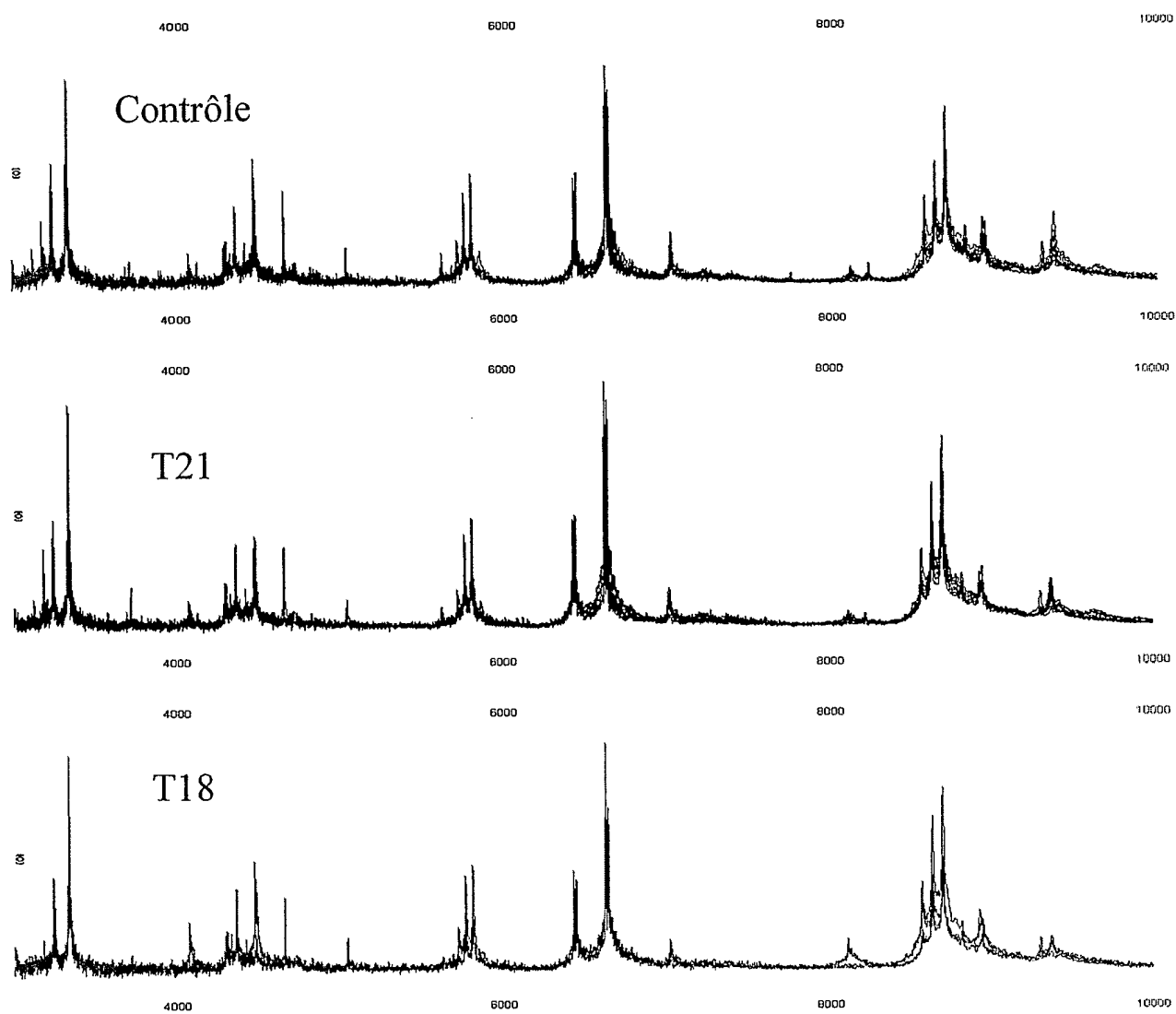


Fig. 19

18 / 90

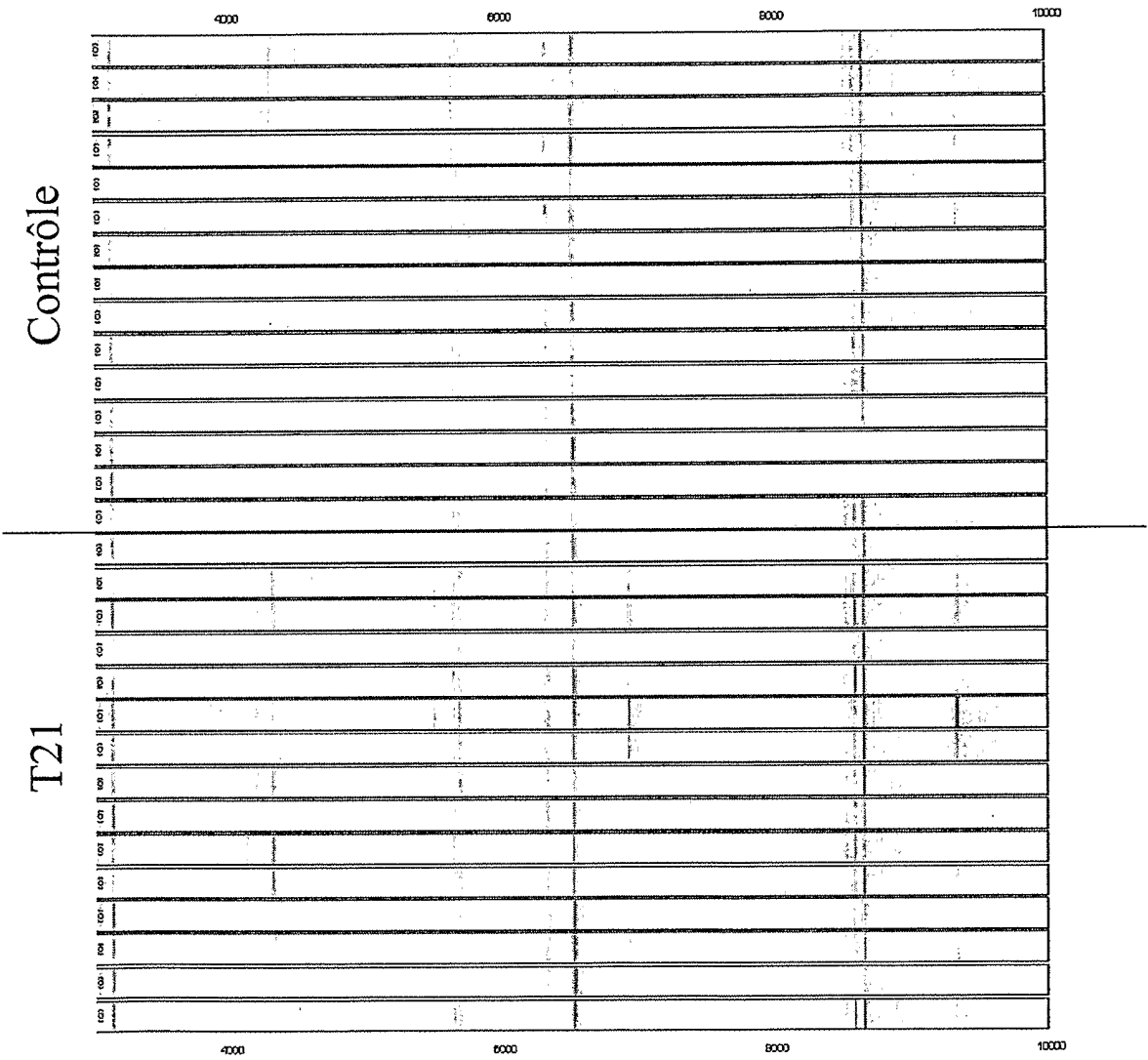
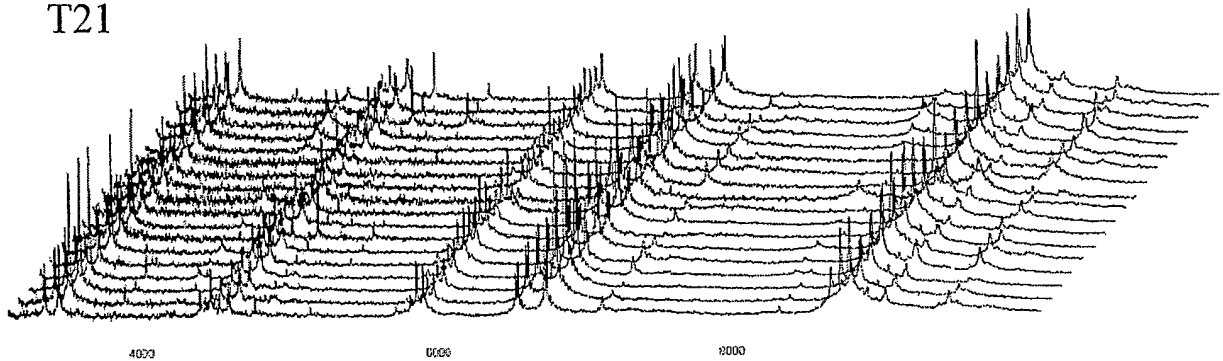


Fig. 20

19 / 90

T21



Contrôle

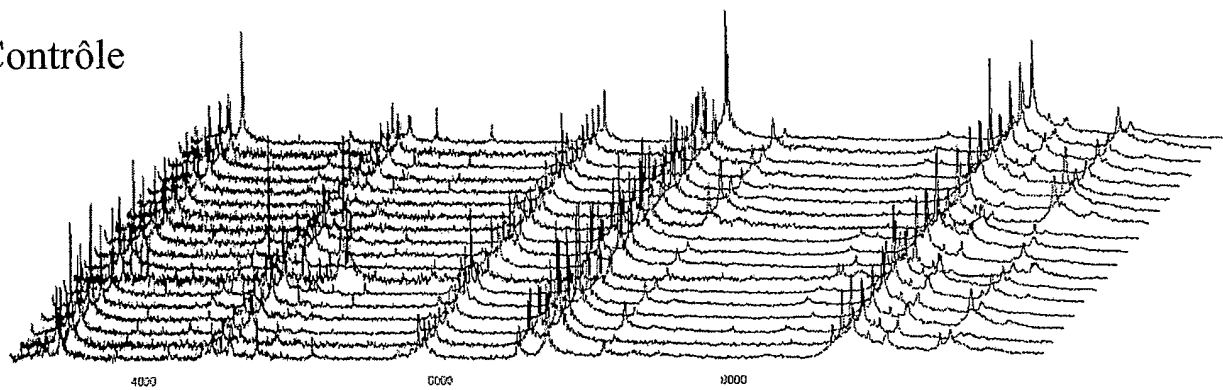


Fig. 21

20 / 90

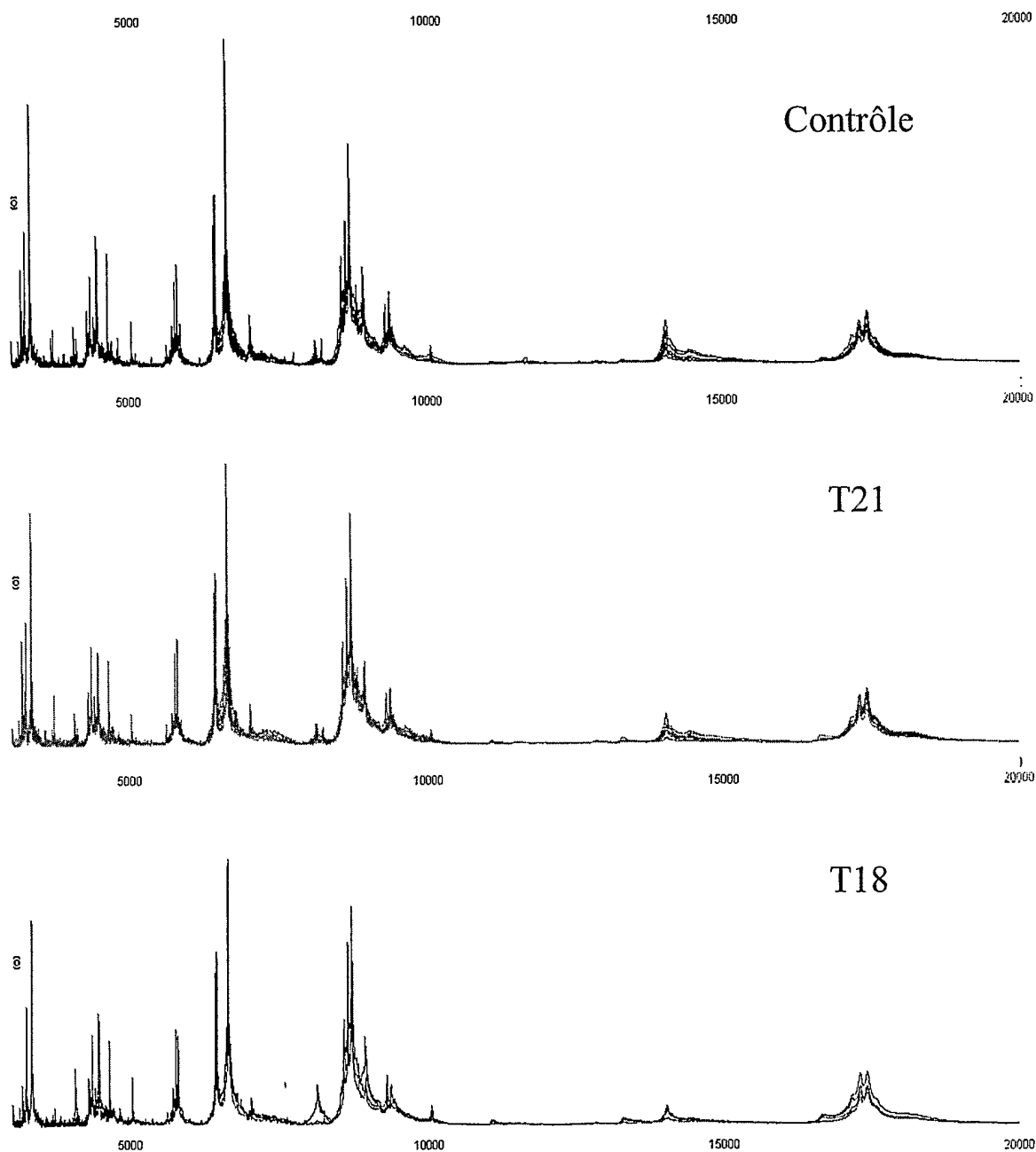


Fig. 22

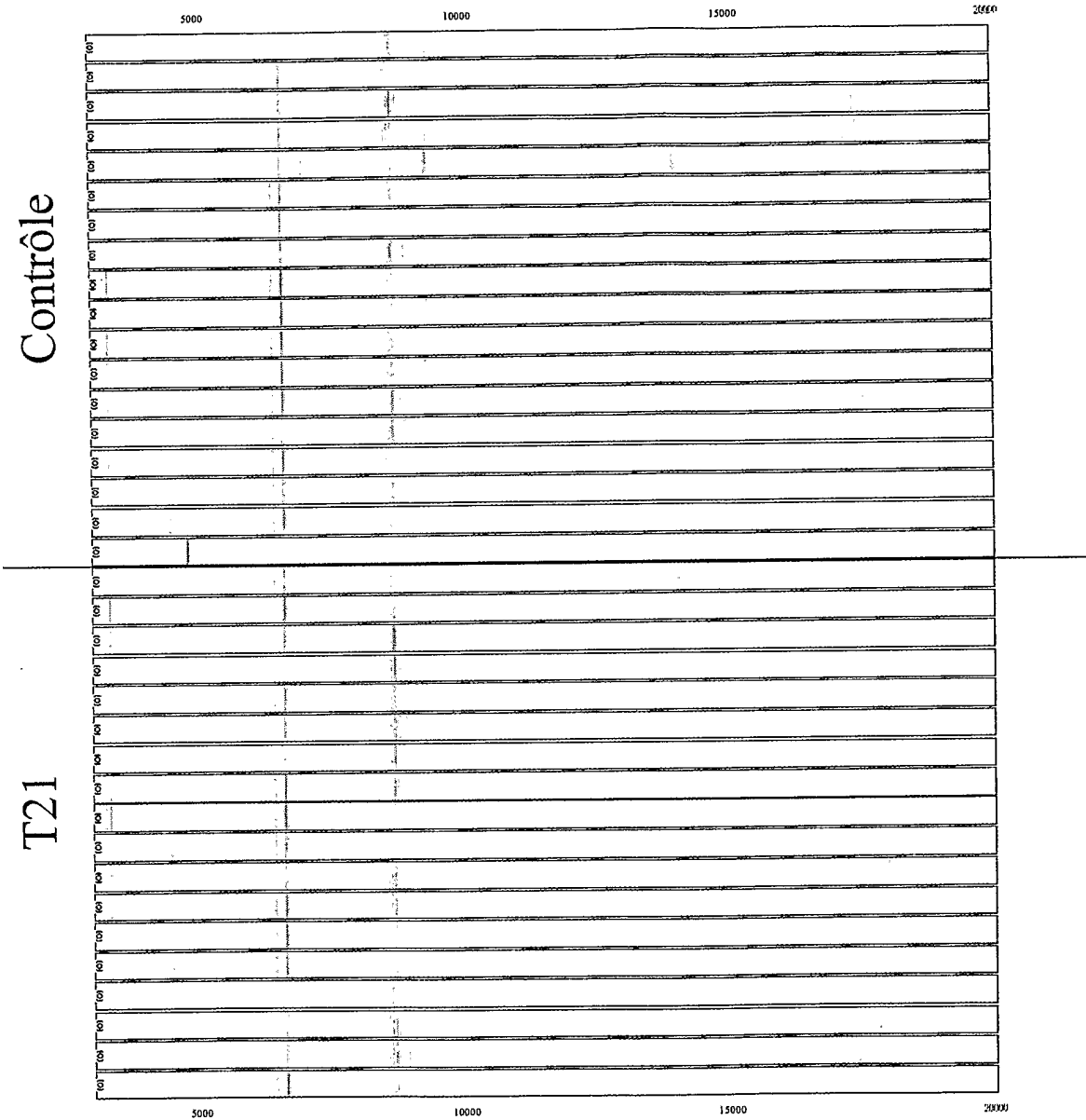


Fig. 23

22 / 90

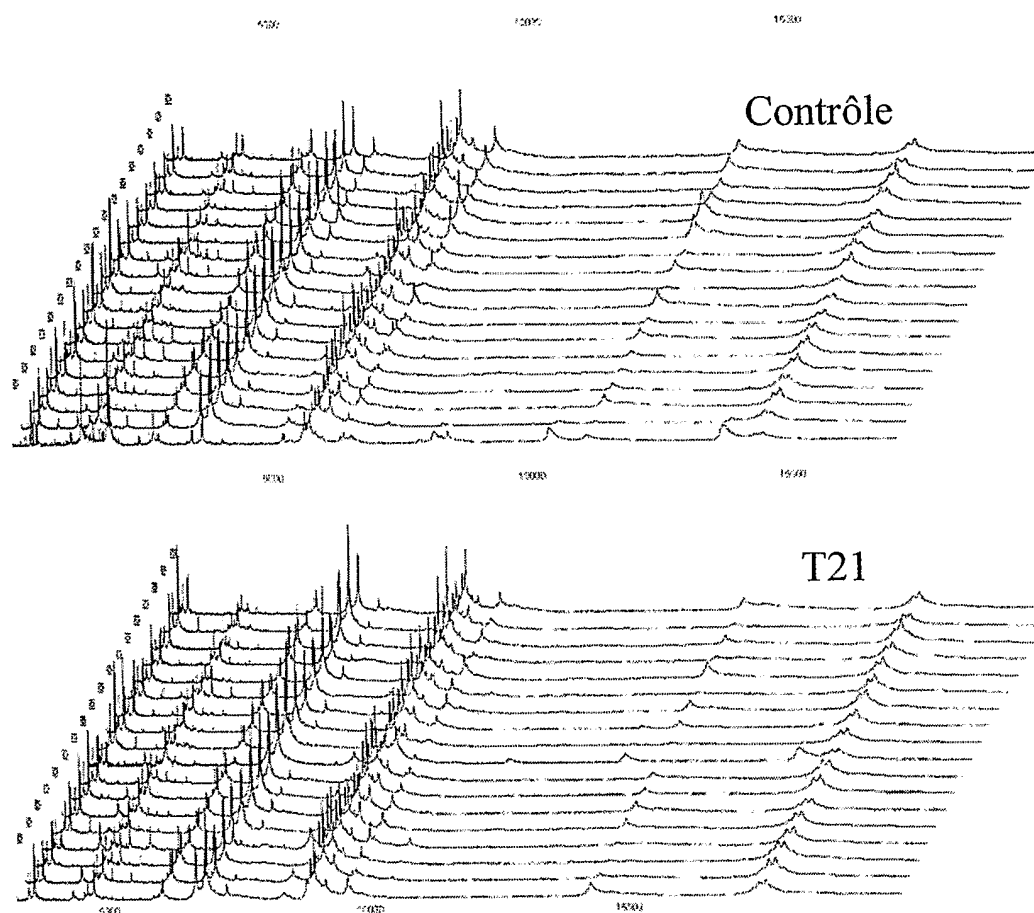


Fig. 24

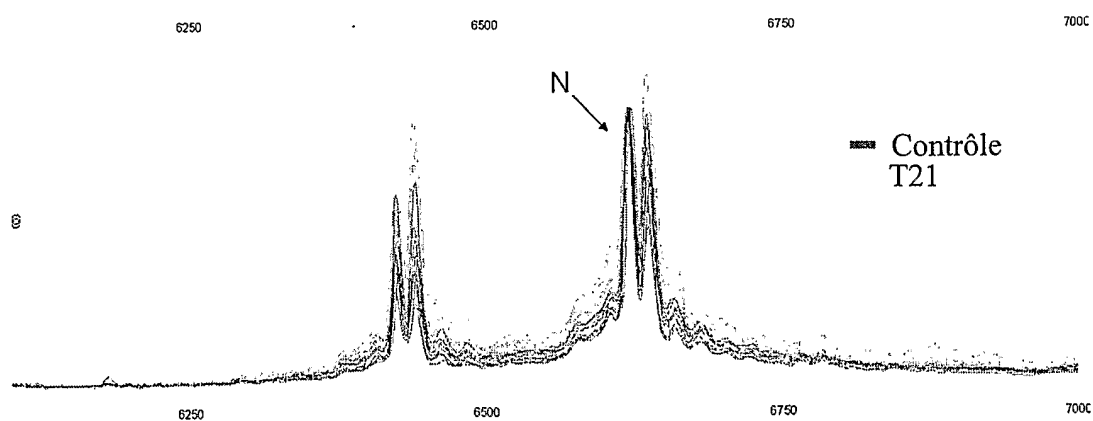
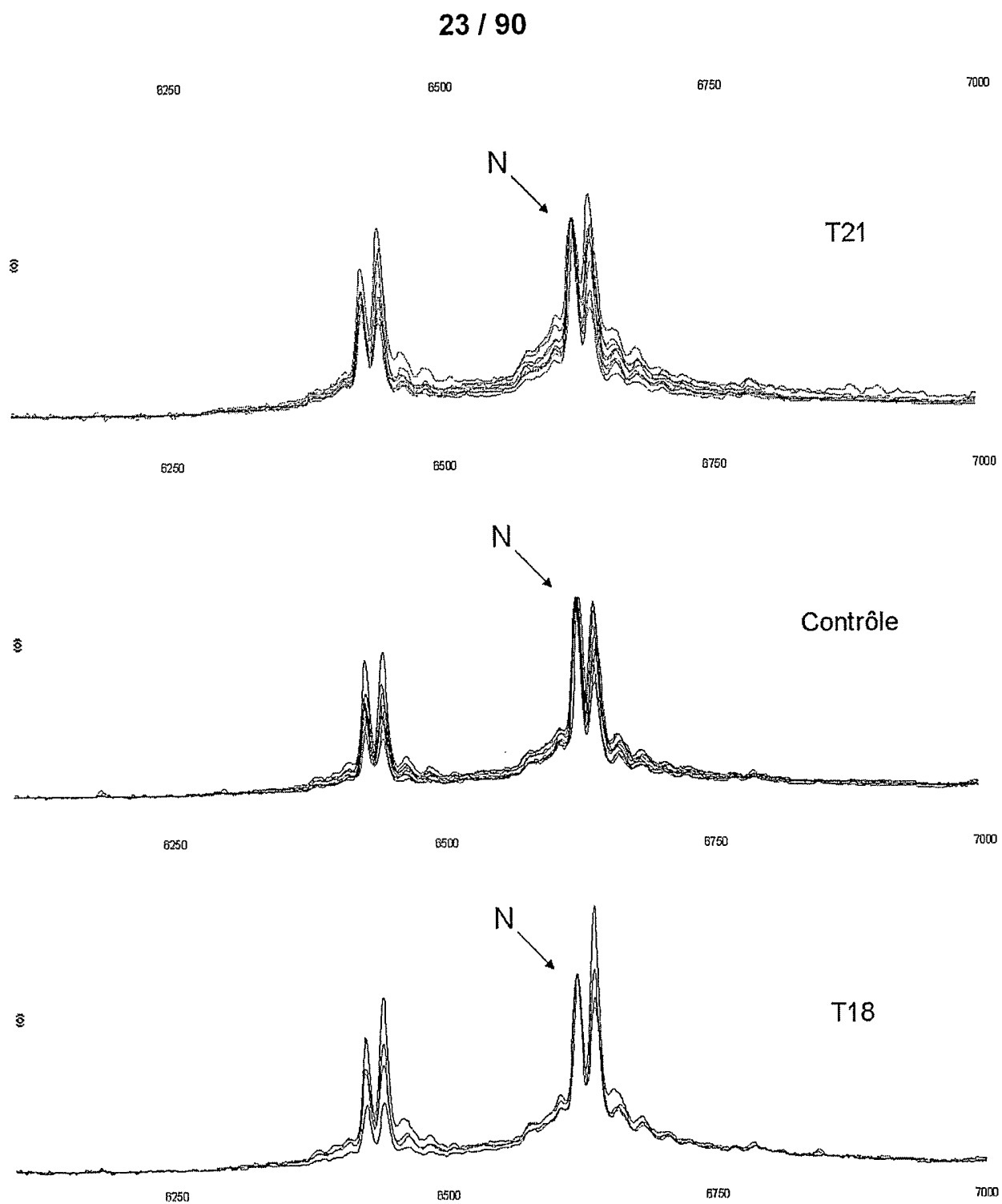


Fig. 25



24 / 90

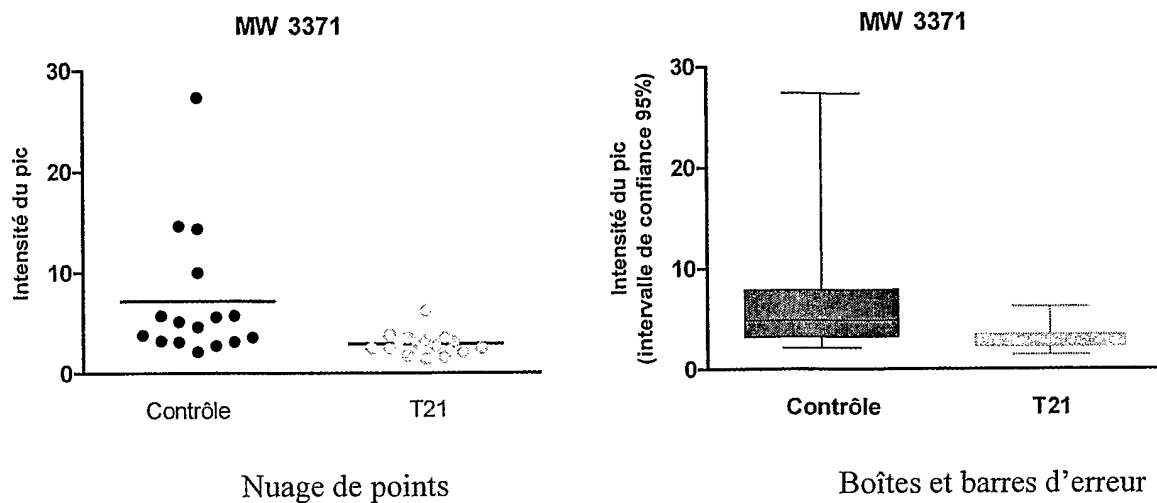


Fig. 27

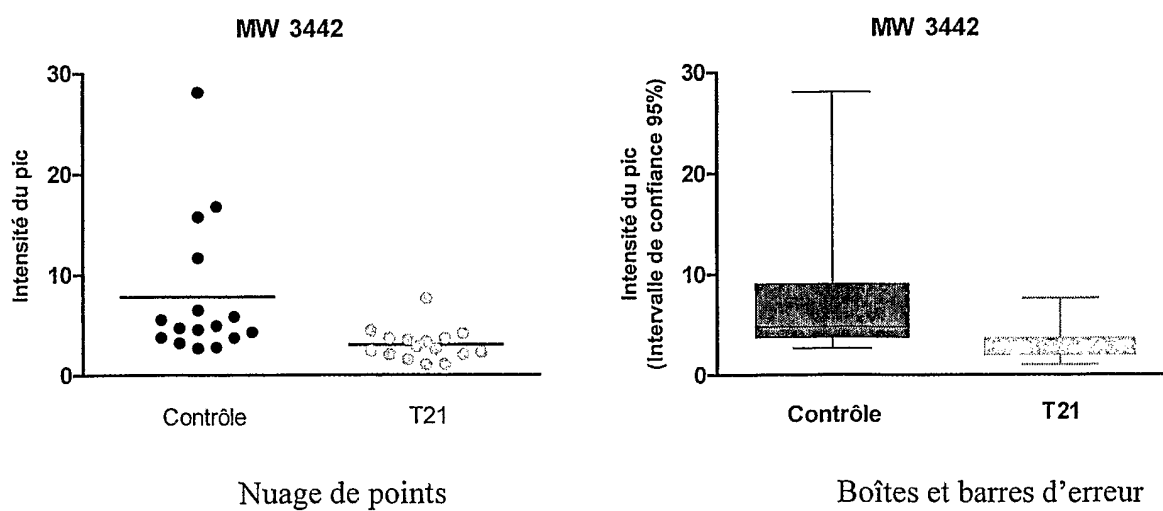


Fig. 28

25 / 90

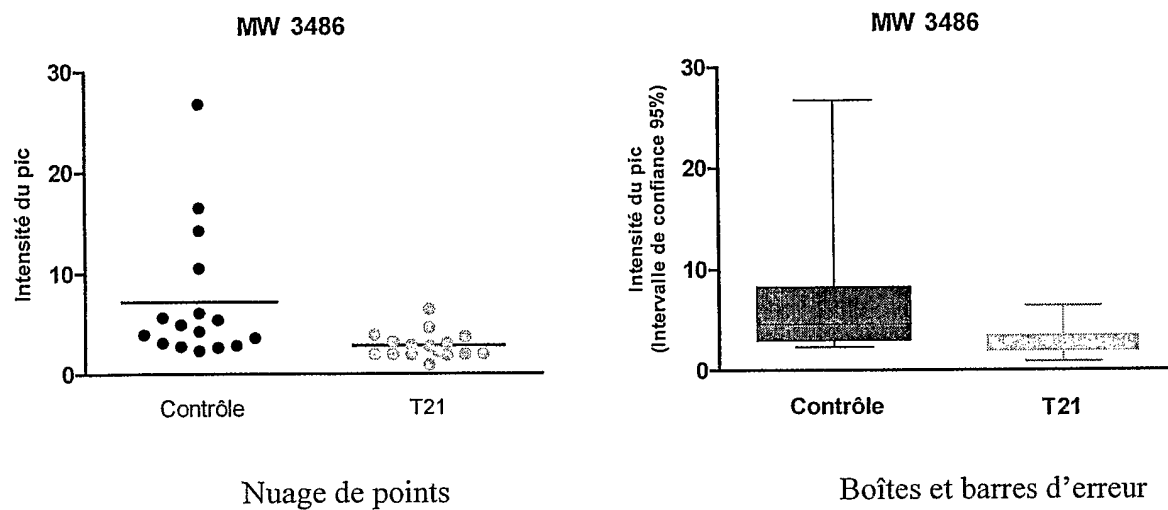


Fig. 29

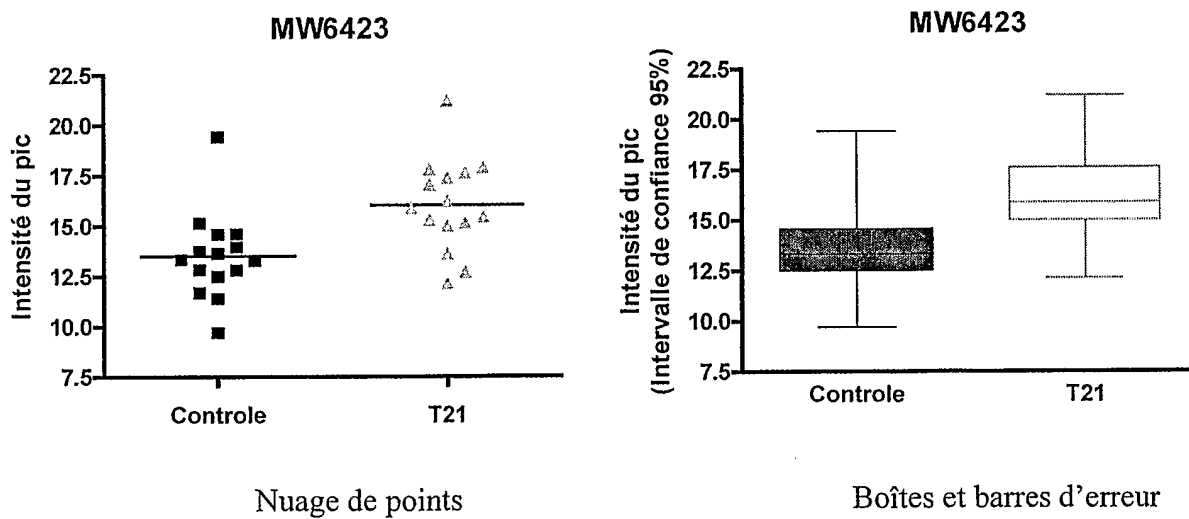


Fig. 30

Courbes ROC (Intervalle de confiance 95%)

