

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 101 423**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **19 10884**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **G 01 N 33/50 (2019.12), G 01 N 33/68**

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 01.10.19.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 02.04.21 Bulletin 21/13.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *bioMérieux Société anonyme* — FR, *HOSPICES CIVILS DE LYON Etablissement public* — FR et *UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 Etablissement public* — FR.

⑦② Inventeur(s) : ASSANT Sophie, MALLET François, BARTOLO François et ALBERT VEGA Chloé.

⑦③ Titulaire(s) : *bioMérieux Société anonyme*, *HOSPICES CIVILS DE LYON Etablissement public*, *UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 Etablissement public*.

⑦④ Mandataire(s) : Cabinet GERMAIN & MAUREAU.

⑫④ Procédé pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus.

⑫⑤ Procédé pour déterminer LA CAPACITÉ D'UN INDIVIDU A REPONDRE A UN STIMULUS

La présente invention concerne un procédé in vitro ou ex vivo pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, basé sur la mesure de l'expression d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis dans des listes différentes parmi trois listes de biomarqueurs, à partir d'un échantillon sanguin dudit individu, incubé avec ledit stimulus, ainsi que des outils permettant la mise en œuvre de ce procédé et l'utilisation de ces outils.

FR 3 101 423 - A1



## Description

### **Titre de l'invention : Procédé pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus**

- [0001] La présente invention concerne un procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, basé sur la mesure de l'expression d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis dans des listes différentes parmi trois listes de biomarqueurs, à partir d'un échantillon sanguin dudit individu, incubé avec ledit stimulus, ainsi que des outils permettant la mise en œuvre de ce procédé et l'utilisation de ces outils.
- [0002] Le système immunitaire est un système de défense de l'organisme contre ce qui est reconnu comme du non-soi, tel que des pathogènes. La réponse immunitaire nécessite une régulation très fine et peut parfois se retrouver altérée, notamment dans le cas de maladies inflammatoires, allergiques ou auto-immunes (dans lesquelles le système immunitaire est plus actif que la normale), ou de maladies caractérisées par une immunosuppression (dans lesquelles le système immunitaire est moins actif que la normale). Cette immunosuppression peut avoir différentes origines, prendre de nombreuses formes, et affecter l'immunité innée et/ou l'immunité adaptative.
- [0003] En particulier, le sepsis a été reconnu comme priorité de santé par l'OMS en 2017, et représente un problème mondial en termes de morbidité, de mortalité, ainsi que de coûts. On estime que 31.5 millions d'individus développent un sepsis chaque année à travers le monde, parmi lesquels 6 millions décèderont de la pathologie et 3 millions souffriront de troubles pouvant mener à une réadmission à l'hôpital. Chez un patient atteint de sepsis (dit également, en état septique), la réponse immunitaire est dérégulée, suite à une infection, ce qui conduit à une défaillance et des dysfonctions d'organes multiples et potentiellement mortelles. Cette réponse immunitaire est complexe et évolue en fonction du temps, avec des phénomènes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires excessifs et pouvant être concomitants. L'ensemble de ces dérèglements du système immunitaire conduit aux défaillances d'organes, à la paralysie du système immunitaire et aux infections secondaires. Le choc septique est un sous-type de sepsis, dans lequel une hypotension persiste, malgré un remplissage vasculaire adéquat. Au stade initial du sepsis, c'est une réponse inflammatoire, voire hyper-inflammatoire (incluant un choc cytokinique), qui semble prédominer, et qui est à l'origine de dommages tissulaires et de défaillances organiques, notamment au niveau rénal. C'est pourquoi les essais cliniques dans le domaine du sepsis se sont pendant longtemps concentrés sur des traitements anti-inflammatoires, mais avec des résultats peu concluants. Des études plus récentes sur la pathophysiologie du sepsis ont conduit

à montrer qu'une réponse anti-inflammatoire ou d'immunosuppression survenait chez les patients en état septique, soit de manière concomitante à l'inflammation initiale, soit plus tard, afin de tenter de compenser la réponse hyper-inflammatoire. Le patient peut alors se retrouver dans un état d'immunosuppression, potentiellement sévère, en fonction des degrés respectifs des réponses pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Ces patients immunodéprimés présentent un risque élevé de développer des infections nosocomiales (ou HAI, *Hospital-Acquired Infections* ou *Healthcare-Associated Infections*) et d'être sujets à une réactivation virale, et pourraient avantageusement bénéficier de traitements immunostimulants. Cependant, des premières études réalisées chez des patients en choc septique n'ont montré aucun bénéfice avec de tels traitements. Cela peut être dû à la complexité de la pathophysiologie du sepsis (y compris la variabilité inter-individuelle de la réponse immunitaire), mais également à la dynamique de la réponse de l'hôte.

- [0004] La stratification des patients selon leur profil immunologique semble par conséquent essentielle à leur prise en charge efficace. Un outil diagnostique permettant une identification précise de la fonctionnalité du système immunitaire et du statut immunitaire est d'une importance fondamentale, afin de pouvoir adapter et personnaliser la prise en charge thérapeutique. Or, les individus ayant des dérèglements du système immunitaire ne présentent pas de signes cliniques spécifiques ; en particulier, l'interprétation de la réponse de l'hôte chez des patients septiques reste un challenge. Des biomarqueurs solubles ou membranaires ont été proposés, tels que l'expression du HLA-DR (*human leucocyte antigen – D related*) à la surface des monocytes (mHLA-DR) ou l'expression du CD88 chez les neutrophiles, ainsi que la numération des lymphocytes ou des plaquettes, mais ils sont chacun restreints à une seule population cellulaire, ce qui sous-estime probablement la contribution immunitaire globale.
- [0005] Dans certaines situations cliniques (comme la tuberculose latente), des tests fonctionnels, ou tests fonctionnels immunitaires (IFA, *Immune Functional Assays*), ont permis d'améliorer significativement la prise en charge des patients. Les tests fonctionnels mesurent directement, *ex vivo*, la capacité d'une ou plusieurs population(s) cellulaire(s) à répondre à un stimulus avec lequel les cellules sont mises en contact, et ont par exemple été utilisés en recherche pour étudier l'anergie des monocytes, le plus souvent en mesurant le TNF $\alpha$  au niveau protéique après une stimulation *ex vivo* avec du lipopolysaccharide (LPS), ainsi qu'en clinique, dans le cas de la tuberculose, en mesurant l'interféron  $\gamma$  au niveau protéique après une stimulation avec un antigène de *Mycobacteria tuberculosis*. Des tests fonctionnels ont également été utilisés dans le cadre d'une étude visant à définir les limites d'une réponse immunitaire normale (*i.e.* en contexte « sain ») en réponse à différents challenges infectieux (Urrutia et al (2016), Cell Reports 16 : 2777-2791).

[0006] Or, il a été découvert que, de façon tout-à-fait surprenante, des tests fonctionnels basés sur la mesure de l'expression de certains biomarqueurs particuliers, classifiés en trois listes, à partir d'un échantillon sanguin d'un individu, incubé avec un stimulus, permettaient de déterminer la capacité de cet individu (pouvant être aussi bien un individu sain qu'un individu malade, tel qu'un patient atteint de sepsis) à répondre à ce stimulus. En particulier, ces tests fonctionnels permettent de mettre en évidence l'hétérogénéité inter-patients de la réponse immunitaire, de manière dynamique, en termes de dysfonctions de la réponse immunitaire innée et/ou adaptative, et donc de capturer la singularité de la capacité de réponse de chaque patient, de manière à en déduire des informations utiles quant au diagnostic, au pronostic et/ou à la prise en charge thérapeutique du patient. Le test fonctionnel selon l'invention permet en particulier de mettre en évidence trois catégories d'individus : des individus présentant un profil immunitaire non altéré à légèrement altéré (cluster S1), des individus présentant un profil immunitaire fortement altéré (cluster S2) et des individus présentant un profil immunitaire intermédiaire (cluster S3). Les individus du cluster S2, dont l'immunité apparaît fortement altérée et présentant une plus grande probabilité de mortalité, pourraient avantageusement bénéficier d'interventions thérapeutiques plus « agressives » et/ou plus précoces, tandis que le *standard of care* serait suffisant pour des individus du cluster S1, dont l'immunité est peu altérée ; chez les individus du cluster S3, dont l'immunité semble restaurable, des traitements personnalisés (e.g. IL-7, interféron  $\gamma$ ) pourraient avantageusement être testés.

[0007] Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, de préférence pour déterminer la capacité du système immunitaire d'un individu à répondre à un stimulus, comprenant :

a) Une étape d'incubation d'un échantillon sanguin dudit individu avec ledit stimulus, et

b) Une étape de mesure de l'expression, à partir de l'échantillon sanguin stimulé résultant de l'étape a), d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1 : BST2, CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD3D, CD44, CD74, CD83, CLEC7A, CXCL10, CXCL2, CXCL9, DYRK2, FAM89A, HLA-DMB, HLA-DPB1, IFNG, IL1A, IRAK2, PTGS2, RARRES3, DDX58, SLAMF7, SRC, STAT2, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;

- Liste S2 : ADGRE3, ARL14EP, BST2, C3, CCL2, CCL20, CCL8, CCNB1IP1, IL7R, CD209, CD3D, CD44, CD74, CD83, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, CXCL10, CXCL2, CXCL9, DYRK2, FAM89A, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA, IFITM1, IRAK2, SLAMF7, TGFB1 ;

- Liste S3 : 121601901-HERV0116, BST2, C3, CCL20, CCL4, CCL8, CCR1, IL7R, CD209, CD44, CD74, CD83, CLEC7A, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DRA, IL1A, IL2, RARRES3, SLAMF7, STAT2.

[0008]

[Tableaux1]

<b>Biomarqueurs cibles</b>	<b>Localisation chromosomique (GRCh38/hg38)</b>
ADGRE3	chr19:14,619,117-14,690,027
ARL14EP	chr11:30,323,099-30,338,458
BST2	chr19:17,402,939-17,405,648
C3	chr19:6,677,704-6,730,562
CCL2	chr17:34,255,218-34,257,203
CCL20	chr2:227,805,739-227,817,564
CCL4	chr17:36,103,827-36,105,621
CCL8	chr17:34,319,047-34,321,402
CCNB1IP1	chr14:20,311,368-20,333,312
CCR1	chr3:46,201,709-46,208,341
CD209	chr19:7,739,988-7,747,605
CD3D	chr11:118,338,954-118,342,744
CD44	chr11:35,138,870-35,232,402
CD74	chr5:150,400,041-150,412,936
CD83	chr6:14,117,256-14,136,918
CDKN1A	chr6:36,676,460-36,687,339
CLEC7A	chr12:10,116,777-10,130,273
CX3CR1	chr3:39,263,494-39,281,735
CXCL10	chr4:76,021,116-76,023,536
CXCL2	chr4:74,097,035-74,099,280
CXCL9	chr4:76,001,275-76,007,523
DDX58	chr9:32,455,302-32,526,324
DYRK2	chr12:67,648,338-67,665,406
EIF2AK4	chr15:39,934,115-40,035,596
FAM89A	chr1:231,018,958-231,040,254
HLA-DMB	chr6:32,934,629-32,941,070
HLA-DPA1	chr6:33,064,569-33,080,778
HLA-DPB1	chr6:33,075,926-33,089,696
HLA-DRA	chr6:32,439,842-32,445,046

IFITM1	chr11:313,506-315,272
IFNG	chr12:68,154,768-68,159,741
IL1A	chr2:112,773,915-112,785,394
IL2	chr4:122,451,470-122,456,725
IL7R	chr5:35,852,695-35,879,603
IRAK2	chr3:10,164,879-10,243,745
PTGS2	chr1:186,671,791-186,680,427
RARRES3	chr11:63,536,801-63,546,462
SLAMF7	chr1:160,739,057-160,754,821
SRC	chr20:37,344,685-37,406,050
STAT2	chr12:56,341,597-56,360,253
STING1	chr5:139,475,533-139,482,758
TGFB1	chr19:41,301,587-41,353,933
TNFA	chr6:31,575,565-31,578,336
TNFSF13B	chr13:108,251,240-108,308,484
ZBP1	chr20:57,603,846-57,620,576
121601901-HERV0116	chr12:112972627-112975754

[0009] **Tableau 1. Localisation chromosomique des biomarqueurs selon le GRCh38/hg38**

[0010] Dans le cadre de la présente invention :

- [0011] – Le terme « individu » désigne un être humain, quel qu'il soit (et notamment quel que soit son état de santé, qu'il s'agisse d'un individu sain ou d'un individu malade). Le terme « patient » désigne un individu qui est entré en contact avec un professionnel de la santé, tel qu'un médecin (par exemple, un médecin généraliste) ou une structure médicale (par exemple, un hôpital, et plus particulièrement le service des urgences, le service de réanimation, une unité de soins intensifs ou une unité de soins continus). Un patient est généralement un individu malade, mais il peut également s'agir d'un individu sain (comme par exemple, une personne âgée venant se faire vacciner) ;
- Le « stimulus » correspond à une ou plusieurs molécules, capable(s) d'induire une réponse immune et permettant d'évaluer qualitativement et/ou quantitativement la réponse immune de l'individu ; en particulier, il peut s'agir d'immunogène(s) (ou « challenge(s) ») ou de molécule(s) à visée théra-

