



**HAL**  
open science

# Étude statistique et optimisation de l'effet thérapeutique du peptide P140 dans un modèle murin lupique ainsi qu'en essai clinique

Laura Neuhart

► **To cite this version:**

Laura Neuhart. Étude statistique et optimisation de l'effet thérapeutique du peptide P140 dans un modèle murin lupique ainsi qu'en essai clinique. *Méthodologie [stat.ME]*. 2011. dumas-00618565

**HAL Id: dumas-00618565**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00618565v1>**

Submitted on 2 Sep 2011

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Institut de  
Biologie  
Moléculaire  
et Cellulaire



Laura Neuhart

Master Mathématiques et Applications  
Spécialité Statistique 1<sup>ère</sup> année  
18 Avril 2011 – 8 juillet 2011



*Etude statistique et optimisation de l'effet thérapeutique du peptide  
P140 dans un modèle murin lupique ainsi qu'en essai clinique.*

Maîtres de stage :

Dr Sylviane Muller  
Directeur UPR 9021 CNRS Immunologie et Chimie Thérapeutique

Nicolas Schall  
Ingénieur IMMUPHARMA

Responsable universitaire :

Armelle Guillou  
Responsable Master Mathématiques et Applications Spécialité Statistique

## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mme Sylviane Muller directrice du laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutique de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de son équipe.

Je tiens également à remercier M. Nicolas Schall ingénieur IMMUPHARMA, mon maitre de stage, pour son aide et sa disponibilité tout au long de mon stage et lors de l'écriture de ce rapport.

Un grand merci également à toutes les personnes rencontrées au sein de ce laboratoire durant ces deux mois pour leur accueil et leur bonne humeur.

Enfin mes remerciements vont également à M. Nicolas Poulin pour ses conseils de rédaction et d'organisation de mon rapport de stage.

# Table des matières

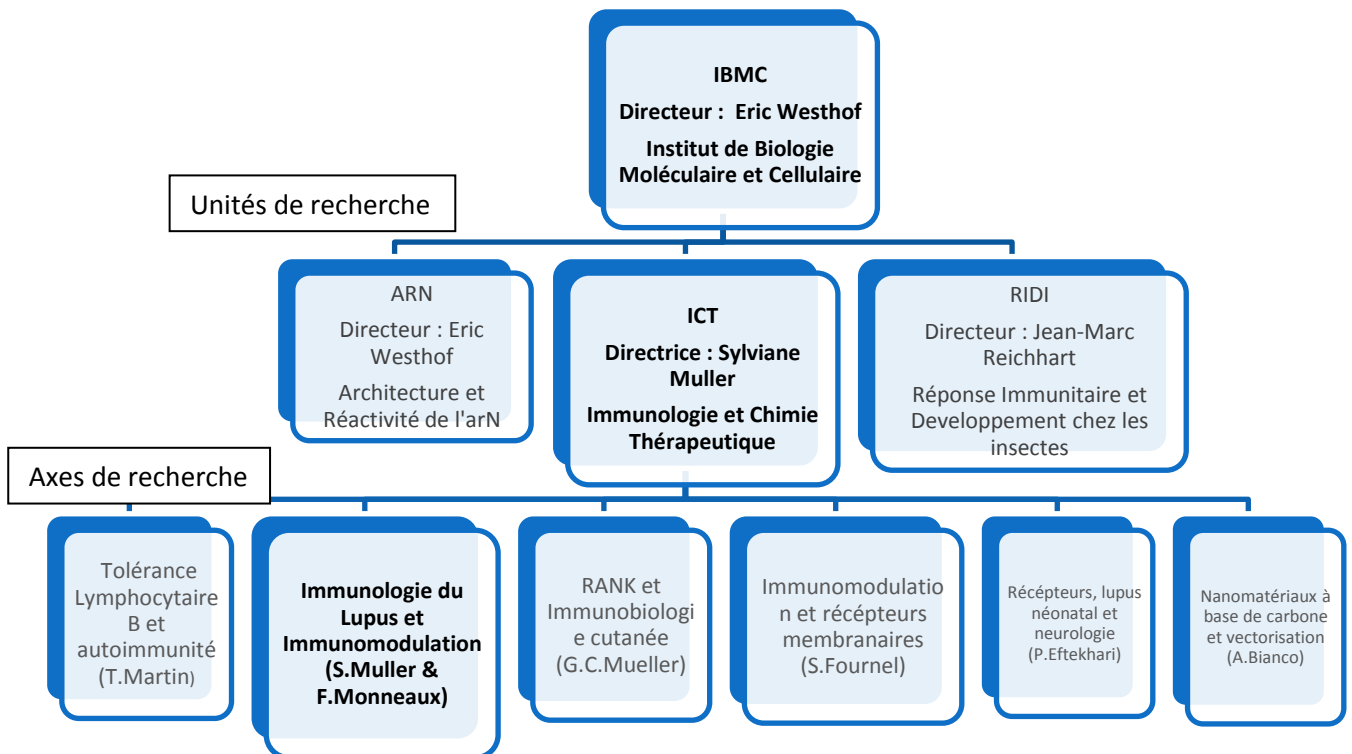
<b>I. Introduction</b>	<b>4</b>
1. Présentation du laboratoire	4
2. Description du Lupus érythémateux disséminé	5
3. Le peptide P140	5
4. La souris MRL/lpr	6
5. Déroulement d'un essai clinique	6
6. But du stage	7
<b>II. Matériel et Méthodes</b>	<b>8</b>
1. Outils informatiques et données	8
1.1. Outils informatiques	8
1.2. Analyse des données	8
1.2.1. Etude d'analogues du P140	8
1.2.2. La phase IIa	9
1.2.3. Les « Bio essais »	10
2. Méthodes statistiques	11
2.1. Analyse de survie	11
2.1.1. Les différents modèles de censure	11
2.1.2. La méthode de Kaplan-Meier	12
2.1.3. Comparaison des courbes de survie	12
2.2. Tests de Mann-Whitney	13
2.3. Les valeurs aberrantes	14
<b>III. Résultats</b>	<b>15</b>
1. Etude des analogues du P140	15
1.1. Effet du P140	15
1.2. Les analogues du P140	20
2. La phase IIa	25
2.1. Les anti. dsDNA	25
2.2. Le score du SLEDAI	31
3. Les « Bio essais »	36
3.1. Les Temps	36
3.1.1. Avec le NaCl 9%	36
3.1.2. Avec le Mannitol 5.4%	38
3.1.3. Avec le Tréhalose 10%	39
3.2. Les Solutés	41
3.2.1. Pour le temps J+3	41
3.2.2. Pour le temps J+5	43
3.2.3. Pour le temps J+7	45
3.2.4. Pour le temps J+10	46

<b>IV. Conclusion et perspectives</b>	<b>49</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>50</b>
<b>Annexes</b>	<b>51</b>
<b>II. Annexes Matériel et Méthodes</b>	<b>52</b>
<b>4. Outils informatiques et données</b>	<b>52</b>
Outils Informatiques	52
<b>5. Méthodes statistiques</b>	<b>53</b>
2.4. Valeurs aberrantes	53
<b>III. Annexes partie Résultats</b>	<b>54</b>
<b>Etude des analogues du P140</b>	<b>54</b>
Effet du P140	54
<b>6. La phase IIa</b>	<b>55</b>
Les Anti dsDNA	55
Le score du SLEDAI	58
<b>7. Les « Bio essais »</b>	<b>61</b>
Les temps	61
Avec le NaCl 9‰	61
Avec le Mannitol 5.4%	61
Avec le Tréhalose 10%	61
Les Solutés	62
Pour le temps J+3	62
Pour le temps J+5	62
Pour le temps J+7	62
Pour le temps J+10	62

## I. Introduction

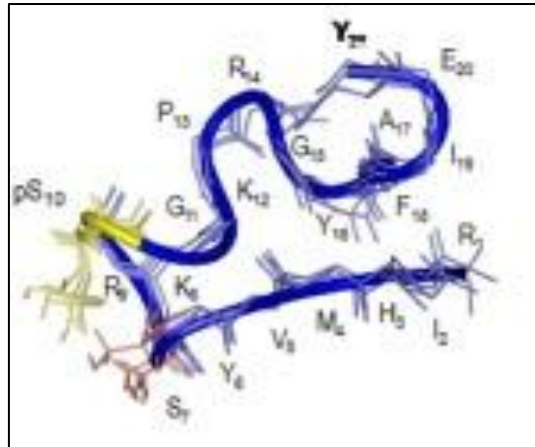
### 1. Présentation du laboratoire

Le laboratoire CNRS d'Immunologie et Chimie Thérapeutique (ICT) dirigé par Sylviane Muller est l'une des trois unités de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de Strasbourg (**Figure 1.1.**).



**Figure 1.1.** Organigramme de l'IBMC

Cette unité de recherche travaille essentiellement sur les fondements moléculaires et cellulaires de la réponse immunitaire et ses dysfonctionnements dans le but de définir de nouvelles voies thérapeutiques d'immuno-intervention ciblées, dans le traitement de pathologies auto-immunes, tumorales et virales. Après de nombreuses et concluantes recherches, les chercheurs de ce laboratoire ont découvert puis breveté en 2001 un fragment de la protéine U1-70K, le peptide P140 (**Figure 1.2.**) capable de traiter un modèle murin lupique, la MRL/lpr.



**Figure 1.2.** Structure du peptide P140

## 2. Description du Lupus érythémateux disséminé

Le Lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique entraînant entre autre des douleurs articulaires, des lésions cutanées du visage ou des atteintes rénales plus ou moins sévères. Touchant entre 80 et 100 000 personnes en France, la prévalence en Europe de cette maladie est de 40 cas pour 100 000 individus dont 90 % de femmes âgées entre 18 et 50 ans.

Aujourd'hui le Lupus ne possède pas encore de traitement spécifique. Les traitements actuels sont particulièrement lourds et provoquent des désordres du système immunitaire, ce qui engendre pour les patients d'importants effets secondaires à long terme pouvant aller par exemple jusqu'au cancer. La mise en place d'un traitement durable et sans effets secondaires lourds devient donc essentiel pour les malades.

## 3. Le peptide P140

C'est au début des années 2000 que l'équipe de Sylviane Muller du laboratoire d'Immunologie et Chimie Thérapeutique identifie le peptide P140 qui deviendra le candidat-médicament « Lupuzor™ ». Les chercheurs de l'unité remarquent un allongement significatif de la durée de vie des souris traitées par ce peptide issu de la protéine U1-70 K ainsi qu'une baisse de la protéinurie et des signes cutanés, représentatifs de la maladie (8). Le peptide P140 est alors breveté en 2001.

C'est avec ces résultats très convaincants que la société ImmuPharma, après avoir obtenu la licence du brevet, décide alors de réaliser en 2006 la phase I de l'essai clinique suivi d'une phase IIa et enfin la phase IIb en 2008, nous définirons ces phases ultérieurement. Après plusieurs étapes d'un essai clinique concluant montrant l'efficacité du peptide et l'absence d'effets secondaires, le futur médicament est actuellement en phase III et pourrait être sur le marché en 2016.

#### 4. La souris MRL/lpr

Les MRL/lpr sont une souche de souris génétiquement prédisposées au développement du LED. Il a été démontré cliniquement que ces souris développent un LED identique à la maladie humaine. Cette souche de souris est porteuse d'une mutation dans le gène FAS (mutation lpr) qui a pour conséquence un syndrome de lymphoprolifération cellulaire ainsi que l'apparition, avec l'âge, de cellules doubles négatives. La souris MRL/lpr est utilisée en laboratoire de recherche pour étudier l'effet de molécules dans les maladies auto-immunes ainsi que l'efficacité des agents immunosuppresseurs.

#### 5. Déroulement d'un essai clinique

Un essai clinique est destiné à tester la capacité d'un nouveau traitement à stopper la progression d'une maladie ou de la guérir sur un panel représentatif de patients.

Dans un premier temps, la molécule est testée sur un modèle animal dans une **phase de toxicité** qui a pour but de déterminer la dose maximale de tolérance avant d'atteindre une dose toxique. Une étude sur l'animal, en général le chien et le rat, est obligatoire avant tout essai sur l'Homme pour assurer la sécurité des patients lors des premières phases. Le traitement passe en phase I de l'essai clinique après que la dose maximale (exprimée en mg de molécule par kg de poids corporel) admissible ait été déterminé par le modèle animal choisi. Cette dose servira de base de calcul pour les injections lors de la phase I.

En **phase I**, la tolérance et l'absence d'effets secondaires sont évaluées dans un groupe de sujets sains (entre 20 et 80 volontaires rémunérés) ou pour certaines pathologies sur des malades en phase terminale. C'est la première administration de la molécule chez l'Homme.

Durant la **phase II**, qui est divisé en deux phases, la dose optimale de traitement en termes d'efficacité est déterminée. Plusieurs doses sur différentes échelles de temps de traitement peuvent ainsi être testées, ce qui servira de base pour la phase III. Dans un premier temps, la **phase IIa** estimera l'efficacité du traitement sur un nombre restreint de patients (entre 10 et 20 malades). Ensuite, la **phase IIb** se fera sur un plus grand nombre de malades et comparera l'efficacité du traitement face à un traitement placebo ou un traitement préalablement existant. Cette phase permettra de confirmer l'absence d'effets secondaires et la tolérance du traitement dans la pathologie incriminée.

En **phase III**, les patients sont entre quelques milliers et plusieurs dizaines de milliers, ce qui permet alors de vérifier l'efficacité du traitement à grande échelle. Cette phase peut durer plusieurs années. L'efficacité du traitement sera alors à nouveau comparée à celle d'un placebo ou d'un traitement actuellement sur le marché. C'est à la fin de cette phase que la demande d'autorisation de mise sur le marché du médicament sera déposée.



Après l'acceptation de la mise sur le marché, une **phase IV** peut être lancée. Elle permet un suivi à long terme du traitement ainsi qu'une surveillance d'éventuelles apparitions d'effets secondaires plus rares ou de complications tardives.

## 6. But du stage

Le projet du stage se concentrera sur l'étude statistique de trois parties bien distinctes, allant de la recherche fondamentale sur les souris MRL/lpr, à l'analyse de résultats d'essais cliniques ainsi que de tests visant à mettre en place un contrôle qualité des différents lots de production de peptide P140.

L'étude préclinique de la souris MRL/lpr nous permettra d'étudier l'effet significatif du P140 sur le rallongement de la survie de celles-ci et de le comparer à plusieurs de ses analogues pour voir si l'un d'eux a de meilleurs effets.

La phase IIa permettra d'une part de vérifier l'efficacité du peptide P140 chez des patients atteint de LED et d'autre part de définir la meilleure dose de traitement à injecter aux patients pour les futurs essais cliniques de phase IIb et III.

Pour finir, la mise en place d'un test biologique permettant de valider les lots à leur sortie de production est indispensable. Nous essayerons donc de trouver les conditions optimales de test pour contrôler rapidement les lots de peptide, grâce à différents « Bio essais » utilisant les souris MRL/lpr.

## II. Matériel et Méthodes

Dans cette partie, nous présenterons les données qui seront étudiées, ainsi que les méthodes utilisées permettant l'analyse de ces données.

### 1. Outils informatiques et données

#### 1.1. Outils informatiques

Dans un premier temps, Microsoft Office Excel 2007 nous a permis de créer et par la suite de manipuler simplement les bases de données utiles au projet (voir **Annexes**).

Ensuite, pour les études statistiques et graphiques, le principal logiciel utilisé au laboratoire est GraphPad Prism (voir **Annexes**). Par la suite, le logiciel MINITAB nous aidera à aller plus loin dans l'étude statistique et à l'élaboration de certains graphiques. Enfin, une macro Excel générée pour effectuer le test de Dixon nous aidera à identifier les valeurs aberrantes dans nos échantillons de données.

#### 1.2. Analyse des données

Les données utilisées pour ce projet ont été récoltées au cours de plusieurs années de travail, et classées dans plusieurs bases de données avant d'être étudiées.

##### 1.2.1. Etude d'analogues du P140

L'étude de ces analogues s'est déroulée au laboratoire sur des souris femelles MRL/lpr. L'équipe de Sylviane Muller a étudié alors grâce à plusieurs thérapies la survie, l'évolution de la protéinurie ainsi que des dermatites en fonction du traitement. La **protéinurie** est un excès de protéines dans l'urine des souris et qui correspond à l'un des symptômes du Lupus dans la MRL/lpr. Cet excès de protéinurie est dû aux atteintes rénales plus ou moins sévères. Les **dermatites** sont des maladies de peau caractérisées par des taches érythémateuses de taille variable. Pour une partie des souris malades les dermatites n'apparaîtront jamais durant de leur maladie.

Les différents traitements testés vont nous permettre de comparer le peptide P140 en injection par voie rétro-orbital de 100µg par 100µL de soluté, aux résultats obtenus avec les différents analogues de ce peptide ainsi qu'un contrôle qui sera ici le NaCl 9%.

### 1.2.2. La phase IIa

La phase IIa s'est déroulée en Bulgarie sur 20 patients atteints de LED et comprenant 18 femmes et 2 hommes. Cette proportion est représentative de la maladie soit 90% de femmes chez les malades du Lupus.

Pour déterminer l'efficacité du traitement nous allons étudier deux facteurs :

- Le taux d'anti. dsDNA (anticorps ADN double brin)
- Le score de SLEDAI (Systemic Lupus Erythémateux Disease Activity Index)

Les sujets reçoivent 3 injections de 200 µg ou 1000 µg de peptide tous les 15 jours (jour 0, jour 15 et jour 30), les données sont récoltées après 8, 15, 29, 43 et 57 jours.

Les anti. dsDNA sont des anticorps spécifiques du Lupus. Il est donc intéressant de les étudier pour surveiller l'évolution de la maladie suite au traitement. Le SLEDAI peut être vu comme le score de l'intensité de la maladie, il est calculé en fonction des manifestations de la maladie chez le patient avec un score maximal de 105. Les données étudiées sont alors l'évolution du pourcentage de baisse du taux d'anti. dsDNA et la baisse du score de SLEDAI des patients. Cette méthode de calcul permet une meilleure visualisation de l'effet du peptide P140, plutôt que d'utiliser les données brutes.