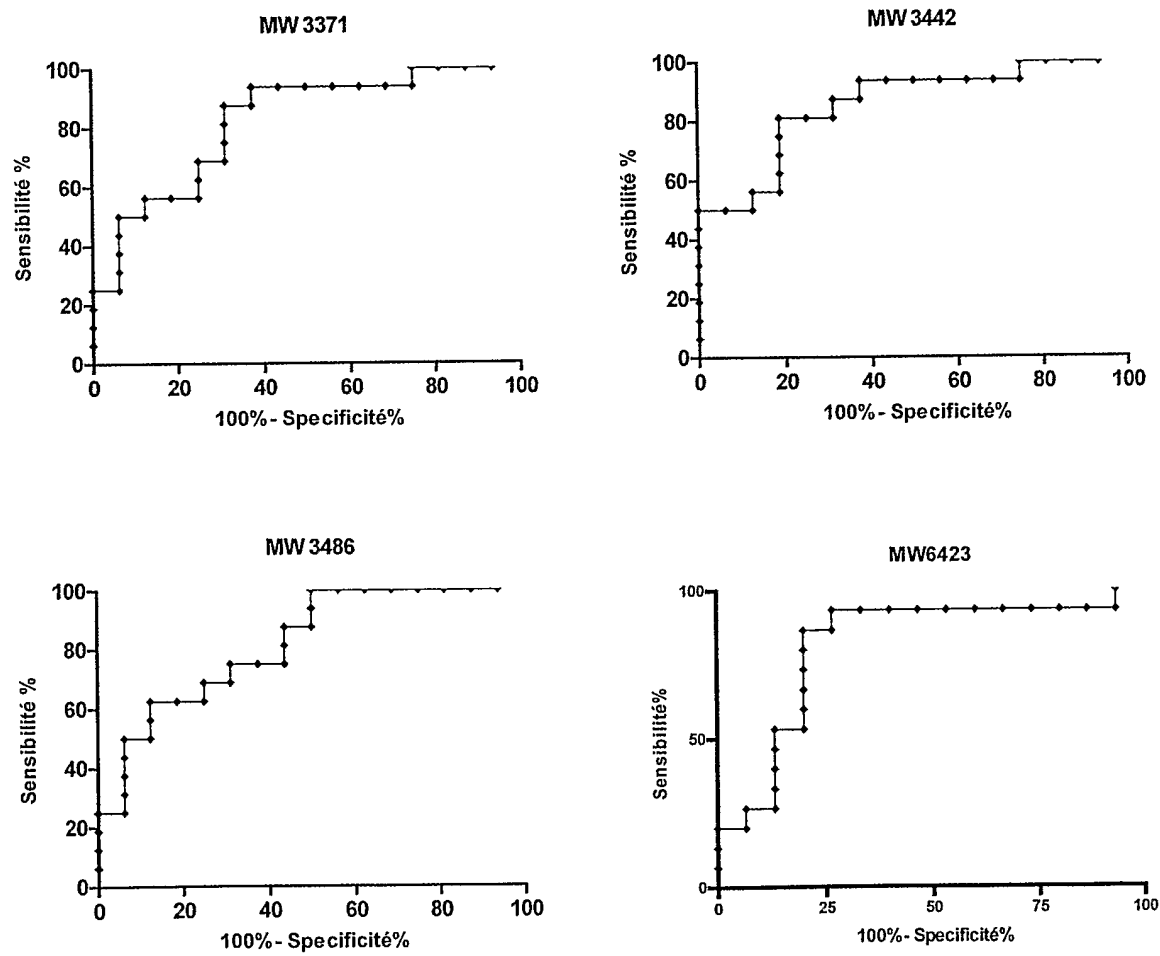


Fig. 31

27 / 90

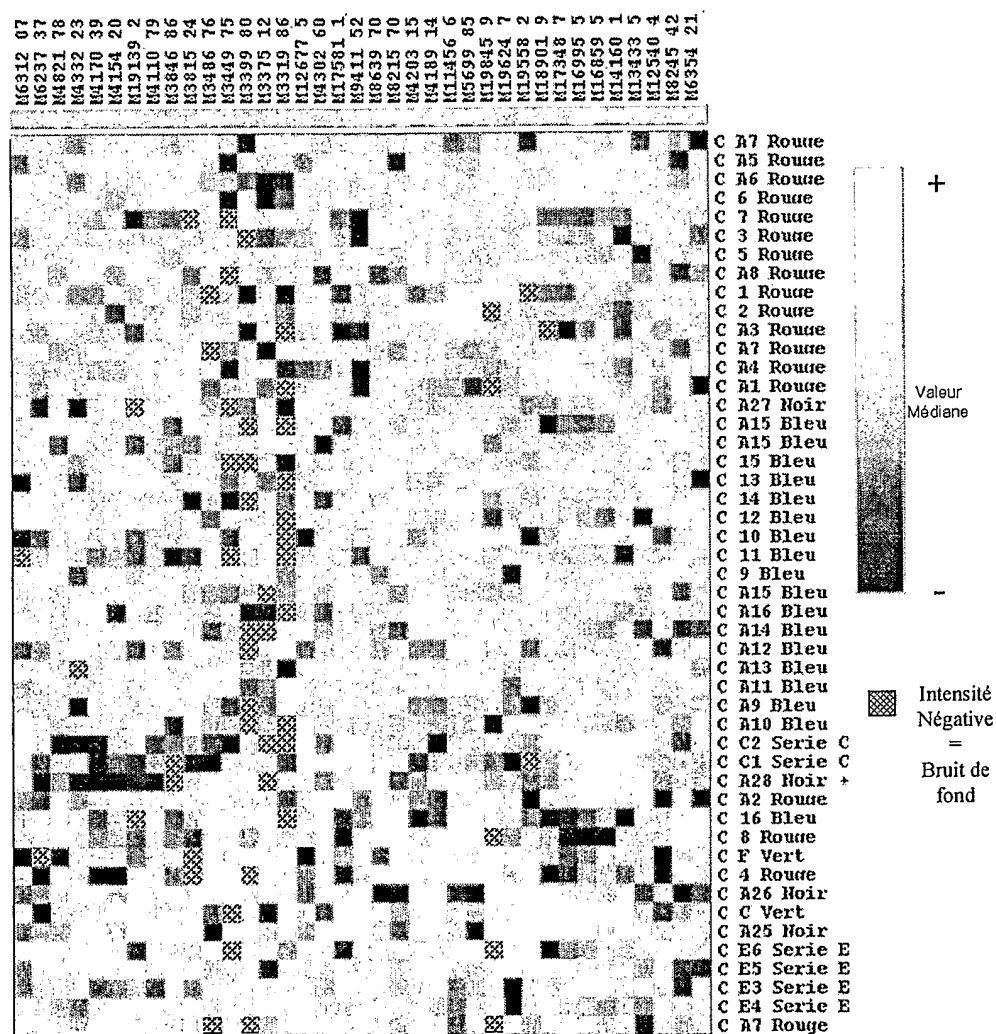


Fig. 32

28 / 90

Analyse en Composante Principale - Surface échangeuse d'anions Q10

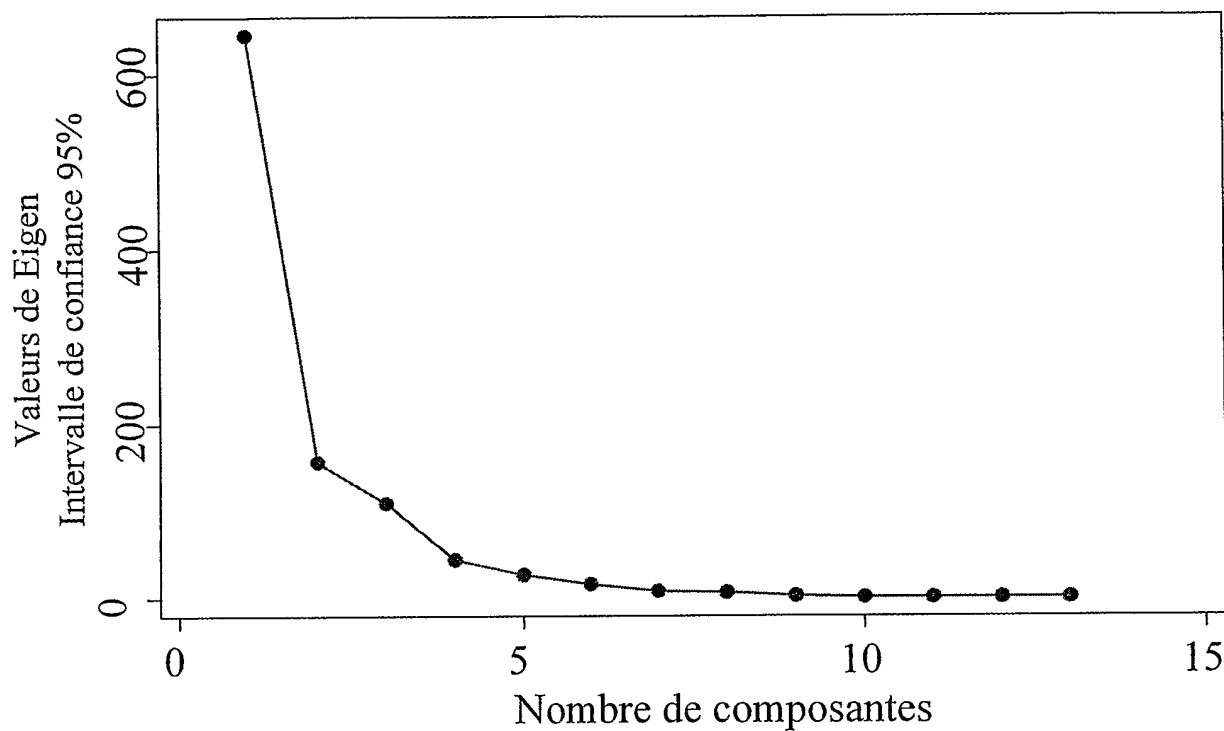


Fig. 33

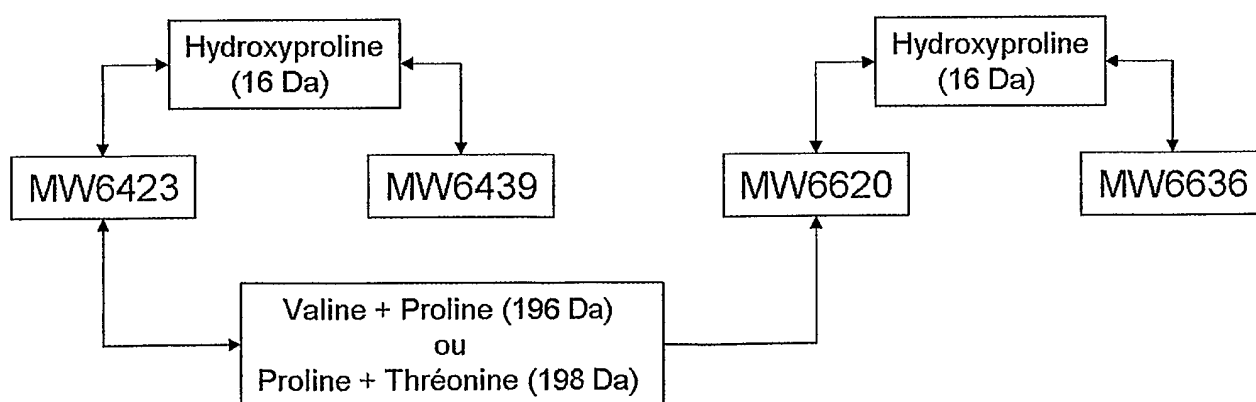


Fig. 34

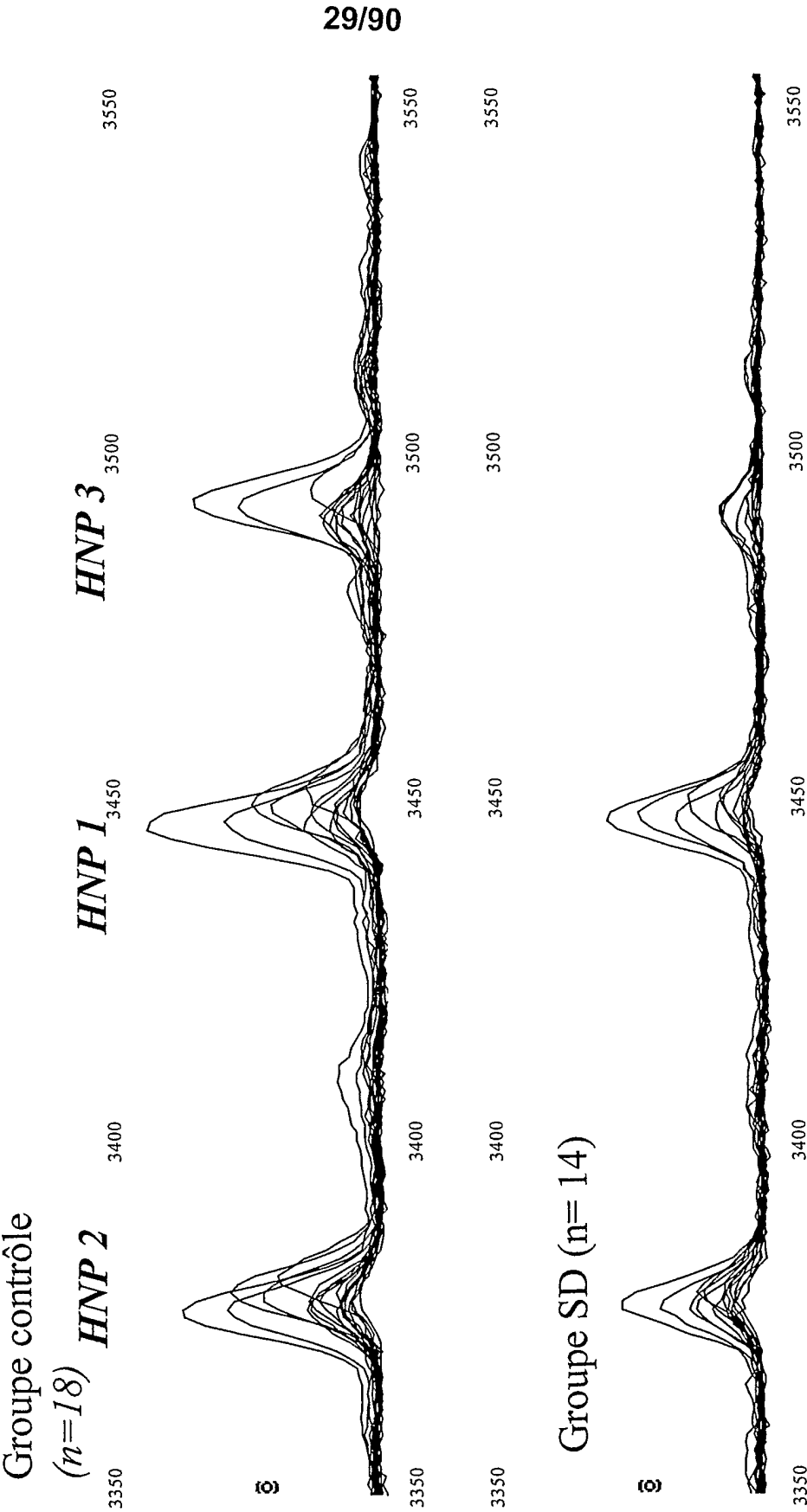
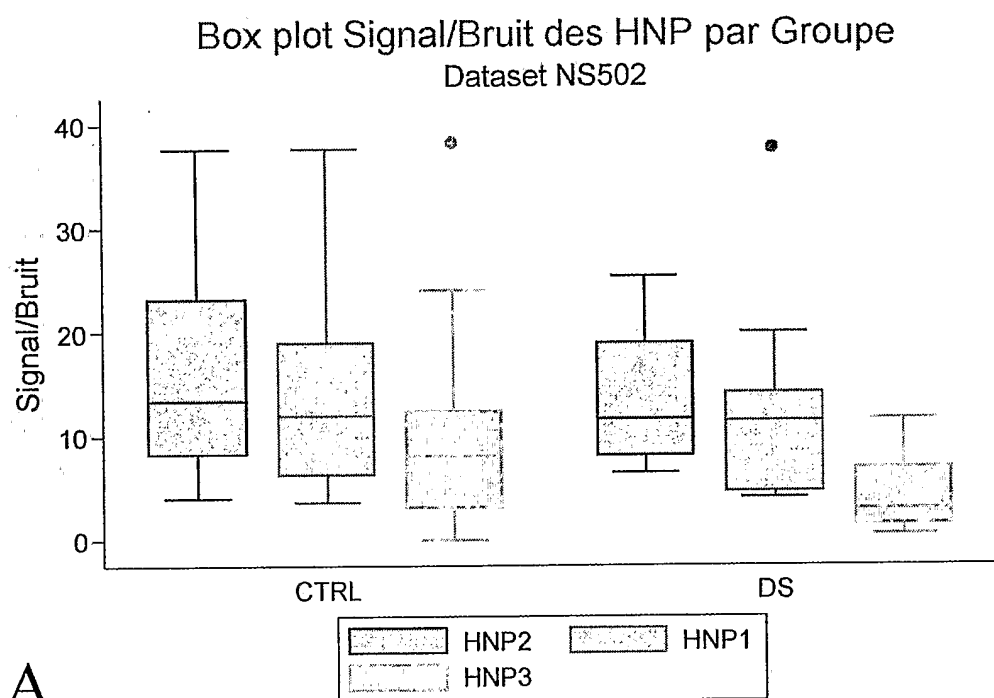
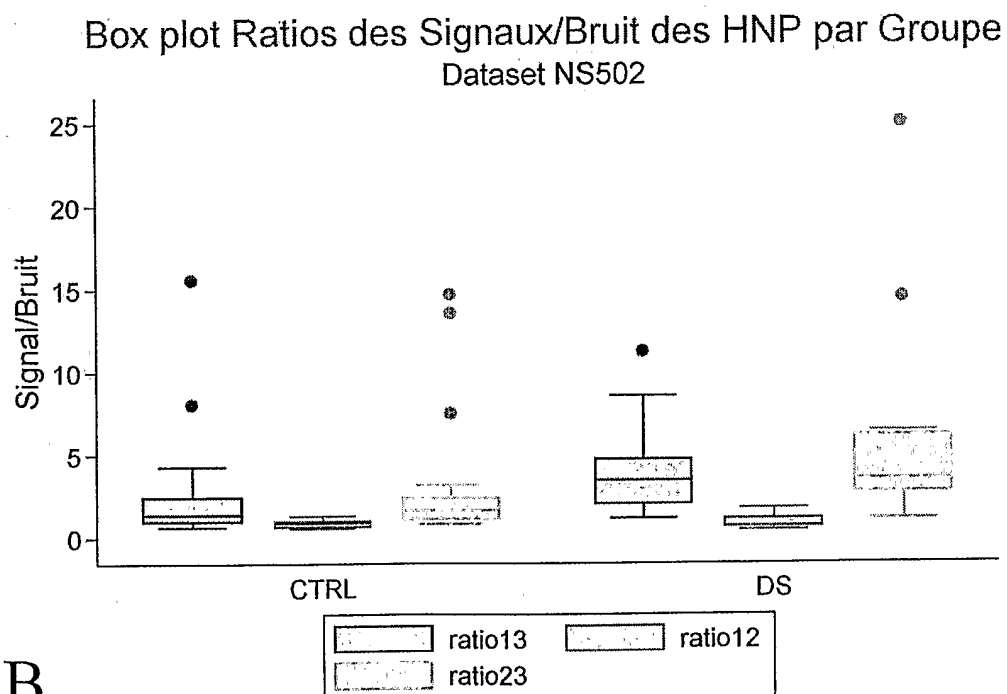


Fig. 35

30/90



A



B

Fig. 36

31/90

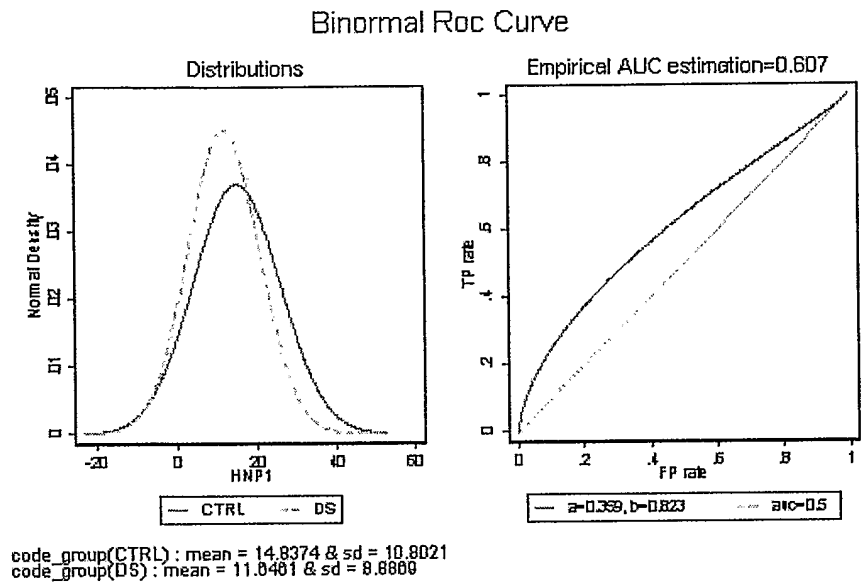


Fig. 37 A

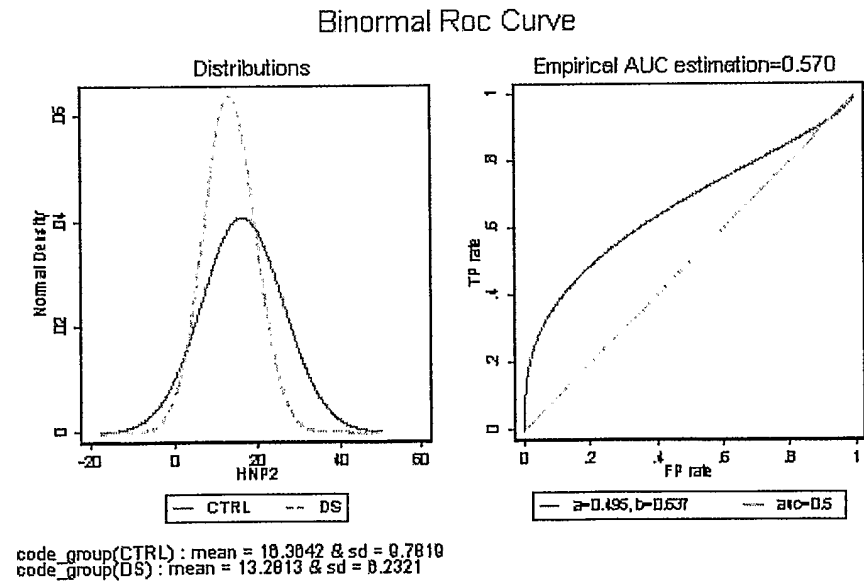


Fig. 37 B

32/90

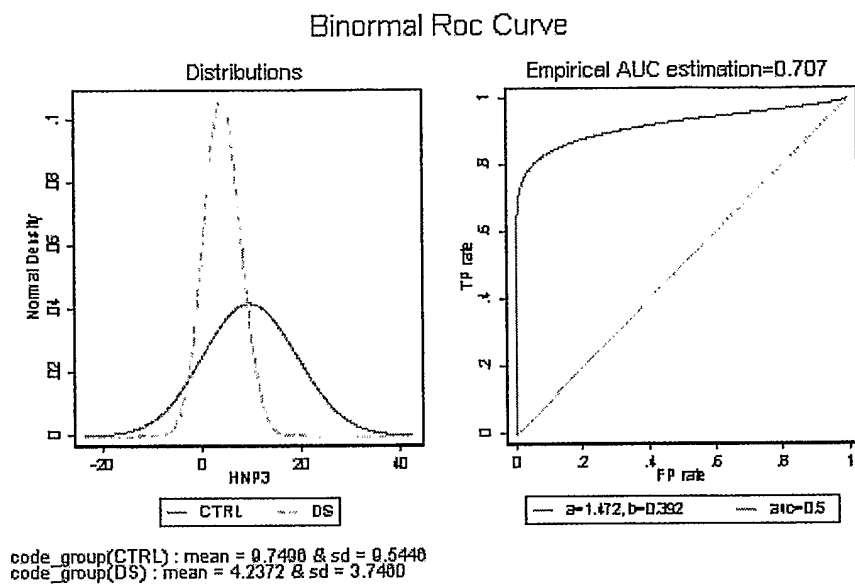


Fig. 37 C

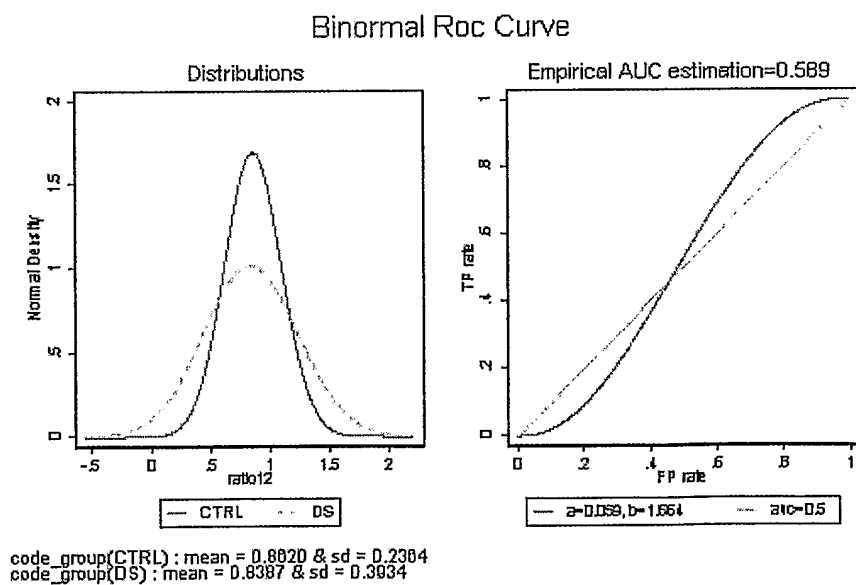


Fig. 38 A

33/90

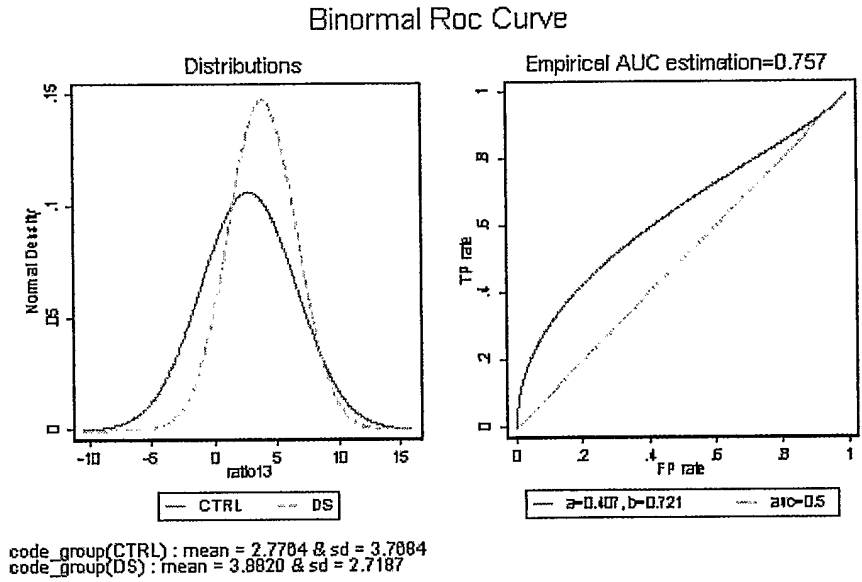


Fig. 38 B

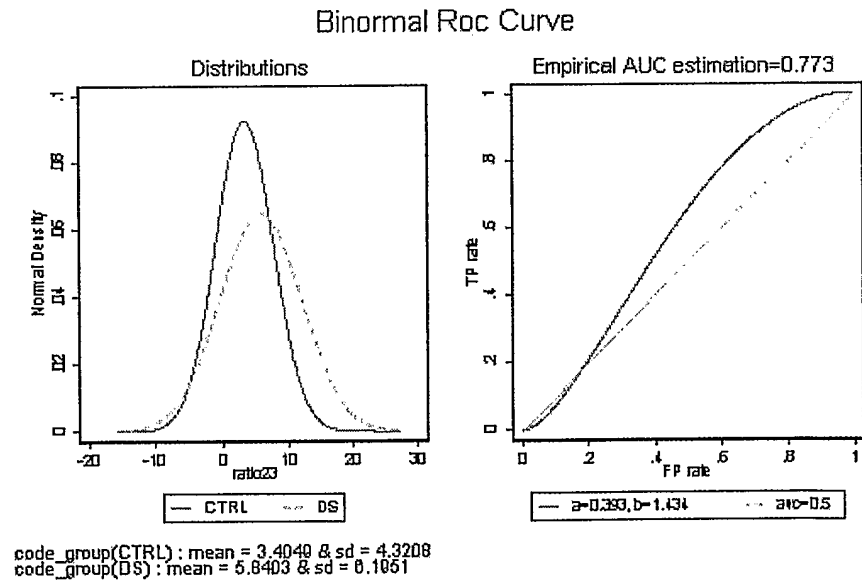


Fig. 38 C

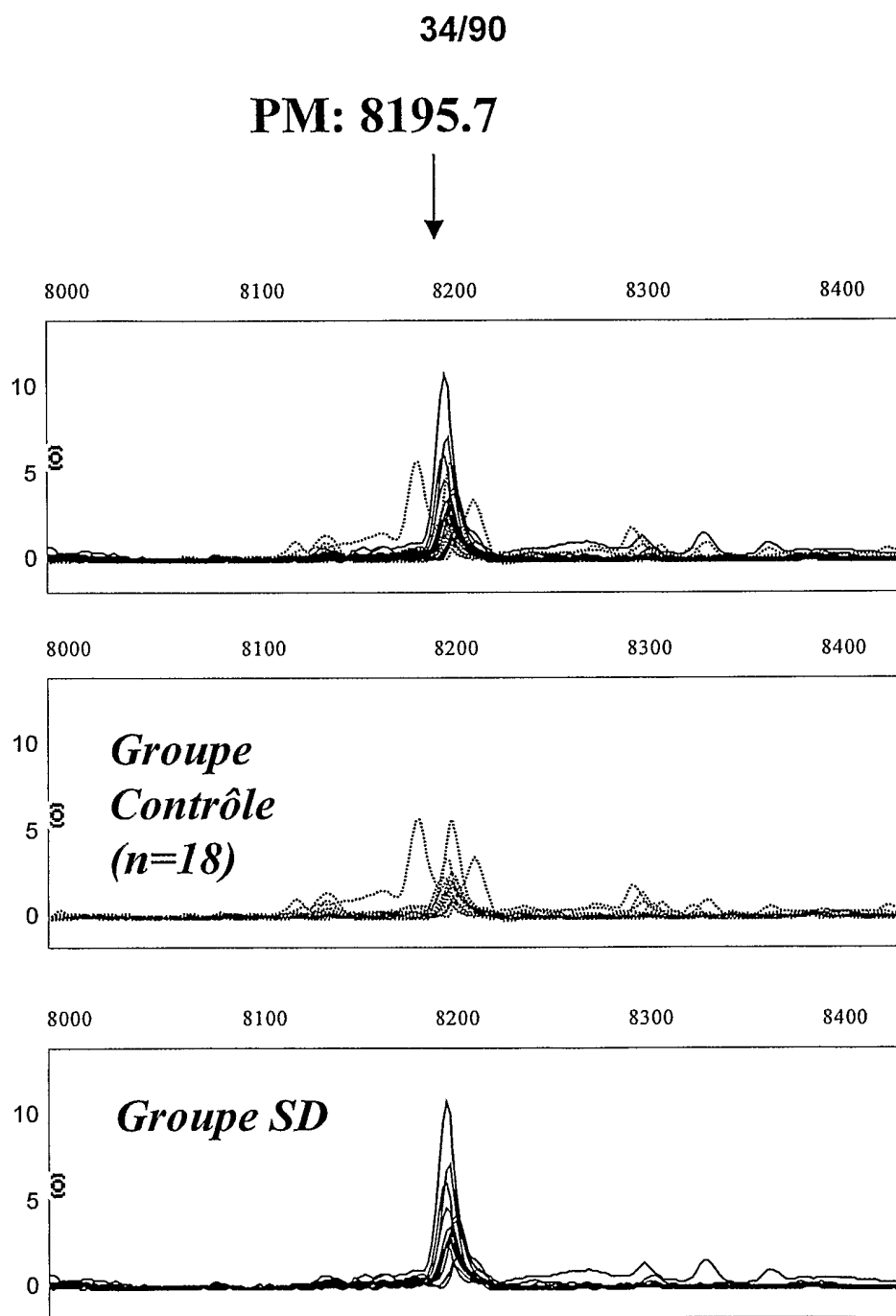


Fig. 39

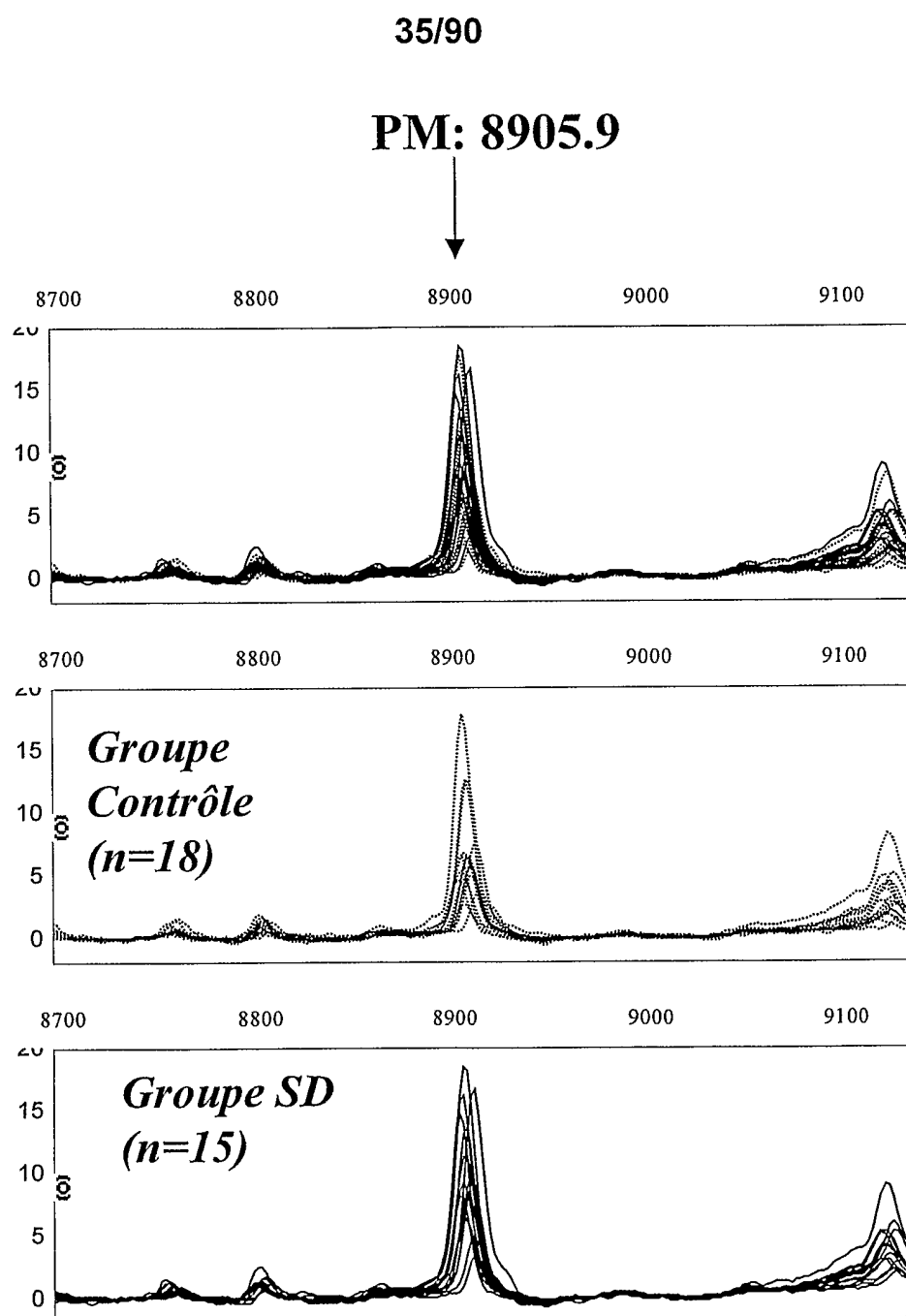


Fig. 40

36/90

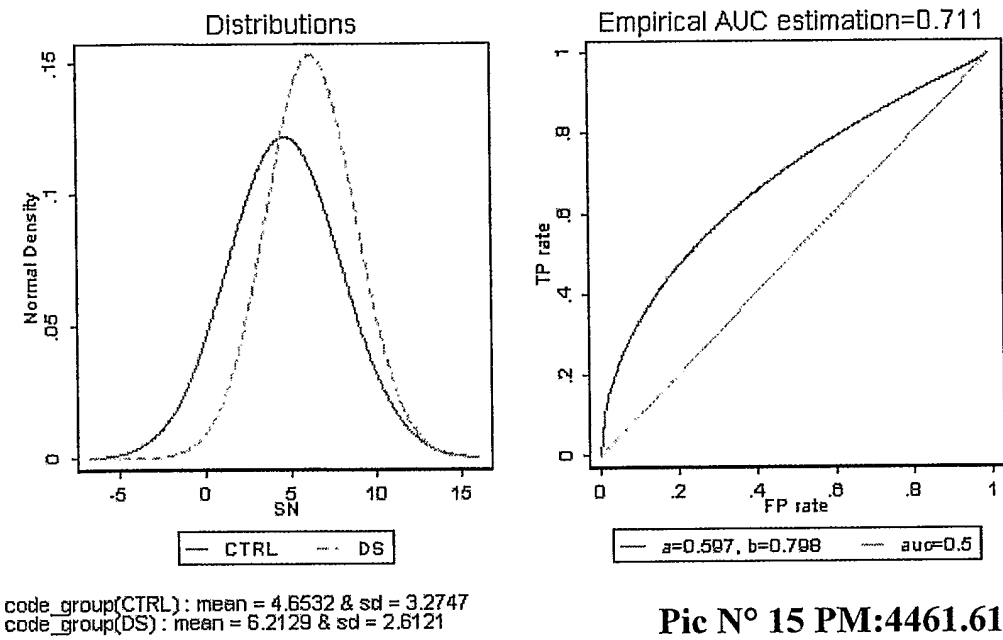


Fig. 41 A

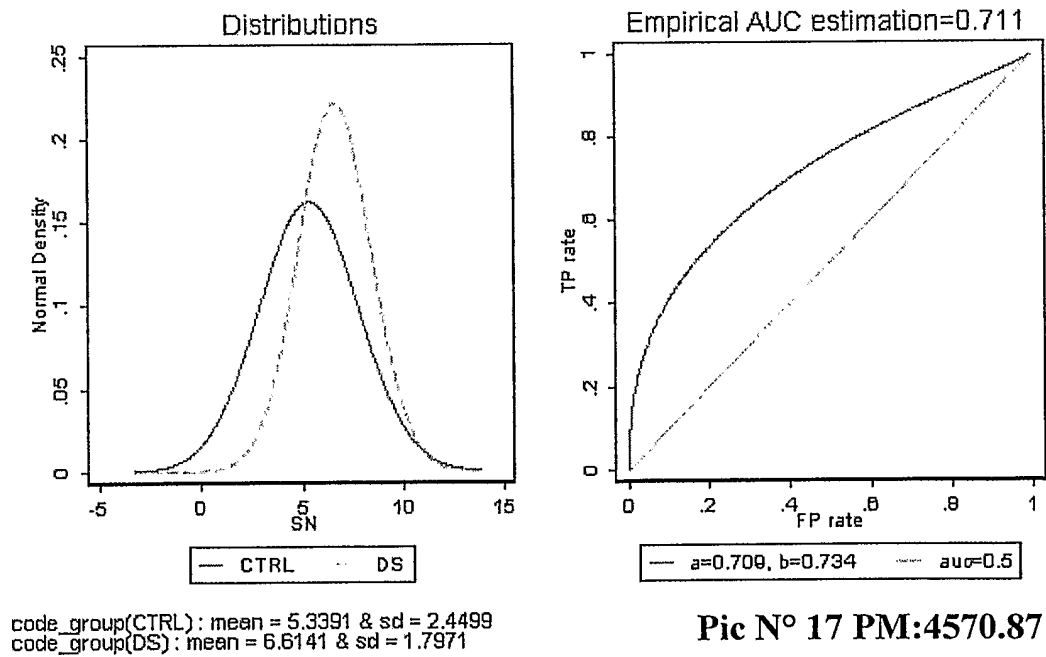


Fig. 41 B

37/90

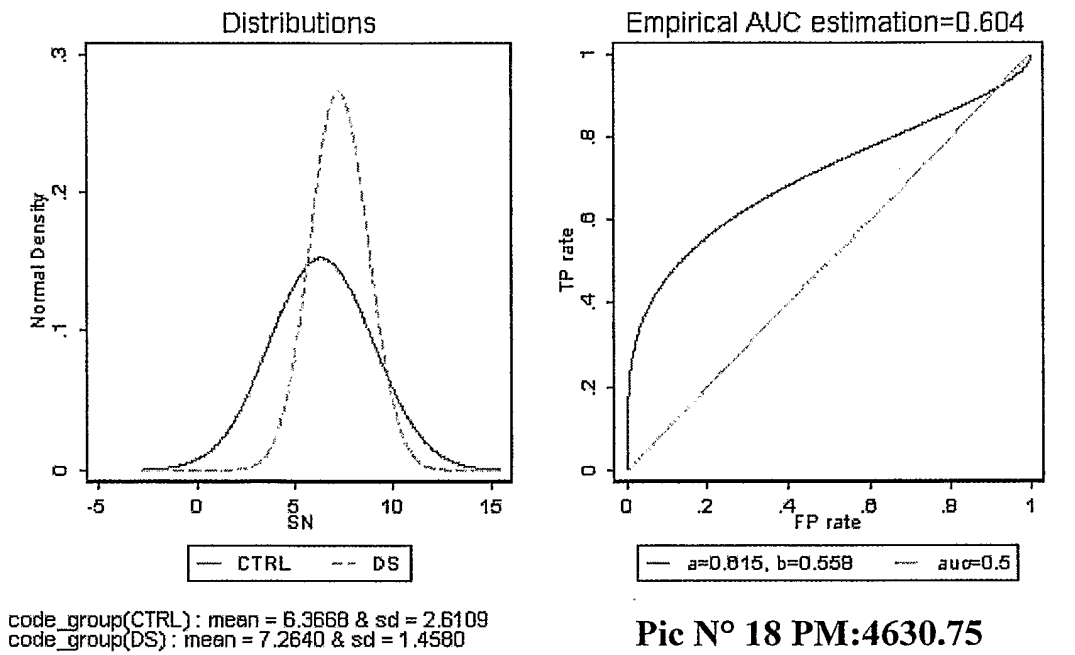


Fig. 41 C

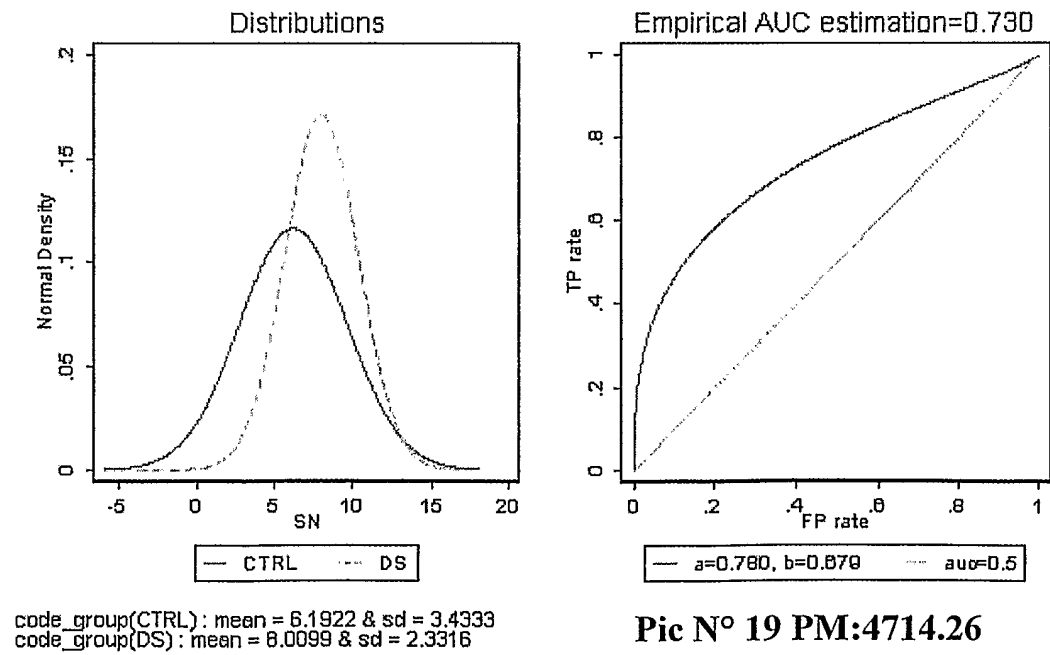
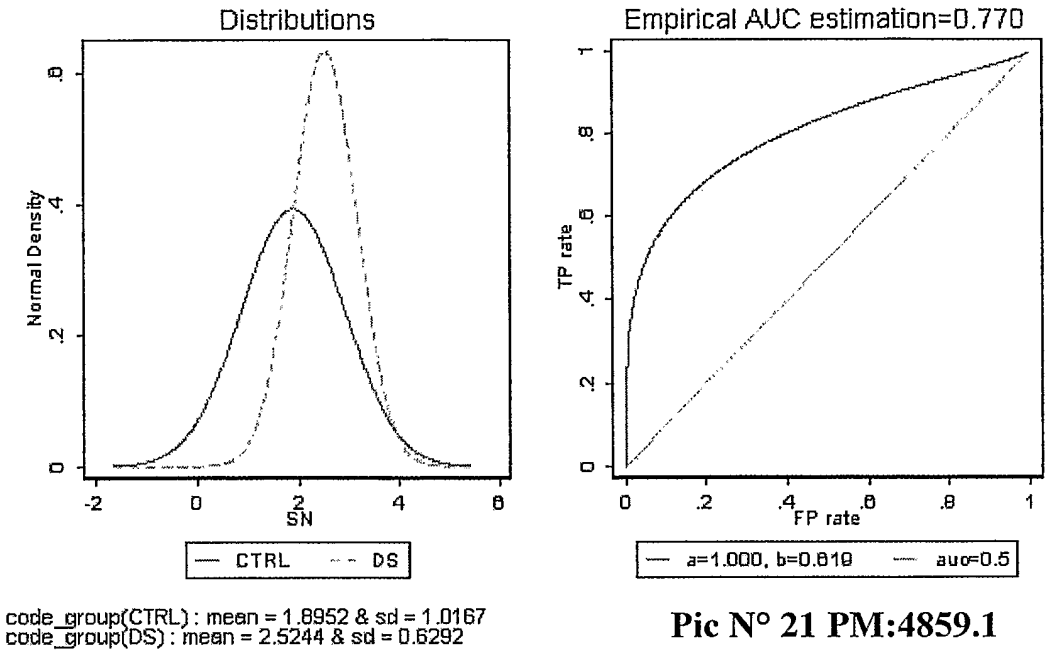


