

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 029 210

②1 N° d'enregistrement national : **14 61553**

⑤1 Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/68 (2016.01)**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 **Date de dépôt** : 27.11.14.

③0 **Priorité** :

④3 **Date de mise à la disposition du public de la demande** : 03.06.16 Bulletin 16/22.

⑤6 **Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire** : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 **Références à d'autres documents nationaux apparentés** :

Demande(s) d'extension :

⑦1 **Demandeur(s)** : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) Etablissement public — FR et UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS — FR.

⑦2 **Inventeur(s)** : HERAULT OLIVIER.

⑦3 **Titulaire(s)** : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) Etablissement public, UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS.

⑦4 **Mandataire(s)** : LLR.

⑤4 **METHODE DE PRONOSTIC D'HEMOPATHIES.**

⑤7 L'invention concerne une méthode de pronostic in vitro de la réponse à une chimiothérapie d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique, comprenant

a. une étape de mesure du niveau d'expression d'au moins un sous-groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes,

b. une étape de comparaison, et

c. une étape de détermination d'un score S de sorte que
- si S est inférieur à 1, ledit individu aura plus de 40% de chance de réponse à la chimiothérapie, et
- si S est supérieur ou égal à 1, ledit individu aura moins de 40% de chance

de réponse à la chimiothérapie.

FR 3 029 210 - A1



Méthode de pronostic d'hémopathies

La présente invention concerne une méthode de pronostic d'hémopathies, plus particulièrement le pronostic personnalisé, ou théranostic, des hémopathies.

5

La leucémie myéloïde chronique fait partie des maladies du sang regroupées sous le nom de « syndromes myéloprolifératifs ». Elle se caractérise par une production excessive et persistante au sein de la moelle osseuse des globules blancs anormaux (des polynucléaires neutrophiles pathologiques). Sans traitement adapté, elle évolue en leucémie aiguë, caractérisée par l'accumulation de cellules immatures dans la moelle osseuse.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie relativement rare, puisque l'on compte environ 600 nouveaux cas par an en France. Elle est un peu plus fréquente chez l'homme que chez la femme. Sa fréquence augmente avec l'âge. Au moment du diagnostic, l'âge médian des patients est de 53 ans.

La maladie est liée à l'apparition d'une anomalie liée à une translocation entre les chromosomes 9 et 22 dans des cellules souches de la moelle osseuse, provoquant l'apparition d'un petit chromosome anormal, le chromosome Philadelphie (du nom de la ville des Etats-Unis où a eu lieu le congrès au cours duquel a été présenté pour la première fois l'anomalie chromosomique - en 1960). Cette anomalie induit l'assemblage par erreur d'un gène du chromosome 9, dénommée ABL, avec un gène du chromosome 22, nommé BCR. Cela produit le gène dit BCR-ABL qui est présent uniquement dans les cellules pathologiques. Ce gène produit une quantité anormalement élevée d'une enzyme, la tyrosine kinase Abelson (ABL) responsable de la production accrue des globules blancs porteurs du chromosome de Philadelphie.

La leucémie myéloïde chronique évolue en trois phases :

- La phase chronique.

C'est à ce stade que la maladie est diagnostiquée chez la plupart des malades. Pendant cette phase, la leucémie évolue lentement et il n'y a pas ou peu de symptômes. Il y a encore peu de globules blancs immatures (leucoblastes) dans la moelle osseuse et dans le sang. Cette phase dure en moyenne de trois à quatre ans en l'absence de traitement.

- La phase d'accélération.

Elle correspond à une augmentation de la proportion de leucoblastes dans le sang et dans la moelle, ainsi qu'à une élévation de la charge BCR-ABL et l'apparition de nouvelles anomalies chromosomiques. Des symptômes, non spécifiques, sont plus fréquents, tels que fatigue, perte d'appétit, fièvre sans raison apparente. Si un

traitement n'est pas mis en œuvre, la maladie évolue en quelques mois vers la phase aiguë, dite de transformation.

- La phase de transformation.

De chronique, la leucémie devient alors aiguë. La moelle osseuse est envahie par des leucoblastes et ne peut plus fonctionner correctement. Le pronostic de cette
5 leucémie aiguë secondaire est très mauvais à court terme.

La prise en charge thérapeutique de la leucémie myéloïde chronique repose sur l'administration de médicaments appelés inhibiteurs de la tyrosine kinase.

L'objectif du traitement est de prévenir la transformation aiguë et sa finalité est l'éradication des cellules exprimant BCR-ABL et d'éviter la transformation en leucémie
10 aiguë.

Au cours de la phase chronique, le traitement de première intention est constitué par l'imatinib mésylate (Glivec®). D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase, dits de seconde génération ont été développés après l'imatinib mesylate: le nilotinib et le dasatinib. Ils
15 sont potentiellement générateurs d'effets secondaires graves. Le nilotinib à une AMM en première ligne.

L'objectif du traitement est l'obtention d'une réponse moléculaire majeure le plus rapidement possible pour éviter une sélection clonale. Cette réponse moléculaire suit la rémission cytologique et cytogénétique.

Il est donc nécessaire de fournir au patient un traitement approprié le plus rapidement possible au patient, permettant l'obtention rapide d'une réponse moléculaire majeure sans induire d'effet secondaire grave. Il existe plusieurs inhibiteurs de tyrosine kinase et un choix thérapeutique inadapté dans la première année aura par ailleurs un
20 coût très élevé pour le système de santé.

Afin d'optimiser les choix thérapeutiques, des méthodes de pronostic visant notamment à évaluer le risque de résistance à un traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK) ont été développées. On peut citer par exemple la demande internationale WO 2012/049329 qui vise à prédire la réponse d'un patient à un traitement ITK en mesurant l'activité kinase sur différents substrats.

Toutefois, une telle méthode est difficile à mettre en œuvre simplement et de manière routinière.

Aussi, le besoin de fournir une méthode de pronostic personnalisé de la LMC demeure, puisqu'il n'existe pas de marqueur permettant d'optimiser simplement la décision thérapeutique entre un traitement ITK de première génération et un traitement
35 ITK de seconde génération ou de générations ultérieures.

Un des buts de l'invention est de palier ces inconvénients.

Un autre but de l'invention est de proposer une méthode de pronostic ayant pour

objectif de minimiser le risque d'échec thérapeutique.

Encore un autre but de l'invention est de réduire le coût de traitement en proposant en première intention le traitement le plus approprié au patient.

Aussi, l'invention concerne une méthode de pronostic *in vitro* de la réponse à une
5 thérapie d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique, à partir d'un
échantillon biologique leucémique issu dudit individu, ladite méthode comprenant :

- a. une étape de mesure du niveau d'expression des gènes d'au moins un sous-
groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes,
ledit groupe de gènes étant constitué de 25 gènes, lesdits 25 gènes
10 comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ
ID NO : 1 à SEQ ID NO : 25,
ledit sous-groupe consistant en 7 gènes, lesdits 7 gènes comprenant ou étant
constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID
NO : 7,
15 une valeur du niveau d'expression mesuré étant obtenue pour chacun des
gènes dudit sous-groupe,
- b. une étape de comparaison de la valeur attribuée à l'étape précédente à
chacun desdits gènes dudit sous-groupe à la valeur attribuée à chacun
desdits gènes dudit sous-groupe obtenue à partir d'un échantillon biologique
20 sain, afin d'obtenir un ratio pour chacun desdits gènes dudit sous-groupe du
niveau d'expression dans l'échantillon biologique leucémique sur le niveau
d'expression dans l'échantillon sain, et
- c. une étape de détermination d'un score S selon la formule 1 suivante

$$S = \sum ratio i - \sum ratio j \quad (\text{formule 1}),$$

25 où ratio i et ratio j représentent respectivement les ratios obtenus pour
lesdits gènes dudit sous-groupe comprenant ou étant constitués par les
séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : i ou SEQ ID NO : j,
où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7,
de sorte que :

- si S est inférieur à 1, ledit individu aura au moins environ 40% de
chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an
après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de
première génération, et
- si S est supérieur ou égal à 1, ledit individu aura moins d'environ 40%
35 de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an
après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de

première génération.

L'invention est basée sur la constatation surprenante faite par l'inventeur qu'au moins 7 gènes spécifiques comprenant ou étant constitué des séquences SEQ ID NO : 1 à 7, appartenant à un groupe de 25 gènes comprenant ou étant constitué des séquences SEQ ID NO : 1 à 25 sont suffisants pour déterminer le pronostic, à 1 an, c'est-à-dire un an après le début d'un traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinases de première génération, suite au diagnostic de la leucémie myéloïde chronique, de patients atteints de leucémie myéloïde chronique et traités avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, i.e. traités avec de l'imatinib mesylate (Glivec®).

Les 25 gènes du groupe susmentionné sont des gènes codant des enzymes participant à la détoxification des cellules dans lesquelles des dérivés réactifs de l'oxygène s'accumulent.

La méthode de l'invention est mise en œuvre de la manière suivante :

- à partir d'un échantillon issu d'un patient, notamment un échantillon de sang, on extrait les acides nucléiques, de préférence les acides ribonucléiques (ARN), selon des méthodes connues de l'homme du métier,

- on mesure la quantité des acides nucléiques issus dudit échantillon et qui comprennent ou sont constitués des séquences SEQ ID NO : 1 à 7, cette mesure permet d'obtenir une valeur du niveau d'expression pour chacun desdits gènes,

- la valeur obtenue pour chacun des gènes précédents est comparée à la valeur obtenue pour les mêmes gènes issus d'un échantillon d'un individu indemne de toute affection hématologique, afin d'obtenir pour chacun desdits gènes des valeurs normalisées, ou ratios,

- lesdites valeurs normalisées sont sommées selon la formule 1 susmentionné, qui peut se résumer par

$$S = \sum ratio \text{ gène SEQ ID NO: } i - \sum ratio \text{ ratio gène SEQ ID NO: } j$$

où i varie de 1 à 5 et j varie de 5 à 6, afin d'obtenir le score S ,

- on détermine le pronostic selon la valeur obtenue pour le score S obtenu à l'étape précédente.

Dans l'invention, on entend par « un échantillon biologique sain », ou par « un échantillon biologique indemne », un échantillon dont le matériel biologique qu'il contient provient d'un ou plusieurs individus sains, ou au moins dépourvu de toute affection hématologique.

Avantageusement, ledit échantillon sain est de même nature que l'échantillon testé.

En d'autres termes, si l'échantillon testé est un échantillon de sang, l'échantillon sain

sera également un échantillon de sang d'un autre individu. De la même manière, si l'échantillon est un échantillon de moelle osseuse, l'échantillon sain sera également un échantillon de moelle osseuse.

Il est à noter que si l'échantillon sain (ou indemne) peut correspondre à un ensemble d'échantillons issus d'individus indemnes d'affections hématologiques, l'échantillon du patient est unique, et ne correspond jamais à un mélange d'échantillons issus de patients différents.

Avantageusement, l'échantillon biologique, et donc l'échantillon biologique issu d'un individu sain, est un échantillon de sang total, de leucocytes, de cellules mononuclées circulantes ou de moelle osseuse.

Dans le contexte de l'invention, il est nécessaire de mesurer le niveau d'expression des gènes comprenant ou étant constitués des séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7. Il est toutefois possible, sans que cela n'altère la réponse pronostique obtenue, de mesurer l'expression d'un ou plusieurs autres gènes du groupe de gènes comprenant ou étant constitué par les séquences SEQ ID NO : 8 à 25, qui reflètent l'état d'oxydation de l'échantillon.

Lorsque la méthode de pronostic de l'invention est mise en œuvre, le score S permet de déterminer le pronostic, et notamment les chances de survie, d'un patient au bout d'un an, après traitement en première intention avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, notamment de l'imatinib, en particulier de l'imatinib mésylate :

- si le score S est inférieur à 1, le patient qui est traité avec l'imatinib mésylate aura environ au moins 40% de chance de présenter, un an après le début du traitement avec ledit imatinib mésylate, une rémission moléculaire majeure, alors que
- si le score S est supérieur ou égal à 1, le pronostic sera plus sévère et le patient qui est traité avec l'imatinib mésylate aura moins d'environ 40% de chance de présenter, un an après le début du traitement avec ledit imatinib mésylate, une rémission moléculaire majeure.

Par « réponse moléculaire majeure », on entend dans l'invention une disparition ou quasi disparition des cellules exprimant des transcrits BCR-ABL, et avantageusement un ratio BCR-ABL/ABL non recombiné inférieur ou égal à 0,1%. L'objectif du traitement donné au patient étant une rémission complète de la maladie, il est bien entendu préférable que le transcrit BCR-ABL ne soit plus du tout détectable. Toutefois, il est actuellement considéré que le ratio susmentionné BCR-ABL/ABL non recombiné inférieur ou égal à 0,1% est très largement satisfaisant. Ceci correspond aux recommandations européennes de suivi des patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique, comme cela a été publié dans Baccarani et al. 2013, Blood, 122(6), 872-

884. En résumé, ces préconisations sont :

- si le taux de transcrit BCR-ABL/ABL mesuré par PCR quantitative est inférieur ou égal à 10% après trois mois de traitement, inférieur ou égal à 1% après six mois de traitement et inférieur ou égal à 0,1% après douze mois de traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinase, le traitement sera optimal,
- alors que si le taux de transcrit BCR-ABL/ABL mesuré par PCR quantitative est supérieur à 10% après six mois de traitement et supérieur à 1% après douze mois de traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinase, il est recommandé de changer le traitement.

Si le ratio BCR-ABL/ABL non recombéné est compris entre 0,1 et 10, on parlera alors de « réponse moléculaire intermédiaire ». Enfin si le ratio BCR-ABL/ABL non recombéné est supérieur à 10, on parlera de « mauvais répondeur » ou de « non répondeur ».

Dans l'invention, les gènes pour lesquels le niveau d'expression est mesuré sont représentés par leur ARN messenger, obtenu lors de la transcription desdits gènes, ou de leur ADN complémentaire. Bien évidemment, la transcription de gènes est un processus bien connu de l'état de la technique qu'il ne sera donc pas nécessaire de rappeler.

Certains des gènes dont le niveau d'expression est mesuré dans le cadre de l'invention sont capables d'exprimer plusieurs variants, c'est à dire plusieurs molécules d'ARN messenger qui diffèrent dans leur séquence. Ces variant sont généralement obtenu par épissage alternatif, ledit épissage permettant d'ajouter, supprimer ou modifier une ou plusieurs parties du produit d'expression dudit gène. Là encore, il n'est pas besoin d'expliquer le mécanisme d'épissage qui est bien connu de l'état de la technique.

Les gènes centraux du procédé selon l'invention sont les suivants :

- le gène CAT représenté par la séquence SEQ ID NO : 1, codant la catalase,
- le gène SOD1 représente par la séquence SEQ ID NO : 2, codant la Superoxide dismutase [Cu-Zn],
- le gène GPX1, représenté par la séquence SEQ ID NO : 3, et en particulier son variant 1, GPX1(1), codant la Glutathion peroxydase 1,
- le gène GPX4(1-2-3), représenté par la séquence SEQ ID NO : 4, et en particulier ses variants 1 à 3, codant la Glutathion peroxydase 4,
- le gène PDRX1 représenté par la séquence SEQ ID NO : 5, et en particulier ses variants 1 à 3, codant la Péroxyrédoxine,
- le gène SOD2(1-2-3), représenté par la séquence SEQ ID NO : 6, codant pour la Superoxyde dismutase 2, et

- le gène GPX2 représenté par la séquence SEQ ID NO : 7, codant la Glutathion peroxydase 2.

En outre, comme indiqué précédemment, du fait de la présence de variants pour certains gènes, il est possible pour mesurer l'expression :

5 - du gène GPX4(1-2-3) de mesurer l'expression des acides nucléiques comprenant ou étant constitués des séquences SEQ ID NO : 4 et/ou SEQ ID NO : 8 et/ou SEQ ID NO : 9,

- du gène PRDX1 de mesurer l'expression des acides nucléiques comprenant ou étant constitués des séquences SEQ ID NO : 5 et/ou SEQ ID NO : 10 et/ou SEQ ID
10 NO : 11, et

- du gène SOD2(1-2-3) de mesurer l'expression des acides nucléiques comprenant ou étant constitués des séquences SEQ ID NO : 6 et/ou SEQ ID NO : 12 et/ou SEQ ID NO : 13.

Le tableau ci-dessus récapitule les gènes avantageux selon l'invention.

Nom du gène	SEQ ID NO	Nom du gène	SEQ ID NO
CAT	SEQ ID NO : 1	PRDX1	SEQ ID NO: 5
SOD1	SEQ ID NO : 2		SEQ ID NO: 28
GPX1	SEQ ID NO : 3		SEQ ID NO: 29
GPX4(1-2-3)	SEQ ID NO : 4	SOD2(1-2-3)	SEQ ID NO: 6
	SEQ ID NO : 26		SEQ ID NO: 30
	SEQ ID NO : 27		SEQ ID NO: 31
		GPX2	SEQ ID NO: 7

15 Les outils moléculaires utilisés dans l'invention pour mesurer l'expression des gènes présentant des variants sont tels qu'ils permettent de mesurer le niveau d'expression de l'ensemble des variants d'un même gène simultanément.

Aussi, dans le cadre de l'invention, lorsque l'on mesure le niveau d'expression du gène GPX4(1-2-3) représenté par la séquence SEQ ID NO : 1, on mesure en fait
20 simultanément l'expression des variants dudit gène, c'est-à-dire que l'on mesure simultanément le niveau d'expression des molécules d'acides nucléique de séquence SEQ ID NO : 4, SEQ ID NO : 8 et SEQ ID NO : 9.

Afin de s'affranchir des variabilités liées aux expérimentations, le niveau d'expression de chacun des gènes d'intérêt de l'invention, c'est-à-dire au moins les
25 gènes de séquence SEQ ID NO : 1 à 7, et de leur variants quand ils existent, choisis parmi les gènes de séquence SEQ ID NO : 1 à 25, est normalisé par rapport au niveau d'expression d'un ou plusieurs gènes dont le niveau d'expression n'est pas modulé (augmenté ou diminué) dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique, ou plus

généralement dans la cadre d'une quelconque pathologie.

Le ou les gènes permettant la normalisation sont communément les gènes dits « de ménage » (« housekeeping genes » en anglais), qui correspondent à des gènes codant des protéines participant à l'architecture des cellules, comme l'actine ou la tubuline, ou encore des gènes codant des enzymes du métabolisme, comme par exemple le gène GAPDH codant la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase.

Ainsi en pratique, pour un gène donné, on mesure son niveau d'expression et on obtient une valeur 1. En parallèle, on mesure le niveau d'expression de la GAPDH, et l'on obtient un score 2.

Le niveau d'expression normalisé dudit gène donné, lorsque l'on utilise par exemple la technique de northern blot, est alors obtenu par le ratio suivant : score1/score2.

Comme mentionné précédemment, le niveau d'expression des gènes étudiés dans la méthode de pronostic susmentionnée est comparé au niveau d'expression des mêmes gènes issus d'échantillons biologiques issus d'individus sains. Le niveau d'expression des gènes issus desdits échantillons biologiques sains est également normalisé par rapport à un ou plusieurs gènes « de ménage ».

Aussi, le ratio i tel que défini dans la formule 1 peut être redéfini de la manière suivante :

$$\text{Ratio } i = \frac{\frac{\text{score1 } i \text{ (patient)}}{\text{score2 (patient)}}}{\frac{\text{score1 } i \text{ (sain)}}{\text{score2 (sain)}}}$$

où

- score1 i (patient) est le niveau d'expression mesuré pour le gène i dans l'échantillon issu de patient,

- score2 (patient) est le niveau d'expression mesuré pour le gène de ménage dans l'échantillon issu de patient,

- score1 i (sain) est le niveau d'expression mesuré pour le gène i dans l'échantillon issu d'un individu sain,

- score2 (sain) est le niveau d'expression mesuré pour le gène de ménage dans l'échantillon issu d'un individu sain.

Ainsi, la formule 1 peut se réécrire de la manière suivante :

$$s = \sum \frac{\frac{\text{score1 } i \text{ (patient)}}{\text{score2 (patient)}}}{\frac{\text{score1 } i \text{ (sain)}}{\text{score2 (sain)}}} - \sum \frac{\frac{\text{score1 } j \text{ (patient)}}{\text{score2 (patient)}}}{\frac{\text{score1 } j \text{ (sain)}}{\text{score2 (sain)}}}$$

où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7.

