



(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2011/058984

(22) Date de dépôt international :
31 mai 2011 (31.05.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1054245 1 juin 2010 (01.06.2010) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) :
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147 rue de l'Université,
F-75007 Paris Cedex 07 (FR). CHU NANTES [FR/FR];
5 Allée de l'Île Gloriette, F-44000 Nantes (FR).
UNIVERSITE DE NANTES [FR/FR]; 1 Quai de
Tourville, F-44000 Nantes (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
KAEFFER, Bertrand [FR/FR]; 20 rue du Fresche
Blanc, F-44300 Nantes (FR). ROZE, Jean-Christophe
[FR/FR]; 52 rue de la Bastille, F-44000 Nantes (FR).

(74) Mandataire : FOURCADE, Emmanuelle; Parc de Basso
Cambo, 4, Rue Paul Mesplé, F-31100 Toulouse (FR).

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

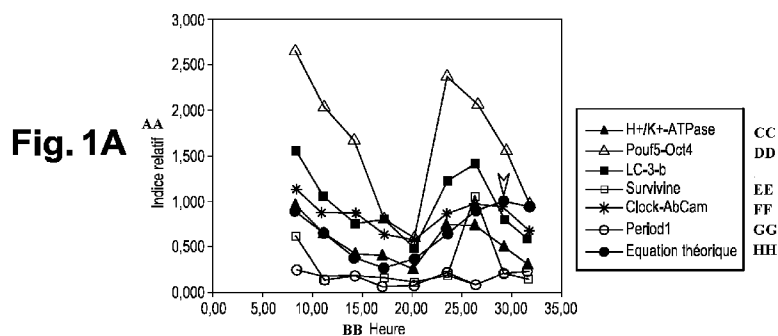
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD OF IN-VITRO EVALUATION OF THE PHYSIOLOGICAL STATE OF A GASTRIC MUCOUS
MEMBRANE AND KIT FOR CARRYING OUT SUCH AN EVALUATION

(54) Titre : PROCÉDÉ D'ÉVALUATION IN VITRO DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE D'UNE MUQUEUSE GASTRIQUE ET
KIT POUR RÉALISER UNE TELLE ÉVALUATION



missing Trad. ENG

(57) Abstract : The invention relates to a method of in-vitro evaluation of the physiological state of a gastric mucous membrane on the basis of exfoliated cells isolated from a biological fluid of a human or nonhuman animal individual, according to which said cells are subjected to a set of antibodies able to interact with protein markers from among at least one autophagia marker and at least one clock marker. Advantageously, anti-SURVIVIN antibodies and/or anti-LC3 antibodies are used as autophagia markers. Likewise, anti-PERIOD1 antibodies and/or anti-CLOCK antibodies are used as clock markers. The invention also relates to a kit comprising a set of antibodies capable of being used for said method.

(57) Abrégé :

[Suite sur la page suivante]



-
- *relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii)* — *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)*
- Publiée :**
- *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

L'invention concerne un procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique à partir de cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique d'un individu animal, humain ou non humain, selon lequel on soumet lesdites cellules à un ensemble d'anti-corps susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques parmi au moins un marqueur de l'autophagie et au moins un marqueur de l'horloge. Avantageusement, on utilise des anticorps anti-SURVIVINE et/ou des anticorps anti-LC3, en tant que marqueurs de l'autophagie. De même, on utilise des anticorps anti-PERIOD1 et/ou des anticorps anti-CLOCK, en tant que marqueurs de l'horloge. L'invention concerne également un kit comportant un ensemble d'anti-corps susceptibles d'être utilisés pour ledit procédé.

PROCÉDÉ D'ÉVALUATION IN VITRO DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE D'UNE MUQUEUSE GASTRIQUE ET KIT POUR RÉALISER UNE TELLE ÉVALUATION

DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique à partir de cellules exfoliées de la muqueuse gastrique d'un individu. Plus précisément, l'invention permet
5 d'évaluer l'importance de la perte de cellules épithéliales de la muqueuse gastrique d'un individu en inférant sur le degré d'autophagie et le cycle circadien de la population de cellules exfoliées dudit individu. L'invention concerne également un kit comportant un ensemble d'anticorps susceptibles
10 d'interagir avec des biomarqueurs protéiques spécifiques, afin d'évaluer l'état physiologique de la muqueuse gastrique d'un individu.

L'invention trouve des applications dans le domaine médical, afin d'évaluer l'état de la muqueuse gastrique des enfants prématurés, pour notamment identifier et surveiller la mise en place d'un rythme circadien dans le renouvellement cellulaires de la muqueuse gastrique. L'invention trouve
15 également des applications dans le domaine médical, pour évaluer l'état physiologique de la muqueuse gastrique d'un patient suite à un trouble physiologique ou une affection telle qu'un ulcère, ou suite à un traitement susceptible d'avoir des répercussions sur la muqueuse gastrique d'un patient. L'invention trouve également des applications dans le domaine médical, afin
20 de déterminer le meilleur moment sur un cycle de 24h pour administrer un traitement par voie orale susceptible d'avoir des répercussions sur les cellules gastriques d'un patient, en fonction du rythme circadien de l'exfoliation des cellules gastriques dudit patient.

ETAT DE LA TECHNIQUE ET PROBLEMES RENCONTRES

L'épithélium gastrique est une structure complexe, constituée de glandes tubulaires et ramifiées. Les cellules souches épithéliales dans la région du collet sont responsables du renouvellement constant de l'épithélium par la production de multiples lignées de cellules gastriques qui
30 peuplent les glandes. Certaines cellules progénitrices gastriques peuvent fonctionner comme des senseurs de dommages, ou des cellules de réserve,

qui sont mobilisables pour colmater des microlésions. Ces cellules conservent un potentiel prolifératif élevé, permettant de régénérer des parties de la muqueuse gastrique après une blessure.

5 L'exfoliation est un processus biochimique actif lié à l'homéostasie de l'épithélium. La perte de contact entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire ou les cellules compagnes, telles que les fibroblastes, se traduit par l'activation d'une cascade enzymatique nommée anoïkis. Le détachement des cellules épithéliales déclenche à la fois des signaux pro et anti-apoptotiques, ce qui permettrait aux cellules de survivre quelque temps
10 dans le milieu extérieur. Dans ce contexte, l'exfoliation aurait un rôle physiologique dans le maintien et l'évolution de l'architecture d'un épithélium, non seulement en permettant la formation d'une lumière glandulaire, mais aussi en offrant une souplesse suffisante pour préserver la continuité physique des épithéliums tout en permettant leur croissance.

15 Chez un enfant prématuré, il est important de pouvoir contrôler la maturation de l'épithélium gastrique, afin notamment d'évaluer si l'enfant est à même ou non d'être alimenté autrement que par sonde gastrique.

De même, suite à un traitement, l'épithélium gastrique d'un patient peut avoir été endommagé, et le contrôle du bon rétablissement du patient
20 passe également par celui de l'état physiologique de son épithélium gastrique.

Jusqu'à présent, il n'existe aucune méthode non invasive d'évaluation de la maturation de l'épithélium gastrique d'un individu. Or, chez des individus fragiles, tels que les enfants prématurés, il n'est pas concevable de
25 procéder à de telles évaluations de manière récurrente.

EXPOSE DE L'INVENTION

Un but de l'invention est de proposer une méthode fiable et non invasive pour évaluer l'état physiologique d'un épithélium gastrique, qui
30 puisse se faire de manière récurrente, et notamment plusieurs fois par 24h, sans risque de fragiliser le patient.

Pour cela, l'invention propose avantageusement d'utiliser des cellules exfoliées de la muqueuse gastrique, récupérées par exemple dans le liquide gastrique du patient.

La récupération de cellules exfoliées quiescentes est possible dans de nombreuses situations cliniques, notamment à partir d'aspirats de fluides gastriques, rinçage extensif à la fin d'une coloscopie de routine etc. Par exemple, en milieu hospitalier, les enfants prématurés sont maintenus sous sonde nasogastrique, notamment pour assurer la période transitoire entre nutrition parentérale totale et nutrition entérale totale. Lors des soins courants, le personnel soignant doit retirer toutes les trois heures, le contenu gastrique comportant du lait non-digéré et des fluides gastriques, qui est source de cellules exfoliées de la muqueuse gastrique de l'enfant. Les cellules exfoliées sont également récupérables sur des patients adultes équipés d'une sonde nasogastrique. De plus, la multiplicité et la fréquence de ces gestes du soin courant pratiqués dans toutes les unités de soins intensifs rend possible la collecte d'une seringue de contenu gastrique et leur utilisation immédiate (ou différée après stockage par exemple à -70 °C) pour extraire et détecter les cellules gastriques exfoliées. L'exfoliation des cellules épithéliales gastriques est induite par l'arrivée constante de lait dans la lumière de l'estomac et/ou par un éventuel frottement de la sonde sur la muqueuse gastrique. Ces cellules épithéliales sont dans un état physiologique particulier, nommé anoïkis, qui correspond à l'activation d'un processus d'autophagie

Il a été récemment découvert que l'autophagie regroupe un ensemble de mécanismes cataboliques aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome. L'autophagie peut être décrite comme un mécanisme de survie cellulaire. Ce dernier a lieu en cas de stress, notamment en cas de carences nutritionnelles, accumulation d'agrégats protéiques etc., et agit en recyclant des nutriments, notamment les acides aminés. Dans la cellule, l'autophagie débute par la formation d'une vacuole, l'autophagosome, qui séquestre de façon non sélective les constituants du cytoplasme. L'autophagosome est délimité par plusieurs feuilletés lipidiques dont l'origine est encore mal connue. Bien que l'importance de l'autophagie chez l'homme soit incontestée, son analyse n'est pas évidente du fait du manque de bons marqueurs. Jusqu'à présent, la protéine LC3, homologue chez l'homme, le rat et la souris de Atg8, est le seul marqueur fiable de la présence d'autophagosomes dans les cellules. Le dépistage de la conversion de LC3-I en LC3-II est ainsi un indicatif de l'activité autophagique

des cellules. On connaît également, une protéine responsable de l'inhibition de l'autophagie, la SURVIVINE. Plus précisément, la SURVIVINE inhibe la réaction de conversion de LC3-I à LC3-II.

5 Les inventeurs ont découvert que la détection et l'analyse de marqueurs de l'autophagie sur les cellules exfoliées quiescentes de la muqueuse gastrique, en parallèle de la détection et de l'analyse de marqueurs de l'horloge sur lesdites cellules, permet d'évaluer de manière fiable l'état physiologique de la muqueuse gastrique.

10 L'invention propose donc d'évaluer in vitro l'état physiologique de cellules exfoliées de la muqueuse gastrique d'un individu, en utilisant des anti-corps susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques de l'autophagie et des marqueurs protéiques de l'horloge. Il est ainsi possible, selon l'invention, de suivre et de contrôler l'évolution en cinétique sur un ou plusieurs jours des cellules de la muqueuse gastrique, pour évaluer le rythme
15 circadien de l'exfoliation et l'effet d'un stress nutritionnel. Notamment, l'invention peut permettre d'assurer un suivi en chrononutrition, en contrôlant les perturbations sur le taux d'exfoliation et le niveau d'autophagie de bolus d'acides aminés essentiels (pris par la bouche, seuls ou en cocktails), comme le L-Tryptophane par exemple. De même, l'invention peut permettre
20 d'assurer un suivi en chronopharmacologie, notamment pour la détection des effets de doses de médicaments, tels que l'ibuprofène, sur l'épithélium gastrique. Par ailleurs, le suivi et le contrôle sur ces cellules de la muqueuse gastrique, sur plusieurs semaines, par prélèvements hebdomadaires, peuvent permettre d'évaluer la maturation de l'épithélium. Ainsi, chez les
25 nourrissons prématurés, la possibilité de déterminer la cinétique cellulaire permettant la maturation et la croissance de l'épithélium gastrique normal permet de suivre l'évolution clinicopathologique du patient. Par exemple, un indice de pleine maturité de l'épithélium gastrique du patient pourrait consister en un équilibre délicat entre la prolifération cellulaire et la perte
30 cellulaire, qui pourrait être révélé indirectement par les différents taux d'exfoliation observés durant le séjour en hôpital. D'une manière générale, l'analyse et le suivi simultané des marqueurs de l'autophagie et de l'horloge selon l'invention permettent d'évaluer dans le temps l'état physiologique de l'épithélium gastrique d'un patient, et par la suite de pouvoir poser le

diagnostic adéquat et/ou prendre les décisions qui s'imposent pour le suivi dudit patient.

