

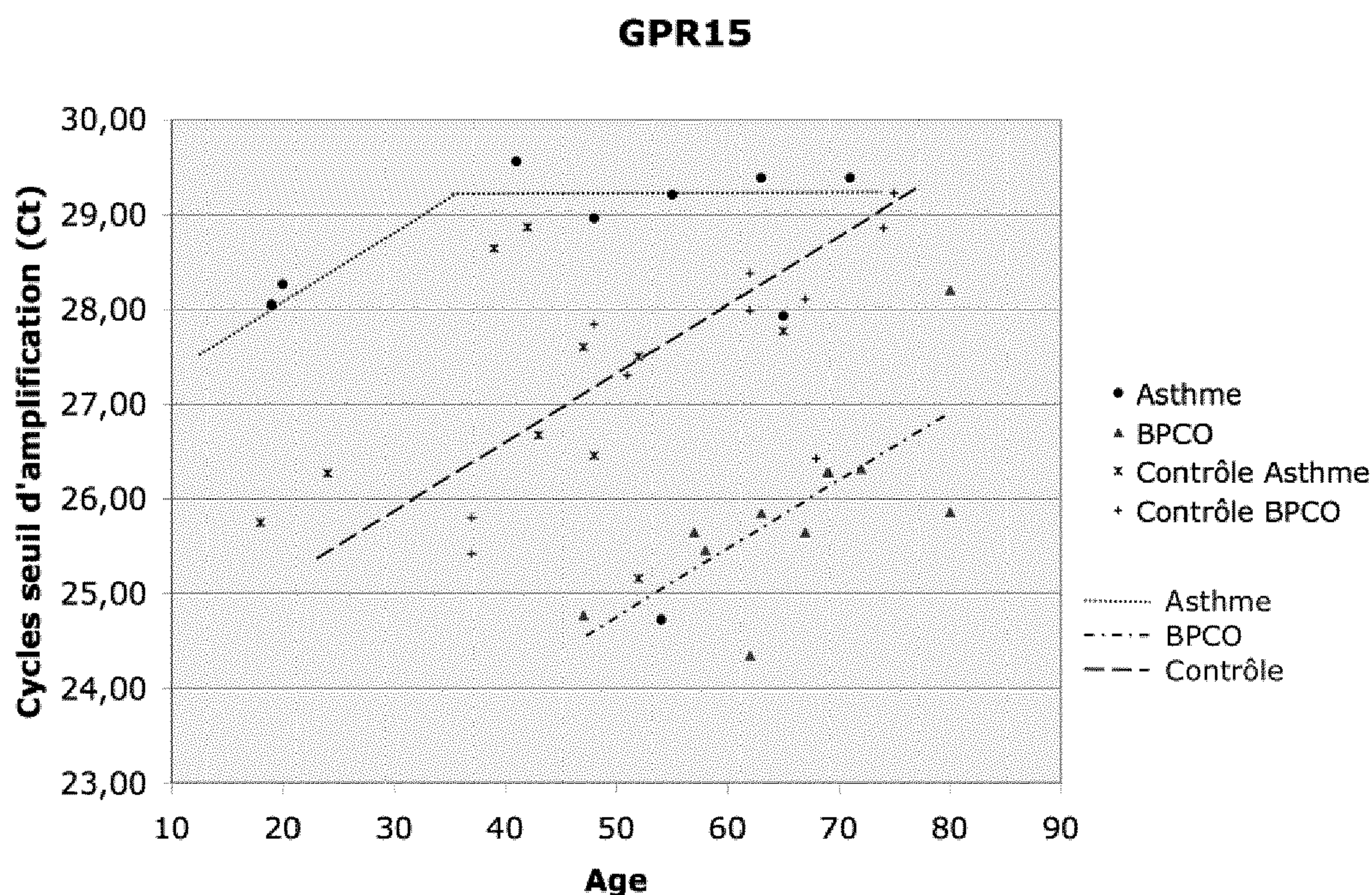


(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2013/01/31
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2013/08/08
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2014/07/28
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2013/051964
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2013/113852
(30) Priorité/Priority: 2012/01/31 (FR1250917)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01),
G01N 33/68 (2006.01)
(71) Demandeurs/Applicants:
UNIVERSITE DE STRASBOURG, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
FROSSARD, NELLY, FR;
HAIECH, JACQUES, FR;
LEHALLE, CHRISTINE, FR;
KESSLER, ROMAIN, FR;
MAGNAN, ANTOINE, FR;
CHANEZ, PASCAL, FR; ...