Une autre formulation serait la suivante :

$$\begin{aligned}
 \mathbf{S} = & \left(\frac{\text{score1 1 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} + \frac{\text{score1 2 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} + \frac{\text{score1 3 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} \right. \\
 & \left. \frac{\text{score1 1 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} + \frac{\text{score1 2 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} + \frac{\text{score1 3 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} \right. \\
 & \left. + \frac{\text{score1 4 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} + \frac{\text{score1 5 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} \right) \\
 & \left. + \frac{\text{score1 4 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} + \frac{\text{score1 5 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} \right) \\
 & - \left(\frac{\text{score1 6 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} + \frac{\text{score1 7 (patient)}}{\text{score2 (patient)}} \right) \\
 & - \left(\frac{\text{score1 6 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} + \frac{\text{score1 7 (sain)}}{\text{score2 (sain)}} \right)
 \end{aligned}$$

Dans le cas particulier de l'utilisation d'une méthode quantitative de mesure de l'expression des gènes, et notamment par PCR quantitative, on utilisera pour chaque gène deux échantillons indépendants, et le ratio sera calculé par le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon1}} - \Delta Ct_{\text{échantillon2}}$ et $\Delta Ct = Ct_{\text{ARN}} - Ct_{\text{ARN de référence}}$ (voir ci-après).

Une autre formulation sera alors la suivante :

$$\mathbf{S} = \sum 2^{-\Delta\Delta Ct_i} - \sum 2^{-\Delta\Delta Ct_j}$$

où i varie de 1 à 5 et j varie de 6 à 7, soit

$$\mathbf{S} = (2^{-\Delta\Delta Ct_1} + 2^{-\Delta\Delta Ct_2} + 2^{-\Delta\Delta Ct_3} + 2^{-\Delta\Delta Ct_4} + 2^{-\Delta\Delta Ct_5}) - (2^{-\Delta\Delta Ct_6} + 2^{-\Delta\Delta Ct_7}).$$

Dans un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une méthode de pronostic *in vitro* telle que définie précédemment, dans laquelle

- si S est supérieur ou égal à 1 et inférieur ou égal à 2, ledit individu aura de 40% à 10% de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

Avantageusement, il est possible d'affiner le pronostic du patient et de déterminer quelle sera sa réponse moléculaire majeure après un an de traitement avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, notamment l'imatinib mesylate.

Ainsi, si :

- le score S est inférieur à 1, ledit individu aura au moins environ 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

5 - le score S est supérieur à 1 mais inférieur ou égal à 2, ledit individu aura de 40% à 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

Cela signifie que plus le score S augmente, plus le risque du patient de développer une résistance à l'inhibiteur de tyrosine kinase de première génération est grand, ou, en
10 d'autres termes, plus les chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure diminuent.

Plus avantageusement, l'invention concerne une méthode de pronostic in vitro telle que définie précédemment, dans laquelle :

15 - si S supérieur à 2, ledit individu aura moins de 10% de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

En d'autres termes, selon ce mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une méthode de pronostic in vitro telle que définie précédemment, dans laquelle, si :

20 - le score S est inférieur à 1, ledit individu aura au moins environ 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

- le score S est supérieur à 1 mais inférieur ou égal à 2, ledit individu aura de 40% à 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est
25 traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et

- S supérieur à 2, ledit individu aura moins de 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

L'inventeur a constaté de manière surprenante que le niveau d'expression d'au
30 moins les 7 gènes de séquence SEQ ID NO : 1 à 7 variait selon le pronostic des patients traités avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

Ainsi, l'invention peut être avantageusement définie comme une méthode de pronostic in vitro de la réponse à une thérapie d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique, à partir d'un échantillon biologique leucémique issu dudit individu,
35 ladite méthode comprenant :

a. une étape de mesure du niveau d'expression des gènes d'au moins un sous-groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes,

ledit groupe de gènes étant constitué de 25 gènes, lesdits 25 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 25,

5 ledit sous-groupe consistant en 7 gènes, lesdits 7 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7,

une valeur du niveau d'expression mesuré étant obtenue pour chacun des gènes dudit sous-groupe,

10 b. une étape de comparaison de la valeur attribuée à l'étape précédente à chacun desdits gènes dudit sous-groupe à la valeur attribuée à chacun desdits gènes dudit sous-groupe obtenue à partir d'un échantillon biologique sain, afin d'obtenir un ratio pour chacun desdits gènes dudit sous-groupe du niveau d'expression dans l'échantillon biologique leucémique sur le niveau d'expression dans l'échantillon sain, et

15 c. une étape de détermination d'un score S selon la formule suivante

$$S = \sum ratio i - \sum ratio j$$

où ratio i et ratio j représentent respectivement les ratios obtenus pour lesdits gènes dudit sous-groupe comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : i ou SEQ ID NO : j,

où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7,

20 de sorte que :

- si le score S est inférieur à 1, ledit individu aura au moins environ 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

25 - si le score S est supérieur à 1 mais inférieur ou égal à 2, ledit individu aura de 40% à 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et

30 - si S supérieur à 2, ledit individu aura moins de 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

Encore plus avantageusement, l'invention concerne la méthode susmentionnée dans laquelle :

- si le score S est inférieur à 1, ledit individu aura

35 - au moins environ 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de

tyrosine kinase de première génération, et

- moins d'environ 60% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire intermédiaire s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

5 - si le score S est supérieur à 1 mais inférieur ou égal à 2, ledit individu aura

- jusqu'à 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire intermédiaire s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et

10 - jusqu'à environ 25% de chances après 1 an d'être mauvais répondeur s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

et

- si S supérieur à 2, ledit individu aura

15 - moins de 10% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire majeure s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération,

- jusqu'à environ 40% de chances après 1 an de présenter une rémission moléculaire intermédiaire s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et

20 - environ 50% ou plus de chances d'être mauvais répondeur s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.

On entend dans l'invention par « réponse moléculaire intermédiaire » la quantité de transcrits BCR-ABL dans les cellules de niveau intermédiaire, et avantageusement un ratio BCR-ABL/ABL non recombiné compris entre 0,1% et 10% inclus ([0,1%-10%]).

On entend dans l'invention par « mauvais répondeur », un patient dont la quantité de transcrits BCR-ABL dans les cellules est de niveau intermédiaire, et avantageusement avec un ratio BCR-ABL/ABL non recombiné supérieur à 10%.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne une méthode de pronostic *in vitro* telle que définie précédemment, dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe par une méthode de mesure quantitative, notamment la méthode de PCR quantitative.

Afin de mesurer le niveau d'expression des gènes d'intérêt, il est possible d'utiliser différentes techniques connues de l'homme du métier :

35 - le northern-blot, est une méthode de biologie moléculaire permettant l'analyse de l'ARN. Elle dérive du Southern blot sauf qu'au lieu d'étudier de l'ADN, on étudie de l'ARN. L'ARN va être analysé par électrophorèse, permettant de séparer les ARN en

fonction de leur taille. Puis ils sont détectés par une sonde d'ADN ou d'ARN. Le northern-blot permet d'apprécier la distribution des ARN dans les tissus et d'étudier leur abondance relative. On peut alors déduire de ces observations l'expression plus ou moins importante de certains gènes. L'utilisation de marqueurs radioactifs ou
5 fluorescents permet de quantifier le niveau d'expression.

- Les puces à ADN : le principe des puces à ADN, dont l'utilisation s'est répandue depuis les années 1990, est apparenté au northern puisqu'il est fondé sur la fixation sur un support de fragments isolés d'ADN rétrotranscrits et l'hybridation avec une sonde faite à partir d'ADN.

10 - La PCR – quantitative : Le principe de la PCR quantitative dite « en temps réel » repose sur la possibilité de suivre la quantité d'ADN présente dans la réaction à tout instant et non à la fin de la PCR (PCR point final). Des sondes fluorescentes se fixent soit sur l'ADN double brin (technologie SYBR) soit sur une séquence d'ADN précise (technologie Taqman et Beacon). Ces sondes ne fluorescent qu'une fois fixées à l'ADN
15 (soit à cause d'un "quencher" soit car la fluorescence nécessite un ADN double brin). Un seuil de fluorescence est établi par le programme de la machine de PCR en temps réel. Une fois que la quantité d'ADN permet aux sondes fluorescentes de dépasser ce seuil alors on obtient un numéro de cycle PCR appelé "Ct" pour "Cycle Threshold" ou cycle seuil. C'est cette valeur qui est à la base des calculs pour quantifier l'ADN de
20 façon absolue ou relative. Il est important de connaître l'efficacité E de la PCR. Pour cela, on effectue une PCR en temps réel sur des échantillons de dilution croissante pour obtenir une courbe étalon correspondant au couple d'amorces utilisé (spécifiques du locus d'intérêt). Par exemple, une série de dilution au 1/2 ($D_{n+1} = D_n/2$) doit, en théorie, donner des courbes d'amplification décalées d'un cycle PCR à chaque fois. Si
25 tel est le cas, la réaction a alors une efficacité égale à 2 (la quantité d'ADN double à chaque cycle). En pratique, le programme de la machine de PCR en temps réel peut calculer l'efficacité E de la réaction. Plus souvent, une PCR en temps réel sur une série de dilution avec une quantité d'ADN initiale connue permet de calculer l'efficacité de la réaction. Les Ct sont placés sur un graphe en échelle logarithmique et l'équation de la
30 régression linéaire passant par ces points donne l'efficacité (c'est le coefficient directeur).

Pour des raisons pratiques et de spécificité, il sera avantageux dans le cadre de l'invention d'utiliser la PCR quantitative utilisant la technologie Taqman et Beacon : l'expression d'un gène est suivie par une amplification par un couple d'amorce
35 spécifiques, et la présence d'une sonde quencher permettant de quantifier le nombre de molécules.

Plus avantageusement, l'invention concerne une méthode de pronostic in vitro telle

que définie précédemment, dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe mise en œuvre en utilisant au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45, notamment les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45 et les séquences suivantes : 5'-tggggaag-3', 5'-ctgctggg-3', 5'-tgctggag-3', 5'-ggtggtgg-3', 5'-caggagaa-3', 5'-ctgccccca-3' et 5'-ctggctgg-3'.

Dans l'invention, il est avantageux de déterminer le niveau d'expression desdits 7 gènes de séquence SEQ ID NO : 1 à 7, et des variants envisagés ci-dessus, représentés par les séquences SEQ ID NO : 26 à 31, avec les oligonucléotides suivants :

Gène	Oligonucléotide sens	Oligonucléotide antisens	Sonde TaqMan®
CAT	5'-cgcagttcggttctccac-3' SEQ ID NO : 32	5'-gggtcccgaactgtgtca-3' SEQ ID NO : 33	5'-tgctggag-3'
SOD1	5'-gcatcatcaatttcgagcag-3' SEQ ID NO : 34	5'-caggccttcagtcagtcctt-3' SEQ ID NO : 35	5'-tggggaag-3'
GPX1	5'-caaccagtttgggcatcag-3' SEQ ID NO : 36	5'-gttcacctcgcacttctcg-3' SEQ ID NO : 37	5'-ggtggtgg-3'
GPX4 (1-2-3)	tacggacccatggaggag-3' SEQ ID NO : 38	5'-ccacacactgtggagctagaa-3' SEQ ID NO : 39	5'-ctgccccca-3'
PRDX1	5'-cactgacaacatggggaagt-3' SEQ ID NO : 40	5'-ttgctctttggacatcagg-3' SEQ ID NO : 41	5'-ctggctgg-3'
SOD2 (1-2-3)	5'-tccactgcaaggaacaacag-3' SEQ ID NO : 42	5'-taagcgtgctcccacacat-3' SEQ ID NO : 43	5'-ctgctggg-3'
GPX2	5'-gtccttgcttcccttgc-3' SEQ ID NO : 44	5'-tggtcaggatctcctcattctg-3' SEQ ID NO : 45	5'-caggagaa-3'

En d'autres termes, ce mode de réalisation avantageux concerne une méthode de pronostic in vitro telle que définie précédemment, dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe mise en œuvre en utilisant au moins les oligonucléotides comprenant ou

5 constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45, tels que

- Les oligonucléotides SEQ ID NO : 32 et 33 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 1
- Les oligonucléotides SEQ ID NO : 34 et 35 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 2
- 10 - Les oligonucléotides SEQ ID NO : 36 et 37 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 3
- Les oligonucléotides SEQ ID NO : 38 et 39 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 4
- Les oligonucléotides SEQ ID NO : 40 et 41 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 5
- 15 - Les oligonucléotides SEQ ID NO : 42 et 43 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 6, et
- Les oligonucléotides SEQ ID NO : 44 et 45 permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 7, et

20 notamment dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe mise en œuvre en utilisant au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45, tels que

- les oligonucléotides SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 33 et 5'-tggggaag-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 1
- 25 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 34, SEQ ID NO : 35 et 5'-ctgctggg-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 2
- 30 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO : 37 et 5'-tgctggag-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 3
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 38, SEQ ID NO : 39 et 5'-ggtggtgg-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 4
- 35 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 40, SEQ ID NO : 41 et 5'-caggagaa-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID

NO : 5

- les oligonucléotides SEQ ID NO : 42, SEQ ID NO : 43 et 5'-ctgccccca-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 6, et
- 5 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 44, SEQ ID NO : 45 et 5'-ctggctgg-3' permettent de mesurer l'expression du gène de séquence SEQ ID NO : 7.

Il est en outre avantageux de normaliser l'expression de chacun des gènes susmentionnés avec l'expression de la GAPDH en utilisant les oligonucléotides de séquence SEQ ID NO : 46 et 47, et de séquence 5'-tggggaag-3'.

Avantageusement, l'invention concerne une méthode de pronostic *in vitro* telle que définie précédemment, où la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe, ladite mesure utilisant les oligonucléotides suivants :

- 15 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 32 et 33 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1,
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 34 et 35 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 2
- 20 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 36 et 37 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 3
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 38 et 39 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 4
- 25 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 40 et 41 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 5
- 30 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 42 et 43 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 6, et
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 44 et 45 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 7.
- 35

L'invention concerne en outre une méthode de diagnostic personnalisé ou théranostic *in vitro*, d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique,

comprenant

- b. une étape de mesure du niveau d'expression d'au moins un sous-groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes, le dit groupe de gènes étant constitué de 25 gènes, lesdits 25 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 25, le dit sous-groupe consistant en 7 gènes, lesdits 7 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7,
- une valeur du niveau d'expression mesuré étant obtenue pour chacun des gènes dudit sous-groupe,
- c. une étape de comparaison de la valeur attribuée à l'étape précédente à chacun desdits gènes dudit sous-groupe à la valeur attribuée à chacun desdits gènes dudit sous-groupe obtenue à partir d'un échantillon biologique sain, afin d'obtenir un ratio pour chacun desdits gènes dudit sous-groupe du niveau d'expression dans l'échantillon biologique leucémique sur le niveau d'expression dans l'échantillon sain, et
- d. une étape de détermination d'un score S selon la formule suivante

$$S = \sum ratio\ i - \sum ratio\ j$$

- où ratio i et ratio j représentent respectivement les ratios obtenus pour lesdits gènes dudit sous-groupe comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : i ou SEQ ID NO : j, où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7, de sorte que

- si S est inférieur à 1, la leucémie myéloïde chronique dudit individu est une leucémie myéloïde chronique susceptible de répondre préférentiellement à un traitement comprenant un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et
- si S est supérieur à 2, la leucémie myéloïde chronique dudit individu est une leucémie myéloïde chronique susceptible de répondre préférentiellement à un traitement comprenant un inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération ou de génération ultérieure.

Dans cette méthode de diagnostic personnalisé, notamment in vitro, de l'invention, il est possible de déterminer quel type de traitement il sera avantageux de fournir au patient atteint de leucémie myéloïde chronique afin d'obtenir une réponse moléculaire majeure.

L'inventeur a fait la constatation surprenante selon laquelle lorsque que l'on mesure le niveau d'expression des gènes appartenant au groupe de gènes représentés par les acides nucléiques de séquences SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7, et que l'on applique la formule 1 susmentionnée, il est possible de déterminer quel sera le meilleur
5 traitement à proposer au patient. En effet, lorsque S, tel que calculé comme indiqué précédemment, est

- inférieur ou égal à 1, le patient aura plus de 40% de chances de présenter une réponse moléculaire majeure à 1an après le début du traitement s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, notamment avec de l'imatinib
10 mesylate, Le traitement à l'imatinib mesylate est donc recommandé et approprié pour le patient.

- supérieur ou égal à 2, le patient aura moins de 10% de chances de présenter une réponse moléculaire majeure à 1an après le début du traitement s'il est traité avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, notamment avec de l'imatinib
15 mesylate. Il sera donc approprié de proposer au patient un autre traitement et notamment de lui proposer un traitement à base d'inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération ou de génération ultérieure.

Dans le cas particulier où $1 < S < 2$, le praticien est confronté à un choix entre le traitement avec un inhibiteur de première génération et de seconde génération ou de
20 génération(s) ultérieure(s). Dans cette situation, le praticien s'aidera alors des éléments cliniques, des co-morbidités en lien avec les effets secondaires potentiels et des scores pronostic clinico-biologiques (Score de Sokal...).

Avantageusement, l'invention concerne une méthode telle que définie précédemment, dans laquelle l'inhibiteur de tyrosine kinase de première génération est
25 l'imatinib ou l'un de ses sels.

L'imatinib mésylate est un inhibiteur compétitif sélectif et puissant de l'ATP pour son site de liaison sur abl, induisant une inhibition de l'activité tyrosine kinase. C'est aujourd'hui le traitement de première intention. Il est utilisé à la dose de 400 mg/j per
os. Il permet d'obtenir des réponses hématologiques classiquement en un à trois mois.

30 En absence de réponse hématologique complète à 3 mois, on parlera d'échec de traitement. Le taux de rémission hématologique à 5 ans est de plus de 98% et le taux de rémission complète cytogénétique à 5 ans est supérieur à 87%.

Les effets secondaires sont fréquents mais d'intensité modérée: nausées, diarrhée, crampes, œdèmes et éruptions cutanées. Ils sont exacerbés chez les sujets âgés.
35 Cependant, ils conduisent rarement à l'arrêt du traitement.

En raison du risque de neutropénie et de thrombopénie, une surveillance régulière de l'hémogramme doit être pratiquée tous les quinze jours pendant les 3 premiers mois.

Il existe des résistances dites primaires et d'autres secondaires (acquises).

Les résistances primaires sont définies comme une situation de non réponse sur le plan hématologique, cytogénétique et moléculaire après des durées de traitement précises. Celles-ci impliquent alors de proposer d'autres alternatives de traitement ou
5 d'augmenter les doses.

Tandis que les résistances secondaires sont définies par une perte de la réponse initiale ou par transformation. Plusieurs mécanismes de résistance ont été mis en évidence: modification de la biodisponibilité intracellulaire de l'imatinib, sur-expression du gène MDR (multidrug resistance), amplification de BCR-ABL, mutations du domaine
10 kinase d'abl (>50 mutations différentes), mécanismes BCR-ABL indépendants. Dans ces cas, une augmentation de la posologie peut parfois être efficace (600 voire 800mg/j) ou un changement vers un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) dit de deuxième génération ou de générations ultérieures.

Dans un autre mode de réalisation avantageux, l'invention concerne une méthode
15 telle que définie ci-dessus, dans laquelle l'inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération est le dasatinib ou le nilotinib, ou l'un de leurs sels.

Le dasatinib (Sprycel®) est un ITK dit de 2^{ème} génération, ayant montré son efficacité chez des patients intolérants ou ayant des mécanismes de résistance par mutations acquises au Glivec®. Il est utilisé à la dose de 100mg/j. En plus de bloquer
20 l'activité kinase de BCR-ABL, il inhibe d'autres voies de transduction comme les kinases de la famille des SRC. Contrairement à l'imatinib, le dasatinib se lie à la fois au domaine kinase de ABL dans sa conformation active et inactive, ce qui explique sa grande efficacité. La plupart des mutations de sensibilité diminuée à l'imatinib sont sensibles au dasatinib, à l'exception d'une mutation du site ATP d'ABL, associée à une
25 résistance complète (Thréonine en Isoleucine au niveau du codon 315, T315I).