Calcul de baisse du taux d'anti. dsDNA entre le temps 0 et le temps  $t = (8, 15, 29, 43, 57)$ , soit  $n$  le nombre de sujets :

Temps 0 (UI / mL)	Temps $t$ (UI / mL) $t = (8, 15, 29, 43, 57)$	Pourcentage de baisse
$A_1$	$B_1$	$C_{1,t}$
$A_2$	$B_2$	$C_{2,t}$
...	...	...
$A_n$	$B_n$	$C_{n,t}$

$$\text{Avec } C_{i,t} = \frac{100 * B_i}{A_i} - 100$$

Calcul de la baisse du score du SLEDAI entre le temps 0 et le temps  $t = (8, 15, 29, 43, 57)$  :

Temps 0	Temps $t$ $t = (8, 15, 29, 43, 57)$	Baisse
$A_1$	$B_1$	$C_{1,t}$
$A_2$	$B_2$	$C_{2,t}$
...	...	...
$A_n$	$B_n$	$C_{n,t}$

$$\text{Avec } C_{i,t} = B_i - A_i$$

Nous testons alors la dose de peptide P140 la plus efficace en injection entre 200 µg et 1000 µg avec des groupes de 10 patients.

### 1.2.3. Les « Bio essais »

Les « Bio essais » sont effectués sur des souris MRL/lpr âgées de 12 semaines qui reçoivent une seule injection de 100 µg de peptide dans 100 µL de soluté par voie rétro-orbitale. Ces « Bio essais » sont indispensables pour trouver les conditions optimales de tests *in vivo* permettant de contrôler rapidement les lots de peptide à leur sortie de production. Pour les mêmes raisons qu'en phase IIa, les données recueillies sont le pourcentage de baisse de la cellularité.

Calcul du pourcentage de baisse de cellularité, soit n le nombre de souris dans chaque échantillon :

Contrôle (x10 <sup>6</sup> cells / mL)	Traitement (x10 <sup>6</sup> cells / mL)	Pourcentage de baisse
A <sub>1</sub>	B <sub>1</sub>	C <sub>1</sub>
A <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	C <sub>2</sub>
...	...	...
A <sub>n</sub>	B <sub>n</sub>	C <sub>n</sub>

$$\text{Avec } C_i = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \left( 100 - \frac{100 \cdot B_j}{A_i} \right)$$

Contrairement aux études de phase IIa où le suivi des paramètres d'intérêts se fait sur le même groupe de patients, les « bio-essais » comparent un groupe contrôle à un groupe de souris traitées. De ce fait, nous avons décidé d'étudier les moyennes de baisse de cellularité des souris traitées par rapport aux souris contrôles pour pouvoir comparer les différents tests entre eux.

Deux facteurs sont étudiés :

- Le soluté : NaCl 9‰, Tréhalose 10% et Mannitol 5.4%

Le NaCl 9‰ encore appelé eau physiologique a été choisi pour sa particularité d'être sans effets. Le Mannitol 5.4% a été lui préféré par la société ImmuPharma pour l'injection du peptide chez l'Homme en phase IIa. Enfin la société américaine Cephalon qui après avoir obtenu une sous-licence du peptide P140, a décidé d'utiliser le Tréhalose 10% pour injecter la molécule aux patients en phase IIb.

- Le temps : 3, 5, 7 ou 10 jours après injection

Ces différents temps nous permettrons de déterminer d'une part après combien de jours la baisse de cellularité est la plus importante et d'autre part si l'effet du peptide P140 se prolonge dans le temps.

## 2. Méthodes statistiques

### 2.1. Analyse de survie

En analyse de survie, ce qui nous intéresse est l'apparition d'un événement au cours du temps, par exemple dans notre étude, le décès causé par le Lupus de la souris MRL/lpr. La variable d'intérêt sera donc la durée entre une origine précise et la survenue de l'événement, pour nous l'âge de la souris lors de son décès, soit  $X$  cette variable.

De nombreuses méthodes d'analyse des données de survie sont connues, la méthode de Kaplan-Meier étant la plus répandue pour notre type de données.

Introduisons dans un premier temps les principales fonctions pour l'analyse de la survie.

Soit  $X$  une durée de vie,  $X$  variable aléatoire quantitative positive.

- La fonction de répartition (théorique)

$$F(t) = P(X \leq t)$$

= la probabilité de décéder avant l'instant  $t$

- La fonction de survie (théorique)

$$S(t) = P(X > t) = 1 - F(t)$$

= la probabilité de survivre à l'instant  $t$

$S(t)$  est une probabilité, elle est comprise entre 0 et 1.

$S(t)$  donne la proportion de sujets n'étant pas encore décédés à l'instant  $t$ , c'est donc logiquement une fonction décroissante.

$S(t)$  telle que  $S(0) = 1$  et  $\lim_{t \rightarrow \infty} S(t) = 0$ .

Pour commencer l'analyse de survie, il faut estimer la fonction de survie pour cela plusieurs méthodes existent, mais nous nous intéresserons uniquement à la méthode de Kaplan-Meier.

#### 2.1.1. Les différents modèles de censure

Pour certain individus d'un même échantillon les données de survies sont observées de manière exacte mais pour d'autres, on ne dispose que d'une information partielle sur les durées de vie.

La censure est à l'origine de ce problème.

- $X$  est dite censurée **à droite** si au lieu d'observer  $X$ , on observe  $C$  une variable aléatoire positive représentant une durée et si  $X > C$ .
- $X$  est dite censurée **à gauche** si au lieu d'observer  $X$ , on observe  $C$  une variable aléatoire positive représentant une durée et si  $X < C$ .

- X est dite censurée **par intervalle** si au lieu d'observer X, on observe  $C_1$  et  $C_2$  deux variables aléatoires positives représentant des durées telles que  $C_1 < C_2$  et si  $C_1 < X < C_2$ .

Dans notre cas, nous considérerons que les souris sont suivies pendant un certain nombre de semaines défini à l'avance. Les observations sont donc censurées à droite quand leur durée de survie est supérieure à ce nombre de semaines.

### 2.1.2. La méthode de Kaplan-Meier

Soient  $n$  le nombre de sujets total et  $n'$  le nombre total de sujets non censurés.

- L'absence de censure, un estimateur  $\hat{S}(t)$  de  $S(t)$  est la proportion de sujets en vie à l'instant  $t$ .

$$\hat{S}(t) = \frac{\text{nombre de sujets en vie à l'instant } t}{\text{nombre total de sujets}}$$

- En cas de censure, si  $s < t$ , par la formule des probabilités totales on a :

$$S(t) = P(X > t) = P(X > t \mid X > s)P(X > s)$$

Après itérations nous obtenons :

$$\begin{aligned} S(t) &= \prod_{\substack{i=1 \\ T'_i \leq t}}^{n'} P(X \geq T'_i \mid X > T'_{i-1}) \\ &= \prod_{\substack{i=1 \\ T'_i \leq t}}^{n'} (1 - P(X \leq T'_i \mid X > T'_{i-1})) \\ &= \prod_{\substack{i=1 \\ T'_i \leq t}}^{n'} (1 - P(T'_{i-1} < X \leq T'_i \mid X > T'_{i-1})) \\ &= \prod_{\substack{i=1 \\ T'_i \leq t}}^{n'} (1 - \text{probabilité de mourir entre } T'_{i-1} \text{ et } T'_i \text{ sachant que l'on est vivant en } T'_{i-1}) \end{aligned}$$

$T'_{i-1} < X \leq T'_i$  : la durée X est supérieur  $T'_{i-1}$  mais inférieur à  $T'_i$  .

$X > T'_{i-1}$  : la durée X est supérieur à  $T'_{i-1}$  .

L'estimateur de la fonction de survie est donc :

$$\hat{S}(t) = \prod_{\substack{i=1 \\ T'_i \leq t}}^{n'} \left(1 - \frac{M_i}{R_i}\right)$$

Avec  $T'_1 < \dots < T'_{n'}$ ,  $n' < n$  observations non censurés distinctes ordonnées de l'échantillon ( $T_1, \dots, T_n$ ),  $M_i$  est le nombre de sujets morts en  $T'_i$  et  $R_i$  est le nombre de sujets à risque en  $T'_i$ .

Des **sujets à risques** sont des sujets ni morts, ni censurés en  $T'_i$ .

### 2.1.3. Comparaison des courbes de survie

Le but essentiel de l'analyse de survie est d'évaluer les différences entre deux courbes, dans notre cas évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement par rapport à un traitement placebo. Nous cherchons à savoir si les différences observées en termes d'évolution de durée de vie entre chacun des deux groupes sont significatives.

Ce qui revient à tester les hypothèses suivantes à l'aide du test du Log-rank et du test de Gehan-Breslow-Wilcoxon :

$H_0$ : Les évolutions des durées de vie des 2 groupes sont identiques Contre $H_1$ : Les évolutions des durées de vie des 2 groupes sont différentes
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### *Test du Log-rank*

Le principe du test du log-rank est de comparer, dans chaque groupe, le nombre observé et le nombre attendu de décès si la survie était identique dans les deux groupes, sur l'ensemble de la période étudiée.

Pour chaque intervalle de temps, le nombre attendu de décès, sous l'hypothèse  $H_0$  s'obtient en appliquant, au nombre de sujets à risque, la proportion de décès observés sur l'ensemble des deux groupes.

### *Test de Gehan-Breslow-Wilcoxon*

Le test de Gehan-Breslow-Wilcoxon repose sur le même principe que le test du log-rank, mais pondère la différence entre le nombre observé et le nombre attendu de décès. Ce test permet de donner moins de poids à cette différence lorsque le nombre de sujets encore à risque est faible.

## **2.2. Tests de Mann-Whitney**

Il y a deux sortes de tests d'hypothèses, les tests paramétriques avec normalité des distributions et égalité des variances et tests non paramétriques qui ne vérifient pas ces conditions. En général, quand toutes les conditions sont remplies les tests paramétriques sont plus puissants que les tests non paramétriques. Nous entendons par puissance la probabilité de refuser l'hypothèse  $H_0$  à raison.

Soit  $X$  une variable aléatoire, de loi continue, sur deux populations.

Nous obtenons deux séries d'observations notées  $(x_1, \dots, x_{n_1})$  et  $(y_1, \dots, y_{n_2})$ , soit  $L_i$  la loi de la variable aléatoire  $X$  sur la population d'ordre  $i$ .

Le test de Mann-Whitney test l'hypothèse:

$H_0$ : $L_1(X) = L_2(X)$ Contre $H_1$ : $L_1(X) \neq L_2(X)$
---------------------------------------------------------------------

Après avoir classé par ordre croissant chaque échantillon, affectons à chaque valeur le rang correspondant, soit  $R_{n_1}$  et  $R_{n_2}$  la somme des rangs pour chacun des deux échantillons.

Nous avons alors la statistique de test  $U_{n_1, n_2} = \min(U_{n_1}, U_{n_2})$ , avec

$$U_{n_1} = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_{n_1}$$

$$U_{n_2} = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_{n_2}$$

Dans notre projet, les tailles des échantillons  $n_1$  et  $n_2$  seront généralement inférieures ou égales à 20, dans ce cas, pour un seuil  $\alpha = 5\%$ , les tables de Mann-Whitney nous fournissent une valeur critique  $c$ , nous décidons alors :

Si  $U_{n_1;n_2;obs} \leq c$  ( $H_1$ ) est vraie

Si  $U_{n_1;n_2;obs} > c$  ( $H_0$ ) est vraie

Dans le cas où nous voudrions faire un test sur plus de deux échantillons, un test d'analyse de la variance sera utilisé.

### 2.3. Les valeurs aberrantes

Au cours d'une expérimentation, il peut arriver que l'une des données semble être bien éloignée des autres, nous pouvons considérer cette valeur comme une valeur aberrante. Pour justifier l'élimination de cette valeur, nous utiliserons le test de Dixon (voir **Annexes**).

#### Test de Dixon

Soient  $x_1 < \dots < x_n$  les données récoltées. Le test permet alors de détecter si  $x_1$  ou  $x_n$  est une valeur aberrante.

En fonction du nombre d'observation, on calcule les rapports suivants :

$3 \leq n \leq 7$	$r_{10} = \frac{y_2 - y_1}{y_n - y_1}$	$r_{10} = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_1}$
$8 \leq n \leq 10$	$r_{11} = \frac{y_2 - y_1}{y_{n-1} - y_1}$	$r_{11} = \frac{y_n - y_{n-1}}{y_n - y_2}$
$11 \leq n \leq 13$	$r_{21} = \frac{y_3 - y_1}{y_{n-1} - y_1}$	$r_{21} = \frac{y_n - y_{n-2}}{y_n - y_2}$
$14 \leq n \leq 30$	$r_{22} = \frac{y_3 - y_1}{y_{n-2} - y_1}$	$r_{22} = \frac{y_n - y_{n-2}}{y_n - y_3}$

La table de Dixon nous donne les valeurs critiques de ces rapports au niveau 10%, 5% et 1%.

Si la valeur du rapport est inférieure à la valeur critique, l'élimination de l'observation n'est pas justifiée au risque donné.



### III. Résultats

#### 1. Etude des analogues du P140

L'étude est composée de plusieurs thérapies comparant, sur le modèle murin lupique MRL/lpr, différents analogues du peptide P140 au peptide P140 lui-même. Les injections sont réalisées en retro-orbital, à raison de 100 µg de peptide dans 100 µL d'eau physiologique (NaCl 9‰). Les souris ainsi traitées seront comparées à un placebo composé exclusivement de NaCl 9‰. Le protocole sera toujours identique. Les souris recevront 4 injections à 5, 7, 9 et 12 semaines. Nous commencerons le suivi de la protéinurie et des dermatites définis plus haut, à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine tous les 10 jours.

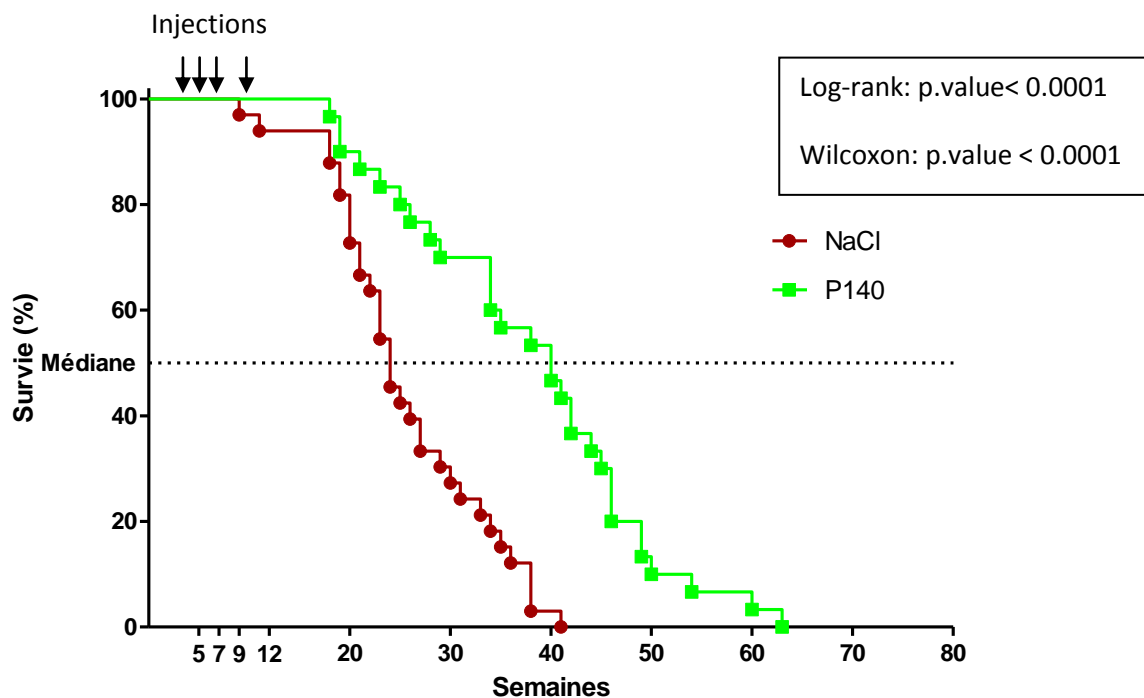
##### 1.1. Effet du P140

Dans un premier temps observons les effets du peptide P140 lui-même sur la survie, le taux de protéinurie et sur les dermatites des souris MRL/lpr.

Les vérifications des différentes conditions d'utilisation des tests sont en **Annexe**.

##### Survie

Commençons par étudier les courbes de survie (**Figure 3.1.**) du groupe contrôle NaCl 9‰ ainsi que du groupe P140 composés tous les deux de 30 souris.



**Figure 3.1.** Courbes de Survie. La médiane de survie est de 24 semaines pour le groupe NaCl et de 40 semaines pour le groupe P140. (résultats GraphPad)

## Sortie GraphPad

Comparison of Survival Curves		Comparison of Survival Curves	
Log-rank (Mantel-Cox) Test		Gehan-Breslow-Wilcoxon Test	
Chi square	22,92	Chi square	16,42
df	1	df	1
<b>P value</b>	<b>P&lt;0.0001</b>	<b>P value</b>	<b>P&lt;0.0001</b>
P value summary	***	P value summary	***
Are the survival curves sig different?	Yes	Are the survival curves sig different?	Yes

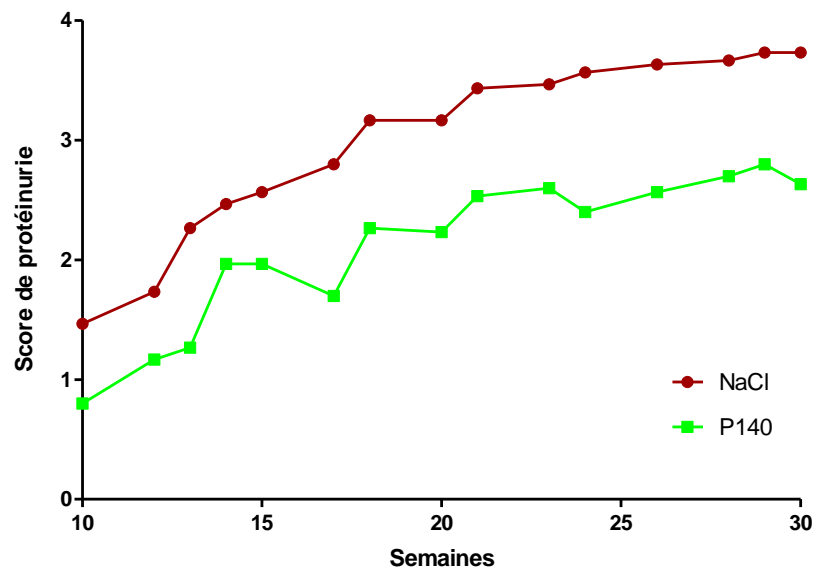
**Tableau 3.1** Test du log-rank/Gehan-Breslow-Wilcoxon

Nous observons une différence significative, avec des p.valeurs < 0.001 (**Tableau 3.1**) entre la courbe de survie des MRL/lpr traitées avec le peptide P140 et la courbe de survie du groupe contrôle, que se soit avec le test du Log-rank qui prend en compte tous les points, ainsi qu'avec le test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Nous pouvons donc confirmer que le peptide P140 permet d'augmenter la durée de vie des souris MRL/lpr.