L'invention a donc pour objet un procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique à partir de cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique, tel que du liquide gastrique, d'un individu animal, humain ou non humain, selon lequel :

a) on soumet des cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique dudit individu, récupéré à un instant T, à un ensemble d'anti-corps susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques, parmi au moins un marqueur de l'autophagie et au moins un marqueur de l'horloge.

Préférentiellement, les anticorps sont des anticorps monoclonaux. Il est également possible d'utiliser des nano-ligands spécifiques des marqueurs protéiques cibles.

Selon l'invention, il est possible de déposer des préparations protéiques sur un support, après la lyse des cellules à étudier.

Autrement, il est possible de capturer les protéines par des anticorps immobilisés sur un support. Par exemple, on peut utiliser un système ELISA, en procédant dans un premier temps à une capture des marqueurs protéiques par une première série d'anticorps et dans un second temps à une révélation par une seconde série d'anticorps dirigés contre un autre épitope des marqueurs protéiques cibles.

On peut également utiliser une puce à protéines ou à capture par anticorps.

De même, on peut utiliser un système d'imagerie microscopique de fluorescence à haut débit et multiples signatures biologiques permettant de compter et caractériser les cellules individuellement et d'intégrer leurs caractéristiques, en mettant en œuvre des anticorps dirigés contre les marqueurs d'intérêt associés à des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes.

Dans tous les cas, l'analyse selon l'invention permet de détecter et de caractériser les cellules exfoliées, évaluer leur quantité et qualité, ainsi que d'aider au diagnostic d'un phénomène de maturation.

Chez le nourrisson nourrit par sonde, les cellules sont par exemple isolées à partir du contenu gastrique, l'arrivée de lait dans la lumière de l'estomac induisant une forte exfoliation cellulaire. Chez l'adulte suivi pour un

ulcère, notamment, le contenu gastrique peut présenter de nombreuses cellules épithéliales, qui participent à la cicatrisation, utile pour l'analyse de l'état physiologique de la muqueuse gastrique.

Par marqueur protéique, on entend une protéine susceptible de renseigner, de par sa présence/absence/quantité etc. sur un état pathologique particulier.

Par marqueur de l'autophagie, on entend une protéine susceptible de renseigner sur l'état autophagique d'une cellule, c'est-à-dire si la cellule est en autophagie ou non.

Notamment, selon l'invention, on peut utiliser des anticorps anti-SURVIVINE et/ou des anticorps anti-LC3, la protéine SURVIVINE et la protéine LC3 étant de bons marqueurs de l'autophagie. Par ailleurs, la présence de LC3, en plus d'être associée directement à la présence de l'autophagosome dans la cellule, est également un marqueur de cellule souche.

Par marqueur de l'horloge, on entend les gènes directement impliqués dans la régulation circadienne de la physiologie cellulaire.

Notamment selon l'invention, on peut utiliser des anticorps anti-PERIOD1 et/ou des anticorps anti-CLOCK, la protéine PERIOD1 et la protéine anti-CLOCK étant de bons marqueurs de l'horloge. En effet, les gènes codant les protéines CLOCK et PERIOD1 font partie d'une douzaine de gènes actuellement reconnus comme impliqués dans la régulation circadienne de la physiologie cellulaire. Ainsi, la protéine CLOCK est cruciale pour la détermination du dimère central de l'horloge (CLOCK:BMAL1). De même, la protéine PERIOD1 est la seule protéine directement corrélée à un stress cellulaire.

Avantageusement, l'ensemble d'anti-corps de l'étape a) comporte également des anti-corps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur de l'identité, afin d'évaluer avec certitude que la perte de cellules épithéliales gastriques provient bien de la personne étudiée. De plus cela permet de comparer entre plusieurs personnes le taux de cellules épithéliales gastriques qui expriment ledit marqueur d'identité. La mobilisation de cellules pariétales exprimant des marqueurs d'identité est indicative du renouvellement de l'épithélium gastrique. Ainsi, par exemple, une différence entre les profils d'exfoliation des marqueurs de l'identité de

deux personnes peut indiquer une différence de sensibilité à un traitement nutritionnel, médicamenteux ou autre. Avantageusement, les marqueurs de l'identité utilisés sont H⁺/K⁺-ATPase et/ou Pouf5/Oct-4.

5 En particulier, le marqueur Pouf5/Oct-4 fournit avantageusement des informations sur l'état de souffrance de la muqueuse gastrique de l'individu, qui combinées aux informations tirées des marqueurs de l'autophagie et de l'horloge, permet de dresser un diagnostic fiable sur l'état de la muqueuse gastrique de l'individu.

10 Dans des modes de mise en œuvre préférés de l'invention, le procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique comporte une étape préalable a0) de sélection de cellules exfoliées et isolées du fluide biologique de l'individu, et qui expriment un marqueur de l'identité cellulaire indicatif d'une cellule pariétale gastrique de l'individu, en particulier H⁺/K⁺-ATPase. L'étape a) est ensuite mise en œuvre sur les
15 cellules sélectionnées au cours de cette étape a0). On s'assure ainsi avantageusement que seules les cellules pariétales gastriques de l'individu seront examinées conformément à l'invention. En particulier, les cellules pouvant provenir du personnel soignant ayant procédé aux prélèvements sur l'individu, ou de la mère dans le cas des enfants prématurés, ne sont pas
20 susceptibles de venir fausser les résultats de l'analyse des marqueurs protéiques d'intérêt.

Dans un tel cadre, l'invention prévoit de préférence que le procédé mette en œuvre le dépôt des cellules sur une surface appropriée, préférentiellement de manière à rendre ces cellules repérables
25 individuellement, l'identification des cellules exprimant H⁺/K⁺-ATPase, notamment par observation microscopique, par exemple par microscopie confocale au moyen de couples d'anticorps adéquats dont un est couplé à un fluorochrome, puis la mise en présence de ces cellules positives avec les anticorps dirigés contre les autres marqueurs protéiques d'intérêt, en
30 particulier les marqueurs de l'autophagie, de l'horloge et de l'identité cellulaire.

Préférentiellement, le procédé selon l'invention comporte en outre une étape préalable de sélection des cellules quiescentes, par exemple au moyen d'un marqueur de l'intégrité nucléaire, afin d'éliminer les cellules pré-

sénescentes susceptibles d'être contenues dans le fluide biologique récupéré de l'individu, et qui pourraient fausser les résultats d'analyse.

Les deux étapes préalables du procédé selon l'invention, telles qu'exposées ci-dessus, permettent avantageusement de s'assurer que l'analyse portera uniquement sur des cellules exfoliées intègres et issues de la muqueuse gastrique de l'individu ciblé.

Avantageusement, on répète l'étape a), et le cas échéant une ou les deux étapes préalables, en particulier l'étape a0), sur un nouveau lot de cellules exfoliées et isolées dudit individu, récupérées à un instant T+n après la première analyse, de manière à pouvoir comparer les résultats et suivre l'évolution de l'état physiologique de la muqueuse gastrique dudit individu.

Dans toute la présente description, on entend par « le cas échéant l'étape a0) », le fait que, lorsque cette étape a0) est mise en œuvre préalablement à l'étape a) pour le fluide biologique de l'individu récupéré à l'instant T, cette étape préalable est également systématiquement mise en œuvre pour tout fluide biologique de cet individu récupéré à un instant T+n.

Selon l'invention, en fonction de la périodicité des contrôles, il est possible d'évaluer différents paramètres liés à l'état de la muqueuse gastrique du patient, et ainsi poser différents diagnostics. Généralement, une périodicité d'au moins 12 heures est suffisante. L'étape a), et le cas échéant l'étape a0), sont ainsi répétées à chaque fois sur un lot de cellules de l'individu fraîchement récupérées, les cellules analysées ayant été pour la plus part exfoliées à un instant T+n, n étant préférentiellement au moins égale à 12 heures, par rapport à l'analyse précédente.

Par exemple, l'invention propose de répéter l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins toutes les 12 heures pendant au moins 24h, de manière à évaluer la mise en place d'un rythme circadien de l'exfoliation cellulaire chez l'individu dont les cellules sont issues. Cela est particulièrement intéressant pour les enfants prématurés, car cela permet de déterminer à partir de quand l'épithélium gastrique de l'enfant est mature, et donc quand la sonde gastrique peut être retirée, pour que l'enfant puisse s'alimenter sans assistance médicale. De plus, d'une manière générale, cela permet de déterminer chez un animal (humain ou non humain) le rythme d'exfoliation cellulaire, qui lui est propre. .

Selon une autre mise en œuvre du procédé de l'invention, on répète l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins toutes les 12 heures pendant au moins 72h, de manière à analyser le rythme circadien de l'exfoliation cellulaire chez l'individu dont les cellules sont issues. Ainsi, on
5 peut vérifier la mise en place et le maintien du rythme circadien de l'exfoliation chez l'enfant prématuré, ou la remise en place chez l'adulte d'un tel rythme, par exemple après traitement d'un ulcère. De même, la connaissance exacte, à un moment donné, pour un individu donné, du rythme circadien de l'exfoliation cellulaire de sa muqueuse gastrique, qui lui
10 est propre et peut être modifié de manière ponctuelle, pour différentes raisons, permet d'optimiser la prise d'un traitement particulier. Cela peut notamment être très avantageux dans le cas d'un traitement anti-cancéreux.

De même, en répétant l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins une fois par semaine pendant au moins deux semaines, on peut
15 suivre l'évolution de la maturation de la muqueuse gastrique de l'individu dont les cellules sont issues. Il est ainsi possible de vérifier la rémission durable de la muqueuse gastrique du patient, les effets à long terme d'un traitement etc.

Bien entendu, l'homme du métier est tout à fait à même d'adapter la
20 périodicité et la durée de l'analyse, en fonction du patient, des informations spécifiques souhaitées, du diagnostic à poser etc.

Par exemple, il est possible de construire, chez une catégorie d'individus donnée (notamment d'une classe d'âge donnée), des courbes de référence, en compilant les données obtenues pour plusieurs individus de
25 ladite catégorie, sur une période donnée, depuis une journée jusqu'à plusieurs semaines (voir notamment ci-dessous la première et la troisième expérimentations).

Il est également possible de dériver des abaques ou autres tables constituées des acrophases, périodes, ou amplitudes des rythmes de tout ou
30 partie des biomarqueurs. Cela peut notamment être utile pour des diagnostics prédictifs, et pour affiner le suivi et le pronostic d'un nouvel individu, par rapport aux autres individus de sa catégorie.

D'une manière générale, la compilation d'un certain nombre de données pour une catégorie d'individus donnée permet selon l'invention de
35 construire un système expert pour ladite catégorie d'individus.

L'invention concerne également, un kit pour l'évaluation de l'état physiologique de la muqueuse gastrique d'un individu animal, humain ou non humain, destiné à être appliqué in vitro à des cellules gastriques exfoliées dudit individu, caractérisé en ce qu'il comporte un ensemble d'anti-corps
5 susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques parmi au moins un marqueur de l'autophagie et au moins un marqueur de l'horloge.

Le kit selon l'invention est particulièrement adapté à la mise en œuvre du procédé de l'invention.

Préférentiellement, les anticorps utilisés sont des anticorps
10 monoclonaux.

Selon un exemple de kit de l'invention, l'ensemble d'anticorps comporte des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur parmi la protéine SURVIVINE et la protéine LC3, en tant que marqueur de l'autophagie.

De même, l'ensemble d'anticorps peut comporter des anticorps
15 susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur parmi la protéine PERIOD1 et la protéine CLOCK, en tant que marqueur de l'horloge.