Plus récemment, cette molécule a obtenu une AMM pour une utilisation en deuxième ligne.

Parmi les effets indésirables, on note surtout des rétentions hydriques (épanchements pleuraux, péricardiques), une toxicité hématologique, diarrhée. Ainsi
30 cette molécule est à éviter en cas d'antécédents d'hypertension, de cardiopathie ou de maladie respiratoire. Quelques cas d'hypertension artérielle pulmonaire ont été rapportés.

Le nilotinib (Tasigna®) est, comme le dasatinib, un ITK dit de 2^{ème} génération, ayant montré son efficacité chez des patients intolérants ou ayant des mécanismes de
35 résistance par mutations acquises au Glivec®. Il s'agit d'un analogue de l'imatinib plus puissant. Il peut cibler également d'autre protéine kinase comme les récepteurs c-Kit. Comme l'imatinib, le nilotinib se lie à la conformation inactive de la kinase. Il est

préconisé à la dose de 400mg 2 fois par jour à 12h d'intervalle, et à distance des repas. Les aliments entraînent une modification de sa biodisponibilité.

Le nilotinib est bien toléré, les principaux effets indésirables sont l'augmentation de la lipase, de la bilirubine, de la glycémie, une hypophosphatémie, une toxicité cutanée ainsi qu'une toxicité hématologique moins importante que le dasatinib. On évitera d'utiliser le nilotinib chez les patients ayant des antécédents de pancréatite ou de diabète mal équilibré, ainsi que les patients présentant des artériopathies

Les inhibiteurs de tyrosine kinase de génération ultérieure sont notamment : le bosutinib, le ponatinib ou des composés en phase de développement clinique, tel que le bafetinib.

L'invention concerne en outre un kit, ou trousse, comprenant,

a. au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45, en particulier les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45 ainsi que les oligonucléotides constitués des séquences suivantes : 5'-tggggaag-3', 5'-ctgctggg-3', 5'-tgctggag-3', 5'-ggtggtg-3', 5'-caggagaa-3', 5'-ctgccccca-3' et 5'-ctggctgg-3', et

b. les acides nucléiques d'un ou plusieurs échantillons biologiques sains, notamment les acides nucléiques d'un ou plusieurs échantillons de cellules polynucléaires ou neutrophiles du sang périphérique d'un ou plusieurs individus non leucémiques.

L'échantillon biologique sain est tel qu'il est défini précédemment.

Avantageusement, le kit, ou la trousse, comprend :

a. au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 47, en particulier les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45 ainsi que les oligonucléotides constitués des séquences suivantes : 5'-tggggaag-3', 5'-ctgctggg-3', 5'-tgctggag-3', 5'-ggtggtg-3', 5'-caggagaa-3', 5'-ctgccccca-3', 5'-ctggctgg-3', 5'-ctggctgg-3' et 5'-tggggaag-3', et

b. les acides nucléiques d'un échantillon biologique sain, notamment les acides nucléiques d'un échantillon de cellules polynucléaires ou neutrophiles du sang périphérique d'un individu non leucémique.

Les acides nucléiques de l'échantillon sain sont avantageusement des ARNs conservés dans des conditions limitant leur dégradation.

La trousse ou le kit peut en outre contenir des instructions sur un support approprié permettant de mettre en œuvre la méthode de diagnostic ou de théranostic susmentionnées. Il peut s'agir par exemple d'instructions définissant le programme de PCR quantitative (nombre de cycles, températures etc...), et aussi un produit programme d'ordinateur sur un support approprié permettant de réaliser le calcul de S,

à l'aide de la formule susmentionnée.

Un autre aspect de l'invention porte sur un logiciel ou un produit programme d'ordinateur conçu pour mettre en œuvre la méthode susmentionnée et/ou comprenant des portions/moyens/instructions de code de programme pour l'exécution de ladite
 5 lorsque ledit programme est exécuté sur un ordinateur. Avantageusement ledit programme est compris dans un support d'enregistrement de données lisible par ordinateur. Un tel support n'est pas limité à un support d'enregistrement portable tel qu'un CD-ROM mais peut également faire part d'un dispositif comprenant une mémoire interne dans un ordinateur (par exemple des RAM et/ou ROM), ou de dispositif à
 10 mémoires externes tels des disques durs ou des clefs USB, ou un serveur à proximité ou à distance.

L'invention sera mieux comprise à la lumière des quatre figures et de l'exemple suivants.

15 **Brève description des figures**

La **figure 1** représente un graphique montrant le niveau d'expression des 25 gènes testés chez les 35 patients testés. Le niveau contrôle (correspondant à l'expression des gènes dans des échantillons sains est normalisé à 1. L'échelle est logarithmique.

Les gènes sont les suivants : #1 : SOD2, #2 : GLRX1(1-2), #3 : GSR, #4 : PRDX5(1-
 20 3), #5 : PRDX3(1-3), #6 : TXN, #7, CAT, #8 : SOD1, #9, GPX1(1), #10 : GPX4(1-2-3), #11 : PRDX2(1), #12 : PRDX1(1-2-3), #13 : GPX1(2), #14 : GPX3, #15 : GPX7, #16 : TXN2, #17 : PRDX5(2), #18 : GLRX2(2), #19 : GLRX5, #20 : PRDX2(3), #21 : PRDX4, #22 : GLRX3, #23 : PRDX6, #24 : GPX2 et #25 : GLRX2(1).

La **figure 2** représente un graphique montrant le niveau d'expression des 25 gènes
 25 testés chez les 35 patients, et regroupés selon leur réponse moléculaire : A : réponse moléculaire majeure, B : réponse moléculaire intermédiaire et C : mauvais répondeurs.

La **figure 3** est un histogramme montrant la répartition en pourcentage des types des réponses moléculaire selon le score S calculé. Les régions en noir correspondent à une réponse moléculaire majeure, les régions en hachuré correspondent à une réponse
 30 moléculaire intermédiaire, et les régions grises correspondent aux mauvais répondeurs.

La **figure 4** est un graphique représentant les valeurs du score S (ordonnée) en fonction de la distribution des patients selon la réponse moléculaire à l'imatinib mesylate obtenue un an après le diagnostic (en abscisse de gauche à droite : majeure, intermédiaire ou non répondeur)

EXEMPLE :**Matériel et Méthodes****1- Isolement des polynucléaires sanguins**

Les polynucléaires du sang périphérique sont isolés par centrifugation sur Ficoll de
5 densité $d=1,077$.

2- Extraction des ARN

Les ARN sont extraits à partir de $5 \cdot 10^6$ cellules. Ces dernières ont été lavées deux
fois en PBS, suivit de l'ajout de 1 mL de Trizol® (Invitrogen). Les tubes sont agités
(vortex®) pendant 15 min pour bien lyser les cellules. 200 μ L de chloroforme sont
10 ajoutés pour obtenir 3 phases, suite à un passage au vortex tube par tube pendant 45
sec et à une centrifugation de 15 min à 12000 g à 4 °C. La phase aqueuse supérieure
contenant les ARN, la phase intermédiaire renfermant les protéines et la phase
inférieure correspondant au chloroforme et phénol. Une deuxième extraction au
chloroforme est réalisée sur la phase supérieure contenant les ARN. Puis, 500 μ L
15 d'isopropanol sont ajoutés à la phase supérieure de la deuxième extraction au
chloroforme. Il est nécessaire de retourner les tube une dizaine de fois pour que
l'isopropanol précipite les ARN, puis ces derniers sont centrifugés 10 min à 12000 g. Un
premier lavage des ARN est effectué sur le culot du tube auquel est ajouté 1 mL
d'éthanol 75 % suivant une centrifugation de 5 min à 7500 g. Un deuxième lavage est
20 réalisé avec 500 μ L d'éthanol 75 %. Le surnageant est éliminé une nouvelle fois par
retournement et les tubes sont déposés à l'envers sur des compresses pendant au
moins 20 min pour que tout l'éthanol s'évapore. L'ARN est ensuite dissout dans 40 μ L
d'eau DEPC et les tubes ont été mis 1 h à -20 °C pour une meilleure dissolution des
ARN.

25 3- Dosage des ARN, analyse de leur pureté et de leur qualité

La concentration des ARN est évaluée par la lecture de l'absorbance à 260 nm à
l'aide du spectrophotomètre NanoDrop®. La détermination de la contamination des
ARN s'effectue en faisant le rapport de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm.
L'ARN est considéré comme exempt de contamination pour un rapport A260/A280
30 compris entre 1,9 et 2,1. La qualité des ARN est ensuite vérifiée par Bioanalyzer selon
les recommandations du fabricant.

4- Reverse Transcription (RT) :

La transcription inverse (Reverse Transcription, RT) est la réaction de synthèse d'un
brin d'ADN avec pour matrice un brin d'ARN. La transcriptase inverse est une ADN
35 polymérase ARN dépendante synthétisant un brin d'ADN dit complémentaire (ADNc)
d'un brin d'ARN. De plus, cette enzyme ne peut synthétiser l'ADNc qu'à partir d'une
zone double brin créée par l'hybridation de l'ARN avec une amorce.

La RT est réalisée avec le kit « SuperScript® VILO™ cDNA synthesis kit » (Invitrogen). Une réaction est réalisée avec un tube de 5 µg d'ARN précédemment aliquoté. L'incubation des tubes 10 min à 70°C permet de linéariser l'ARN pour une meilleure synthèse de l'ADNc. Puis, 50 µL du mélange réactionnel suivant sont ajoutés à chaque tube : 20 µL d'eau DEPC, 20 µL de tampon 5 X VILO contenant des amorces aléatoires, du MgCl₂, des dNTPs et un tampon optimisé pour la RT, 10 µL de SuperScript® Enzyme Mélange réactionnel 10 X contenant la SuperScript® III RT (ADN polymérase ARN dépendante réduisant l'activité des RNaseH) et un inhibiteur des RNase le RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Les tubes sont incubés 10 min à température ambiante puis 1 à 3 h à 42°C qui est la température optimale pour que la SuperScript® III RT synthétise l'ADNc. Les brins d'ARN matrice sont détruits en incubant les tubes 5 min à 85°C.

Pour vérifier que la qualité de la RT, une PCR de contrôle est réalisée pour le gène codant pour la β-actine, présent dans toutes cellules non musculaires. Le mélange réactionnel suivant est préparé pour une réaction : 35,6 µL d'eau DEPC (Invitrogen), 5 µL de tampon 10 X (Roche), 1 µL de dNTPs (Amersham Biosciences), 1 µL d'amorce forward, 1 µL d'amorce reverse (Invitrogen), 2 µL de MgCl₂ (Roche) et 0,4 µL de Taq (EuroBio). Mélange réactionnel auquel 4 µL de produit de RT sont ajoutés. La PCR est réalisée sur le thermocycler BIO-RAD C1000™ Thermal Cycler selon le programme : 95°C pendant 3 min (94°C pendant 3 sec, 60°C pendant 30 sec, 72°C durant 30 sec) ceci répété 34 fois, 72°C durant 2 min et 12°C ensuite. La migration a été effectuée sur gel d'agarose imprégné de BET, la révélation est faite sous UV.

5- PCR en temps réel

La PCR en temps réel est réalisée sur un faible nombre de cycles et en utilisant un fluorochrome dont la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'ADN.

Le type de fluorescence détectée ici provient des sondes. L'utilisation de sondes se liant au brin d'ADN correspondant au gène d'intérêt, permet d'obtenir des courbes de fluorescence proportionnelle à la quantité d'ADN. En effet, une sonde est composée d'ADN complémentaire au gène cible et comprend à une extrémité, un fluorophore et à l'autre extrémité un "quencher" ou fluorophore extincteur. Lorsque les amorces se fixent de manière spécifique au brin d'ADN et que la Taq polymérase progresse le long du brin d'ADN (où est fixée la sonde), le fluorophore est libéré et émet sa fluorescence. Au fur et à mesure des cycles, la fluorescence émise va croître et sera proportionnelle à la quantité d'amplicons formés.

Les sondes, ont une séquences permettant de détecter des motifs de 8 à 9 nucléotides dont la prévalence dans le transcriptome permet une couverture optimale des gènes. Avec ce type de sonde, la spécificité de la PCR provient des primers. Le

cycle-seuil ou Ct (threshold cycle) correspond au cycle au cours duquel la fluorescence de l'ADN amplifié devient significativement différente du bruit de fond. Ce seuil permet de comparer toutes les amplifications pendant la phase exponentielle. Pour que cette relation existe, il est nécessaire que le rendement de l'amplification soit de 100 %, autrement dit, que l'efficacité E du système soit de 1. En effet, si E est différent de 1, la relation entre le Ct et la quantité initiale N₀ d'ARN n'est plus linéaire, et toute quantification est alors impossible. L'efficacité E d'une PCR peut être définie en traçant une courbe sur laquelle est représentée le Ct en fonction de la dilution du couple d'amorces. D'après l'équation suivante, la pente de la droite correspond à $-1/(\log(1+E))$. À partir de cette équation on peut écrire $E=10^{-1/\text{pente}-1}$. Donc, lorsque l'efficacité E de la PCR est de 1, la pente de la droite est égale à $-1/\log 2 = -3,32$. Les couples d'amorces doivent présenter des efficacités E supérieures à 0,85, seuil arbitraire en dessous duquel la PCR n'est plus quantitative. D'autre part, pour comparer la quantité d'ARN présente dans deux échantillons différents, il faut un autre ARN invariant servant de référence c'est-à-dire dont l'efficacité d'amplification soit proche de l'efficacité d'amplification de l'ARN étudié. Ces ARN sont rétro transcrits à partir de gènes dits « gènes de ménages » c'est-à-dire dont la transcription ne varie pas ou peu. Pour comparer les quantités relatives d'ARN d'intérêts entre deux échantillons, il faut dans un premier temps normaliser la quantité d'intérêt relativement à la quantité d'ARN de référence. Cette mesure, appelée ΔCt correspond au calcul suivant :

$\Delta Ct = Ct_{\text{ARN}} - Ct_{\text{ARN de référence}}$. Puis on calcule le $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon1}} - \Delta Ct_{\text{échantillon2}}$ pour obtenir la variation relative exprimée par le nombre $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

L'étape de PCR en temps réel est réalisée en utilisant le kit « LightCycler® 480 Probes Master » de Roche.

Pour une réaction, le mélange réactionnel suivant est préparé : 1,4 µL d'eau « PCR grade », 5 µL de pré-mélange réactionnel 2 X (contenant l'ADN polymérase Taq Man, le MgCl₂, les dNTPs), 0,25 µL de chaque amorces du gène à quantifier, 0,1 µL de sonde UPL. L'ADNc est dilué au 1/3 et une gamme étalon de ce dernier est réalisée de 10⁻¹ à 10⁻³ puis diluée au 1/3 aussi, pour évaluer l'efficacité de la PCR en temps réel. Les mélange réactionnel et ADNc ont été distribués en plaque 384 puits par le biais d'un système de pipetage automatique : epMotion® de vaudau-eppendorf. 7 µL de mélange réactionnel et 3 µL d'ADN dilué au 1/3 sont distribués pour une réaction. La PCR en temps réel est effectuée avec le LightCycler® 480 de Roche avec le programme suivant : incubation à 95°C pendant 5 min pour éviter les interactions entre les amorces et donc améliorer la sensibilité, 45 cycles de PCR à 95°C pendant 10 sec et 60°C durant 30 sec et pour finir un refroidissement à 40°C pendant 30 sec. La longueur d'onde d'excitation des sondes est de 465nm et celle de détection de 510nm.

Les résultats obtenus à partir du LightCycler® 480 sont analysés avec le logiciel « LightCycler® 480 Software ».

La qRT-PCR est effectuée sur 7 gènes (isoformes): SOD1, SOD2, CAT, SOD1, GPX1(1), GPX4(1-2-3), PRDX1(1-2-3) avec calcul des ΔC_t (vs. GAPDH). Le calcul du $\Delta\Delta C_t$ ($\Delta C_t - \Delta C_{tm}$) est effectué pour chacun des gènes. Le coefficient de variation par rapport au témoins sains est ensuite déterminé : $RQ = 2^{\exp(-\Delta\Delta C_t)}$ pour chacun des gènes. Le score S du patient est calculé en utilisant les RQ calculés pour chaque gène, selon la formule suivante :

$$S = \sum RQ[CAT, SOD1, GPX1(1), GPX4(1-2-3), PRDX1(1-2-3)] - \sum RQ[SOD2, GPX2].$$

10 Oligonucléotides utilisés

gène	Oligo sens	Oligo antisens	sonde
<i>SOD1</i>	Gcatcatcaatttcgagcag SEQ ID NO : 32	Caggccttcagtcagtcctt SEQ ID NO : 33	tggggaag
<i>SOD2</i>	Tccactgcaaggaacaacag SEQ ID NO : 34	Taagcgtgctcccacacat SEQ ID NO : 35	ctgctggg
<i>CAT</i>	Cgcagttcgggtctccac SEQ ID NO : 36	Gggtcccgaactgtgtca SEQ ID NO : 37	tgctggag
<i>GPX1_var1</i>	Caaccagtttgggcatcag SEQ ID NO : 38	Gttcacctcgcaacttctcg SEQ ID NO : 39	ggtggtgg
<i>GPX2</i>	Gtccttggttcccttgc SEQ ID NO : 40	Tgttcaggatctcctcattctg SEQ ID NO : 41	caggagaa
<i>GPX4_var1&2&3</i>	Tacggacctatggaggag SEQ ID NO : 42	Ccacacactgtggagctagaa SEQ ID NO : 43	ctgccccca
<i>PRDX1_var1&2&3</i>	Cactgacaacatggggaagt SEQ ID NO : 44	Tttgctcttttgacatcagg SEQ ID NO : 45	ctggctgg
<i>GAPDH</i>	Agccacatcgctcagacac SEQ ID NO : 46	Gcccaatacgaccaaattcc SEQ ID NO : 47	tggggaag

Résultats

L'inventeur est parti de l'hypothèse de départ selon laquelle le mauvais pronostic d'une leucémie myéloïde chronique serait lié à la fréquence en cellules souches leucémiques. Les cellules souches leucémiques présentent un taux réduit de dérivés réactifs de l'oxygène (ou ROS). Aussi, pour maintenir un taux faible de ROS, les cellules souches leucémiques devraient présenter une activité métabolique de détoxification des ROS élevée.

Un des moyens d'augmenter le métabolisme de détoxification des ROS est de modifier le niveau d'expression des gènes codant les enzymes impliquées dans ce processus.

Dans un premier temps, l'inventeur a mesuré par PCR quantitative le niveau d'expression de 25 gènes codant les principales enzymes participant à la détoxification des ROS (et représentés par les séquences SEQ ID NO : 1 à 25, ou les variants de ces séquences lorsqu'ils existent) dans plusieurs échantillons biologiques (qui sont des

échantillons sanguins de donneurs non atteints de leucémie, desquels ont été purifiés les polynucléaires neutrophiles) en normalisant ce niveau d'expression à celui de la GAPDH.

Cette mesure du niveau d'expression a permis d'établir un niveau d'expression standard dans les cellules saines.

Dans un second temps, l'inventeur a réalisé, les mêmes types de mesures des niveaux d'expression sur des échantillons lors du diagnostic de 35 patients atteints de leucémie myéloïde chronique par le Service d'Hématologie Biologique du centre hospitalier universitaire de Tours en France.

Les niveaux d'expression de chacun des 25 gènes, pour chacun des 35 patients, ont été comparés au niveau d'expression desdits 25 gènes dans les échantillons sains.

La **figure 1** montre cette comparaison.

On constate de cette figure que l'expression des 25 gènes varie par rapport au niveau d'expression mesuré dans les échantillons sains, avec pour certains gènes une grande variabilité entre les patients. C'est le cas notamment pour les gènes SOD2 : #1, CAT : #7, SOD1 : #8, GPX1(1) : #9, GPX4(1-2-3) : #10, PRDX1(1-2-3) : #12 et GPX2 : #24.

Les 35 patients étant suivis régulièrement sur le long terme, l'inventeur a pu accéder aux données de ceux-ci, notamment leurs réponses moléculaires après un an de traitement avec de l'imatinib mésilate.