- peutique ;
- Déterminer la « capacité d'un individu à répondre à un stimulus » peut avoir plusieurs utilités, aussi bien diagnostique (e.g. identifier le statut immunitaire de l'individu, qui peut être un statut normal, un statut d'inflammation ou un statut d'immunosuppression) que pronostique (e.g. identifier les individus dont le statut immunitaire peut évoluer - par exemple, d'un statut normal vers un statut d'inflammation ou inversement, ou encore les individus qui vont passer d'un statut d'immunosuppression à un statut d'inflammation), afin par exemple d'adapter la prise en charge thérapeutique, ou encore de prédiction et/ou de suivi de l'efficacité de réponse à un traitement ;
  - Un « échantillon sanguin » désigne un échantillon de sang total ou un échantillon cellulaire dérivé du sang (i.e. un échantillon obtenu à partir du sang et contenant au moins un type de cellules, tel qu'un échantillon de cellules mononuclées du sang périphérique ou PBMC) ;
  - Un « biomarqueur » ou « marqueur » est une caractéristique biologique mesurable objectivement qui représente un indicateur des processus biologiques normaux ou pathologiques ou de réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Il peut s'agir en particulier d'un biomarqueur moléculaire, de préférence détectable au niveau ARNm. Plus particulièrement, le biomarqueur peut être un biomarqueur endogène ou loci (tel qu'un gène ou un *HERV / Human Endogenous RetroVirus*, qui se retrouvent dans le matériel chromosomique d'un individu) ou un biomarqueur exogène (tel qu'un virus) ;
- [0012] De préférence, dans le procédé tel que décrit précédemment, les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :
- Liste S1-1 : BST2, CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD3D, CD44, CD83, CXCL2, DYRK2, HLA-DMB, IFNG, IL1A, IRAK2, PTGS2, RARRES3, DDX58, SRC, STAT2, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;
  - Liste S2-1 : ADGRE3, ARL14EP, C3, CCL2, CCNB1IP1, IL7R, CD3D, CD44, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, CXCL2, DYRK2, HLA-DMB, HLA-DRA, IFITM1, IRAK2, TGFB1 ;
  - Liste S3-1 : 121601901-HERV0116, C3, CCR1, IL7R, CD44, CD74, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DRA, IL1A, IL2, RARRES3, SLAMF7, STAT2.
- [0013] De préférence encore, dans le procédé tel que décrit précédemment, les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :
- Liste S1-2 : CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD44, CD83, CXCL2, IFNG, IL1A,



IRAK2, PTGS2, DDX58, SRC, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;

- Liste S2-2 : ADGRE3, ARL14EP, CCL2, CCNB1IP1, IL7R, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, DYRK2, IFITM1, TGFB1 ;

- Liste S3-2 : 121601901-HERV0116, C3, CCR1, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, IL2, SLAMF7.

[0014] De manière encore plus préférée, dans le procédé tel que décrit précédemment, les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1-3 : IFNG, PTGS2, DDX58, SRC, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;

- Liste S2-3 : ADGRE3, ARL14EP, CCL2, CCNB1IP1, CDKN1A, CX3CR1, IFITM1, TGFB1 ;

- Liste S3-3 : 121601901-HERV0116, CCR1, EIF2AK4, HLA-DPA1, IL2.

[0015] De préférence, le procédé tel que décrit précédemment est un procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, de préférence pour déterminer la capacité du système immunitaire d'un individu à répondre à un stimulus, comprenant :

a) Une étape d'incubation d'un échantillon sanguin dudit individu avec ledit stimulus, et

b) Une étape de mesure de l'expression, à partir de l'échantillon sanguin stimulé résultant de l'étape a), d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans :

- La Liste S1, la Liste S2 et la Liste S3 ;

- La Liste S1-1, la Liste S2-1 et la Liste S3-1 ;

- La Liste S1-2, la Liste S2-2 et la Liste S3-2 ; ou

- La Liste S1-3, la Liste S2-3 et la Liste S3-3.

[0016] De préférence encore, dans l'étape b) ci-dessus, on mesure l'expression, à partir de l'échantillon sanguin stimulé résultant de l'étape a) :

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38, au moins 39, au moins 40, au moins 41, au moins 42, au moins 43, au moins 44, au moins 45, au moins 46 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1, S2 et S3 ;

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au

moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38, au moins 39, au moins 40, au moins 41, au moins 42, au moins 43, au moins 44, au moins 45 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-1, S2-1 et S3-1 ;

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au

[0017] moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-2, S2-2 et S3-2 ; ou

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-3, S2-3 et S3-3.

[0018] Les combinaisons de deux et trois biomarqueurs particulièrement préférées, pour être utilisées dans le cadre du procédé tel que décrit précédemment, sont divulguées dans le Tableau 2.

[0019]

[Tableaux2]

Combinaisons de deux bio-marqueurs respectivement choisis dans les Listes S1-3 et S2-3	IFNG	ADGRE3	
	IFNG	ARL14EP	
	IFNG	CCL2	
	IFNG	CCNB1IP1	
	IFNG	CDKN1A	
	IFNG	CX3CR1	
	IFNG	IFITM1	
	IFNG	TGFB1	
	PTGS2	ADGRE3	
	PTGS2	ARL14EP	
	PTGS2	CCL2	
	PTGS2	CCNB1IP1	
	PTGS2	CDKN1A	
	PTGS2	CX3CR1	
	PTGS2	IFITM1	
	PTGS2	TGFB1	
	DDX58	ADGRE3	
	DDX58	ARL14EP	
	DDX58	CCL2	
	DDX58	CCNB1IP1	
	DDX58	CDKN1A	
	DDX58	CX3CR1	
	DDX58	IFITM1	
	DDX58	TGFB1	
	SRC	ADGRE3	
	SRC	ARL14EP	
	SRC	CCL2	
	SRC	CCNB1IP1	
	SRC	CDKN1A	
	SRC	CX3CR1	

SRC	IFITM1	
SRC	TGFB1	
STING	ADGRE3	
STING	ARL14EP	
STING	CCL2	
STING	CCNB1IP1	
STING	CDKN1A	
STING	CX3CR1	
STING	IFITM1	
STING	TGFB1	
TNFA	ADGRE3	
TNFA	ARL14EP	
TNFA	CCL2	
TNFA	CCNB1IP1	
TNFA	CDKN1A	
TNFA	CX3CR1	
TNFA	IFITM1	
TNFA	TGFB1	
TNFSF13B	ADGRE3	
TNFSF13B	ARL14EP	
TNFSF13B	CCL2	
TNFSF13B	CCNB1IP1	
TNFSF13B	CDKN1A	
TNFSF13B	CX3CR1	
TNFSF13B	IFITM1	
TNFSF13B	TGFB1	
ZBP1	ADGRE3	
ZBP1	ARL14EP	
ZBP1	CCL2	
ZBP1	CCNB1IP1	
ZBP1	CDKN1A	

ZBP1	CX3CR1	
ZBP1	IFITM1	
ZBP1	TGFB1	

Combinaisons de deux bio-marqueurs respectivement choisis dans les Listes S1-3 et S3-3	IFNG	121601901-HERV0116	
	IFNG	CCR1	
	IFNG	EIF2AK4	
	IFNG	HLA-DPA1	
	IFNG	IL2	
	PTGS2	121601901-HERV0116	
	PTGS2	CCR1	
	PTGS2	EIF2AK4	
	PTGS2	HLA-DPA1	
	PTGS2	IL2	
	DDX58	121601901-HERV0116	
	DDX58	CCR1	
	DDX58	EIF2AK4	
	DDX58	HLA-DPA1	
	DDX58	IL2	
	SRC	121601901-HERV0116	
	SRC	CCR1	
	SRC	EIF2AK4	
	SRC	HLA-DPA1	
	SRC	IL2	
	STING	121601901-HERV0116	
	STING	CCR1	
	STING	EIF2AK4	
	STING	HLA-DPA1	
	STING	IL2	
	TNFA	121601901-HERV0116	

TNFA	CCR1	
TNFA	EIF2AK4	
TNFA	HLA-DPA1	
TNFA	IL2	
TNFSF13B	121601901-HERV0 116	
TNFSF13B	CCR1	
TNFSF13B	EIF2AK4	
TNFSF13B	HLA-DPA1	
TNFSF13B	IL2	
ZBP1	121601901-HERV0 116	
ZBP1	CCR1	
ZBP1	EIF2AK4	
ZBP1	HLA-DPA1	
ZBP1	IL2	

Combinaisons de deux bio-marqueurs respectivement choisis dans les Listes S2-3 et S3-3	ADGRE3	121601901-HERV0116	
	ADGRE3	CCR1	
	ADGRE3	EIF2AK4	
	ADGRE3	HLA-DPA1	
	ADGRE3	IL2	
	ARL14EP	121601901-HERV0116	
	ARL14EP	CCR1	
	ARL14EP	EIF2AK4	
	ARL14EP	HLA-DPA1	
	ARL14EP	IL2	
	CCL2	121601901-HERV0116	
	CCL2	CCR1	
	CCL2	EIF2AK4	
	CCL2	HLA-DPA1	
	CCL2	IL2	
	CCNB1IP1	121601901-HERV0116	
	CCNB1IP1	CCR1	
	CCNB1IP1	EIF2AK4	
	CCNB1IP1	HLA-DPA1	
	CCNB1IP1	IL2	
	CDKN1A	121601901-HERV0116	
	CDKN1A	CCR1	
	CDKN1A	EIF2AK4	
	CDKN1A	HLA-DPA1	
	CDKN1A	IL2	
	CX3CR1	121601901-HERV0116	



CX3CR1	CCR1	
CX3CR1	EIF2AK4	
CX3CR1	HLA-DPA1	
CX3CR1	IL2	
IFITM1	121601901-HERV0 116	
IFITM1	CCR1	
IFITM1	EIF2AK4	
IFITM1	HLA-DPA1	
IFITM1	IL2	
TGFB1	121601901-HERV0 116	
TGFB1	CCR1	
TGFB1	EIF2AK4	
TGFB1	HLA-DPA1	
TGFB1	IL2	

Combinaisons de trois bio-marqueurs respectivement choisis dans chacune des Listes S1-3, S2-3 et S3-3	IFNG	ADGRE3	121601901-HERV 0116
	IFNG	ADGRE3	CCR1
	IFNG	ADGRE3	EIF2AK4
	IFNG	ADGRE3	HLA-DPA1
	IFNG	ADGRE3	IL2
	IFNG	ARL14EP	121601901-HERV 0116
	IFNG	ARL14EP	CCR1
	IFNG	ARL14EP	EIF2AK4
	IFNG	ARL14EP	HLA-DPA1
	IFNG	ARL14EP	IL2
	IFNG	CCL2	121601901-HERV 0116
	IFNG	CCL2	CCR1
	IFNG	CCL2	EIF2AK4
	IFNG	CCL2	HLA-DPA1
	IFNG	CCL2	IL2
	IFNG	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
	IFNG	CCNB1IP1	CCR1
	IFNG	CCNB1IP1	EIF2AK4
	IFNG	CCNB1IP1	HLA-DPA1
	IFNG	CCNB1IP1	IL2
	IFNG	CDKN1A	121601901-HERV 0116
	IFNG	CDKN1A	CCR1
	IFNG	CDKN1A	EIF2AK4
	IFNG	CDKN1A	HLA-DPA1
	IFNG	CDKN1A	IL2
	IFNG	CX3CR1	121601901-HERV 0116

IFNG	CX3CR1	CCR1
IFNG	CX3CR1	EIF2AK4
IFNG	CX3CR1	HLA-DPA1
IFNG	CX3CR1	IL2
IFNG	IFITM1	121601901-HERV 0116
IFNG	IFITM1	CCR1
IFNG	IFITM1	EIF2AK4
IFNG	IFITM1	HLA-DPA1
IFNG	IFITM1	IL2
IFNG	TGFB1	121601901-HERV 0116
IFNG	TGFB1	CCR1
IFNG	TGFB1	EIF2AK4
IFNG	TGFB1	HLA-DPA1
IFNG	TGFB1	IL2
PTGS2	ADGRE3	121601901-HERV 0116
PTGS2	ADGRE3	CCR1
PTGS2	ADGRE3	EIF2AK4
PTGS2	ADGRE3	HLA-DPA1
PTGS2	ADGRE3	IL2
PTGS2	ARL14EP	121601901-HERV 0116
PTGS2	ARL14EP	CCR1
PTGS2	ARL14EP	EIF2AK4
PTGS2	ARL14EP	HLA-DPA1
PTGS2	ARL14EP	IL2
PTGS2	CCL2	121601901-HERV 0116
PTGS2	CCL2	CCR1