## Protéinurie

Etudions maintenant l'effet du traitement sur la protéinurie (voir **Figure 3.2.**).



**Figure 3.2.** Courbes d'évolution du score de la protéinurie au cours du temps (résultats GraphPad)

Celle-ci sera évaluée sur une échelle de 0 à 4, 0 étant le score minimum et 4 le maximum. Nous considérons qu'après la mort du sujet son score de protéinurie est au maximum. Nous utilisons une Analyse de la Variance à 2 facteurs et à mesures répétées.

On aura donc le modèle à effets fixes suivant :

$$Y_{isj} = \mu + \alpha_i + \tau_{s(j)} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{isj}$$

$i = 1, \dots, 15$  (le score a été évalué à 15 temps différents entre 9 et 30 semaines)

$j = 1, 2$  (deux traitements)

$s = 1, \dots, 30$  (30 sujets)

$\alpha_i$  représente l'effet fixe du temps  $i$

$\beta_j$  représente l'effet fixe du traitement  $j$ , NaCl ou P140

$\tau_{s(j)}$  représente le sujet  $s$  à qui le traitement  $j$  a été administré

Avec les contraintes supplémentaires,

$$\sum_{i=1}^{15} \alpha_i = 0, \sum_{j=1}^2 \beta_j = 0, \sum_{i=1}^{15} (\alpha\beta)_{ij} = 0, \sum_{j=1}^2 (\alpha\beta)_{ij} = 0, \text{ pour tous } i, j.$$

Nous admettons que les effets  $\tau_{s(j)}$  sont distribués suivant une loi normale centrée de variance  $\sigma_{\tau|\alpha}^2$ .

Après vérification des conditions fondamentales de l'ANOVA (**Figure 3.3. et 3.4.**),

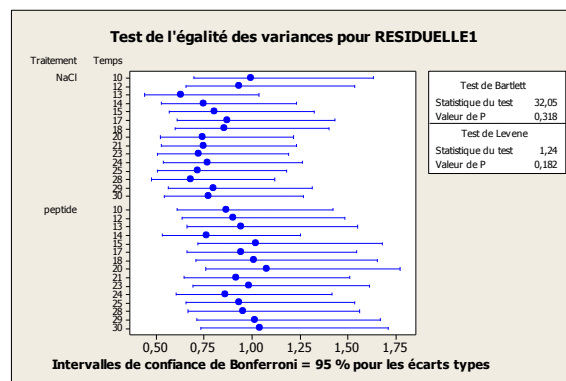


Figure 3.3. Test d'égalité des variances des résidus (MINITAB)

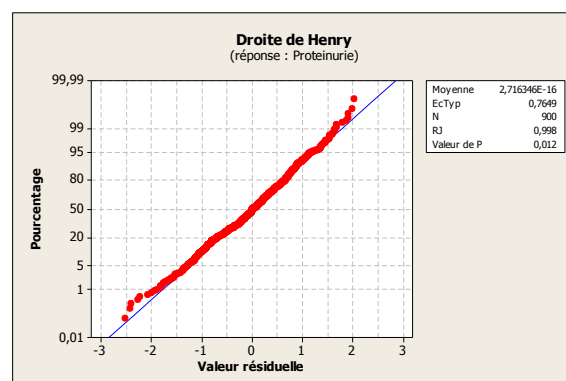


Figure 3.4. Droite de Henry, Test de Normalité des données (MINITAB)

nous obtenons les résultats suivant :

### Sortie GraphPad

Two-way ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	0,61	0,4442	ns	No
Temps	25,78	P<0.0001	***	Yes
Traitement	<b>11,84</b>	<b>P &lt; 0.0001</b>	<b>***</b>	<b>Yes</b>
Subjects (matching)	26,3854	P<0.0001	***	Yes
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	14	9,129	0,6521	1,007
Temps	14	383,4	27,38	42,27
Traitement	1	176,0	176,0	26,02
Subjects (matching)	58	392,3	6,764	10,44
Residual	812	526,0	0,6478	

**Tableau 3.2** ANOVA 2 facteurs, mesures répétées

Nous remarquons un effet significatif du temps, une p.valeur<0.0001 (**Tableau 3.2**), due à l'augmentation de la protéinurie au cours du temps c'est-à-dire durant l'évolution de la maladie. De plus, il est vérifié que le traitement à un effet significatif sur la protéinurie, on voit en effet que la courbe du NaCl seul est bien au dessus de la courbe du peptide P140.

## Dermatites

Enfin analysons les courbes de l'évolution du score des dermatites au cours du temps (**Figure 3.5.**).

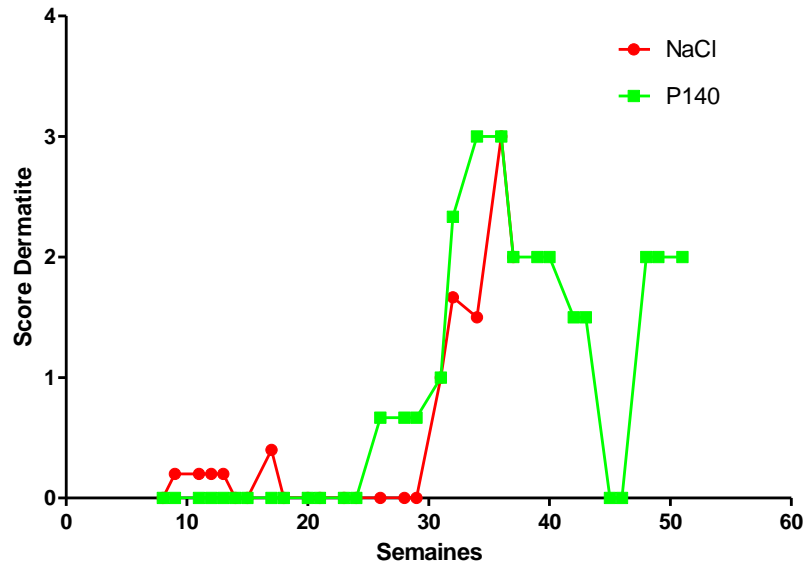


Figure 3.5. Courbes d'évolution du score de dermatite au cours du temps (GraphPad)

De la même façon que pour le score de protéinurie, le score des dermatites sera évalué sur une échelle allant de 0 à 4 avec 4 le stade le plus élevé et 0 l'absence de dermatites. Une souris même malade n'est pas forcément sujette à l'apparition de dermatites. Dans notre étude seules 5 souris MRL/lpr sur les 30 (17%) du groupe NaCl sont touchées et à peine 3 (10%) dans le groupe P140. De plus, nous remarquons sur le graphique que l'évolution des dermatites n'est pas forcément monotone au contraire pour la souris traitée avec le peptide P140, on aurait tendance à remarquer une baisse après quelques semaines.

Etudier statistiquement l'effet du peptide sur les dermatites n'aurait pas grand intérêt ici, ce qui nous intéresse essentiellement est l'allure des courbes en elle-même.

### Conclusion :

Le peptide P140 permet un allongement de la durée de vie des souris MRL/lpr ainsi qu'une baisse significative de la protéinurie par rapport au groupe contrôle.

L'effet du peptide sur les dermatites est plutôt nuancé, on aurait tendance à remarquer une baisse des dermatites environ 35 semaines après le début de l'étude, mais vu le nombre très limité de souris atteintes par ce symptôme il est difficile de conclure à un effet du peptide.

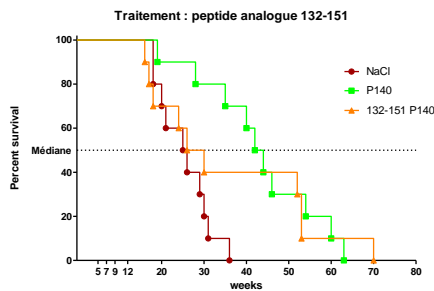
Une nouvelle question se pose alors, l'un des analogues de ce peptide P140 aurait-il un encore meilleur effet ?

## 1.2. Les analogues du P140

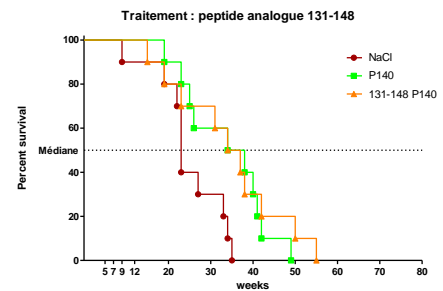
Regardons maintenant les résultats obtenus pour 8 différents analogues du peptide P140. Le but de l'étude sera de voir si l'un des analogues du peptide aurait un meilleur effet que le peptide P140 lui-même. On aura dans chaque groupe n=10 souris. Nous comparons dans le même temps le groupe P140 par rapport au groupe de son analogue, ainsi qu'au groupe contrôle. Les peptides ayant été testés indépendamment les uns des autres, les groupes contrôles ne sont donc pas toujours les mêmes.

### Survie

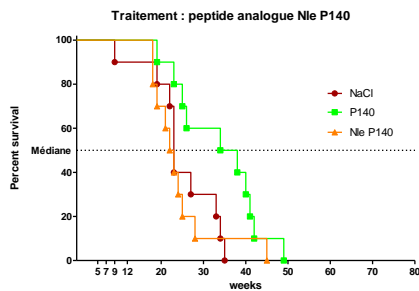
Après avoir testé les effets des différents analogues à l'aide du test du Log-rank pour l'analyse de la survie, nous remarquons qu'un seul des analogues rallonge significativement la durée de vie du modèle murin lupique par rapport au soluté seul : le peptide 131-148 (Figure 3.6.).



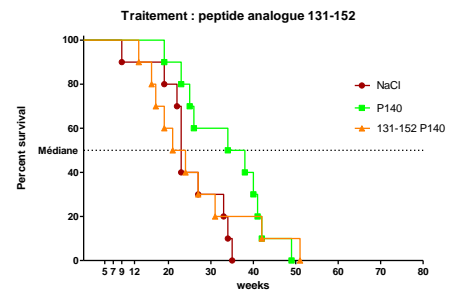
La médiane de survie est de 25.5 semaines pour le groupe NaCl, de 43 semaines pour le groupe P140 et de 28 semaines pour le groupe 132-151.



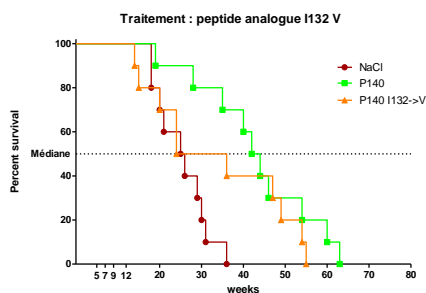
Médiane NaCl : 23 semaines  
Médiane P140 : 36 semaines  
Médiane 131-148 : 35.5 semaines



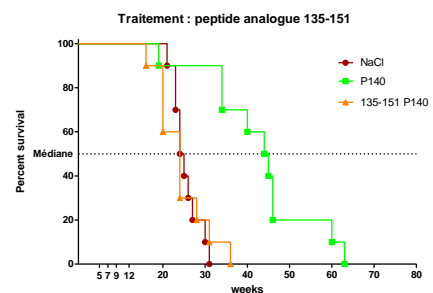
Médiane NaCl : 23 semaines  
Médiane P140 : 36 semaines  
Médiane Nle P140 : 22.5 semaines



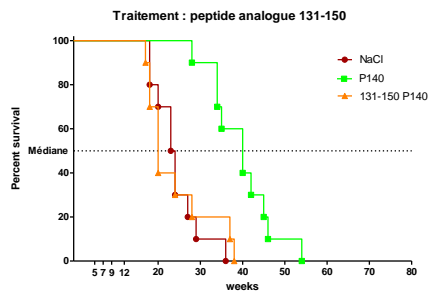
Médiane NaCl : 23 semaines  
Médiane P140 : 36 semaines  
Médiane 131-152 : 22.5 semaines



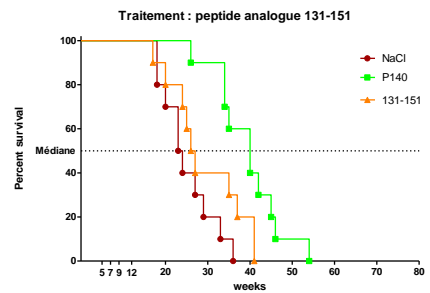
Médiane NaCl : 25.5 semaines  
Médiane P140 : 43 semaines  
Médiane I132 V : 30 semaines



Médiane NaCl : 24.5 semaines  
Médiane P140 : 44.5 semaines  
Médiane 135-151 : 24 semaines



Médiane NaCl 23.5 semaines  
 Médiane P140 : 40 semaines  
 Médiane 131-150 : 20 semaines



Médiane NaCl : 23.5 semaines  
 Médiane P140 : 40 semaines  
 Médiane 131-151 : 26.5 semaines

Figure 3.6. Courbes de survie (résultats GraphPad)

Par contre, en le comparant au peptide P140 lui-même aucun effet statistiquement significatif n'a été démontré.

	P.value (comparé au NaCl 9‰)	P.value (comparé au P140)
132-151	0.1601	0.6710
131-148	0.0238	0.5967
NIe P140	0.7074	0.0661
131-152	0.7850	0.4923
I132 V	0.1163	0.2913
135-151	0.9430	0.0003
131-150	0.7626	0.0006
131-151	0.1317	0.0213

Tableau 3.3 Test Log-rank

- Effet significatif du peptide 131-148 par rapport au NaCl 9‰
- Effet significatif du P140 par rapport à son analogue.

## Protéinurie

Nous testons ensuite si l'un des analogues a un effet significatif sur le taux de protéinurie de la souris MRL/lpr (Figure 3.7.).

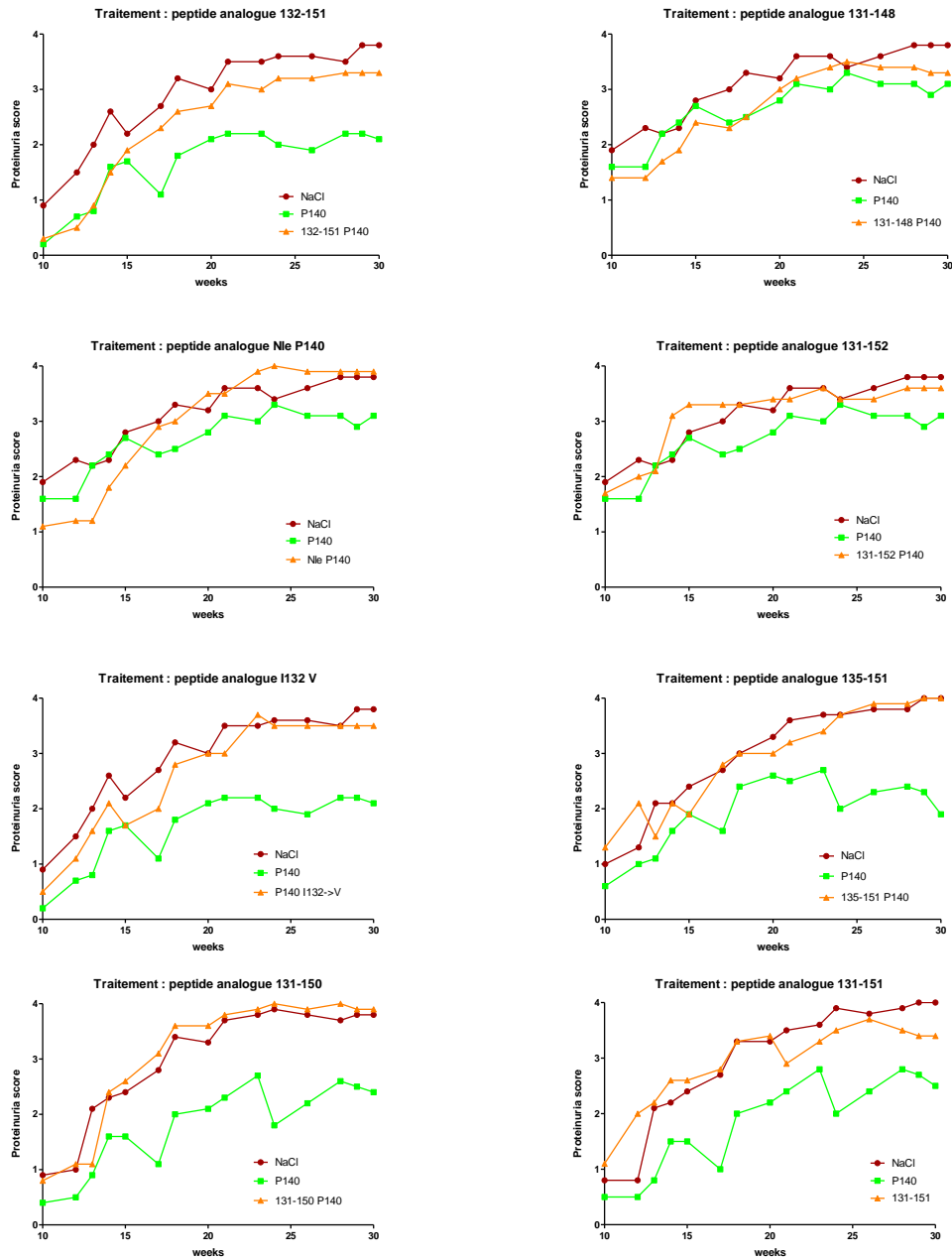


Figure 3.7. Courbes Protéinurie (résultats GraphPad)

Nous remarquons, grâce à un ANOVA 2 facteurs à mesures répétées et après avoir vérifié les 3 conditions fondamentales, qu'aucun d'entre eux n'agit significativement sur ce taux.