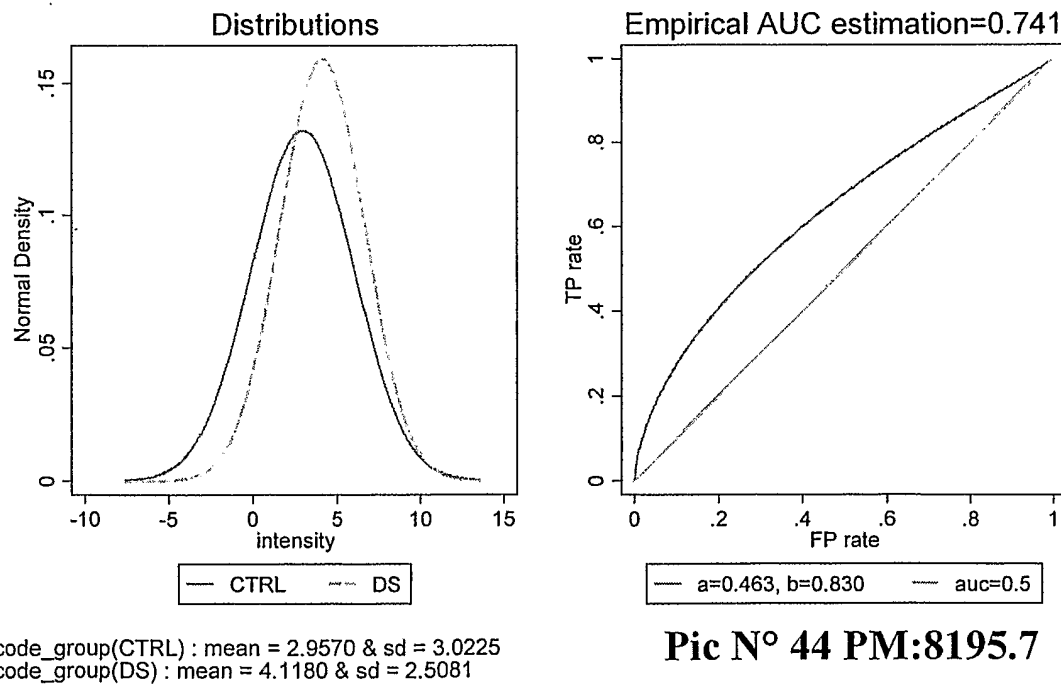
Fig. 41 D

38/90



Pic N° 21 PM:4859.1

Fig. 41 E



Pic N° 44 PM:8195.7

Fig. 41 F

39/90

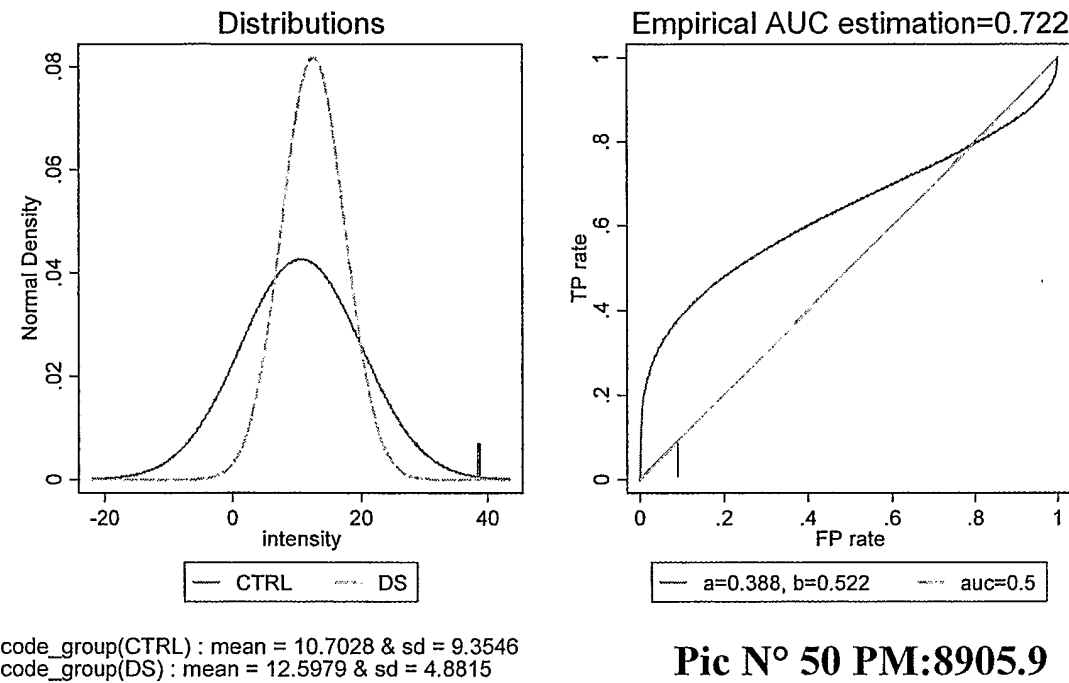


Fig. 41 G

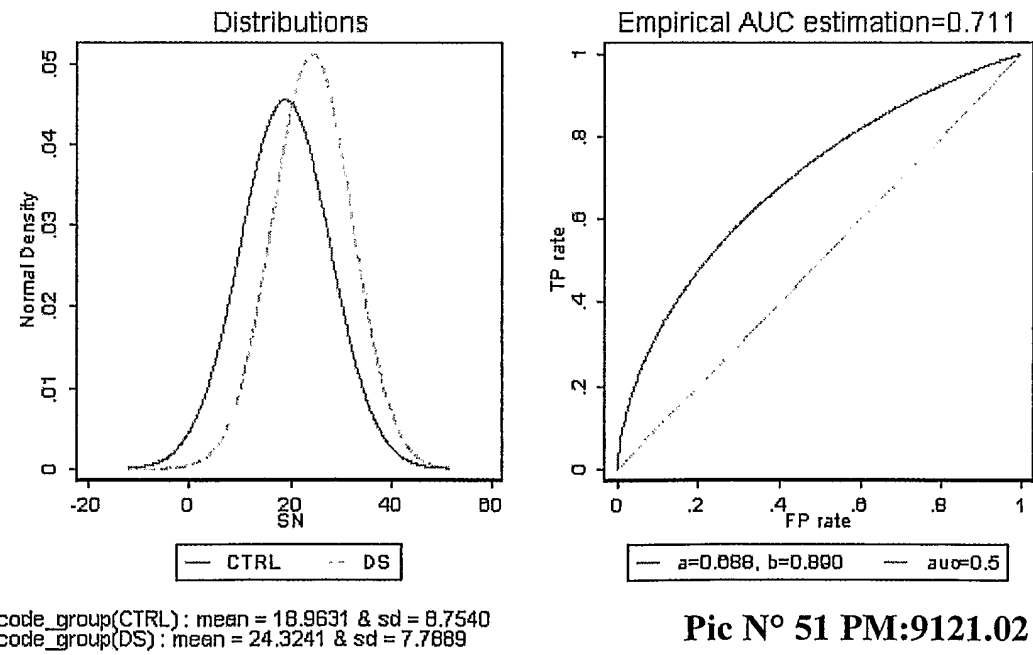


Fig. 41 H

40/90

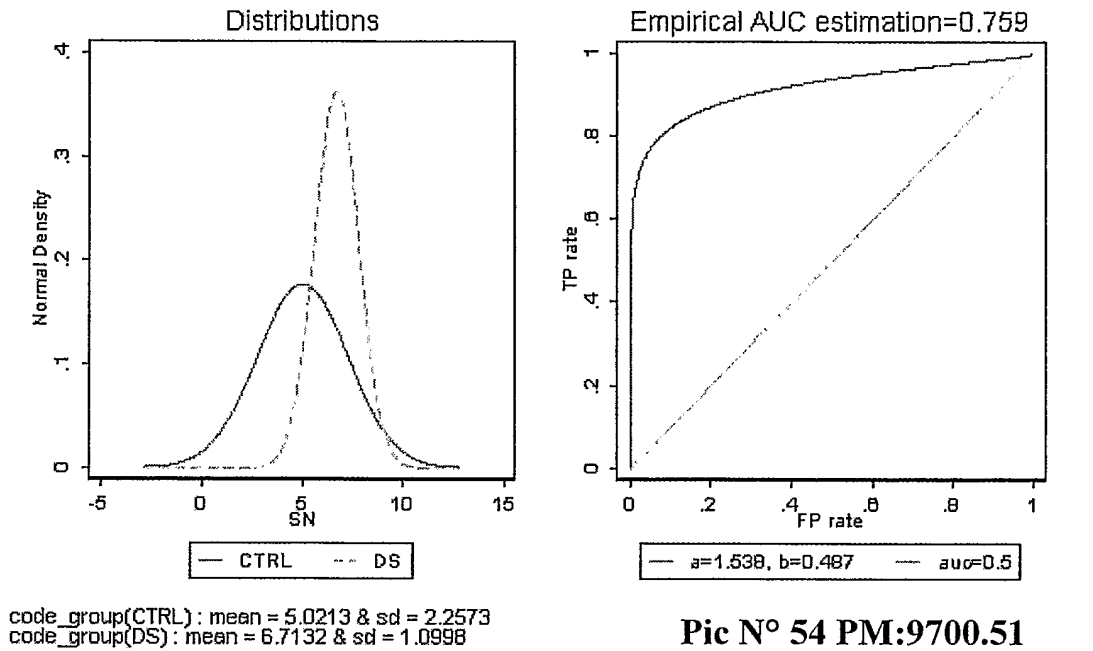


Fig. 41 I

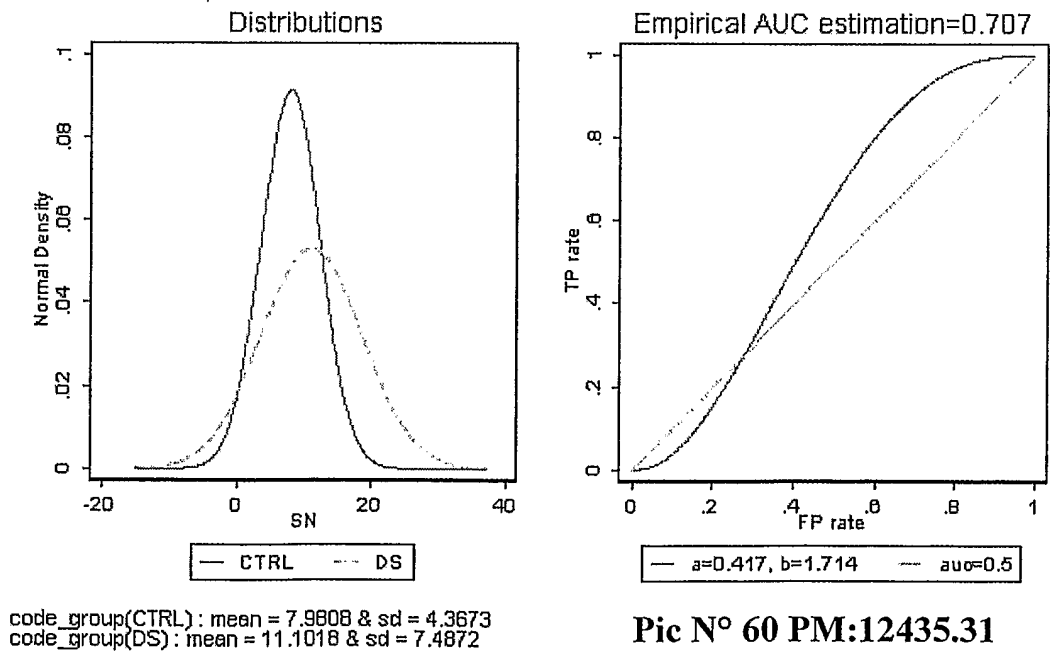
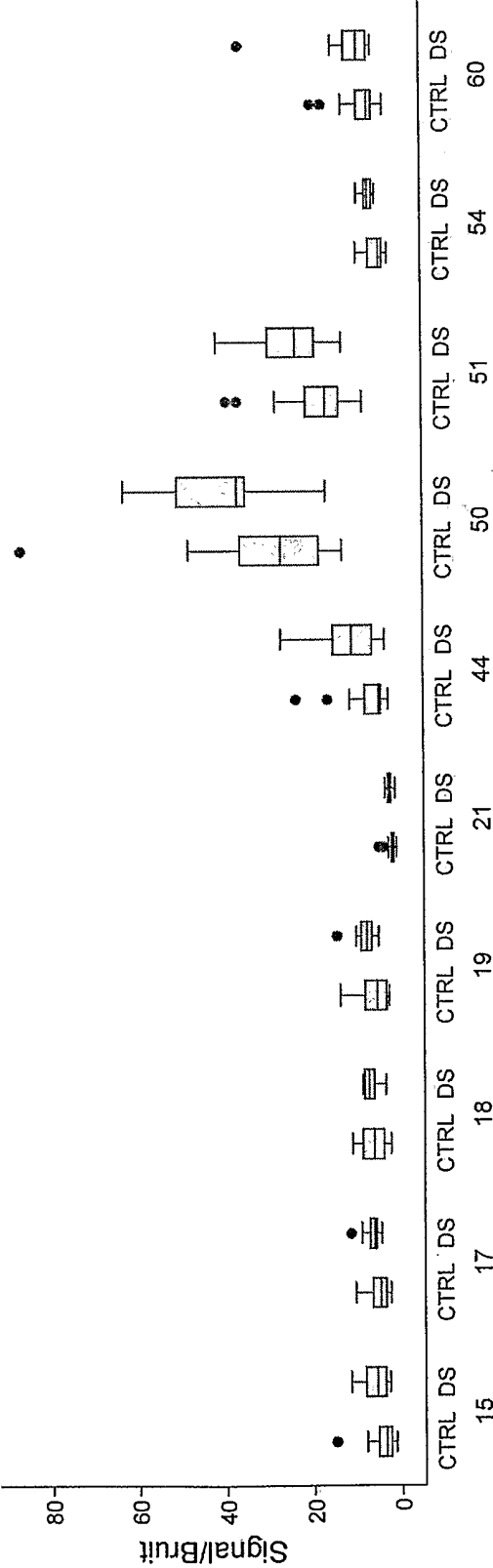


Fig. 41 J

Box plot Signal/Bruit des pics par Groupe
Dataset NS502



41/90

Fig. 42

42/90

PM: 4068.2 4075 4082.9 4092.1

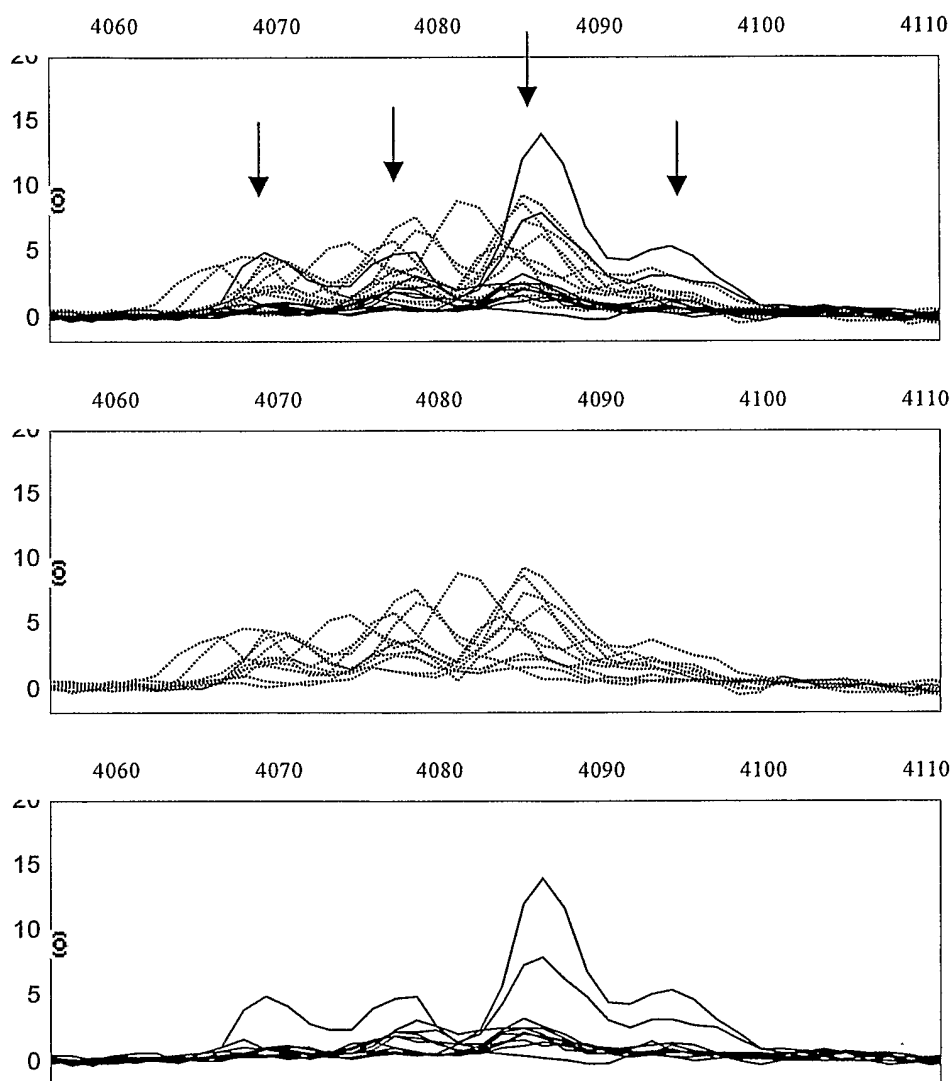


Fig. 43

PM:6418.6

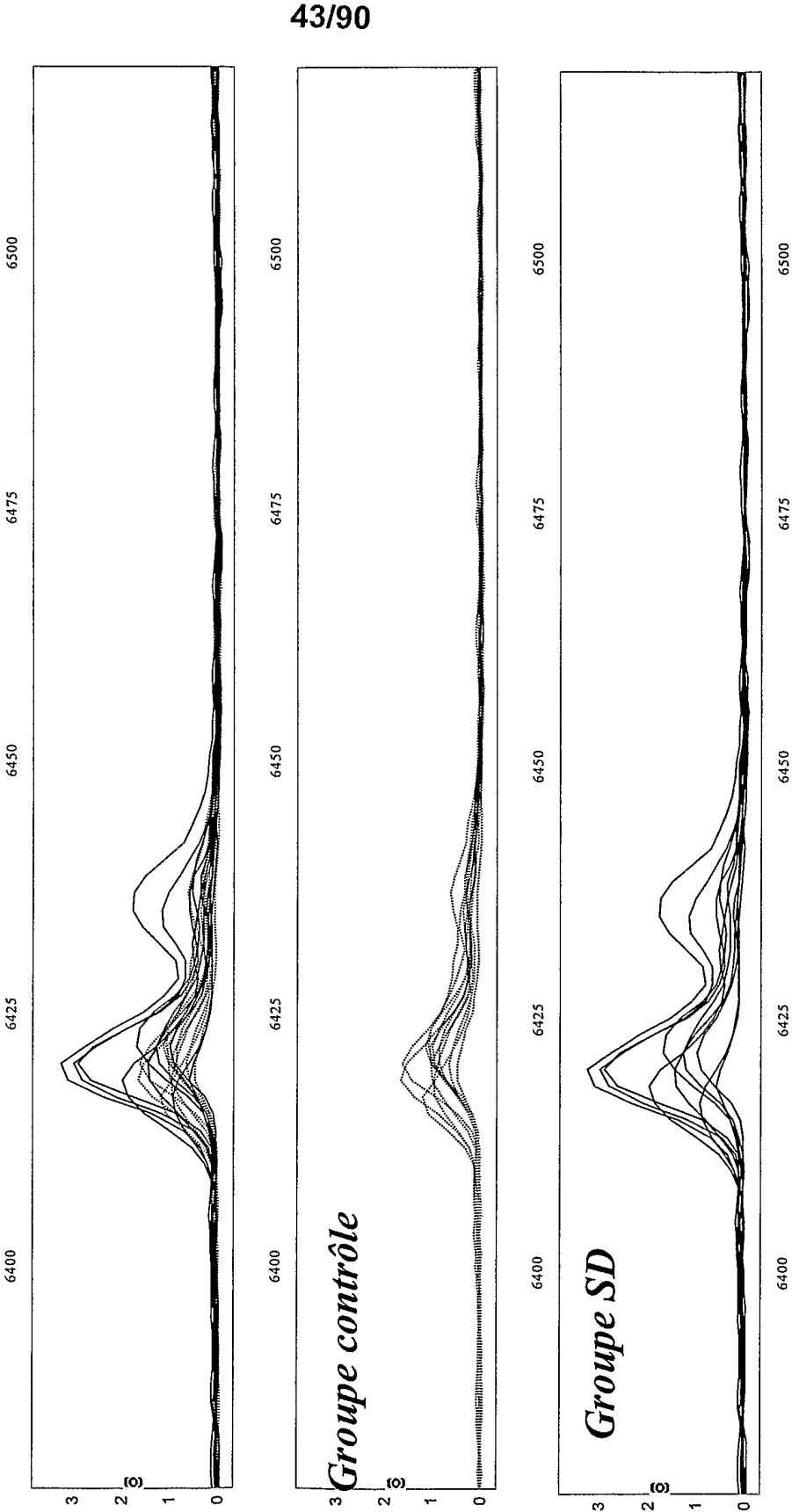


Fig. 44

44/90

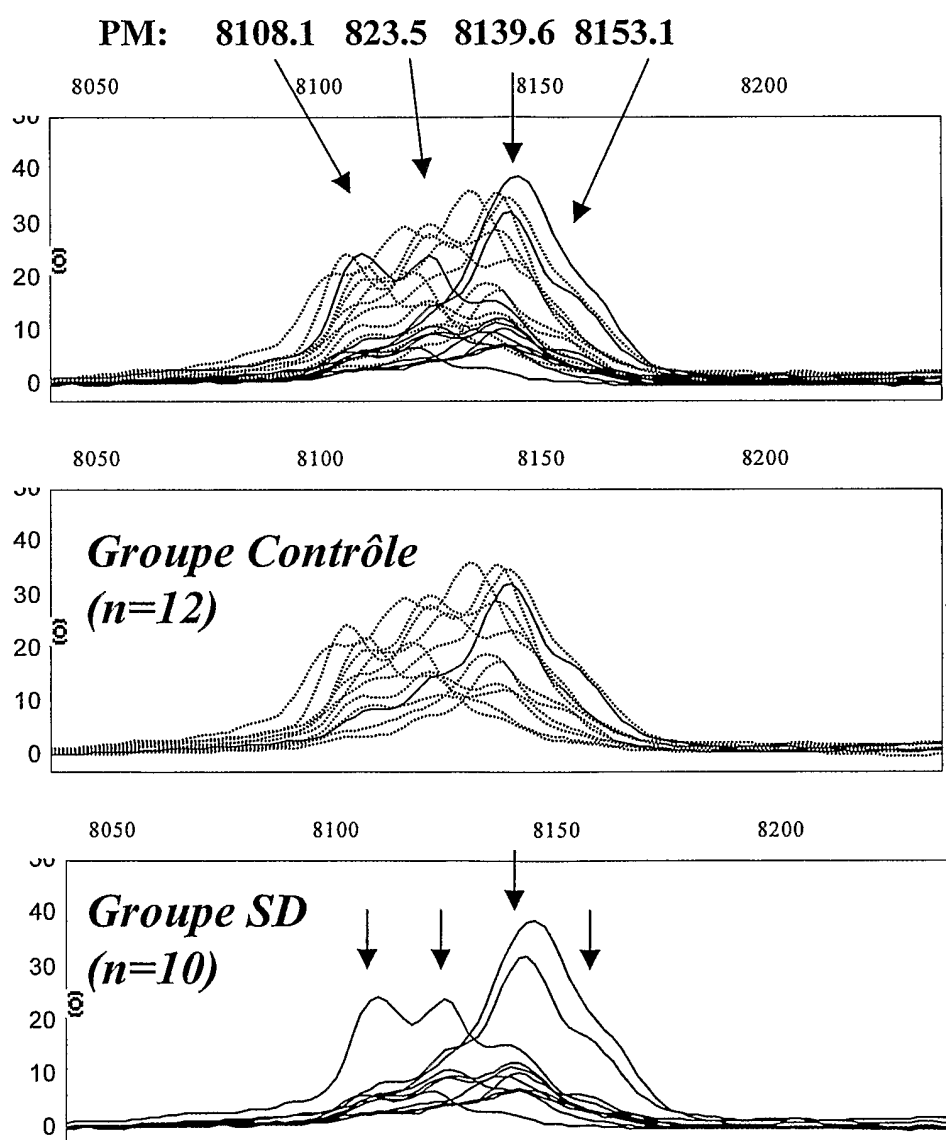


Fig. 45

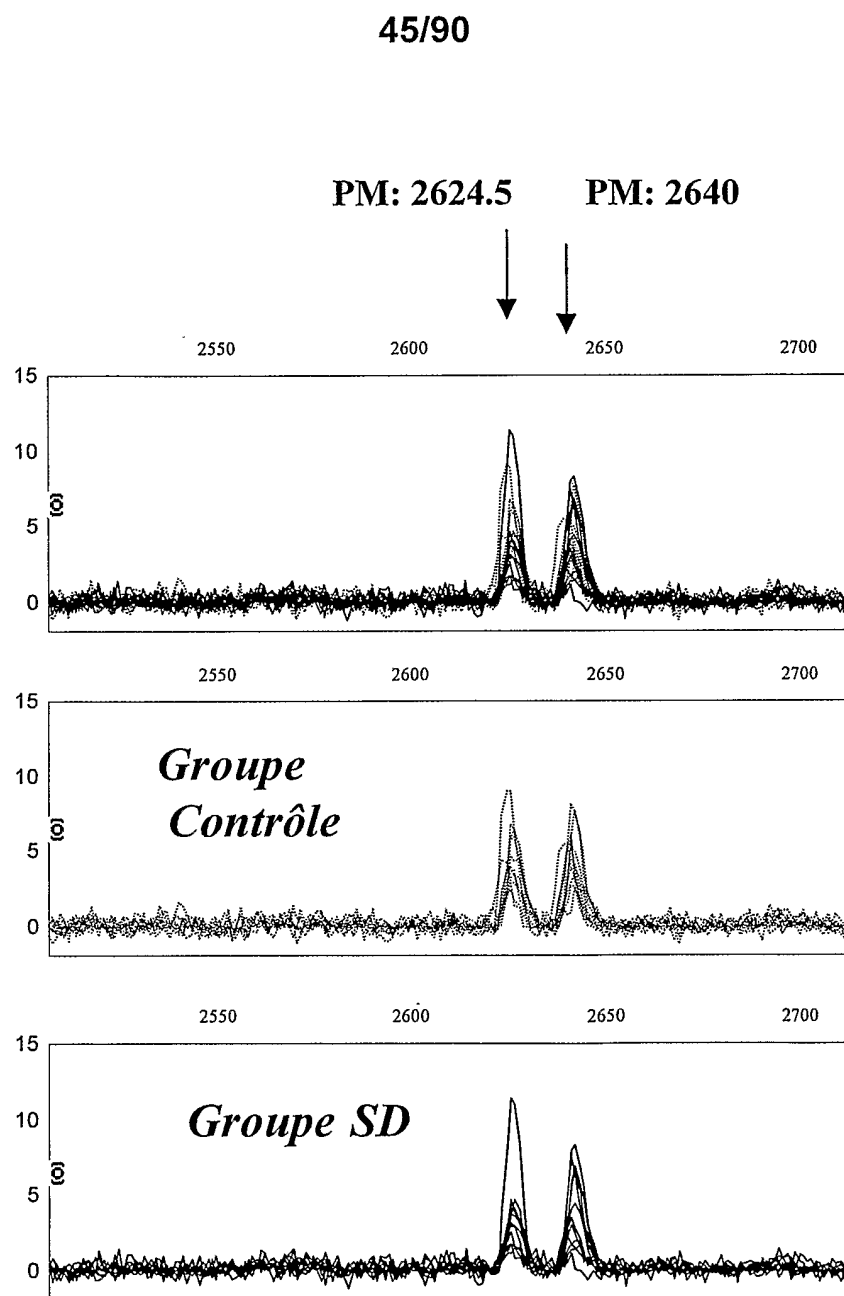


Fig. 46

46/90

PM: 4319.80

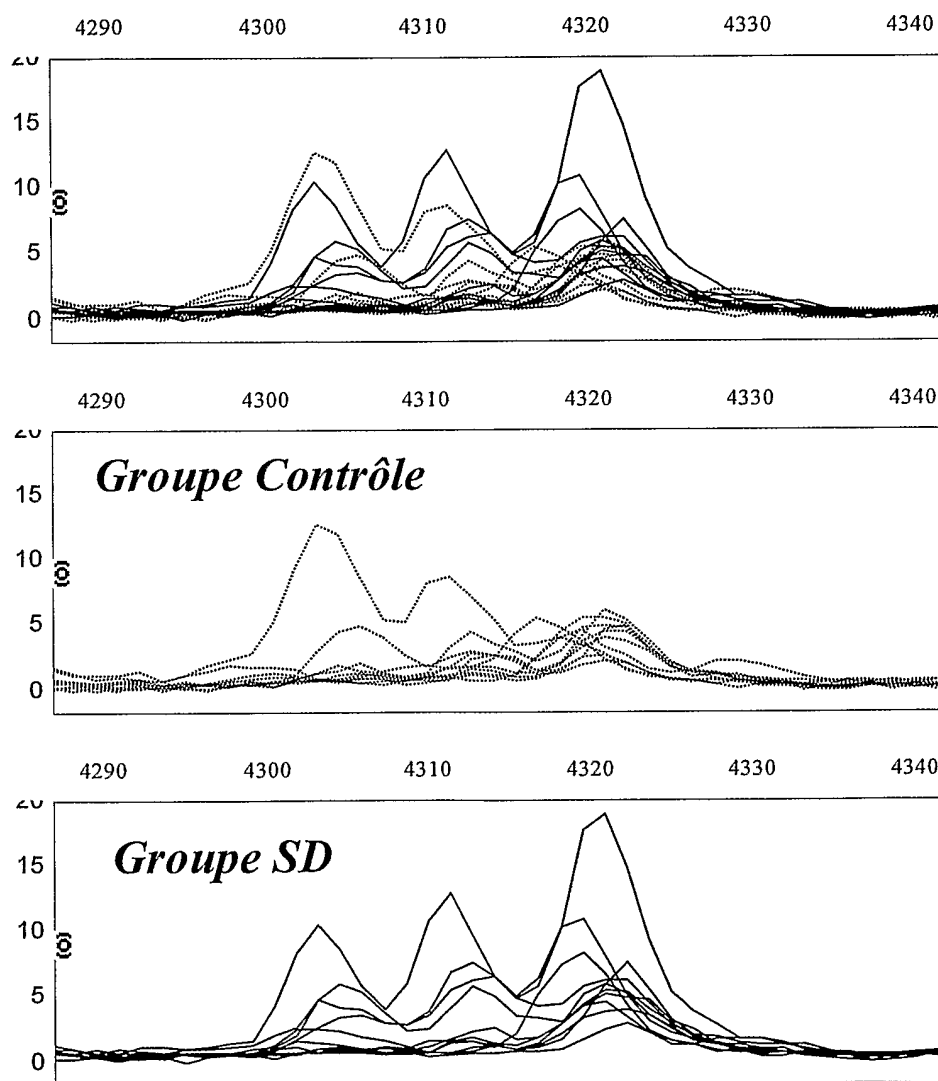


Fig. 47

47/90

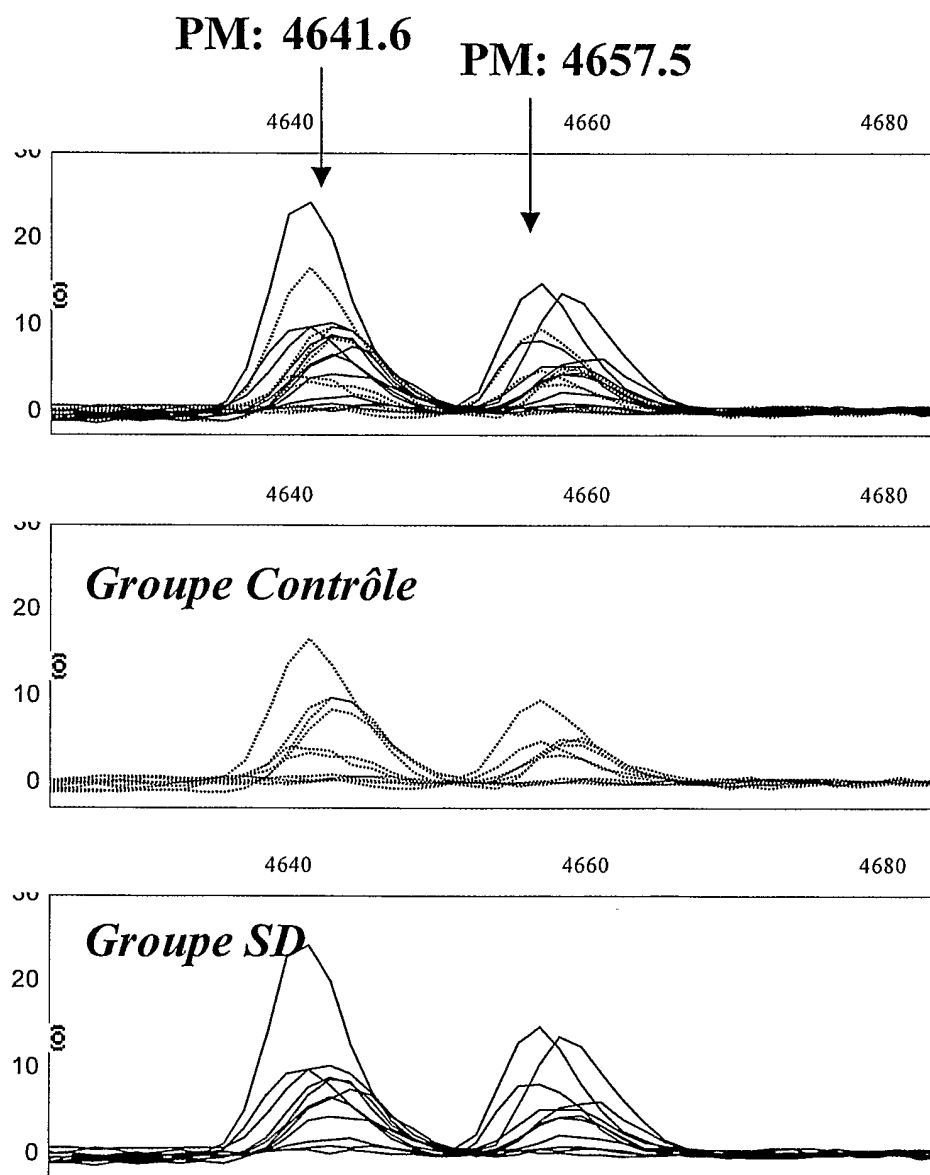
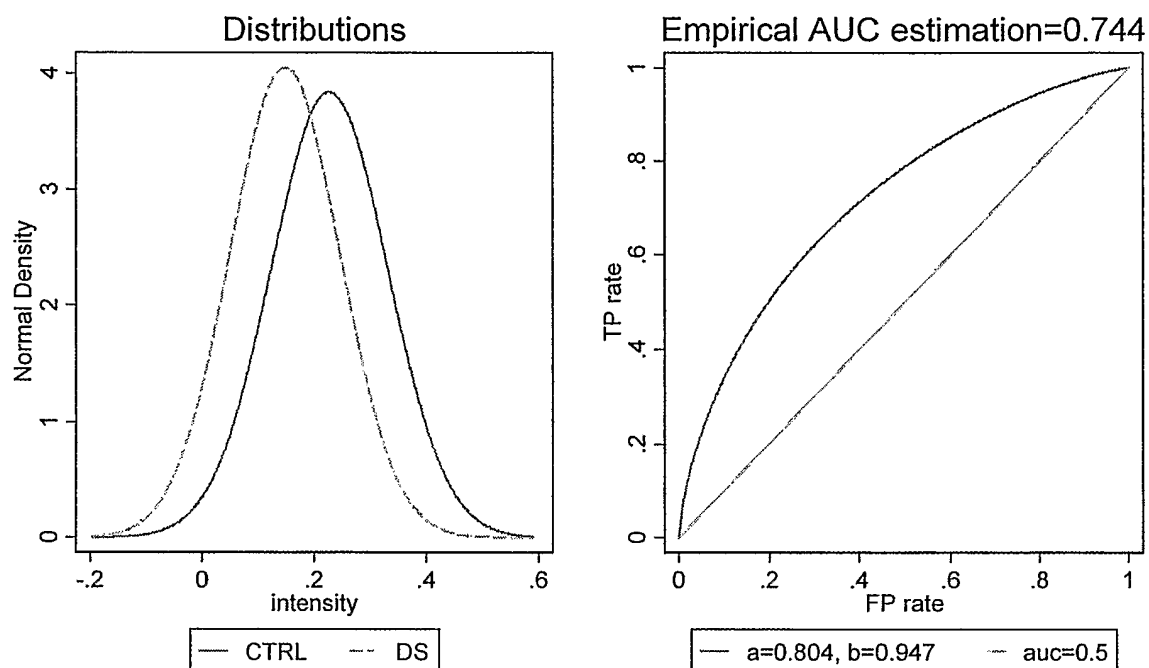