PTGS2	CCL2	EIF2AK4
PTGS2	CCL2	HLA-DPA1
PTGS2	CCL2	IL2
PTGS2	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
PTGS2	CCNB1IP1	CCR1
PTGS2	CCNB1IP1	EIF2AK4
PTGS2	CCNB1IP1	HLA-DPA1
PTGS2	CCNB1IP1	IL2
PTGS2	CDKN1A	121601901-HERV 0116
PTGS2	CDKN1A	CCR1
PTGS2	CDKN1A	EIF2AK4
PTGS2	CDKN1A	HLA-DPA1
PTGS2	CDKN1A	IL2
PTGS2	CX3CR1	121601901-HERV 0116
PTGS2	CX3CR1	CCR1
PTGS2	CX3CR1	EIF2AK4
PTGS2	CX3CR1	HLA-DPA1
PTGS2	CX3CR1	IL2
PTGS2	IFITM1	121601901-HERV 0116
PTGS2	IFITM1	CCR1
PTGS2	IFITM1	EIF2AK4
PTGS2	IFITM1	HLA-DPA1
PTGS2	IFITM1	IL2
PTGS2	TGFB1	121601901-HERV 0116
PTGS2	TGFB1	CCR1
PTGS2	TGFB1	EIF2AK4

PTGS2	TGFB1	HLA-DPA1
PTGS2	TGFB1	IL2
DDX58	ADGRE3	121601901-HERV 0116
DDX58	ADGRE3	CCR1
DDX58	ADGRE3	EIF2AK4
DDX58	ADGRE3	HLA-DPA1
DDX58	ADGRE3	IL2
DDX58	ARL14EP	121601901-HERV 0116
DDX58	ARL14EP	CCR1
DDX58	ARL14EP	EIF2AK4
DDX58	ARL14EP	HLA-DPA1
DDX58	ARL14EP	IL2
DDX58	CCL2	121601901-HERV 0116
DDX58	CCL2	CCR1
DDX58	CCL2	EIF2AK4
DDX58	CCL2	HLA-DPA1
DDX58	CCL2	IL2
DDX58	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
DDX58	CCNB1IP1	CCR1
DDX58	CCNB1IP1	EIF2AK4
DDX58	CCNB1IP1	HLA-DPA1
DDX58	CCNB1IP1	IL2
DDX58	CDKN1A	121601901-HERV 0116
DDX58	CDKN1A	CCR1
DDX58	CDKN1A	EIF2AK4
DDX58	CDKN1A	HLA-DPA1

DDX58	CDKN1A	IL2
DDX58	CX3CR1	121601901-HERV 0116
DDX58	CX3CR1	CCR1
DDX58	CX3CR1	EIF2AK4
DDX58	CX3CR1	HLA-DPA1
DDX58	CX3CR1	IL2
DDX58	IFITM1	121601901-HERV 0116
DDX58	IFITM1	CCR1
DDX58	IFITM1	EIF2AK4
DDX58	IFITM1	HLA-DPA1
DDX58	IFITM1	IL2
DDX58	TGFB1	121601901-HERV 0116
DDX58	TGFB1	CCR1
DDX58	TGFB1	EIF2AK4
DDX58	TGFB1	HLA-DPA1
DDX58	TGFB1	IL2
SRC	ADGRE3	121601901-HERV 0116
SRC	ADGRE3	CCR1
SRC	ADGRE3	EIF2AK4
SRC	ADGRE3	HLA-DPA1
SRC	ADGRE3	IL2
SRC	ARL14EP	121601901-HERV 0116
SRC	ARL14EP	CCR1
SRC	ARL14EP	EIF2AK4
SRC	ARL14EP	HLA-DPA1
SRC	ARL14EP	IL2

SRC	CCL2	121601901-HERV 0116
SRC	CCL2	CCR1
SRC	CCL2	EIF2AK4
SRC	CCL2	HLA-DPA1
SRC	CCL2	IL2
SRC	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
SRC	CCNB1IP1	CCR1
SRC	CCNB1IP1	EIF2AK4
SRC	CCNB1IP1	HLA-DPA1
SRC	CCNB1IP1	IL2
SRC	CDKN1A	121601901-HERV 0116
SRC	CDKN1A	CCR1
SRC	CDKN1A	EIF2AK4
SRC	CDKN1A	HLA-DPA1
SRC	CDKN1A	IL2
SRC	CX3CR1	121601901-HERV 0116
SRC	CX3CR1	CCR1
SRC	CX3CR1	EIF2AK4
SRC	CX3CR1	HLA-DPA1
SRC	CX3CR1	IL2
SRC	IFITM1	121601901-HERV 0116
SRC	IFITM1	CCR1
SRC	IFITM1	EIF2AK4
SRC	IFITM1	HLA-DPA1
SRC	IFITM1	IL2
SRC	TGFB1	121601901-HERV 0116

SRC	TGFB1	CCR1
SRC	TGFB1	EIF2AK4
SRC	TGFB1	HLA-DPA1
SRC	TGFB1	IL2
STING	ADGRE3	121601901-HERV 0116
STING	ADGRE3	CCR1
STING	ADGRE3	EIF2AK4
STING	ADGRE3	HLA-DPA1
STING	ADGRE3	IL2
STING	ARL14EP	121601901-HERV 0116
STING	ARL14EP	CCR1
STING	ARL14EP	EIF2AK4
STING	ARL14EP	HLA-DPA1
STING	ARL14EP	IL2
STING	CCL2	121601901-HERV 0116
STING	CCL2	CCR1
STING	CCL2	EIF2AK4
STING	CCL2	HLA-DPA1
STING	CCL2	IL2
STING	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
STING	CCNB1IP1	CCR1
STING	CCNB1IP1	EIF2AK4
STING	CCNB1IP1	HLA-DPA1
STING	CCNB1IP1	IL2
STING	CDKN1A	121601901-HERV 0116
STING	CDKN1A	CCR1



STING	CDKN1A	EIF2AK4
STING	CDKN1A	HLA-DPA1
STING	CDKN1A	IL2
STING	CX3CR1	121601901-HERV 0116
STING	CX3CR1	CCR1
STING	CX3CR1	EIF2AK4
STING	CX3CR1	HLA-DPA1
STING	CX3CR1	IL2
STING	IFITM1	121601901-HERV 0116
STING	IFITM1	CCR1
STING	IFITM1	EIF2AK4
STING	IFITM1	HLA-DPA1
STING	IFITM1	IL2
STING	TGFB1	121601901-HERV 0116
STING	TGFB1	CCR1
STING	TGFB1	EIF2AK4
STING	TGFB1	HLA-DPA1
STING	TGFB1	IL2
TNFA	ADGRE3	121601901-HERV 0116
TNFA	ADGRE3	CCR1
TNFA	ADGRE3	EIF2AK4
TNFA	ADGRE3	HLA-DPA1
TNFA	ADGRE3	IL2
TNFA	ARL14EP	121601901-HERV 0116
TNFA	ARL14EP	CCR1
TNFA	ARL14EP	EIF2AK4

TNFA	ARL14EP	HLA-DPA1
TNFA	ARL14EP	IL2
TNFA	CCL2	121601901-HERV 0116
TNFA	CCL2	CCR1
TNFA	CCL2	EIF2AK4
TNFA	CCL2	HLA-DPA1
TNFA	CCL2	IL2
TNFA	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
TNFA	CCNB1IP1	CCR1
TNFA	CCNB1IP1	EIF2AK4
TNFA	CCNB1IP1	HLA-DPA1
TNFA	CCNB1IP1	IL2
TNFA	CDKN1A	121601901-HERV 0116
TNFA	CDKN1A	CCR1
TNFA	CDKN1A	EIF2AK4
TNFA	CDKN1A	HLA-DPA1
TNFA	CDKN1A	IL2
TNFA	CX3CR1	121601901-HERV 0116
TNFA	CX3CR1	CCR1
TNFA	CX3CR1	EIF2AK4
TNFA	CX3CR1	HLA-DPA1
TNFA	CX3CR1	IL2
TNFA	IFITM1	121601901-HERV 0116
TNFA	IFITM1	CCR1
TNFA	IFITM1	EIF2AK4
TNFA	IFITM1	HLA-DPA1

TNFA	IFITM1	IL2
TNFA	TGFB1	121601901-HERV 0116
TNFA	TGFB1	CCR1
TNFA	TGFB1	EIF2AK4
TNFA	TGFB1	HLA-DPA1
TNFA	TGFB1	IL2
TNFSF13B	ADGRE3	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	ADGRE3	CCR1
TNFSF13B	ADGRE3	EIF2AK4
TNFSF13B	ADGRE3	HLA-DPA1
TNFSF13B	ADGRE3	IL2
TNFSF13B	ARL14EP	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	ARL14EP	CCR1
TNFSF13B	ARL14EP	EIF2AK4
TNFSF13B	ARL14EP	HLA-DPA1
TNFSF13B	ARL14EP	IL2
TNFSF13B	CCL2	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	CCL2	CCR1
TNFSF13B	CCL2	EIF2AK4
TNFSF13B	CCL2	HLA-DPA1
TNFSF13B	CCL2	IL2
TNFSF13B	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	CCNB1IP1	CCR1
TNFSF13B	CCNB1IP1	EIF2AK4
TNFSF13B	CCNB1IP1	HLA-DPA1
TNFSF13B	CCNB1IP1	IL2

TNFSF13B	CDKN1A	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	CDKN1A	CCR1
TNFSF13B	CDKN1A	EIF2AK4
TNFSF13B	CDKN1A	HLA-DPA1
TNFSF13B	CDKN1A	IL2
TNFSF13B	CX3CR1	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	CX3CR1	CCR1
TNFSF13B	CX3CR1	EIF2AK4
TNFSF13B	CX3CR1	HLA-DPA1
TNFSF13B	CX3CR1	IL2
TNFSF13B	IFITM1	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	IFITM1	CCR1
TNFSF13B	IFITM1	EIF2AK4
TNFSF13B	IFITM1	HLA-DPA1
TNFSF13B	IFITM1	IL2
TNFSF13B	TGFB1	121601901-HERV 0116
TNFSF13B	TGFB1	CCR1
TNFSF13B	TGFB1	EIF2AK4
TNFSF13B	TGFB1	HLA-DPA1
TNFSF13B	TGFB1	IL2
ZBP1	ADGRE3	121601901-HERV 0116
ZBP1	ADGRE3	CCR1
ZBP1	ADGRE3	EIF2AK4
ZBP1	ADGRE3	HLA-DPA1
ZBP1	ADGRE3	IL2
ZBP1	ARL14EP	121601901-HERV 0116

ZBP1	ARL14EP	CCR1
ZBP1	ARL14EP	EIF2AK4
ZBP1	ARL14EP	HLA-DPA1
ZBP1	ARL14EP	IL2
ZBP1	CCL2	121601901-HERV 0116
ZBP1	CCL2	CCR1
ZBP1	CCL2	EIF2AK4
ZBP1	CCL2	HLA-DPA1
ZBP1	CCL2	IL2
ZBP1	CCNB1IP1	121601901-HERV 0116
ZBP1	CCNB1IP1	CCR1
ZBP1	CCNB1IP1	EIF2AK4
ZBP1	CCNB1IP1	HLA-DPA1
ZBP1	CCNB1IP1	IL2
ZBP1	CDKN1A	121601901-HERV 0116
ZBP1	CDKN1A	CCR1
ZBP1	CDKN1A	EIF2AK4
ZBP1	CDKN1A	HLA-DPA1
ZBP1	CDKN1A	IL2
ZBP1	CX3CR1	121601901-HERV 0116
ZBP1	CX3CR1	CCR1
ZBP1	CX3CR1	EIF2AK4
ZBP1	CX3CR1	HLA-DPA1
ZBP1	CX3CR1	IL2
ZBP1	IFITM1	121601901-HERV 0116
ZBP1	IFITM1	CCR1

ZBP1	IFITM1	EIF2AK4
ZBP1	IFITM1	HLA-DPA1
ZBP1	IFITM1	IL2
ZBP1	TGFB1	121601901-HERV 0116
ZBP1	TGFB1	CCR1
ZBP1	TGFB1	EIF2AK4
ZBP1	TGFB1	HLA-DPA1
ZBP1	TGFB1	IL2

[0020] **Tableau 2. Combinaisons préférées de deux et trois biomarqueurs**

[0021] De préférence, le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, est appliqué à un échantillon sanguin provenant d'un patient, de préférence un patient à l'hôpital, de préférence encore un patient au sein du service des urgences, d'un service de réanimation, en unité de soins intensifs ou en unité de soins continus, de manière encore plus préférée un patient atteint de traumatismes (de préférence, de traumatismes graves), de brûlures (de préférence, de brûlure graves), ayant reçu une chirurgie (notamment, une chirurgie lourde) ou en état septique, et de manière tout particulièrement préférée un patient en choc septique. Par patient en état septique (ou patient atteint de sepsis), on entend un patient présentant au moins une défaillance d'organe menaçant le pronostic vital et causée par une réponse inappropriée de l'hôte à une infection. Par choc septique, on entend un sous-type de sepsis, dans lequel une hypotension persiste, malgré un remplissage vasculaire adéquat.