(54) Titre : BIOMARQUEUR POUR LES MALADIES INFLAMMATOIRES PULMONAIRES CHRONIQUES
(54) Title: BIOMARKER FOR CHRONIC INFLAMMATORY LUNG DISEASES

Figure 3



(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne un procédé in vitro de diagnostic et/ou de pronostic et/ou d'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet, utilisant le niveau d'expression du gène récepteur couplé aux protéines G GPR15, comme biomarqueur de la maladie.



(72) Inventeurs(suite)/Inventors(continued): GALZI, JEAN-LUC, FR

(74) Agent: SMART & BIGGAR

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2013/113852 A1

(43) Date de la publication internationale
8 août 2013 (08.08.2013)

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2013/051964

(22) Date de dépôt international :
31 janvier 2013 (31.01.2013)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1250917 31 janvier 2012 (31.01.2012) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE STRASBOURG [FR/FR]; 4 rue Blaise Pascal, F-67000 Strasbourg (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs : FROSSARD, Nelly; 4b, rue du Jeu de Paume, F-67000 Strasbourg (FR). HAIECH, Jacques; 2, rue du Dôme, F-67000 Strasbourg (FR). LEHALLE, Christine; 10 rue du Milieu, F-67400 Illkirch (FR).

KESSLER, Romain; 9 rue Malraux, F-67205 Oberhausbergen (FR). MAGNAN, Antoine; 3 rue Similien, F-44000 Nantes (FR). CHANEZ, Pascal; 7 rue Scudery, F-13007 Marseille (FR). GALZI, Jean-Luc; 38 rue des Messieurs, F-67500 Weitbruch (FR).

(74) Mandataires : GALLOIS, Valérie et al.; Becker & Associates, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (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, BN, 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, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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.

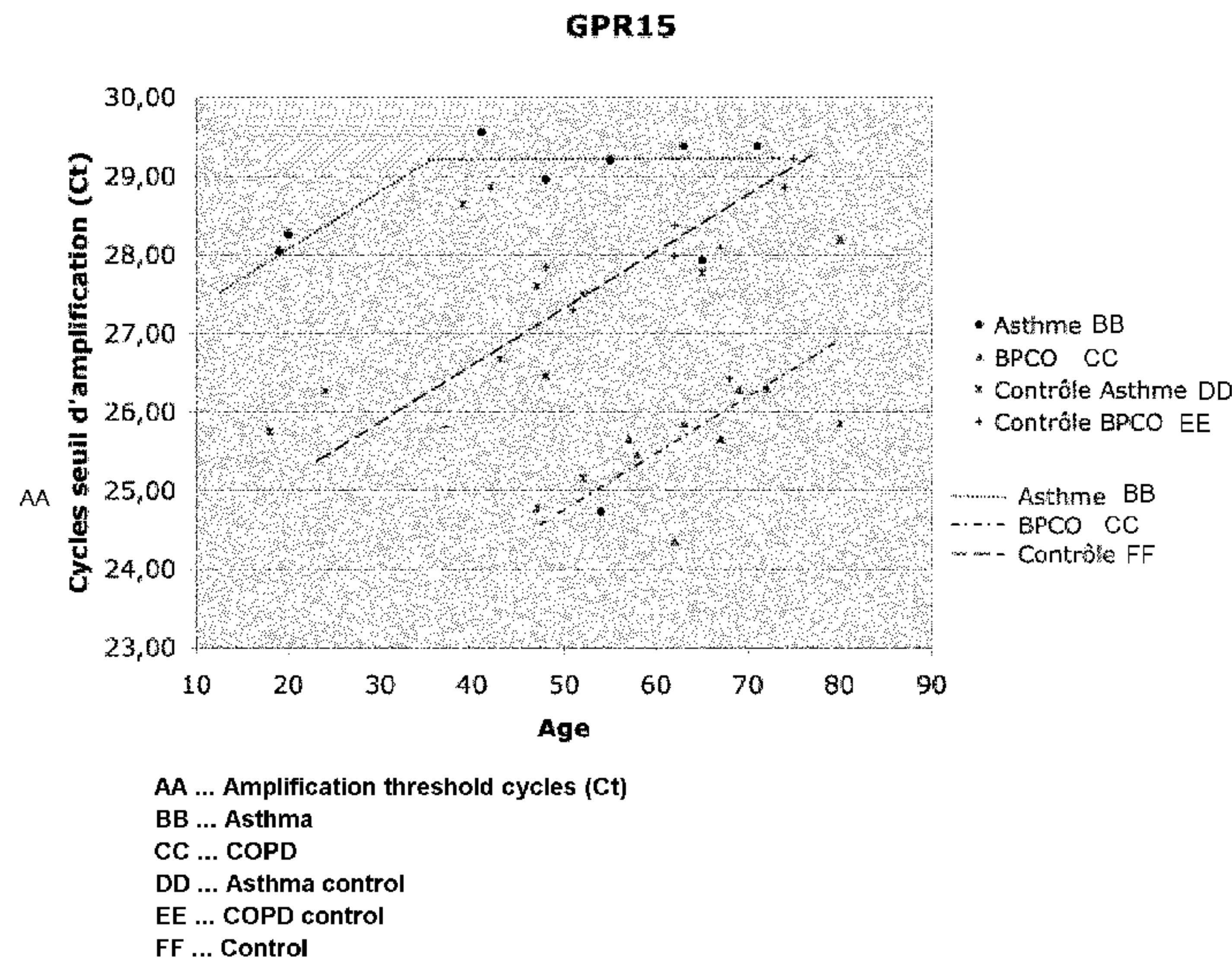
(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : BIOMARKER FOR CHRONIC INFLAMMATORY LUNG DISEASES