De plus l'ensemble d'anticorps peut comporter des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur de l'identité et
20 notamment H⁺/K⁺-ATPase.

Selon l'invention, le kit peut comporter des solutions nécessaires pour permettre l'extraction des cellules exfoliées, tel que du tampon phosphate salin sans ion calcium ni ion magnésium (PBS0) contenant 3 mM EDTA et 0.05 mM DTT. De même, il peut comporter du tampon carbonate bicarbonate
25 pH 9.6 pour la saturation sur les plaques ELISA si cette solution est retenue.

Il est également possible de prévoir du tampon de rinçage des cellules comme le PSBO, ou autre tampon salin tamponné, contenant Tween-20 à 0.05% pour le rinçage ELISA ou 0.2% BSA pour les incubations. Bien entendu, toute autre formule de tampon pour rincer et incuber peut être
30 envisagée. Avantageusement, on peut prévoir de l'eau distillée pour resuspendre le lysat de cellules obtenu après des cycles de congélation/décongélation, ou toute autre formule de tampon lyse adaptée.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

Figures 1A à 1D : Détection de marqueurs protéiques exprimés par des cellules gastriques exfoliées, dans une série temporelle d'aspirats de fluides gastriques d'un enfant prématuré, pendant 24 heures, sur des échantillons prélevés toutes les trois heures.

Figures 2A à 2E : Détection de marqueurs protéiques exprimés par des cellules gastriques exfoliées, dans une série temporelle d'aspirats de fluides gastriques de cinq enfants prélevés selon un rythme hebdomadaire entre le troisième jour de vie et le retrait de la sonde gastrique.

Figures 3A à 3F : Morphologie de cellules épithéliales gastriques fraîchement isolées (Figures 3 A à 3C) ou mises en culture (Figures 3D à 3F), avec expression des marqueurs de cellules souches.

Figure 4 : Évolution des taux d'expression de deux marqueurs d'autophagie sur des cellules exfoliées buccales d'un individu sain.

Figure 5 : Effet exacerbant sur l'exfoliation gastrique d'une exposition par voie orale à une dose d'Ibuprofène ou de L-Tryptophane chez le raton de douze jours lors d'un cycle diète/réalimentation qui induit le phénomène d'exfoliation.

Figure 6 : Détection de marqueurs protéiques exprimés par des cellules gastriques exfoliées, dans une série temporelle d'aspirats de fluides gastriques d'un enfant prématuré sur 24 heures, sur des prélèvements effectués toutes les trois heures.

Figures 7A et 7B : Détection du marqueur protéique H⁺/K⁺-ATPases exprimé par des cellules gastriques exfoliées, dans une série temporelle d'aspirats de fluides gastriques de quatre enfants prématurés (Enfants 1 et 2, Figure 7A ; Enfants 3 et 4, Figure 7B), pendant deux nycthémères consécutifs, sur des échantillons prélevés toutes les trois heures.

Figures 8A à 8D : Clichés de microscopie confocale illustrant le marquage d'une cellule gastrique exfoliée d'un enfant prématuré : Figure 8A, pour le marqueur H⁺/K⁺-ATPases, selon les plans respectivement xy, yz et xz ; Figure 8B, pour le marqueur Survivine (cliché haut), le marqueur H⁺/K⁺-ATPases (cliché central), et le marqueur nucléaire Hoechst 33258 (cliché bas) ; Figure 8C : pour le marqueur LC3 (cliché haut) et le marqueur nucléaire Hoechst 33258 (cliché bas) ; Figure 8D : pour le marqueur CLOCK (cliché haut) et le marqueur nucléaire Hoechst 33258 (cliché bas).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

I- MATERIEL ET METHODES

5 1- Récupération et préparation des cellules exfoliées de muqueuse gastrique

On récolte du résidu gastrique ou des selles d'un individu en container stérile. L'échantillon est traité immédiatement. Autrement, l'échantillon peut être stocké préférentiellement à -80°C, ou à -20°C jusqu'à utilisation. Dans le cas où l'échantillon devait attendre sur la paillasse, il est conseillé de le
10 laisser à température ambiante, à l'obscurité pour minimiser la lyse cellulaire. Dans tous les cas, il est recommandé de ne pas stocker les cellules dans un réfrigérateur, soit à +4°C, ce qui pourrait endommager de manière irrévocable les cellules et les rendre inutilisables ensuite.

On procède ensuite à une re-suspension de l'échantillon dans un
15 tampon phosphate salin sans ions calcium ni magnésium contenant 3 mM EDTA et 0,05 mM DTT.

Puis on récupère des cellules dans un culot hétérogène par simple centrifugation à 2000 tpm durant 3 min à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot peut être stocké en l'état jusqu'à re-suspension
20 en tampon de lyse ou être utilisé comme suit.

Ce culot cellulaire peut être extrait par un tampon de lyse pour immunodétection quantitative ou utilisé en l'état ou après mise en culture pour réaliser des analyses directes par imagerie microscopique en utilisant un système d'immunofluorescence.
25

2- Échantillons :

Lot n°1 : Échantillons (issus de la biocollection Prémathèque) prélevés toutes les trois heures pendant 24 heures, à partir d'aspirats de fluides gastriques d'un enfant prématuré (figure 1).

30 Lot N°2 : Échantillons (issus de la biocollection Prémathèque) prélevés de manière hebdomadaire, à partir d'aspirats de fluides gastriques de cinq enfants prématurés (2A à 2E), avec ou sans mise en culture des cellules (figure 2).

Lot N°3 : Échantillons de cellules de la muqueuse interne de la joue d'un volontaire adulte sain, exfoliées par frottements doux ont été récupérées, pour servir de témoin (figure 4).

5 Lot N°4 : Échantillons de cellules exfoliées de muqueuse gastrique de rats de douze jours, soumis à un cycle diète/réalimentation pendant cinq heures, et ayant reçu une dose de sérum physiologique (NaCl 9 pour mille), ou une dose d'Ibuprofène (10 mg/kg poids vif, dose utilisée en médecine pédiatrique) ou une dose de L-Tryptophane ou rien. Les rats ont été ensuite remis avec leur mère pour une heure de tétée puis sacrifiés, pour un
10 sous lot à 13H00 et pour un second sous lot à 01H00 (figure 5).

Lot N°5 : Échantillons (issus de la biocollection Prémathèque) prélevés toutes les trois heures pendant 48 heures, à partir d'aspirats de fluides gastriques de quatre enfants prématurés (figure 7).

15 3- Procédure de lyse :

Chaque lot de cellules a subi une lyse de manière à pouvoir être utilisé pour un test ELISA. On utilise à chaque fois 20 µl de culot cellulaire.

La lyse est réalisée par trois cycles de congélation/décongélation : passage dans un premier temps de -70°C à +37 °C, puis trois fois de suite,
20 de -20°C pendant 10-15 min à +37°C, en vérifiant à chaque fois la congélation – décongélation de la gouttelette de 20 µl au fond du tube.

Une aliquote de la solution est re-suspendue dans de l'eau ou du tampon de saturation (100 µL par échantillon) et mise à saturer sur les puits ELISA.

25 Tampon de saturation : 0,5 M Na₂CO₃ / NaHCO₃, pH 9,6 ;

Pour un litre : Na₂CO₃ : 1,59 g et NaHCO₃ : 2,93 g compléter par de l'eau distillée ;

Tampon de post-saturation et d'incubation : PBS0 + 0,2% BSA

Tampon de rinçage : PBS0 + 0,05% Tween-20 (25 µl dans 50 ml)

30 Plaques ELISA : Greiner, spéciale ELISA, 96 puits

Spectrophotomètre : Bio-Tek Instruments Inc, ELX800-UV, filtre 405nm

4- Protéines cibles

Selon l'invention, on utilise avantageusement sur ces échantillons
35 cellulaires des anticorps dirigés contre des protéines spécifiques, telles que celles répertoriées dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1. Liste de marqueurs protéiques pouvant être utilisés pour l'évaluation de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique.

Marqueurs protéiques	Référence Protéine / PubMed	Fonction
H ⁺ /K ⁺ ATPase (sous-unité bêta, gastrique)	ATP4B	Cellule Pariétale de l'enfant
Pouf5/Oct-4	ABF29403	Cellule Souche
SURVIVINE	015392	Autophagie / Cellule souche
Microtubule-associated protein light chain 3b (LC3b) APG8 autophagy 8-like	NP_004849.2	Autophagie
CLOCK	NP_004889	Homéostasie / Horloge – facteur transcription central
Period-1	BAA94085	Homéostasie / Horloge - régulateur

5 Par ailleurs, il est possible d'envisager d'utiliser l'ADN cellulaire comme biomarqueur supplémentaire, pour permettre un sexage de l'échantillon. Autrement, il est possible d'utiliser un fluorochrome, tel que Hoechst 33258.

10

5- Batterie d'anticorps primaires mis en œuvre pour le test ELISA

Dans les expérimentations décrites ici, une batterie d'anti-corps a été utilisée, comportant tout ou partie des anti-corps répertoriés dans le Tableau 2 ci-dessous.

15

20

Tableau 2 : Batterie d'anti-corps monoclonaux

Cible	Origine	Espèce	ELISA	Intérêt
H+/K+ ATPase (2G11)	Abcam [2G-11], ab-2866	Souris	1/400	Spécifique enfant
POUF5F1-OCT4	Sigma - P0873	Lapin	1/50	Souche
SURVIVINE (FL-142)	Santa-Cruz, sc-10811	Lapin	1/50	Survie, souche, autophagie
MAP LC3beta (H-50)	Santa-Cruz, sc-28266	Lapin	1/50	Autophagie
CLOCK (KAT13D)	Abcam ab3517	Lapin	1/50	Horloge (facteur transcription)
CLOCK (H-276)	Santa-Cruz, sc-25361	Lapin	1/50	Horloge (facteur transcription)
PERIOD1	Santa-Cruz sc-	Lapin	1/50	Horloge (régulateur)

- 5 L'évolution de la protéine CLOCK a été suivie par 2 anticorps (KAT13D et H-276) provenant de deux fournisseurs. Seul le signal de plus forte amplitude, obtenu avec KAT13D (Abcam), a été présenté.

6- Conjugués mis en œuvre pour le test ELISA

- 10 Le Tableau ci-dessous 3 ci-dessous reprend les anticorps secondaires biotinylés utilisés pour amplifier la réaction.

Tableau 3 : Conjugués

Cible	Origine	Espèce
Goat-anti-rabbit-biotin	Vector-lab, BA-1000	Chèvre (1/1000)
Goat Anti-mouse-biotin	Sigma, B-0529	Chèvre (1/1000)

7- Détection et analyse - test ELISA

Révélateur de fixation d'anticorps : Extravidin-horse-radish peroxydase (Sigma, E-2886, 1/1000), ABTS (en tablettes, Sigma A-9941 dont tampon citrate pH 3) et eau oxygénée.

- 5 Lecture sur Bio-Tek : Les densités optiques ont été lues à 405 nm après 20 min d'incubation à 37°C. Aucune variation significative des densités optiques n'a été obtenue en incubant sur 40 min.

Traitement des densités optiques : Les valeurs sont exprimés par un indice relatif l'indice relatif se calcule par :

- 10 $IR = (DO \text{ échantillon} - DO \text{ Bruit Fond}) / DO \text{ Bruit Fond}.$

La détection du niveau d'actine par un anticorps a montré une faible différence entre échantillon, aucune normalisation n'a donc été appliquée.

8- Détection et analyse par microscopie confocale

- 15 Les anticorps spécifiques des marqueurs protéiques mis en œuvre pour la microscopie confocale sont identiques à ceux cités dans le Tableau 2 ci-dessus.

La détection a été réalisée par un anticorps secondaire marqué par Alexa-488 pour détecter l'anticorps de souris dirigé contre H⁺/K⁺-ATPase, et
20 par un anticorps secondaire marqué par Alexa-568 pour détecter l'anticorps de lapin dirigé contre la Survivine, le LC3b ou Pouf5/Oct4.