[0022] De préférence, le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, est appliqué à un échantillon sanguin contenant des leucocytes. L'échantillon sanguin peut par exemple être un échantillon de cellules mononuclées du sang périphérique (ou PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), qui est constitué des lymphocytes (B, T et cellules NK), des cellules dendritiques et des monocytes, et qui est généralement obtenu par la méthode Ficoll, bien connue de l'homme du métier. Cependant, de manière particulièrement avantageuse, on préférera utiliser directement un échantillon de sang total (c'est-à-dire contenant l'ensemble des leucocytes, érythrocytes, plaquettes et le plasma), tel que collecté par la voie veineuse (par exemple en utilisant des tubes contenant un anticoagulant), afin de minimiser les manipulations de l'échantillon et de préserver les interactions cellulaires physiologiques entre les différentes populations cellulaires impliquées dans la réponse immunitaire, et de mieux refléter la complexité des réponses immunitaires innées et adaptatives chez l'individu.

En particulier, alors que les PBMC ne contiennent que les cellules mononuclées, le sang total contient également des granulocytes (ou polynucléaires). Il est également particulièrement avantageux d'utiliser des systèmes permettant une standardisation des procédures ; en particulier, on pourra utiliser des systèmes de culture semi-fermés (e.g. des tubes) pré-remplis avec le milieu de culture et le stimulus d'intérêt, qui sont standardisés, e.g. qui contiennent un stimulus bien défini (i.e. sans variabilité inter-lots au niveau de la production du stimulus, quant à sa nature/sa composition) et/ou chargé en « batch », de manière à contrôler la quantité de stimulus dans le tube et avoir une reproductibilité de tube à tube. De préférence, ces tubes peuvent également permettre la collecte de l'échantillon de sang (ce qui permet de stimuler les cellules au moment de la collecte), et de préférence encore, ils permettent la collecte d'un volume précis de sang. On peut citer à titre d'exemple de systèmes standardisés les tubes TruCulture®.

- [0023] Le prélèvement de l'échantillon sanguin peut avoir été réalisé à la demande du médecin, par exemple pour savoir si un individu va répondre à une injection vaccinale. Le prélèvement peut également avoir été réalisé à l'admission ou au décours de l'évolution du patient ; notamment, pour des patients atteints de sepsis ou des patients atteints de traumatismes, le prélèvement peut en particulier avoir été réalisé lors de la première semaine (e.g. de J3 à J7, et notamment à J3/4) après l'agression (i.e. le sepsis ou le traumatisme) ou après le choc septique (en particulier, lorsque le patient a besoin de vasopresseurs et que son lactate dépasse les 2 mmol/L).
- [0024] Dans le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, l'étape d'incubation de l'échantillon sanguin de l'individu avec le stimulus peut être réalisée à différentes températures (préférentiellement à 37°C) et à différents temps d'incubation (préférentiellement entre 1h et 48h d'incubation ; par exemple avec une incubation d'1h ou moins, de 2h ou moins, de 4h ou moins, de 12h ou moins, de 24h ou moins, ou de 48h ou moins). Des temps d'incubation courts sont particulièrement avantageux pour la mise en œuvre du test en clinique.
- [0025] Le stimulus utilisé dans le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, peut être de différentes natures.
- [0026] Selon un mode de réalisation, le stimulus peut comprendre une (ou plusieurs) molécule(s) de type immunogène(s). Dans ce mode de réalisation, le procédé est particulièrement utile pour déterminer un diagnostic (en particulier concernant le statut immunitaire de l'individu), un pronostic (en particulier concernant l'évolution du statut immunitaire de l'individu), et/ou adapter la prise en charge thérapeutique dudit individu.
- [0027] Le stimulus de type immunogène peut par exemple comprendre une (des) molécule(s) capable(s) de lier au moins un type de cellule de l'immunité innée (comme une cellule présentatrice d'antigène, e.g. un monocyte, un macrophage, ou une cellule

dendritique), d'une part, et au moins un type de cellule de l'immunité adaptative (comme un lymphocyte T ou un lymphocyte B), d'autre part ; de préférence, ce stimulus comprend une molécule de type superantigène ou une molécule analogue à un superantigène. Les superantigènes sont des toxines de nature protéique, capables de stimuler un grand nombre de lymphocytes T, par l'intermédiaire de leur liaison simultanée à la chaîne  $\beta$  du domaine variable ( $V_\beta$ ) d'un récepteur des cellules T *via* la région hypervariable CDR4, et à une molécule du CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de classe II), présente en surface d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA). L'interaction forcée qui s'établit entre la cellule présentatrice d'antigène portant le CMH et les lymphocytes T dont le récepteur des cellules T porte le segment  $V_\beta$ , provoque une activation polyclonale de ces lymphocytes T, indépendamment de leur spécificité pour l'antigène peptidique présenté. Lorsqu'un stimulus comprenant une molécule de type superantigène est utilisé, l'échantillon sanguin utilisé dans le procédé selon l'invention, contient des lymphocytes T et des cellules présentatrices d'antigène. Parmi les superantigènes plus particulièrement d'intérêt, on peut notamment citer les superantigènes produits par les espèces staphylococciques et les superantigènes produits par les espèces streptococciques. De préférence, le stimulus comprend au moins une molécule choisie parmi SEB (*Staphylococcal Enterotoxin B*) et SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*). Parmi les molécules analogues à un superantigène, on peut par exemple citer des anticorps bispécifiques, capables de se lier d'une part à un lymphocyte T, et d'autre part à une cellule présentatrice d'antigène (comme, par exemple, des anticorps capables de se lier d'une part au  $V_\beta$  sur les lymphocytes T, et, d'autre part à une molécule du CMHII ou à un récepteur de type TLR, sur les cellules présentatrices d'antigène).

[0028] Il peut également s'agir d'un stimulus qui active directement les lymphocytes T, qui est de préférence choisi parmi des anticorps reconnaissant et activant un récepteur à la surface du lymphocyte T de manière à déclencher un signal d'activation au niveau du lymphocyte T, de préférence encore ces anticorps étant associés physiquement et/ou chimiquement entre eux, de préférence encore par couplage sur polymères, par couplage sur billes ou par couplage entre eux. Il peut par exemple s'agir d'anticorps anti-CD3 (tel que le Muromonab-CD3, commercialisé sous le nom Orthoclone OKT3), de préférence associés avec des anticorps anti-CD28, anti-CD2 et/ou anti-CD137/TNFRSF9.

[0029] Il peut encore s'agir d'un stimulus de type imidazoquinolines, analogues structuraux d'un nucléoside, comportant un anneau dans leur structure, de bas poids moléculaire. Ce type de stimulus produit *in vivo* des effets antiviraux et antitumoraux. On peut citer à titre d'exemple de stimulus de type imidazoquinoline, le Resiquimod (R848), qui se lie au TLR7 et au TLR8 humains sur des cellules dendritiques, ou plus généralement



sur des cellules présentatrices d'antigène, ou CPA (réponse NF-KB dépendante). Des effets directs sur les lymphocytes T ont également été décrits (Smits et al (2008), *Oncologist* 13(8) : 859-875).

- [0030] Selon un autre mode de réalisation, le stimulus peut comprendre, de préférence consister essentiellement en, de préférence encore consister en, une molécule à visée thérapeutique (en particulier, un médicament ou un candidat médicament), et plus préférentiellement une molécule ayant un effet immunomodulateur (en particulier, une molécule ayant un effet immunostimulant ou anti-inflammatoire). On peut citer à titre d'exemples l'IL-7 ou l'interféron  $\gamma$ . Dans ce mode de réalisation, le procédé est particulièrement utile pour prédire et/ou suivre l'efficacité de réponse à ladite molécule à visée thérapeutique.
- [0031] La mesure de l'expression (ou du niveau d'expression) d'un biomarqueur consiste à quantifier au moins un produit d'expression de ce biomarqueur. Le produit d'expression d'un biomarqueur au sens de l'invention est toute molécule biologique issue de l'expression de ce biomarqueur. Plus particulièrement, le produit d'expression d'un biomarqueur peut être un transcrite ARN. Par « transcrite », on entend les ARN, et en particulier les ARN messagers (ARNm), issus de la transcription du biomarqueur. Plus précisément, les transcrits sont les ARN produits par la transcription d'un gène suivi des modifications post-transcriptionnelles des formes pré-ARN.
- [0032] Ainsi, de préférence, dans le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, l'expression des biomarqueurs est mesurée au niveau transcrite ARN ou ARNm. Dans le cadre de la présente invention, la mesure du niveau d'expression d'un ou plusieurs transcrits ARN du même biomarqueur peut être effectuée. La détermination de la quantité de plusieurs transcrits peut être mise en œuvre séquentiellement ou simultanément, selon des procédés bien connus de l'homme du métier. La détection d'un transcrite ARNm peut être réalisée par une méthode directe, par tout procédé connu de l'homme du métier permettant de déterminer la présence dudit transcrite dans l'échantillon, ou par détection indirecte du transcrite après transformation de ce dernier en ADN, ou après amplification dudit transcrite ou après amplification de l'ADN obtenu après transformation dudit transcrite en ADN. De nombreuses méthodes existent pour la détection des acides nucléiques (voir par exemple Kricka et al., *Clinical Chemistry*, 1999, n° 45(4), p.453-458 ; Relier G. H. et al., *DNA Probes*, 2nd Ed., Stockton Press, 1993, sections 5 et 6, p.173-249). L'expression des biomarqueurs peut notamment être mesurée par *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* ou RT-PCR, de préférence par RT-PCR quantitative ou RT-qPCR (par exemple en utilisant la technologie FilmArray®), par séquençage (de préférence par séquençage haut débit) ou par des techniques d'hybridation (par exemple avec des micropuces d'hybridation ou par des techniques

du type NanoString® nCounter®). Les techniques permettant le multiplexage (comme le FilmArray® ou le NanoString® nCounter®) sont préférées.

- [0033] Dans le cadre de la présente invention, la mesure du niveau d'expression permet de déterminer la quantité d'un ou plusieurs transcrits présents dans l'échantillon testé ou d'en donner une valeur dérivée. Une valeur dérivée de la quantité peut par exemple être la concentration absolue, calculée grâce à une courbe de calibration obtenue à partir de dilutions successives d'une solution d'amplicons de concentration connue. Elle peut également correspondre à la valeur de la quantité normalisée et calibrée, comme le CNRQ (*Calibrated Normalized Relative Quantity*, (Hellemans et al (2007), *Genome biology* 8(2):R19)), qui intègre les valeurs d'un échantillon de référence, d'un calibrateur et d'un ou plusieurs gènes de ménage (appelés également gènes de référence). A titre d'exemples de gène de référence, on peut citer les gènes PPIB, PPIA, GLYR1, RANBP3, HPRT1, 18S, GAPDH, RPLP0 et ACTB.
- [0034] De préférence, dans le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, l'expression des biomarqueurs est normalisée par rapport à l'expression d'un ou plusieurs des gènes de référence suivants : HPRT1, DECR1 et TBP ; en particulier, on peut utiliser pour la normalisation la moyenne géométrique des 3 gènes HPRT1, DECR1 et TBP.
- [0035] De préférence, le procédé tel que décrit précédemment, dans tous ses modes de réalisation, peut comprendre également une étape de mesure de l'expression, à partir d'un échantillon sanguin contrôle sans stimulation (c'est-à-dire l'échantillon sanguin incubé dans les mêmes conditions que l'échantillon sanguin stimulé, mais en l'absence de stimulus), des mêmes biomarqueurs que ceux mesurés à partir de l'échantillon sanguin stimulé. De préférence encore, le procédé comprend une étape de calcul des ratios de l'expression (préférentiellement, l'expression normalisée) de chaque biomarqueur dans l'échantillon sanguin stimulé, par rapport à l'expression (préférentiellement, l'expression normalisée), du même biomarqueur dans l'échantillon sanguin contrôle. De manière encore plus préférée, le procédé comprend une étape de transformation des ratios obtenus par une transformation logarithmique de base 10, et éventuellement des étapes de transformation en variables centrées réduites.
- [0036] L'invention a également pour objet un kit comprenant des moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes parmi :
- les Listes S1, S2 et S3 ;
  - les Listes S1-1, S2-1 et S3-1 ;
  - les Listes S1-2, S2-2 et S3-2 ; ou
  - les Listes S1-3, S2-3 et S3-3 ;

de préférence comprenant des moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans chacune des trois listes :

- Listes S1, S2 et S3 ;
- Listes S1-1, S2-1 et S3-1 ;
- Listes S1-2, S2-2 et S3-2 ; ou
- Listes S1-3, S2-3 et S3-3 ;

de préférence encore comprenant des moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) :

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38, au moins 39, au moins 40, au moins 41, au moins 42, au moins 43, au moins 44, au moins 45, au moins 46 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1, S2 et S3 ;

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38, au moins 39, au moins 40, au moins 41, au moins 42, au moins 43, au moins 44, au moins 45 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-1, S2-1 et S3-1 ;

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21, au moins 22, au moins 23, au moins 24, au moins 25, au moins 26, au moins 27, au moins 28, au moins 29, au moins 30, au moins 31, au moins 32, au moins 33, au moins 34, au moins 35, au moins 36, au moins 37, au moins 38 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-2, S2-2 et S3-2 ; ou

- d'au moins 4, au moins 5, au moins 6, au moins 7, au moins 8, au moins 9, au moins 10, au moins 11, au moins 12, au moins 13, au moins 14, au moins 15, au moins 16, au moins 17, au moins 18, au moins 19, au moins 20, au moins 21 biomarqueurs différents choisis dans chacune des Listes S1-3, S2-3 et S3-3 ;

- ledit kit étant caractérisé en ce que l'ensemble des moyens d'amplification et/ou de détection dudit kit permettent la détection et/ou l'amplification d'au plus 100 (de

préférence au plus 90, de préférence au plus 80, de préférence au plus 70, de préférence au plus 60, de préférence au plus 50, de préférence au plus 40, de préférence au plus 30, de préférence au plus 20, de préférence au plus 10, de préférence, au plus 5) biomarqueurs, au total.