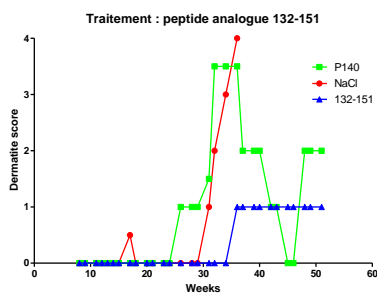
	P.value (comparé au NaCl 9%)	P.value (comparé au P140)
132-151	0.0902	0.0914
131-148	0.1246	0.9447
Nle P140	0.4804	0.3177
131-152	0.9633	0.1375
I132 V	0.3079	0.0175
135-151	0.8288	0.0026
131-150	0.7121	0.0001
131-151	0.8363	0.0013

Tableau 3.4. ANOVA 2 facteurs mesures répétées / Effet du peptide analogue

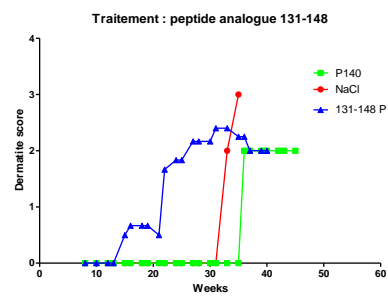
  Effet significatif du P140 par rapport à son analogue.

### Dermatite

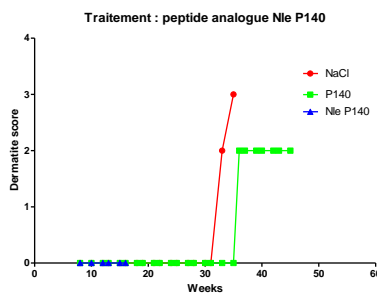
Pour finir avec les analogues du P140, il est difficile de comparer les effets des différents analogues sur les dermatites étant donné que seuls quelques souris développent ce symptôme voir pour certains peptides aucune souris (**Figure 3.8.**).



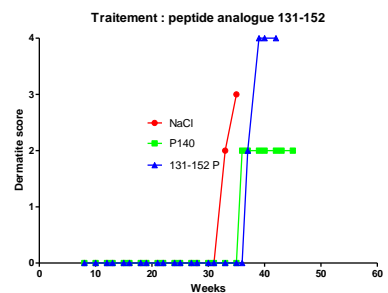
Nombre de souris avec des Dermatites :  
NaCl n=2, P140 n=2, 132-151 n=1



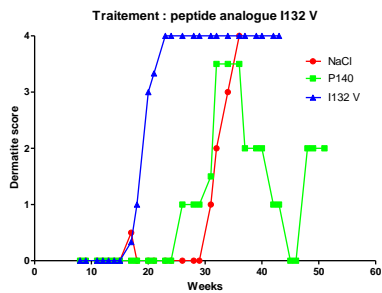
NaCl n=1, P140 n=1, 131-148 n=6



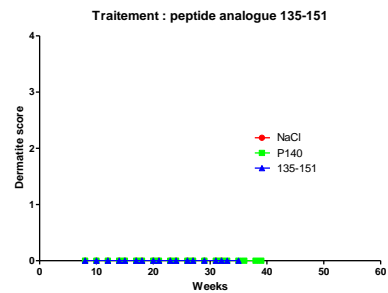
NaCl n=1, P140 n=1, Nle P140 n=0



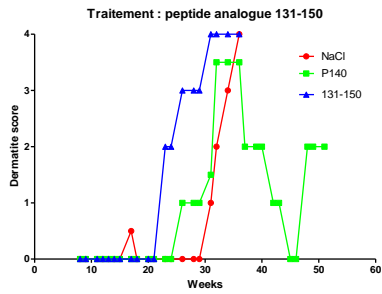
NaCl n=1, P140 n=1, 131-152 n=1



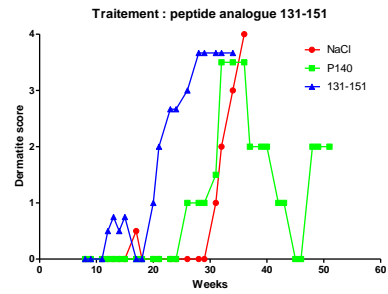
NaCl n=2, P140 n=2, I132 V n=3



NaCl n=0, P140 n=0, 135-151 n=0



NaCl n=2, P140 n=2, 131-150 n=1



NaCl n=2, P140 n=2, 131-151 n=4

**Figure 3.8.** Courbes Dermatites (résultats GraphPad)

Nous remarquons que le groupe contrôle subit une augmentation constante du score de dermatites aux environs de 30 semaines. Les effets du P140 sur les dermatites sont assez variables, on peut remarquer une baisse lors de certaines thérapies ou alors une augmentation puis un score de dermatites s'équilibrant autour de 2. Enfin, pour les analogues du peptide P140, nous remarquons une légère baisse uniquement avec le peptide 131-148.

### Conclusion :

L'effet du peptide P140 reste donc le meilleur comparé aux effets des différents analogues sur la survie ou la protéinurie. On remarque cependant que l'analogue 131-148 a un effet significatif sur la survie par rapport au NaCl 9%, mais pas par rapport au P140. De plus, on remarque que ce même peptide 131-148 a tendance à influencer sur les dermatites.

L'efficacité du traitement ayant été prouvée sur le modèle murin lupique, le peptide P140 va maintenant passé en phase I de l'essai clinique, il sera alors testé sur des participants sains avant de continuer en phase II sur des patients atteints du Lupus.

## 2. La phase IIa

La phase II est réalisée sur des patients atteints du Lupus. Cette phase nous permet d'estimer l'efficacité du traitement sur un petit groupe de malades. Notre étude est composée de 20 personnes (18 femmes et 2 hommes). Nous testons ici l'action de deux doses du peptide (200 µg et 1000 µg) sur la baisse des anti. dsDNA ainsi que sur l'évolution score du SLEDAI.

Pour chaque analyse réalisée dans cette partie 2. nous avons vérifié la normalité des données ainsi que l'égalité des variances. Les résultats sont donnés en **Annexe**.

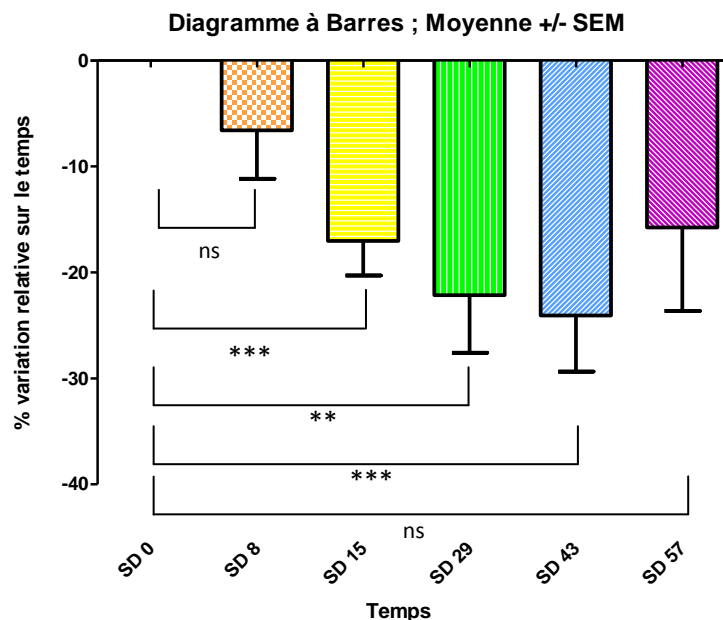
### 2.1. Les anti. dsDNA

#### *Effet du P140 à 200 µg temps par temps*

Ce qui nous intéresse dans un premier temps est de savoir après et pendant combien de jours le peptide a un effet significatif. Les résultats aux différents temps sont donc calculés et comparés par rapport au temps 0.

Après avoir vérifié la normalité des données, l'égalité des variances et supposé l'indépendance des patients d'après le protocole, on obtient les résultats suivants grâce à un test de Student pour données appariées. Nous remarquerons que les valeurs au temps 0 sont imposées à 0% de variation vu qu'au moment de l'injection aucune variation ne peut être détectée, ce qui entraîne une variabilité nulle des données pour ce temps.

Commençons par les résultats de la dose 200 µg (**Figure 3.9**).



**Figure 3.9** Evolution du pourcentage de baisse d'anti dsDNA au cours du temps pour les patients traités avec 200 µg de peptide par rapport au temps 0. SEM : Standard Error of mean

## Sortie GraphPad, pour 200 µg

Table Analyzed	Anti. ds DNA 200 g / au temps 0				
Column A	SD 0	SD 0	SD 0	SD 0	SD 0
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	SD 8	SD 15	SD 29	SD 43	SD 57
Paired t test					
P value	0,1823	0,0006	0,0028	P<0.0001	0,0767
P value summary	ns	***	**	***	ns
Are means signif. different? (P <0.05)	No	Yes	Yes	Yes	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1.445 df=9	t=5.210 df=9	t=4.070 df=9	t=8.269 df=8	t=1.999 df=9
Number of pairs	10	10	10	9	10

**Tableau 3.6.** Paired t test

Nous remarquons donc qu'au seuil de 5%, il y a un effet significatif du P140 à 200 µg après 15 jours et jusqu'à 43 jours après la première injection, des p.valeurs < 0.05 (**Tableau 3.6**) Nous pourrions donc penser qu'une réinjection du peptide sera nécessaire à ce moment là.

### *Effet du P140 à 1000 µg temps par temps*

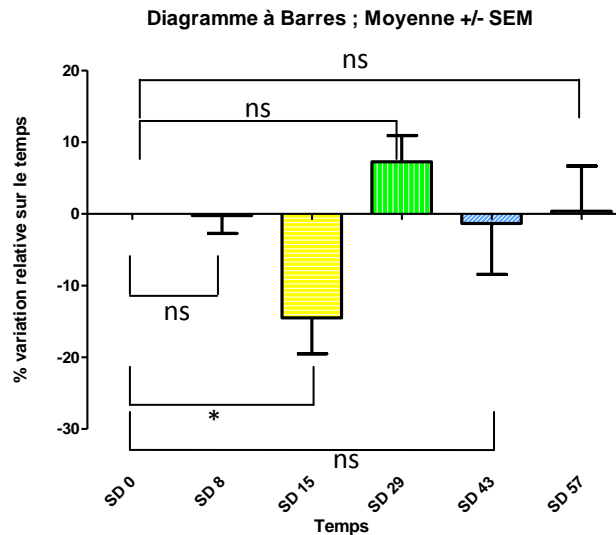
Comme nous l'avions précisé dans la partie II.2.4, nous utilisons systématiquement le test de DIXON pour l'exclusion des valeurs aberrantes. Or, dans ce groupe 1000µg, nous avons décidé d'exclure une valeur du groupe SD29 relevée comme aberrante par ce test :

n = 8 à 10					
n = 8	n = 9	n = 10			
8	9	22,24541	A. La plus petite valeur est-elle hors norme ?		
7	8	19,72112	n = 8	NON	
6	7	13,84196	n = 9	NON	
5	6	10,91703	n = 10	OUI	
4	5	9,969789			
3	4	5,463347			
2	3	-1,768607	B. La plus grande valeur est-elle hors norme ?		
1	2	-5,685619	n = 8	NON	
	1	-9,45083	n = 9	NON	
		-42,19198	n = 10	NON	

**Tableau 3.7.** Test de Dixon

Nous remarquons donc que la plus petite valeur du groupe 29 jours est une valeur non représentative de l'échantillon (**Tableau 3.7**), nous allons donc la tronquer.

Les résultats du peptide dosé à 1000 µg sont les suivants (**Figure 3.10**)



**Figure 3.10** Evolution du pourcentage de baisse d'anti dsDNA au cours du temps pour les patients traités avec 1000 µg de peptide

Sortie GraphPad, pour 1000 µg

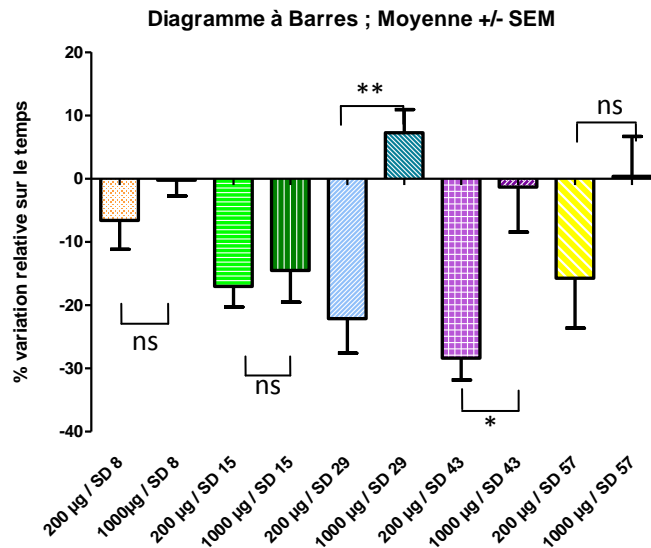
Table Analyzed	Anti. ds DNA 1000 µg / au temps 0				
Column A	SD 0	SD 0	SD 0	SD 0	SD 0
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	SD 8	SD 15	SD 29	SD 43	SD 57
Paired t test					
P value	0,9254	0,0176	0,0844	0,8553	0,9542
P value summary	ns	*	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	Yes	No	No	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=0.09624 df=9	t=2.900 df=9	t=1.970 df=8	t=0.1876 df=9	t=0.05904 df=9
Number of pairs	10	10	9	10	10

**Tableau 3.8.** Paired t test

Pour les patients traités à 1000 µg on voit un effet significatif uniquement 15 jours après la première injection, p.valeur=0.0176.

*Effet du P140 à 2 doses différentes temps par temps*

Ensuite, observons temps par temps s'il y a une différence significative entre les deux doses injectées, grâce à un test de Student et non un test de Student apparié du fait que les patients traités ne sont pas les mêmes pour les doses 200 µg et 1000 µg. (**Figure 3.11**)



**Figure 3.11** Comparaison du pourcentage de baisse d’anti dsDNA au cours du temps en fonction de la dose de peptide Injectée

Sortie GraphPad, comparaison 200 µg / 1000 µg temps par temps

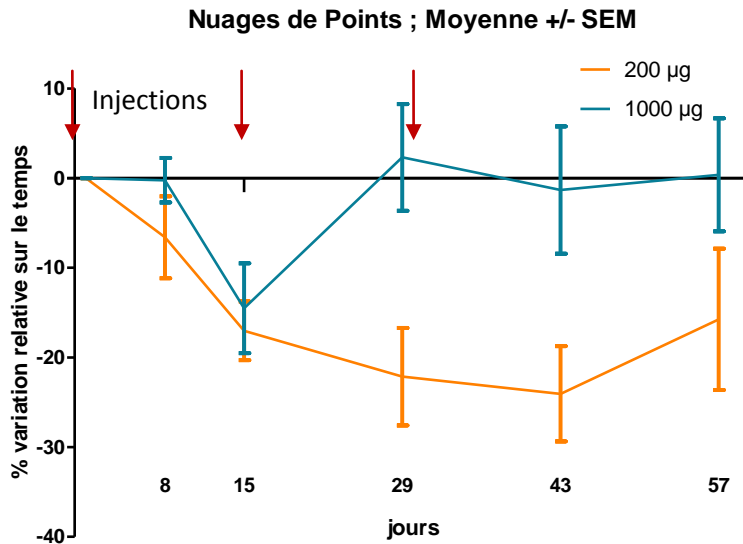
Table Analyzed	Anti. ds DNA pt/pt 200 g / 1000 g				
Column A	200 g / SD 8	200 g / SD 15	200 g / SD 29	200 g / SD 43	200 g / SD 57
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column B	1000g / SD 8	1000 g / SD 15	1000 g / SD 29	1000 g / SD 43	1000 g / SD 57
Unpaired t test					
P value	0,2369	0,6784	0,0071	0,0196	0,1276
P value summary	ns	ns	**	*	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	No	Yes	Yes	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1223 df=18	t=0.4215 df=18	t=3.035 df=18	t=2.562 df=18	t=1597 df=18

**Tableau 3.9.** Unpaired t test

Avec des p.valeurs égales à 0.0071 pour le temps 29 et 0.0196 pour le temps 43 (**Tableau 3.9**), nous remarquons que ce sont les deux seuls temps où une différence significative entre les deux doses administrées est décelée.

### *Comparaison de l’effet du P140 à 2 doses différentes*

Enfin, regardons si le peptide injecté à la dose de 200 µg a un meilleur effet que le peptide injecté à la dose de 1000 µg. (**Figure 3.12**)



**Figure 3.12** Courbes pourcentage de baisse des anti. dsDNA

Pour cela nous utilisons à nouveau une ANOVA 2 facteurs à mesures répétées. Nous aurons donc le modèle à effets fixes suivant :

$$Y_{isj} = \mu + \alpha_i + \tau_{s(j)} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{isj}$$

$i = 1, \dots, 5$  (le score a été évalué à 5 temps différents 8, 15, 29, 43 et 57 semaines)

$j = 1, 2$  (1=dose 200 µg, 2=dose 1000 µg)

$s = 1, \dots, 10$  (10 sujets)

$\alpha_i$  représente l'effet fixe du temps  $i$

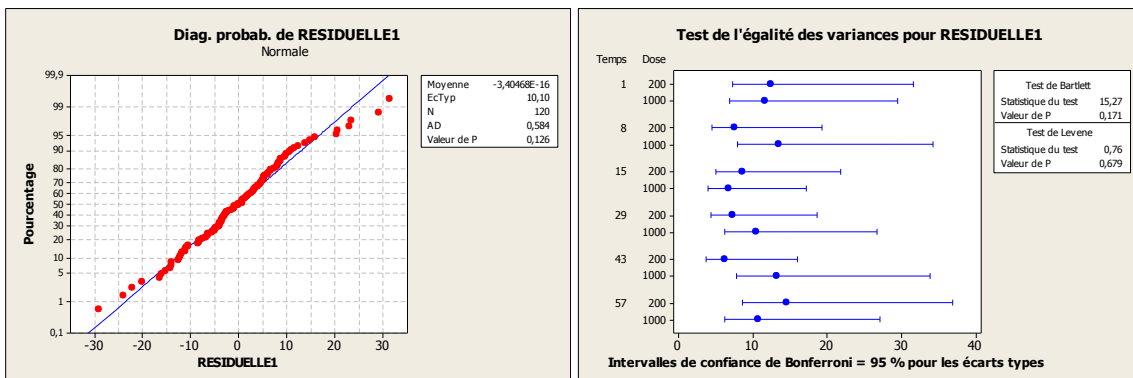
$\beta_j$  représente l'effet fixe de la dose  $j$

$\tau_{s(j)}$  représente le sujet à qui la dose  $j$  a été administrée

Avec les contraintes supplémentaires,

$\sum_{i=1}^5 \alpha_i = 0, \sum_{j=1}^2 \beta_j = 0, \sum_{i=1}^5 (\alpha\beta)_{ij} = 0, \sum_{j=1}^2 (\alpha\beta)_{ij} = 0$ , pour tous  $i, j$ .