Les préparations contenaient toujours un marqueur fluorescent spécifique de l'ADN nucléaire, à savoir le Hoechst 33258.

- 25 Lors de la révélation, les différentes molécules marquées ont été révélées par utilisation des jeux de filtres appropriés pour chaque fluorochrome visé.

II- RESULTATS

30

1- Expérimentations sur lot N°1

1.1- Première expérimentation

- 35 Lors d'une première expérimentation sur le lot N°1, on a cherché à étudier la variation sur 24 h de la perte cellulaire au niveau de la muqueuse

gastrique d'un enfant prématuré, en suivant la cinétique d'expression de marqueurs circadiens dans ces cellules par dosage ELISA.

L'ensemble des six biomarqueurs du tableau 1 ont été détectés, au moyen des sept anti-corps du tableau 2.

- 5 Les graphes des figures 1A à 1D montrent le profil circadien d'exfoliation cellulaire de l'enfant, avec tous les marqueurs (figure 1A), avec les marqueurs de phénotype uniquement (figure 1B), avec les marqueurs d'autophagie uniquement (figure 1C), et avec les marqueurs de l'horloge uniquement (figure 1D).
- 10 Ce profil correspond à une série d'échantillons positifs de volume minimum 500 µl. L'aspect blanc laiteux observé indique que l'échantillon comportait une fraction de lait non digéré.

- Ainsi, on observe que l'exfoliation des cellules de la muqueuse gastrique de cet enfant prématuré suit un rythme circadien, qu'illustrent et
- 15 contrôlent les marqueurs de l'horloge.

Sur cette base, il est possible de vérifier l'acquisition d'un rythme par l'enfant selon l'âge et calculer une amplitude, une période et une phase.

- Par exemple, la figure 1A illustre l'estimation chronobiométrique d'une
- 20 fonction cosinus à partir des données mesurées sur les cellules exfoliées du lot N°1. La fonction théorique est représentée par un symbole « cercle noir » en parallèle des valeurs obtenues par le test ELISA également représentées sur la figure 1A. La flèche blanche indique l'heure (hh:mm) de l'acrophase.

- 25 Plus précisément, dans le cas présent, les calculs ont été réalisés par Time Series Analysis Serial Cosinor, version 6.3, ExpertSoft Technologies.

L'équation proposée par le logiciel est : $0,3671 * \cos((2 \pi t/24.000) - 1,426) + 0,6555$.

- L'existence d'un rythme circadien est testée vraie par analyse de
- 30 variance et divers tests chronobiométriques au seuil 5%.

- A titre d'exemple, l'acrophase de l'exfoliation (pic de l'oscillation) pour cet enfant est : 05 h 26 min en heure de la journée (flèche blanche portée sur la figure 1A qui correspond au temps 29,44 h). Un décalage dans le pic d'un jour sur l'autre indique une altération de l'équilibre liée soit à un stress
- 35 nutritionnel soit à une maturation gastrique.

1.2- Deuxième expérimentation

Lors d'une seconde expérimentation sur des cellules du lot N°1, on a voulu montrer que les biomarqueurs de l'autophagie, de l'horloge et/ou de l'identité selon l'invention peuvent être détectés directement au microscope.

5 Pour cela, les cellules ont été isolées et fixées pour observation microscopique immédiate, ou mises en culture durant 15 jours dans un milieu de croissance classique (Dulbecco's Minimum Essential Medium supplémenté avec 2 mM L-Glutamine, 10% sérum fetal calf, amphotéricine-B –pénicilline- streptomycine et gentamycine en doses antimicrobiennes
10 classiques). Les colonies ayant poussé ont été fixées pour observation microscopique. Les observations d'immunomarques ont été obtenues sur un microscope à épifluorescence Nikon Eclipse 400.

L'isolement des cellules quiescentes utiles pour une immunodétection a été observé uniquement à partir du troisième jour de vie. Les cellules
15 isolées d'aspirats de fluides gastriques antérieurs (jour de naissance jusqu'au second jour de vie, correspondant au premier contenu gastrique) sont en sénescence et impropres pour une utilisation en immunodétection.

Il est alors possible de suivre de manière fiable les phénotypes cellulaires via un système d'analyse quantitative d'images microscopiques.

20 Ainsi, les figures 3A, 3B et 3C montrent l'expression du marqueur de cellules-souches (Pouf5/Oct4) dans des cellules exfoliées fraîchement isolées de la muqueuse gastrique d'un enfant prématuré, respectivement sur Hoechst (figure 3A), Alexa 438 (figure 3B) et fond clair+Hoechst (figure 3C).

Les figures 3C, 3D et 3E, elles, montrent l'expression du marqueur de
25 cellules-souches (Pouf5/Oct4) dans des cellules exfoliées isolées de la muqueuse gastrique d'un enfant prématuré, et mises en culture, respectivement sur fond clair et lumière UV (figure 3D), Alexa 438 (figure 3E) et Hoechst (figure 3F).

On observe que ces cellules épithéliales quiescentes peuvent être
30 cultivées après exfoliation, ce qui suggère que l'autophagie, induite par un détachement des cellules, contribue à préserver la viabilité de ces cellules.

1.3- Troisième expérimentation

Lors de cette troisième expérimentation, on a voulu montrer qu'il était
35 possible, avec les anti-corps selon l'invention, d'exclure rapidement et

aisément des séries d'échantillons non-conformes à une charte de qualité donnée, par dosage ELISA.

Pour cela, il suffit de procéder à la détection des biomarqueurs exprimés par les cellules gastriques exfoliées. Il convient de pouvoir
5 comparer ces résultats avec une courbe de référence, spécifique par exemple d'une tranche d'âge et/ou d'une pathologie et/ou d'un traitement donné etc., pour lesdits marqueurs.

Le profil représenté dans le graphe de la figure 6 montre une série « négative ». Les échantillons sont tous de volume inférieur à 500 µl
10 (compris entre 50 µl et 300 µl), un échantillon étant par ailleurs manquant. Dans le cas présent, l'aspect des échantillons était marron sale indiquant une série non-conforme. Ces allégations visuelles ont été confirmées lors de l'analyse des biomarqueurs. Comparativement au profil représenté sur les graphes de la figure 1, on observe en effet une discordance dans les taux
15 d'expression des marqueurs de l'autophagie et de l'horloge.

2- Expérimentation sur le lot N°2

Lors de l'expérimentation sur le second lot de cellules, on a cherché à suivre l'évolution, par dosage ELISA, de la maturation de l'épithélium
20 gastrique, sur cinq enfants prématurés différents, à partir d'échantillons prélevés une fois par semaine, entre le troisième jour de vie et le retrait de la sonde gastrique, soit environ vers le quarantième jour de vie.

On a, selon les cas, détecté un ou les deux biomarqueurs de l'identité présentés dans le tableau 1, un ou les deux biomarqueurs de l'autophagie
25 présentés dans le tableau 1 et un ou les deux biomarqueurs de l'horloge présentés dans le tableau 1, en utilisant les anti-corps correspondants présentés dans le tableau 2.

Les différences de profil entre les enfants (figures 2A à 2E) sont indicatives et leur interprétation pour partie liées à l'âge gestationnel des
30 enfants et à leur historique clinique.

Ainsi, l'expression soudainement élevée de PERIOD1 sur les profils des enfants 3 (figure 2C) et 5 (figure 2E), sans évolution notable des niveaux des autres biomarqueurs, suggère une réponse à un stress nutritionnel ou
35 médicamenteux récent à surveiller ou à retrouver dans le dossier de suivi du patient.

L'expression du facteur transcriptionnel CLOCK ne permet pas à elle seule d'interprétation nette sans courbes de référence pour chaque âge. Par contre, en lien avec les autres biomarqueurs, elle permet de moduler l'interprétation. Ainsi, les profils d'exfoliation des enfants 1 (figure 2A), 2 (figure 2B) et 4 (figure 2D) illustrent une maturation progressive de l'épithélium gastrique.

Cette expérimentation permet de montrer qu'il est possible, grâce à l'invention, de suivre des enfants d'âges gestationnels différents pendant la durée de leur hospitalisation.

3- Expérimentation sur le lot N°3

On a voulu ici suivre par dosage ELISA l'évolution en parallèle des marqueurs d'autophagie sur des cellules humaines exfoliées mécaniquement, et maintenues en survie pendant 3 heures dans un tampon salin phosphate à température ambiante sans source énergétique, afin de reproduire des conditions similaires à un échantillon oublié sur la paillasse.

La figure 4 montre ainsi l'augmentation du taux d'expression de la SURVIVINE et de LC-3-b sur 3 heures sur des cellules buccales exfoliées d'un individu humain adulte.

Plus précisément, les cellules exfoliées voient leur taux de biomarqueurs de l'autophagie augmenter de manière significative au cours de la première heure, pour atteindre un palier à une densité optique mesurée à 405 nm de 2,250 et s'y maintenir au cours des heures suivantes.

4- Expérimentation sur le lot N°4

Lors de cette expérimentation, on a voulu suivre par dosage ELISA les effets inducteurs de l'exfoliation lorsqu'une préparation médicamenteuse ou nutritionnelle est prise par la bouche. Pour des raisons éthiques, cette expérimentation a été conduite sur des cellules de rats.

Le graphe de la figure 5 montre l'effet exacerbant sur l'exfoliation des cellules de la muqueuse gastrique, d'une exposition par voie orale à une dose d'Ibuprofène ou de L-Tryptophane, comparativement à une dose de sérum physiologique représentant le témoin négatif, chez le raton de douze jours lors d'un cycle diète/réalimentation qui induit le phénomène d'exfoliation des cellules de la muqueuse gastrique.

La dose d'ibuprofène administrée aux rats est en corrélation avec celle donnée à un enfant prématuré (10 mg / kg de poids vif).

La dose de L-Tryptophane administrée correspond à celle classiquement donnée à un rat adulte lors d'étude sur cet acide aminé (50
5 mg / kg de poids vif).

Chez le raton de 12 jours, le rythme de vie, qui consiste à manger la nuit et à dormir le jour, commence à se mettre en place (bien que la mère allaite encore le raton de 12 jours de jour comme de nuit). L'exfoliation est donc circadienne avec une forte sensibilité à "midi" et une faible sensibilité
10 aux perturbations par un bolus alimentaire à "minuit".

Ainsi, dans le cas présent, donner un bolus par la bouche à "minuit" (ici 01H00) perturbe peu l'épithélium gastrique.

Selon l'invention, il est possible de déterminer aisément le meilleur moment de la journée chez un individu donné, ou sur un groupe d'individus,
15 pour la prise d'un traitement, et de savoir si il est préférable ou non de l'associer à la prise d'aliments, pour minimiser des effets nocifs ulcérant sur l'estomac. Ainsi chez l'humain, pour l'ibuprofène, il faut avantageusement administrer la dose orale à certaines heures correspondant à la zone "active", c'est à dire le jour en association avec un aliment.

20 Par ailleurs, on a comparé les niveaux d'expression, mesurés par dosage ELISA, des marqueurs de l'autophagie et de l'horloge chez les mêmes rats de 12 jours en période d'allaitement, d'une part sur des cellules épithéliales exfoliées gastriques, et d'autre part sur des cellules présentes dans la muqueuse gastrique.

25 Il a été obtenu les résultats suivants (les % indiqués ci-après expriment le taux de cellules exfoliées exprimant le même niveau de marqueur que celles présentes dans la muqueuse gastrique)

Survivine : à 01H00 : 78%

à 13H00 : 84%

30 LC3-b : à 13H00 : 90%

CLOCK : à 13H00 : 100%

Ces résultats démontrent que pour les marqueurs conformes à l'invention, les cellules exfoliées suivent le profil d'intensité des cellules de la muqueuse gastrique, qui ont une distribution « minuit » strictement disjointe
35 de la distribution « midi ». Ceci confirme la pertinence du procédé selon

l'invention pour étudier l'état physiologique d'une muqueuse gastrique sans réaliser de biopsies.