[0037] Ainsi, ledit kit peut par exemple comprendre également des moyens d'amplification et/ou de détection d'un ou plusieurs gènes de ménage. Le kit peut également comprendre des moyens de contrôle positif permettant de qualifier la qualité de l'extraction de l'ARN, la qualité de tout procédé d'amplification et /ou d'hybridation.

[0038] On entend par « amorce » ou « amorce d'amplification », un fragment nucléotidique pouvant être constitué de 5 à 100 nucléotides, de préférence de 15 à 30 nucléotides, et possédant une spécificité d'hybridation avec une séquence nucléotidique cible, dans des conditions déterminées pour l'initiation d'une polymérisation enzymatique, par exemple dans une réaction d'amplification enzymatique de la séquence nucléotidique cible. Généralement, on utilise des « couples d'amorces », constitués de deux amorces. Lorsque l'on souhaite réaliser l'amplification de plusieurs biomarqueurs (e.g des gènes) différents, plusieurs couples d'amorces différents sont de préférence utilisés, ayant préférentiellement chacun une capacité à s'hybrider spécifiquement avec un biomarqueur différent.

[0039] On entend par « sonde » ou « sonde d'hybridation », un fragment nucléotidique constitué typiquement de 5 à 100 nucléotides, de préférence de 15 à 90 nucléotides, de manière encore plus préférée de 15 à 35 nucléotides, possédant une spécificité d'hybridation dans des conditions déterminées pour former un complexe d'hybridation avec une séquence nucléotidique cible. La sonde comporte également un rapporteur (tel qu'un fluorophore, une enzyme ou tout autre système de détection), qui va permettre la détection de la séquence nucléotidique cible. Dans la présente invention, la séquence nucléotidique cible peut être une séquence nucléotidique comprise dans un ARN messager (ARNm) ou une séquence nucléotidique comprise dans un ADN complémentaire (ADNc) obtenu par transcription inverse dudit ARNm. Lorsque l'on souhaite cibler plusieurs biomarqueurs (e.g. des gènes) différents, plusieurs sondes différentes sont de préférence utilisées, ayant préférentiellement chacune une capacité à s'hybrider spécifiquement avec un biomarqueur différent.

[0040] Par « hybridation », on entend le processus au cours duquel, dans des conditions appropriées, deux fragments nucléotidiques, tels que par exemple une sonde d'hybridation et un fragment nucléotidique cible, ayant des séquences suffisamment complémentaires, sont susceptibles de former un double brin avec des liaisons hydrogènes stables et spécifiques. Un fragment nucléotidique "capable de s'hybrider" avec un polynucléotide est un fragment pouvant s'hybrider avec ledit polynucléotide dans des conditions d'hybridation, qui peuvent être déterminées dans chaque cas de

façon connue. Les conditions d'hybridation sont déterminées par la stringence, c'est-à-dire la rigueur des conditions opératoires. L'hybridation est d'autant plus spécifique qu'elle est effectuée à plus forte stringence. La stringence est définie notamment en fonction de la composition en bases d'un duplex sonde/cible, ainsi que par le degré de mésappariement entre deux acides nucléiques. La stringence peut également être fonction des paramètres de la réaction, tels que la concentration et le type d'espèces ioniques présentes dans la solution d'hybridation, la nature et la concentration d'agents dénaturants et/ou la température d'hybridation. La stringence des conditions dans lesquelles une réaction d'hybridation doit être réalisée dépendra principalement des sondes d'hybridation utilisées. Toutes ces données sont bien connues et les conditions appropriées peuvent être déterminées par l'homme du métier. En général, selon la longueur des sondes d'hybridation utilisées, la température pour la réaction d'hybridation est comprise entre environ 20 et 70°C, en particulier entre 35 et 65°C dans une solution saline à une concentration d'environ 0,5 à 1 M. On réalise ensuite une étape de détection de la réaction d'hybridation.

[0041] Par « réaction d'amplification enzymatique », on entend un processus générant de multiples copies d'un fragment nucléotidique cible, par l'action d'au moins une enzyme. De telles réactions d'amplification sont bien connues de l'homme du métier et on peut citer notamment les techniques suivantes : PCR (*Polymerase Chain Reaction*), LCR (*Ligase Chain Reaction*), RCR (*Repair Chain Reaction*), 3SR (*Self Sustained Séquence Replication*) avec la demande de brevet WO-A-90/06995, NASBA (*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*), TMA (*Transcription Mediated Amplification*) avec le brevet US-A-5,399,491, et LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) avec le brevet US6410278. Lorsque la réaction d'amplification enzymatique est une PCR, on parlera plus particulièrement de RT-PCR (RT pour « *reverse transcription* »), lorsque l'étape d'amplification est précédée d'une étape de réverse-transcription d'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), et de qPCR ou RT-qPCR lorsque la PCR est quantitative.

[0042] L'invention a également pour objet l'utilisation :

- de moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) tels que décrits précédemment dans le kit selon l'invention, dans tous ses modes de réalisation ; de préférence, de moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes parmi les listes S1 à S3 (ou S1-1 à S3-1, ou S1-2 à S3-2, ou S1-3 à S3-3), de préférence encore des moyens d'amplification et/ou de détection d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans chacune des trois listes S1 à S3 (ou S1-1 à S3-1, ou S1-2 à S3-2, ou S1-3 à S3-3)), ou

- d'un kit comprenant de tels moyens d'amplification et/ou de détection, de préférence l'ensemble des moyens d'amplification et/ou de détection dudit kit permettent la détection et/ou l'amplification d'au plus 100 (de préférence au plus 90, de préférence au plus 80, de préférence au plus 70, de préférence au plus 60, de préférence au plus 50, de préférence au plus 40, de préférence au plus 30, de préférence au plus 20, de préférence au plus 10, de préférence au plus 5) biomarqueurs, au total, et optionnellement ledit kit comprend des moyens d'amplification et/ou de détection d'un ou plusieurs gènes de ménage et/ou des moyens de contrôle positif permettant de qualifier la qualité de l'extraction de l'ARN, la qualité de tout procédé d'amplification et /ou d'hybridation, pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, de préférence la capacité du système immunitaire d'un individu à répondre à un stimulus.

### Figures

- [0043] [fig.1] : Les biomarqueurs contribuant le plus à la variance pour la réponse des individus sains et des patients en choc septique, suite à une stimulation avec du SEB. (A) Analyse en Composantes Principales (PCA) de la réponse (échantillon stimulé/échantillon contrôle) de 10 individus sains (cercles) et 30 patients en choc septique (triangles), suite à une stimulation avec du SEB. Chaque individu (« donateur », D) est étiqueté par son numéro. Le pourcentage de variance expliqué par chaque axe de Composante Principale (PC) est indiqué, ainsi que la variance totale. La position du vecteur pour chaque individu a été tracée. Les variables les plus importantes sont représentées graphiquement en (B) (représentant 20% du poids total des variables pour PC1 et PC2).
- [0044] [fig.2] : Analyse de clustering multivariée, suite à une stimulation avec du SEB. 10 individus sains et 30 patients en choc septique ont été traités comme un tout, afin de discriminer les profils d'expression géniques. La réponse à une stimulation avec du SEB a révélé 3 groupements ou clusters (S1; n=16, S2; n=11 and S3; n=12), en utilisant la méthode PAM avec distance de corrélation (indice de score = 31). Le dendrogramme est basé sur la distance entre les individus du médonoïde de chaque cluster trouvé par la méthode PAM. Une plus forte intensité du niveau de gris (se rapprochant du noir) sur la carte thermique (ou heatmap) indique une valeur plus élevée du ratio d'expression ou fold change (échantillon stimulé/échantillon contrôle) des biomarqueurs et une plus faible intensité du niveau de gris (se rapprochant du blanc) indique une plus faible valeur du ratio d'expression ou fold change (échantillon stimulé/échantillon contrôle) des biomarqueurs. La valeur 10 000 Ab/c a été utilisée comme seuil pour les taux de mHLA-DR élevé et faible. HLA-DR: antigène leucocytaire humain (human leukocyte antigen) DR.

[0045] [fig.3] : Distribution de la sécrétion de TNF $\alpha$  protéique post-stimulation avec du LPS et du mHLA-DR par clusters définis suite à stimulation avec du SEB. Au jour 3-4 après le début du choc septique, (A) la sécrétion de TNF $\alpha$  protéique a été mesurée ex vivo 24 heures post-stimulation avec du LPS chez des individus sains (cercles) et des patients en choc septique (carrés), et (B) le mHLA-DR a été mesuré par cytométrie en flux, uniquement chez les patients en choc septique (carrés). La mortalité (individus non survivants) est représentée par des triangles et les infections nosocomiales par des carrés vides. Les clusters définis post-stimulation avec du SEB ont été obtenus en utilisant la méthode PAM avec distance de corrélation . \*\*p < 0.001; \*\*\*p < 0.0001. SEB: staphylococcal enterotoxin B, LPS: lipopolysaccharide, mHLA-DR: monocyte human leukocyte antigen DR.

[0046] La présente invention est illustrée de manière non limitative par les exemples suivants.

### **Exemples**

[0047] *Matériels et Méthodes*

#### **Population d'individus testés**

[0048] L'étude clinique a été approuvée par le comité régional d'éthique (Comité de Protection des Personnes Sud-Est II, numéro 11236), et enregistrée auprès du ministère Français de la Recherche (Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation ; DC-2008-509) et de la Commission nationale de la protection des données (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés). Cette étude a été menée sur des patients en choc septique admis à l'unité de soins intensifs de l'hôpital Edouard Herriot (Hospices Civils de Lyon, Lyon, France) et fait partie d'une étude plus vaste portant sur les dysfonctionnements immunitaires liés à l'unité de soins intensifs (NCT02803346).

[0049] Les patients en choc septique ont été inclus de manière prospective. Le choc septique a été défini selon le consensus Sepsis-3 de la Société de Médecine de Soins Critiques et de la Société Européenne de Médecine de Soins intensifs (Singer et al (2016), JAMA 315:801-10) : patients nécessitant l'administration de vasopresseur et ayant une mesure de la concentration en lactate sérique supérieure à 2 mmol/L en l'absence d'hypovolémie chez un patient ayant une infection, ou suspecté d'avoir une infection (i.e. critères qui définissent l'entrée en choc septique chez un patient ayant un sepsis). Les critères d'exclusion étaient un âge inférieur à 18 ans et la présence d'une aplasie ou d'une maladie immunosuppressive connue. Au moment de l'admission, les données recueillies incluaient les caractéristiques démographiques (âge, sexe) et le site d'infection primaire ; la sévérité initiale a été évaluée par l'indice de gravité simplifié (IGS II ; gamme de valeurs : 0-163) à l'admission. Les informations concernant le

décès au cours du séjour en unité de soins intensifs ont été recueillies, et la sévérité 24 heures après l'admission a été évaluée par le score d'évaluation séquentielle des défaillances d'organes (SOFA) (gamme de valeurs: 0-24). Des données de laboratoire au cours du suivi ont également été recueillies, y compris les valeurs de HLA-DR des monocytes (mHLA-DR), ainsi que la mesure de la sécrétion de protéine TNF $\alpha$  après stimulation par le LPS.

[0050] Parallèlement, des échantillons de sang provenant d'individus sains (ou volontaires sains) ont été obtenus auprès du service national du sang (Établissement Français du Sang) et utilisés immédiatement.

### **Tests fonctionnels immunitaires**

[0051] – Incubation en tubes TruCulture

[0052] Du sang total hépariné (1 mL) provenant de patients en choc septique, prélevé aux jours 3-4 après le début du choc septique, ou provenant d'individus sains, a été distribué dans des tubes TruCulture (Myriad Rbm, Austin, Texas, États-Unis) pré-chauffés, contenant le milieu seul (« échantillon contrôle ») ou le milieu avec SEB (400 ng/mL). Ces tubes ont ensuite été insérés dans un incubateur à bloc sec et maintenus à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, le culot cellulaire a été remis en suspension dans 2 ml de TRI Reagent® LS (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Allemagne), agité au vortex pendant 2 minutes et laissé à reposer pendant 10 minutes à température ambiante, avant un stockage à -80°C.