Fig. 48

48/90

Binormal Roc Curve

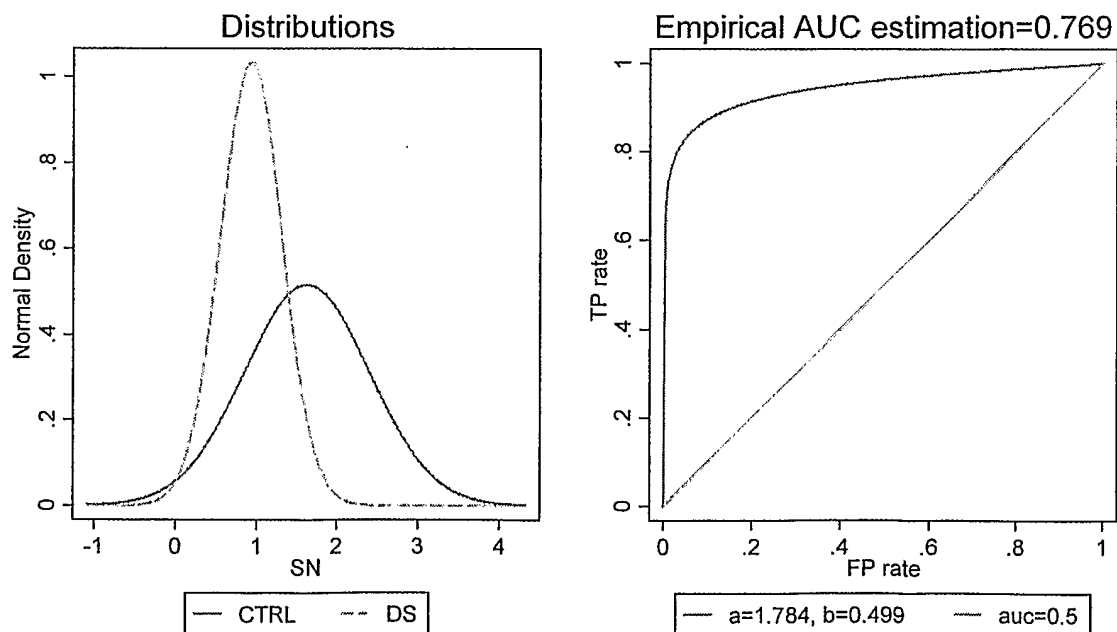
Pic N° 8 PM : 4067.1



code_group(CTRL) : mean = 0.2270 & sd = 0.1040
 code_group(DS) : mean = 0.1478 & sd = 0.0985

Binormal Roc Curve

Pic N° 8 PM : 4067.1

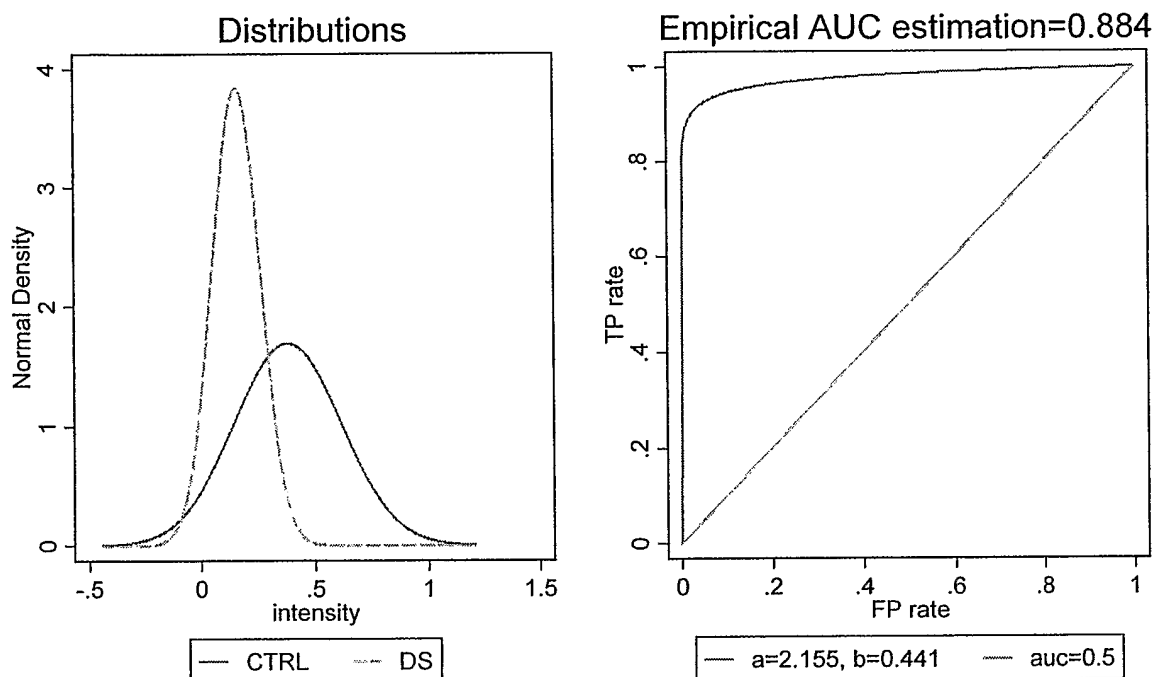


code_group(CTRL) : mean = 1.6268 & sd = 0.7737
 code_group(DS) : mean = 0.9376 & sd = 0.3864

Fig. 49A

49/90 Binormal Roc Curve

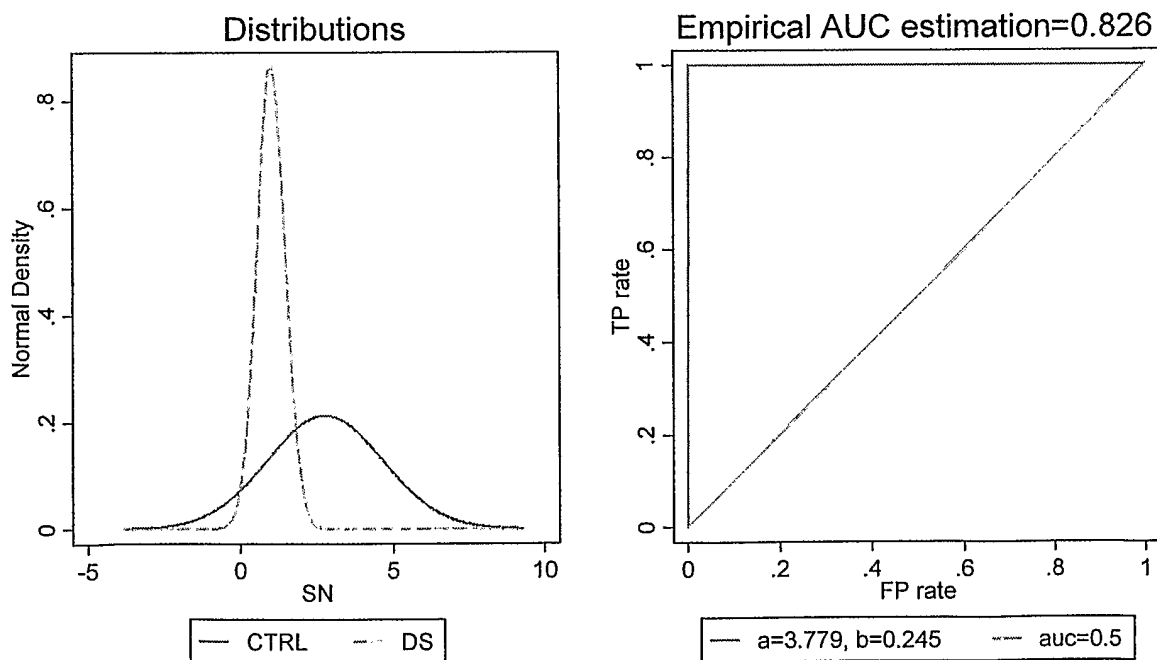
Pic N° 9 PM : 4074.9



code_group(CTRL) : mean = 0.3805 & sd = 0.2357
 code_group(DS) : mean = 0.1564 & sd = 0.1040

Binormal Roc Curve

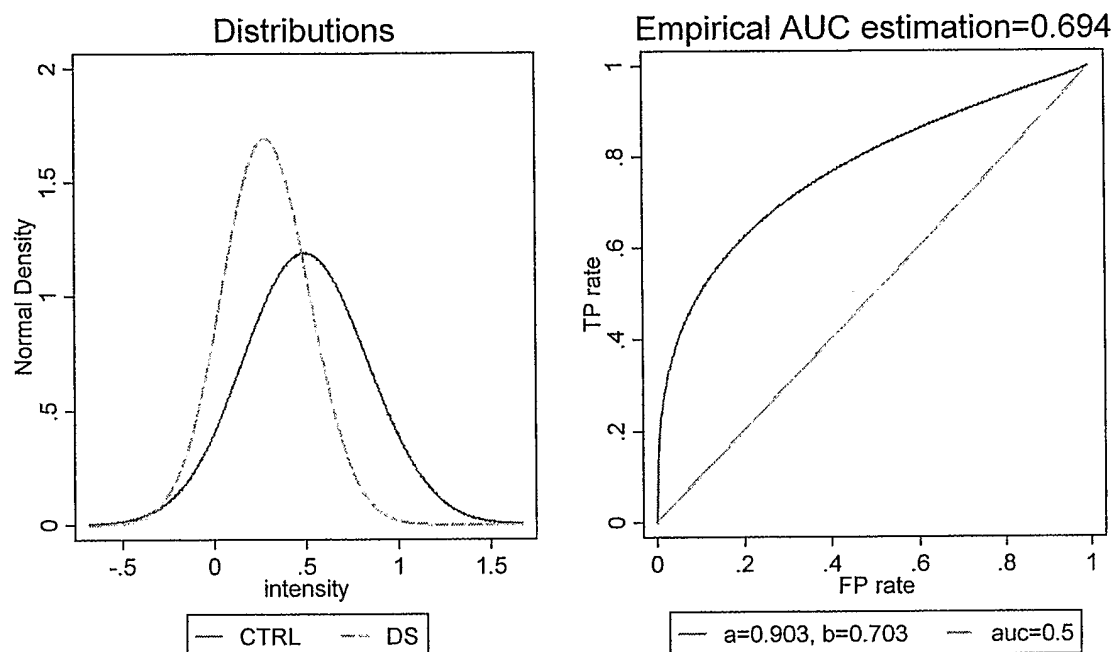
Pic N° 9 PM : 4074.9



code_group(CTRL) : mean = 2.7673 & sd = 1.8832
 code_group(DS) : mean = 1.0212 & sd = 0.4621

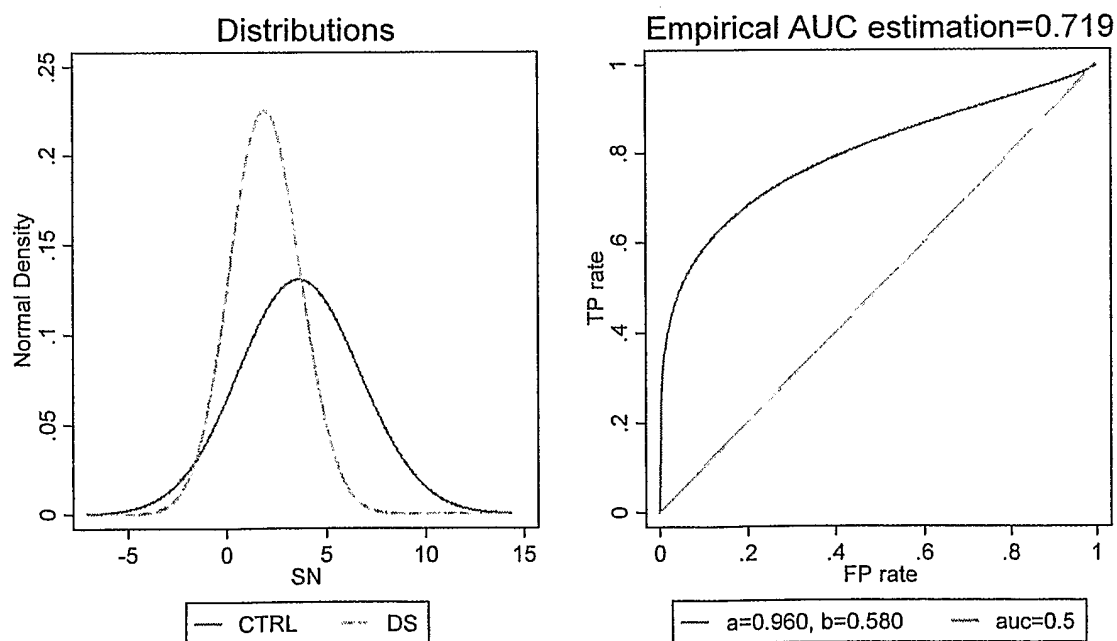
Fig. 49B

50/90
Binormal Roc Curve
Pic N° 11 PM : 4083.7



code_group(CTRL) : mean = 0.4956 & sd = 0.3359
code_group(DS) : mean = 0.2823 & sd = 0.2362

Binormal Roc Curve
Pic N° 11 PM : 4083.7



code_group(CTRL) : mean = 3.6386 & sd = 3.0513
code_group(DS) : mean = 1.9382 & sd = 1.7706

Fig. 49C

51/90

Pic N° 29 PM : 6418.6

Binormal Roc Curve

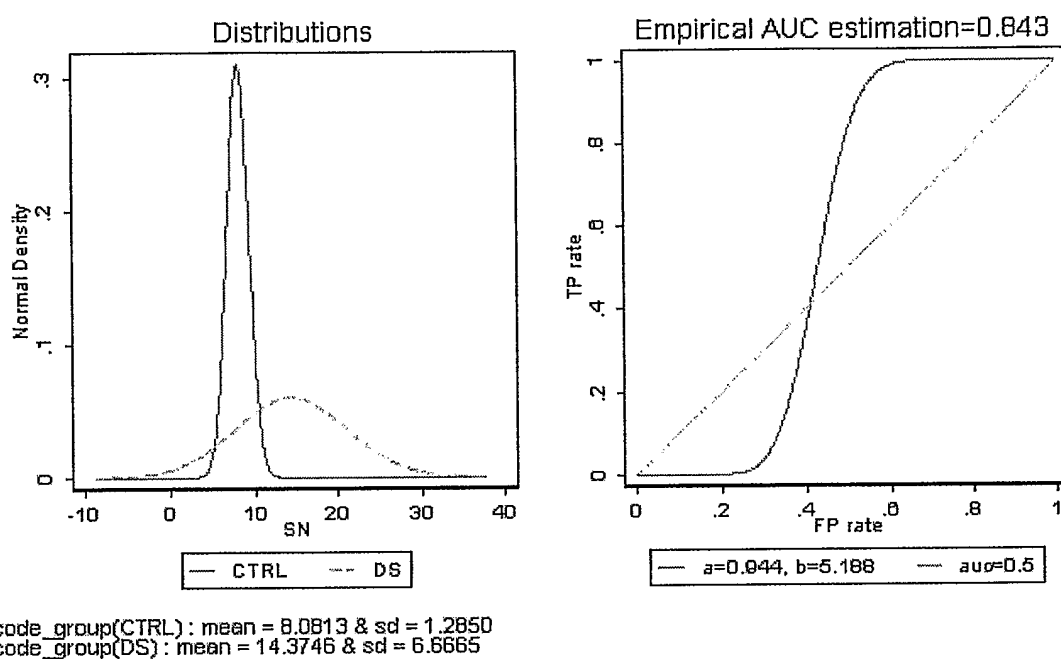
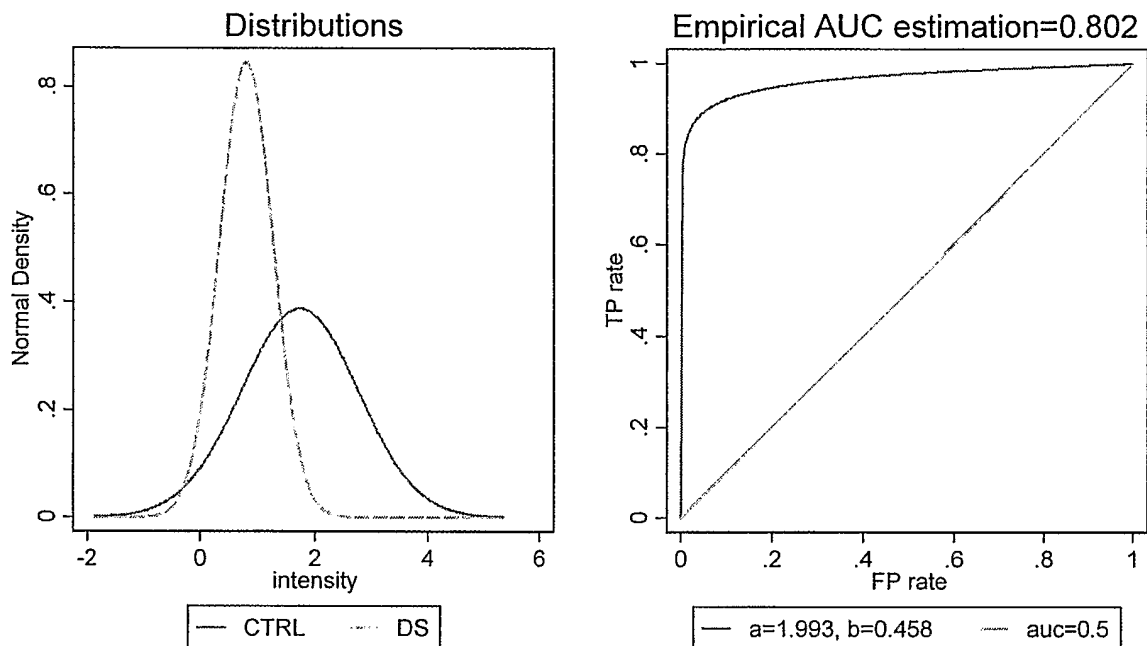


Fig. 49D

52/90
Binormal Roc Curve
Pic N° 36 PM : 8123.7



Binormal Roc Curve
Pic N° 36 PM : 8123.7

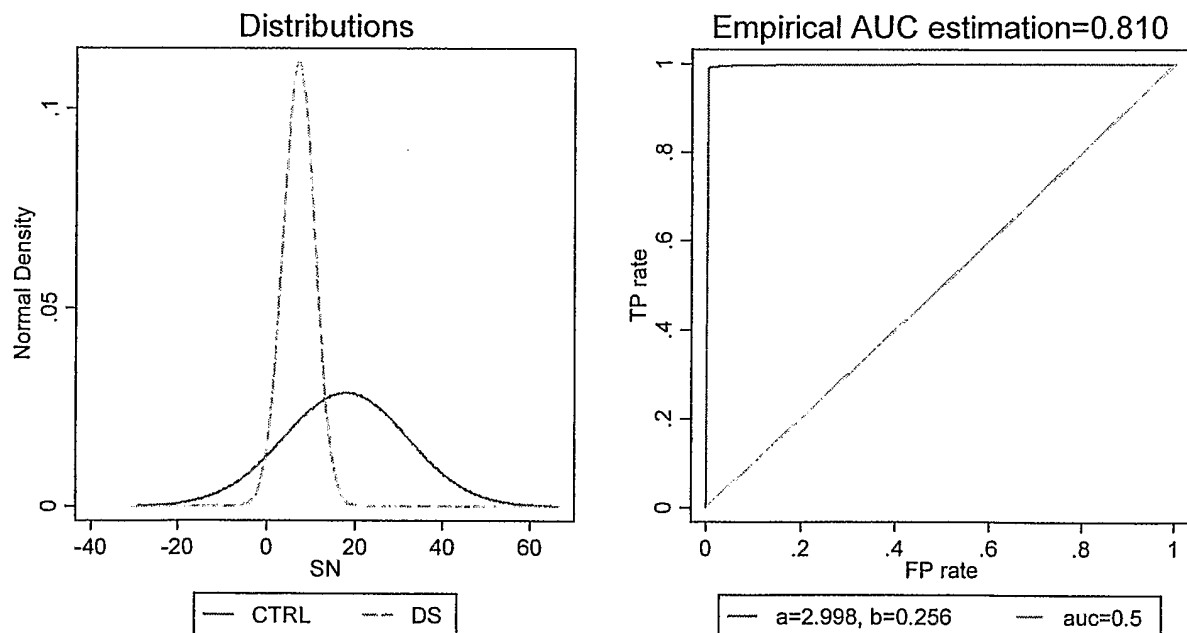
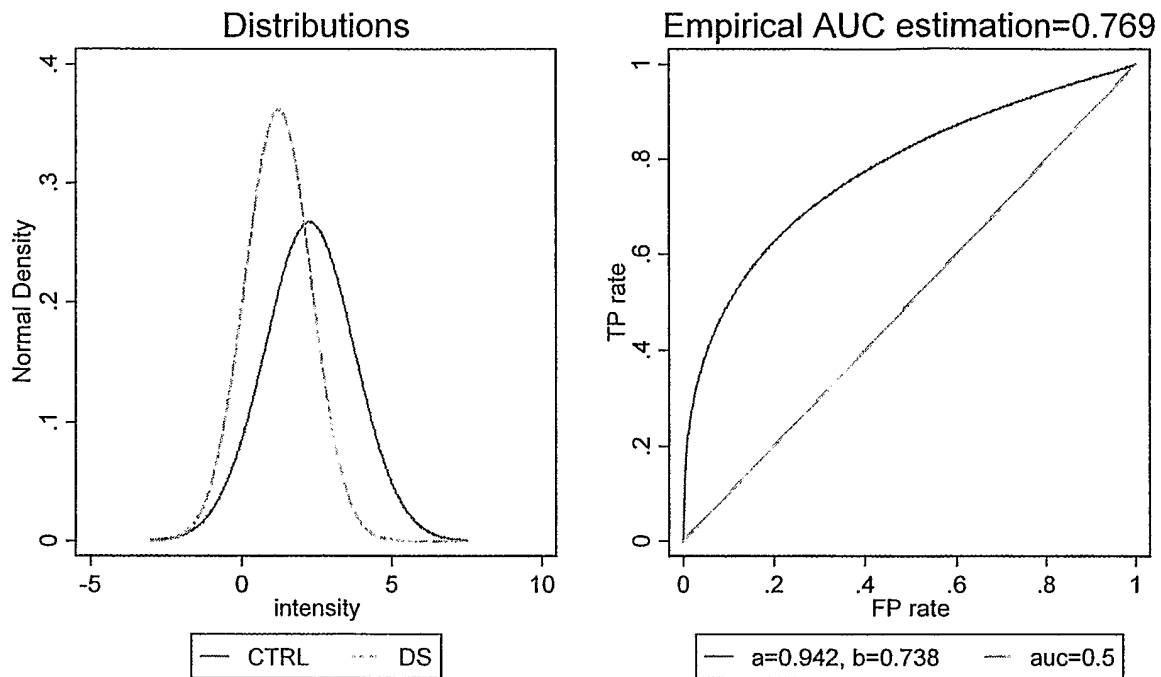


Fig 49E

53/90

Binormal Roc Curve

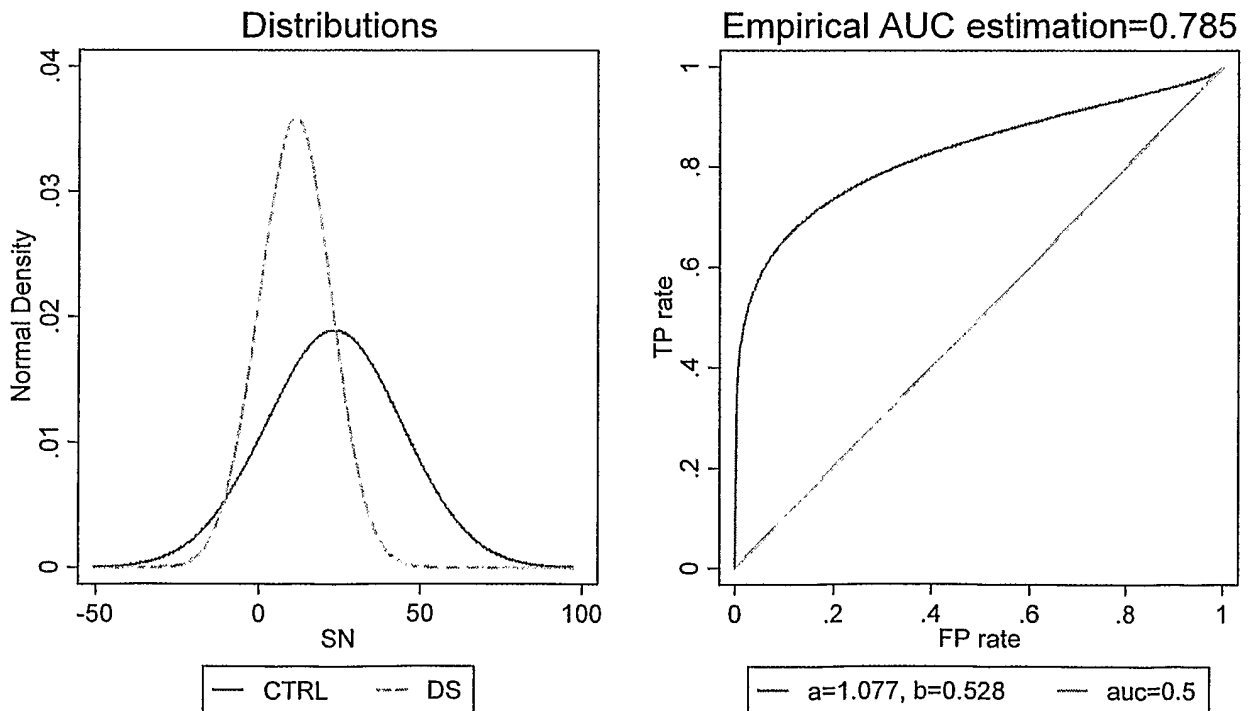
Pic N° 37 PM : 8139.3



code_group(CTRL) : mean = 2.2621 & sd = 1.4954
 code_group(DS) : mean = 1.2228 & sd = 1.1031

Binormal Roc Curve

Pic N° 37 PM : 8139.3



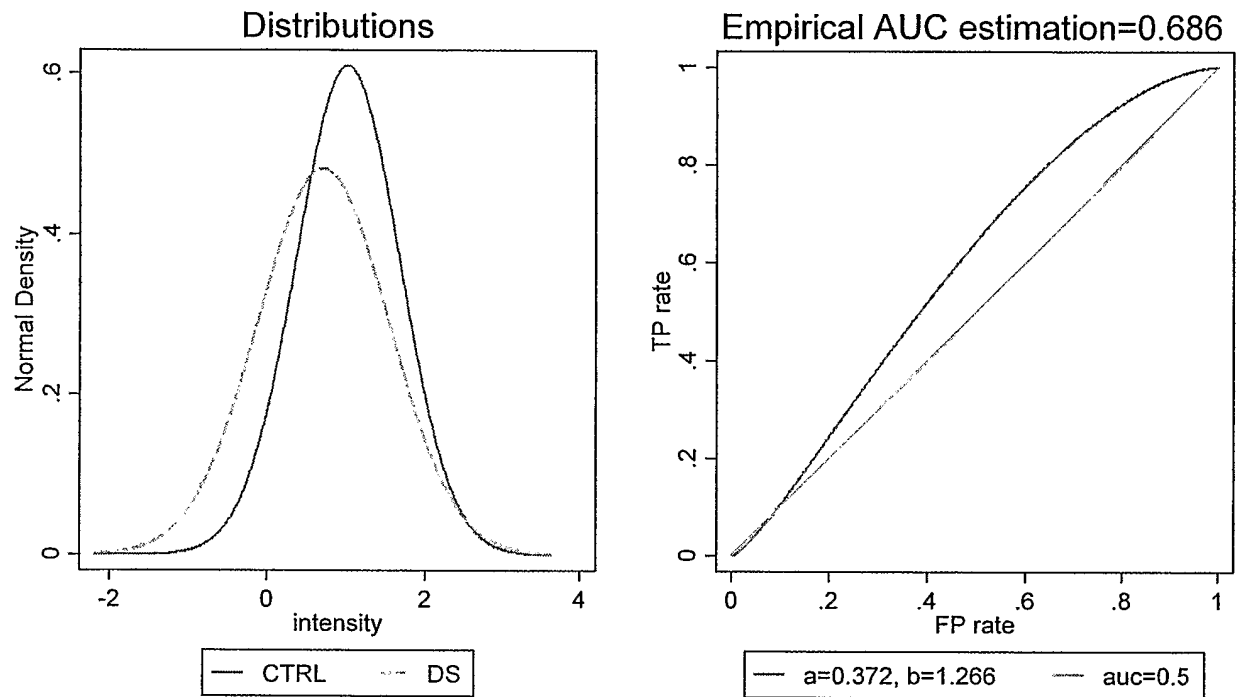
code_group(CTRL) : mean = 23.2680 & sd = 21.0583
 code_group(DS) : mean = 11.2981 & sd = 11.1174

Fig. 49F

Pic N° 38 PM : 8155.6

Binormal Roc Curve

graph__append=06jul2005(H50[SPA]-pH0-BIAuto-las170)_B1N1C2_peak=38



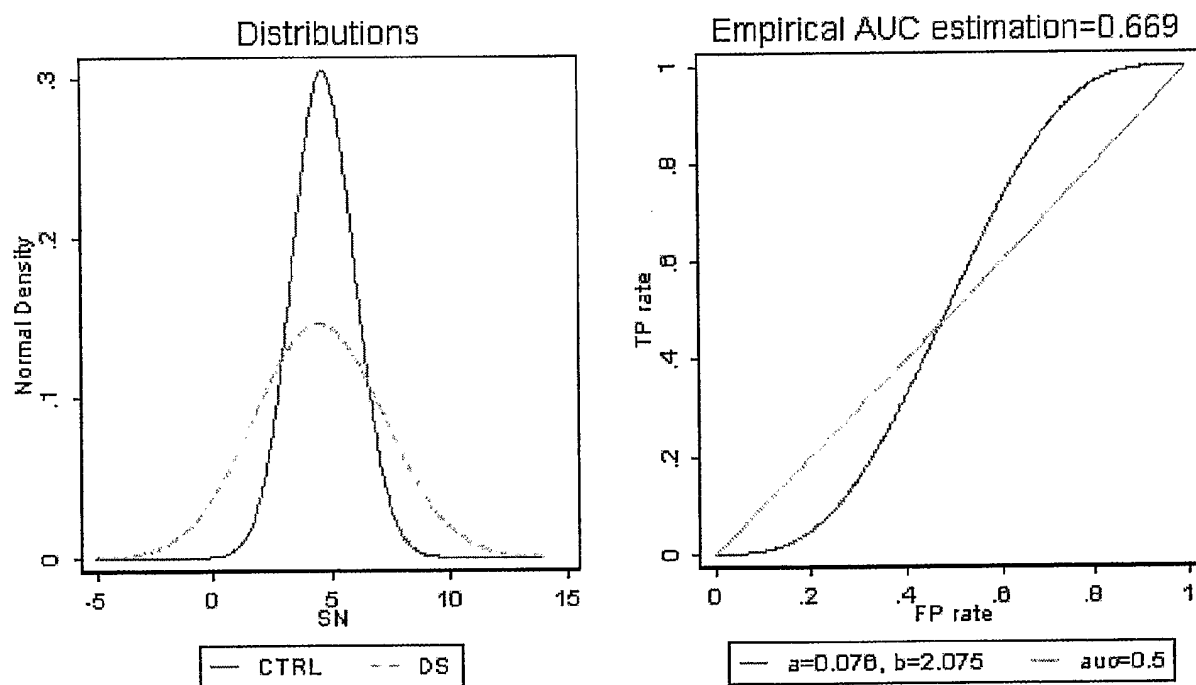
code_group(CTRL) : mean = 1.0241 & sd = 0.6546
code_group(DS) : mean = 0.7154 & sd = 0.8288

Fig. 49G

55/90

Pic N° 1 PM : 2624.46

Binormal Roc Curve



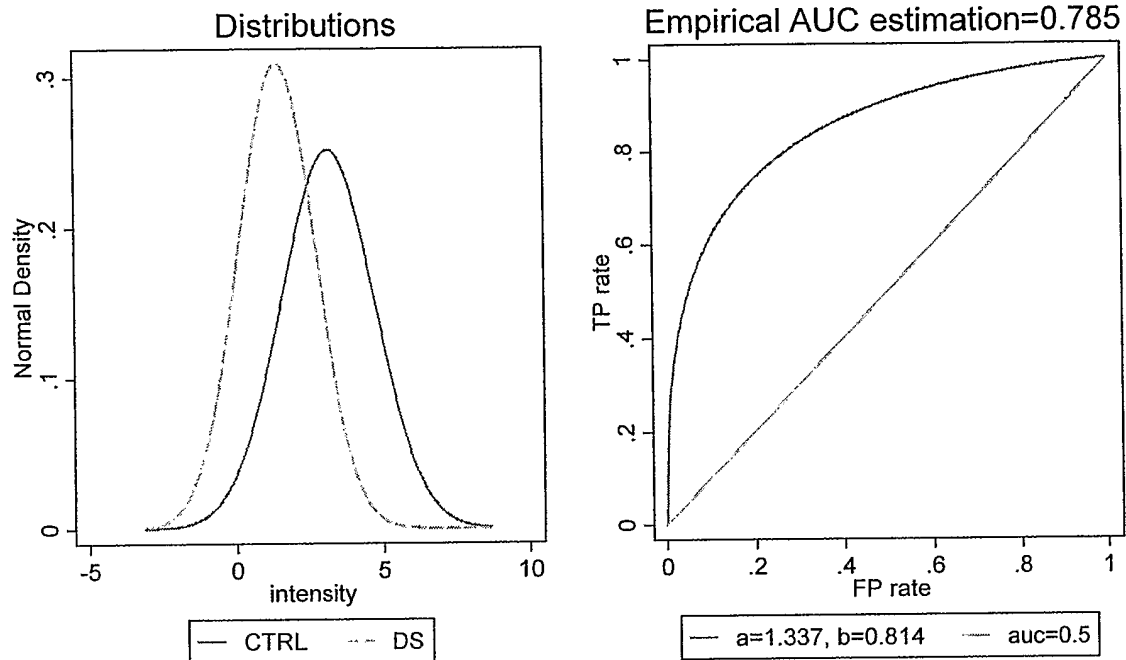
code_group(CTRL) : mean = 4.6766 & sd = 1.3104
code_group(DS) : mean = 4.4699 & sd = 2.7192