5- Expérimentation sur le lot N°5

5 Lors de cette expérimentation, il a été étudié le profil d'exfoliation de cellules gastriques H⁺/K⁺-ATPases de quatre enfants prématurés (Enfants 1 à 4) prélevés toutes les trois heures sur deux nycthémères consécutifs, par dosage ELISA.

10 Ces profils sont représentés sur les Figures 7A (pour les Enfants 1 et 2) et 7B (pour les Enfants 3 et 4). Sur ces figures, les flèches blanches indiquent les acrophases et les flèches noires les bathyphases.

Les profils montrés sur ces figures démontrent la répétabilité de l'exfoliation de cellules positives pour H⁺/K⁺-ATPases pour un même enfant, ce qui confirme la pertinence de sélectionner de telles cellules pour l'étude
15 des autres biomarqueurs.

6- Analyse par microscopie confocale

Un échantillon du Lot N°1 a été déposé sur une puce adaptée aux observations microscopiques, de telle sorte que chaque cellule soit repérable
20 individuellement.

Chaque cellule positive pour H⁺/K⁺-ATPase a été repérée par microscopie confocale (Figure 8A), de manière visuelle ou automatique, au moyen de l'anticorps décrit dans le Tableau 2 ci-dessus et d'un anticorps secondaire anti-souris marqué par le fluorochrome Alexa-488.

25 On a également vérifié que chaque cellule ainsi identifiée était quiescente, au moyen par exemple du marqueur de l'intégrité nucléaire Hoechst 33258 (Figures 8B à 8D, clichés bas).

Sur chacune des cellules ainsi préalablement sélectionnées, on a analysé, toujours par microscopie confocale, les niveaux d'expression des
30 marqueurs de l'autophagie, des marqueurs de l'horloge et de l'identité cellulaire d'intérêt, au moyen des couples d'anticorps décrits ci-avant (pour chaque marqueur protéique, anticorps du Tableau 2 et anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorochrome Alexa-568).

Les clichés obtenus sont montrés sur les Figures 8B pour la Survivine
35 (cliché haut), 8C pour LC3 (cliché haut) et 8D pour CLOCK (cliché haut).

Un tel mode de mise en œuvre par sélection préalable des cellules positives pour H⁺/K⁺-ATPases, préférentiellement associé à un test de contrôle du caractère quiescent des cellules, permet avantageusement d'obtenir un résultat fiable sur l'état réel de la muqueuse gastrique.

BIBLIOGRAPHIE

- Aoyama F, Sawaguchi A, Ide S, Kitamura K, Suganuma T. (2008). Exfoliation of gastric pit-parietal cells into the gastric lumen associated with a stimulation of isolated rat gastric mucosa in vitro: a morphological study by the application of cryotechniques. *Histochem. Cell Biol.* 129: 785-793.
- 5 - Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, and Zoran MJ. (2005) Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet.* 6: 544–556.
- Davidson LA, Lupton JR, Miskovsky E, Fields AP, Chapkin RS. (2003). Quantification of human intestinal gene expression profiles using exfoliated colonocytes: a pilot study. *Biomarkers* 8: 51-61.
- 10 - Dimaline R, Andrea Varro A. (2007) Attack and defence in the gastric epithelium a delicate balance. *Exp Physiol* 92;591-601.
- Frisch SM, Francis H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619-626.
- 15 - Gilmore AP. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ.* 12 (suppl 2), 1473-1477.
- Kaeffer B, Des Robert C, Alexandre Gouabau MC, Pagniez A, Legrand A, Amarger V, Küster A, Piloquet H, Champ M, Le Huërou-Luron I, Rozé J-C (2007). Recovery of exfoliated cells from the gastro-intestinal tract of premature infants: a new tool to obtain “non-invasive biopsies”? *Pediatric Research*, 62: 564-569.
- 20 - Kaeffer B, Rozé JC. (2009) Base de données NeoExfolCel: Biomarqueurs de cellules exfoliées digestives de l'enfant prématuré. Sigle: NeoExfolCel (NEC), 2009, IDDN.FR.001.230013.000.R.P.2009.000.10300
- 25 - Kaeffer B. (2010) Exfoliated epithelial cells: potentials to explore gastrointestinal maturation of preterm infants. *Brazilian Journal of Mother and Child Health* 10: 13-24.
- Kitazawa H, Nishihara T, Nambu T, Nishizawa H, Iwaki M, Fukuhara A, Kitamura T, Matsuda M, Shimomura I. (2004). Intectin, a novel small intestine-specific glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, accelerates apoptosis of intestinal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 42867-42874.
- 30

- Klein P, Glaser E, Grogan L, Keane L, Lipkowitz S, Sobalie P, Brooks L, Jenkins J, Steinberg SM, DeMarini DM, Kirsch I. (2001). Biomarker assays in nipple aspirate fluid. *Breast J.* 7: 378-387.
- Liu Z, Li H, Wu X, Yoo BH, Yan SR, Stadnyk AW, Sasazuki T, Shirasawa S, LaCasse EC, Korneluk RG, Rosen KV. (2006). Detachment-induced upregulation of XIAP and cIAP2 delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 25: 7680-7690.
- Lock R, Debnath J. (2008). Extracellular matrix regulation of autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 20: 583-588.
- 10 - MOREL F., 2008. Optimisation de l'isolement de cellules exfoliées gastriques et coliques du prématuré. Mémoire de Master Science de l'Aliment et Nutrition Humaine, Université de Nantes, p 35.
- Nomura S, Esumi H, Job C, Tan S-S. Lineage and clonal development of gastric glands. *Developmental Biology* 204: 124-135; 1998.
- 15 - Qiao X, Ziel JW, McKimpson W, Madison BB, Todisco A, Merchant JL, Samuelson LC, Gumucio DL. Prospective identification of a multi-lineage progenitor in murine stomach epithelium. *Gastroenterology* 133: 1989-1998; 2007.
- Thompson PA, Kadlubar FF, Vena SM, Hill HL, McClure GHY, McDaniel LP, Ambrosone CB. (1998). Exfoliated ductal epithelial cells in human breast milk: a source of target tissue DNA for molecular epidemiologic studies of breast cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 7: 37-42.
- 20 - Yan SR, Joseph RR, Rosen K, Reginato MJ, Jackson A, Allaire N, Brugge JS, Jobin C, Stadnyk AW. (2005). Activation of NF-kappa B following detachment delays apoptosis in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 24: 6482-6491.
- 25

REVENDICATIONS

1- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique à partir de cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique d'un individu animal, humain ou non humain, selon lequel :

- 5 a) on soumet des cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique dudit individu récupéré à un instant T, à un ensemble d'anticorps susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques, parmi au moins un marqueur de l'autophagie et au moins un marqueur de l'horloge.

- 10 2- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte une étape préalable a0) de sélection de cellules exfoliées et isolées dudit fluide biologique, et qui expriment un marqueur de l'identité cellulaire indicatif d'une cellule pariétale gastrique dudit individu, et en ce que l'étape a) est mise en œuvre sur les cellules sélectionnées au cours de ladite étape a0).

- 15 3- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit marqueur de l'identité cellulaire est H⁺/K⁺-ATPase.

- 20 4- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on répète l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), sur des cellules exfoliées et isolées d'un fluide biologique dudit individu récupéré à un instant T+n.

- 25 5- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps de l'étape a) comporte au moins des anticorps anti-SURVIVINE et/ou des anticorps anti-LC3, en tant que marqueurs de l'autophagie.

- 6- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce

que l'ensemble d'anticorps de l'étape a) comporte au moins des anticorps anti-PERIOD1 et/ou des anticorps anti-CLOCK, en tant que marqueurs de l'horloge.

5 7- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps de l'étape a) comporte également des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur de l'identité cellulaire.

10 8- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps de l'étape a) comporte au moins des anticorps susceptibles d'interagir avec H⁺/K⁺-ATPase et/ou des anticorps susceptibles d'interagir avec Pouf5/Oct-4, en tant que marqueurs de l'identité cellulaire.

15 9- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on répète l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins toutes les 12 heures pendant au moins 24h, de manière à évaluer la mise en place d'un rythme circadien de l'exfoliation cellulaire chez l'individu dont les cellules sont issues.

20 10- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on répète l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins toutes les 12 heures pendant au moins 72h, de manière à analyser le rythme circadien de l'exfoliation cellulaire chez l'individu dont les cellules sont issues.

25 11- Procédé d'évaluation in vitro de l'état physiologique d'une muqueuse gastrique selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on répète l'étape a), et le cas échéant l'étape a0), au moins une fois par semaine pendant au moins deux semaines, pour suivre l'évolution de la maturation de la muqueuse gastrique de l'individu dont les cellules sont issues.

30 12- Kit pour l'évaluation de l'état physiologique de la muqueuse gastrique d'un individu animal, humain ou non humain, destiné à être

appliqué in vitro à des cellules gastriques exfoliées dudit individu, caractérisé en ce qu'il comporte un ensemble d'anticorps susceptibles d'interagir avec des marqueurs protéiques parmi au moins un marqueur de l'autophagie et au moins un marqueur de l'horloge.

- 5 13- Kit selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps comporte des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur parmi la SURVIVINE et la LC3, en tant que marqueur de l'autophagie.

- 10 14- Kit selon l'une des revendications 12 à 13, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps comporte des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur parmi PERIOD1 et CLOCK, en tant que marqueur de l'horloge.

- 15 15- Kit selon l'une des revendications 12 à 14, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps comporte des anticorps susceptibles d'interagir avec au moins un marqueur de l'identité cellulaire.

16- Kit selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'ensemble d'anticorps comporte au moins des anticorps susceptibles d'interagir avec H⁺/K⁺-ATPase et/ou des anticorps susceptibles d'interagir avec Pouf5/Oct-4, en tant que marqueurs de l'identité cellulaire.