Parmi les 35 patients, 10 présentaient une réponse moléculaire majeure à 1 an, 16 présentaient une réponse moléculaire intermédiaire et 9 étaient mauvais répondeurs audit traitement.

En regroupant les patients selon les catégories de réponse susmentionnées, l'inventeur a pu constater que le niveau d'expression desdits 7 gènes susmentionnés variait selon la réponse moléculaire. Les résultats sont présentés à la **figure 2**.

Sur cette base, l'inventeur a proposé pour chaque patient de sommer les valeurs de niveau d'expression pour les gènes dont l'expression était plus élevée dans les mauvais répondeurs, et d'y retrancher le niveau d'expression dont l'expression était plus faible dans les mauvais répondeurs.

Aussi, l'inventeur a proposé la formule

$$S = \sum RQ[CAT,SOD1,GPX1(1),GPX4(1-2-3),PRDX1(1-2-3)] - \sum RQ[SOD2,GPX2].$$

Rétrospectivement, avec les données issues des échantillons de chaque patient prélevés au diagnostic avant le traitement avec l'imatinib mesylate, l'inventeur a pu calculer le score S.

Les données sont regroupées dans les tableaux suivants :

Patients ayant une réponse moléculaire majeure à 1an

patient	SOD2	CAT	SOD1	GPX1(1)	GPX4(1-2-3)	PRDX1(1-2-3)	GPX2	Score S
1	0,04	0,16	0,29	0,15	0,16	0,32	0,00	1,03
2	0,05	0,07	0,14	0,10	0,08	0,13	0,13	0,33
3	0,06	0,14	0,26	0,09	0,22	0,16	0,73	0,09
4	0,01	0,30	0,41	0,26	0,29	0,59	0,01	1,83
5	0,02	0,06	0,08	0,07	0,13	0,04	0,10	0,27
6	0,01	0,32	0,26	0,26	0,23	0,38	0,02	1,42
7	0,01	0,43	0,36	0,79	0,62	0,53	0,04	2,68
8	0,16	0,19	0,37	0,17	0,28	0,49	0,42	0,93
9	0,01	0,18	0,30	0,14	0,06	0,32	0,01	0,99
10	0,02	0,20	0,33	0,09	0,06	0,54	0,04	1,16

Patients ayant une réponse moléculaire intermédiaire à 1 an

patient	SOD2	CAT	SOD1	GPX1(1)	GPX4(1-2-3)	PRDX1(1-2-3)	GPX2	score S
11	0,01	0,29	0,24	0,09	0,23	0,26	0,00	1,10
12	0,00	0,10	0,17	0,02	0,05	0,07	0,00	0,40
13	0,02	0,08	0,25	0,22	0,18	0,38	0,00	1,09
14	0,01	0,29	0,48	0,29	0,35	0,63	0,03	2,01
15	0,02	0,34	0,18	0,05	0,07	0,13	0,01	0,74
16	0,01	0,24	0,21	0,10	0,16	0,10	0,06	0,75
17	0,01	0,49	0,85	0,31	0,66	0,69	0,01	2,98
18	0,01	0,15	0,34	0,10	0,30	0,34	0,00	1,21
19	0,01	0,74	0,57	1,20	1,15	1,49	0,09	5,06
20	0,08	0,12	0,22	0,08	0,16	0,08	0,00	0,57
21	0,01	0,35	0,29	0,48	0,36	0,98	0,02	2,43
22	0,01	0,09	0,07	0,04	0,03	0,12	0,06	0,27
23	0,02	0,11	0,45	0,75	0,24	0,44	0,00	1,97
24	0,02	0,19	0,16	0,06	0,20	0,28	0,00	0,87
25	0,00	0,37	0,33	0,13	0,27	0,29	0,00	1,38
26	0,04	0,18	0,17	0,12	0,12	0,16	0,01	0,70

Patients mauvais répondeurs à 1 an

patient	SOD2	CAT	SOD1	GPX1(1)	GPX4(1-2-3)	PRDX1(1-2-3)	GPX2	score S
27	0,02	0,16	0,93	1,50	0,55	2,88	0,01	5,99
28	0,01	0,34	0,26	0,19	0,11	0,38	0,03	1,24
29	0,01	0,38	1,00	0,29	0,44	1,15	0,01	3,25
30	0,01	0,53	0,80	0,24	0,31	0,48	0,00	2,34
31	0,00	0,19	0,47	0,27	0,38	0,41	0,00	1,70
32	0,03	0,51	0,67	0,38	0,56	0,92	0,01	3,00
33	0,07	0,12	0,32	0,50	0,30	0,15	0,01	1,30
34	0,02	0,22	0,53	1,11	0,42	0,71	0,00	2,97
35	0,01	0,15	0,31	0,12	0,18	0,35	0,00	1,10

En reclassant les patients selon le score S, l'inventeur a pu constater de manière surprenante que :

5 si $S < 1$, environ 40% des patients auront une réponse moléculaire majeure à 1 an, et environ 60 % des patients auront une réponse moléculaire intermédiaire à 1 an. En d'autres termes, 100% des patients auront une réponse moléculaire, et aucun ne sera mauvais répondeur,

10 si $1 < S < 2$, environ 30 % des patients auront un réponse moléculaire majeure à 1an, environ 40% des patient auront une réponse moléculaire intermédiaire à 1 an, et surtout environ 30% des patients seront de mauvais répondeurs. En d'autres termes, environ 70% des patients présenterons une réponse moléculaire, et

15 si $S > 2$, seuls 10% des patients auront une réponse moléculaire majeure, environ 30% des patients auront une réponse moléculaire intermédiaire, et plus de 50 % des patients seront des mauvais répondeurs. En d'autres termes, seuls environ 40% des patients répondront au traitement à l'imatinib.

Les résultats obtenus pour les 35 patients sont présentés dans le tableau suivant :

	n = 10	n = 16	n = 26	n = 9
score	RMM	RMI	R	MR
S < 1	41,7%	58,3%	100,0%	0,0%
1 < S < 2	28,6%	42,9%	71,4%	28,6%
S > 2	11,1%	33,3%	44,4%	55,6%

RMM : réponse moléculaire majeure, RMI : réponse moléculaire intermédiaire, R : réponse, MR : mauvais répondeur.

La **figure 3** est une représentation graphique de ces résultats, présentant la répartition des réponses moléculaires à un an (noir: majeure ; hachuré : intermédiaire ; gris : non répondeur) en fonction du score S.

La **figure 4** quant à elle montre la distribution des patients selon leur score S.

5

L'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation présentés et d'autres modes de réalisation apparaîtront clairement à l'homme du métier.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de pronostic *in vitro* de la réponse à une thérapie d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique, à partir d'un échantillon biologique leucémique issu dudit individu, ladite méthode comprenant :
- 5
- a. une étape de mesure du niveau d'expression des gènes d'au moins un sous-groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes, ledit groupe de gènes étant constitué de 25 gènes, lesdits 25 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 25,
- 10
- ledit sous-groupe consistant en 7 gènes, lesdits 7 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7,
- une valeur du niveau d'expression mesuré étant obtenue pour chacun des gènes dudit sous-groupe,
- 15
- b. une étape de comparaison de la valeur attribuée à l'étape précédente à chacun desdits gènes dudit sous-groupe à la valeur attribuée à chacun desdits gènes dudit sous-groupe obtenue à partir d'un échantillon biologique sain, afin d'obtenir un ratio pour chacun desdits gènes dudit sous-groupe du niveau d'expression dans l'échantillon biologique leucémique sur le niveau d'expression dans l'échantillon sain, et
- 20
- c. une étape de détermination d'un score S selon la formule suivante
- $$S = \sum ratio i - \sum ratio j$$
- où ratio i et ratio j représentent respectivement les ratios obtenus pour lesdits gènes dudit sous-groupe comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : i ou SEQ ID NO : j,
- 25
- où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7, de sorte que :
- si S est inférieur à 1, ledit individu aura au moins environ 40% de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et
 - si S est supérieur ou égal à 1, ledit individu aura moins d'environ 40% de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.
- 30
- 35

2. Méthode de pronostic *in vitro* selon la revendication 1, dans laquelle
- si S est supérieur ou égal à 1 et inférieur ou égal à 2, ledit individu aura de 40% à 10% de chances de présenter une rémission moléculaire majeure un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.
- 5
3. Méthode de pronostic *in vitro* selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle
- si S est supérieur à 2, ledit individu aura moins de 10% de chances de présenter une rémission moléculaire un an après le début d'une thérapie avec un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération.
- 10
4. Méthode de pronostic *in vitro* selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe par une méthode de mesure quantitative, notamment la méthode de PCR quantitative.
- 15
5. Méthode de pronostic *in vitro* selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans laquelle la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe mise en œuvre en utilisant au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45.
- 20
6. Méthode de pronostic *in vitro* selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, où la valeur du niveau d'expression mesuré est obtenue par une mesure de l'expression desdits gènes du sous-groupe, ladite mesure utilisant les oligonucléotides suivants :
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 32 et 33 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1,
 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 34 et 35 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 2
 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 36 et 37 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 3
- 30
- 35

- les oligonucléotides SEQ ID NO : 38 et 39 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 4
- 5 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 40 et 41 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 5
- les oligonucléotides SEQ ID NO : 42 et 43 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 6, et
- 10 - les oligonucléotides SEQ ID NO : 44 et 45 pour mesurer l'expression du gène comprenant ou étant constitué par la séquence d'acides nucléiques SEQ ID NO : 7.

7. Méthode de théranostic *in vitro*, d'un individu atteint d'une leucémie myéloïde chronique, comprenant

- a. une étape de mesure du niveau d'expression d'au moins un sous-groupe de gènes choisis dans un groupe de gènes, ledit groupe de gènes étant constitué de 25 gènes, lesdits 25 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 25, ledit sous-groupe consistant en 7 gènes, lesdits 7 gènes comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : 1 à SEQ ID NO : 7, une valeur du niveau d'expression mesuré étant obtenue pour chacun des gènes dudit sous-groupe,
- 25 b. une étape de comparaison de la valeur attribuée à l'étape précédente à chacun desdits gènes dudit sous-groupe à la valeur attribuée à chacun desdits gènes dudit sous-groupe obtenue à partir d'un échantillon biologique sain, afin d'obtenir un ratio pour chacun desdits gènes dudit sous-groupe du niveau d'expression dans l'échantillon biologique leucémique sur le niveau d'expression dans l'échantillon sain, et
- 30 c. une étape de détermination d'un score S selon la formule suivante

$$S = \sum ratio\ i - \sum ratio\ j$$

où ratio i et ratio j représentent respectivement les ratios obtenus pour lesdits gènes dudit sous-groupe comprenant ou étant constitués par les séquences d'acides nucléiques SEQ ID NO : i ou SEQ ID NO : j,

où i et j sont des entiers, i variant de 1 à 5 et j variant de 6 à 7,
de sorte que

- 5 - si S est inférieur à 1, la leucémie myéloïde chronique dudit individu est une leucémie myéloïde chronique susceptible de répondre préférentiellement à un traitement comprenant un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, et
- 10 - si S est supérieur à 2, la leucémie myéloïde chronique dudit individu est une leucémie myéloïde chronique susceptible de répondre préférentiellement à un traitement comprenant un inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération.

8. Méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, dans laquelle l'inhibiteur de tyrosine kinase de première génération est l'imatinib ou l'un de ses sels.

15

9. Méthode selon la revendication 7, dans laquelle l'inhibiteur de tyrosine kinase de seconde génération est le dasatinib ou le nilotinib, ou l'un de leurs sels.

10. Kit comprenant,

- 20 a. au moins les oligonucléotides comprenant ou constitués des séquences SEQ ID : 32 à 45, et
- b. les acides nucléiques d'un ou plusieurs échantillons biologiques sains.

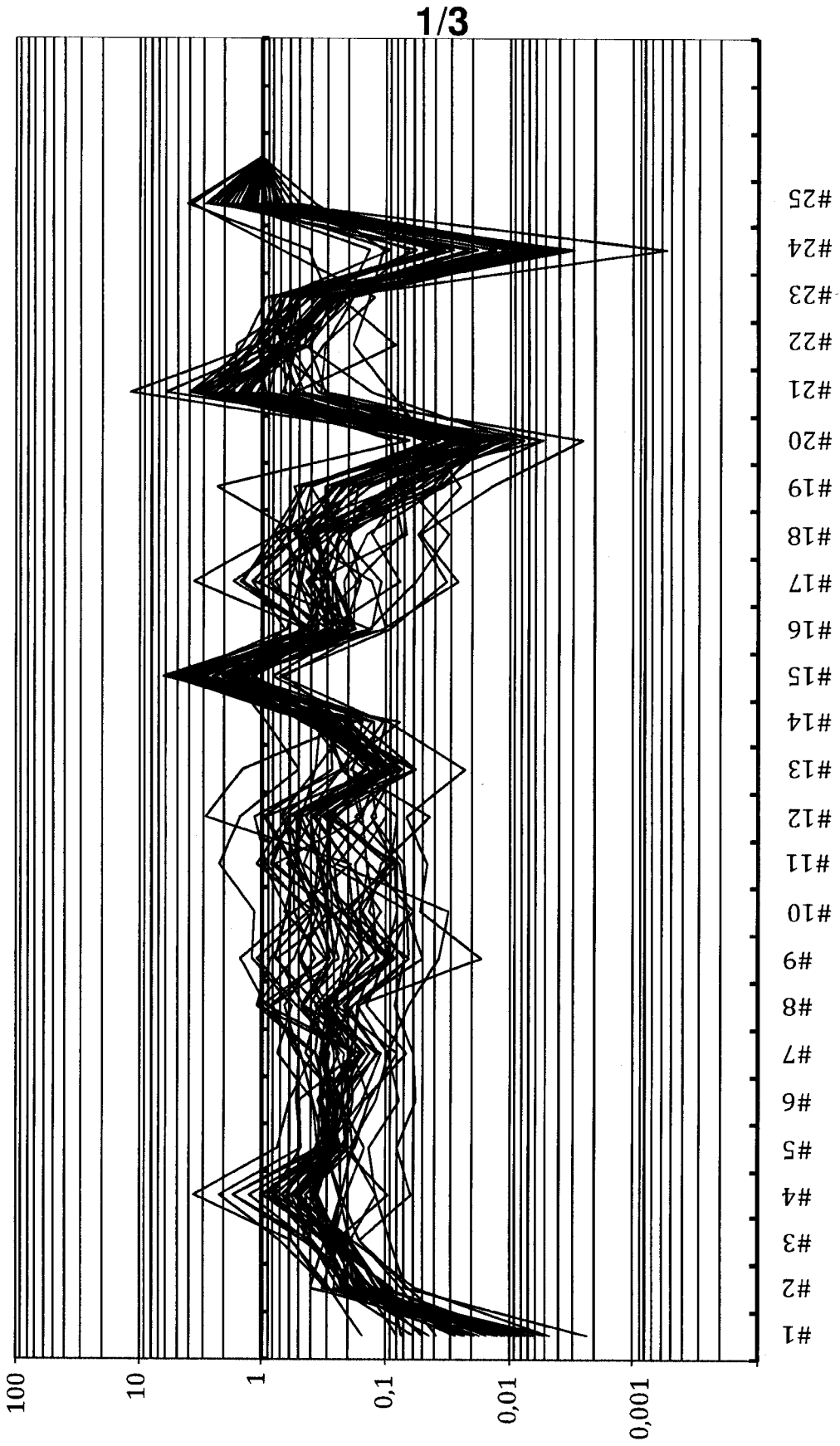


Figure 1

2/3

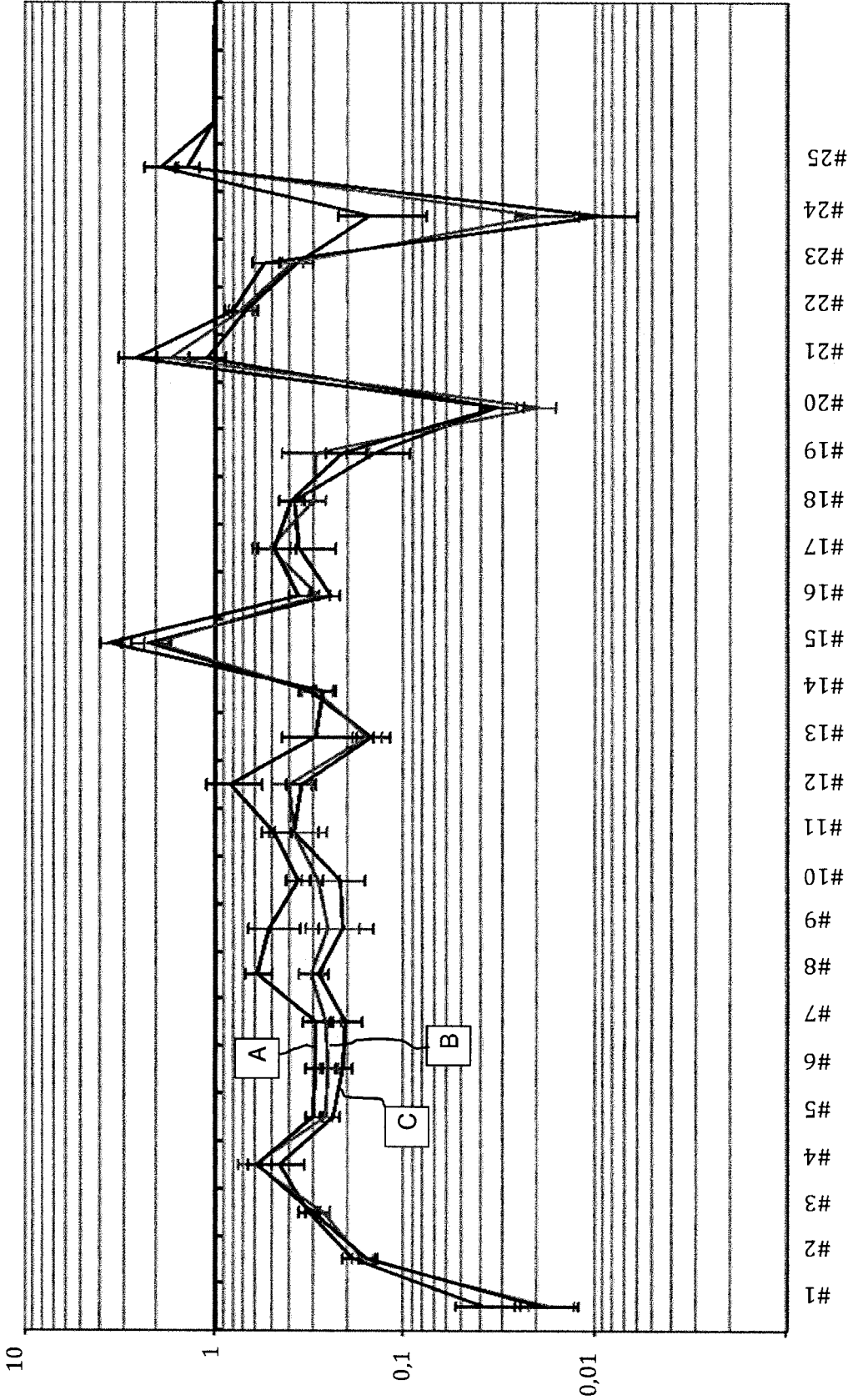
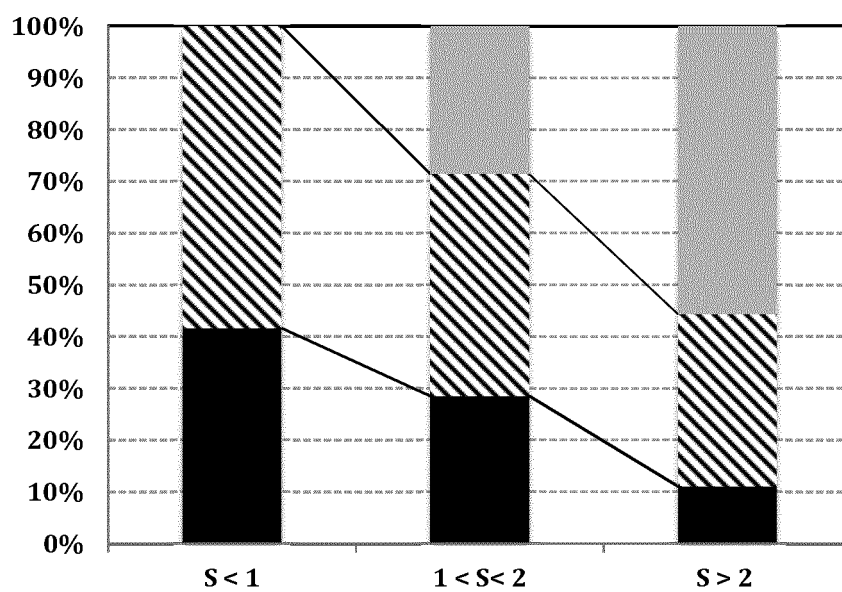
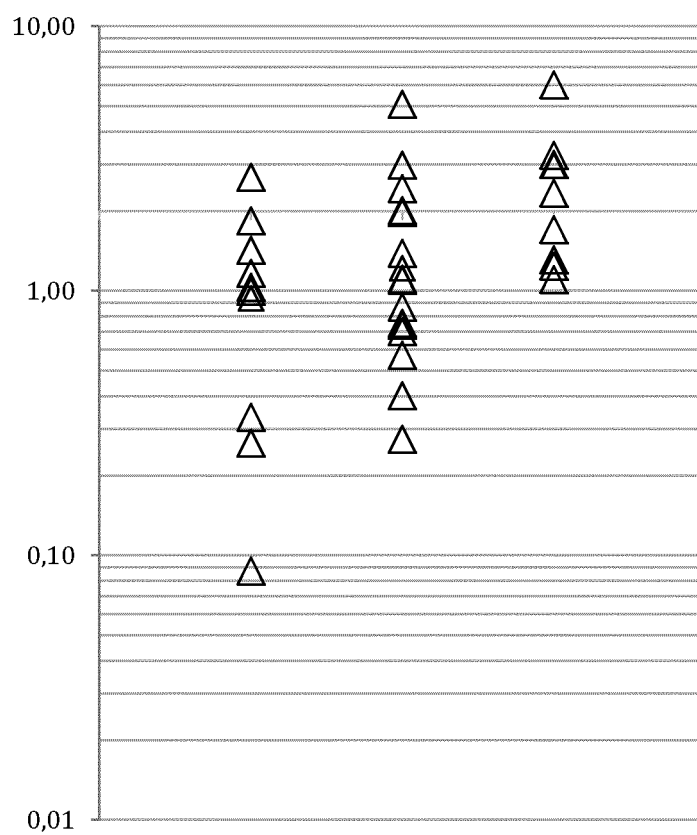