(54) Titre : BIOMARQUEUR POUR LES MALADIES INFLAMMATOIRES PULMONAIRES CHRONIQUES

Figure 3



(57) Abstract : The invention concerns an *in vitro* method for the diagnosis and/or prognosis and/or assessment of the development of a chronic inflammatory lung disease in a patient, using the expression level of the receptor gene coupled to GPR15 G proteins as a biomarker of the disease.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé *in vitro* de diagnostic et/ou de pronostic et/ou d'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet, utilisant le niveau d'expression du gène récepteur couplé aux protéines G GPR15, comme biomarqueur de la maladie.

WO 2013/113852 A1

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). **Publiée :** — avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

BIOMARQUEUR POUR LES MALADIES INFLAMMATOIRES PULMONAIRES CHRONIQUES

L'invention concerne l'utilisation d'un nouveau biomarqueur pour diagnostiquer une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, spécifiquement l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) chez un sujet. Le biomarqueur selon
5 l'invention permet également de déterminer la susceptibilité d'un sujet à développer une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, et/ou de suivre l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet atteint. Plus particulièrement, le marqueur permet de différencier l'asthme et la BPCO.

10 Contexte de l'invention

Les maladies inflammatoires pulmonaires chroniques, qui affectent à différents degrés l'appareil respiratoire, sont en forte expansion depuis plusieurs décennies, notamment dans les pays industrialisés. De nos jours, on estime à plus de 3 millions par an le nombre de décès dans le monde liés à ces maladies. Les principaux facteurs environnementaux
15 pointés du doigt sont le tabagisme et la mauvaise qualité de l'air. Ainsi, dans les pays industrialisés, l'accroissement dans l'air de polluants chimiques participe à l'émergence de nouveaux cas et à l'aggravation des cas déjà répertoriés. Parmi ces maladies inflammatoires chroniques des voies aériennes, on trouve principalement l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive, qui présentent toutefois des profils
20 inflammatoires opposés.