Fig. 1A

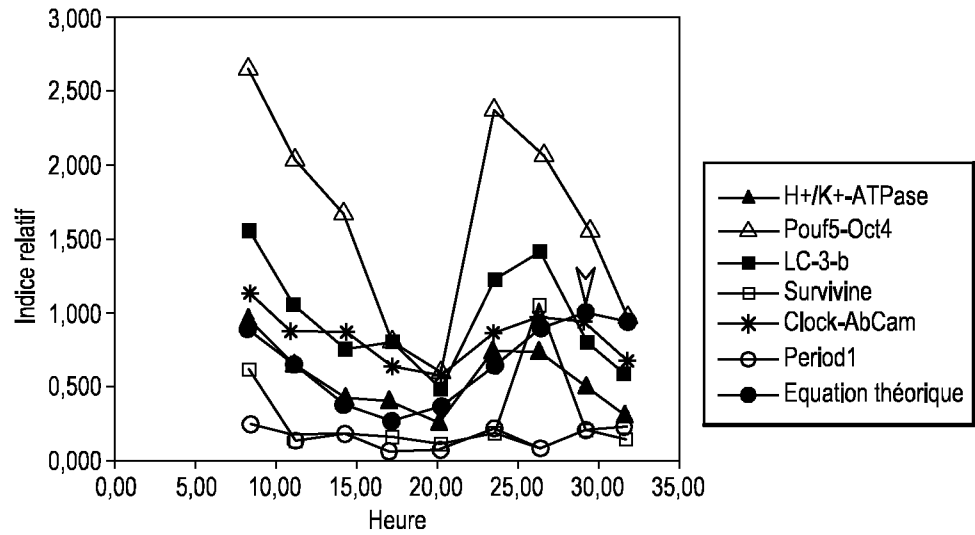


Fig. 1B

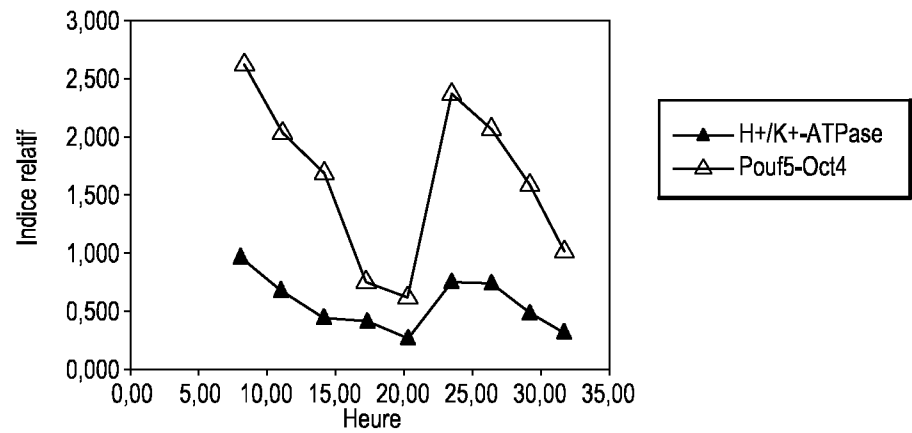


Fig. 1C

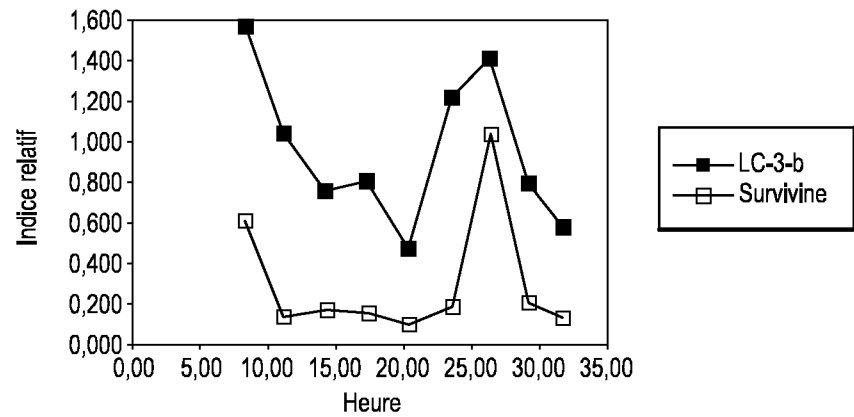
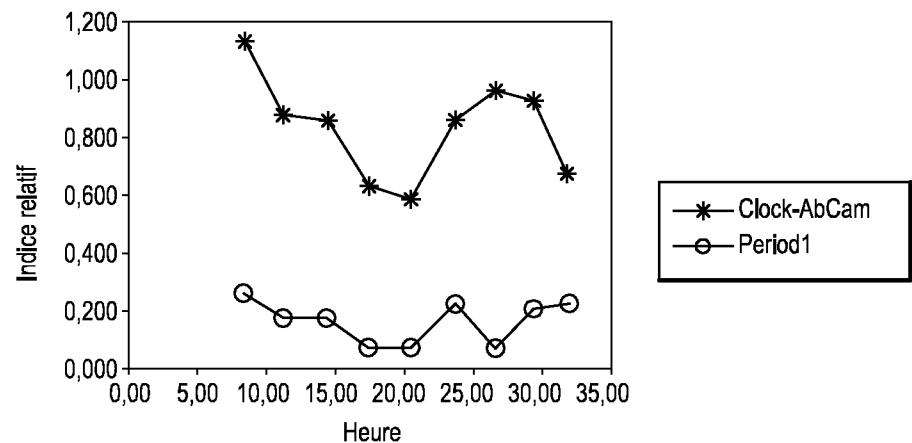