Figure 2

3/3

**Figure 3****Figure 4**

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS DE TOURS

<120> Methode de pronostic d'hemopathies

<130> BR 71446

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2300

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

actcggggca acaggcagat ttgcctgctg aggggtggaga cccacgagcc gaggcctcct	60
gcagtgttct gcacagcaaa ccgcacgcta tggctgacag cgggatccc gccagcgacc	120
agatgcagca ctggaaggag cagcgggccg cgcagaaagc tgatgtcctg accactggag	180
ctggtaaccc agtaggagac aaacttaatg ttattacagt agggccccgt gggccccctc	240
ttgttcagga tgtggttttc actgatgaaa tggctcattt tgaccgagag agaattcctg	300
agagagtgtg gcatgctaaa ggagcagggg cttttggcta ctttgaggtc acacatgaca	360
ttaccaaata ctccaaggca aaggtatttg agcatattgg aaagaagact cccatcgag	420
ttcggttctc cactgttgct ggagaatcgg gttcagctga cacagttcgg gaccctcgtg	480
ggtttgagc gaaattttac acagaagatg gtaactggga tctcgttgga aataacaccc	540
ccattttctt catcagggat cccatattgt ttccatcttt tatccacagc caaaagagaa	600
atcctcagac acatctgaag gatccggaca tggctcggga cttctggagc ctacgtcctg	660
agtctctgca tcaggtttct ttcttgttca gtgatcgggg gattccagat ggacatcgcc	720
acatgaatgg atatggatca catactttca agctgggttaa tgcaaatggg gaggcagttt	780
attgcaaatt ccattataag actgaccagg gcatcaaaaa cttttctggt gaagatgcgg	840
cgagactttc ccaggaagat cctgactatg gcatccggga tctttttaac gccattgcca	900
caggaaagta cccctcctgg actttttaca tccaggatcat gacatttaat caggcagaaa	960
cttttccatt taatccattc gatctacca aggtttggcc tcacaaggac taccctctca	1020
tcccagttgg taaactggtc ttaaaccgga atccagttaa ttactttgct gaggttgaac	1080
agatagcctt cgaccaagc aacatgccac ctggcattga ggccagtcct gacaaaatgc	1140
ttcagggccg cttttttgcc tatcctgaca ctaccgcca tcgcctggga cccaattatc	1200
ttcatatacc tgtgaactgt ccctaccgtg ctcgagtggc caactaccag cgtgacggcc	1260
cgatgtgcat gcaggacaat cagggtgggtg ctccaaatta ctacccaac agctttgggtg	1320
ctccggaaca acagccttct gccctggagc acagcatcca atattctgga gaagtgcgga	1380
gattcaacac tgccaatgat gataacgtta ctcaggtgcg ggcattctat gtgaacgtgc	1440
tgaatgagga acagaggaaa cgtctgtgtg agaacattgc cggccacctg aaggatgcac	1500
aaattttcat ccagaagaaa gcggtcaaga acttactga ggtccaccct gactacggga	1560

gccacatcca ggctcttctg gacaagtaca atgctgagaa gcctaagaat gcgattcaca 1620
 cctttgtgca gtccggatct cacttggcgg caagggagaa ggcaaatctg tgaggccggg 1680
 gccctgcacc tgtgcagcga agcttagcgt tcatccgtgt aacccgctca tcaactggatg 1740
 aagattctcc tgtgctagat gtgcaaatgc aagctagtgg cttcaaaata gagaatccca 1800
 ctttctatag cagatttgtt aacaatttta atgctatttc cccaggggaa aatgaagggtt 1860
 aggatttaac agtcatttaa aaaaaaatt tgttttgacg gatgattgga ttattcattt 1920
 aaaatgatta gaaggcaagt ttctagctag aaatatgatt ttatttgaca aaatttgttg 1980
 aaattatgta tgtttacata tcacctcatg gcctattata ttaaaatatg gctataaata 2040
 tataaaaaga aaagataaag atgatctact cagaaatfff ttttttcta aggttctcat 2100
 aggaaaagta catttaatac agcagtgtca tcagaagata acttgagcac cgtcatggct 2160
 taatgtttat tctgataat aattgatcaa attcattfff tcaactggag ttacattaat 2220
 gtaattcag cactgatttc acaacagatc aatttgaat tgcttacatt tttacaataa 2280
 ataactctga cgtaagaaca 2300

<210> 2
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 gtttggggcc agagtgggag aggcgaggag gtctggccta taaagtagtc gcgagacgg 60
 ggtgctgggt tgcgtcgtag tctcctgcag cgtctggggg ttccgttgca gtcctcggaa 120
 ccaggacctc ggcgtggcct agcgagttat ggcgacgaag gccgtgtgcg tgctgaaggg 180
 cgacggccca gtgcagggca tcatcaattt cgagcagaag gaaagtaatg gaccagtгаа 240
 ggtgtgggga agcattaaag gactgactga aggcctgcat ggattccatg ttcattgagtt 300
 tggagataat acagcaggct gtaccagtgc aggtcctcac tttaatcctc tatccagaaa 360
 acacggtggg ccaaggatg aagagaggca tggtggagac ttgggcaatg tgactgctga 420
 caaagatggg gtggccgatg tgtctattga agattctgtg atctcactct caggagacca 480
 ttgcatcatt ggccgcacac tgggtgtcca tgaaaaagca gatgacttgg gcaaagggtg 540
 aatgaagaa agtacaaga caggaaacgc tggaagtcgt ttggcttgtg gtgtaattgg 600
 gatcgcccaa taaacattcc cttggatgta gtctgaggcc ccttaactca tctgttatcc 660
 tgctagctgt agaaatgtat cctgataaac attaaact gtaactttaa aagtgttaatt 720
 ggtgactttt ttcagagttg ctttaaagta cctgtagtga gaaactgatt tatgatcact 780
 tggaagattt gtatagtttt ataaaactca gttaaaatgt ctgtttcaat gacctgtatt 840
 ttgccagact taaatcacag atgggtatta aacttgtcag aatttctttg tcattcaagc 900
 ctgtgaataa aaaccctgta tggcacttat tatgaggcta ttaaaagaat ccaaatcaaa 960
 actaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 981

<210> 3

<211> 921
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 cagttaaag gaggcgctg ctggcctccc cttacagtgc ttgttcgggg cgctccgctg 60
 gcttcttga caattgcgcc atgtgtgctg ctgggctagc ggcggcggcg gcggcggccc 120
 agtcggtgta tgccttctcg gcgcgcccgc tggccggcgg ggagcctgtg agcctgggct 180
 ccctgcgggg caaggtacta cttatcgaga atgtggcgtc cctctgaggc accacggctc 240
 gggactacac ccagatgaac gagctgcagc ggcgcctcgg accccggggc ctggtggtgc 300
 tcggcttccc gtgcaaccag tttgggcatc aggagaacgc caagaacgaa gagattctga 360
 attccctcaa gtacgtccgg cctggtggtg ggttcgagcc caacttcatg ctcttcgaga 420
 agtgcgaggt gaacggtgcg ggggcgcacc ctctcttcgc ctctctgagg gaggcctgc 480
 cagctcccag cgacgacgcc accgcgctta tgaccgacc caagctcatc acctggtctc 540
 cgggtgtgctg caacgatggt gcctggaact ttgagaagtt cctggtgggc cctgacggtg 600
 tgcccctacg caggtacagc cgccgcttcc agaccattga catcgagcct gacatcgaag 660
 ccctgctgtc tcaagggccc agctgtgcct agggcgcccc tcctaccccg gctgcttggc 720
 agttgcagtg ctgctgtctc gggggggttt tcatctatga ggggtgttcc tctaaaccta 780
 cgagggagga acacctgatc ttacagaaaa taccacctcg agatgggtgc tggctctggt 840
 gatcccagtc tctgccagac caaggcgagt ttccccacta ataaagtgcc ggggtgtcagc 900
 agaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 921

<210> 4
 <211> 942
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gagcgctctg gagggcgtgg ccgtgggaaa ggaggcgcgg aaagccgacg cgcgtccatt 60
 ggtcggctgg acgaggggag gagccgctgg ctcccagccc cgccgcgatg agcctcggcc 120
 gcctttgccg cctactgaag ccggcgctgc tctgtggggc tctggccgcg cctggcctgg 180
 ccgggaccat gtgcgcgtcc cgggacgact ggcgctgtgc gcgctccatg caccagtttt 240
 ccgccaagga catcgacggg cacatggtta acctggacaa gtaccggggc ttcgtgtgca 300
 tcgtcaccaa cgtggcctcc cagtgaggca agaccgaagt aaactacact cagctcgtcg 360
 acctgcacgc ccgatacgt gagtgtggtt tgcggatcct ggccttcccg tgtaaccagt 420
 tcgggaagca ggagccagg agtaacgaag agatcaaaga gttcgccgcg ggctacaacg 480
 tcaaattcga tatgttcagc aagatctgcg tgaacgggga cgacgccac ccgctgtgga 540
 agtggatgaa gatccaacc aagggaagg gcacccctggg aatgcccac aagtggaact 600
 tcaccaagt cctcatcgac aagaacggct gcgtggtgaa gcgctacgga cccatggagg 660
 agcccctggt gatagagaag gacctgccc actatttcta gctccacaag tgtgtggccc 720
 cgcccgagcc cctgcccacg cccttgagc cttccaccgg cactcatgac ggcctgcctg 780

caaacctgct ggtggggcag acccgaaaat ccagcgtgca ccccgccgga ggaaggtccc 840
 atggcctgct gggcttgget cggcgcccc acccctggct accttgtggg aataaacaga 900
 caaattagcc tgctggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 942

<210> 5
 <211> 1262
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 actctcgcga gatccctact ggctataaag gcagcgcgcc ggagagctct tgcgcgtctt 60
 gttcttgccct ggtgtcgggt gttagtttct gcgacttggt ttgggactgg tgagtgtggg 120
 cagtgcggcc cctgcggagt gaggcgcggc gcgcccttct tgcctgttgc ctcttcctcc 180
 tcctgtccgg ggccccccg cgctcgggtg ggggtgctgt gatgcgtgag gcagccgggg 240
 gaggccccga gtccgagact gcttgagcgc tgcgcacacc cctctcgtgg gccccccagc 300
 taggtgcggg aacctggtt aaccccaagc tgataggaag atgtcttcag gaaatgctaa 360
 aattgggcac cctgccccca acttcaaagc cacagctggt atgccagatg gtcagtttaa 420
 agatatcagc ctgtctgact acaaaggaaa atatgttgtg ttcttctttt accctcttga 480
 cttcacctt gtgtgcccc cggagatcat tgctttcagt gatagggcag aagaatttaa 540
 gaaactcaac tgccaagtga ttggtgctt tgtggattct cacttctgtc atctagcatg 600
 ggtcaataca cctaagaaac aaggaggact gggacccatg aacattcctt tggtatcaga 660
 cccgaagcgc accattgctc aggattatgg ggtcttaaag gctgatgaag gcatctcggt 720
 caggggcctt tttatcattg atgataaggg tattcttcgg cagatcactg taaatgacct 780
 ccctgttggc cgctctgtgg atgagacttt gagactagtt caggccttcc agttcactga 840
 caaacatggg gaagtgtgcc cagctggctg gaaacctggc agtgatacca tcaagcctga 900
 tgtccaaaag agcaaagaat atttctcaa gcagaagtga gcgctgggct gttttagtgc 960
 caggctgcgg tgggcagcca tgagaacaaa acctcttctg tttttttttt ttccattagt 1020
 aaaacacaag acttcagatt cagccgaatt gtggtgtctt acaaggcagg ctttctctac 1080
 agggggtgga gagaccagcc tttcttctt ttgtaggaat ggctgagtt ggcgttgtgg 1140
 gcaggctact ggtttgtatg atgtattagt agagcaacc attaatctt tgtagtttgt 1200
 attaaacttg aactgagacc ttgatgagtc tttaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1260
 aa 1262

<210> 6
 <211> 1593
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gcggtgccct tgcggcgcag ctggggtcgc ggccctgctc cccgcgctt ctttaaggccc 60
 gcgggcggcg caggagcggc actcgtggct gtggtggctt cggcagcggc ttcagcagat 120
 cggcggcatc agcggtagca ccagcactag cagcatgttg agccgggcag tgtgcggcac 180

cagcaggcag ctggctccgg ttttggggta tctgggctcc aggcagaagc acagcctccc 240
cgacctgccc tacgactacg gcgccctgga acctcacatc aacgcgcaga tcatgcagct 300
gcaccacagc aagcaccacg cggcctacgt gaacaacctg aacgtcaccg aggagaagta 360
ccaggaggcg ttggccaagg gagatgttac agcccagata gctcttcagc ctgcactgaa 420
gttcaatggg ggtggtcata tcaatcatag ctttttctgg acaaacctca gccctaacgg 480
tggtggagaa cccaaagggg agttgctgga agccatcaaa cgtgactttg gttcctttga 540
caagttaag gagaagctga cggctgcac tgttggtgct caaggctcag gttggggttg 600
gcttggttc aataaggaac ggggacactt acaaattgct gcttgtccaa atcaggatcc 660
actgcaagga acaacaggcc ttattccact gctggggatt gatgtgtggg agcacgctta 720
ctaccttcag tataaaaatg tcaggcctga ttatctaaaa gctatttgga atgtaatcaa 780
ctgggagaat gtaactgaaa gatacatggc ttgcaaaaag taaaccacga tcgttatgct 840
gagtatgta agctctttat gactgttttt gtagtggtat agagtactgc agaatacagt 900
aagctgctct attgtagcat ttcttgatgt tgcttagtca cttatctcat aaacaactta 960
atgttctgaa taatttctta ctaaactttt tgttattggg caagtgattg aaaatagtaa 1020
atgctttgtg tgattgaatc tgattggaca ttttcttcag agagctaaat tacaattgct 1080
attataaaa ccatcaaaaa tattccatcc atatactttg gggacttgta gggatgcctt 1140
tctagtccta ttctattgca gttatagaaa atctagtctt ttgccccagt tacttaaaaa 1200
taaaatatta acactttccc aagggaaca ctcggctttc tatagaaaat tgcacttttt 1260
gtcgagtaat cctctgcagt gatacttctg gtagatgtca cccagtgggt tttgttaggt 1320
caaatgttcc tgtatagttt ttgcaaatag agctgtatac tgtttaaatg tagcagggtga 1380
actgaactgg ggtttgetca cctgcacagt aaaggcaaac ttcaacagca aaactgcaaa 1440
aaggtggttt ttgcagtagg agaaaggagg atgtttatct gcagggcgcc aagcaaggag 1500
aattgggcag ctcatgcttg agaccaatc tccatgatga cctacaagct agagtattta 1560
aaggcagtgg taaatttcag gaaagcagaa gtt 1593

<210> 7
<211> 1024
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7
cttcctggct cctccttct cccaccct ctaataggct cataagtggg ctcaggcctc 60
tctgcggggc tcaactctgc cttcaccatg gctttcattg ccaagtcctt ctatgacctc 120
agtgccatca gcctggatgg ggagaaggta gatttcaata cgttccgggg cagggccgtg 180
ctgattgaga atgtggcttc gctctgaggc acaaccacc gggacttcac ccagctcaac 240
gagctgcaat gccgctttcc caggcgcctg gtggctcttg gcttcccttg caaccaatct 300
ggacatcagg agaactgtca gaatgaggag atcctgaaca gtctcaagta tgtccgtcct 360
gggggtggat accagcccac cttaccctt gtccaaaaat gtgaggtgaa tgggcagaac 420
gagcatcctg tcttcgcta cctgaaggac aagctcccct acccttatga tgaccattt 480

tccctcatga ccgatcccaa gctcatcatt tggagccctg tgcgccgctc agatgtggcc	540
tggaactttg agaagttcct catagggccg gagggagagc cttccgacg ctacagccgc	600
accttcccaa ccatcaacat tgagcctgac atcaagcgcc tccttaaagt tgccatatag	660
atgtgaactg ctcaacacac agatctccta ctccatccag tcctgaggag ccttaggatg	720
cagcatgcct tcaggagaca ctgctggacc tcagcattcc cttgatatca gtccccttca	780
ctgcagagcc ttgcctttcc cctctgcctg tttccttttc ctctcccaac cctctggttg	840
gtgattcaac ttgggctcca agacttgggt aagctctggg ccttcacaga atgatggcac	900
cttcctaaac cctcatgggt ggtgtctgag aggcgtgaag ggcttgagc cactctgcta	960
gaagagacca ataaaggga ggtgtggaaa cggcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1020
aaaa	1024