Fig. 50A

56/90

Binormal Roc Curve

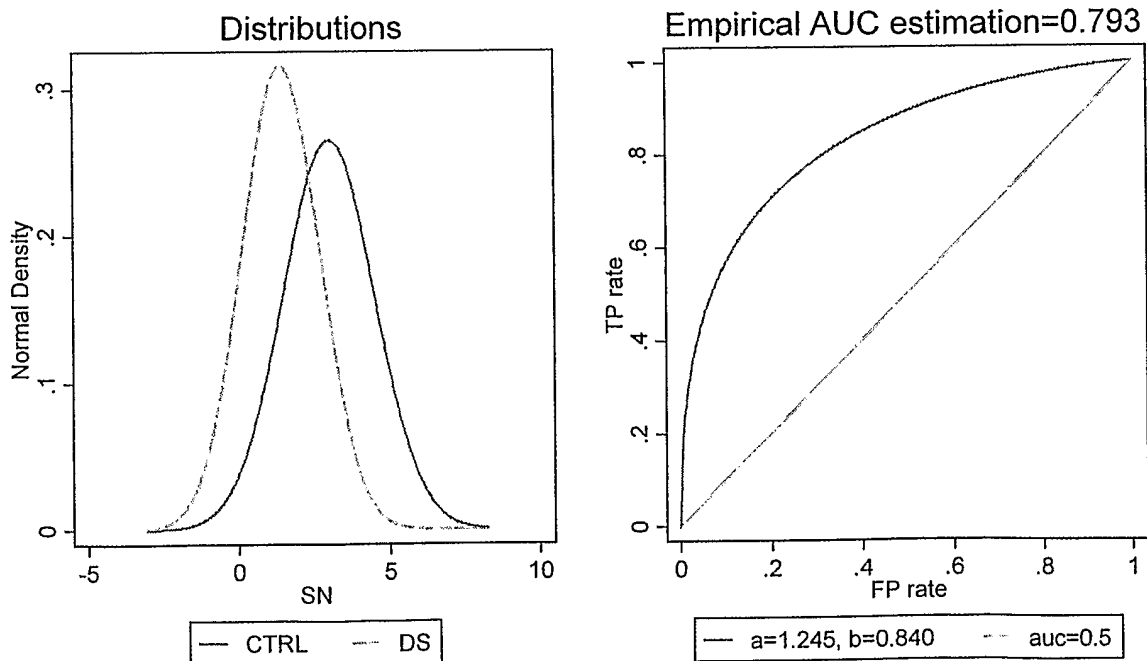
Pic N° 20 PM : 4068.2



code_group(CTRL) : mean = 3.1357 & sd = 1.5842
 code_group(DS) : mean = 1.4124 & sd = 1.2891

Binormal Roc Curve

Pic N° 20 PM : 4068.2



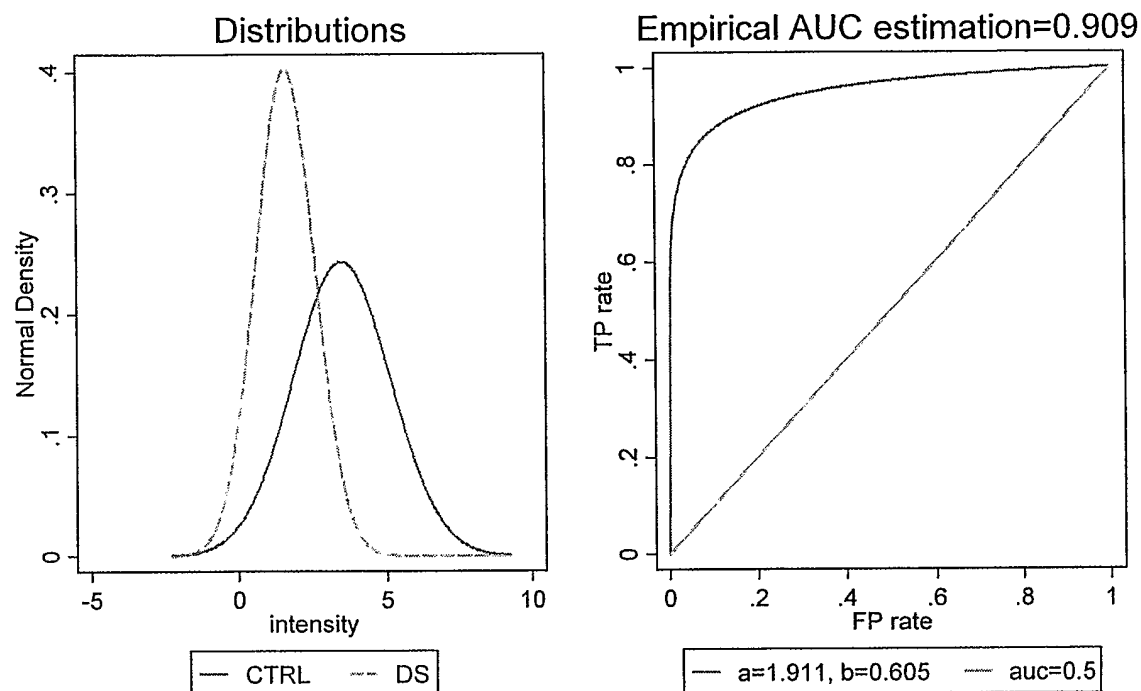
code_group(CTRL) : mean = 2.9895 & sd = 1.5063
 code_group(DS) : mean = 1.4153 & sd = 1.2649

Fig. 50B

57/90

Binormal Roc Curve

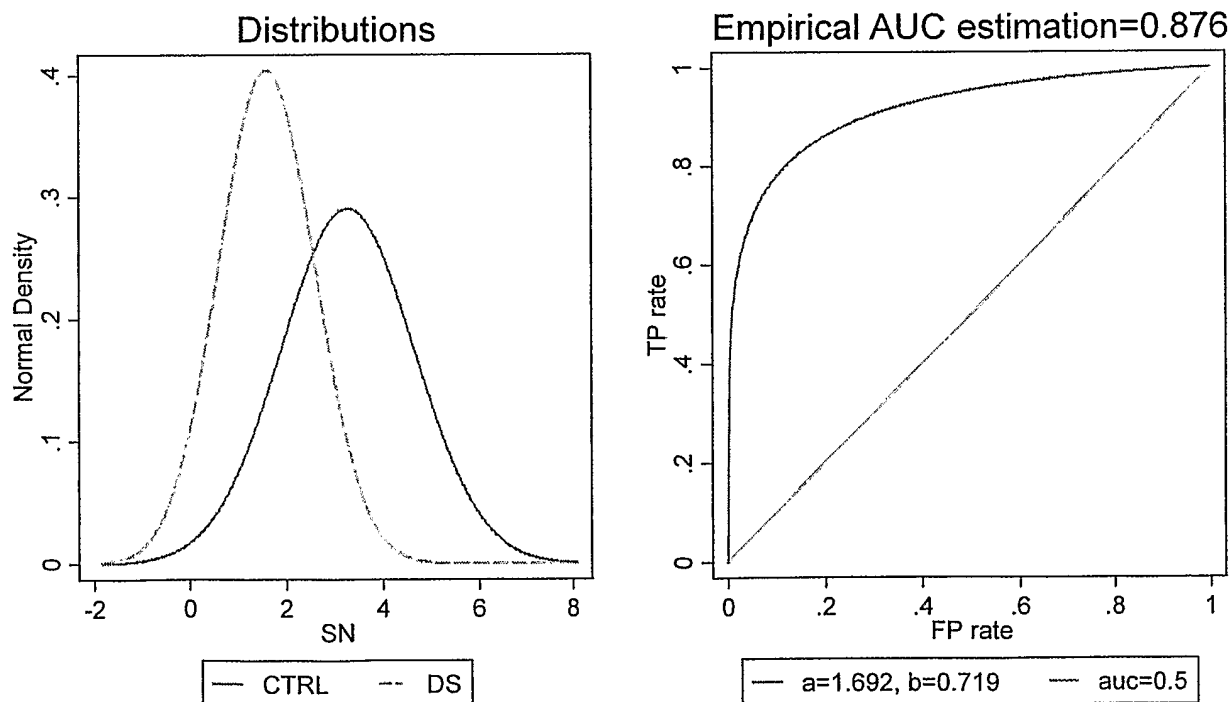
Pic N° 21 PM : 4075.0



code_group(CTRL) : mean = 3.4892 & sd = 1.6392
 code_group(DS) : mean = 1.5955 & sd = 0.9912

Binormal Roc Curve

Pic N° 21 PM : 4075.0



code_group(CTRL) : mean = 3.2717 & sd = 1.3736
 code_group(DS) : mean = 1.6008 & sd = 0.9875

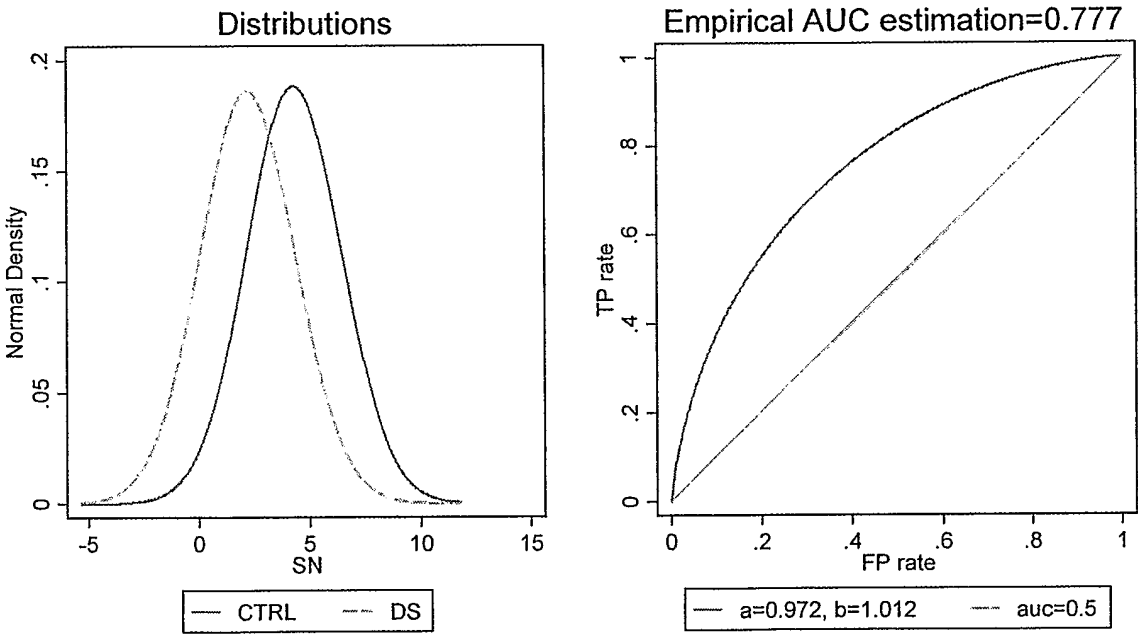
Fig. 50C

58/90

Pic N° 24 PM : 4082.9

Binormal Roc Curve

graph__append=05jul2005(H50[SPA]-pH0-BI10-las180)_B1N1C2_peak=24



code_group(CTRL) : mean = 4.3078 & sd = 2.1205
code_group(DS) : mean = 2.2217 & sd = 2.1454

Fig. 50D

59/90

Pic N° 25 PM : 4084.75

Binormal Roc Curve

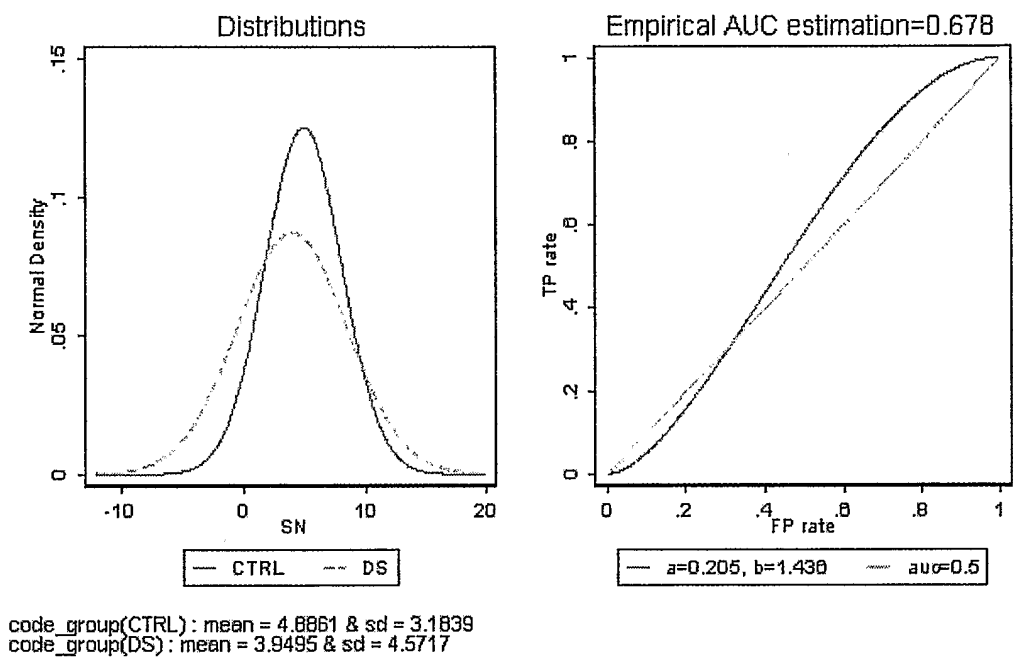
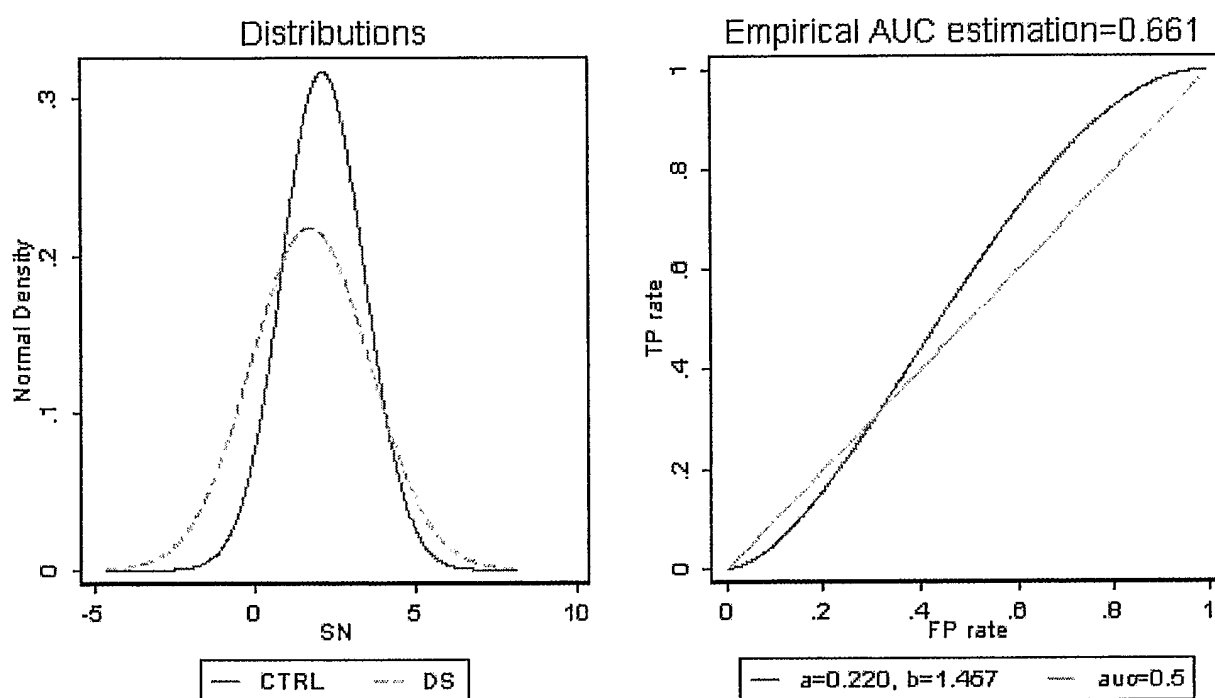


Fig. 50E

60/90

Pic N° 26 PM : 4092.12

Binormal Roc Curve



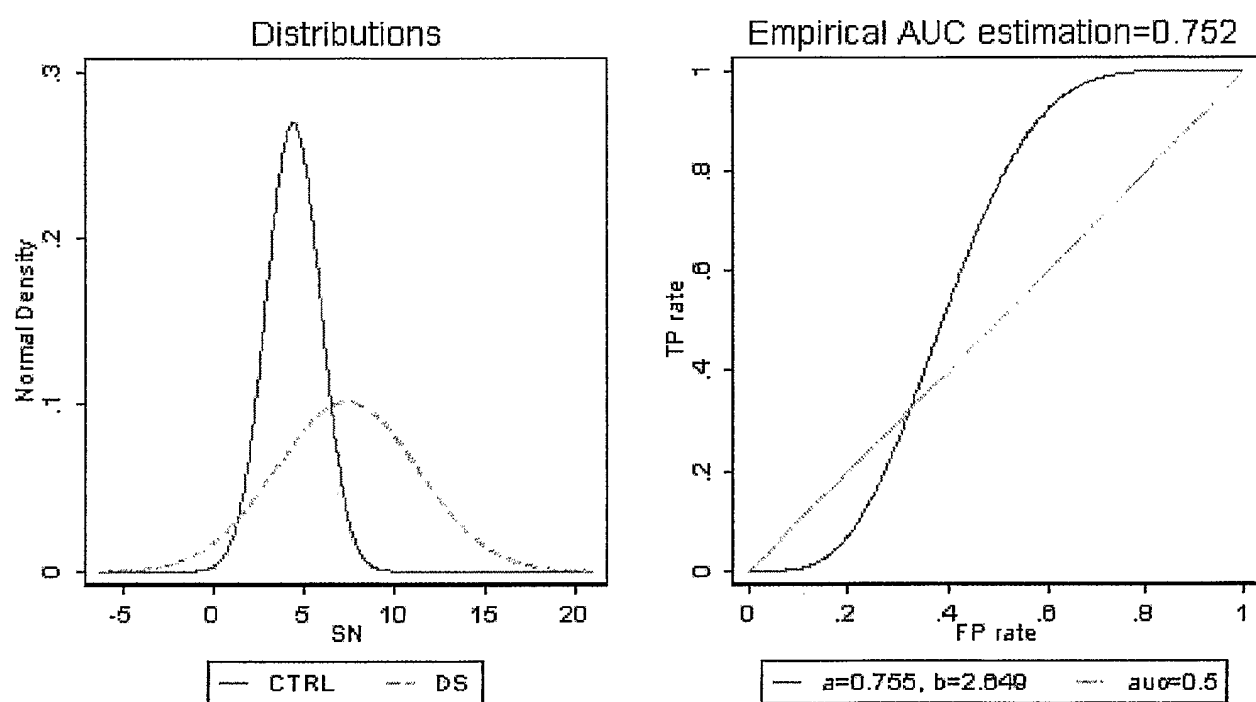
code_group(CTRL) : mean = 2.1429 & sd = 1.2599
code_group(DS) : mean = 1.7394 & sd = 1.8352

Fig 50F

61/90

Pic N° 30 PM : 4319.79

Binormal Roc Curve



code_group(CTRL) : mean = 4.4100 & sd = 1.4774
code_group(DS) : mean = 7.3654 & sd = 3.9138

Fig. 50G

62/90

Pic N° 42 PM : 4641.65

Binormal Roc Curve

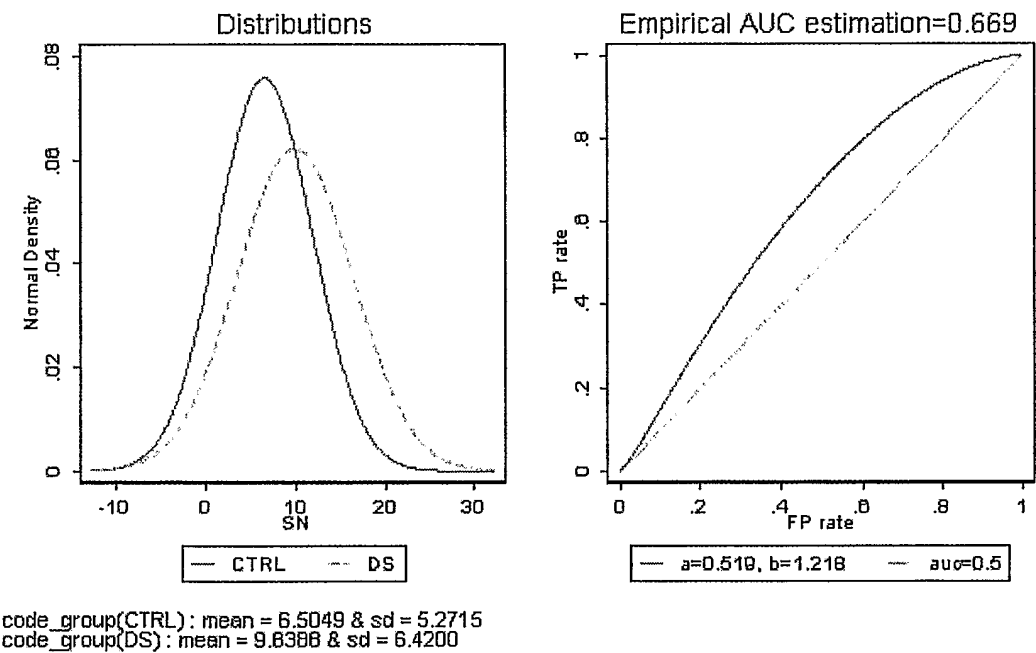


Fig. 50H

63/90

Pic N° 43 PM : 4657.5

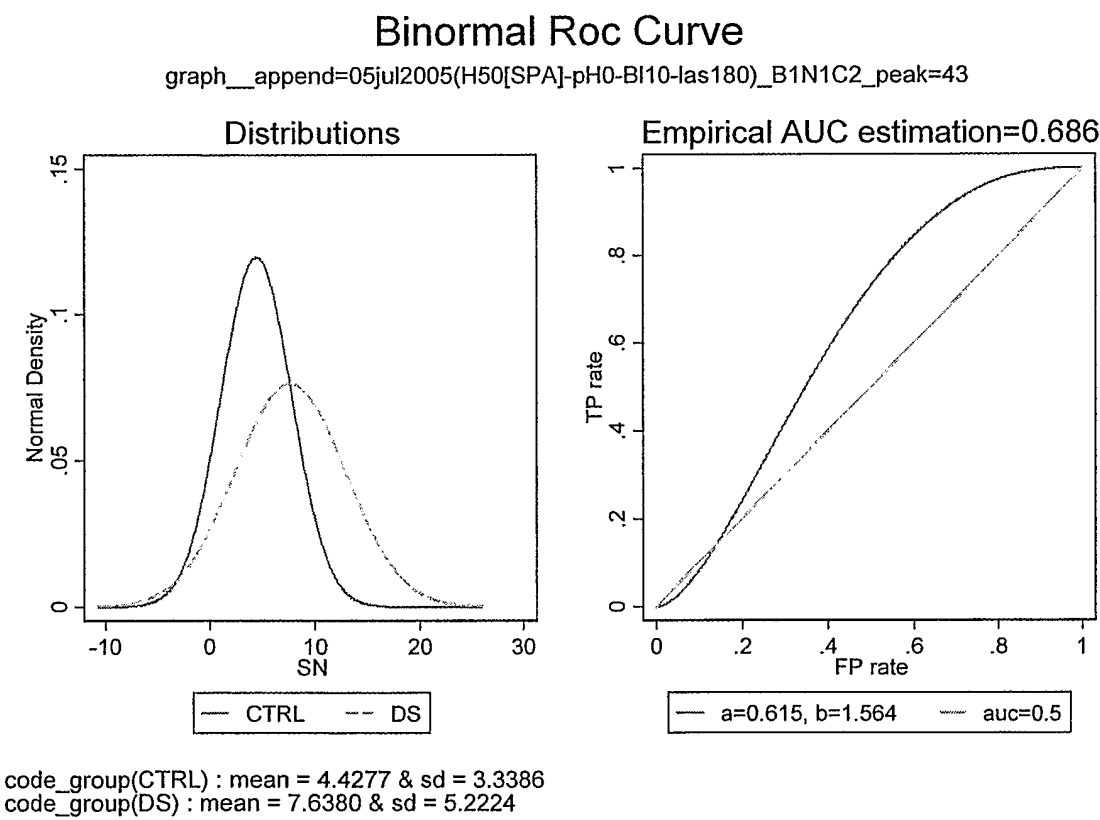
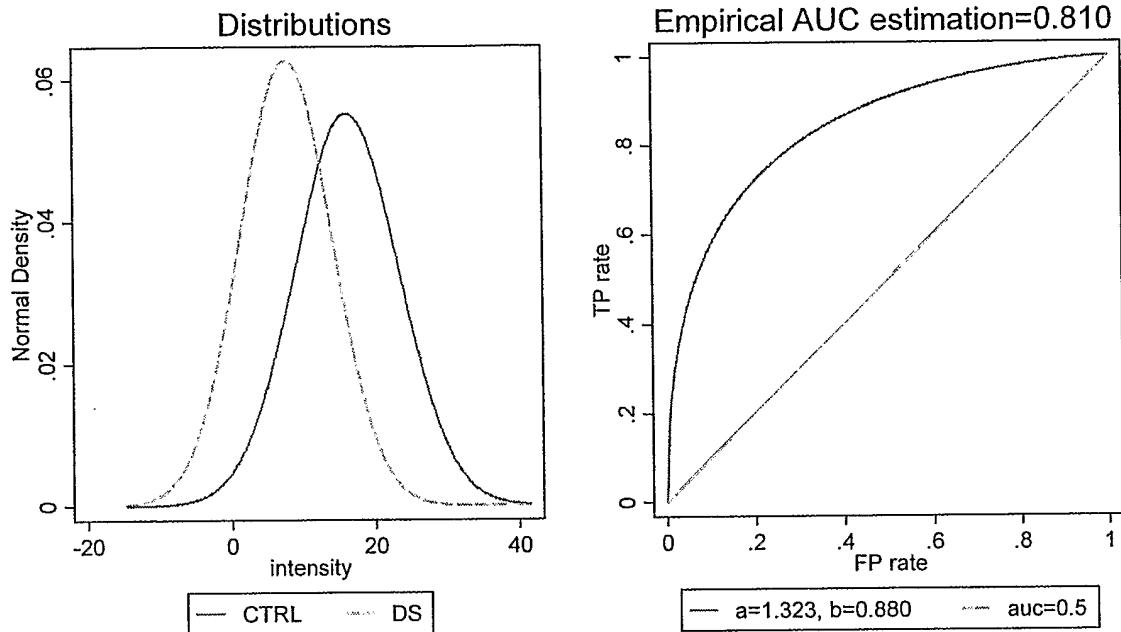


Fig. 50I

64/90

Binormal Roc Curve

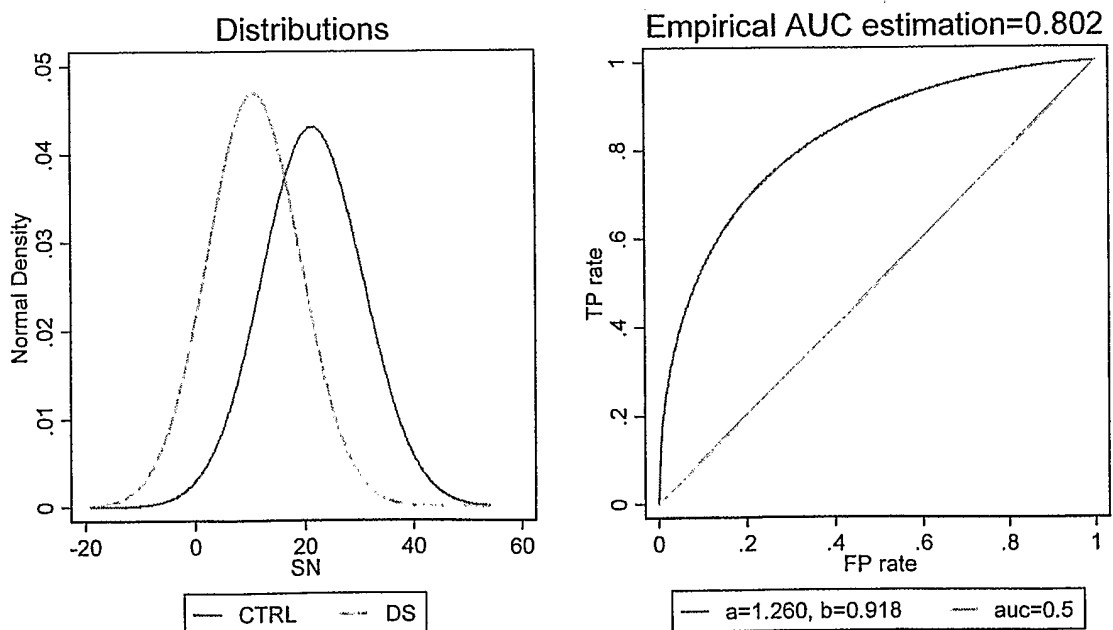
Pic N° 58 PM : 8108.1



code_group(CTRL) : mean = 16.0712 & sd = 7.2348
 code_group(DS) : mean = 7.6454 & sd = 6.3677

Binormal Roc Curve

Pic N° 58 PM : 8108.1

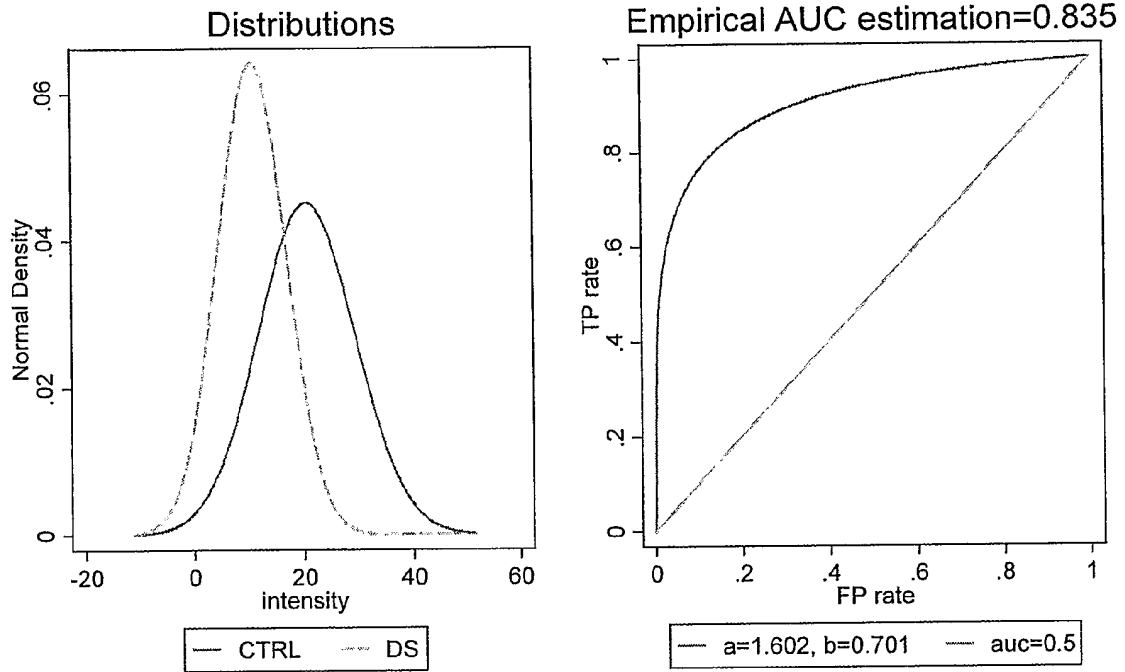


code_group(CTRL) : mean = 21.4686 & sd = 9.2691
 code_group(DS) : mean = 10.7440 & sd = 8.5109

Fig. 50J

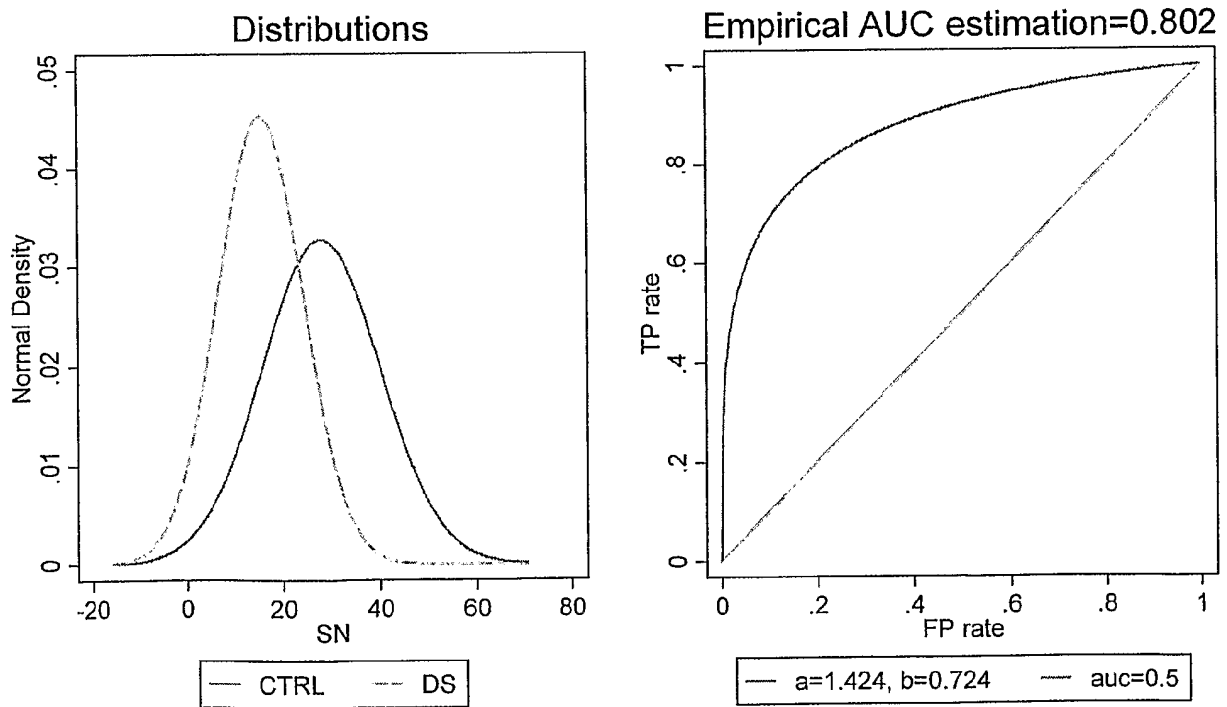
65/90 Binormal Roc Curve

Pic N° 59 PM : 8123.5



Binormal Roc Curve

Pic N° 59 PM : 8123.5



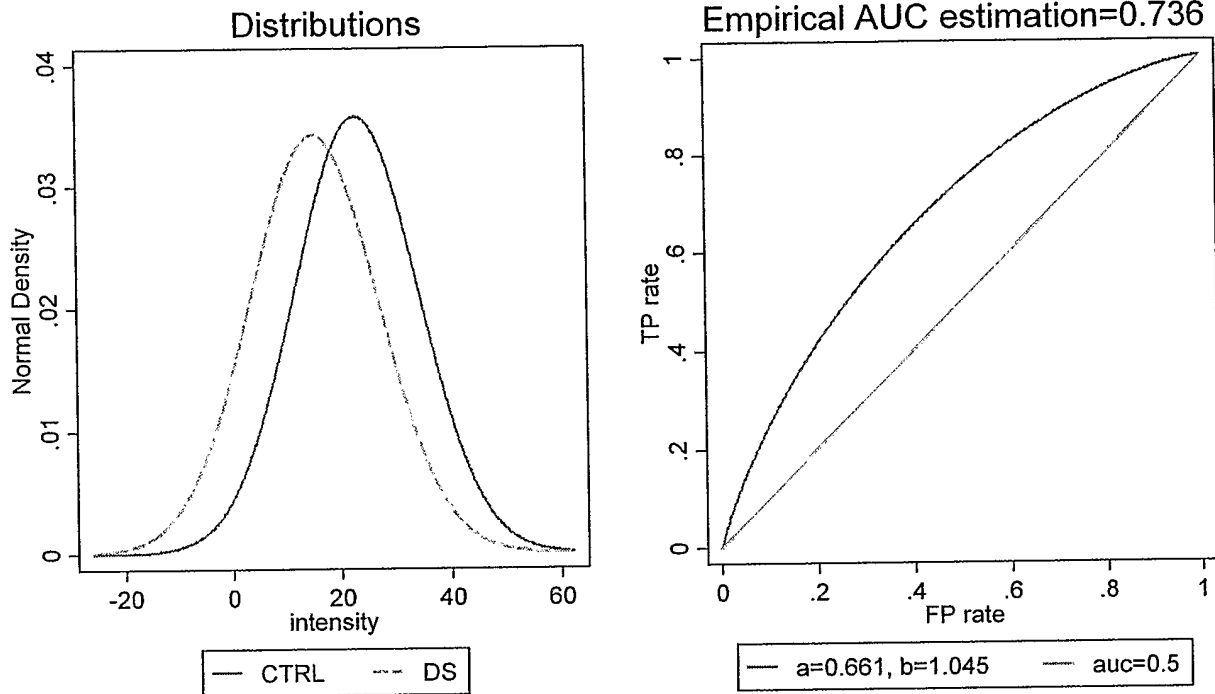
code_group(CTRL) : mean = 27.8266 & sd = 12.1810
code_group(DS) : mean = 15.2686 & sd = 8.8184