Fig. 1D



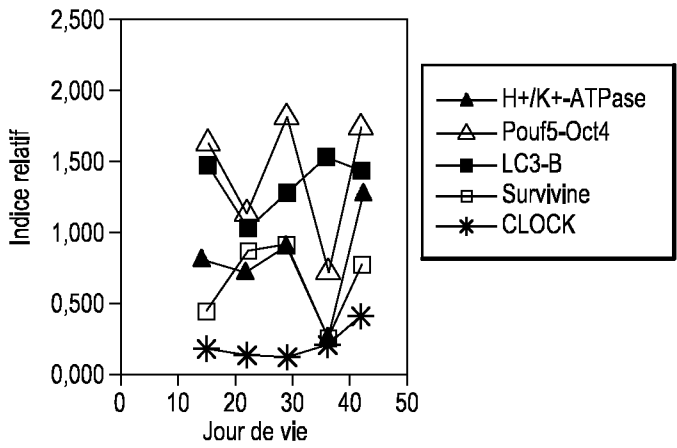


Fig. 2A

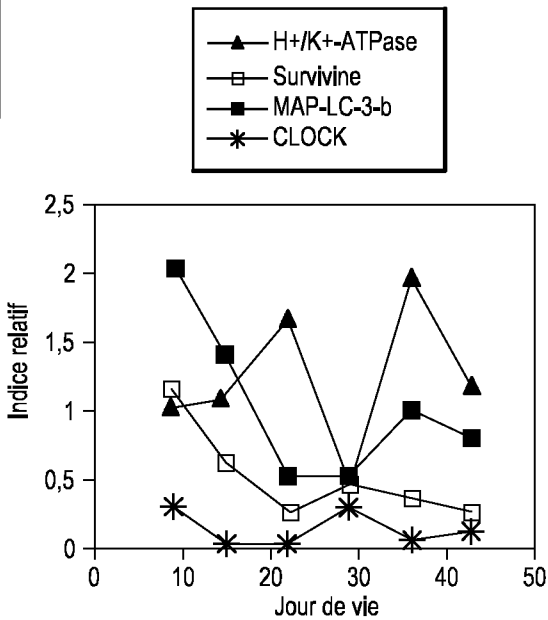


Fig. 2B

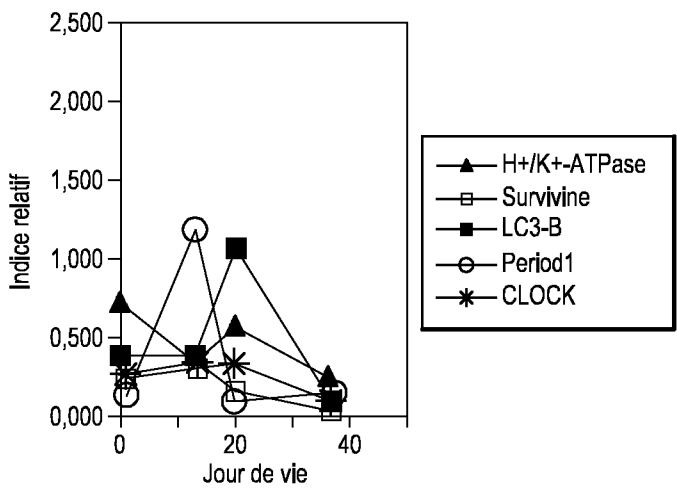


Fig. 2C

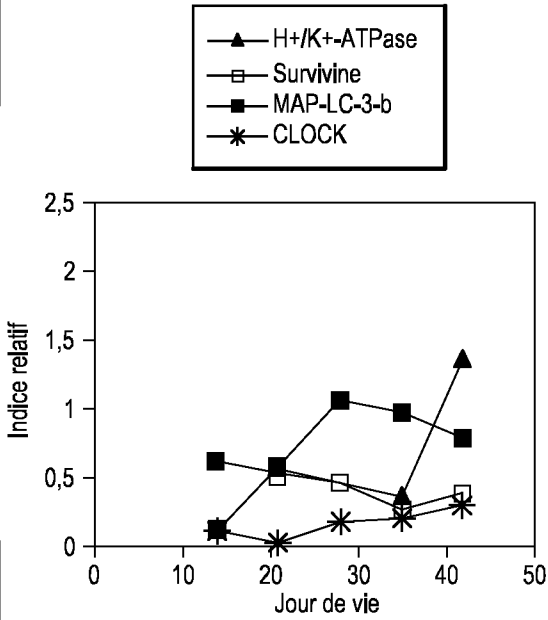


Fig. 2D

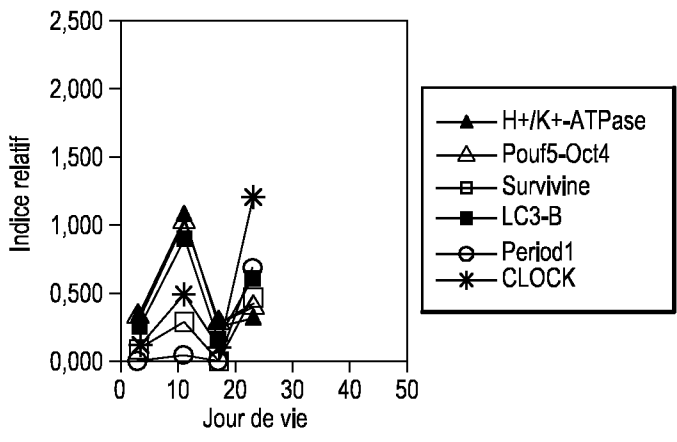


Fig. 2E

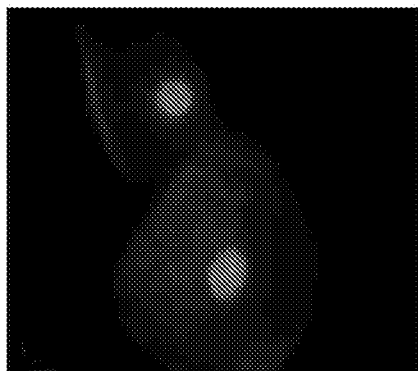


Fig. 3A

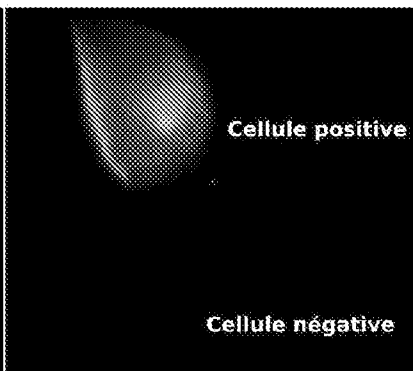


Fig. 3B

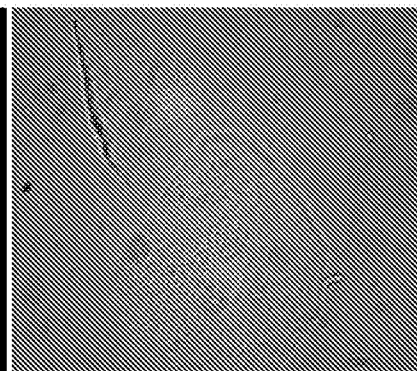


Fig. 3C

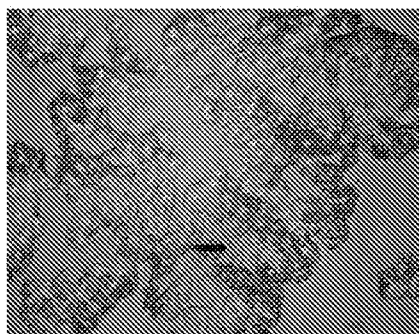


Fig. 3D

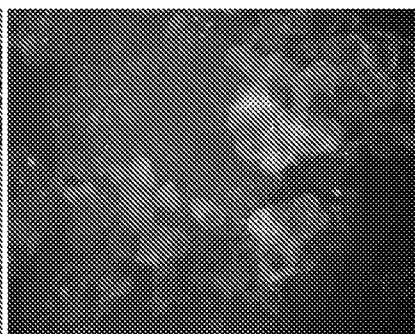


Fig. 3E

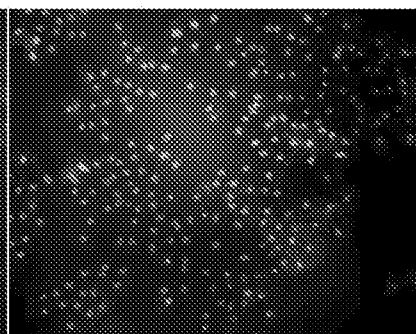


Fig. 3F

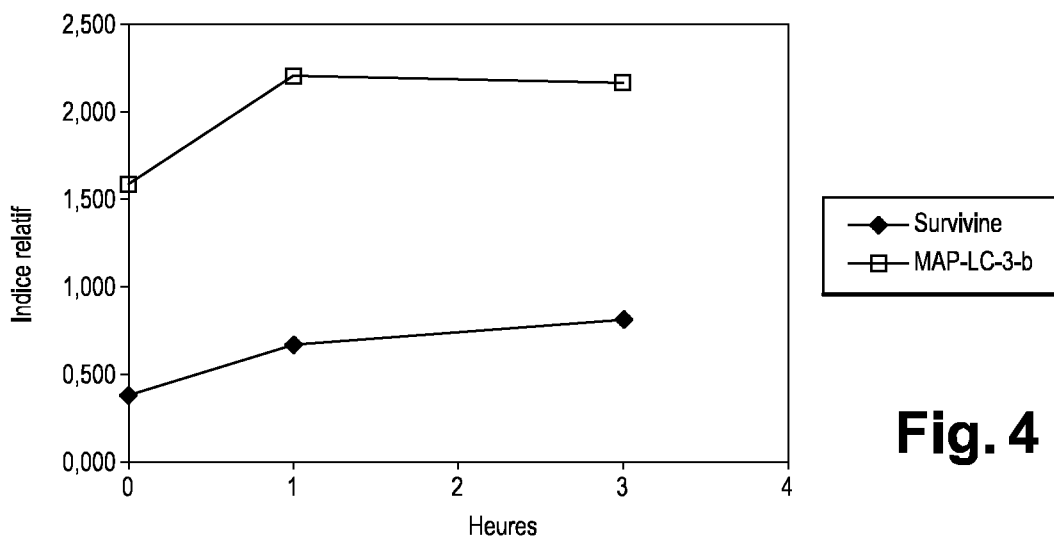


Fig. 4

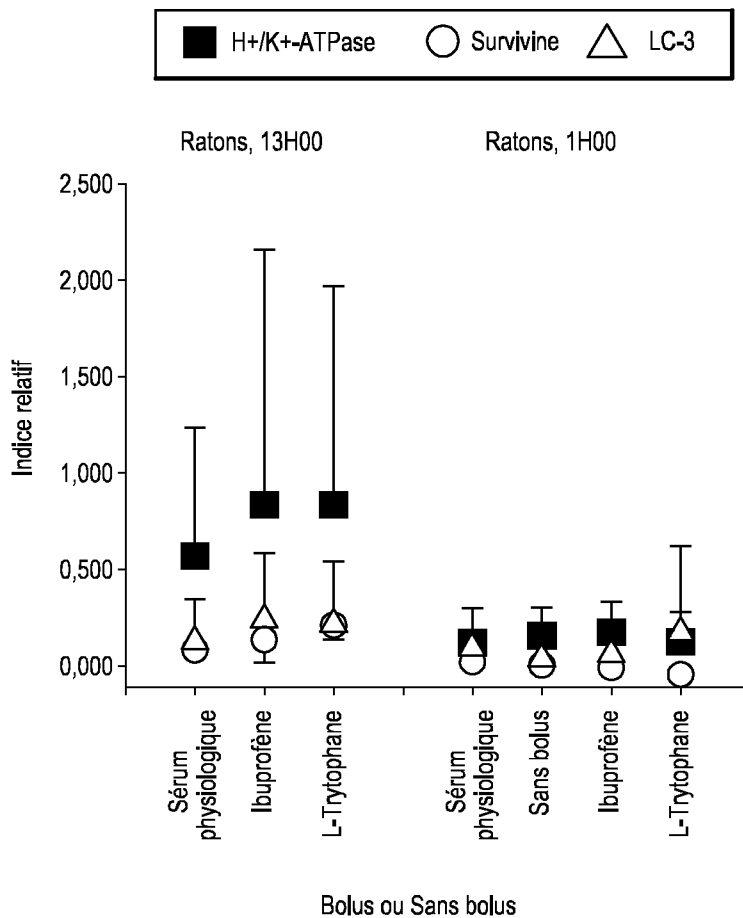


Fig. 5

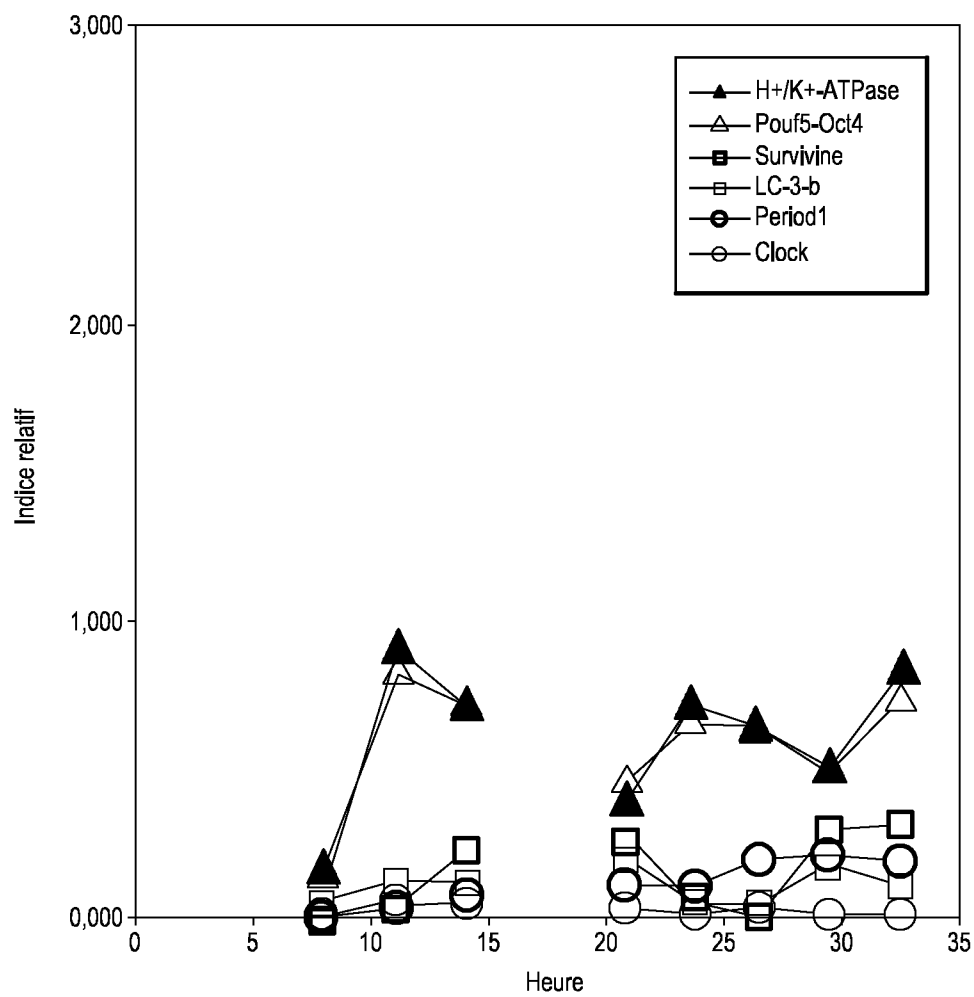
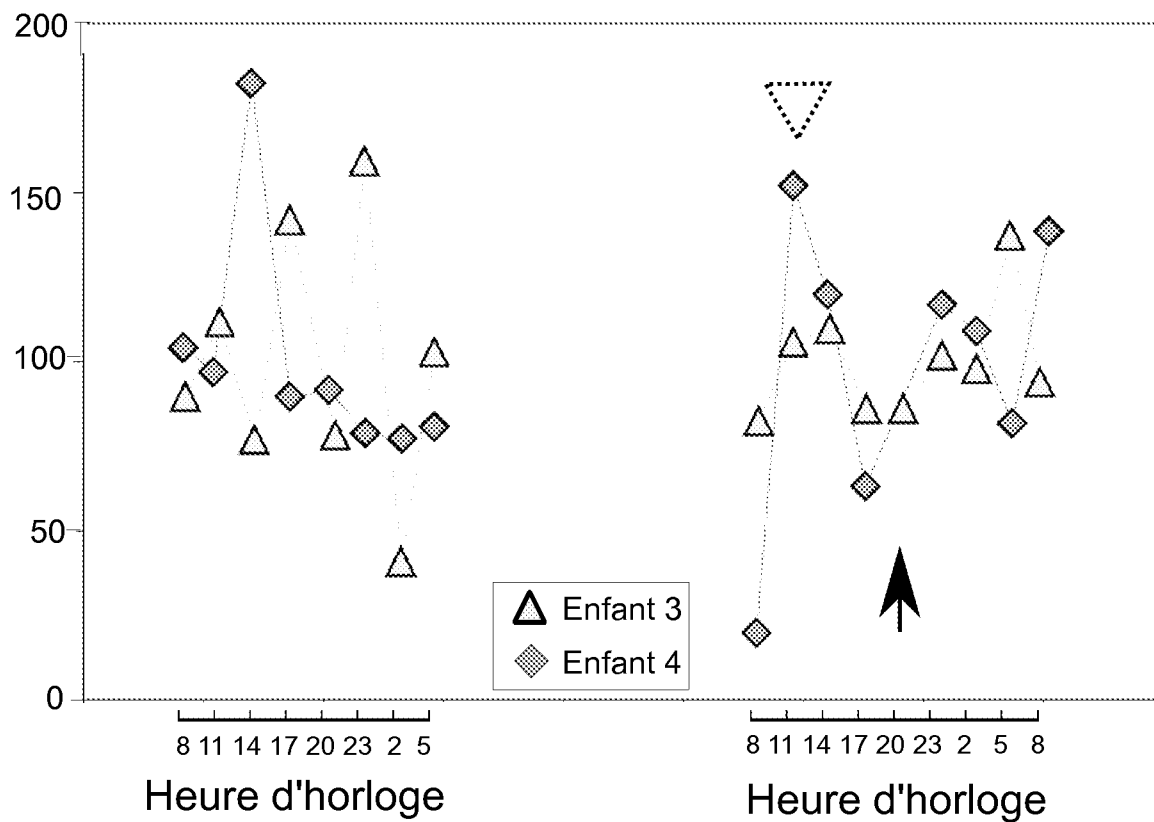
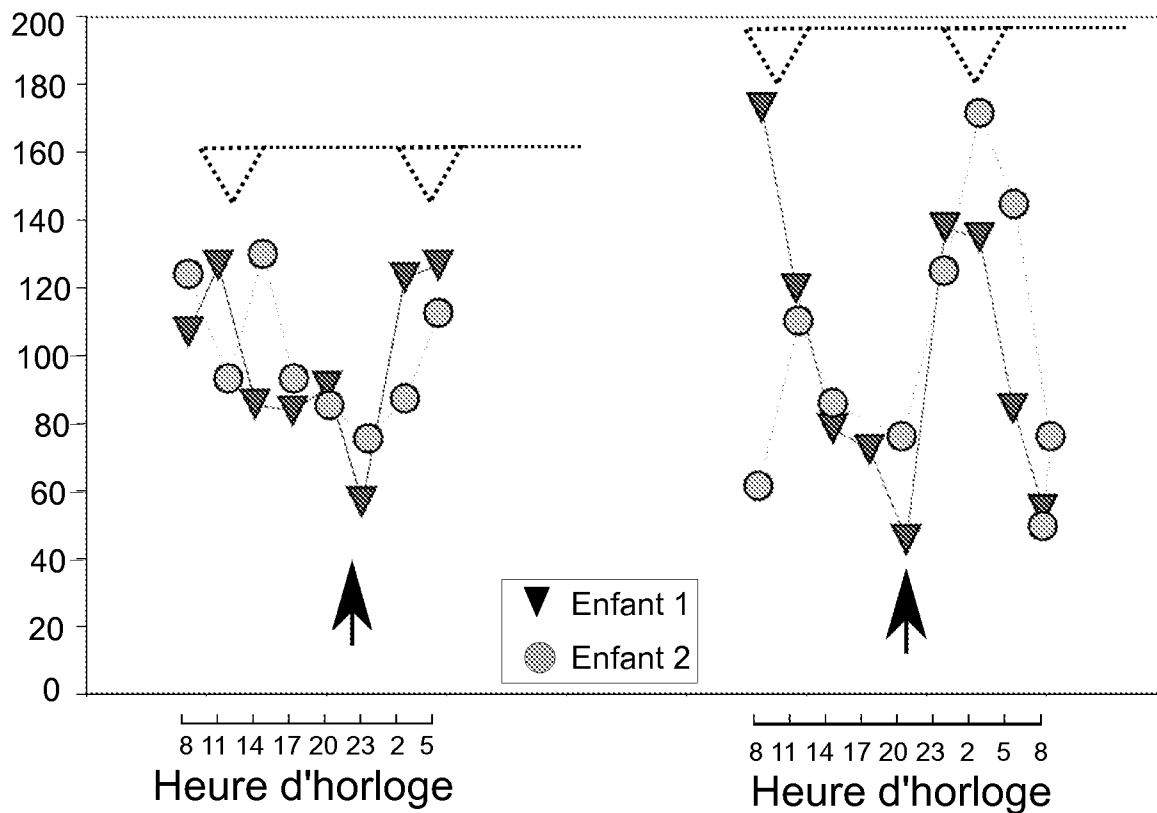
**Fig. 6**