Les conditions d'application de l'ANOVA sont vérifiées (**Figure 3.13**)



**Figure 3.13** Normalité des résidus, égalité des variances

Nous admettons que les effets  $\tau_{s(j)}$  sont distribués suivant une loi normale centrée de variance  $\sigma_{\tau|\alpha}^2$ .

Les résultats observés sont donc les suivants :

#### Sortie GraphPad

Table Analyzed	Anti. dsDNA %variation relative sur le temps			
Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	7,22	<b>0,0021</b>	**	Yes
Time	8,93	<b>0,0004</b>	***	Yes
Dose	11,35	<b>0,0381</b>	*	Yes
Subjects (matching)	40,7623	<b>P &lt; 0.0001</b>	***	Yes
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	5	2763	552,6	4,096
Time	5	3415	683,0	5,062
Dose	1	4341	4341	5,011
Subjects (matching)	18	15590	866,3	6,421
Residual	90	12140	134,9	

**Tableau 3.10.** ANOVA 2 facteurs à mesures répétées

Nous pouvons donc dire qu'au seuil  $\alpha = 5\%$  il y a un effet significatif du facteur fixe Dose p.valeur=0.0381, ainsi que du facteur Temps p.valeur=0.0004 dut à l'évolution des anti. dsDNA au cours du temps. De plus, nous remarquons un effet de l'interaction des deux facteurs p.valeur=0.0021, ce qui nous informe sur le fait qu'il y a une évolution des anti. dsDNA en fonction du temps et de la dose de peptide injectée. Enfin l'effet du facteur aléatoire Sujet ne nous intéresse pas dans notre étude.

#### Conclusion :

Pour les anti. dsDNA nous avons 50% des patients traités avec 200  $\mu\text{g}$  de peptide qui sont répondeurs au traitement contre seulement 10% pour les patients traités avec 1000  $\mu\text{g}$  de peptide. Nous appelons patient répondeur, un patient dont le taux d'anti. dsDNA a baissé d'au moins 20% après les 57 jours d'étude.

Au final, nous pouvons donc conclure que le peptide P140 à 200  $\mu\text{g}$  a un meilleur effet que le peptide à 1000  $\mu\text{g}$  sur le taux d'anti. dsDNA des malades.

De plus, on remarque que le peptide 200  $\mu\text{g}$  a un effet 15 jours après la première injection et jusqu'à 43 jours. Sachant que la dernière injection est à 30 jours, nous pouvons donc supposer qu'il sera peut-être nécessaire de renouveler l'injection.



## 2.2. Le score du SLEDAI

### Effet du P140 à 200 µg temps par temps

Etudions maintenant si le peptide P140 a un effet sur l'intensité de la maladie c'est-à-dire sur le score du SLEDAI. (Figure 3.14)

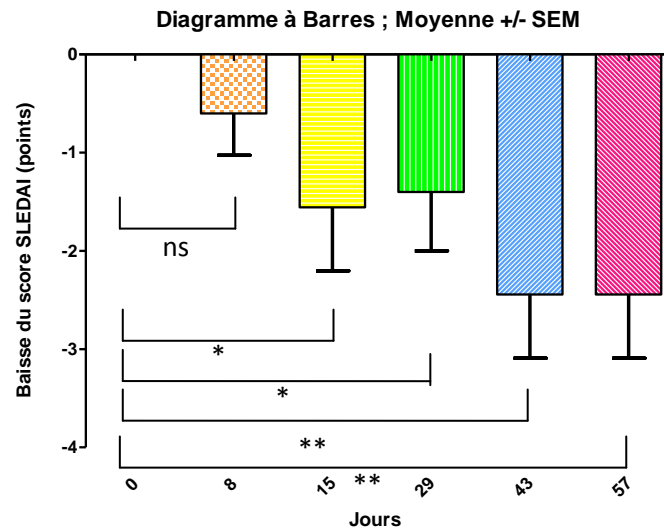


Figure 3.14 Evolution de la baisse du score du SLEDAI au cours du temps pour les patients traités avec 200 µg de peptide

### Sortie GraphPad, P140 dosé à 200 µg

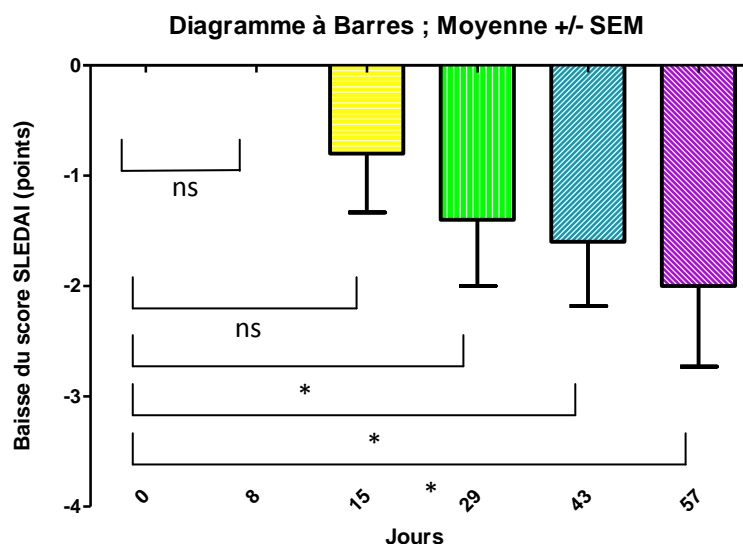
Table Analyzed	SLEDAI baisse de pts 200 g				
Column A	0	0	0	0	0
vs	vs	vs	vs	vs	vs
Column C	8	15	29	43	57
Paired t test					
P value	0,1934	0,0431	0,0445	0,0054	0,0054
P value summary	ns	*	*	**	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	No	Yes	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df	t=1406 df=9	t=2.401 df=8	t=2.333 df=9	t=3.773 df=8	t=3.773 df=8
Number of pairs	10	9	10	9	9

Tableau 3.12. Paired t test

Nous observons donc un effet significatif du peptide P140, dosé à 200 µg, sur l'intensité de la maladie 15 jours après la première injection, p.valeur=0.0431, l'effet dure ensuite tout le long de l'étude, c'est-à-dire jusqu'au 57<sup>ième</sup> jour, p.valeur=0.0054.

### Effet du P140 à 1000 µg temps par temps

Regardons ensuite les résultats obtenus avec le peptide dosé à 1000 µg (Figure 3.15).



**Figure 3.15** Evolution de la baisse du score du SLEDAI au cours du temps pour les patients traités avec 1000 µg de peptide

Nous effectuons un test de Student pour données appariées qui nous permet de comparer les données à chaque temps par rapport au temps 0 qui est notre temps contrôle.

Sortie GraphPad, P140 dosé à 1000 µg

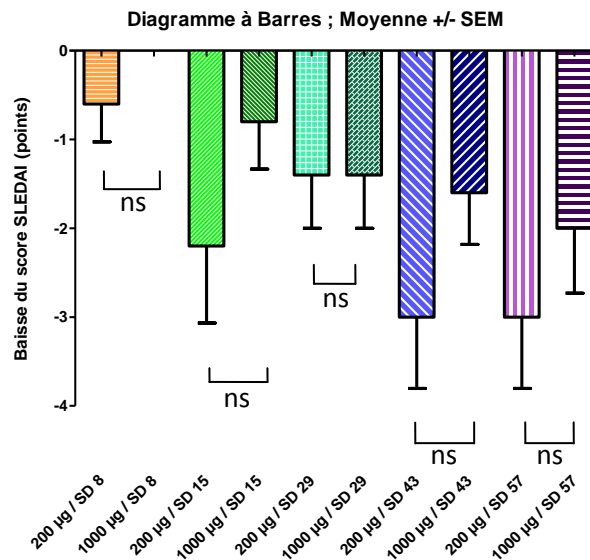
Table Analyzed	SLEDAI baisse de pts 1000 g				
Column A		0	0	0	0
vs		vs	vs	vs	vs
Column C		15	29	43	57
Paired t test					
P value		0,1679	0,0445	0,0224	0,0229
P value summary		ns	*	*	*
Are means signif. different? (P < 0.05)		No	Yes	Yes	Yes
One- or two-tailed P value?		Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df		t=1.500 df=9	t=2.333 df=9	t=2.753 df=9	t=2.739 df=9
Number of pairs		10	10	10	10

**Tableau 3.13.** Paired t test

Le score du SLEDAI des patients traités par 1000 µg de peptide baisse significativement après 29 jours, p.valeur=0.0445 et jusqu'à la fin de l'étude.

### Effet du P140 à 2 doses différentes temps par temps

Comparons alors les résultats des deux doses grâce à un test de Student pour données non appariées, pour observer si la dose 200 µg ou 1000 µg a un meilleur effet ou non par rapport à l'autre (**Figure 3.16**).



**Figure 3.16** Comparaison de la baisse du score du SLEDAI au cours du temps en fonction de la dose de peptide injectée

### Sortie GraphPad, comparaison 200 µg/1000 µg temps par temps

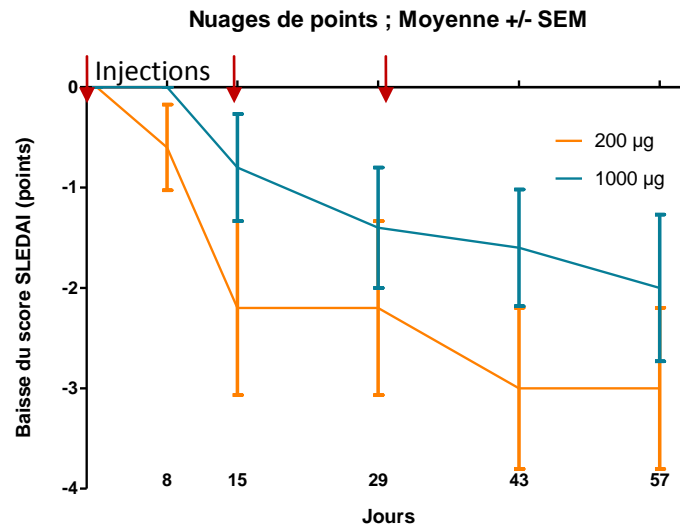
Table Analyzed	SLEDAI baisse de pts 200 g / 1000 g				
Column C		200 g / SD 15	200 g / SD 29	200 g / SD 43	200 g / SD 57
vs		vs	vs	vs	vs
Column D		1000 g / SD 15	1000 g / SD 29	1000 g / SD 43	1000 g / SD 57
Unpaired t test					
P value		0,1858	1,0000	0,1748	0,3690
P value summary		ns	ns	ns	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)		No	No	No	No
One- or two-tailed P value?		Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed	Two-tailed
t, df		t=-1.376 df=18	t=0.0000 df=18	t=1.413 df=18	t=-0.9214 df=18

**Tableau 3.14.** Unpaired t test

Entre 8 et 57 jours après la 1<sup>ère</sup> injection nous ne notons aucune différence significative entre les deux doses de traitement administrées aux souris MRL/lpr, p.valeurs > 0.05. Mais nous aurions tendance à observer de meilleurs résultats sur les patients traités avec 200 µg de peptide.

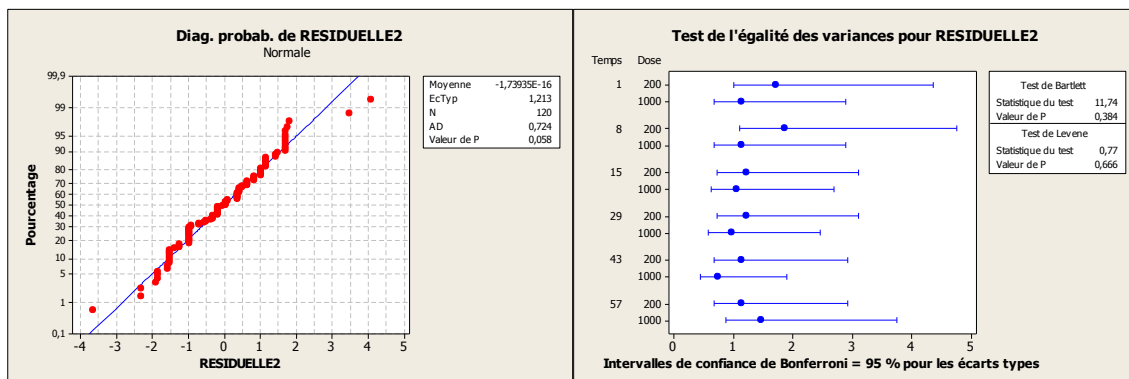
### Comparaison de l'effet du P140 à 2 doses différentes

Pour finir, étudions l'effet de la dose de peptide P140 injectée au patient sur l'intensité de sa maladie c'est-à-dire la baisse du score SLEDAI (**Figure 3.17**).



**Figure 3.17** Courbes de baisse du score de SLEDAI

Pour cela et avec toujours le même modèle de l'ANOVA 2 facteurs à mesures répétées les conditions d'application sont vérifiées (**Figure 3.18**),



**Figure 3.18** Normalité des résidus, égalité des variances

nous obtenons les résultats suivants :

### Sortie GraphPad

Table Analyzed	SLEDAI baisse de pts			
Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?
Interaction	1,31	0,6053	ns	No
Time	19,82	P < 0.0001	***	Yes
Dose	4,17	0,1998	ns	No
Subjects (matching)	42,3323	P < 0.0001	***	Yes
Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
Interaction	5	7,067	1,413	0,7266
Time	5	107,2	21,44	11,02
Dose	1	22,53	22,53	1,772
Subjects (matching)	18	228,9	12,72	6,538
Residual	90	175,1	1,945	

**Tableau 3.15.** ANOVA 2 facteurs à mesures répétées

Nous notons un effet significatif du facteur Sujet p.valeur < 0.0001 ainsi que du facteur Temps p.valeur < 0.0001, par contre l'effet de la Dose n'est pas démontré p.valeur=0.1998. Il n'y a donc pas d'effet significatif entre les deux doses, 200 µg et 1000 µg, sur l'intensité de la maladie.

### Conclusion :

Pour le score du SLEDAI nous avons 60% des patients traités avec 200 µg de peptide qui sont répondeurs au traitement contre seulement 40% pour les patients traités avec 1000 µg de peptide.

Nous appelons patient répondeur, un patient dont le score du SLEDAI a baissé d'au moins 4 points après les 57 jours d'étude. Les deux doses de traitement ont un effet sur l'intensité de la maladie au cours du temps, mais le peptide à 1000 µg a un effet plus tardif que le peptide à 200 µg. Nous ne pouvons pas conclure à une différence significative entre les deux doses pour leur effet sur le score du SLEDAI des patients. Enfin nous observons que la courbe de baisse du score ne cesse de décroître au fil du temps, même après la dernière injection à 30 jours.

### 3. Les « Bio essais »

Le but des « Bio essais » est de pouvoir mettre en place un test biologique permettant la validation des lots de peptide à leur sortie de production. Pour cela il nous faut trouver les conditions optimales de test pour contrôler rapidement ces lots. Ces « Bio essais » sont effectués sur les souris MRL/lpr.

Deux facteurs sont étudiés :

- Le soluté, entre le NaCl 9‰, le Mannitol 5.4% et la Tréhalose 10%. Avec lequel de ces trois soluté le P140 a-t-il le meilleur effet sur la cellularité du modèle murin lupique?
- Le temps. Combien de jours après l'injection (3, 5, 7 ou 10 jours) le peptide a-t-il le meilleur effet sur la cellularité de la MRL/lpr?

Les données récoltées sont donc le nombre de cellules par mL de sang chez la souris MRL/lpr et pour une meilleure visualisation des résultats nous traiterons le pourcentage de baisse de cette cellularité.

Les vérifications des différentes conditions d'utilisation des tests sont en **Annexe**.

#### 3.1. Les Temps

Regardons l'effet du temps sur le peptide mis en solution dans différents solutés.

Comme précisé dans la partie matériel et méthode, les résultats sont exprimés en pourcentage de baisse cellulaire par rapport au contrôle, qui est donc fixé à 0%

##### 3.1.1. Avec le NaCl 9‰

(Figure 3.19)

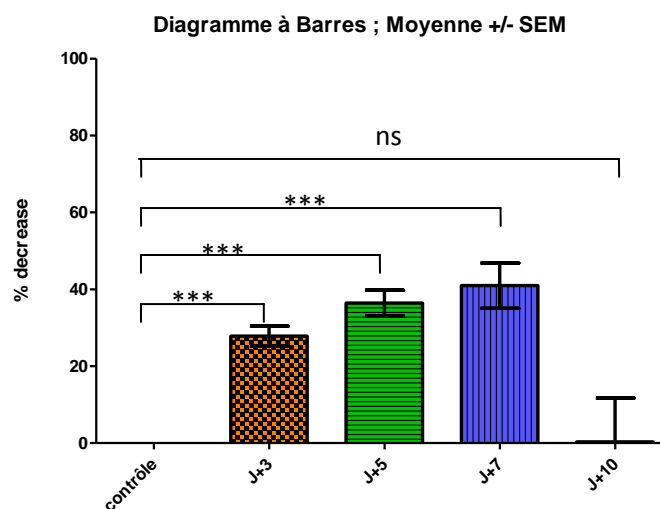
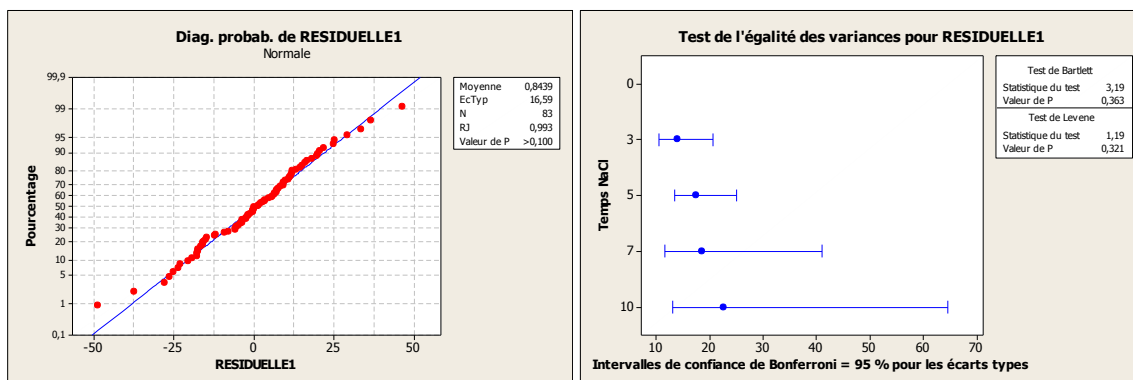


Figure 3.19 Effet du traitement au cours du temps avec le soluté NaCl 9‰

	J+3	J+5	J+7	J+10
Number of values	29	35	10	8

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions sont vérifiées (**Figure 3.20**).



## Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement %decrease NaCl				
One-way analysis of variance					
P value	P < 0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	5				
F	12,84				
R squared	0,3558				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	22310	4	5578		
Residual (within columns)	40390	93	434,3		
Total	62700	97			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
contrôle vs J+3	-29,61	6,051	Yes	***	-48,91 to -10,31
contrôle vs J+5	-36,44	7,613	Yes	***	-55,31 to -17,56
contrôle vs J+7	-40,95	6,607	Yes	***	-65,40 to -16,51
contrôle vs J+10	0,6259	0,1010	No	ns	-23,82 to 25,07
J+3 vs J+5	-6,830	1,863	No	ns	-21,29 to 7,630
J+3 vs J+7	-11,35	2,109	No	ns	-32,57 to 9,874
J+3 vs J+10	30,23	5,618	Yes	**	9,010 to 51,45
J+5 vs J+7	-4,518	0,8550	No	ns	-25,36 to 16,32
J+5 vs J+10	37,06	7,014	Yes	***	16,22 to 57,90
J+7 vs J+10	41,58	6,309	Yes	***	15,59 to 67,57

**Tableau 3.16.** ANOVA 1 facteur

Nous observons donc que le peptide dans le NaCl 9% a un effet significatif par rapport au contrôle uniquement aux temps 3, 5 et 7 (**Tableau 3.16**). De plus, il n'y a pas de différence significative entre les temps 3, 5 et 7. Vu que ces Bio essais sont faits dans le but de trouver

un test rapide pour le contrôle des lots de peptide nous choisirons la plus courte durée entre l'injection et le prélèvement rétro-orbital, c'est-à-dire 3 jours.

### 3.1.2. Avec le Mannitol 5.4%

Nous n'avons pas de données aux temps 7 et 10 pour le Mannitol 5.4% (Figure 3.21).

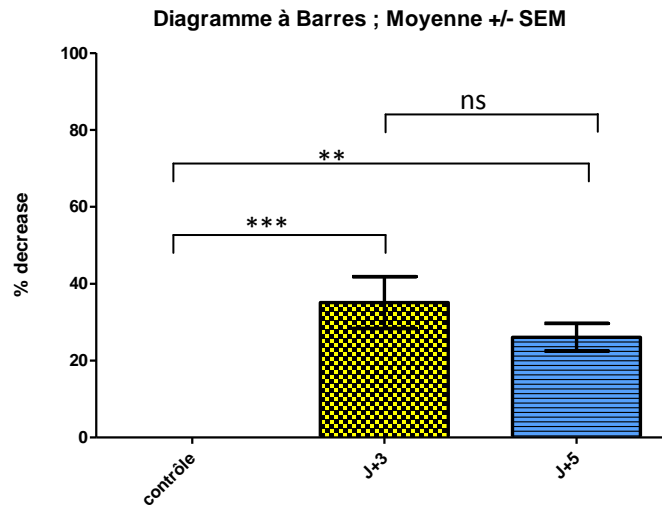


Figure 3.21 Effet du traitement au cours du temps avec le soluté Mannitol 5.4%

	J+3	J+5
Number of values	9	12

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions sont vérifiées (Figure 3.22).

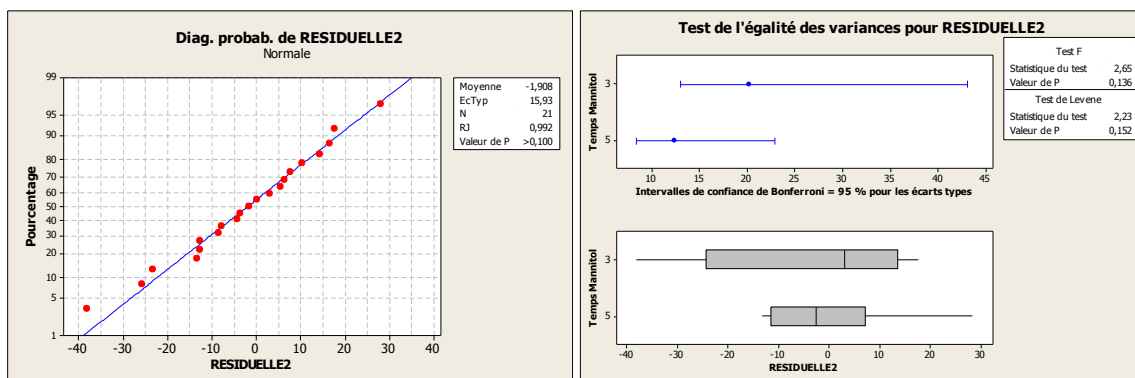


Figure 3.22 Normalité des résidus, égalité des variances, Mannitol 5.4%



## Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement %decrease Mannitol				
One-way analysis of variance					
P value	0,0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	12,89				
R squared	0,5077				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5126	2	2563		
Residual (within columns)	4971	25	198,9		
Total	10100	27			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
contrôle vs J+3	-35,10	6,985	Yes	***	-52.81to -17.39
contrôle vs J+5	-26,07	5,497	Yes	**	-42.78 to -9.357
J+3 vs J+5	9,032	2,054	No	ns	-6.465 to 24.53

**Tableau 3.17.** ANOVA 1 facteur

Aux temps J+3 et J+5, nous remarquons que le groupe Mannitol 5.4% diffère significativement du groupe contrôle, de plus il n'y a pas de différence entre ces deux temps (**Tableau 3.17**).

Sachant que le but de ces manipulations est de trouver les conditions optimales pour pouvoir tester rapidement les lots de peptides nous choisirons plutôt le temps J+3.

### 3.1.3. Avec le Tréhalose 10%

**(Figure 3.23)**

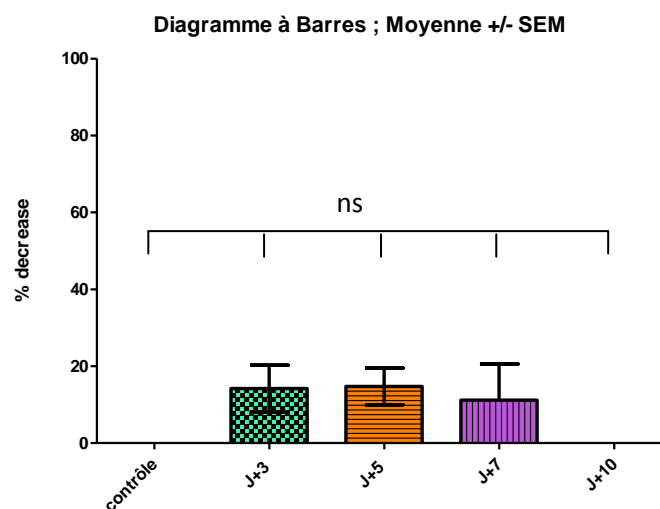


Figure 3.23 Effet du traitement au cours du temps avec le traitement Tréhalose 10%

	J+3	J+5	J+7	J+10
Number of values	14	16	5	5

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions d'application sont vérifiées (Figure 3.24).

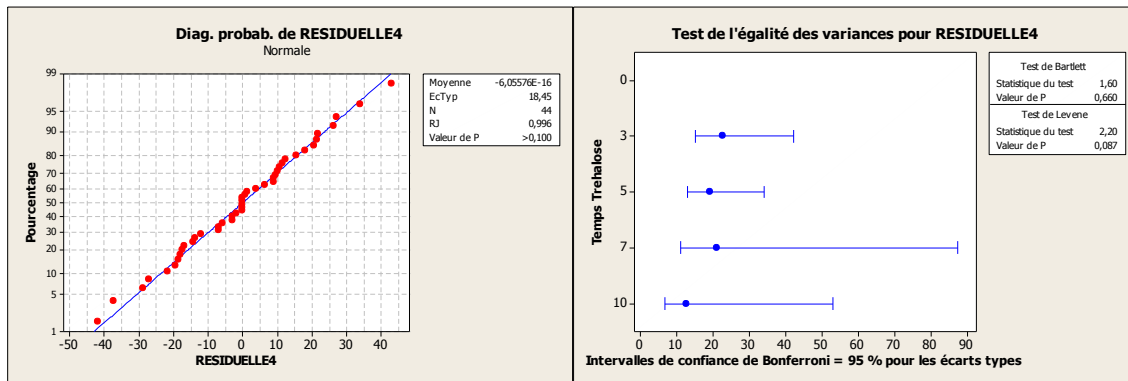


Figure 3.24 Normalité des résidus, Egalité des variances, Tréhalose 10%

### Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement %decrease Trehalose		
One-way analysis of variance			
P value	<b>0,5154</b>		Bartlett's test for equal variances
P value summary	ns		Bartlett's statistic (corrected)
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		P value
Number of groups	4		P value summary
F	0,7755		Do the variances differ signif. (P < 0.05)
R squared	0,06070		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	946,4	3	315,5
Residual (within columns)	14640	36	406,8
Total	15590	39	

Tableau 3.18. ANOVA 1 facteur

Aucune différence significative n'est mise en évidence pour le Tréhalose 10% (Tableau 3.18), ni avec le contrôle ni entre les différents temps. Le Tréhalose 10% n'est donc pas le soluté optimal pour le contrôle des lots.

## Conclusion :

Le but étant de trouver les conditions optimales pour un test rapide de contrôle des lots et après n'avoir observé aucune différence entre les différents temps et le contrôle pour le Tréhalose 10%, ce n'est donc pas ce soluté que nous choisirons. Du moins nous le garderons tout de même dans la suite de nos analyses.

Pour le Mannitol 5.4% et le NaCl 9‰, qui ont tous deux un effet significatif par rapport au groupe contrôle, aucune différence entre les temps 3 et 5 pour le Mannitol 5.4% et 3, 5 et 7 pour le NaCl 9‰, n'a été mise en évidence. Le but des « Bio essais » étant de finaliser un test rapide, la durée la plus courte entre l'injection et le test sera retenue, c'est-à-dire 3 jours.

### 3.2. Les Solutés

Observons maintenant l'effet de chaque soluté en fonction des différents temps. Le groupe contrôle est toujours fixé à 0% de baisse de cellularité.

#### 3.2.1. Pour le temps J+3

(Figure 3.25)

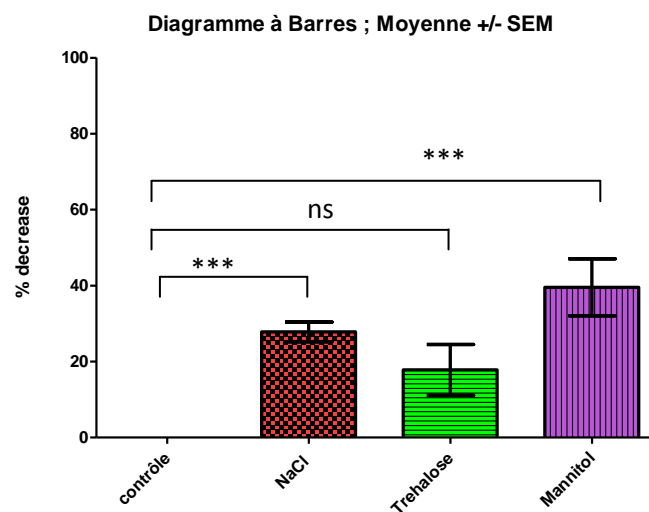


Figure 3.25 Effet du temps J+3 pour les différents solutés

	NaCl	Trehalose	Mannitol
Number of values	29	15	10

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions d'application sont vérifiées (Figure 2.26).

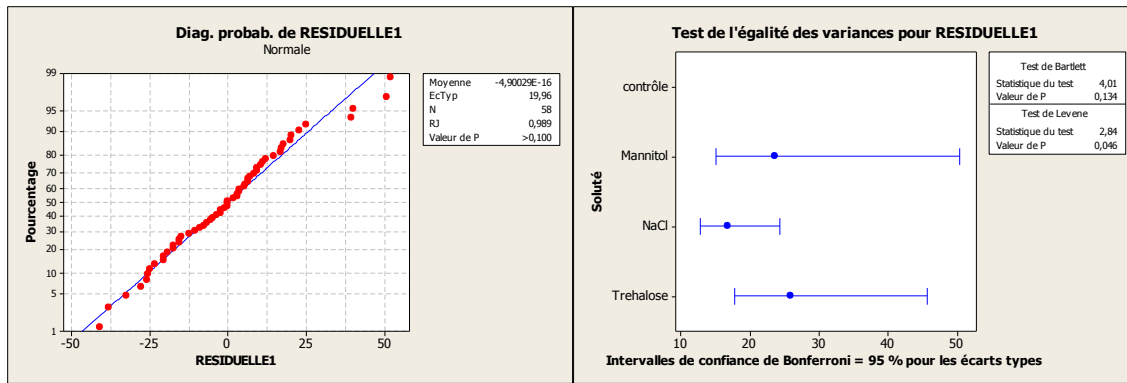


Figure 3.26 Normalité des résidus, Egalité des variances, J+3

### Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement %decrease J+3				
One-way analysis of variance				Bartlett's test for equal variances	
P value	<b>P &lt; 0.0001</b>			Bartlett's statistic (corrected)	
P value summary	***			P value	
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			P value summary	
Number of groups	4			Do the variances differ signif. (P < 0.05)	
F	8,682			No	
R squared	0,2992				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	9698	3	3233		
Residual (within columns)	22710	61	372,3		
Total	32410	64			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
contrôle vs NaCl	-29,61	5,942	<b>Yes</b>	***	-48.22 to -10.99
contrôle vs Trehalose	-17,80	3,195	<b>No</b>	ns	-38.61 to 3.015
contrôle vs Mannitol	-39,55	6,482	<b>Yes</b>	***	-62.35 to -16.76
NaCl vs Trehalose	11,81	2,737	<b>No</b>	ns	-4.311 to 27.93
NaCl vs Mannitol	-9,947	1,997	<b>No</b>	ns	-28.56 to 8.667
Trehalose vs Mannitol	-21,76	3,906	<b>Yes</b>	*	-42.57 to -0.9459

Tableau 3.19. ANOVA 1 facteur

3 jours après l'injection, les groupes NaCl 9‰ et le Mannitol 5.4% ont un effet significatif par rapport au groupe contrôle (Tableau 3.19), nous remarquons de plus une différence significative entre les groupes Mannitol 5.4% et Trehalose 10%.

### 3.2.2. Pour le temps J+5

(Figure 3.27)

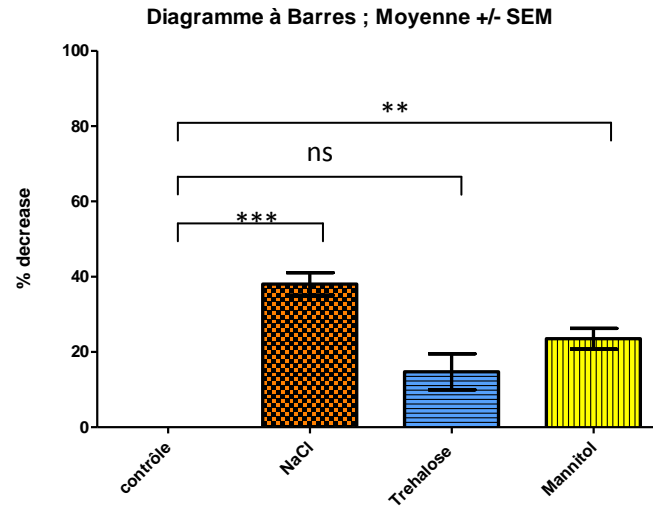


Figure 3.27 Effet du temps J+5 pour les différents solutés

	NaCl	Trehalose	Mannitol
Number of values	34	16	11

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions d'application sont vérifiées (Figure 3.28).

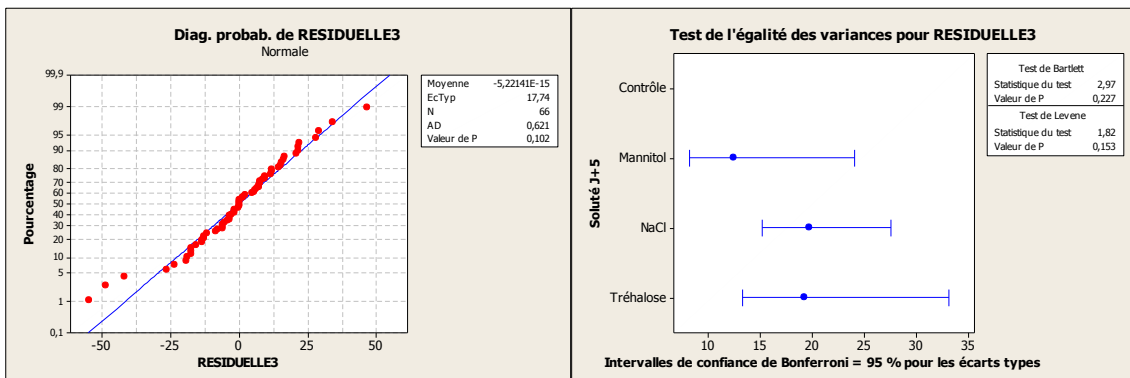


Figure 3.28 Normalité des résidus, Egalité des variances, J+5

## Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement %decrease J+5				
One-way analysis of variance					
P value	P<0.0001				
P value summary	***				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	4				
F	17,45				
R squared	0,4423				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	13100	3	4367		
Residual (within columns)	16520	66	250,2		
Total	29620	69			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
contrôle vs NaCl	-38,04	9,072	Yes	***	-53.69 to -22.39
contrôle vs Trehalose	-14,73	3,160	No	ns	-32.12 to 2.665
contrôle vs Mannitol	-23,50	4,674	Yes	**	-42.26 to -4.739
NaCl vs Trehalose	23,31	6,875	Yes	***	10.66 to 35.97
NaCl vs Mannitol	14,54	3,747	Yes	*	0.06055 to 29.02
Trehalose vs Mannitol	-8,773	2,002	No	ns	-25.12 to 7.577

**Tableau 3.20.** ANOVA 1 facteur

Après 5 jours, nous observons un effet significatif par rapport au groupe contrôle uniquement pour les groupes NaCl 9‰ et Mannitol 5.4% (**Tableau 3.20**). Nous notons de plus que le NaCl 9‰ est significativement meilleur que les deux autres solutés testés.