Fig. 50K

66/90

Binormal Roc Curve

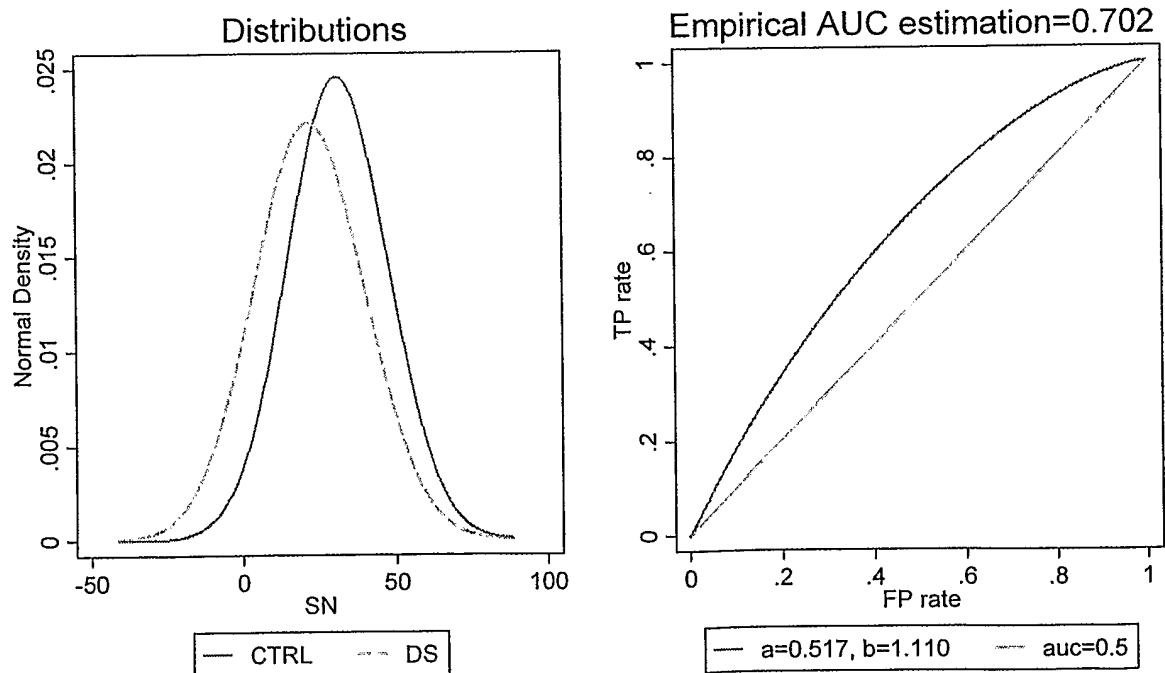
graph__append=05jul2005(H50[SPA]-pH0-BI10-las180)_B1N1C2_peak=60



code_group(CTRL) : mean = 22.9099 & sd = 11.1853
 code_group(DS) : mean = 15.1842 & sd = 11.6860

Binormal Roc Curve

graph__append=05jul2005(H50[SPA]-pH0-BI10-las180)_B1N1C2_peak=60



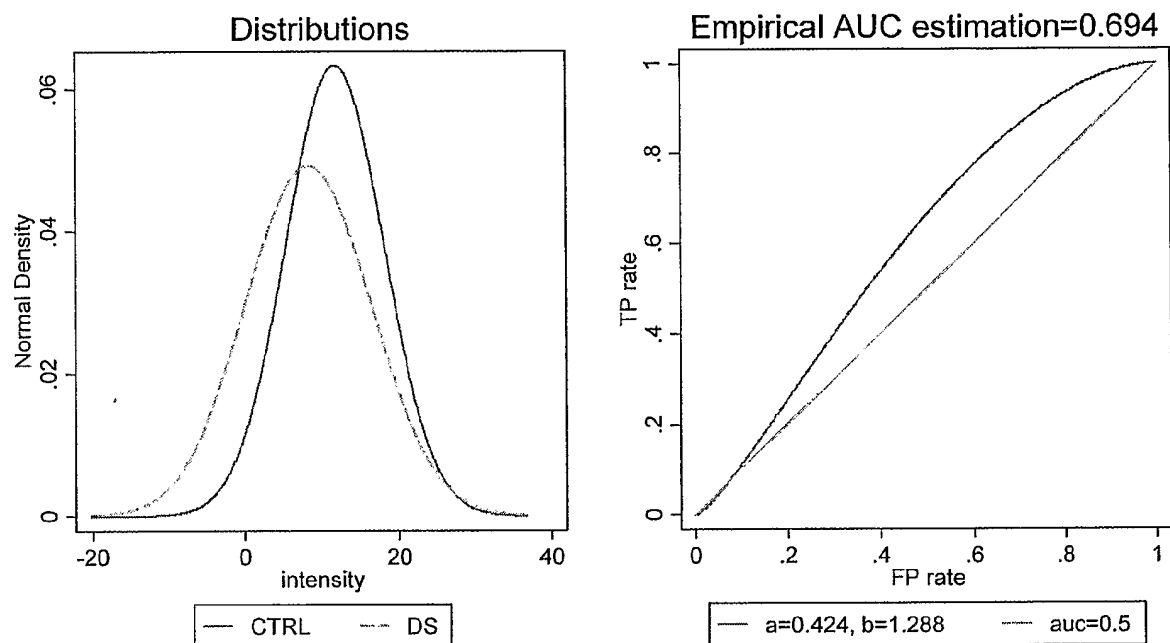
code_group(CTRL) : mean = 31.3563 & sd = 16.2551
 code_group(DS) : mean = 22.0199 & sd = 18.0477

Fig. 50L

67/90

Binormal Roc Curve

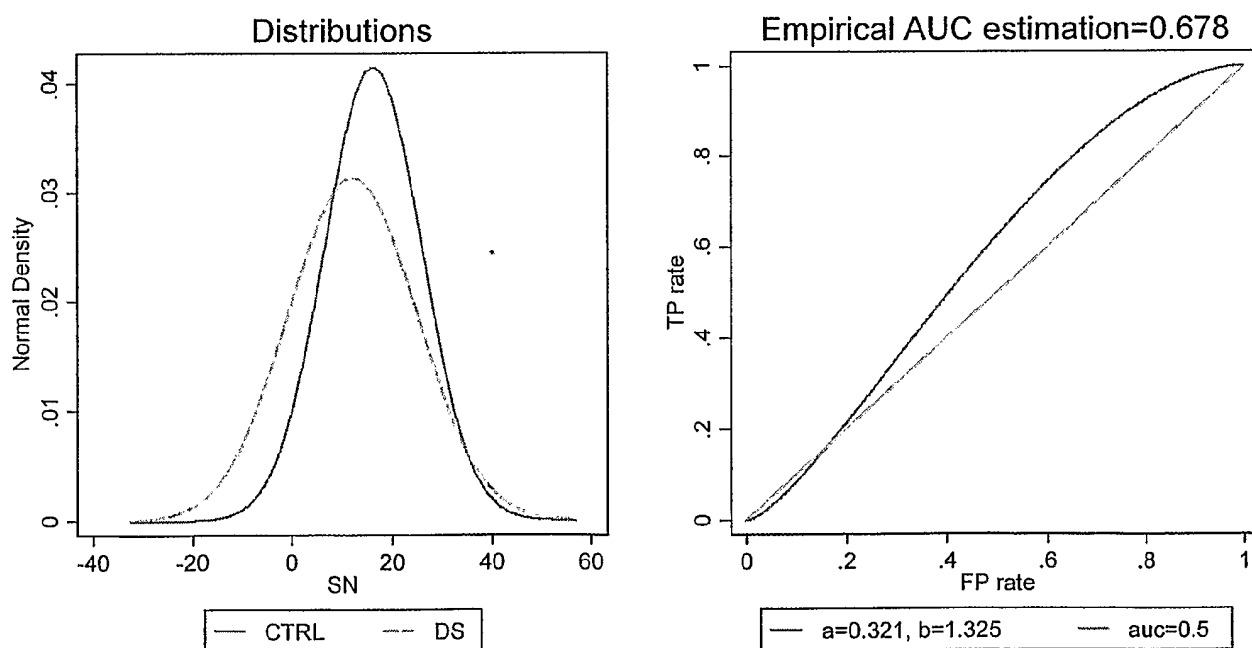
Pic N° 61 PM : 8153.1



code_group(CTRL) : mean = 11.7284 & sd = 6.3020
 code_group(DS) : mean = 8.2837 & sd = 8.1195

Binormal Roc Curve

Pic N° 61 PM : 8153.1



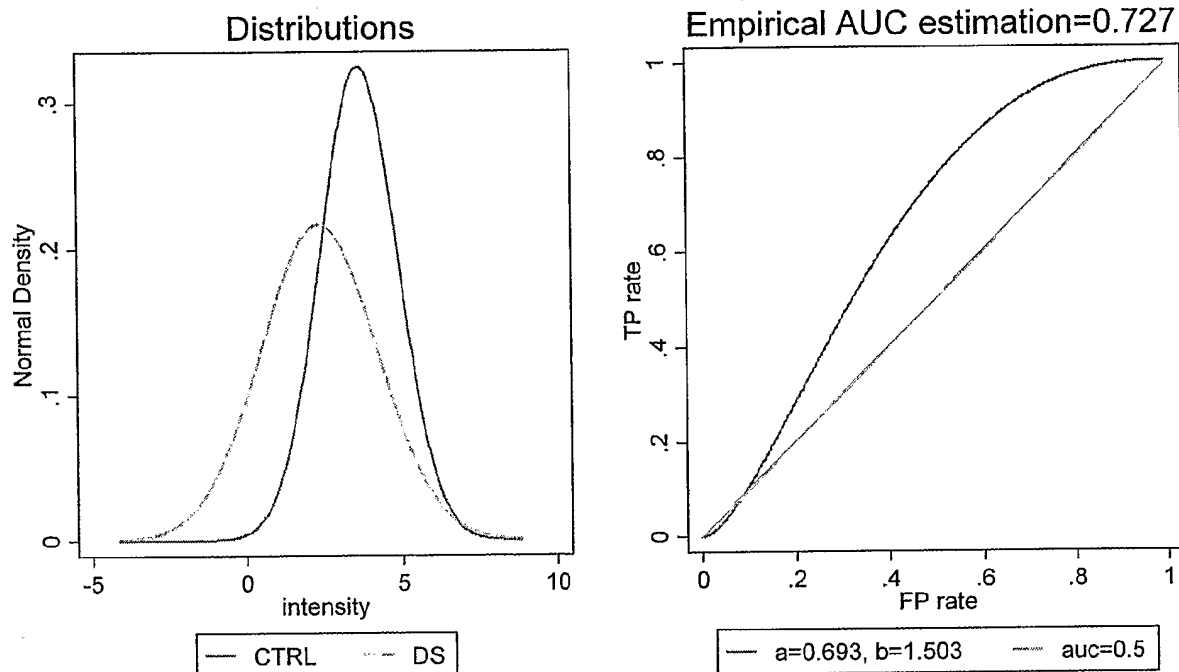
code_group(CTRL) : mean = 16.2201 & sd = 9.6137
 code_group(DS) : mean = 12.1336 & sd = 12.7352

Fig. 50M

68/90

Binormal Roc Curve

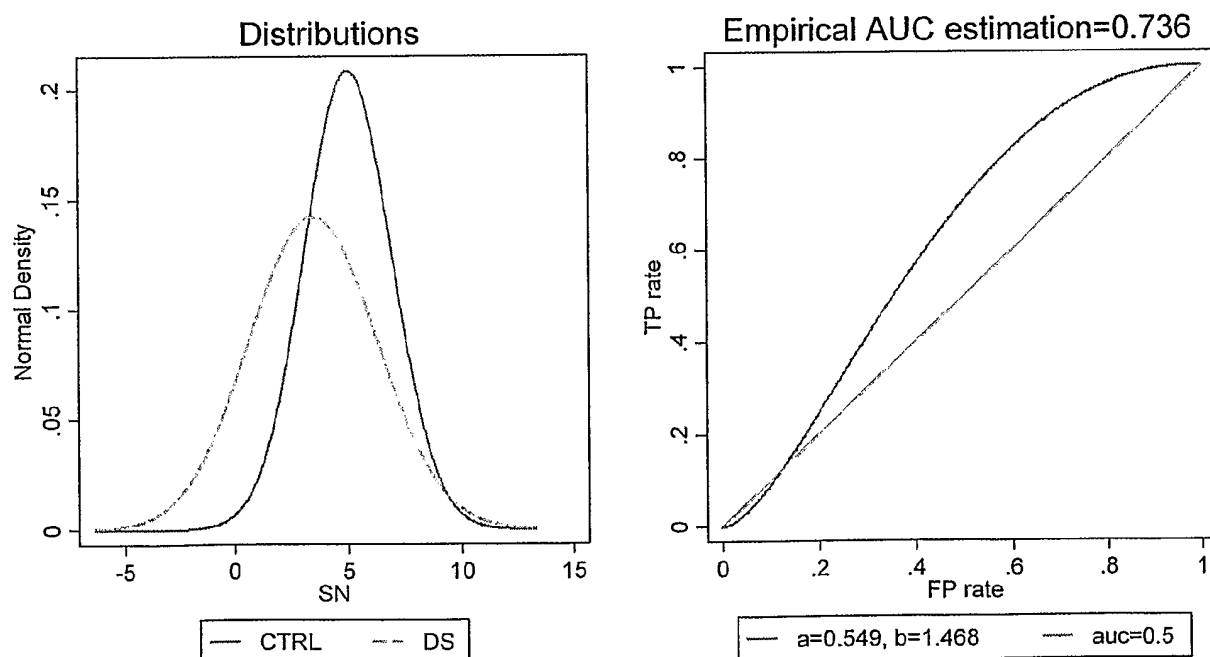
Pic N° 62 PM : 8269.1



code_group(CTRL) : mean = 3.6374 & sd = 1.2281
 code_group(DS) : mean = 2.3584 & sd = 1.8461

Binormal Roc Curve

Pic N° 62 PM : 8269.1

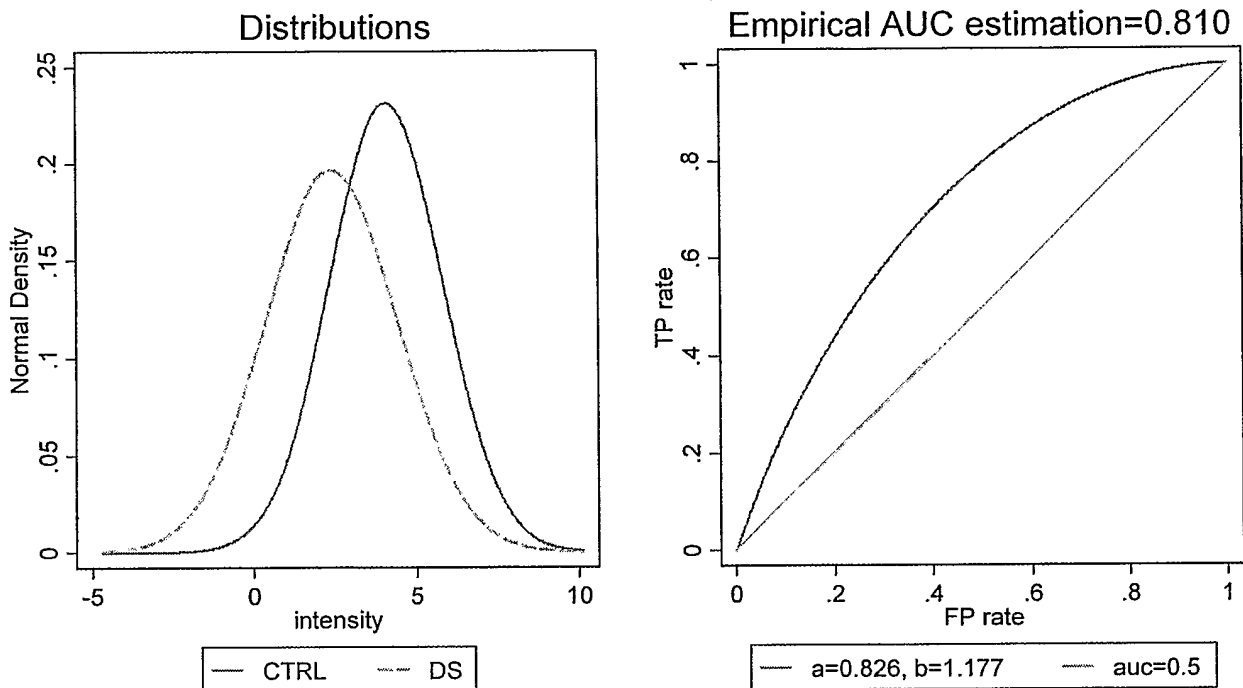


code_group(CTRL) : mean = 5.0158 & sd = 1.9126
 code_group(DS) : mean = 3.4738 & sd = 2.8078

Fig. 50N

69/90 Binormal Roc Curve

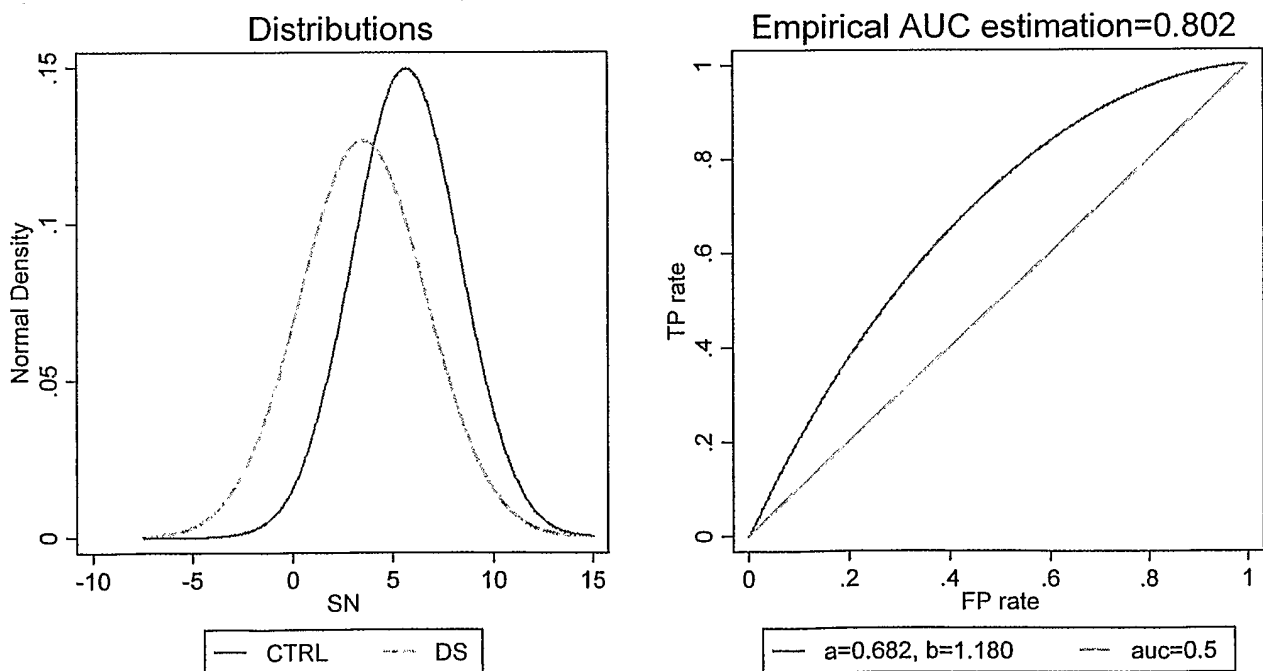
Pic N° 63 PM : 8338.8



code_group(CTRL) : mean = 4.0882 & sd = 1.7266
 code_group(DS) : mean = 2.4097 & sd = 2.0316

Binormal Roc Curve

Pic N° 63 PM : 8338.8

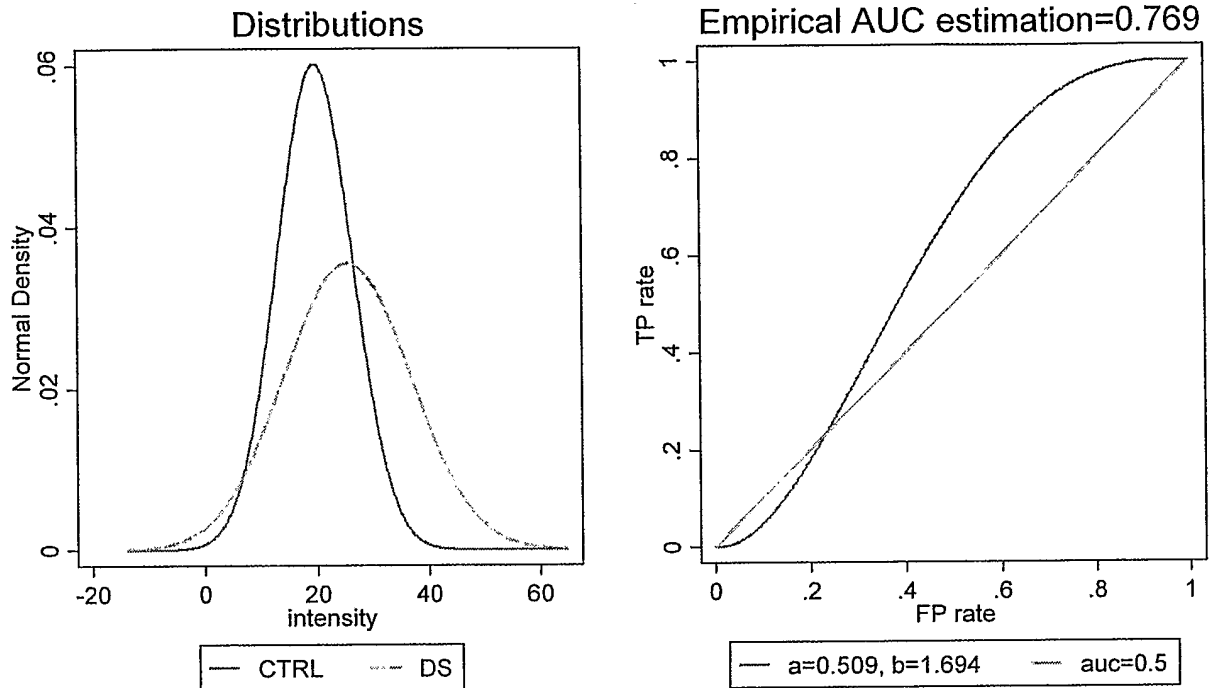


code_group(CTRL) : mean = 5.6876 & sd = 2.6678
 code_group(DS) : mean = 3.5396 & sd = 3.1487

Fig. 50P

70/90 Binormal Roc Curve

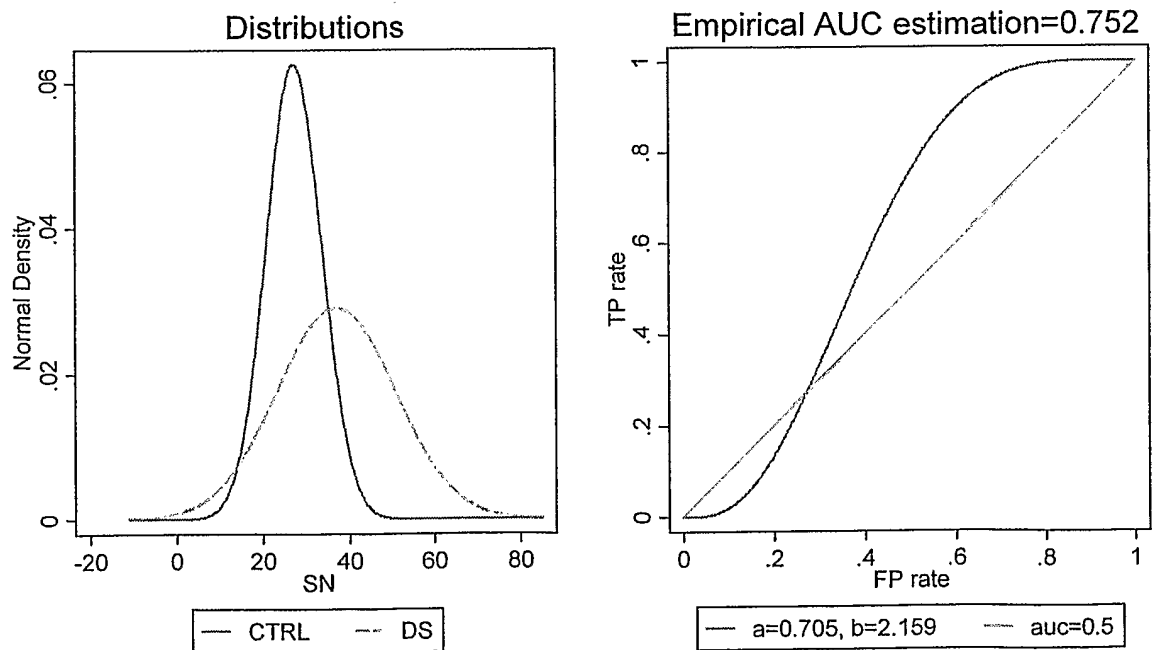
Pic N° 66 PM : 8610.3



code_group(CTRL) : mean = 19.7366 & sd = 6.6345
 code_group(DS) : mean = 25.4594 & sd = 11.2377

Binormal Roc Curve

Pic N° 66 PM : 8610.3



code_group(CTRL) : mean = 27.2595 & sd = 6.3769
 code_group(DS) : mean = 36.9670 & sd = 13.7687

Fig. 50Q

Box plot Signal/Bruit des pics par Groupe
Dataset NS526c

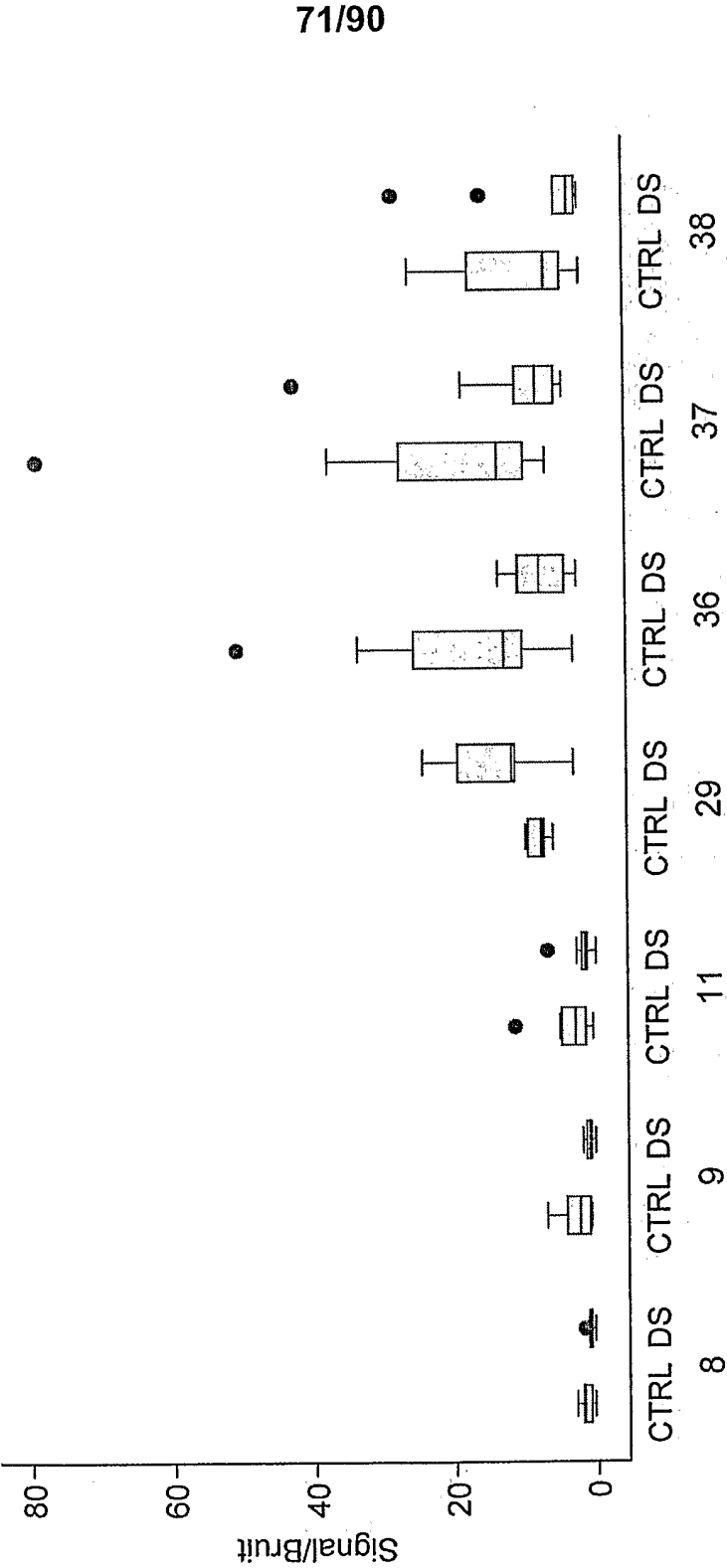


Fig. 51

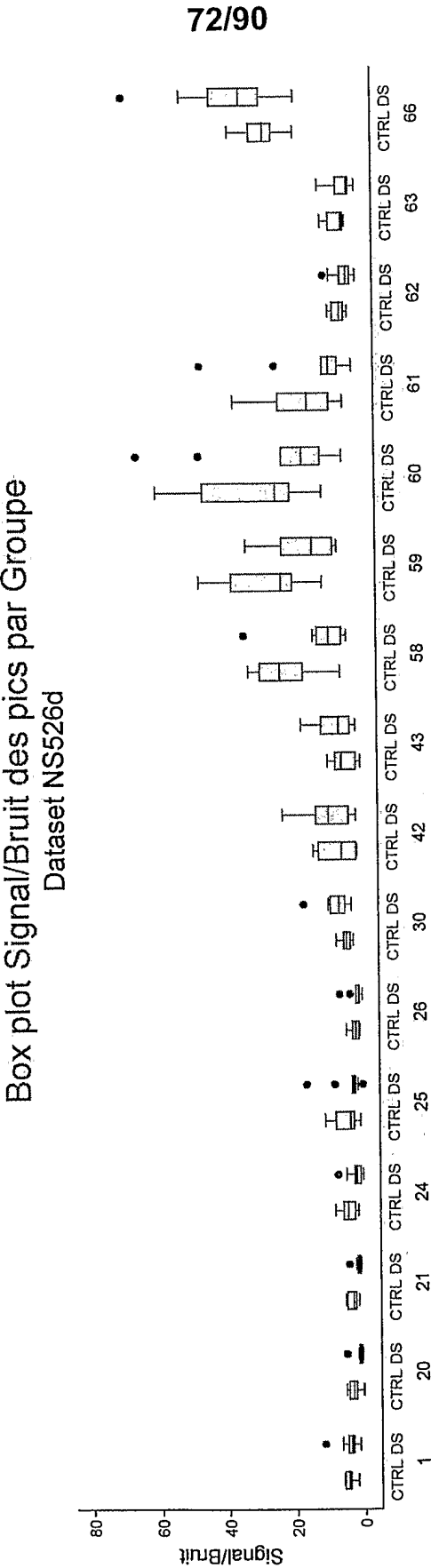


Fig. 52

73/90

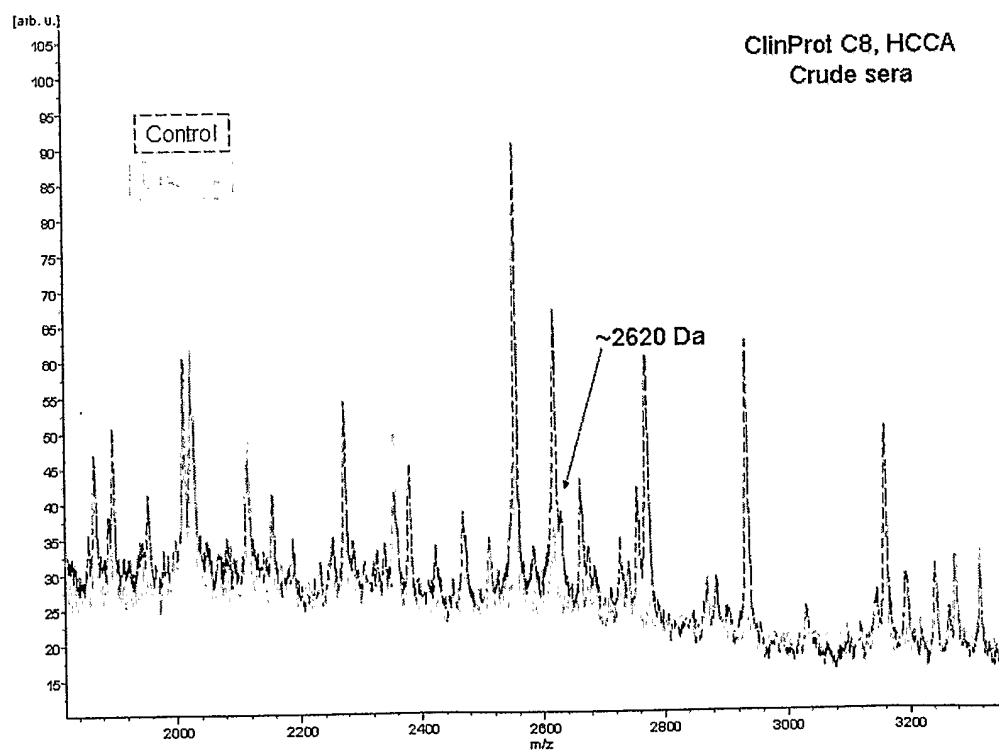
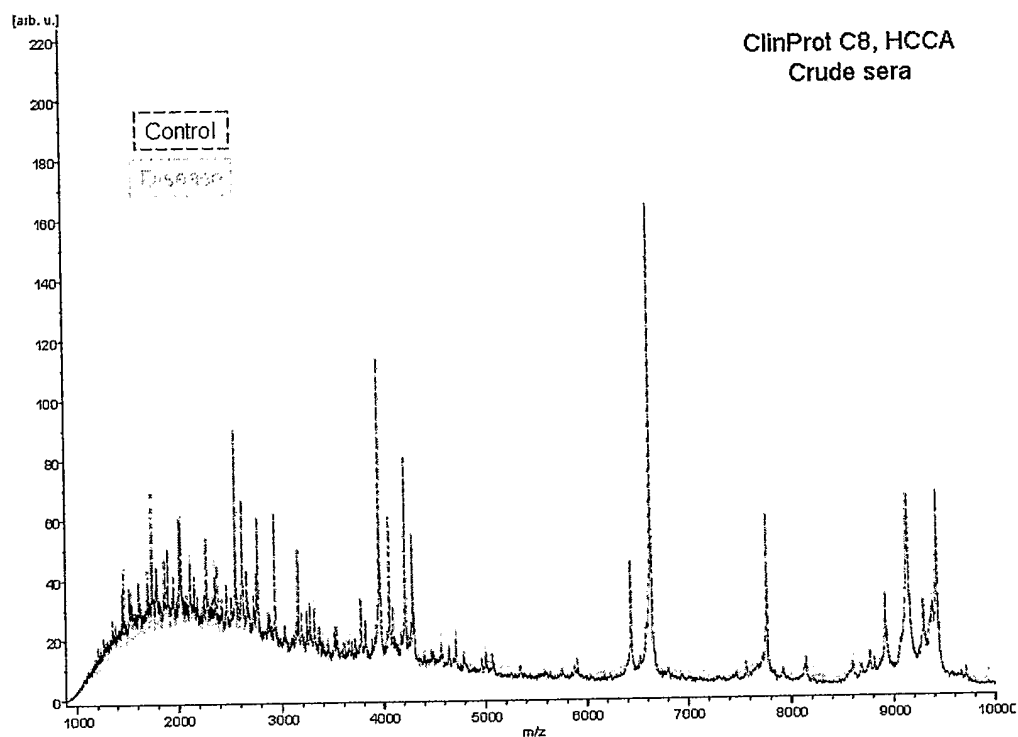


Fig. 53A

74/90

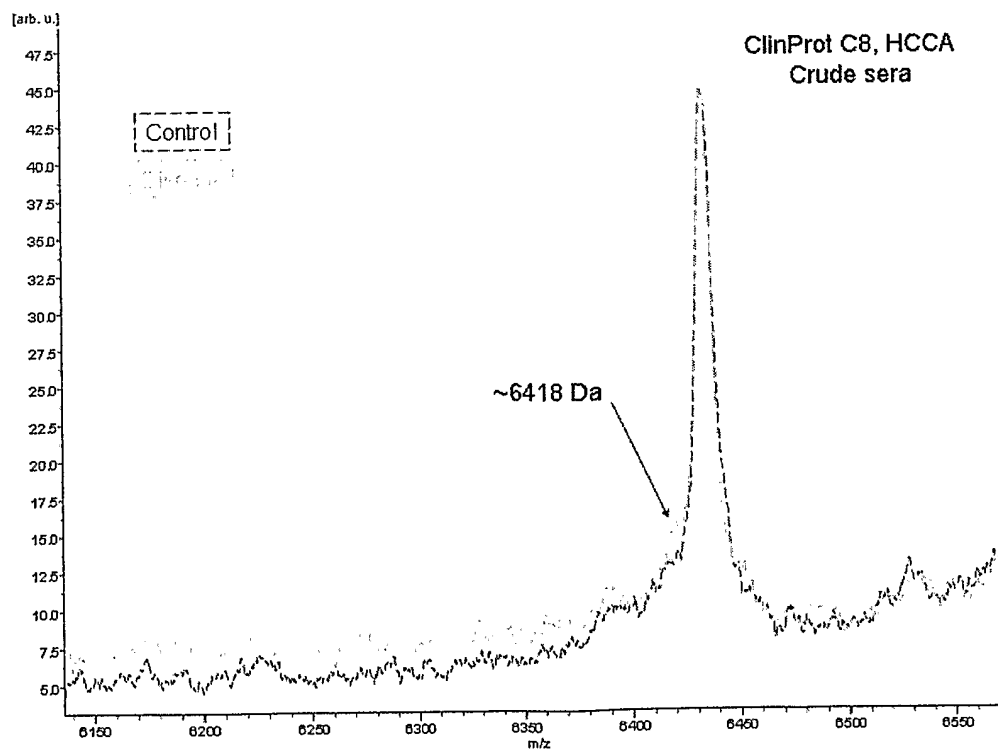
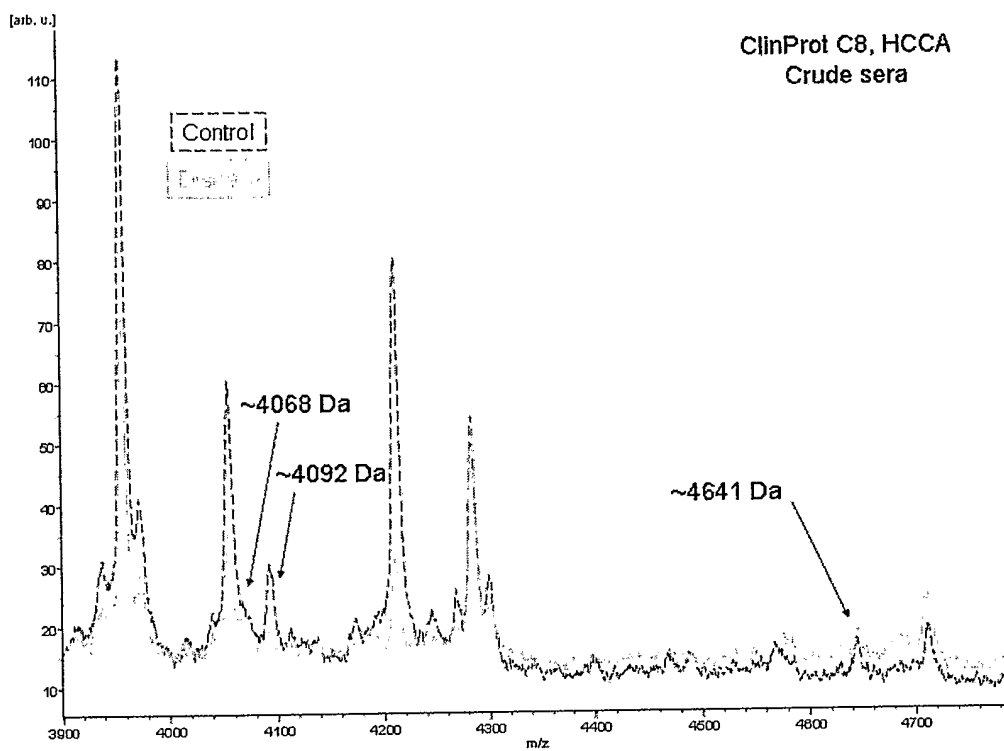