[0053] – Mesure de l'expression de biomarqueurs

[0054] Pour la manipulation de culot cellulaire de TruCulture et le traitement et la détection de l'ARN, le protocole a été suivi conformément à l'étude d'Urrutia et al (2016), Cell Reports 16, 2777-2791. Les culots cellulaires provenant des stimulations par TruCulture et conservés dans le TRI Reagent® LS (Sigma-Aldrich) ont été décongelés sous agitation. Avant le traitement, les échantillons décongelés ont été centrifugés (à 3000 g pendant 5 minutes à 4°C) pour faire sédimenter les débris cellulaires générés au cours de la lyse au Trizol. Pour l'extraction, un protocole modifié du kit NucleoSpin 96 RNA tissue (Macherey-Nagel GmbH&Co. KG, Düren, Allemagne) a été suivi en utilisant un système à vide. En bref, 600  $\mu$ l de lysat clair obtenu par lyse au Trizol ont été transférés dans un tube préchargé de 900  $\mu$ l d'éthanol à 100%.

[0055] Le mélange a été transféré dans une colonne de silice, puis lavé avec les tampons MW1 et MW2, et l'ARN a été élué en utilisant 30  $\mu$ L d'eau exempte d'ARNase. La technologie Nanostring a été utilisée pour la détection de l'ARNm d'un panel de 46 biomarqueurs (Tableau 3) – il s'agit d'un essai multiplex basé sur l'hybridation et caractérisé par l'absence d'étape d'amplification ; 300 ng d'ARN ont été hybridés aux sondes à 67°C pendant 18 heures en utilisant un thermocycleur (Biometra, Tprofessional TRIO, Analytik Jena AG, Jena, Allemagne).



[0056] Après élimination des sondes en excès, les échantillons ont été chargés dans nCounter Prep Station (NanoString Technologies, Seattle, WA, États-Unis) pour la purification et l'immobilisation sur la surface interne d'une cartouche d'échantillon pendant 2-3 heures. La cartouche d'échantillon a ensuite été transférée et imagée sur l'analyseur numérique nCounter Digital Analyzer (NanoString Technologies) où les codes de couleur ont été comptés et mis en tableau pour les 46 biomarqueurs.

[0057]

[Tableaux3]

<b>Biomarqueurs cibles</b>	<b>Numéro d'accèsion ou localisation chromosomique</b>
ADGRE3	NM_032571.2
ARL14EP	NM_152316.1
BST2	NM_004335.2
C3	NM_000064.2
CCL2	NM_002982.3
CCL20	NM_004591.1
CCL4	NM_002984.2
CCL8	NM_005623.2
CCNB1IP1	NM_182849.2
CCR1	NM_001295.2
CD209	NM_021155.2
CD3D	NM_000732.4
CD44	NM_001001392.1
CD74	NM_001025159.1
CD83	NM_004233.3
CDKN1A	NM_000389.2
CLEC7A	NM_197954.2
CX3CR1	NM_001337.3
CXCL10	NM_001565.1
CXCL2	NM_002089.3
CXCL9	NM_002416.1
DDX58	NM_014314.3
DYRK2	NM_003583.3
EIF2AK4	NM_001013703.2
FAM89A	NM_198552.2
HLA-DMB	NM_002118.3
HLA-DPA1	NM_033554.2
HLA-DPB1	NM_002121.4

HLA-DRA	NM_019111.3
IFITM1	NM_003641.3
IFNG	NM_000619.2
IL1A	NM_000575.3
IL2	NM_000586.2
IL7R	NM_002185.2
IRAK2	NM_001570.3
PTGS2	NM_000963.1
RARRES3	NM_004585.3
SLAMF7	NM_021181.3
SRC	NM_005417.3
STAT2	NM_005419.2
STING	NM_198282.1
TGFB1	NM_000660.3
TNFA	NM_000594.2
TNFSF13B	NM_006573.4
ZBP1	NM_001160419.2
121601901-HERV0116	chr12:112972627-112975754

[0058] **Tableau 3. Biomarqueurs cibles utilisés pour le Nanostring® nCounter®, et leur numéro d'accèsion (ou localisation chromosomique)**

[0059] – Génération de données normalisées

[0060] Chaque échantillon a été analysé dans une réaction multiplexée distincte comportant chacune, 8 sondes négatives et 6 concentrations en série de sondes témoins positives. Une analyse de témoins négatifs a été réalisée pour déterminer le bruit de fond pour chaque échantillon. Les données ont été importées dans le logiciel d'analyse nSolver (version 4.0, NanoString technologies) pour le contrôle de qualité et la normalisation des données.

[0061] Une première étape de normalisation utilisant des témoins positifs internes a permis de corriger la source de variation potentielle associée à la plate-forme technique. Pour ce faire, nous avons calculé pour tous les échantillons le niveau du bruit de fond moyen comme étant la médiane +3 écarts-types de l'ensemble des six sondes négatives. Chaque échantillon sous le niveau de bruit de fond a été fixé à cette valeur.

[0062] Ensuite, nous avons calculé pour chaque échantillon la moyenne géométrique des

sondes positives. Un facteur d'échelle pour un échantillon était un ratio de la moyenne géométrique de l'échantillon et de la moyenne de toutes les moyennes géométriques. Pour chaque échantillon, nous avons divisé toutes les valeurs des gènes par le facteur d'échelle correspondant.

- [0063] Enfin, pour normaliser les différences de quantité d'ARN introduit, nous avons utilisé le même procédé que celui dans la normalisation par des témoins positifs, sauf que les moyennes géométriques ont été calculées pour trois gènes de ménage (HPRT1 (NM\_000194.1), DECR1 (NM\_001359.1) et TBP (NM\_001172085.1)).
- [0064] Ces gènes ont été sélectionnés en utilisant la méthode NormFinder, une approche établie pour l'identification de gènes de ménage stables intra- et inter- groupes, à partir des 6 gènes candidats inclus dans le panel de gènes personnalisé. Les résultats sont exprimés en ratio d'expression (ou « fold change »). Un tube TruCulture contenant du SEB n'a pas passé le contrôle de qualité et n'a pas été inclus dans l'analyse.
- [0065] – Mesure de l'expression de mHLA-DR par cytométrie en flux
- [0066] L'expression de HLA-DR à la surface des monocytes circulants (mHLA-DR) des patients a été évaluée aux jours 3-4 après le début du choc septique, sur du sang total périphérique prélevé dans des tubes EDTA, par cytométrie en flux (NAVIOS ; Beckman-Coulter, Brea, CA, États-Unis). Les résultats sont exprimés en nombre d'anticorps liés par cellule (Ab/C).
- [0067] – Détection de protéines
- [0068] La protéine TNF $\alpha$  dans le surnageant des tubes TruCulture a été quantifiée, pour les patients en choc septique et les individus sains, en utilisant le système nanofluidique ELLA (Biotechne, Minneapolis, MI, États-Unis), conformément aux instructions du fabricant. Les résultats sont exprimés en pg/ml.
- [0069] – Analyse statistique
- [0070] Les résultats sont exprimés en médiane et écarts interquartiles [IQR] pour les variables continues. Les données paramétriques ont été analysées par ANOVA et les données non paramétriques ont été analysées par le test de Kruskal-Wallis. Les analyses statistiques ont été menées en utilisant le logiciel GraphPad Prism® (version 5 ; logiciel GraphPad, La Jolla, CA, États-Unis) et R (version 3.5.1). Une valeur p ajustée < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. L'analyse en composantes principales (PCA) a été réalisée en utilisant Genomics Suite 7 (Partek, St. Louis, MO, États-Unis).
- [0071] – Création de clusters
- [0072] Les données ont été transformées par transformation logarithmique de base 10, centrées et réduites. Deux matrices de distances et une matrice de corrélation ont été construites sur les données et 10 méthodes de clustering ont été lancées (« hierarchical », « kmeans », « diana », « fanny », « som », « model », « sota », «

pam », « clara » et « agnes »). Pour chaque méthode,  $k = 3$  à  $k = 18$  clusters ont été testés. Les meilleures méthodes de clustering ont été sélectionnées en utilisant 7 indices combinant des mesures internes (connectivité, largeur de la silhouette et indice de Dunn) et de stabilité (la proportion moyenne de non chevauchement (APN), la distance moyenne (AD), la distance moyenne entre les moyennes (ADM) et le facteur de mérite (FOM)). La méthode la plus stable pour SEB a été sélectionnée : il s'agit de la méthode PAM utilisant la matrice de corrélation (indice de score = 31).

[0073] *Résultats*

[0074] – Diversité de la réponse à une stimulation avec du SEB

[0075] Afin d'identifier les biomarqueurs contribuant principalement à la variation quantitative de la réponse à la stimulation par SEB (Figure 1A) pour les individus sains et pour les patients en choc septique, ceux-ci ont été représentés graphiquement et le poids des biomarqueurs expliquant la variance a été obtenu (Tableau 4). Parmi les plus importants contributeurs à la variance de la réponse au SEB (Figure 1B) pour la première composante PC1 (39%), il a été constaté que *RARRES3* et *STAT2* étaient les plus fortement exprimés par les individus du côté droit de la composante, tandis que *IL1A*, *CXCL2* et *IFNG* étaient plus fortement exprimés par les individus du côté opposé. En ce qui concerne la deuxième composante PC2 (19%), la variance était induite « en tête » par un élément de rétrovirus endogène humain ou HERV (121601901-HERV0116), mais aussi par *SLAMF7*, *CCL4*, *C3* et *CXCL10*.

[0076]

[Tableaux4]

<b>PC1</b>	<b>Poids</b>	<b>PC2</b>	<b>Poids</b>
IL1A	-0.2167	121601901-HERV0116	0.2687
RARRES3	0.2137	SLAMF7	0.2608
IFNG	-0.2097	CCL4	0.2454
STAT2	0.2065	CXCL10	0.2445
CXCL2	-0.2039	C3	0.2345
CCL20	-0.2006	CD74	0.2344
CD209	-0.1965	HLA-DRA	0.2285
PTGS2	-0.1964	CXCL9	0.2239
ZBP1	0.1940	HLA-DPA1	0.2208
CD83	-0.1866	ADGRE3	-0.2049
CDKN1A	-0.1833	CD44	0.1968
DDX58	0.1811	HLA-DPB1	0.1942
HLA-DMB	0.1798	HLA-DMB	0.1858
CX3CR1	0.1782	TNFSF13B	0.1805
BST2	0.1774	IRAK2	0.1726
IL2	-0.1721	SRC	0.1637
TNFA	-0.1717	TNFA	0.1574
IRAK2	-0.1706	BST2	0.1489
HLA-DPB1	0.1654	STING	0.1447
CCL2	-0.1623	FAM89A	0.1350
HLA-DRA	0.1513	RARRES3	0.1221
HLA-DPA1	0.1491	CD83	0.1181
CD74	0.1462	DDX58	0.1069
IFITM1	0.1449	CCL8	0.1066
DYRK2	0.1415	ZBP1	0.1058
TNFSF13B	0.1365	CCR1	0.1048
IL7R	0.1332	CDKN1A	0.0962
CCL8	-0.1327	DYRK2	-0.0959
SRC	-0.1300	IL2	0.0903

CD44	-0.1234	CLEC7A	-0.0890
ARL14EP	0.1176	CX3CR1	0.0823
STING	-0.1162	ARL14EP	0.0783
CCL4	-0.1116	IL7R	-0.0770
CCNB1IP1	0.1049	STAT2	0.0715
CLEC7A	0.1015	IL1A	0.0574
EIF2AK4	0.0968	IFITM1	0.0561
CXCL9	-0.0958	CCL2	0.0463
C3	-0.0589	CCL20	0.0461
CD3D	0.0583	CD3D	0.0453
SLAMF7	-0.0505	PTGS2	-0.0444
CCR1	-0.0371	EIF2AK4	0.0353
TGFB1	-0.0277	IFNG	0.0338
CXCL10	-0.0211	TGFB1	0.0228
121601901-HERV0116	-0.0125	CD209	0.0188
FAM89A	0.0090	CCNB1IP1	0.0119
ADGRE3	0.0008	CXCL2	-0.0084

[0077] **Tableau 4. Poids des biomarqueurs responsables de la plus grande variance de la première composante (PC1) et de la deuxième composante (PC2) pour la stimulation par SEB dans les deux populations. Pour chaque composante, les biomarqueurs ont été classés, du poids le plus élevé (en valeur absolue) au poids le moins élevé (en valeur absolue).**

[0078] – Test fonctionnel immunitaire comme outil de stratification des patients en état septique

[0079] En tenant compte des deux populations (individus sains et patients), nous avons réalisé une classification (clustering) non supervisée avec l'ensemble du panel moléculaire afin d'identifier les motifs géniques. Les individus sains étaient groupés ensemble après la stimulation par SEB, montrant une grande homogénéité dans leur réponse immunitaire. Lors de la stimulation par SEB, 6 patients ont été groupés avec des individus sains (n = 16, cluster S1) et les autres ont été séparés en 2 groupes de nombre presque égal (n = 11 pour le cluster S2 et n = 12 pour le cluster S3 ; Figure 2). La composition de donneurs de chaque cluster est présentée dans le Tableau 5.