### 3.2.3. Pour le temps J+7

Remarque : Nous n'avons plus de données pour le Mannitol 5.4% pour les jours 7 et 10.

(Figure 3.29)

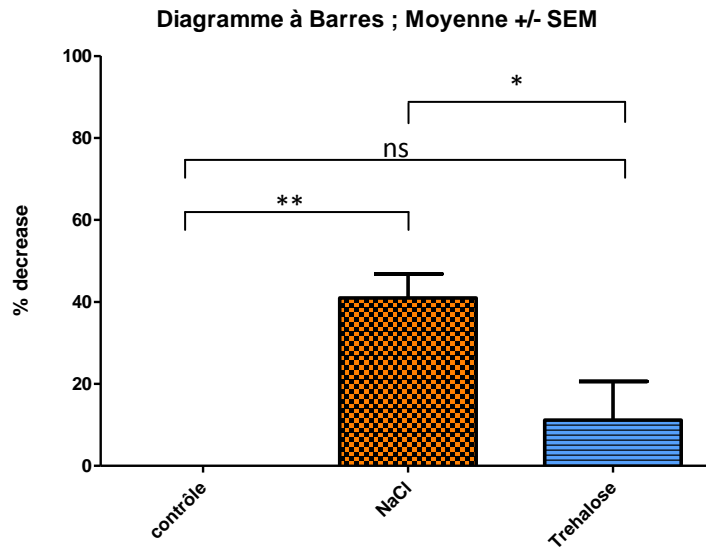


Figure 3.29 Effet du temps J+7 pour les différents solutés

	NaCl	Trehalose
Number of values	10	5

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions sont vérifiées (Figure 3.30).

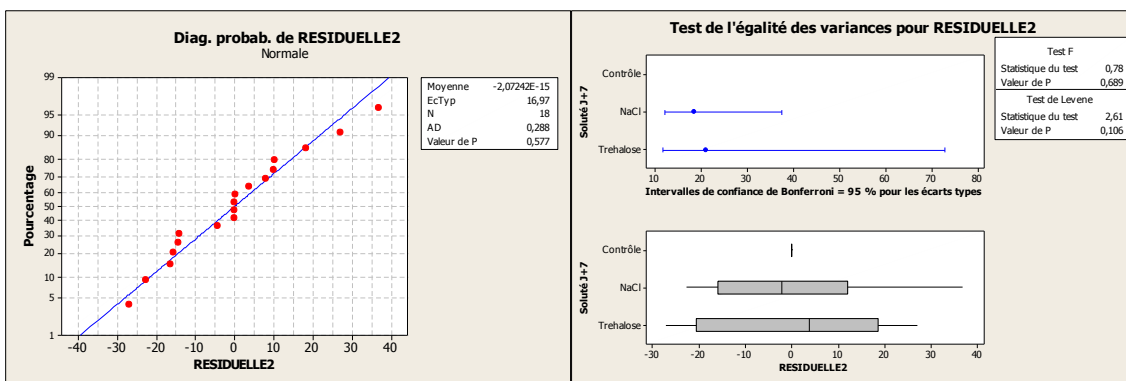


Figure 3.30 Normalité des résidus, Egalité des variances, J+7

## Sortie GraphPad

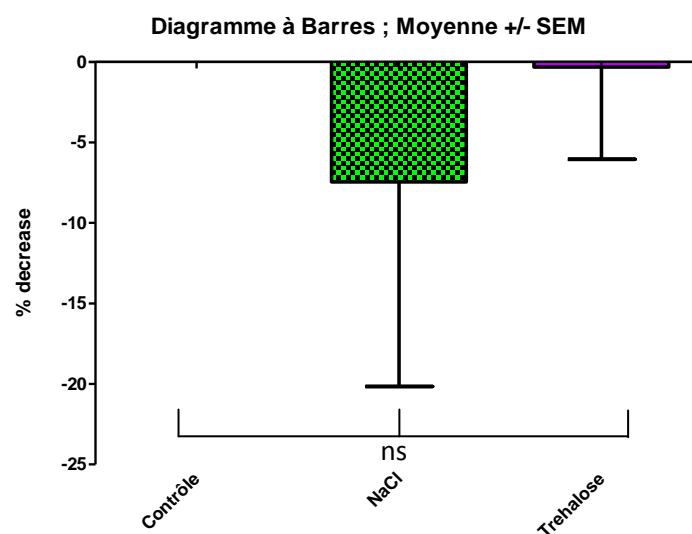
Table Analyzed	Effet du traitement %decrease J+7				
One-way analysis of variance					
P value	<b>0,0039</b>				
P value summary	**				
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes				
Number of groups	3				
F	8,220				
R squared	0,5229				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	5363	2	2682		
Residual (within columns)	4893	15	326,2		
Total	10260	17			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	Significant? P < 0.05?	Summary	95% CI of diff
contrôle vs NaCl	-40,95	4,871	<b>Yes</b>	**	-71.84 to -10.07
contrôle vs Trehalose	-11,17	1,198	<b>No</b>	ns	-45.44 to 23.09
NaCl vs Trehalose	29,78	4,257	<b>Yes</b>	*	4.081 to 55.48

**Tableau 3.21.** ANOVA 1 facteur

Après 7 jours, les souris ayant reçu l'injection du peptide avec le NaCl 9% ont une cellularité qui baisse significativement par rapport au groupe contrôle ainsi que par rapport aux souris du groupe Tréhalose 10% (**Tableau 3.21**).

### 3.2.4. Pour le temps J+10

(Figure 3.31)



**Figure 3.31** Effet du temps J+10 pour les différents solutés



	NaCl	Trehalose
Number of values	9	5

Aux vues du nombre de données la normalité des résidus et l'égalité des variances peuvent être testées. Après l'acceptation de ces deux hypothèses nous pouvons effectuer une analyse de la variance à 1 facteur dont les conditions sont vérifiées (**Figure 3.32**).

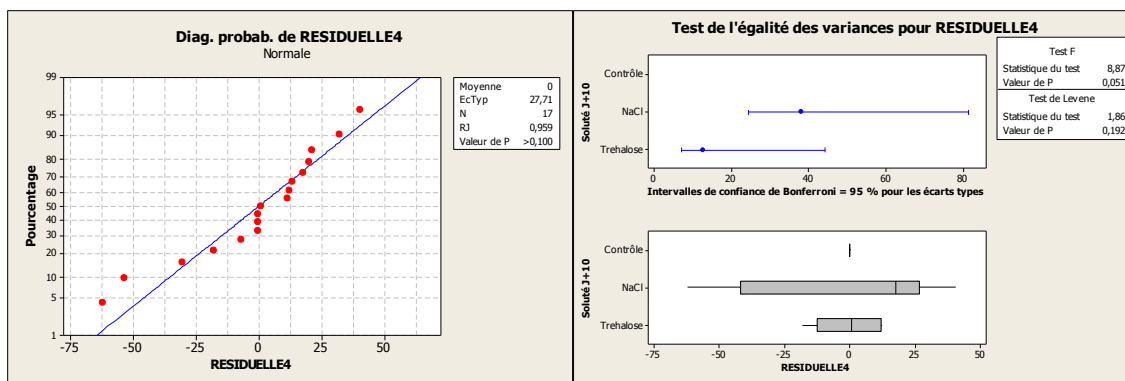


Figure 3.32 Normalité des résidus, Egalité des variances, J+10

### Sortie GraphPad

Table Analyzed	Effet du traitement % decrease J+10		
One-way analysis of variance			
P value	0,8818		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	3		
F	0,1269		
R squared	0,01781		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	222,8	2	111,4
Residual (within columns)	12290	14	877,7
Total	12510	16	

Tableau 3.22. ANOVA 1 facteur

10 jours après l'injection nous ne remarquons aucune différence entre les différents solutés et le contrôle (**Tableau 3.22**). Nous pouvons donc penser que le peptide n'a plus d'effet après 10 jours.

**Conclusion :**

Nous remarquons donc que les souris traitées par le peptide P140 et le NaCl 9‰ ont une cellularité qui baisse significativement par rapport aux souris du groupe contrôle jusqu'à 7 jours après l'injection. Au contraire nous ne remarquons aucune différence significative, à aucun temps, entre les souris traitées par le peptide P140 avec le Tréhalose 10% et le groupe contrôle. Enfin pour le Mannitol 5.4%, nous avons des résultats uniquement pour les jours 3 et 5. Nous observons alors des différences significatives par rapport au groupe contrôle et à J+3 par rapport au groupe Tréhalose 10%. A J+5 le groupe NaCl 9‰ est significativement meilleur que le groupe Mannitol 5.4%.

Nous avons choisi après interprétation des premiers résultats de conserver le temps J+3 après l'injection, or à ce moment les effets du peptide en présence de NaCl 9‰ ou de Mannitol 5.4% ne sont pas significativement différents.

Aux vues des meilleurs résultats du NaCl 9‰ à J+5 par rapport au Mannitol 5.4% ainsi que le fait que le NaCl 9‰ est un soluté dit neutre contrairement au Mannitol, nous choisirons l'eau physiologique comme soluté pour l'injection du peptide P140 aux souris MRL/lpr lors du contrôle des lots de peptide. Les résultats seront observés 3 jours après injection.

#### **IV. Conclusion et perspectives**

Durant cette étude nous avons pu mettre en évidence l'effet du peptide P140, dans un premier temps sur le modèle murin lupique et par la suite sur des patients atteints de Lupus.

Nous avons ainsi montré que le peptide a une influence positive sur différents symptômes caractéristiques du LED comme le taux de protéinurie ou d'anti. dsDNA trop élevé chez le modèle murin lupique MRL/lpr.

De plus, le traitement permet une diminution de l'intensité de la maladie comme nous le montre la phase IIa avec l'étude du score du SLEDAI sur des patients atteints du Lupus.

Si les résultats de la Phase III s'avèrent concluants, le traitement « Lupuzor® » pourrait être commercialisé au cours de l'année 2016. Les malades du Lupus auraient donc un traitement spécialement adapté à leur maladie et sans effet secondaires.

Enfin, pour contrôler l'efficacité du peptide en sortie de production nous avons réuni les conditions optimales pour un test rapide et concluant.

Pour la suite, il reste encore à déterminer le mode d'administration du traitement le plus efficace et le plus adapté aux malades. Pour le moment seule l'injection retro-orbital a été testée pour le modèle murin. Pour plus de praticité pourquoi ne pas penser à un traitement sous forme de comprimé par exemple.

Le travail des chercheurs de cette unité de recherche n'est donc pas encore terminé et des études sur le fonctionnement de ce peptide sont toujours en cours.

## Bibliographie

- (1) (2008) *ImmuPharma : 15 millions de \$ avec Cephalon et des résultats cliniques encourageants.*
- (2) BERTRAND F., MAUMY M. (2011). *Éléments de statistique appliquée.*
- (3) BERTRAND F., MAUMY-BERTRAND M. (2011). *Statistique pour les scientifiques.*
- (4) CHAMPELY S. (2006). *Tests statistiques paramétriques : Puissance, taille d'effet et taille d'échantillon (sous R).*
- (5) CUCHERAT M. *Interprétation des essais cliniques pour la pratique médicale.*
- (6) DEUFFIC S. (1998). Comparer la survie entre deux groupes, *Sang Thrombose Vaisseaux*, Volume 10, Numéro 8, 515-20.
- (7) LANDAIS P., ALBERT I. (1997). Analyse de la survie, *Médecine thérapeutique*, Volume 3, Numéro 1, 45-57.
- (8) MULLER S., MONNEAUX F., SCHALL N., RASHKOV R. K., OPARANOV B. A., WIESEL P., GEIGER J-M., ZIMMER R. (2008). *Spliceosomal Peptide P140 for Immunotherapy of Systemic Lupus Erythematosus.*

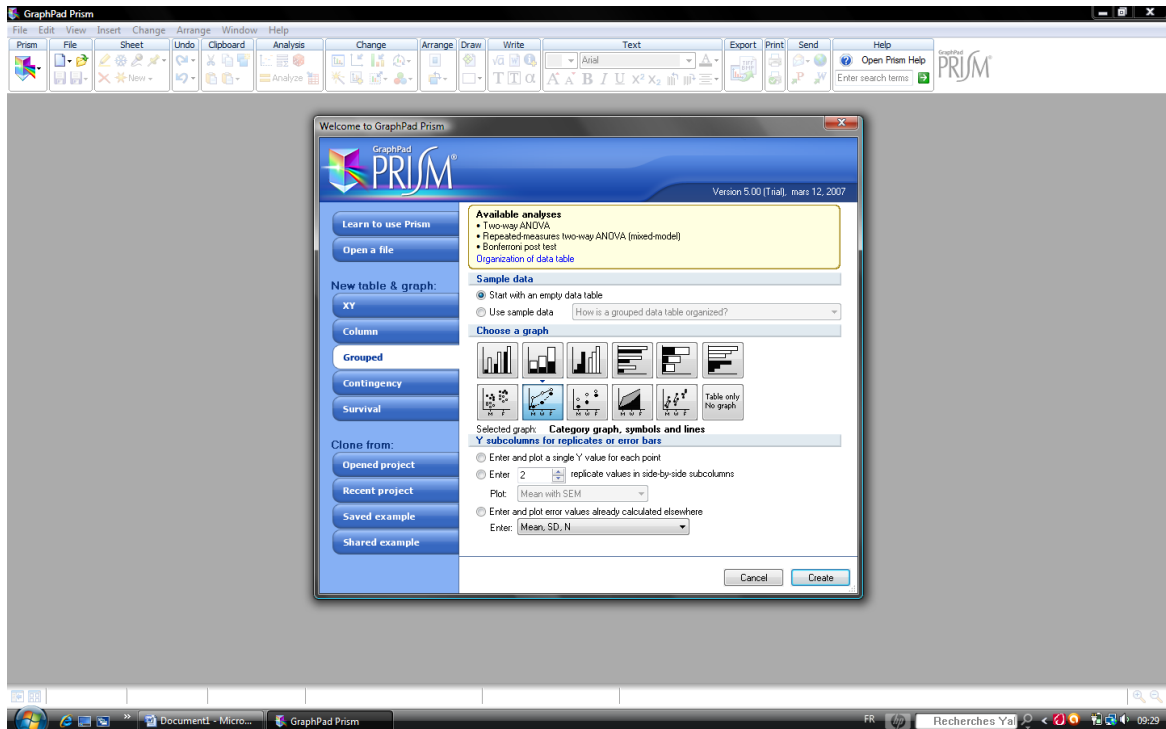
# **Annexes**

## II. Annexes Matériel et Méthodes

### 4. Outils informatiques et données

#### Outils Informatiques

#### Logiciel GraphPad Prism



#### Base de données Excel des Bio essais

Bioassay n	Type souris	num souris	Solaté	traitement	Provenance souris	Durée traitement	Cellularité totale (10 <sup>6</sup> cells/mL)	% LT	% LB	% DN T cells	% mono	% granulo	cell LT (10 <sup>6</sup> cells/mL)
186	MRL/lpr	2	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	3 jours	5,7	25,57	11,74	10,97	10,74	38,27	14,5749
187	MRL/lpr	3	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	3 jours	5,6	29,33	25,47	19,24	13,23	15	16,4248
188	MRL/lpr	4	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	3 jours	20,75	12,29	6,36	68,03	7,25	11,28	25,5075
189	MRL/lpr	5	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	3 jours	7,6	26,6	11,07	19,5	8,14	34,17	20,26
120	MRL/lpr	1	NaCl SS	PH0	HAPLAN	3 jours	4,1	36,9	15,97	15,84	13,62	15,38	15,129
121	MRL/lpr	2	NaCl SS	PH0	HAPLAN	3 jours	3,35	16,24	13,15	11,74	13,71	40,11	6,194
122	MRL/lpr	3	NaCl SS	PH0	HAPLAN	3 jours	4,05	29,01	19,39	9,07	10,94	26,76	11,74905
123	MRL/lpr	4	NaCl SS	PH0	HAPLAN	3 jours	3,7	26,89	14,68	17,73	12,19	29,64	6,8737
124	MRL/lpr	5	NaCl SS	PH0	HAPLAN	3 jours	3,35	28,25	17,82	6,22	15,57	28,33	9,78875
125	MRL/lpr	1	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	5 jours	10,92	22,39	10,2	17,12	10,31	36,78	24,45
126	MRL/lpr	2	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	5 jours	9,29	21,99	10,52	16,67	1,29	42,29	19,21
127	MRL/lpr	3	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	5 jours	8,54	22,74	10,44	13,57	10,91	39,65	14,87
128	MRL/lpr	4	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	5 jours	27,4	21,41	3,28	39,01	3,73	30,38	58,66
129	MRL/lpr	5	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	5 jours	5,88	31,95	8,17	14,49	12	29,63	18,79
130	MRL/lpr	1	NaCl SS	PH0	HAPLAN	5 jours	11,52	25,67	7,17	36,74	10,79	22,1	29,57
131	MRL/lpr	2	NaCl SS	PH0	HAPLAN	5 jours	4,14	20,09	17,62	14,29	9,32	25,66	11,63
132	MRL/lpr	3	NaCl SS	PH0	HAPLAN	5 jours	5,04	27,04	13,61	11,8	12,54	34,12	13,63
133	MRL/lpr	4	NaCl SS	PH0	HAPLAN	5 jours	5,22	29,14	16,54	14,58	12,75	26,76	15,21
134	MRL/lpr	5	NaCl SS	PH0	HAPLAN	5 jours	6,24	27,66	9,08	17,87	10,2	33,04	17,26
135	MRL/lpr	1	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	7 jours	7,02	19,9	10,68	21,49	9,83	31,08	19,9
136	MRL/lpr	2	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	7 jours	8,1	17,72	12,45	35,35	10,8	20,46	17,72
137	MRL/lpr	3	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	7 jours	6,54	22,54	10,68	35,23	10,67	20,08	22,54
138	MRL/lpr	4	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	7 jours	10,14	15,38	11,8	18,43	6,86	39,5	15,38
139	MRL/lpr	5	NaCl SS	contrôle	HAPLAN	7 jours	19,66	20,21	5,72	39,67	6,83	26,02	20,21
140	MRL/lpr	1	NaCl SS	PH0	HAPLAN	7 jours	4,14	16,3	16,5	27,38	11,9	27,85	16,3
141	MRL/lpr	2	NaCl SS	PH0	HAPLAN	7 jours	4,79	23,25	20,2	15,52	14,11	26,94	23,25

# 5. Méthodes statistiques

## 2.4. Valeurs aberrantes

### Test de Dixon

**TEST de DIXON**

1. Placez les valeurs de votre série dans la plage jaune qui convient à l'effetif  
2. Sélectionnez les valeurs numériques (sans le titre de colonne)  
3. Effectuer un tri DEcroissant (de 1 à n) SANS ETENDRE LA SELECTION  
4. Si la plus petite ou la plus grande valeur est "hors norme", il peut être justifié, au risque de 5% unidirectionnel, de la supprimer.