Fig.7A**Fig.7B**

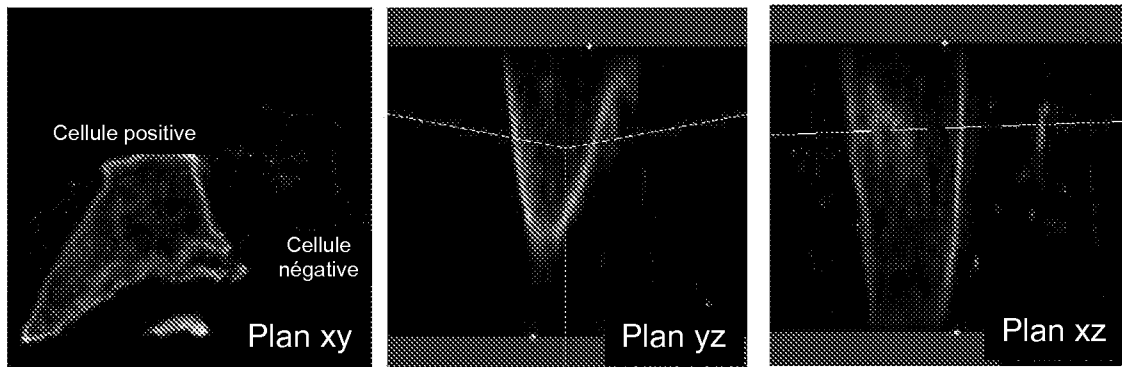
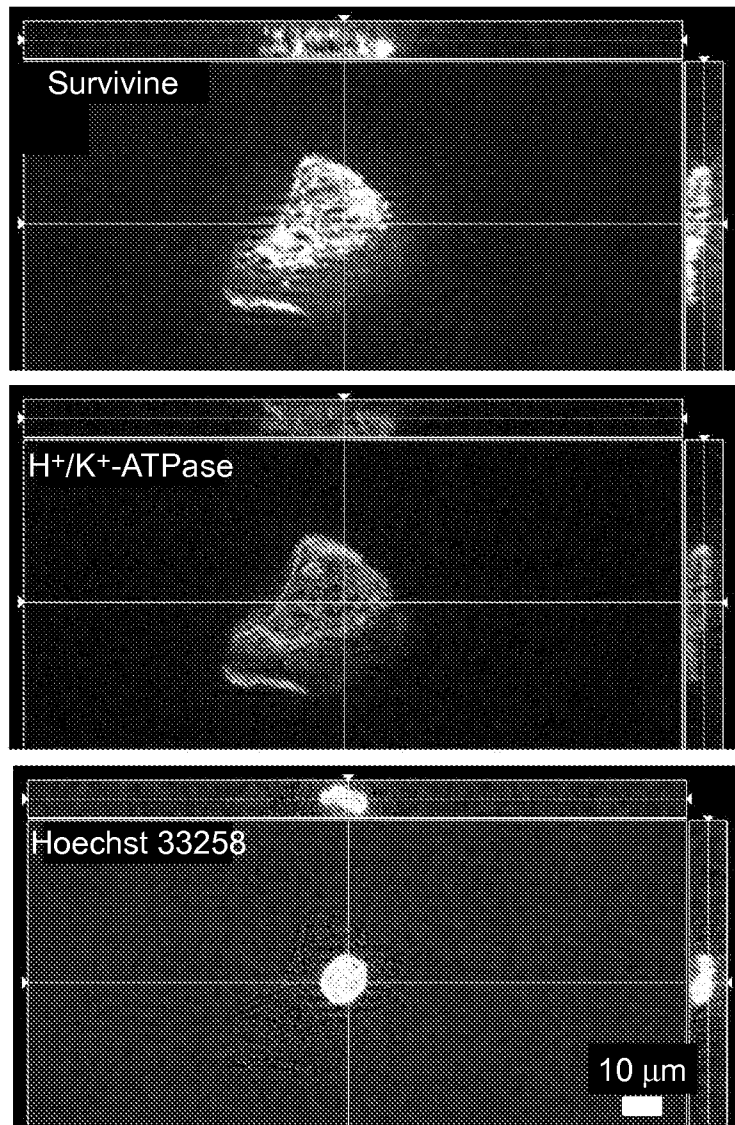
**Fig.8A****Fig.8B**

Fig.8C

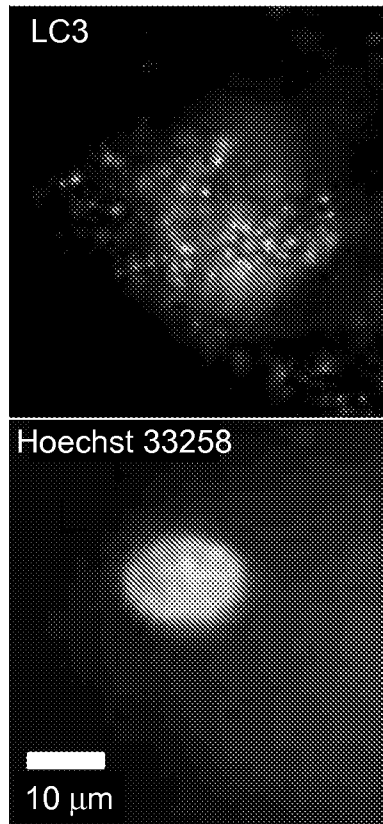
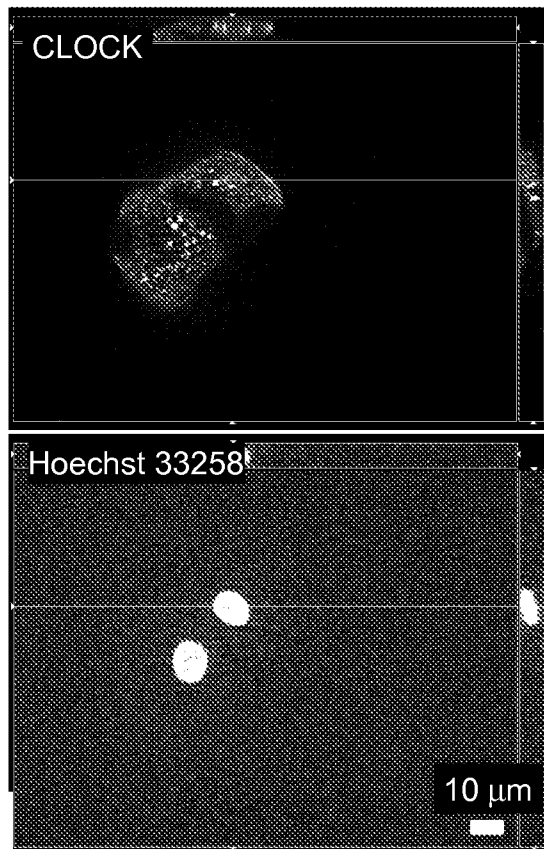


Fig.8D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/058984

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 G01N33/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAEFFER B.: "Exfoliated epithelial cells: potentials to explore gastrointestinal maturation of preterm infants", REV. BRAS. SAÚDE MATERN. INFANT. RECIFE, vol. 10, no. 1, January 2010 (2010-01), pages 13-24, XP002600594, cited in the application	1,4-15
Y	abstract figure 1 page 16, column 1 page 20, column 1 - page 21, column 2 ----- -/--	2,3,8,16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2011

Date of mailing of the international search report

26/09/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Giry, Murielle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/058984

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAEFFER BERTRAND ET AL: "Recovery of exfoliated cells from the gastrointestinal tract of premature infants: a new tool to perform "noninvasive biopsies?".", PEDIATRIC RES., vol. 62, no. 5, November 2007 (2007-11), pages 564-569, XP002600595, cited in the application abstract page 564 page 568, column 2 table 3 -----	1-16
Y	SACHDEVA U.M. ET AL.: "Diurnal rhythms of autophagy - Implications for cell biology and human disease", AUTOPHAGY, vol. 4, no. 5, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 581-589, XP002600596, abstract page 585, column 1 figure 3 -----	1-16
Y	AOYAMA F. ET AL.: "Exfoliation of gastric pit-parietal cells into the gastric lumen associated with a stimulation of isolated rat gastric mucosa in vitro: a morphological study by the application of cryotechniques", HISTOCHEM. CELL BIOL., vol. 129, no. 6, 26 February 2008 (2008-02-26), pages 785-793, XP019629818, abstract page 787, column 1, paragraph 1 -----	2,3,8,16
Y	CHEN Z. ET AL.: "Oct4, a novel marker for human gastric cancer", J. SURG. ONCOL., vol. 99, no. 7, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 414-419, XP55006834, abstract page 414, column 1, lines 5-8 page 415, column 2, lines 8-9, paragraph 2 page 416, column 2, last paragraph - page 418, column 1, paragraph 2 page 418, column 2, paragraphs 2,4 -----	2,8,16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2011/058984

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. G01N33/50 G01N33/68 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	KAEFFER B.: "Exfoliated epithelial cells: potentials to explore gastrointestinal maturation of preterm infants", REV. BRAS. SAÚDE MATERN. INFANT. RECIFE, vol. 10, no. 1, janvier 2010 (2010-01), pages 13-24, XP002600594, cité dans la demande	1,4-15
Y	abrégé figure 1 page 16, colonne 1 page 20, colonne 1 - page 21, colonne 2 ----- -/--	2,3,8,16
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets	
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
12 septembre 2011	26/09/2011	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Giry, Murielle

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	KAEFFER BERTRAND ET AL: "Recovery of exfoliated cells from the gastrointestinal tract of premature infants: a new tool to perform "noninvasive biopsies?".", PEDIATRIC RES., vol. 62, no. 5, novembre 2007 (2007-11), pages 564-569, XP002600595, cité dans la demande abrégé page 564 page 568, colonne 2 tableau 3 -----	1-16
Y	SACHDEVA U.M. ET AL.: "Diurnal rhythms of autophagy - Implications for cell biology and human disease", AUTOPHAGY, vol. 4, no. 5, 1 juillet 2008 (2008-07-01), pages 581-589, XP002600596, abrégé page 585, colonne 1 figure 3 -----	1-16
Y	AOYAMA F. ET AL.: "Exfoliation of gastric pit-parietal cells into the gastric lumen associated with a stimulation of isolated rat gastric mucosa in vitro: a morphological study by the application of cryotechniques", HISTOCHEM. CELL BIOL., vol. 129, no. 6, 26 février 2008 (2008-02-26), pages 785-793, XP019629818, abrégé page 787, colonne 1, alinéa 1 -----	2,3,8,16
Y	CHEN Z. ET AL.: "Oct4, a novel marker for human gastric cancer", J. SURG. ONCOL., vol. 99, no. 7, 1 juin 2009 (2009-06-01), pages 414-419, XP55006834, abrégé page 414, colonne 1, ligne 5-8 page 415, colonne 2, ligne 8-9, alinéa 2 page 416, colonne 2, dernier alinéa - page 418, colonne 1, alinéa 2 page 418, colonne 2, alinéas 2,4 -----	2,8,16