Fig. 53B

75/90

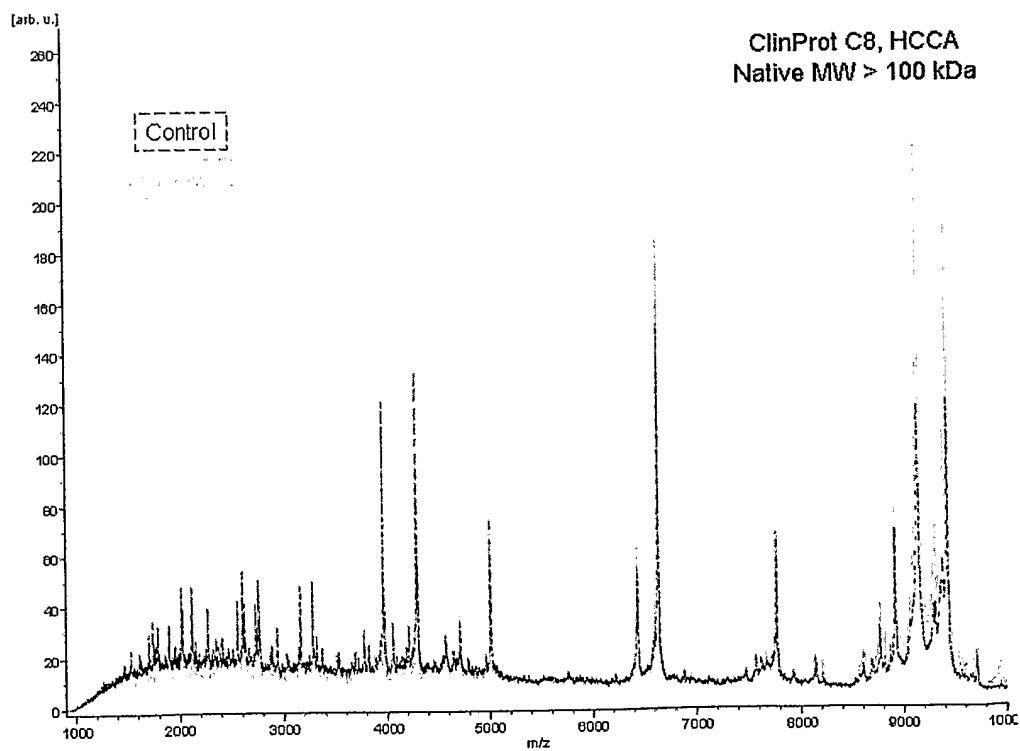
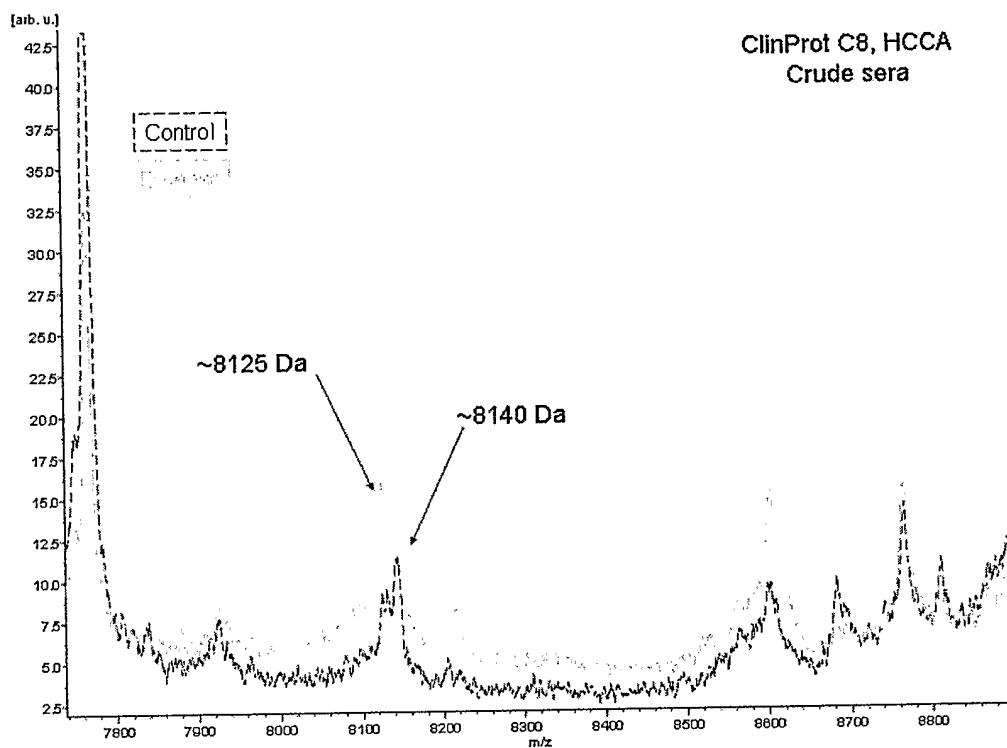


Fig. 53C

76/90

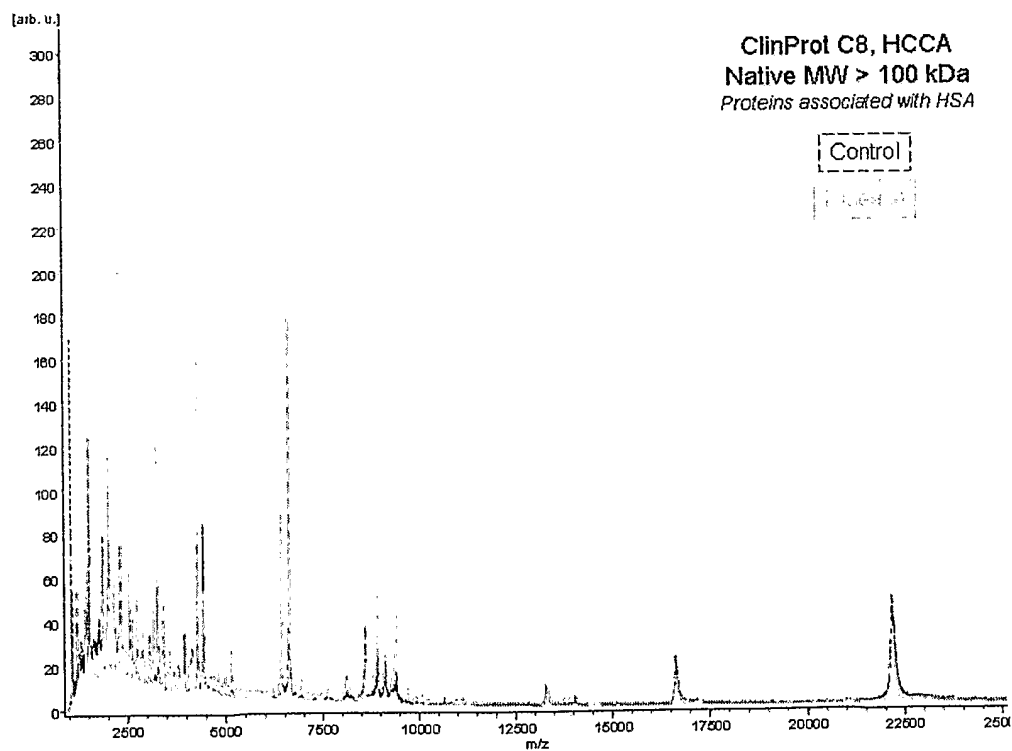
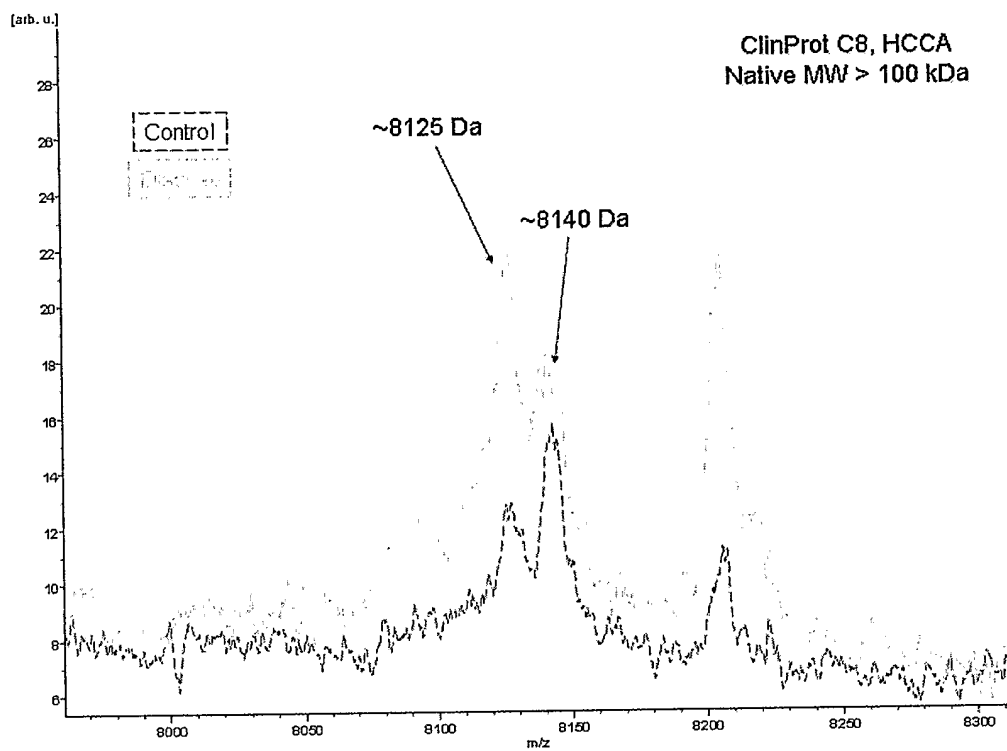


Fig. 53D

77/90

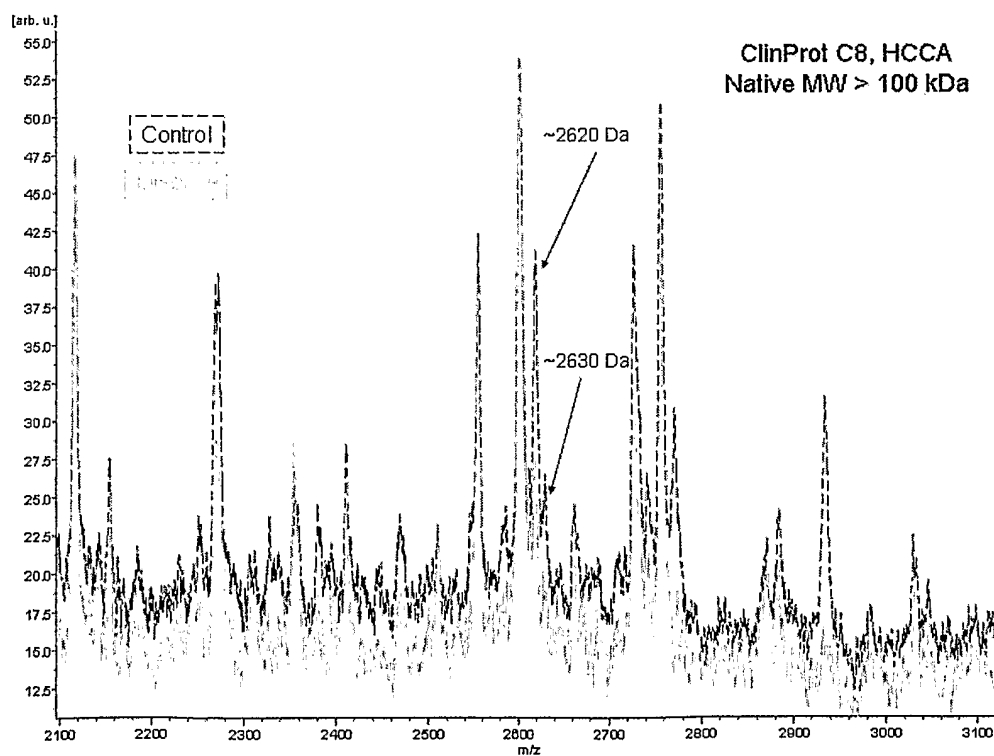
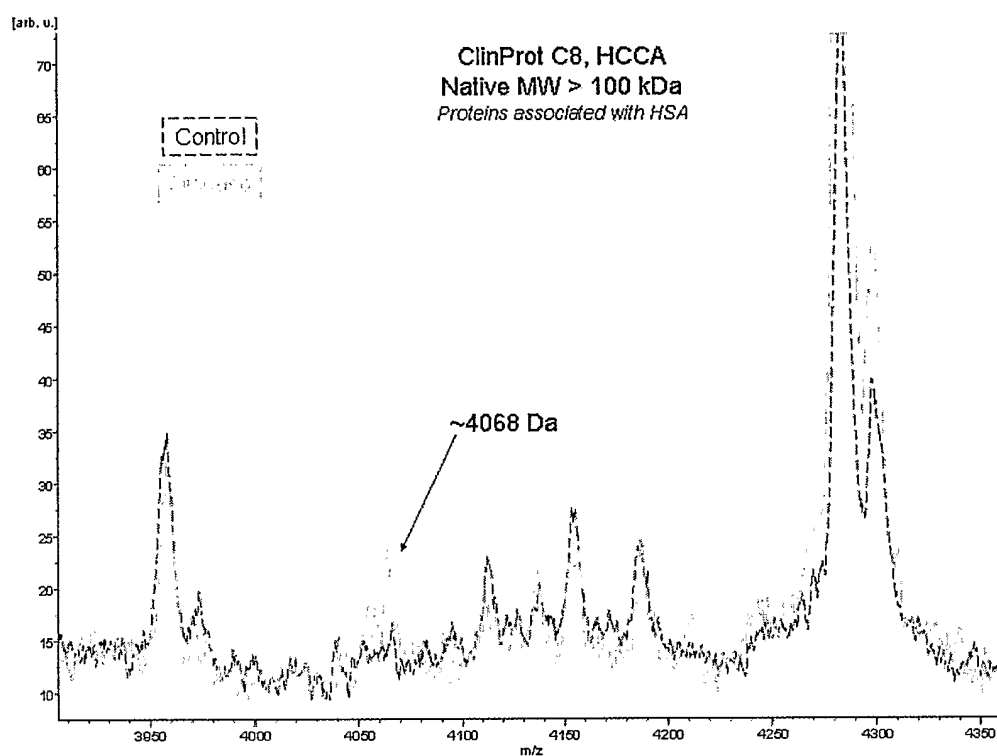


Fig. 53E

78/90

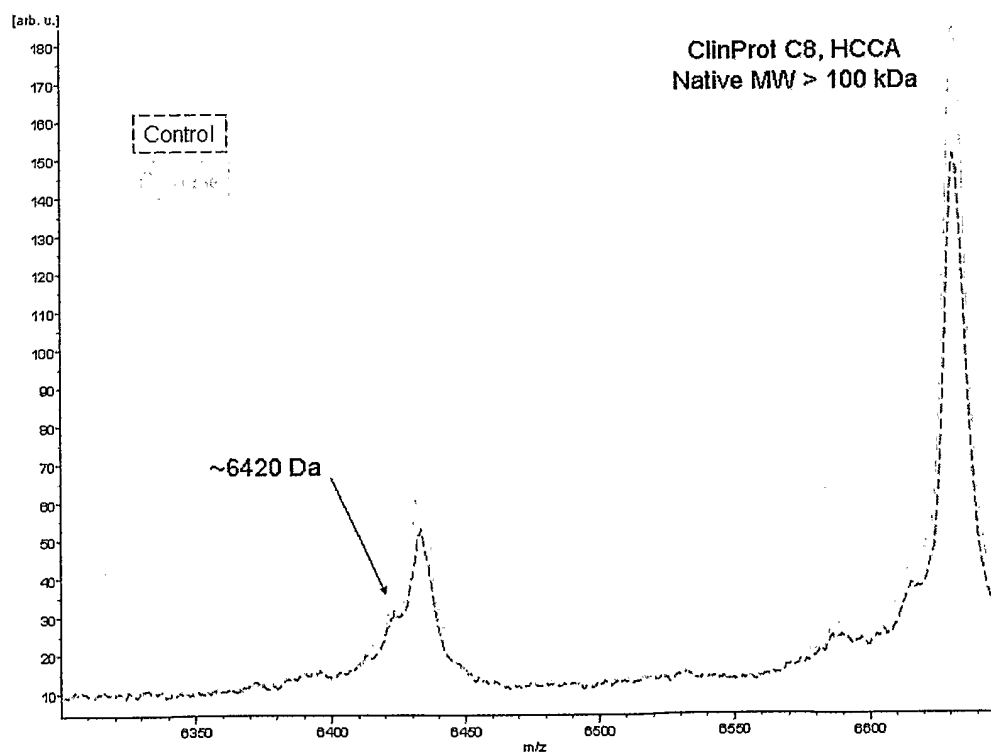
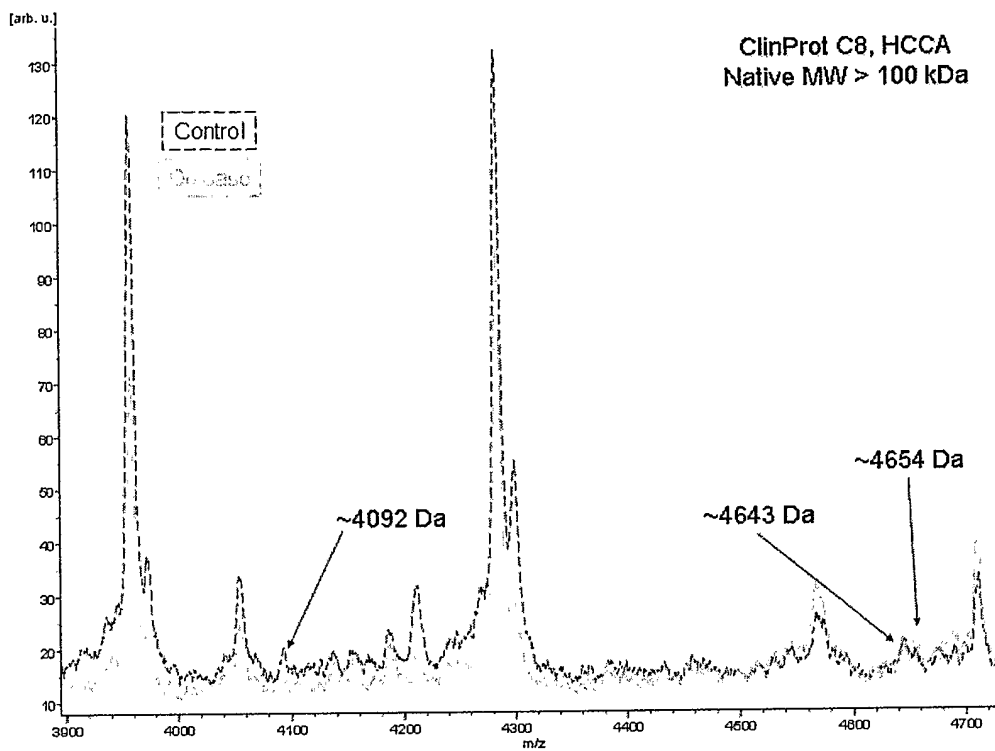


Fig. 53F

79/90

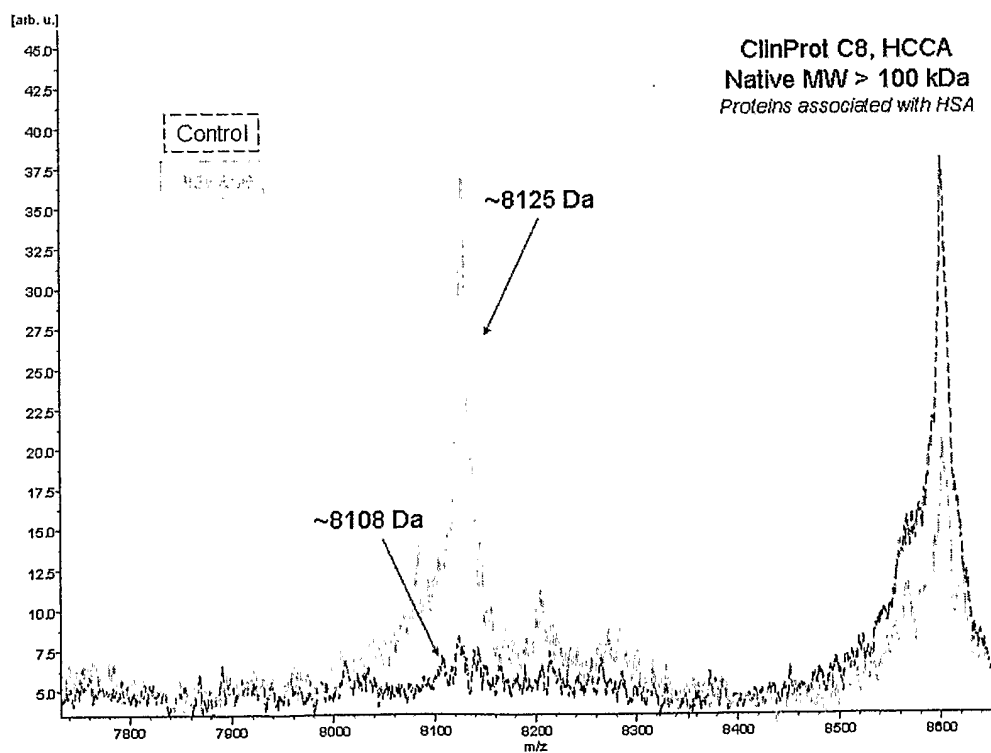
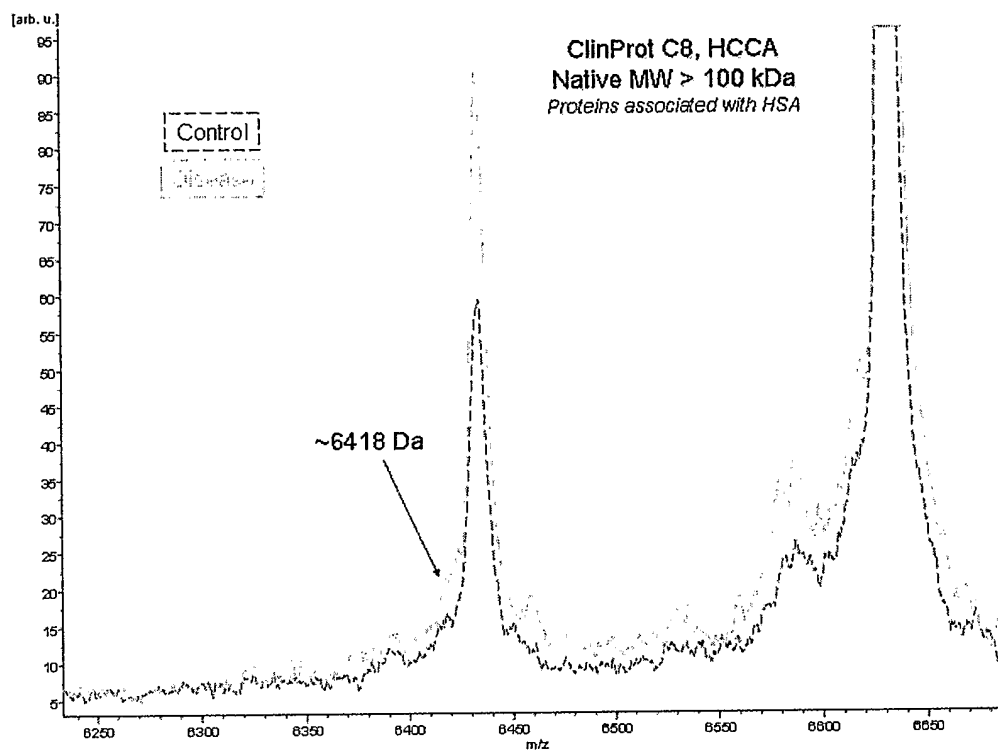


Fig. 53G

80/90

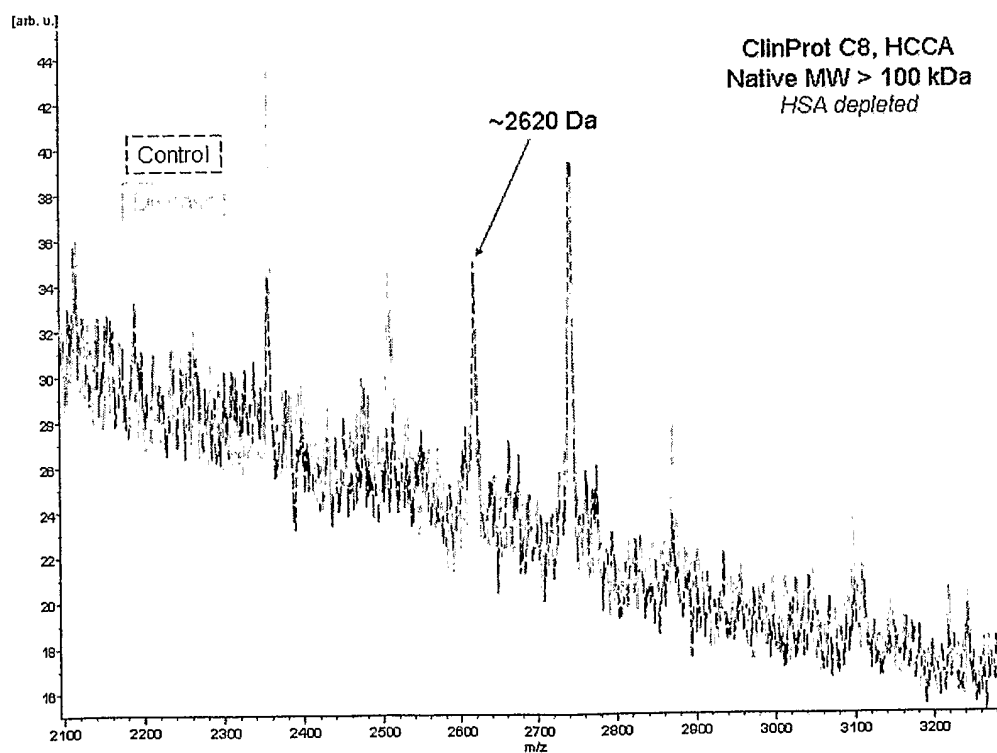
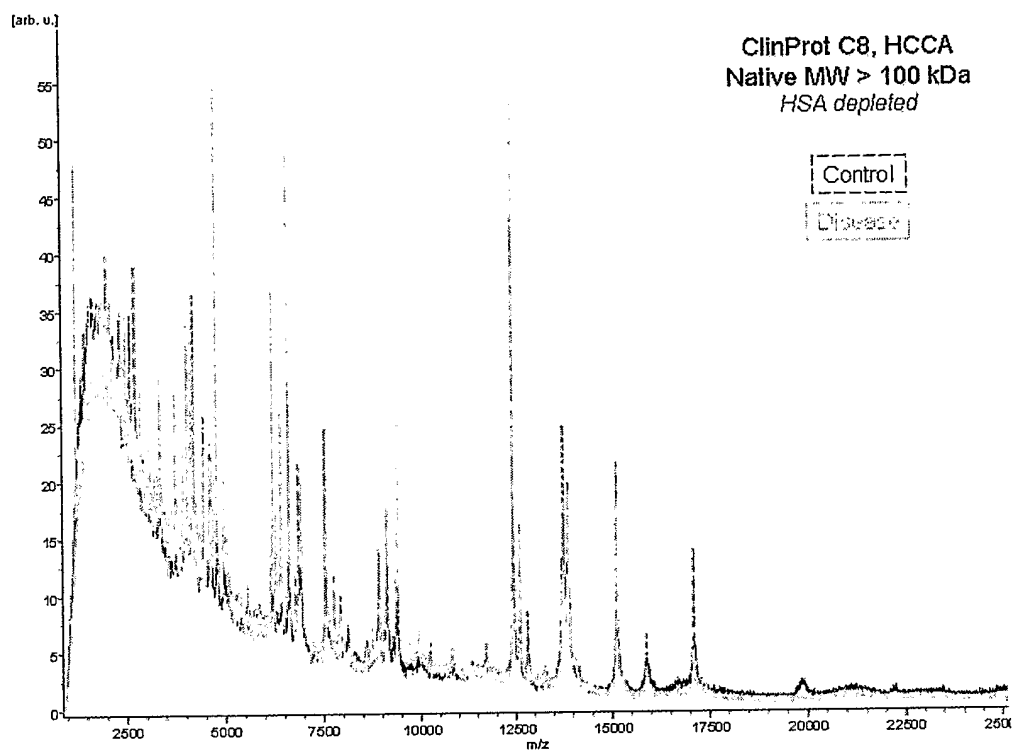


Fig. 53H

81/90

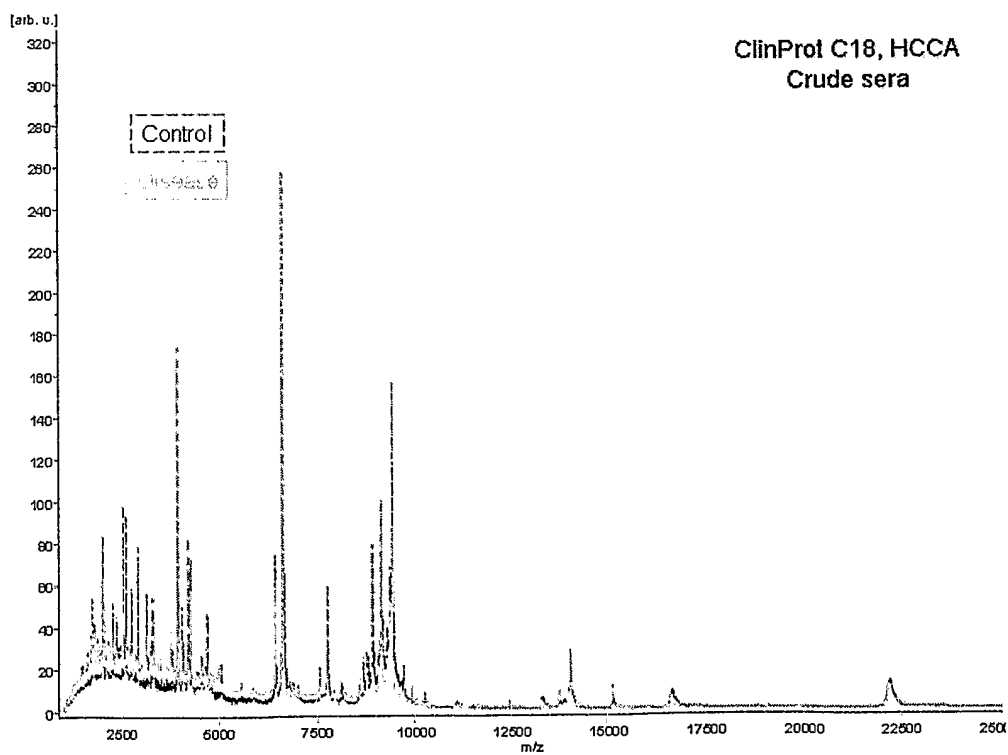
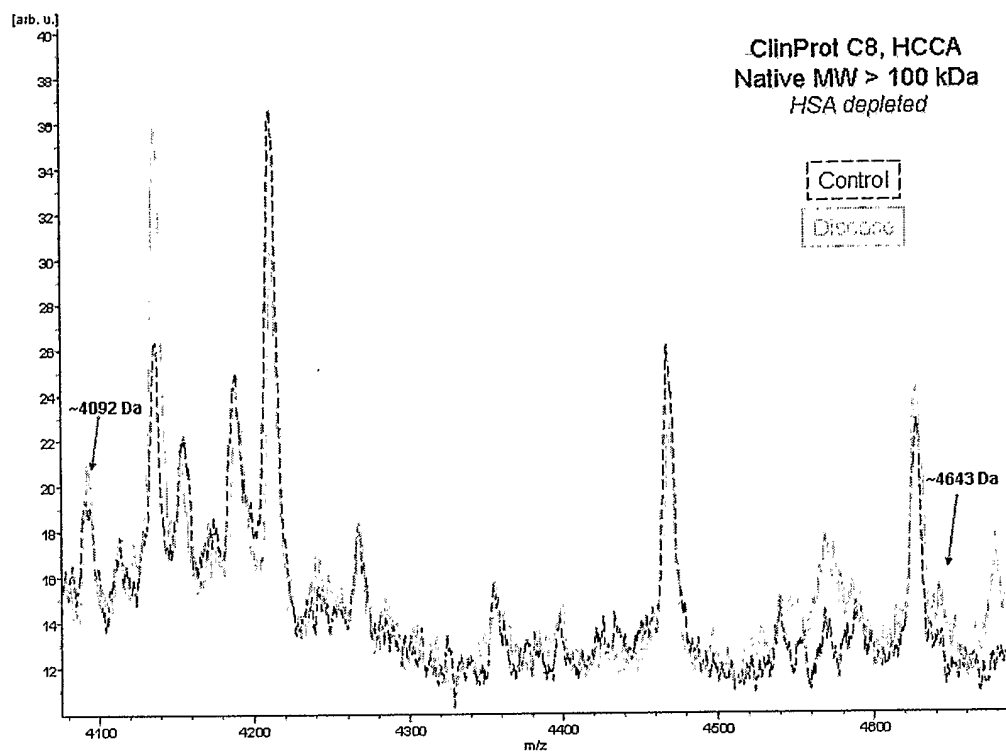


Fig. 53I

82/90

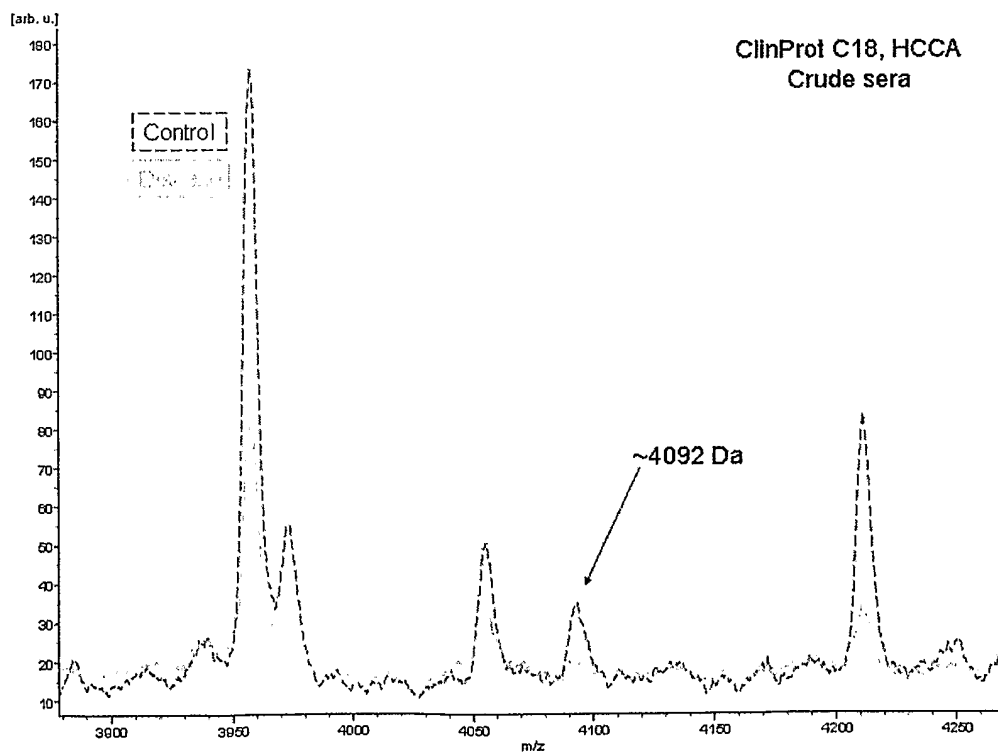
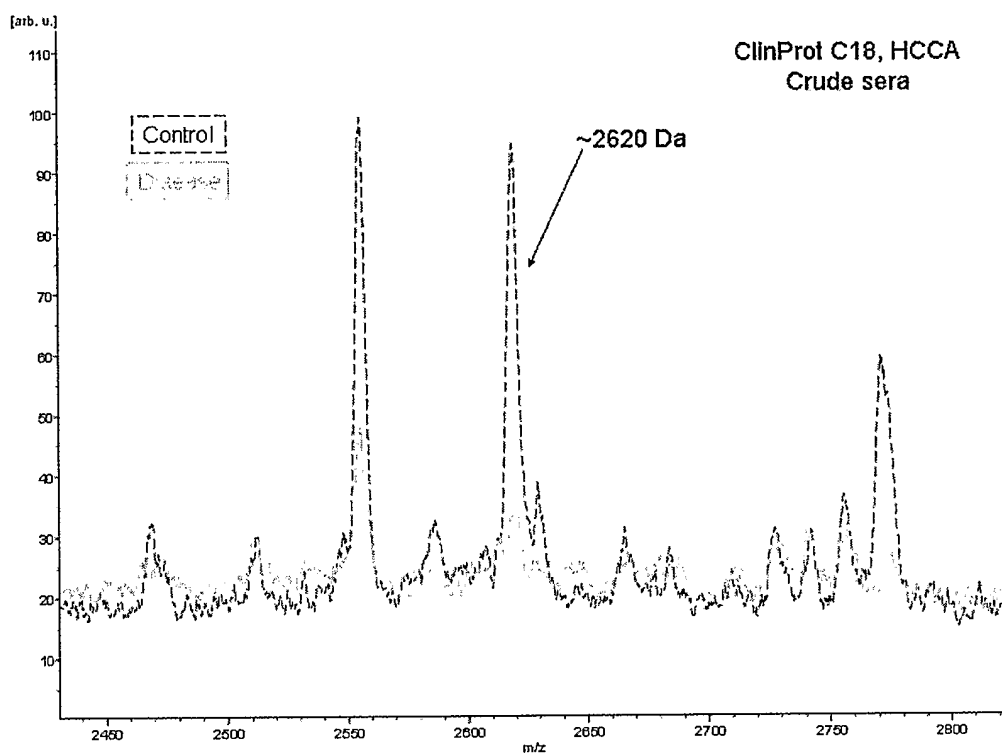