<210> 8
 <211> 1779
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8	
gtcgccccgg gacggggagg tggggagctg agggcaagtc gcgcccggcc ctgaaatccc	60
agccgcctag cgattggctg caagggctc ggcttggccg cggattggtc acacccgagg	120
gcttgaaagg tggctgggag cgccggacac ctacagacgga cgggtggccag ggatcaggca	180
gcggctcagg cgaccctgag tgtgccccca ccccgccatg gcccggtgc tgcaggcgtc	240
ctgcctgctt tcctgctcc tggccggctt cgtctcgcag agccggggac aagagaagtc	300
gaagatggac tgccatggtg gcataagtgg caccatttac gagtacggag ccctcaccat	360
tgatggggag gagtacatcc ccttcaagca gtatgctggc aaatacgtcc tctttgtcaa	420
cgtggccagc tactgaggcc tgacgggcca gtacattgaa ctgaatgcac tacaggaaga	480
gcttgacca ttcggctctgg tcattctggg ctttcctgc aaccaatttg gaaaacagga	540
accaggagag aactcagaga tccttcctac cctcaagtat gtccgaccag gtggaggctt	600
tgtccctaat ttccagctct ttgagaaagg ggatgtcaat ggagagaaag agcagaaatt	660
ctacactttc ctaaagaact cctgtcctcc cacctcggag ctcttgggta catctgaccg	720
cctcttctgg gaacctatga aggttcacga catccgctgg aactttgaga agttcctggt	780
ggggccagat ggtataccca tcatgcgctg gcaccaccgg accacggtca gcaacgtcaa	840
gatggacatc ctgtcctaca tgaggcggca ggcagccctg ggggtcaaga ggaagtaact	900
gaaggccgtc tcatcccatg tccaccatgt aggggagga ctttgttcag gaagaaatcc	960
gtgtctcaa ccacactatc taccatcac agacccttt cctatcactc aaggccccag	1020
cctggcacia atggatgcat acagttctgt gtactgccag gcatgtgggt gtgggtgcat	1080
gtgggtgttt acacacatgc ctacaggtat gcgtgattgt gtgtgtgtgc atgggtgtac	1140
agccacgtgt ctacctatgt gtctttctgg gaatgtgtac catctgtgtg cctgcagctg	1200
tgtagtgtctg gacagtgaca accctttctc tccagttctc cactccaatg ataatagttc	1260

acttacacct aaacccaaag gaaaaaccag ctctaggtcc aattggtctg ctctaactga 1320
 tacctcaacc ttggggccag catctcccac tgcttccaaa tattagtaac tatgactgac 1380
 gtccccagaa gtttctgggt ctaccacact cccaacccc cactctctac ttctgaagg 1440
 gccctcccaa ggctacatcc ccaccccaca gttctcctg agagagatca acctccctga 1500
 gatcaaccaa ggcagatgtg acagcaaggg ccacggaccc catggcaggg gtggcgtctt 1560
 catgagggag gggcccaaag cccttgtggg cggacctccc ctgagcctgt ctgaggggcc 1620
 agcccttagt gcattcaggc taaggcccct gggcagggat gccaccctg ctccttcgga 1680
 ggacgtgcc tcaccctca ctggtccact ggcttgagac tcaccctgtc tgcccagtaa 1740
 aagcctttct gcagcagctg aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1779

<210> 9
 <211> 735
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gcggtgtccg gcagtagagc tcgctgcaga tccgggtctt gaccatgatt tggcgccgcg 60
 cggcgctggc ggggacgcgg ctggtttggg gcaggagcgg ctcggcaggc tggcttgaca 120
 gggcggcggg agctgcggga gctgcggcag ctgcggcctc tgggatggag agcaatacat 180
 catcatcttt ggagaattta gcgacggcgc ctgtgaacca gatccaagaa acaatttctg 240
 ataattgtgt ggtgatthtc tcaaaaacat cctgttctta ctgtacaatg gcaaaaaagc 300
 tttccatga catgaatggt aactataaag tgggtggaact ggacctgctt gaatatggaa 360
 accagttcca agatgctctt tacaaaatga ctggtgaaag aactgttcca agaataattg 420
 tcaatggtag ttttattgga ggtgcaactg acactcatag gcttcacaaa gaaggaaaat 480
 tgctcccact agttcatcag tgttatttaa aaaaaagtaa gaggaaagaa tttcagtgat 540
 gttatacta ataagtttgc tagtacagtg tcagttatth aaagtggtaa tgcccgataa 600
 tgtctthtaa atgtttgagg atgtthtaa tacatgcatt gtcttcacga agaagatgta 660
 aaaataatga acaataaatt gcggtggaag cctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 720
 aaaaaaaaaa aaaaa 735

<210> 10
 <211> 827
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gcagtggagg cggcccaggc ccgccttccg cagggtgtcg ccgctgtgcc gctagcggtg 60
 cccgcctgc tgcggtggca ccagccagga ggcggagtgg aagtggcctg ggggcgggta 120
 tgggactagc tggcgtgtgc gccctgagac gctcagcggg ctatatactc gtcggtgggg 180
 ccggcggta gtctgcggca gcggcagcaa gacggtgcag tgaaggagag tgggcgtctg 240
 gcggggtccg cagtttcagc agagccgctg cagccatggc cccaatcaag gtgggagatg 300
 ccatcccagc agtggagggtg tttgaagggg agccagggaa caaggtgaac ctggcagagc 360

tgttcaaggg caagaagggg gtgctgtttg gagttcctgg ggccttcacc cctggatggt	420
ccaaggttcg gtcctggct gatcccactg gggcctttgg gaaggagaca gacttattac	480
tagatgattc gctggtgtcc atctttggga atcgacgtct caagaggttc tccatggtgg	540
tacaggatgg catagtgaag gccctgaatg tggaaccaga tggcacaggc ctcacctgca	600
gcctggcacc caatatcatc tcacagctct gaggccctgg gccagattac ttctccacc	660
cctccctatc tcacctgcc agccctgtgc tggggccctg caattggaat gttggccaga	720
tttctgcaat aaacacttgt ggtttgccgc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	780
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa	827

<210> 11
 <211> 3174
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11	
tcctcctggg tcttgcttag cgggcggcgc atgcttagtc accgtgaggc tgcgcttgcc	60
cggggcccgc gccccctac cccggggacc gccccgggc cgcccgcccc acttggcgcg	120
ccacttccgc gtgcatggcc ctgctgcccc gagccctgag cgccggcgcg ggaccgagct	180
ggcggcgggc ggcgcgcgcc ttccgaggct tcctgctgct tctgcccagag cccgcggccc	240
tcacgcgcgc cctctcccgt gccatggcct gcaggcagga gccgcagccg cagggcccgc	300
cgcccgctgc tggcgccgtg gcctcctatg actacctggt gatcgggggc ggctcgggcy	360
ggctggccag cgcgcgcagg gcggccgagc tgggtgccag ggccgcccgtg gtggagagcc	420
acaagctggg tggcacttgc gtgaatggtg gatgtgtacc caaaaaggta atgtggaaca	480
cagctgtcca ctctgaattc atgcatgac atgctgatta tggctttcca agttgtgagg	540
gtaaattcaa ttggcgtggt attaaggaaa agcgggatgc ctatgtgagc cgcctgaatg	600
ccatctatca aaacaatctc accaagtccc atatagaaat catccgtggc catgcagcct	660
tcacgagtga tccaagccc acaatagagg tcagtgggaa aaagtacacc gccccacaca	720
tcctgatcgc cacaggtggt atgccctcca cccctcatga gagccagatc cccggtgcca	780
gcttagaat aaccagcgat ggattttttc agctggaaga attgcccggc cgcagcgtca	840
ttgttggtgc aggttacatt gctgtggaga tggcagggat cctgtcagcc ctgggttcta	900
agacatcact gatgatacgg catgataagg tacttagaag ttttgattca atgatcagca	960
ccaactgcac ggaggagctg gagaacgctg gcgtggaggc gctgaagttc tcccaggcca	1020
aggagggtta aaagactttg tcgggcttgg aagtcagcat gggttactgca gttcccggta	1080
ggctaccagt catgaccatg attccagatg ttgactgcct gctctgggccc attgggcccgg	1140
tcccgaatac caaggacctg agtttaaca aactggggat tcaaaccgat gacaagggtc	1200
atatcatcgt agacgaattc cagaatacca acgtcaaagg catctatgca gttggggatg	1260
tatgtggaaa agctcttctt actccagttg caatagctgc tggccgaaaa cttgcccatac	1320
gactttttga atataaggaa gattccaaat tagattataa caacatccca actgtggtct	1380
tcagccacc ccctattggg acagtgggac tcacggaaga tgaagccatt cataaatatg	1440

gaatagaaaa tgtgaagacc tattcaacga gctttacccc gatgtatcac gcagttacca 1500
 aaaggaaaac aaaatgtgtg atgaaaatgg tctgtgctaa caaggaagaa aagggtggttg 1560
 ggatccatat gcagggactt ggggtgtgatg aaatgctgca gggttttgct gttgcagtga 1620
 agatgggagc aacgaaggca gactttgaca acacagtcgc cattcacctt acctcttcag 1680
 aagagctggc cacacttcgt tgagaaccag gagacacgtg tggcgggcag tgggacccat 1740
 agatcttctg aaatgaaaca aataatcaca ttgacttact gtttgagttt tatgtatttc 1800
 tttatnttaa tcaggatctt ctgatagtgg aaatnttttag tacataatag aacttattta 1860
 tggagttaga aatntgtagt gttatccagg attgattntt atnttgatcac atctcacagt 1920
 aattaatatt ttcaagnttt tntnttatta acagctctgt gctagntntt tntntctgnt 1980
 ttagcctcat cccaaatata aagctnttggt aagtacaatt aacttaatgt acttgaatga 2040
 atagaacttg ctactntntt tntntntntt tntgagacag agntnttctc tcattgccca 2100
 ggctggagtg cgggtggctt atntcagctc accacaacct ctgcctcctg ggttcaagtg 2160
 attctcctgc cttagcctcc cgaatagctg gaattacagg cacgcaccac catgcctgac 2220
 taatnttgta tntnttagtag acatgggntt tctccatgnt ggtcaggctg gtctcaaact 2280
 cccacctca ggtgatccgc ccacctcggc ctctgaggtt gctgagatta caggcgtgag 2340
 ccactgtgcc agcttgctaa tnttcacaga agttgatggc aatntctcac atgtaaacag 2400
 tgccagtgca cagaacctt atatatntt tgaagccagt actgtgctct gcataataca 2460
 aagctgctc aaggatgaga cttnttcta aaagcatgta atgtgagaag cggcctgcc 2520
 ttatntctt tntctntnt taatgattaa aaatagntt tggcaaggca cgggtggctca 2580
 ggctgtaat tctagcactt tgggaggccg aggcaggagg attacttgag cctacaagnt 2640
 tgaggccagc atgcacagca tagcaagact gcattctac agagagtaaa aaaaattacc 2700
 cgagtgtggt gatgtgcatc tgtaatctca gctacttggg aggctgaggt gagaggatca 2760
 cttgagcttg ggtgaggtga ggctgcagtg agtctgatc atgctgctgc actcaatctt 2820
 ggacaacaga gcaagacct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa aatatatat atatatatat 2880
 attatntta tgaggtgaag tgcatcaaac ttgggaaaga tntgaggagg ctgggaacct 2940
 cctggaaaac cactccttga agaaagatat gagagacatt tagaagtgat tctgctntt 3000
 agaaggaggt ggattcaaat acatcaaaag tcccttctc tgctaagtgt ttatagttca 3060
 atgaataatt tcaatnttg tatgtgttct tgtcattnta tntntntctg aaaaacttcc 3120
 aaaaatttga aaataaaatt acagcctntt ctctntataa aaaaaaaaaa aaaa 3174

<210> 12
 <211> 1661
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 attgcattcc tgggcattgc taactagtga agtataaccag atggaaatgt cttcgaagct 60
 gtccctntaa aactcgagca agctaccagg caaactccgc ctccaggag gttccttatt 120

aaataggagc caactggctg ggtcggggct caatacccca agcaatacct gcaactgagg 180
 attcttcccg gggagaccgc agcccatcgg catggctcaa gagtttgtga actgcaaaat 240
 ccagcctggg aagggtggtg tgttcatcaa gcccacctgc cgtactgca ggagggccca 300
 agagatcctc agtcaattgc ccatcaaaca agggcttctg gaatttgtcg atatcacagc 360
 caccaaccac actaacgaga ttcaagatta tttgcaacag ctcacgggag caagaacggt 420
 gcctcgagtc tttattggta aagattgtat aggcggatgc agtgatctag tctctttgca 480
 acagagtggg gaactgctga cgcggtctaa gcagattgga gctctgcagt aaccacagaa 540
 caggcccat gctgacgtcc ctctcaaga gctggatggc attgcaaatg atgacagcac 600
 ttctggtgga tgaatttggg ggcacaaaca gcttttttcc tcttttggct cagtatttaa 660
 aagtggacca acttgctctt aatcacaggg ccaagaaggt tgacgggcca tcttggtttt 720
 ctctggatg tgctctttgg ttttcagaag actgtgacaa gttctggccc aggattcgtc 780
 cactgaccct caattgtcct ctttggcatg cgtttcttac tgttctccat gtgtcggcat 840
 gtctctacct ctaagccagt gtttttcaac tatgtttatc cagactcctt ctccacaatg 900
 atgaatccac agttggttat ctgctactgc ccattagcta aaatcatttt gctgcttgac 960
 tttatggagt ttgtattatg aaatcagtgg gtattttgaa tgtgttcttt ctaactacat 1020
 gcatctctcc actcaactcc accccatccc atcccacctt gaaaatcact gctctgaacc 1080
 agtgttctcc accttgtcct ccacagatct cataggaaat gttcaacaat tctgtgaaag 1140
 gtcacaggac ccaattggag aaatcatatg aaaagcatag ttggctttgg tgtcatatgg 1200
 atcagaggca caagtgcaga ggctgtggtc atgcggaaca ctctgttatt taagatggct 1260
 atccagataa tcctgaacac tgtgtattta ttttatttag actaccagca aagattaaag 1320
 catgaaatgt aaaacatctg ataaaactta cagcccccta caccaagagt gtatctgtga 1380
 aagagctcct acactttgaa aacttaagaa tcccttatca tgaagtttgc ctgttctaga 1440
 attgtaagat tgtaatttc cttcaatctc tagtgacaac acttaatttc ttttctaata 1500
 aaaaaaacct atagatgatt cagtgatatt tgtccaattc atttgcatgt tctcaagaca 1560
 ttaaggaatg ttatgcaaaa tacactaact taaaactgtg tttatatttg gccctgccat 1620
 tataaataaa gacacgtgct gctgtcaaaa aaaaaaaaaa a 1661

<210> 13
 <211> 1039
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gctcgtccgc tcctcccc gcgccgtgca cgtcttgggt cgggccgggc ataaaaggct 60
 tcgcgccca gggctcactt ggcgctgaga acgcggtcc acgctgtga tcgtccgtgc 120
 gtctagcctt tgcccacgca gctttcagtc atggcctccg gtaacgcgcg catcgaaag 180
 ccagcccctg acttcaaggc cacagcggtg gttgatggcg cttcaaaga ggtgaagctg 240
 tcggactaca aaggaagta cgtggctctc ttttctacc ctctggactt cacttttgtg 300
 tgcccaccg agatcatcgc gttcagcaac cgtgcagagg acttccgcaa gctgggctgt 360

gaagtgctgg	gcgtctcggg	ggactctcag	ttcaccacc	tggttggat	caacaccccc	420
cggaaagagg	gaggcttggg	ccccctgaac	atccccctgc	ttgctgacgt	gaccagacgc	480
ttgtctgagg	attacggcgt	gctgaaaaca	gatgagggca	ttgcctacag	gggcctcttt	540
atcatcgatg	gcaaggggtg	ccttcgccag	atcactgtta	atgatttgcc	tgtgggacgc	600
tccgtggatg	aggctctgcg	gctgggccag	gccttcagt	acacagacga	gcatggggaa	660
gtttgtccc	ctggctggaa	gcctggcagt	gacacgatta	agcccaacgt	ggatgacagc	720
aaggaatatt	tctccaaaca	caattaggct	ggctaacgga	tagtgagctt	gtgcccctgc	780
ctaggtgcct	gtgctgggtg	tccacctgtg	ccccacctg	ggtgccctat	gctgaccag	840
gaaaggccag	acctgccct	ccaaactcca	cagtatggga	ccctggaggg	ctaggccaag	900
gccttctcat	gcctccacct	agaagctgaa	tagtgacgcc	ctcccccaag	cccaccagc	960
cgcacacagg	cctagaggta	accaataaag	tattagggaa	aggtgtgaaa	aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa					1039

<210> 14
 <211> 2799
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14						
acgtgtgcgg	gaggaagca	ggaagtgact	gcgggagtg	agccggcgag	agagtggcag	60
cgggggctga	tggaagtga	gtgggggctg	gagagggcac	cctactgtat	ccagcatgct	120
ccaaggccac	agctctgtgt	tccaggcctt	gctggggacc	ttcttcacct	gggggatgac	180
agcagctggg	gcagctctcg	tgttcgtatt	ctctagtgga	cagaggcgga	tcttagatgg	240
aagtcttggc	tttgetgcag	gggtcatggt	ggcagcttc	tattggtctc	ttctggcccc	300
agcagttgag	atggccacgt	cctctggggg	cttcggtgcc	tttgcttct	tcctgtggc	360
tgttggcttc	acccttggag	cggcttttgt	ctacttggct	gacctcctga	tgctcactt	420
gggtgcagca	gaagaccccc	agacgacct	ggcactgaac	ttcggtcta	cgttgatgaa	480
gaagaagtct	gatcctgagg	gtcccgcgct	gctcttcct	gagagtgaac	tttccatccg	540
gataggtaga	gctgggcttc	tttcagacaa	gagtgagaat	ggtgaggcat	atcagagaaa	600
gaaggcggca	gccactggcc	ttccagagg	tcctgctgtc	cctgtgcctt	ctcagaggaa	660
tctggcacag	cccggcggca	gcagctggag	gaggatcgca	ctgctcatct	tggccatcac	720
tatacacaac	gttccagagg	gtctcgctgt	tggagttgga	tttggggcta	tagaaaagac	780
ggcatctgct	acctttgaga	gtgccaggaa	tttggccatt	ggaatcggga	tccagaattt	840
ccccgagggc	ctggctgtca	gccttcctt	gcgaggggca	ggcttctcca	cctggagagc	900
tttctggtat	gggcagctga	gcggcatggt	ggagcccctg	gccggggctt	ttggtgcctt	960
tgccgtggtg	ctggctgagc	ccatcctgcc	ctacgctctg	gcctttgctg	ccggtgccat	1020
ggtctacgtg	gtcatggacg	acatcatccc	cgaagcccag	atcagtggta	atgggaaact	1080
ggcatcctgg	gcctccatcc	tgggatttgt	agtgatgatg	tcactggacg	ttggcctggg	1140

ctagggctga gacgcttcgg accccgggaa aggccatacg aagaaacagc agtgggtggc 1200
ttctatggga caacaagctt ctttcttcac attaaaactt ttttccttcc tctcttcttc 1260
atctcattat cctgattgac tctgattata atagaacat ttttactttg ctttgagggg 1320
gatttttgat ttaatgggga attttaaggt gtcattgaaa tacagattct ttgttttggc 1380
cactgaatgg actctctctt cagtgggatt atcaaggaac ttcagatcag ggaaatctcc 1440
acttcgggac cttctatctg cctcccaact cctcaaggtc acctatagaa gcgagctacc 1500
aaaagacgtc tcctaagcat tttggtggcc tagtgactca gggcagagtg gccagcacac 1560
ctctcatccg cccctctgc tccatcactg ctgagcctct ccccatctag aatggttgaa 1620
ctggagcatc ataaagatag caagctacct tccaaggccg agccagccca gagaggagca 1680
tgtcttctt tacctcccc taaggagata ctacatggga gggggacaca gaaaaagggg 1740
aggaaattgg ctagtctggc tttttttttt ttttttttta aaggcaaaga ttgacattat 1800
tgaaggaaag gggatgagga caactgtgaa ctcacagtga gccctgtgga aagaagagac 1860
agacagagtg tgggtttggt cggaggcctc tgctgtcaat ggattccagg agcaaggcca 1920
tttgtcgcgc tttccaaatt tcttaggcat ttattttgat aagtttatag ccatcatggt 1980
tctaagagac ttggagacac cagcaaactg ctagaactca aactcttcaa ttactcaaag 2040
aaggagccat ttcagttaac tcaagtgaat gaaagagttt tggaatctgc tgtgggtcct 2100
tccctgttga ccatttggtg acttataatc tgacaaaaac tcttgagctg caacaggcct 2160
tgccagaggg ctcaggatgg gaaaggaaga aggggatagg aaaagaagag gtaattttac 2220
atttccctt taaagtaaat tttagccaac tcatcattct gaaatgtccc tataaagaat 2280
gagtcgaact agaccagaag ccagcctact cttcttaca tagcttctcc aacaggggta 2340
gcaatgacct gtccacttca aacacagata aggcctgcc tctcattgg ttaaaggcac 2400
acgtgagact ttcagtgggc tctgctgaga aggaaggcag cccaggagtc aggtatgcag 2460
gcattgcatt gtcagtgtct gctctcagag tttacacatt caattgcttc caagggtgaa 2520
tctctgctc tgtgaatgct atcagacccc aaaggccaac cttgggctgg gtctatgtac 2580
gttcttccga agcactgatg atcaaaattg aagacacatt cagaggtttg attggttgag 2640
attaactggt gtggtggttg gtgtatgtat gttttatttt tatgtctttg tatgtagttc 2700
tacataatgc aaattgtgct ttctgatgga caagacctca taactgtgat taatatcaat 2760
aaaaagggga tgttgtggat gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2799