[0080]

[Tableaux5]

Cluster S1	Cluster S2	Cluster S3
D4; D5; D8; D9; D10; D13; <i>D15; D16; D17; D18;</i> <i>D19; D20; D21; D22;</i> <i>D23; D24</i>	D1; <b>D11</b> ; D14; <u>D26</u> ; <b>D29</b> ; D31; D32; D37; D38 ; <b>D40</b> ; <b>D41</b>	D2; D3; <b>D6</b> ; D12; D25; D27; D28; D30; D33; D34; D35; D39

- [0081] **Tableau 5. Composition individuelle (par donneur) des clusters obtenus après stimulation avec du SEB. Les individus sains apparaissent en italique, les non-survivants en gras, et ceux ayant développé une infection nosocomiale sont soulignés. D : Donneur**
- [0082] Une analyse bivariée a ensuite été réalisée entre les clusters et les paramètres biologiques ou cliniques.
- [0083] Pour la stimulation par SEB, un résultat statistiquement significatif a été trouvé pour mHLA-DR (p ajustée = 0,0131) ainsi que pour la sécrétion de protéine TNF $\alpha$  après stimulation par LPS (p ajustée  $\leq$  0,0001 ; Tableau 6).
- [0084] Comme attendu du fait de la classification avec les individus sains, les 6 patients se trouvant dans le cluster S1 présentent la médiane la plus élevée pour mHLA-DR (10938 Ab/C, IQR : [9456-14642]) et présentent une concentration en protéine TNF $\alpha$  après stimulation par LPS la plus élevée (3799 pg/mL, IQR : [2067,2-5401,2]).
- [0085] En comparant les résultats des clusters S1 et S2, la seule différence significative est la concentration médiane en protéine TNF $\alpha$  après stimulation par LPS (p < 0,0001). Le cluster S2 présente le niveau médian en protéine TNF $\alpha$  le plus bas parmi les 3 clusters.
- [0086] En comparant le cluster S1 à S3, il y a une différence significative pour les deux paramètres (p < 0,001), le cluster S3 présente un niveau médian intermédiaire de concentration en protéine TNF $\alpha$  après stimulation par LPS entre les 3 clusters, tandis que les niveaux médians de mHLA-DR sont le plus bas (Figure 3).
- [0087] De plus, nous pouvons observer que parmi les 20 (sur 30) patients qui souffraient d'au moins une comorbidité, 10 (50%) appartenaient à S3, représentant 83,3% du cluster.
- [0088] De même, parmi les 5 patients non survivants, les quatre qui sont décédés avant le jour 28 (80%) appartiennent au cluster S2, représentant 36% de ce cluster, tandis que le cinquième, décédé tardivement à l'hôpital, appartient au cluster S3 (Tableau 6). Il convient de noter que le seul patient qui a développé une infection nosocomiale se trouve dans le cluster S2.
- [0089]



[Tableaux6]

	<b>Cluster S1 (n=16)</b>	<b>Cluster S2 (n=11)</b>	<b>Cluster S3 (n=12)</b>	<b>Valeur p ajustée</b>
Statut				0.0002
Individu sain, n(%)	10 (62.5)	0 (0)	0 (0)	
Patients, n(%)	6 (37.5)	11 (100)	12 (100)	
Comorbidités*				0.2348
non, n(%)	1 (16.7)	6 (54.5)	2 (16.7)	
oui, n(%)	5 (83.3)	5 (45.5)	10 (83.3)	
CCI* médian, [IQR]	2 [1.2-4.2]	1 [0-1.5]	2 [1-5]	0.1593
SOFA* median (jour 1), [IQR]	7.5 [6.2-8]	8 [6.5-10.5]	8.5 [8-10]	0.6383
Mortalité*				0.2416
non, n(%)	6 (100)	7 (63.6)	11 (91.7)	
oui, n(%)	0 (0)	4 (36.4)	1 (8.3)	
mHLA-DR* médian (jour 3-4) (Ab/C), [IQR]	10938 [9456-14642]	7301 [4653-11673]	3839.5 [3444-6250]	0.0131
Sécrétion de TNF $\alpha$ médiane, post-stimulation avec du LPS (pg/mL), [IQR]	3799 [2067.2-5401.2]	282.7 [122.2-861.8]	700.8 [457.8-913.3]	0.0001

[0090] SOFA: *sequential organ failure assessment*

[0091] CCI: *Charlson Comorbidity Index*

[0092] HLA-DR: *human leukocyte antigen DR*

[0093] Ab/C: *antibodies bound per cell*

[0094] TNF $\alpha$ : *tumor necrosis factor alpha*

[0095] LPS: *lipopolysaccharide*

[0096] IQR : *écart interquartile*

[0097] \*: *paramètres mesurés exclusivement pour les patients en choc septique*

[0098] **Tableau 6. Analyses bivariées entre les clusters S1, S2 et S3 lors d'une sti-**

**mulation par SEB pour les paramètres cliniques et biologiques.** 6 paramètres sont représentés lorsque des analyses statistiques ont été réalisées entre les clusters S1 (n = 16 ou n = 6 lorsqu'il n'y avait pas d'informations disponibles pour les individus sains),

S2 (n = 11) et S3 (n = 12) définis en utilisant la méthode PAM avec distance de corrélation. La valeur p ajustée pour des tests multiples a été donnée en sortie. La présence de comorbidités était affirmative lorsqu'au moins une comorbidité était présente chez le patient : une maladie pulmonaire chronique, une insuffisance cardiaque, un infarctus du myocarde, un ulcère, le diabète, une insuffisance rénale ou une tumeur solide maligne.

[0099] Le test fonctionnel immunitaire développé a donc permis de mettre en évidence que, si la réponse immunitaire des individus sains est homogène, la réponse immunitaire des patients en choc septique est quant à elle hétérogène, et l'hétérogénéité de la réponse réside dans le bras adaptatif de l'immunité. Les patients regroupés dans le cluster S1, avec les individus sains, ont un profil immunitaire plus "normal"/"sain", contrairement aux autres patients. A priori ces patients ne nécessiteraient de pas de surveillance particulière et un *standard of care* serait suffisant. Les patients du cluster S2 correspondent quant à eux à des patients "sévéres", caractérisés par un taux de mortalité élevé. Ces patients dont l'immunité apparaît fortement altérée et présentant une plus grande probabilité de mortalité, pourraient avantageusement bénéficier d'interventions thérapeutiques plus « agressives » et/ou plus précoces. Enfin, le troisième groupe (patients du cluster S3) correspond à des patients de phénotype intermédiaire à sévère, pouvant présenter un degré de récupération immunitaire. Ainsi, ces patients dont l'immunité semble restaurable pourraient faire l'objet de traitements personnalisés (e.g. IL-7, interféron  $\gamma$ ). Ainsi, ces résultats montrent que le test fonctionnel immunitaire développé dans le cadre de cette invention permet d'obtenir une stratification des patients, que ne permettent pas les marqueurs de référence (ou *gold standard*) communément admis par la communauté scientifique, tels que mHLA-DR ou encore le TNF- $\alpha$ .

## Revendications

[Revendication 1] Procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, comprenant :

- a. Une étape d'incubation d'un échantillon sanguin dudit individu avec ledit stimulus, et
- b. Une étape de mesure de l'expression, à partir de l'échantillon sanguin stimulé résultant de l'étape a), d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1 : BST2, CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD3D, CD44, CD74, CD83, CLEC7A, CXCL10, CXCL2, CXCL9, DYRK2, FAM89A, HLA-DMB, HLA-DPB1, IFNG, IL1A, IRAK2, PTGS2, RARRES3, DDX58, SLAMF7, SRC, STAT2, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;
- Liste S2 : ADGRE3, ARL14EP, BST2, C3, CCL2, CCL20, CCL8, CCNB1IP1, IL7R, CD209, CD3D, CD44, CD74, CD83, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, CXCL10, CXCL2, CXCL9, DYRK2, FAM89A, HLA-DMB, HLA-DPB1, HLA-DRA, IFITM1, IRAK2, SLAMF7, TGFB1 ;
- Liste S3 : 121601901-HERV0116, BST2, C3, CCL20, CCL4, CCL8, CCR1, IL7R, CD209, CD44, CD74, CD83, CLEC7A, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DRA, IL1A, IL2, RARRES3, SLAMF7, STAT2.

[Revendication 2] Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1-1 : BST2, CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD3D, CD44, CD83, CXCL2, DYRK2, HLA-DMB, IFNG, IL1A, IRAK2, PTGS2, RARRES3, DDX58, SRC, STAT2, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;
- Liste S2-1 : ADGRE3, ARL14EP, C3, CCL2, CCNB1IP1, IL7R, CD3D, CD44, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, CXCL2, DYRK2, HLA-DMB, HLA-DRA, IFITM1, IRAK2, TGFB1 ;
- Liste S3-1 : 121601901-HERV0116, C3, CCR1, IL7R, CD44,

CD74, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, HLA-DRA, IL1A, IL2, RARRES3, SLAMF7, STAT2.

[Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1-2 : CCL20, CCL4, CCL8, CD209, CD44, CD83, CXCL2, IFNG, IL1A, IRAK2, PTGS2, DDX58, SRC, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;
- Liste S2-2 : ADGRE3, ARL14EP, CCL2, CCNB1IP1, IL7R, CDKN1A, CLEC7A, CX3CR1, DYRK2, IFITM1, TGFB1 ;
- Liste S3-2 : 121601901-HERV0116, C3, CCR1, CXCL10, CXCL9, EIF2AK4, HLA-DMB, HLA-DPA1, IL2, SLAMF7.

[Revendication 4] Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que les au moins deux biomarqueurs différents sont choisis respectivement dans au moins deux listes différentes, parmi les listes suivantes :

- Liste S1-3 : IFNG, PTGS2, DDX58, SRC, STING, TNFA, TNFSF13B, ZBP1 ;
- Liste S2-3 : ADGRE3, ARL14EP, CCL2, CCNB1IP1, CDKN1A, CX3CR1, IFITM1, TGFB1 ;
- Liste S3-3 : 121601901-HERV0116, CCR1, EIF2AK4, HLA-DPA1, IL2.

[Revendication 5] Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que, dans l'étape b), on mesure l'expression d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans chacune des trois listes de l'une des revendications 1 à 4.

[Revendication 6] Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'échantillon sanguin est un échantillon de sang total.

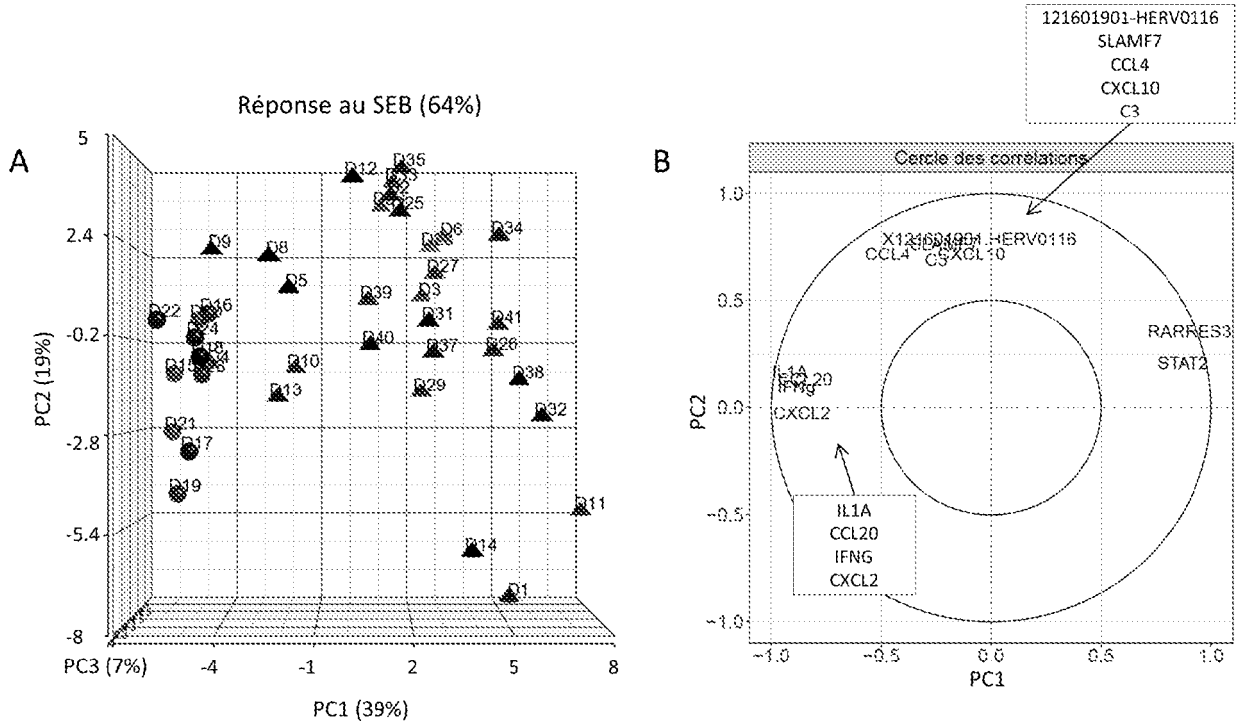
[Revendication 7] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le stimulus comprend une molécule capable de lier au moins un type de cellule de l'immunité innée et au moins un type de cellule de l'immunité adaptative, de préférence une molécule de type superantigène ou une molécule analogue à un superantigène.