**n = 3 à 7**

n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
3	4	5	6	7
2	3	4	5	6
1	2	3	4	5
1	2	3	4	5
1	2	3	4	5

**A. La plus petite valeur est-elle hors norme ?**

n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON

**B. La plus grande valeur est-elle hors norme ?**

n=3	n=4	n=5	n=6	n=7
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON

**n = 8 à 10**

n=8	n=9	n=10
0	3	10
1	6	9
2	7	8
3	6	7
4	5	6
5	4	5
6	3	4
7	2	3
8	1	2
9	1	1

**A. La plus petite valeur est-elle hors norme ?**

n=8	n=9	n=10
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON

**B. La plus grande valeur est-elle hors norme ?**

n=8	n=9	n=10
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON

**n = 11 à 13**

n=11	n=12	n=13
83	103	15
84	101	14
79	77	13
74	54	13
66	31	11
64	8	9
59	1	7
54	6	7
47	5	6
44	4	5
33	3	4
23	2	3
17	1	3

**A. La plus petite valeur est-elle hors norme ?**

n=11	n=12	n=13
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON

**B. La plus grande valeur est-elle hors norme ?**

n=11	n=12	n=13
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON
NON	NON	NON

**n = 14 à 20**

n=14	n=15	n=16	n=17	n=18	n=19	n=20
53	59	59	59	59	59	59
54	54	56	56	56	56	56

**A. La plus petite valeur est-elle hors norme ?**

n=14	n=15	n=16	n=17	n=18	n=19	n=20
OUI	NON	NON	NON	NON	NON	NON
NON	NON	NON	NON	NON	NON	NON

### III. Annexes partie Résultats

#### Sorties Minitab

#### Etude des analogues du P140

#### Effet du P140

#### Protéinurie

#### Modèle linéaire général : Protéinurie en fonction de Traitement; Temps; ...

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Traitement	fixe	2	NaCl; peptide
Temps	fixe	15	10; 12; 13; 14; 15; 17; 18; 20; 21; 23; 24; 25; 28; 29; 30
Patients (Traitement)	aléatoire	60	1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30

Analyse de la variance pour Protéinurie, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Traitement	1	176,004	176,004	176,004	26,02	0,000
Temps	14	383,382	383,382	27,384	42,27	0,000
Patients (Traitement)	58	392,311	392,311	6,764	10,44	0,000
Traitement*Temps	14	9,129	9,129	0,652	1,01	0,444
Erreur	812	526,022	526,022	0,648		
Total	899	1486,849				

S = 0,804867    R carré = 64,62 %    R carré (ajust) = 60,83 %



## 6. La phase IIa

### Les Anti dsDNA

Effet du P140 à 200 µg temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	SD 0	SD 8	SD 15	SD 29	SD 43	SD 57
Number of values	10	10	10	10	9	10
Minimum	0,0	-27,82	-39,30	-44,36	-41,90	-46,61
25% Percentile	0,0	-16,90	-23,83	-38,43	-37,96	-33,27
Median	0,0	-6,000	-14,67	-20,93	-27,27	-18,04
75% Percentile	0,0	-12,16	-11,96	-11,57	-19,51	-3,686
Maximum	0,0	25,39	-0,4965	12,20	-11,88	36,74
Mean	0,0	-6,603	-17,03	-22,14	-28,39	-15,75
Std. Deviation	0,0	14,45	10,33	17,20	10,30	24,92
Std. Error	0,0	4,569	3,268	5,440	3,433	7,882
Lower 95% CI of mean	0,0000e+000	-16,94	-24,42	-34,45	-36,31	-33,58
Upper 95% CI of mean	0,0000e+000	3,733	-9,634	-9,834	-20,47	2,078
Shapiro-Wilk normality test						
W		0,9169	0,9160	0,9414	0,9552	0,9375
P value		0,3317	0,3247	0,5686	0,7471	0,5256
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary		ns	ns	ns	ns	ns
Coefficient of variation		218.82%	60.70%	77.70%	36.28%	158.23%
Sum	0,0	-66,03	-170,3	-221,4	-255,5	-157,5
Bartlett's test for equal variances						
P value summary	ns					
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No					

## Effet du P140 à 1000 µg temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	SD 0	SD 8	SD 15	SD 29	SD 43	SD 57
Number of values	10	10	10	9	10	10
Minimum	0,0	-9,875	-43,12	-9,451	-34,10	-27,51
25% Percentile	0,0	-8,161	-21,97	-3,727	-16,90	-13,79
Median	0,0	-0,6215	-12,38	9,970	-2,608	2,042
75% Percentile	0,0	6,126	-6,080	16,78	13,31	8,658
Maximum	0,0	11,49	8,699	22,25	43,74	43,29
Mean	0,0	-0,2392	-14,51	7,250	-1,332	0,3723
Std. Deviation	0,0	7,860	15,82	11,04	22,46	19,94
Std. Error	0,0	2,486	5,003	3,681	7,101	6,306
Lower 95% CI of mean	0,0000e+000	-5,862	-25,83	-12,37	-17,40	-13,89
Upper 95% CI of mean	0,0000e+000	5,384	-3,191	15,74	14,73	14,64
Shapiro-Wilk normality test						
W		0,9236	0,9165	0,9542	0,9530	0,9316
P value		0,3881	0,3287	0,7366	0,7042	0,4638
Passed normality test (alpha=0.05)?		Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary		ns	ns	ns	ns	ns
Bartlett's test for equal variances						
P value summary	ns					
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No					

## Effet du P140 à 2 doses différentes temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	200 g / SD 8	1000g / SD 8	200 g / SD 15	1000 g / SD 15	200 g / SD 29	1000 g / SD 29	200 g / SD 43	1000 g / SD 43	200 g / SD 57	1000 g / SD 57
Number of values	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Minimum	-27,82	-9,875	-39,30	-43,12	-44,36	-42,19	-41,90	-34,10	-46,61	-27,51
25% Percentile	-16,90	-8,161	-23,83	-21,97	-38,43	-6,627	-37,39	-16,90	-33,27	-13,79
Median	-6,000	-0,6215	-14,67	-12,38	-20,93	7,717	-26,21	-2,608	-18,04	2,042
75% Percentile	-12,16	6,126	-11,96	-6,080	-11,57	15,31	-16,78	13,31	-3,686	8,658
Maximum	25,39	11,49	-0,4965	8,699	12,20	22,25	14,96	43,74	36,74	43,29
Mean	-6,603	-0,2392	-17,03	-14,51	-22,14	2,306	-24,06	-1,332	-15,75	0,3723
Std. Deviation	14,45	7,860	10,33	15,82	17,20	18,78	16,80	22,46	24,92	19,94
Std. Error	4,569	2,486	3,268	5,003	5,440	5,940	5,313	7,101	7,882	6,306
Lower 95% CI of mean	-16,94	-5,862	-24,42	-25,83	-34,45	-11,13	-36,07	-17,40	-33,58	-13,89
Upper 95% CI of mean	3,733	5,384	-9,634	-3,191	-9,834	15,74	-12,04	14,73	2,078	14,64
Shapiro-Wilk normality test										
W	0,9169	0,9236	0,9160	0,9165	0,9414	0,8676	0,8807	0,9530	0,9375	0,9316
P value	0,3317	0,3881	0,3247	0,3287	0,5686	0,0937	0,1331	0,7042	0,5256	0,4638
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Coefficient of variation	218.82%	3285.93%	60.70%	109.05%	77.70%	814.51%	69.84%	1685.48%	158.23%	5356.14%
Sum	-66,03	-2,392	-170,3	-145,1	-221,4	23,06	-240,6	-13,32	-157,5	3,723
Bartlett's test for equal variances										
Bartlett's statistic (corrected)	15,64									
P value	0,0747									
P value summary	ns									
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No									

## Comparaison de l'effet du P140 à 2 doses différentes

➔ Sortie MINITAB ANOVA

### Modèle linéaire général : Anti dsDNA en fonction de Dose; Temps; Patient

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Dose	fixe	2	200; 1000
Temps	fixe	6	1; 8; 15; 29; 43; 57
Patient (Dose)	aléatoire	20	1; 10; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 1; 10; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9

Analyse de la variance pour Anti dsDNA, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Dose	1	4341,1	4341,1	4341,1	5,01	0,038
Temps	5	3414,8	3414,8	683,0	5,06	0,000
Patient (Dose)	18	15593,5	15593,5	866,3	6,42	0,000
Dose*Temps	5	2762,8	2762,8	552,6	4,10	0,002
Erreur	90	12142,4	12142,4	134,9		
Total	119	38254,6				

S = 11,6153 R carré = 68,26 % R carré (ajust) = 58,03 %

## Le score du SLEDAI

### Effet du P140 à 200 µg temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	0	8	15	29	43	57
Number of values	10	10	9	10	9	9
Minimum	0,0	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000
25% Percentile	0,0	-0,5000	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000
Median	0,0	0,0	0,0	0,0	-4,000	-4,000
75% Percentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mean	0,0	-0,6000	-1,556	-1,400	-2,444	-2,444
Std. Deviation	0,0	1,350	1,944	1,897	1,944	1,944
Std. Error	0,0	0,4269	0,6479	0,6000	0,6479	0,6479
Lower 95% CI of mean	0,0000e+000	-1,566	-3,050	-2,757	-3,938	-3,938
Upper 95% CI of mean	0,0000e+000	0,3657	-0,06154	-0,04269	-0,9504	-0,9504
D'Agostino & Pearson omnibus normality test						
K2		15,47	4,527	3,762	4,527	4,527
P value		0,0004	0,1040	0,1524	0,1040	0,1040
Passed normality test (alpha=0.05)?		No	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary		***	ns	ns	ns	ns
Bartlett's test for equal variances						
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary	ns					
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No					

## Effet du P140 à 200 µg temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	0	8	15	29	43	57
Number of values	10	10	10	10	10	10
Minimum	0,0	0,0	-4,000	-4,000	-4,000	-6,000
25% Percentile	0,0	0,0	-1,000	-4,000	-4,000	-4,000
Median	0,0	0,0	0,0	0,0	-1,000	-1,000
75% Percentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mean	0,0	0,0	-0,8000	-1,400	-1,600	-2,000
Std. Deviation	0,0	0,0	1,687	1,897	1,838	2,309
Std. Error	0,0	0,0	0,5333	0,6000	0,5812	0,7303
Lower 95% CI of mean	0,0000e+000	0,0000e+000	-2,006	-2,757	-2,915	-3,652
Upper 95% CI of mean	0,0000e+000	0,0000e+000	0,4065	-0,04269	-0,2853	-0,3479
D'Agostino & Pearson omnibus normality test						
K2			7,486	3,762	3,972	2,193
P value			0,0237	0,1524	0,1373	0,3341
Passed normality test (alpha=0.05)?			No	Yes	Yes	Yes
P value summary			*	ns	ns	ns
Bartlett's test for equal variances						
Bartlett's statistic (corrected)						
P value						
P value summary	ns					
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No					

## Effet du P140 à 2 doses différentes temps par temps

➔ Normalité des échantillons et égalité des variances

	200 g / SD 8	1000 g / SD 8	200 g / SD 15	1000 g / SD 15	200 g / SD 29	1000 g / SD 29	200 g / SD 43	1000 g / SD 43	200 g / SD 57	1000 g / SD 57
Number of values	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Minimum	-4,000	0,0	-8,000	-4,000	-4,000	-4,000	-8,000	-4,000	-8,000	-6,000
25% Percentile	-0,5000	0,0	-4,000	-1,000	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000	-4,000
Median	0,0	0,0	-1,000	0,0	0,0	0,0	-4,000	-1,000	-4,000	-1,000
75% Percentile	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mean	-0,6000	0,0	-2,200	-0,8000	-1,400	-1,400	-3,000	-1,600	-3,000	-2,000
Std. Deviation	1,350	0,0	2,741	1,687	1,897	1,897	2,539	1,838	2,539	2,309
Std. Error	0,4269	0,0	0,8667	0,5333	0,6000	0,6000	0,8028	0,5812	0,8028	0,7303
Lower 95% CI of mean	-1,566	0,0000e+000	-4,161	-2,006	-2,757	-2,757	-4,816	-2,915	-4,816	-3,652
Upper 95% CI of mean	0,3657	0,0000e+000	-0,2394	0,4065	-0,04269	-0,04269	-1,184	-0,2853	-1,184	-0,3479
D'Agostino & Pearson omnibus normality test										
K2	15,47		2,901	7,486	3,762	3,762	0,5305	3,972	0,5305	2,193
P value	0,0004		0,2345	0,0237	0,1524	0,1524	0,7670	0,373	0,7670	0,3341
Passed normality test (alpha=0.05)?	No		Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	***		ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Bartlett's test for equal variances										
Bartlett's statistic (corrected)										
P value										
P value summary	ns									
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No									

## Comparaison de l'effet du P140 à 2 doses différentes

➔ Sortie MINITAB ANOVA

### Modèle linéaire général : SLEDAI en fonction de Dose; Temps; Patient

Facteur	Type	Niveaux	Valeurs
Dose	fixe	2	200; 1000
Temps	fixe	6	1; 8; 15; 29; 43; 57
Patient (Dose)	aléatoire	20	1; 10; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 1; 10; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9

Analyse de la variance pour SLEDAI, avec utilisation de la somme des carrés ajustée pour les tests

Source	DL	SomCar séq	SomCar ajust	CM ajust	F	P
Dose	1	22,533	22,533	22,533	1,77	0,200
Temps	5	107,200	107,200	21,440	11,02	0,000
Patient (Dose)	18	228,933	228,933	12,719	6,54	0,000
Dose*Temps	5	7,067	7,067	1,413	0,73	0,605
Erreur	90	175,067	175,067	1,945		
Total	119	540,800				

S = 1,39470 R carré = 67,63 % R carré (ajust) = 57,20

## 7. Les « Bio essais »

### Vérification des conditions Bio essais

➔ Sorties MINITAB ANOVA

#### Les temps

##### *Avec le NaCl 9‰*

#### **ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité NaCl en fonction de Temps NaCl**

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Temps NaCl	4	25956	6489	16,67	0,000
Erreur	93	36199	389		
Total	97	62154			

S = 19,73    R carré = 41,76 %    R carré (ajust) = 39,26 %

##### *Avec le Mannitol 5.4%*

#### **ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité Mann en fonction de Temps Mannitol**

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Temps Mannitol	2	5126	2563	12,89	0,000
Erreur	25	4971	199		
Total	27	10097			

S = 14,10    R carré = 50,77 %    R carré (ajust) = 46,83 %

##### *Avec le Tréhalose 10%*

#### **ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité Treh en fonction de Temps Trehalose**

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Temps Trehalose	4	1489	372	0,99	0,424
Erreur	39	14645	376		
Total	43	16134			

S = 19,38    R carré = 9,23 %    R carré (ajust) = 0,00 %

## Les Solutés

### Pour le temps J+3

#### ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité J+3 en fonction de Soluté

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Soluté	3	9698	3233	8,68	0,000
Erreur	61	22713	372		
Total	64	32411			

S = 19,30 R carré = 29,92 % R carré (ajust) = 26,48 %

### Pour le temps J+5

#### ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité J+5 en fonction de Soluté J+5

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Soluté J+5	3	7697	2566	7,78	0,000
Erreur	62	20448	330		
Total	65	28146			

S = 18,16 R carré = 27,35 % R carré (ajust) = 23,83 %

### Pour le temps J+7

#### ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité J+7 en fonction de Soluté J+7

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Soluté J+7	2	5363	2682	8,22	0,004
Erreur	15	4893	326		
Total	17	10257			

S = 18,06 R carré = 52,29 % R carré (ajust) = 45,93 %

### Pour le temps J+10

#### ANOVA à un facteur contrôlé : Cellularité J+10 en fonction de Soluté J+10

Source	DL	Somme des carrés	CM	F	P
Soluté J+10	2	223	111	0,13	0,882
Erreur	14	12287	878		
Total	16	12510			

S = 29,63 R carré = 1,78 % R carré (ajust) = 0,00 %



Laura Neuhart

*Etude statistique et optimisation de l'effet thérapeutique du peptide P140 dans un modèle murin lupique ainsi qu'en essai clinique.*

Le Lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune systémique touchant entre 80 et 100 000 personnes en France dont 90% de femmes. A ce jour aucun traitement spécifique n'a encore été découvert. Cependant depuis une dizaine d'années, Sylviane Muller et son équipe travaillent sur un fragment de protéine, le peptide P140 capable de traiter un modèle murin lupique, la MRL/lpr. Après des premiers tests concluants, le peptide a passé avec succès les phases cliniques I, IIa et IIb et est actuellement en essai clinique de phase III.

Dans ce contexte, mon sujet de stage a pour but d'optimiser et d'améliorer certains aspects du peptide qui n'ont pas encore été abordé à ce jour. Ces études statistiques ont été scindées en trois parties à savoir, l'optimisation de la séquence peptidique du P140, l'analyse approfondie de la phase d'essai clinique IIa et la mise en place d'un bioassay permettant de contrôler les lots de peptides à leur sortie de production.

**Mots Clefs** : peptide P140, Lupus, MRL/lpr, essais cliniques, t tests, ANOVA