<210> 15
<211> 508
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 15
tttggtgctt tggatccatt tccatcggtc cttacagccg ctctcagac tccagcagcc 60
aagatggtga agcagatcga gagcaagact gcttttcagg aagccttggg cgctgcaggt 120
gataaacttg tagtagttga cttctcagcc acgtgggtgtg ggccttgcaa aatgatcaag 180
ccttctttc attccctctc tgaaaagtat tccaacgtga tattccttga agtagatgtg 240

gatgactgtc aggatgttgc ttcagagtgt gaagtcaaat gcatgccaac attccagttt 300
 ttttaagaagg gacaaaaggt ggggtgaattt tctggagcca ataaggaaaa gcttgaagcc 360
 accattaatg aattagtcta atcatgtttt ctgaaaatat aaccagccat tggctattta 420
 aaacttgtaa tttttttaat ttacaaaaat ataaaatatg aagacataaa cccagttgcc 480
 atctgctga caataaaaca ttaatgct 508

<210> 16
 <211> 1591
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 ccctgctct ctgcccgcc cgtggcgccc gagtgcactg aagatggcgg ctgctgtagg 60
 acggttgctc cgagcgtcgg ttgcccgaca tgtgagtgcc attccttggg gcatttctgc 120
 cactgcagcc ctgaggcctg ctgcatgtgg aagaacgagc ttgacaaatt tattgtgttc 180
 tggttccagt caagcaaat tattcagcac cagttcctca tgccatgcac ctgctgtcac 240
 ccagcatgca ccctatttta aggttacagc cgttgtcaat ggagagttca aagacctaag 300
 ccttgatgac ttttaagggga aatatttggg gcttttcttc tctccttggg atttcacctt 360
 tgtgtgtcct acagaaattg ttgcttttag tgacaaagct aacgaatttc acgacgtgaa 420
 ctgtgaagtt gtcgcagtct cagtggattc ccactttagc catcttgctt ggataaatac 480
 accaaggaag aatggtggtt tgggccacat gaacatcgca ctcttgctag acttaactaa 540
 gcagatttcc cgagactacg gtgtgctgtt agaaggttct ggtcttgac taagaggtct 600
 cttcataatt gacccaatg gagtcatcaa gcatttgagc gtcaacgatc tcccagtggg 660
 ccgaagcgtg gaagaaacc tccgcttggg gaaggcgttc cagtatgtag aaacacatgg 720
 agaagtctgc ccagcgaact ggacaccgga ttctcctacg atcaagccaa gtccagctgc 780
 ttccaaagag tactttcaga aggtaaatca gtagatcacc catgtgtatc tgcaccttct 840
 caactgagag aagaaccaca gttgaaacct gcttttatca ttttcaagat ggttatttgt 900
 agaaggcaag gaaccaatta tgcttgtatt cataagtatt actctaaatg ttttgttttt 960
 gtaattctgg ctaagacctt ttaaacadgg ttagttgcta gtacaaggaa tcctttattg 1020
 gtaacatctt ggtggctggc tagctagttt ctacagaaca taatttgcct ctatagaagg 1080
 ctattcttag atcatgtctc aatggaaaca ctcttcttc ttagccttac ttgaatcttg 1140
 cctataataa agtagagcaa cacacattga aagcttctga tcaacgggtcc tgaaattttc 1200
 atcttgaatg tctttgtatt aaactgaatt ttcttttaag ctaacaaaga tcataatttt 1260
 caatgattag ccgtgtaact cctgcaatga atgtttatgt gattgaagca aatgtgaatc 1320
 gtattatfff aaaaagtggc agagtgactt aactgatcat gcatgatccc tcatccctga 1380
 aattgagttt atgtagtcat ttacttatt ttattcatta gctaactttg tctatgtata 1440
 tttctagata ttgattagtg taatcgatta taaaggatat ttatcaaatc cagggattgc 1500
 attttgaaat tataattatt ttctttgctg aagtattcat tgtaaaacat acaaaaataaa 1560

catattttaa aacatttgca ttttaccacc a 1591

<210> 17
 <211> 1246
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gtctttgccc tcgcgacgcc gccacctccg gaacaagcca tgggtggcggc gacggtggca 60
 gcggcgctggc tgctcctgtg ggctgcggcc tgcgcgcagc aggagcagga cttctacgac 120
 ttcaaggcgg tcaacatccg gggcaaactg gtgtcgtctg agaagtaccg cggatcgggtg 180
 tccctggtgg tgaatgtggc cagcgagtgc ggcttcacag accagcacta ccgagccctg 240
 cagcagctgc agcgagacct gggccccac cactttaacg tgctcgcctt cccctgcaac 300
 cagtttggcc aacaggagcc tgacagcaac aaggagattg agagctttgc ccgccgcacc 360
 tacagtgtct cattccccat gtttagcaag attgcagtca ccggtactgg tgcccatcct 420
 gccttcaagt acctggccca gacttctggg aaggagccca cctggaactt ctggaagtac 480
 ctagtagccc cagatggaaa ggtggtaggg gcttgggacc caactgtgtc agtggaggag 540
 gtcagacccc agatcacagc gctcgtgagg aagctcatcc tactgaagcg agaagactta 600
 taaccaccgc gtctcctcct ccaccacctc atcccgccca cctgtgtggg gctgaccaat 660
 gcaaactcaa atggtgcttc aaagggagag acccactgac tctccttctt ttactcttat 720
 gccattggtc ccatcattct tgtgggggaa aaattctagt attttgatta tttgaaatctt 780
 acagcaacaa ataggaactc ctggccaatg agagctcttg accagtgaat caccagccga 840
 tacgaacgtc ttgccaacaa aatgtgtgg caaatagaag tatatcaagc aataatctcc 900
 cacccaaggc ttctgtaaac tgggaccaat gattacctca tagggctggt gtgaggatta 960
 ggatgaaata cctgtgaaag tgcctaggca gtgccagcca aataggaggc attcaatgaa 1020
 cattttttgc atataacca aaaaataact tgttatcaat aaaaacttgc atccaacatg 1080
 aatttccagc cgatgataat ccaggccaaa ggttttagttg ttgttatttc ctctgtatta 1140
 ttttcttcat taaaaagaa atgcaagttc attgtaacaa tccaaacaat acctcacgat 1200
 ataaaataaa aatgaaagta tcctcctcaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1246

<210> 18
 <211> 1342
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gaggaagtga cgacaggcgt gcccttgaca ggcagggagg gctaggctgt gcatccctcc 60
 gctcgcattg caggagatg gctcagcgac ttcttctgag gaggttcttg gcctctgtca 120
 tctccaggaa gccctctcag ggtcagtggc caccctcac ttccagagcc ctgcagaccc 180
 cacaatgcag tcctggtggc ctgactgtaa cacccaacc agcccggaca atataacca 240
 cgaggatctc cttgacaacc tttaatatcc aggatggacc tgactttcaa gaccgagtgg 300
 tcaacagtga gacaccagtg gttgtggatt tccacgcaca gtggtgtgga ccctgcaaga 360

tcctggggcc gaggttagag aagatggtgg ccaagcagca cgggaaggtg gtgatggcca 420
 aggtggatat tgatgaccac acagacctcg ccattgagta tgaggtgtca gcggtgcccc 480
 ctgtgctggc catgaagaat ggggacgtgg tggacaagtt tgtgggcatc aaggatgagg 540
 atcagttgga ggccttcctg aagaagctga ttggctgaca agcagggatg agtcctggtt 600
 cccttgcccg cgtgggacct caatagaact cagcccttcc atgccagccc tcctgctgc 660
 ctccctcctg tctggctcct ggggccccatg cttagagccc aggctccagc cctgagtgt 720
 tccgagctgg cggactgccc aggggccatc agaggatggt ggtgctgctg ctgatccggg 780
 gaccgctgtc ttccctccca tacgcctttc atccctcctt ctagggccta tggcagttct 840
 cccaggatgt gtggcgagag cctggggccag cccacagcgt tcctagtcag gcagccacac 900
 cttggtcctc atcttgggcc cttccaatct gaaacctcgt gcctggctcg tctgccacct 960
 acatttctt ttccagctgc tgttttgtaa aaagaaaaag aaaaaagaag cccaaactag 1020
 tgagagtaat atctaattat ctcatTTTTT gtaggctgtg gataaagaac ttagtcatcc 1080
 cttccacctc ctactgtgaa gaacagacct tgggtcccac actgaaatcc cctctagtca 1140
 cccattccca cccccaggg agctgcctcc caggcagggg gtgcagaaaa tgattgatgg 1200
 gctggggaac cctggagagc ctcgactccg gaagtctcaa ggtgcctcct cctctcctta 1260
 gctggcccgt tggTTTTctg agcagggggc tgaactgtga acaagtcaga caaataaagc 1320
 aagggtctgc accatcaaaa aa 1342

<210> 19
 <211> 921
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 gcggcgctcg cgccaagga cgtgtttctg cgctcgcgtg gtcattggagg cgctgccgct 60
 gctagccgag acaactccgg accacggccg ccaccgaagg ctgcttctgc tgccgctact 120
 gctgttctct ctgccggctg gagctgtgca gggctgggag acagaggaga ggccccggac 180
 tcgcgaagag gagggccact tctacgcggg tggacaagtg taccggggag aggcattccc 240
 ggtatcggtc gccgacct ccctgcacct aagcaaagcg aagatttcca agccagcggc 300
 ctactgggaa ggaacagctg tgatcgatgg agaatttaag gagctgaagt taactgatta 360
 tcgtgggaaa tacttggttt tcttcttcta cccacttgat ttcacatttg tgtgtccaac 420
 tgaaattatc gcttttggcg acagacttga agaattcaga tctataaata ctgaagtgg 480
 agcatgctct gttgattcac agtttaccga tttggcctgg attaataccc ctcgaagaca 540
 aggaggactt gggccaataa ggattccact tctttcagat ttgacctatc agatctcaaa 600
 ggactatggt gtataacctag aggactcagg ccacactctt agaggtctct tcattattga 660
 tgacaaagga atcctaagac aaattactct gaatgatctt cctgtgggta gatcagtgga 720
 tgagacacta cgtttggttc aagcattcca gtacactgac aaacacggag aagtctgccc 780
 tgctggctgg aaacctggta gtgaaacaat aatcccagat ccagctggaa agctgaagta 840
 tttcgataaa ctgaattgag aaatacttct tcaagttatg atgcttgaaa gttctcaata 900

aagttcacgg tttcattacc a 921

<210> 20
 <211> 1200
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 cagttaaaag gaggcgcctg ctggcctccc cttacagtgc ttgttcgggg cgctccgctg 60
 gcttcttggg caattgcgcc atgtgtgctg ctcggctagc ggcggcggcg gcggcggccc 120
 agtcggtgta tgccttctcg gcgcgcccgc tggccggcgg ggagcctgtg agcctgggct 180
 ccctgcgggg caaggtacta cttatcgaga atgtggcgtc cctctgaggc accacggctc 240
 gggactacac ccagatgaac gagctgcagc ggcgcctcgg accccggggc ctggtggtgc 300
 tcggcttccc gtgcaaccag tttgggcatc aggtgcgccg ggcggagcgg ggcggggcgg 360
 gggcggacgt gcagtagtgg ctggggggcg cggcgggtgt ctggtgggtg ccgtcggctc 420
 catgcgcgga gagtctggct actctctcgt ttcctttctg ttgctcgtag ctgctgaaat 480
 tcctctccgc ccttgggatt gcgcatggag ggcaaatcc cggtgactca tagaaaatct 540
 cccttgtttg tggtagaac gtttctctcc tcctcttgac cccgggttct agctgccctt 600
 ctctcctgta ggagaacgcc aagaacgaag agattctgaa ttcctcaag tacgtccggc 660
 ctggtggtgg gttcgagccc aacttcatgc tcttcgagaa gtgcgaggtg aacggtgcgg 720
 gggcgcaccc tctcttcgcc ttctgcggg aggcctgc cc agctcccagc gacgacgcca 780
 ccgcgcttat gaccgacccc aagctcatca cctggtctcc ggtgtgtcgc aacgatgttg 840
 cctggaactt tgagaagttc ctggtgggccc ctgacggtgt gccctacgc aggtacagcc 900
 gccgcttcca gaccattgac atcgagcctg acatcgaagc cctgctgtct caagggccca 960
 gctgtgccta gggcggcccct cctaccccgg ctgcttggca gttgcagtgc tgctgtctcg 1020
 ggggggtttt catctatgag ggtgtttcct ctaaacctac gagggaggaa cacctgatct 1080
 tacagaaaat accacctcga gatgggtgct ggtcctgttg atcccagtct ctgccagacc 1140
 aaggcgagtt tccccactaa taaagtgccg ggtgtcagca gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1200

<210> 21
 <211> 1274
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gcttctgtct ggcggcggca gcatggcggc gggggcggct gaggcagctg tagcggccgt 60
 ggaggaggct ggctcagccg ggcagtttga ggagctgctg cgcctcaaag ccaagtcctt 120
 ccttgtggtc catttctggg caccatgggc tccacagtgt gcacagatga acgaagttat 180
 ggagagttta gctaaagaac tccctcaagt ttcatttgtg aagttggaag ctgaaggtgt 240
 tcctgaagta tctgaaaaat atgaaattag ctctgttccc acttttctgt ttttcaagaa 300
 ttctcagaaa atcgaccgat tagatgggtg acatgcccga gagttgacca aaaaagttca 360
 gcgacatgca tctagtggct ccttctacc cagcgctaata gaacatctta aagaagatct 420

caaccttcgc ttgaagaat tgactcatgc tgccccctgc atgctgttta tgaaaggaac	480
tcctcaagaa ccacgctgtg gtttcagcaa gcagatggtg gaaattcttc acaaacataa	540
tattcagttt agcagttttg atatcttctc agatgaagag gttcgacagg gactcaaagc	600
ctattccagt tggcctacct atcctcagct ctatgtttct ggagagctca taggaggact	660
tgatataatt aaggagctag aagcatctga agaactagat acaatttgtc ccaaagctcc	720
caaattagag gaaaggctca aagtgctgac aaataaagct tctgtgatgc tctttatgaa	780
aggaaacaaa caggaagcaa aatgtggatt cagcaaacaa attctggaaa tactaaatag	840
tactggtggt gaatatgaaa cattcgatat attggaggat gaagaagttc ggcaaggatt	900
aaaagcttac tcaaattggc caacatacc tcagctgtat gtgaaagggg agctggtggg	960
aggattggat attgtgaagg aactgaaaga aaatggtgaa ttgctgccta tactgagagg	1020
agaaaattaa taaatcttaa acttggtgcc caactattgt aagaaatatt taattacatt	1080
gggagcagtt catgatttag tcctcagaaa tggactagga atagaaaatt cctgctttct	1140
cagttacatg ttttgtgtat ttcacaatgt cgtgctaaat aaatgtatgt tacatttttt	1200
tcccaccaa aatagaatgc aataaacatc ttcaaattat taacgaaaaa aaaaaaaaaa	1260
aaaaaaaaa aaaa	1274

<210> 22
 <211> 710
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22	
gctcgtccgc tccctcccc gcgccgtgca cgtcttggtt cgggccgggc ataaaaggct	60
tcgcgccca gggetcaact ggcgctgaga acgcggtcc acgctgtga tcgtccgtgc	120
gtctagcctt tgcccacgca gctttcagtc atggcctccg gtaacgcgcg catcgaaag	180
ccagcccctg acttcaaggc cacagcggtg gttgatggcg cttcaaaga ggtgaagctg	240
tcggactaca aaggaagta cgtggctctc tttttctacc ctctggactt cacttttgtg	300
tgccccaccg agatcatgc gttcagcaac cgtgcagagg acttccgcaa gctgggctgt	360
gaagtgctgg gcgtctcggg ggactctcag ttcaccacc tggttggtg tgagcagggg	420
ccaagaggg aggttgacg taagctcaca ccctcaggtc ctagcagtgt ggcttcgtgg	480
ccattgctca acctctggaa cctgcgtttc cccatcgtga aaataatgga aacattgccg	540
ccaagtctt taaggatgat gacagtaatt agcatttgac aactagttgc ctggtatata	600
gagttgcaga tgcaactcag atgcaactct atctactcta tgtacttagt tcccaggagg	660
gaggctgtgc tgccctatth catgaagatg gaaactccag ttcaccgaag	710

<210> 23
 <211> 1715
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23	
gaaccaaccg gttgcttgc gtcccagcgg cgtccccca tcaccgtcgc catgcccga	60

ggtctgcttc tcggggacgt ggctcccaac tttgaggcca ataccaccgt cggccgcac 120
 cgtttccacg actttctggg agactcatgg ggcatttctt tctcccaccc tcgggacttt 180
 accccagtgt gcaccacaga gcttggcaga gctgcaaagc tggcaccaga atttgccaa 240
 aggaatgtta agttgattgc cctttcaata gacagtgttg aggaccatct tgcctggagc 300
 aaggatatca atgcttacia ttgtgaagag cccacagaaa agttaccttt tcccatcatc 360
 gatgatagga atcgggagct tgccatcctg ttgggcatgc tggatccagc agagaaggat 420
 gaaaagggca tgcctgtgac agctcgtgtg gtgtttgttt ttggtcctga taagaagctg 480
 aagctgtcta tcctctacc agctaccact ggcaggaact ttgatgagat tctcagggta 540
 gtcattcttc tccagctgac agcagaaaaa agggttgcca cccagttga ttggaaggat 600
 ggggatagtg tgatggctct tccaaccatc cctgaagaag aagccaaaaa acttttccc 660
 aaaggagtct tcaccaaaga gctcccatct ggcaagaaat acctccgcta cacacccag 720
 ccttaagtct ctgggagaag ctgggtgctg gagccagagg atgtcagctg ccaattgtgt 780
 tttcctgcag caattccata aacacatcct ggtgtcatca cagccaaggt ttttaggtt 840
 ctataccaat ggcttattaa atgaaaatgg cactaaaagt ttcttgagat tctttatact 900
 ctctgccttc agcaatcaat tccattcata catcagcact ctgctggttc tgtttgaaat 960
 atgttctgta tttaaaactc aaatcttggt ggatctctgc agggcttggt accaatgaag 1020
 tcatatttgt tgatggttga caaagcttgc ttcactccat cagagaaatga ctatcaattt 1080
 ttttttaact gtcctatcac gtcctctcct gtcaccatt ttgaagagtg gcagaacttg 1140
 aagttcaact tcctctgtaa atatccaagt ataaagccca ggaacttcta gaataacca 1200
 gatgcgcttt aatttttttt aatatgtttt gatcacagaa cttctagaat aaccagatg 1260
 ctctttcata ttcttttaac acatcttgat cacagctggg ggaaaaaaag ctttttaatt 1320
 ctataccttc ctagtagata agtgaagagc agggaaagag acctttaaat attttgctat 1380
 aaaaaaattt gtgataagtt tctatcaaaa tggggagatt gcagaaaagg cttcccttg 1440
 ctccaagga ggtgtagcag gtgtgagcaa tattagtgcc atgtgccttt cacacaggg 1500
 ttgcatttat cagtctgttt tccgatgatg tgtacatgaa agagtacacc atgtgaagag 1560
 aagagagaat gattgaaaat gtttttagtat agaactcttc ttgcagtggg ttgctat 1620
 ctagatttta ctttttaggg aacaaaataa aatcctttgt taaaactggg aaaaaaaaa 1680
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1715