- [Revendication 8] Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le stimulus comprend une molécule de type superantigène, choisie parmi les superantigènes produits par les espèces staphylococciques et les superantigènes produits par les espèces streptococciques.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le stimulus comprend une molécule choisie parmi SEB (*Staphylococcal Enterotoxin B*) et SEA (*Staphylococcal Enterotoxin A*).
- [Revendication 10] Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le stimulus comprend une molécule analogue à un superantigène, ladite molécule analogue à un superantigène étant un anticorps bispécifique.
- [Revendication 11] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le stimulus permet une activation directe des lymphocytes T.
- [Revendication 12] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 ou 11, caractérisé en ce que le stimulus est choisi parmi des anticorps reconnaissant et activant un récepteur à la surface du lymphocyte T.
- [Revendication 13] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 ou 11 à 12, caractérisé en ce que le stimulus est un anticorps anti-CD3, de préférence associé physiquement et/ou chimiquement avec un ou plusieurs anticorps, de préférence encore ces un ou plusieurs anticorps étant sélectionnés dans la liste constituée par : des anticorps anti-CD28, des anticorps anti-CD2 et/ou des anticorps anti-CD137.
- [Revendication 14] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le stimulus est de type imidazoquinolines, de préférence un agoniste de récepteurs TLR, de préférence encore un agoniste des récepteurs TLR7 et/ou TLR8.
- [Revendication 15] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6 ou 14, caractérisé en ce que le stimulus est le Resiquimod (R848).
- [Revendication 16] Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le stimulus comprend une molécule à visée thérapeutique, de préférence une molécule ayant un effet immunomodulateur.
- [Revendication 17] Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que l'expression des biomarqueurs est mesurée au niveau ARN messenger (ARNm).
- [Revendication 18] Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que l'expression des biomarqueurs est mesurée par RT-PCR, de préférence par RT-qPCR.
- [Revendication 19] Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que l'expression des biomarqueurs est mesurée par séquençage.

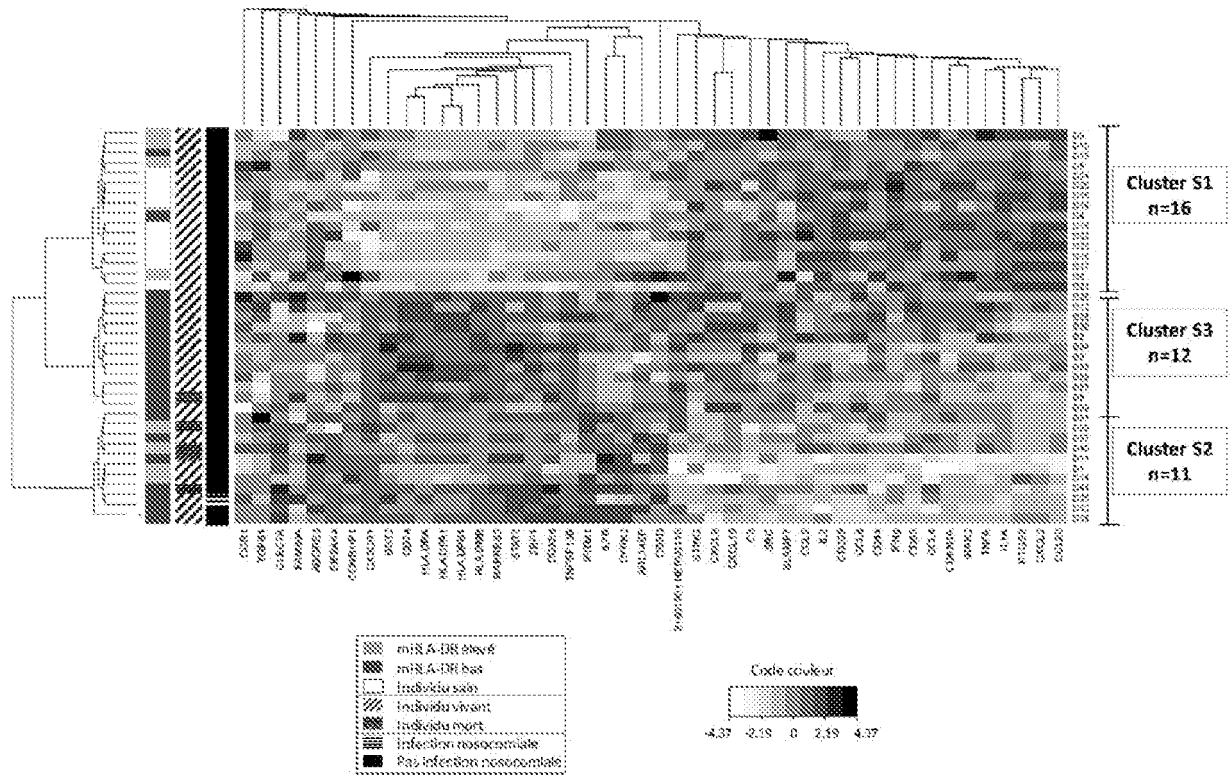
- [Revendication 20] Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que l'expression des biomarqueurs est mesurée par hybridation.
- [Revendication 21] Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que l'expression des biomarqueurs est normalisée par rapport à l'expression d'un ou plusieurs gènes de ménage.
- [Revendication 22] Procédé selon l'une des revendications 1 à 21, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de mesure de l'expression, à partir d'un échantillon sanguin contrôle sans stimulation, des mêmes biomarqueurs que ceux mesurés à partir de l'échantillon sanguin stimulé.
- [Revendication 23] Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de calcul des ratios de l'expression, de préférence l'expression normalisée, de chaque biomarqueur dans l'échantillon sanguin stimulé, par rapport à l'expression, de préférence l'expression normalisée, du même biomarqueur dans l'échantillon sanguin contrôle.
- [Revendication 24] Kit comprenant des moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes parmi les listes de l'une des revendications 1 à 4, de préférence des moyens d'amplification et/ou de détection d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans chacune des trois listes de l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ensemble des moyens d'amplification et/ou de détection dudit kit permettent la détection et/ou l'amplification d'au plus 100 biomarqueurs, au total.
- [Revendication 25] Kit selon la revendication 24, comprenant des moyens d'amplification et/ou de détection d'un ou plusieurs gènes de ménage.
- [Revendication 26] Kit selon la revendication 24 ou 25, comprenant des moyens de contrôle positif permettant de qualifier la qualité de l'extraction de l'ARN, la qualité de tout procédé d'amplification et /ou d'hybridation.
- [Revendication 27] Utilisation :
- de moyens d'amplification et/ou de détection (de préférence des amorces et/ou des sondes) d'au moins deux biomarqueurs différents, choisis respectivement dans au moins deux listes différentes parmi les listes de l'une des revendications 1 à 4, de préférence des moyens d'amplification et/ou de détection d'au moins trois biomarqueurs différents, choisis respectivement dans chacune des trois listes de l'une des revendications 1 à 4, ou
  - d'un kit comprenant de tels moyens d'amplification et/ou de détection,

de préférence l'ensemble des moyens d'amplification et/ou de détection dudit kit permettent la détection et/ou l'amplification d'au plus 100 biomarqueurs, au total, et optionnellement ledit kit comprend des moyens d'amplification et/ou de détection d'un ou plusieurs gènes de ménage et/ou des moyens de contrôle positif permettant de qualifier la qualité de l'extraction de l'ARN, la qualité de tout procédé d'amplification et /ou d'hybridation, pour déterminer la capacité d'un individu à répondre à un stimulus, de préférence la capacité du système immunitaire d'un individu à répondre à un stimulus.

[Fig. 1]

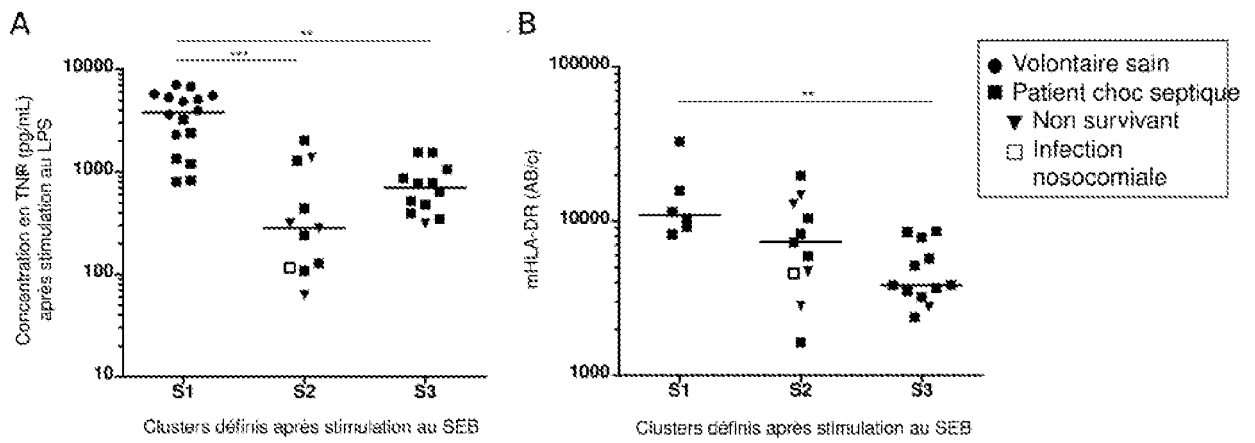


[Fig. 2]





[Fig. 3]



**RAPPORT DE RECHERCHE  
 PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications  
 déposées avant le commencement de la recherche
N° d'enregistrement  
nationalFA 878514  
FR 1910884

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		
X	ANONYMOUS: "GeneChip Human Genome Arrays", INTERNET CITATION, 1 janvier 2004 (2004-01-01), XP002384937, Extrait de l'Internet: URL:http://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/human_datasheet.pdf#search=%22GENECHIP%20HUMAN%20GENOME%20ARRAYS%22 [extrait le 2006-06-12] * le document en entier *	24-26	G01N33/50 G01N33/68
A	WO 2012/101387 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]) 2 août 2012 (2012-08-02) * abrégé * * page 23 - page 31 * * revendications 1-30 *	1-27	
A	WO 2013/162651 A1 (US ARMY CENTER FOR ENVIRONMENTAL HEALTH RESEARCH (CEHR) [US]) 31 octobre 2013 (2013-10-31) * le document en entier * * revendications 1-26 *	1-27	
A	WO 2015/135071 A1 (HANCOCK R.E.W. [CA] ET AL.) 17 septembre 2015 (2015-09-17) * le document en entier * * revendications 1-28 *	1-27	
A	US 2011/098195 A1 (RUSSWURM S. [DE]) 28 avril 2011 (2011-04-28) * le document en entier * * revendications 1-15 *	1-27	
	----- -/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 août 2020		Giry, Murielle	
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	

**RAPPORT DE RECHERCHE  
 PRÉLIMINAIRE**

 établi sur la base des dernières revendications  
 déposées avant le commencement de la recherche
N° d'enregistrement  
national
 FA 878514  
 FR 1910884

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	BECKER J. ET AL.: "A comprehensive hybridization model allows whole HERV transcriptome profiling using high density microarray", BMC GENOMICS, vol. 18, no. 1, 8 avril 2017 (2017-04-08), pages 1-14, XP021243930, * le document en entier * -----	1-27	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	SWEENEY T.E. ET AL.: "Unsupervised analysis of transcriptomics in bacterial sepsis across multiple datasets reveals three robust clusters", CRIT. CARE MED., vol. 46, no. 6, juin 2018 (2018-06), pages 915-925, XP055722753, * le document en entier * -----	1-27	
A	FR 3 044 325 A1 (BIOMERIEUX SA [FR]) 2 juin 2017 (2017-06-02) * le document en entier * -----	1-27	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
17 août 2020		Giry, Murielle	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1910884 FA 878514**

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 **17-08-2020**

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 2012101387 A1	02-08-2012	CA 2824378 A1	02-08-2012
		EP 2668293 A1	04-12-2013
		ES 2633732 T3	25-09-2017
		FR 2970975 A1	03-08-2012
		US 2013316930 A1	28-11-2013
		US 2018312921 A1	01-11-2018
		WO 2012101387 A1	02-08-2012
WO 2013162651 A1	31-10-2013	US 2015051094 A1	19-02-2015
		WO 2013162651 A1	31-10-2013
WO 2015135071 A1	17-09-2015	AU 2015230632 A1	06-10-2016
		AU 2020201564 A1	19-03-2020
		CA 2942577 A1	17-09-2015
		CN 106661765 A	10-05-2017
		EP 3117030 A1	18-01-2017
		JP 2017514459 A	08-06-2017
		US 2017073734 A1	16-03-2017
		US 2020032321 A1	30-01-2020
		WO 2015135071 A1	17-09-2015
US 2011098195 A1	28-04-2011	CA 2718741 A1	24-09-2009
		DE 102008000715 A1	24-09-2009
		GB 2470707 A	01-12-2010
		JP 2011517401 A	09-06-2011
		US 2011098195 A1	28-04-2011
		WO 2009115478 A2	24-09-2009
FR 3044325 A1	02-06-2017	AU 2016361646 A1	21-06-2018
		BR 112018011224 A2	21-11-2018
		CN 108474038 A	31-08-2018
		EP 3384047 A1	10-10-2018
		FR 3044325 A1	02-06-2017
		JP 2019503663 A	14-02-2019
		US 2019017118 A1	17-01-2019
		WO 2017093672 A1	08-06-2017