Fig. 53J

83/90

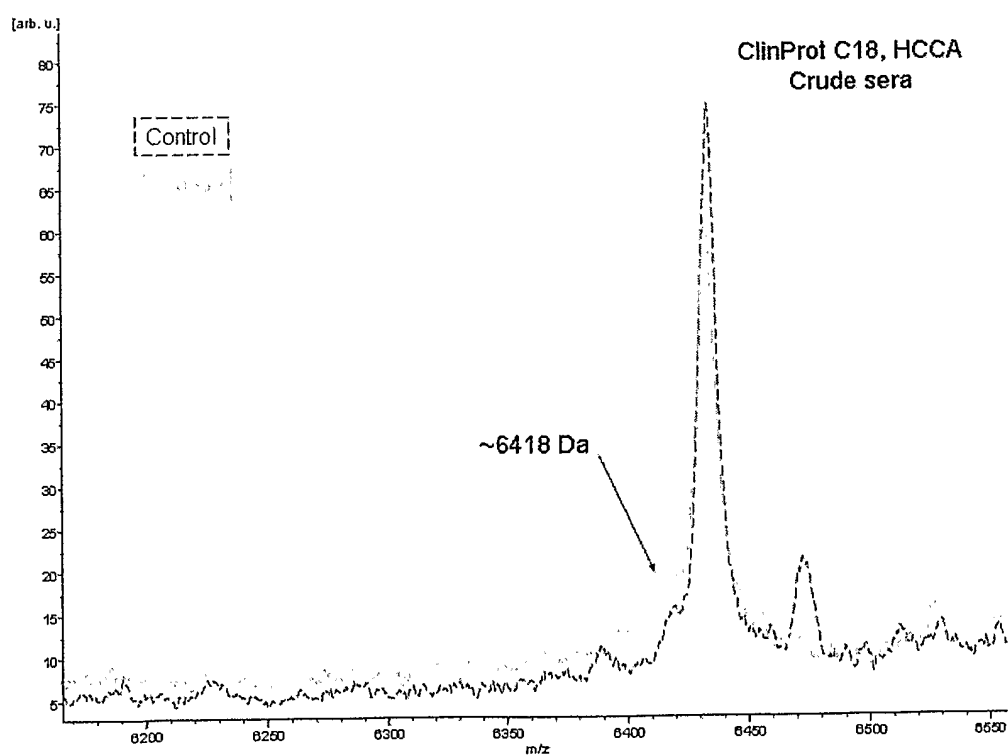
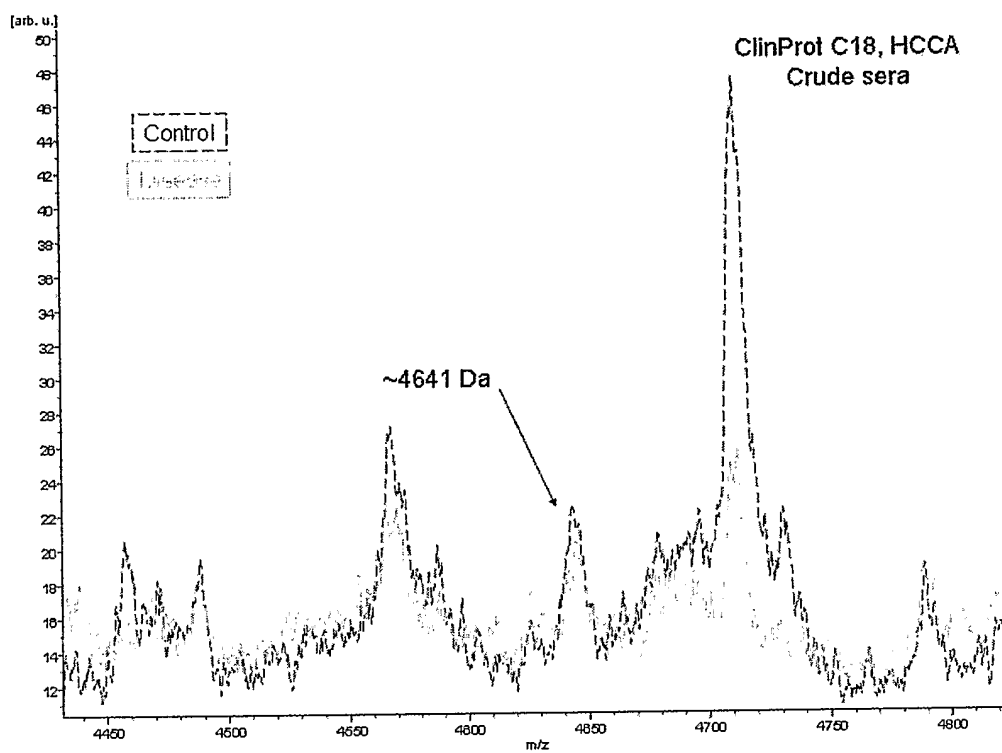


Fig. 53K

84/90

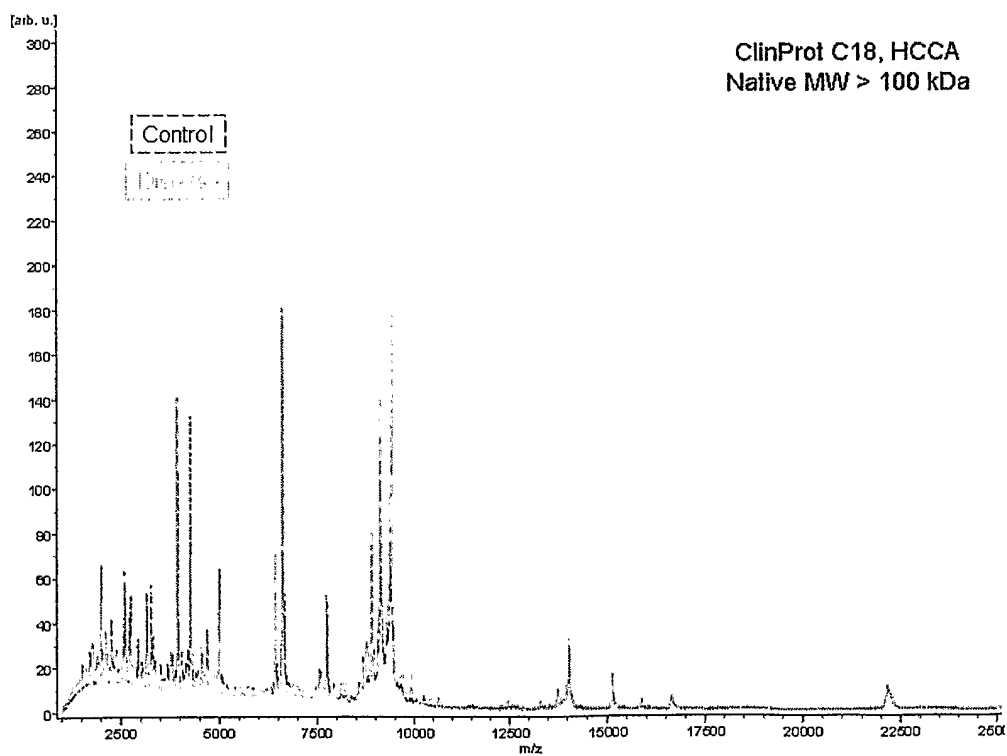
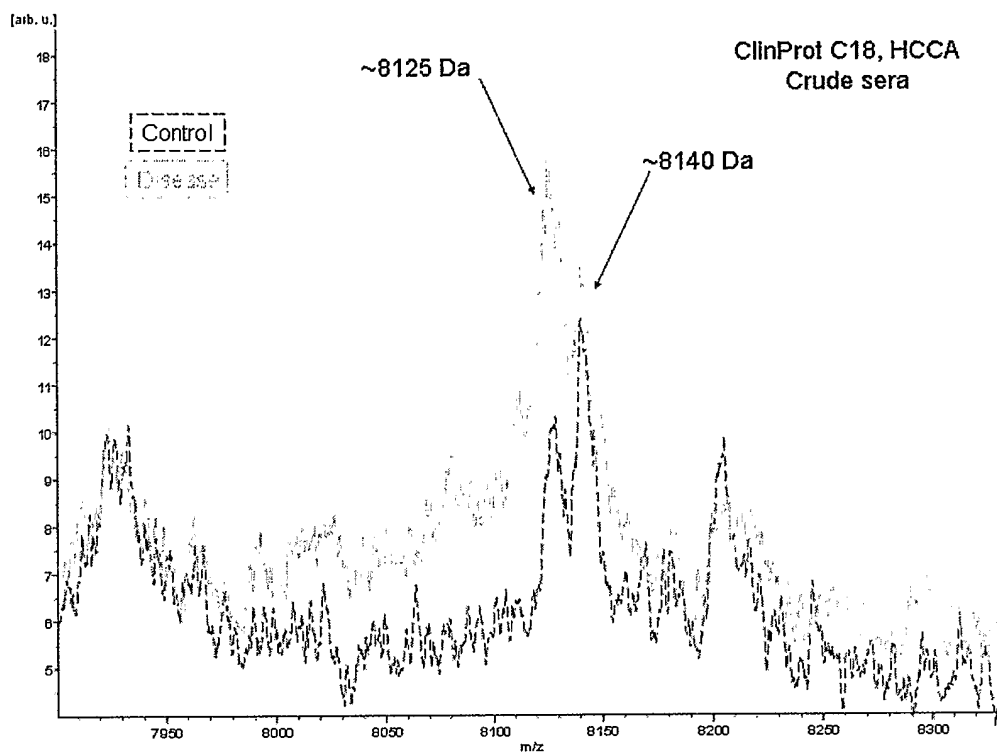


Fig. 53L

85/90

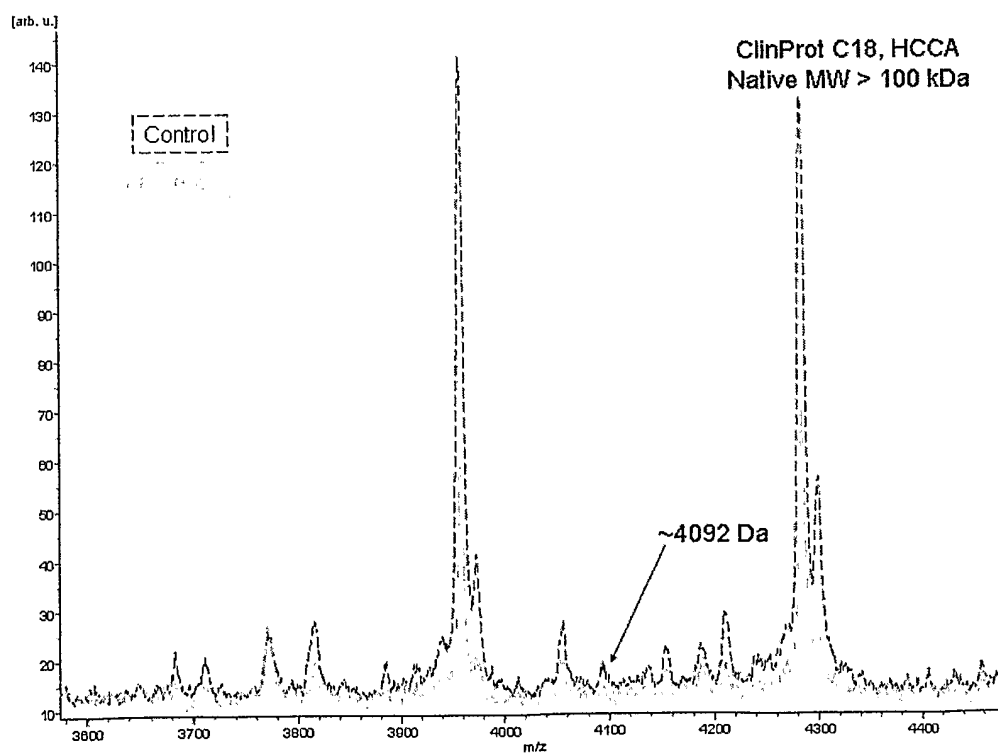
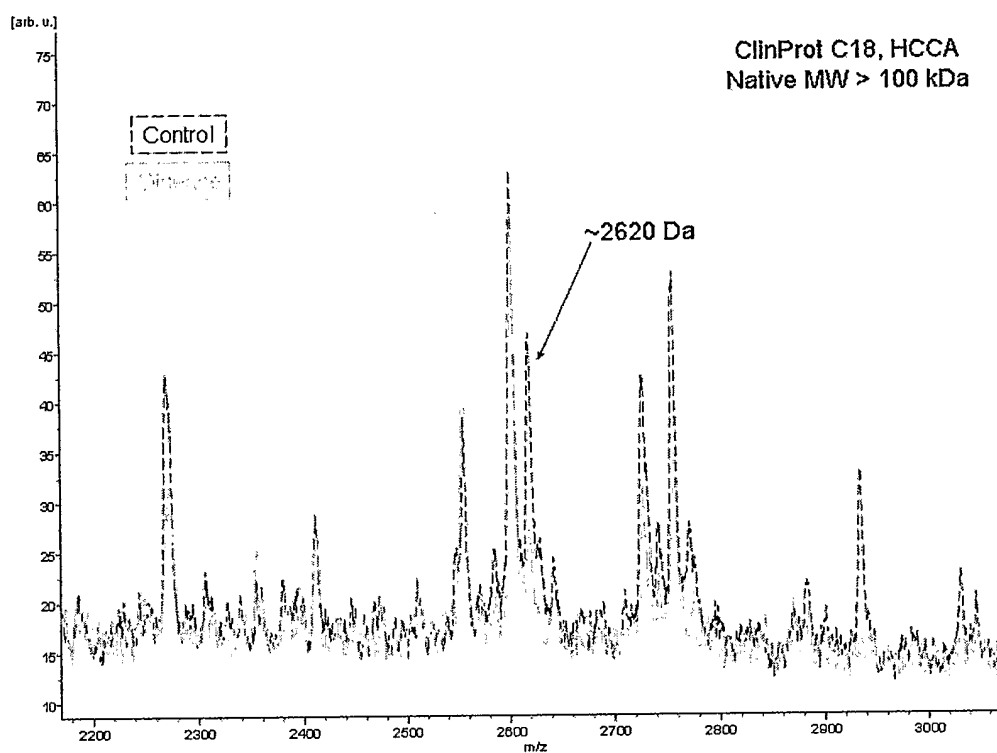


Fig. 53M

86/90

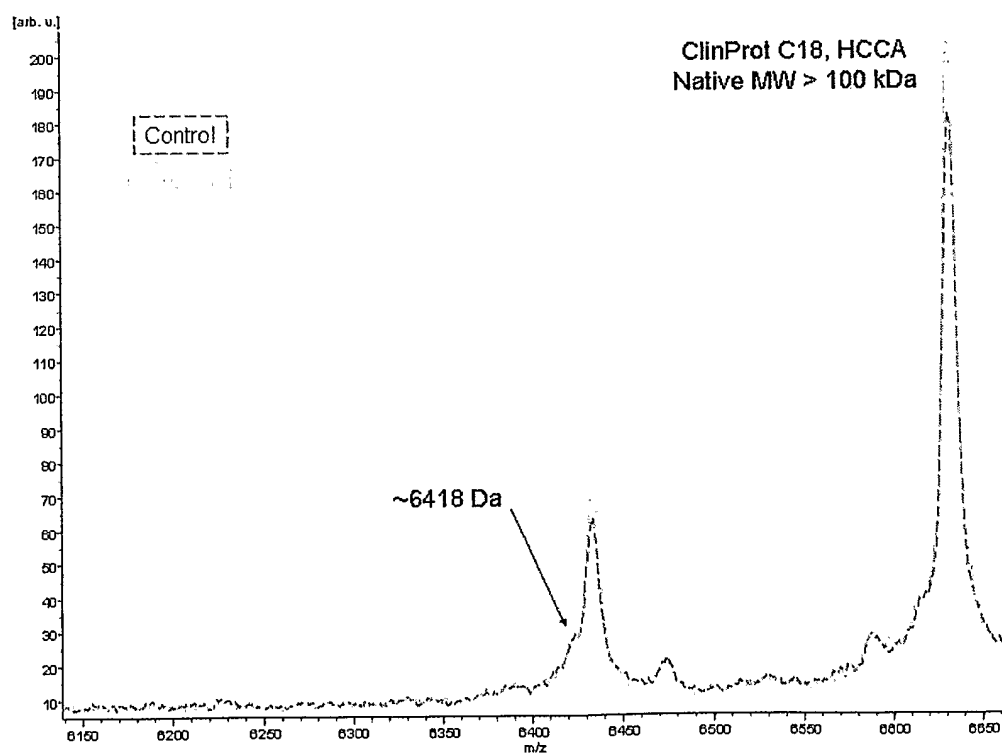
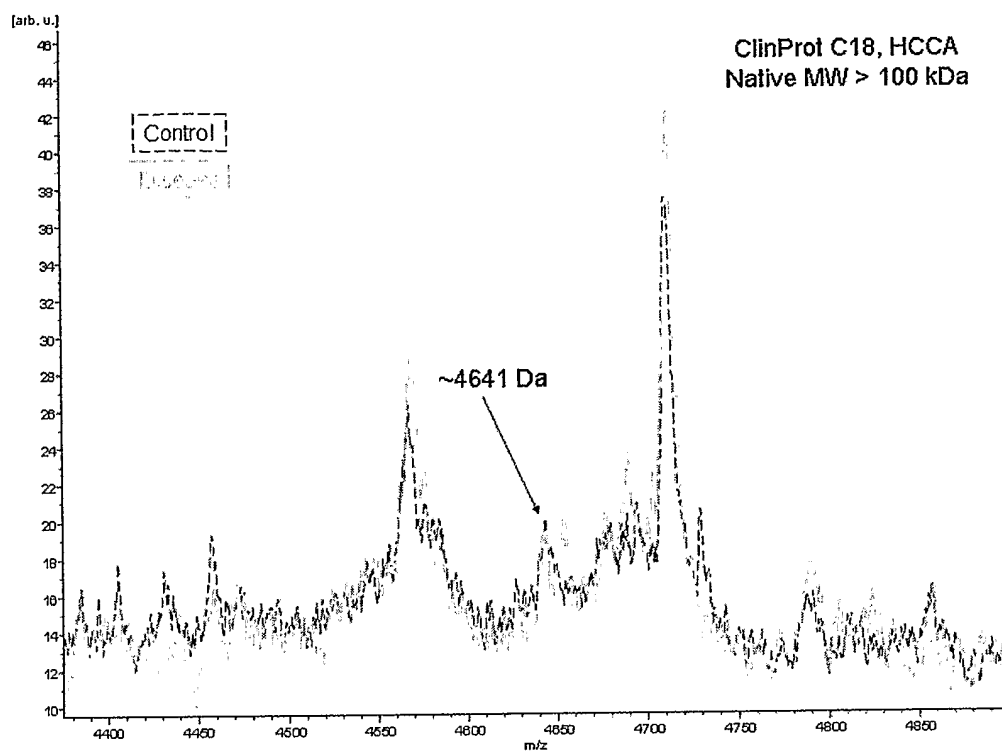


Fig. 53N

87/90

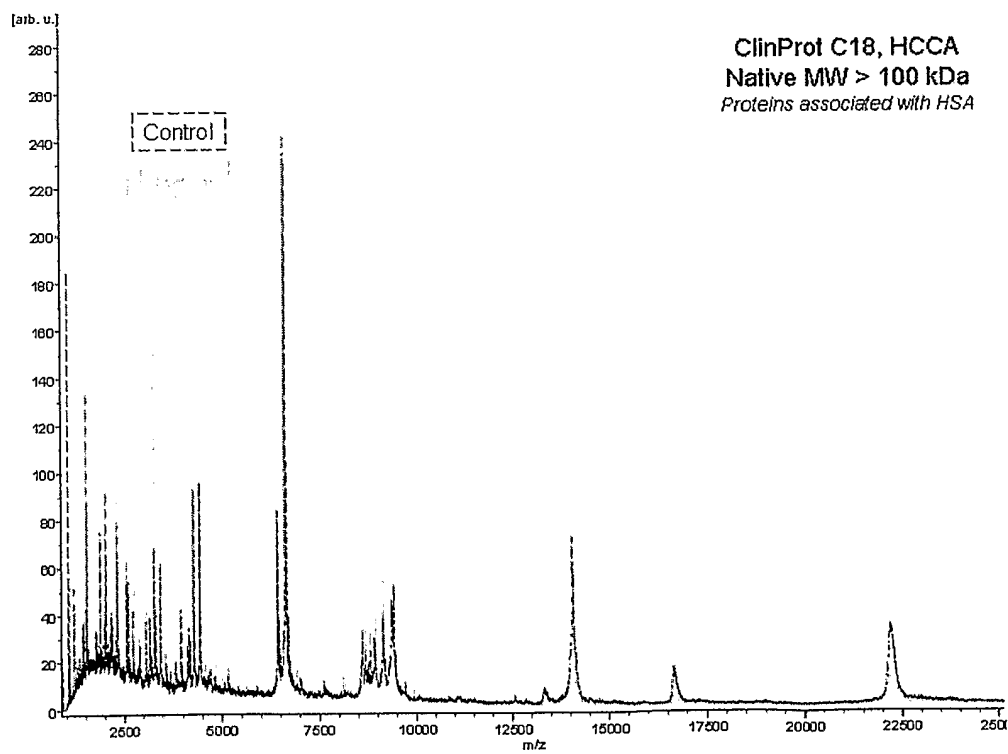
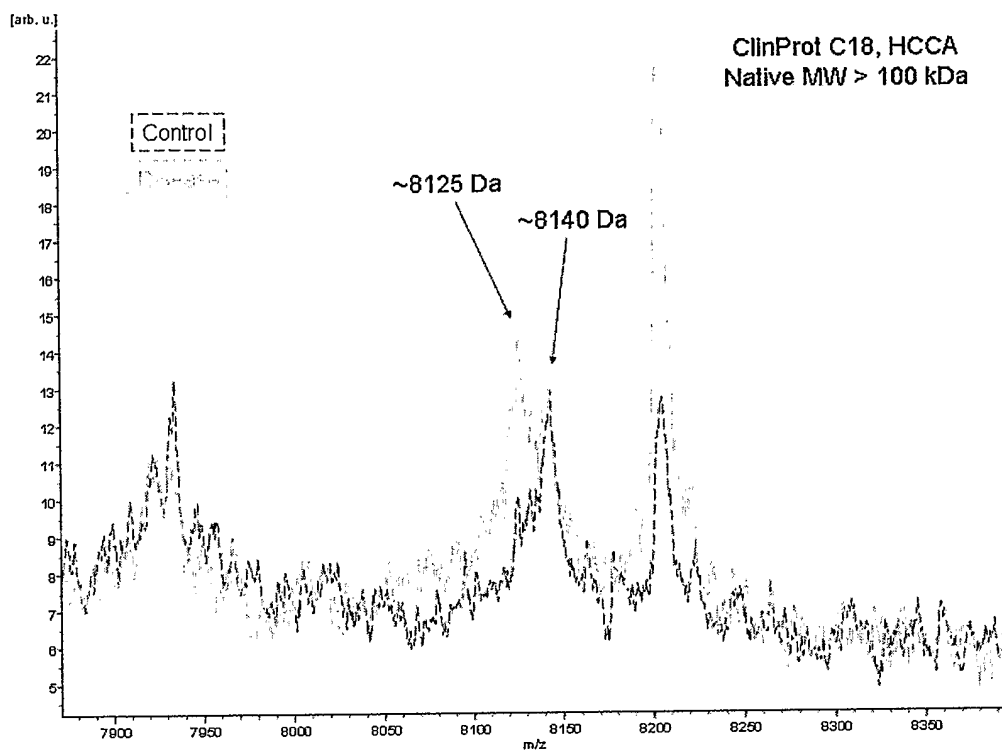


Fig. 53P

88/90

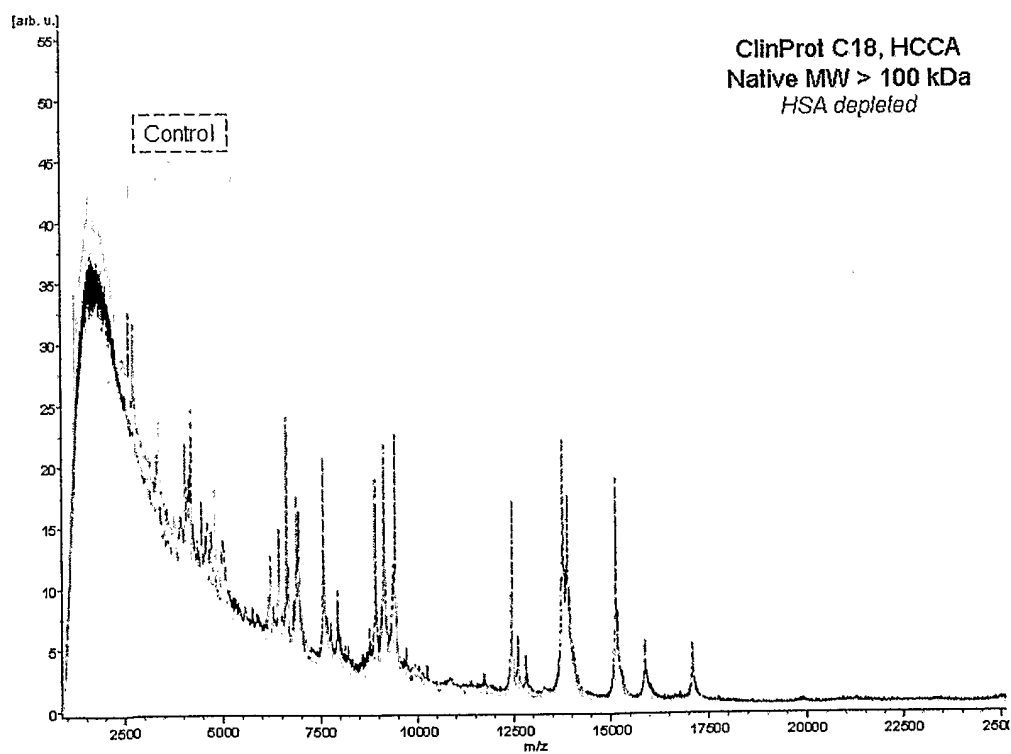
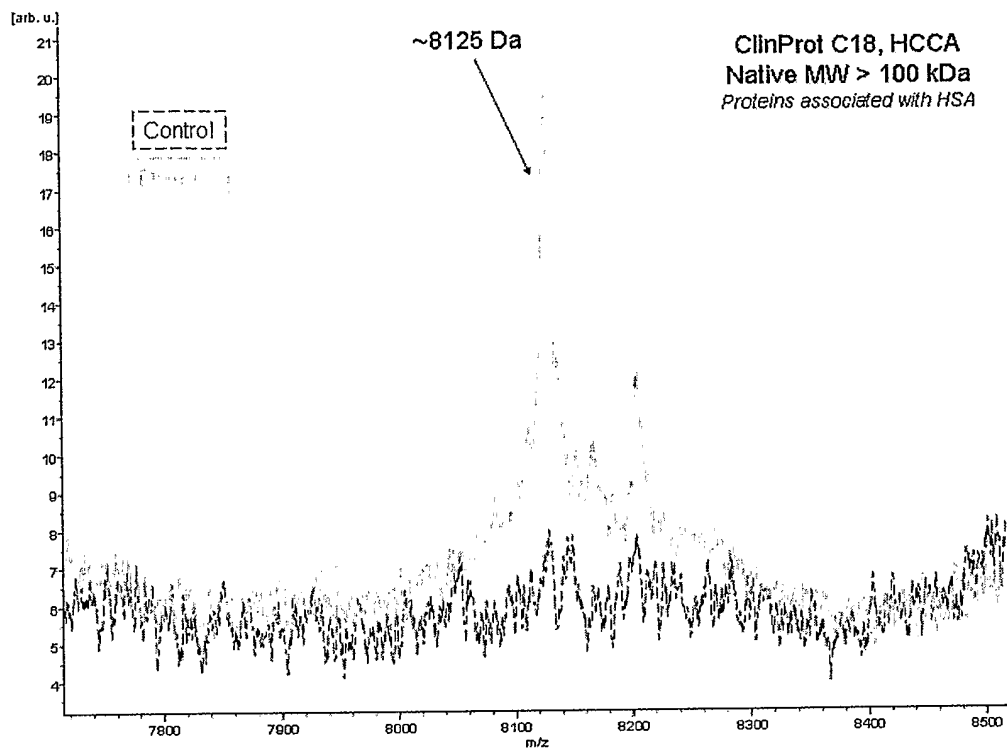


Fig. 53Q

89/90

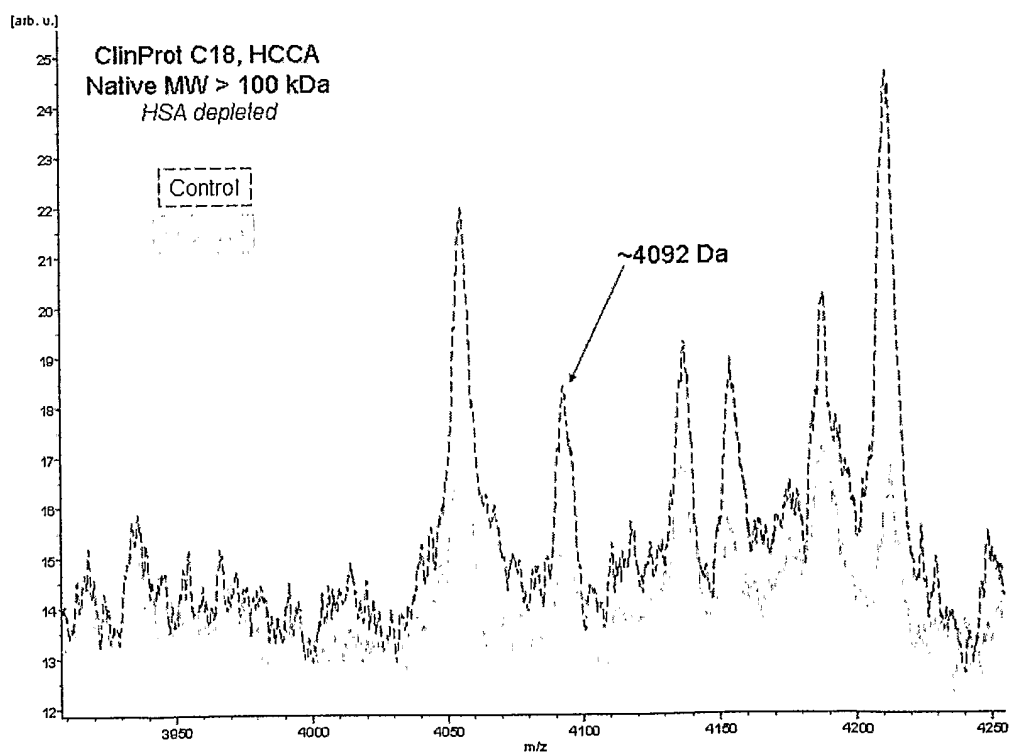
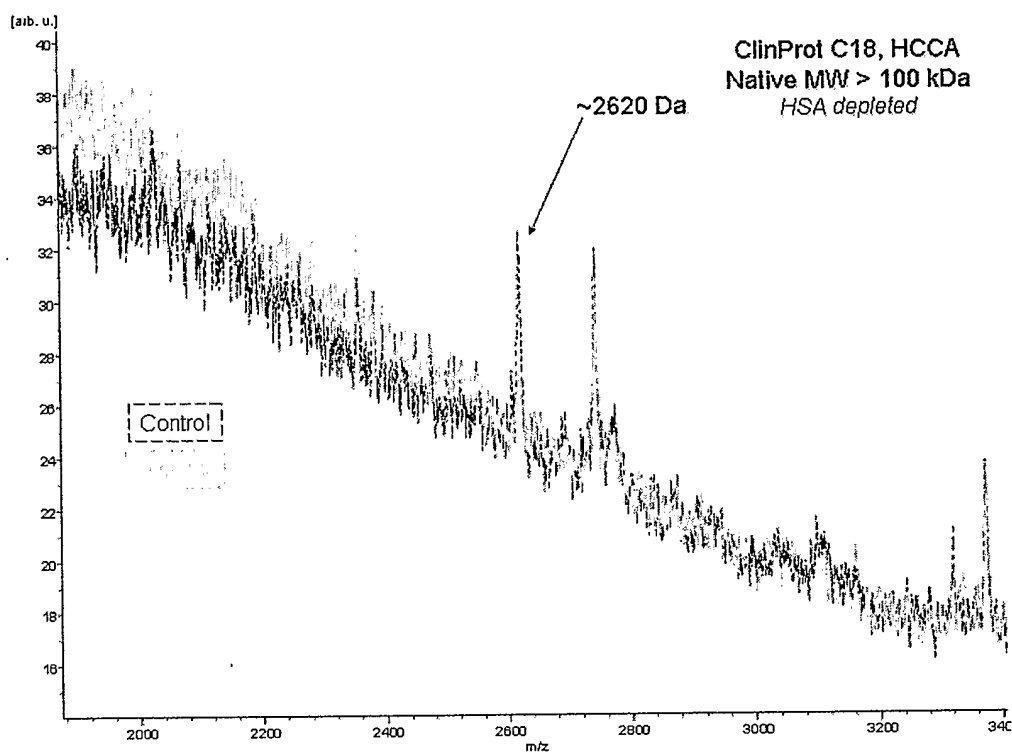


Fig. 53R

90/90

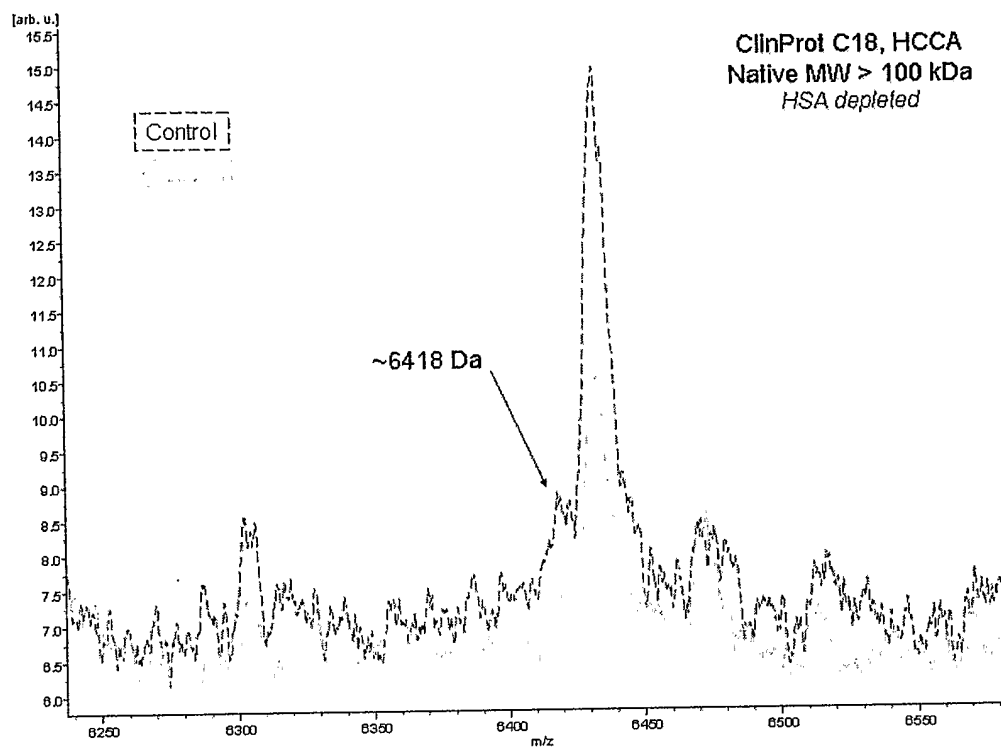


Fig. 53S

1701-2.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> NEUROLAB
LEPORRIER, Nathalie
HERROU, Michel
FELDBLUM, Sophie
SIMONIN, Pierre-Yves
CORNUEL, Jean-François

<120> MARQUEURS ET PROCEDES POUR LE DEPISTAGE PRENATAL D'ANOMALIES
CHROMOSOMIQUES

<130> VMABv1701/2PCT

<150> 04292013.2
<151> 2004-08-06

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Défensine-1 neutrophile humaine

<400> 1

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 2
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> Défensine-2 neutrophile humaine

<400> 2

Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr Gly
1 5 10 15

Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25

<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

1701-2.ST25

<221> misc_feature

<223> Défensine-3 neutrophile humaine

<400> 3

Asp Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30