<210> 24
 <211> 1182
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 aatgagggcc tccagggggc gggctggact gccgcgggcc ggggagcgt ctgggtggcc 60
 agctgtgggc ccgggccgtc gtgggctccg gcttgcgtgc ggagatgagc gggccctcg 120
 gccgagctgc ggcggctctg ctccgctggg ggcgcgccgc gggcggcggg ggcctttggg 180

gtccgggcgt gcgggcggcg ggctcgggcg cgggcggcgg cggctcggcg gagcagttgg 240
 acgcgctggt gaagaaggac aaggtggtgg tcttcctcaa ggggacgccg gagcagcccc 300
 agtgcggcctt cagcaacgcc gtggtgcaga tctcgcggct gcacggcgtc cgcgattacg 360
 cggcctacaa cgtgctggac gacccggagc tccgacaagg cattaagac tattccaact 420
 ggcccacat cccgcaagtg tacctcaatg gcgagtttgt agggggctgt gacattcttc 480
 tgcagatgca ccagaatggg gacttggtgg aagaactgaa aaagctgggg atccactccg 540
 cccttttaga tgaaaagaaa gaccaagact ccaagtgagg gcggccaagt cctcgcctgag 600
 cagagagga gccgttcagc tcagagactc actgccagaa aagccttacc cattttgggt 660
 ttcactattg agaccgcaac tgcttgact gatcattttg gttcgtgagc agttggtgat 720
 tttagttggt ctggtgttcg ggctaagaat attttattgt ggacttaatt acaaccactg 780
 cactgtaatg attcaatgct gtattatgat attgctgtaa acaaaattca ttcttatatt 840
 gtcacttatt ctttgctga ttcagaagtt aaataggagc tttggaatca ttattcatga 900
 cccctctgca aatgtgtcag tctccaaaga gagtatctcc ccccaaattt tgtgtagctt 960
 cttttgttat ggaaaatggt gaacaaaaaa agaaactgtg ataactgggg cgttgttttt 1020
 taaaataaac tccagcacag ggatgctgtg catgcctgag ttgattccga agtgcatatg 1080
 tctgtaagga tttggagtgc ctgcagtgtt ttatgtgtgg gaagtaaggg tgagtctcat 1140
 attcttctat taaatttgcc acaagaattg caaaaaaaaa aa 1182

<210> 25
 <211> 1170
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 aaggctatta ttaccaccac tgagtggcct aaataatcct gtcaacagca atcgcccatt 60
 tccaaagcca tggatgaaaca tctctgtgct aatttctttt gttttgtttc ctaatttttt 120
 ttttttggca ggtggtggga aataatcttt gtcttctttg gagtaaacct tcaacaccgg 180
 atttttctt ttaattatgg atgtaaacc caatatcccc ataatttaca ttgggtctcg 240
 accaattgcc taattataag aggatatatt taggctctta tttcatccac acaaaaactt 300
 gtgtaacagg tagttgaaa catctgaggc accactttga ttctgttttg gatggtcatg 360
 tttttctcc tccgtttccc cagcatgtct gccaccatcc tcatgactg cttccaagtg 420
 cctgggagcc tttatgagcg tccctaaacc taaaagaatc cagaggcggg gctcggatga 480
 accctcgaga taagcaagtg agccgcttct cccctctaaa ggatgtttac acgtgggtgg 540
 cactcgtggt aatccagcgc tcgggcagcc ctgggaggac gcgctcagct gcgaggagga 600
 tggagagcaa tacatcatca tctttggaga atttagcgac ggcgcctgtg aaccagatcc 660
 aagaacaat ttctgataat tgtgtggtga ttttctcaaa aacatcctgt tcttactgta 720
 caatggcaaa aaagcttttc catgacatga atgttaacta taaagtgggt gaactggacc 780
 tgcttgaata tggaaaccag ttccaagatg ctctttacaa aatgactggt gaaagaactg 840
 ttccaagaat atttgtcaat ggtactttta ttggaggtgc aactgacact cataggcttc 900

acaaagaagg aaaattgctc ccactagttc atcagtgtta tttaaaaaaaa agtaagagga 960
 aagaatttca gtgatgttta tactaataag tttgctagta cagtgtcagt tattttaaagt 1020
 ggtaatgcc gataatgtct tttaaatggt tgaggatggt ttaaatacat gcattgtctt 1080
 cacgaagaag atgtaaaaat aatgaacaat aaattgcggt ggaaaccta aaaaaaaaaa 1140
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1170

<210> 26
 <211> 964
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 gagcgctctg gagggcgtgg ccgtgggaaa ggaggcgcgg aaagccgacg cgcgtccatt 60
 ggtcggctgg acgaggggag gagccgctgg ctcccagccc cgccgcgatg agcctcggcc 120
 gcctttgcc cctactgaag ccggcgctgc tctgtggggc tctggccgcg cctggcctgg 180
 ccgggacat gtgcgcgtcc cgggacgact ggcgctgtgc gcgctccatg cacgagtttt 240
 ccgccaagga catcgacggg cacatgggta acctggacaa gtaccggggc ttcgtgtgca 300
 tcgtcaccaa cgtggcctcc cagtgaggca agaccgaagt aaactacact cagctcgtcg 360
 acctgcacgc ccgatacgct gagtgtgggt tgcggatcct ggccttcccg tgtaaccagt 420
 tcgggaagca ggagccaggg agtaacgaag agatcaaaga gttcgccgcg ggctacaacg 480
 tcaaattcga tatgttcagc aagatctgcg tgaacgggga cgacgccac ccgctgtgga 540
 agtggatgaa gatccaacc aagggcaagg gcacccctggg aaatgccatc aagtggaact 600
 tcaccaagtt tggacaccgt ctctccacag ttctcatcg acaagaacgg ctgctgtggtg 660
 aagcgctacg gacctatgga ggagcccctg gtgatagaga aggacctgcc ccaactatttc 720
 tagctccaca agtgtgtggc cccgcccag cccctgccc aagccttggg gccttccacc 780
 ggcaactcatg acggcctgcc tgcaaacctg ctgggtggggc agaccgaaa atccagcgtg 840
 caccgcccg gaggaaggtc ccatggcctg ctgggcttgg ctcggcgccc ccaccctgg 900
 ctaccttgtg ggaataaaca gacaaattag cctgctggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 960
 aaaa 964

<210> 27
 <211> 1031
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 agtcctgact acggcctccg ggccctttgt ccccgctagc ggcgctcggg gtgggggagc 60
 caggaggggc gggagacggg cgggtatggg ccgcgcgggc gcaggctccc ccgggcgccg 120
 caggcagcgg tgccagagcc ggggcaggcg gcggccgca gccctcggc ggcggaaggc 180
 cccagcgtgc aggcgcagga gggcgcgggc ccggcggaag aagccctgtc cccgcagctt 240
 gcgaccggag atccacgaat gtcccaagtc ccaggaccg tcgctgtccc gggacgactg 300
 gcgctgtgcg cgctccatgc acgagttttc cgccaaggac atcgacgggc acatggttaa 360

cctggacaag taccggggct tcgtgtgcat cgtcaccaac gtggcctccc agtgaggcaa	420
gaccgaagta aactacactc agctcgtcga cctgcacgcc cgatacgtg agtgtggttt	480
gcggtacctg gccttcccgt gtaaccagtt cgggaagcag gagccaggga gtaacgaaga	540
gatcaaagag ttcgccgagg gctacaacgt caaattcgat atgttcagca agatctgcgt	600
gaacggggac gacgcccacc cgctgtggaa gtggatgaag atccaacca agggcaaggg	660
catcctggga aatgccatca agtggaaactt caccaagttc ctcatcgaca agaacggctg	720
cgtaggtgaag cgctacggac ccatggagga gccctgggtg atagagaagg acctgcccc	780
ctatttctag ctccacaagt gtgtggcccc gcccgagccc ctgcccacgc ctttgagacc	840
ttccaccggc actcatgacg gcctgcctgc aaacctgctg gtggggcaga cccgaaaatc	900
cagcgtgcac cccgccggag gaaggtccca tggcctgctg ggcttggtc ggcgccccca	960
cccctggcta cttgtggga ataaacagac aaattagcct gctggaaaaa aaaaaaaaaa	1020
aaaaaaaaa a	1031

<210> 28
 <211> 1236
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 28	
actctcgcga gatccctact ggctataaag gcagcgcgcc ggagagctct tgcgcgtctt	60
gttcttgctt ggtgtcgggt gtttagtttct gcgacttggt ttgggactgg tgagtgtggg	120
cagtgcggcc cctgcggagt gaggcgcggc gcgcccttct tgctgttgc ctcttctctc	180
tcctgtccgg ggcccgccg cgctcgggtg ggggtgctgt gatgcgtgag gcagccgggg	240
gagggccgga gtccgagact gcttgagcgc tgcgcacacc cctctcgtgg gccccccacg	300
tagctgatag gaagatgtct tcaggaaatg ctaaaattgg gcaccctgcc cccaacttca	360
aagccacagc tgttatgcca gatggtcagt ttaaagatat cagcctgtct gactacaaag	420
gaaaatatgt tgtgttcttc ttttacctc ttgacttcac ctttgtgtgc cccacggaga	480
tcattgcttt cagtgatagg gcagaagaat ttaagaaact caactgcca gtgattgggtg	540
cttctgtgga ttctacttc tgtcatctag catgggtcaa tacacctaa aaacaaggag	600
gactgggacc catgaacatt ctttggtat cagaccgaa gcgcaccatt gctcaggatt	660
atggggctct aaaggctgat gaaggcatct cgttcagggg cttttttatc attgatgata	720
agggtattct tcggcagatc actgtaaatg acctccctgt tggccgctct gtggatgaga	780
ctttgagact agttcaggcc ttccagttca ctgacaaaca tggggaagtg tgcccagctg	840
gctggaaacc tggcagtgat accatcaagc ctgatgtcca aaagagcaaa gaatatttct	900
ccaagcagaa gtgagcgtg ggctgtttta gtgccaggct gcggtgggca gccatgagaa	960
caaacctct tctgtatttt tttttccat tagtaaaaca caagacttca gattcagccg	1020
aattgtgggt tcttacaagg caggcctttc ctacaggggg tggagagacc agcctttctt	1080
cctttggtag gaatggcctg agttggcggt gtgggcaggc tactggtttg tatgatgtat	1140

tagtagagca acccattaat cttttgtagt ttgtattaaa cttgaactga gaccttgatg 1200
 agtctttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1236

<210> 29
 <211> 1042
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 actctcgcga gatccctact ggctataaag gcagcgcgcc ggagagctct tgcgcgtctt 60
 gttcttgcct ggtgtcgggtg gttagtttct gcgacttgtg ttgggactgc tgataggaag 120
 atgtcttcag gaaatgctaa aattgggcac cctgccccca acttcaaagc cacagctggt 180
 atgccagatg gtcagtttaa agatattcagc ctgtctgact acaaaggaaa atatgttgtg 240
 ttcttctttt accctcttga cttcaccttt gtgtgccccca cggagatcat tgctttcagt 300
 gatagggcag aagaatttaa gaaactcaac tgccaagtga ttggtgcttc tgtggattct 360
 cacttctgtc atctagcatg ggtcaataca cctaagaaac aaggaggact gggacccatg 420
 aacattcctt tggatcaga cccgaagcgc accattgctc aggattatgg ggtcttaaag 480
 gctgatgaag gcatctcggt caggggcctt tttatcattg atgataaggg tattcttcgg 540
 cagatcactg taaatgacct ccctgttggc cgctctgtgg atgagacttt gagactagtt 600
 caggccttcc agttcactga caaacatggg gaagtgtgcc cagctggctg gaaacctggc 660
 agtgatacca tcaagcctga tgtccaaaag agcaaagaat atttctccaa gcagaagtga 720
 gcgctgggct gttttagtg caggctgcgg tgggcagcca tgagaacaaa acctcttctg 780
 tatttttttt ttccattagt aaaacacaag acttcagatt cagccgaatt gtggtgtctt 840
 acaaggcagg cttttcctac aggggggtgga gagaccagcc tttcttcctt tggtaggaat 900
 ggcctgagtt ggcgttgtgg gcaggctact ggtttgtatg atgtattagt agagcaaccc 960
 attaactttt tgtagtttgt attaaacttg aactgagacc ttgatgagtc tttaaaaaaaa 1020
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1042

<210> 30
 <211> 1035
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 gcggtgccct tgcggcgcag ctggggtcgc ggccctgctc cccgcgcttt cttaaggccc 60
 gcgggcggcg caggagcggc actcgtggct gtggtggctt cggcagcggc ttcagcagat 120
 cggcggcatc agcggtagca ccagcactag cagcatgttg agccgggcag tgtgcggcac 180
 cagcaggcag ctggctccgg ttttggggta tctgggctcc aggcagaagc acagcctccc 240
 cgacctgccc tacgactacg gcgccctgga acctcacatc aacgcgcaga tcatgcagct 300
 gcaccacagc aagcaccagc cggcctacgt gaacaacctg aacgtcaccg aggagaagta 360
 ccaggaggcg ttggccaagg gagatgttac agcccagata gctcttcagc ctgactgaa 420
 gttcaatggt ggtggtcata tcaatcatag cattttctgg acaaacctca gccctaacgg 480

tgggtggagaa cccaaagggg agttgctgga agccatcaaa cgtgactttg gttcctttga 540
 caagtttaag gagaagctga cggctgcatc tgttggtgtc caaggctcag gttgggggtg 600
 gcttggtttc aataaggaac ggggacactt acaaattgct gcttgtccaa atcaggatcc 660
 actgcaagga acaacaggcc ttattccact gctggggatt gatgtgtggg agcacgctta 720
 ctaccttcag tataaaaatg tcaggcctga ttatctaaaa gctattttgga atgtaatcaa 780
 ctgggagaaat gtaactgaaa gatacatggc ttgcaaaaag taaaccacga tcgttatgct 840
 gatcataccc taatgatccc agcaagataa tgtcctgtct tctaagatgt gcatcaagcc 900
 tggtagatac tgaaaaccct ataaggctct ggataatfff tgtttgatta ttcattgaag 960
 aacattttat tttccaattg tgtgaagttt ttgactgtta ataaaagaat ctgtcaacca 1020
 tcaaaaaaaaa aaaaa 1035

<210> 31
 <211> 918
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 gcggtgccct tgcggcgcag ctggggctgc gccctgctc cccgcgcttt cttaggccc 60
 gcgggcggcg caggagcggc actcgtggct gtgggtggctt cggcagcggc ttcagcagat 120
 cggcggcatc agcggtagca ccagcactag cagcatgttg agccgggcag tgtgcggcac 180
 cagcaggcag ctggctccgg ttttggggta tctgggctcc aggcagaagc acagcctccc 240
 cgacctgccc tacgactacg gcgccctgga acctcacatc aacgcgcaga tcatgcagct 300
 gcaccacagc aagcaccacg cggcctacgt gaacaacctg aacgtcaccg aggagaagta 360
 ccaggaggcg ttggccaagg gggagttgct ggaagccatc aaacgtgact ttggttcctt 420
 tgacaagttt aaggagaagc tgacggctgc atctgttggg gtccaaggct caggttgggg 480
 ttggcttggg ttcaataagg aacggggaca cttacaaatt gctgcttgtc caaatcagga 540
 tccactgcaa ggaacaacag gccttattcc actgctgggg attgatgtgt gggagcacgc 600
 ttactacctt cagtataaaa atgtcaggcc tgattatcta aaagctattt ggaatgtaat 660
 caactgggag aatgtaactg aaagatacat ggcttgcaaa aagtaaacca cgatcgttat 720
 gctgatcata ccctaagat cccagcaaga taatgtcctg tcttctaaga tgtgcatcaa 780
 gcctgtgaca tactgaaaac cctataaggt cctggataat ttttgtttga ttattcattg 840
 aagaaacatt tattttcaa ttgtgtgaag tttttgactg ttaataaaag aatctgtcaa 900
 ccatcaaaaa aaaaaaaaa 918

<210> 32
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sense oligonucleotide for CAT

<400> 32
 cgagttcgg ttctccac

<210> 33
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antisense oligonucleotide for CAT

<400> 33
gggtcccgaactgtgtca 18

<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sense oligonucleotide for SOD1

<400> 34
gcatcatcaatttcgagcag 20

<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antisense oligonucleotide for SOD1

<400> 35
caggccttca gtcagtcctt 20

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sense oligonucleotide for GPX1

<400> 36
caaccagttt gggcatcag 19

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> antisense oligonucleotide for GPX1

<400> 37
gttcacctcg cacttctcg 19

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> sense oligonucleotide for GPX4

<400> 38
 tacggacca tggaggag 18

<210> 39
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antisense oligonucleotide for GPX4

<400> 39
 ccacacactt gtggagctag aa 22

<210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sense oligonucleotide for PRDX2

<400> 40
 cactgacaaa catggggaag t 21

<210> 41
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antisense oligonucleotide for PRDX2

<400> 41
 tttgctcttt tggacatcag g 21

<210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> sense oligonucleotide for SOD2

<400> 42
 tccactgcaa ggaacaacag 20

<210> 43
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> antisense oligonucleotide for SOD2

<400> 43
 taagcgtgct cccacacat 19

<210> 44
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> sense oligonucleotide for GPX2

<400> 44

gtccttggt tcccttgc

18

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antisense oligonucleotide for GPX2

<400> 45

tggtcaggat ctctcattc tg

22

<210> 46

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> sense oligonucleotide for GAPDH

<400> 46

agccacatcg ctgagacac

19

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> antisense oligonucleotide for GAPDH

<400> 47

gcccaatag accaaatcc

19



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

établi sur la base des dernières revendications déposées avant le commencement de la recherche

FA 806265
FR 1461553

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	WO 2012/085188 A1 (UNIV FRANCOIS RABELAIS DE TOURS [FR]; HERAULT OLIVIER [FR]; VIGNON CHR) 28 juin 2012 (2012-06-28)	10	C12Q1/68
A	* séquences 31,32,47,48,27,28,55,56,33,34,37,38 * * alinéas [0022], [0027], [0029], [0033], [0039], [0078] * * tableau 1 * * alinéa [0202] - alinéa [0207] * * revendications 1-12 *	1-9	
Y	O. HERAULT ET AL: "A role for GPx3 in activity of normal and leukemia stem cells", BLOOD, vol. 117, no. 2, 16 avril 2012 (2012-04-16), pages 895-901, XP055203622, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-07-293332 * figure 1 * * page 896, colonne 1, dernier alinéa * * Materials and methods *	10	
Y	Anonymous: "RT 2 Profiler (TM) PCR Array: Human Oxidative Stress and Antioxidant Defense", 22 septembre 2007 (2007-09-22), pages 1-4, XP055203631, Extrait de l'Internet: URL:http://www.biomol.de/details/SA/DS/PAHS-065A.pdf [extrait le 2015-07-21] * le document en entier *	10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) C12Q
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 juillet 2015		Schmitt-Humbert, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 806265
FR 1461553

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	US 2007/154931 A1 (RADICH JERALD P [US] ET AL) 5 juillet 2007 (2007-07-05) * tableaux 1a,1b,8 * * revendications 1,18,19 * -----	1-9	
A,D	WO 2012/049329 A1 (PAMGENE BV [NL]; VERENIGING VOOR CHRISTELIJK HOGER ONDERWIJS WETENSCHA) 19 avril 2012 (2012-04-19) * revendications 1-15 * -----	1-9	
A	RIZWAN AHMAD ET AL: "OXIDATIVE STRESS AND ANTIOXIDANT STATUS IN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA", INDIAN JOURNAL OF CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 23, no. 4, 1 janvier 2008 (2008-01-01), pages 328-333, XP055203451, * le document en entier * -----	1-9	
A	W. YAN ET AL: "GPX2, a Direct Target of p63, Inhibits Oxidative Stress-induced Apoptosis in a p53-dependent Manner", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 12, 24 mars 2006 (2006-03-24), pages 7856-7862, XP055203509, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M512655200 * le document en entier * -----	1-10	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 juillet 2015		Schmitt-Humbert, C	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 806265
FR 1461553

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>CHIARA GORRINI ET AL: "Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 12, no. 12, 29 novembre 2013 (2013-11-29), pages 931-947, XP055203511, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd4002 * le document en entier * -----</p>	1-9	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		22 juillet 2015	Schmitt-Humbert, C
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1461553 FA 806265**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **22-07-2015**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2012085188 A1	28-06-2012	EP 2655658 A1	30-10-2013
		JP 2014506127 A	13-03-2014
		US 2013288924 A1	31-10-2013
		WO 2012085188 A1	28-06-2012

US 2007154931 A1	05-07-2007	US 2007154931 A1	05-07-2007
		US 2012072124 A1	22-03-2012

WO 2012049329 A1	19-04-2012	EP 2628012 A1	21-08-2013
		US 2013217055 A1	22-08-2013
		WO 2012049329 A1	19-04-2012