L'asthme est la maladie inflammatoire pulmonaire chronique la plus répandue dans les pays industrialisés, et qui touche toutes les classes d'âges. L'asthme est une maladie polyfactorielle, qui n'a pas nécessairement une origine génétique. Elle se caractérise principalement par des bronches inflammatoires, participant à la réduction de leur diamètre
25 et rendant ainsi l'expiration, lors de la respiration des personnes asthmatiques, difficile. Cette inflammation est réversible, de sorte que la personne asthmatique peut, en dehors des crises d'asthme, ne présenter aucun symptôme particulier de la maladie. Suivant la cause, le nombre et la fréquence des crises d'asthme, on parle d'asthme intermittent, d'asthme persistant léger, d'asthme persistant modéré ou d'asthme persistant sévère. En outre, selon
30 la nature de l'asthme, chronique, allergique, à l'effort etc., le diagnostic peut être plus difficile à établir. Généralement, ce n'est qu'après la survenue de crises d'asthme répétées

que l'on procède à une exploration poussée de la fonction respiratoire/ventilatoire des poumons du patient. Les tests associés, tels que le test d'hyperréactivité bronchique, le test de réversibilité à un bronchodilatateur, sont éprouvants pour le patient et les résultats peuvent parfois être difficiles à interpréter par le personnel soignant, en fonction de la nature de l'asthme, du stade de la maladie, de l'état de santé physique du patient au moment de l'examen, etc.

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) quant à elle regroupe plusieurs maladies chroniques du système respiratoire, dont les bronchites chroniques et l'emphysème. La BPCO se caractérise par une diminution du débit expiratoire due principalement à une obstruction bronchique non complètement réversible par un agoniste bêta2 adrénergique et d'aggravation progressive. La BPCO fait partie des pathologies liées au tabagisme la plus répandue et touche entre 4 et 10% de la population mondiale adulte, avec une plus forte prévalence chez les adultes de plus de 40 ans. Généralement, les symptômes de la BPCO incluent la toux, l'expectoration et un essoufflement croissant à l'effort. Le diagnostic de sévérité est basé sur une épreuve fonctionnelle respiratoire qui mesure le degré d'obstruction bronchique. Actuellement, le dépistage de la BPCO par l'exploration fonctionnelle est limité, car cet examen est peu accessible, et on estime à plus de 40% la proportion de patients atteints non diagnostiqués.

Par ailleurs, le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO se révèle souvent assez complexe. Le résultat du test de réversibilité bronchique par un agoniste bêta-2 mimétique n'est pas toujours clair. Pourtant, il est important de bien faire la différence entre ces deux pathologies pour le choix du traitement approprié, ainsi que pour la caractérisation des patients entrant dans des essais cliniques.

Face à la contrainte et la difficulté de ces diagnostics des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques, le développement de biomarqueurs efficaces et fiables permettrait de diagnostiquer plus facilement ces maladies, de les dépister à un stade précoce, d'en établir un pronostic et d'améliorer la prise en charge des patients en leur donnant au plus tôt le traitement approprié. Le bénéfice de tels biomarqueurs serait i) l'indication rapide du traitement approprié en clinique usuelle (intérêt sociétal), et ii) une caractérisation plus fine des patients entrant dans les essais cliniques de nouvelles molécules ou de nouvelles thérapeutiques (intérêt industriel).

Résumé de l'invention

La présente invention tend à pallier les difficultés liées au dépistage et au diagnostic des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques et au suivi de l'évolution de la maladie chez les patients, en proposant l'utilisation d'un biomarqueur spécifique dont le profil
5 d'expression est représentatif de ces maladies. Notamment, la présente invention est utile pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO. Alternativement, la présente invention est utile pour le diagnostic de l'asthme. Par ailleurs, elle est également utile pour le diagnostic de la BPCO.

Les inventeurs ont mis en évidence, de manière inattendue, que l'analyse de l'expression du
10 gène d'un récepteur couplé aux protéines G, GPR15, est particulièrement adaptée pour la caractérisation des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques, et tout particulièrement de l'asthme et de la BPCO. L'analyse du profil d'expression du gène GPR15 permet d'établir de manière rapide et fiable, indépendamment de facteurs extérieurs à la maladie, si un sujet est atteint d'une ou l'autre maladie inflammatoire
15 pulmonaire chronique : les inventeurs ont découvert que les patients présentent un profil d'expression du gène GPR15 différent selon qu'ils sont atteints d'asthme ou de BPCO. Le biomarqueur selon l'invention permet donc de déterminer si un patient est atteint d'asthme ou d'une BPCO. L'utilisation du profil d'expression du gène GPR15 selon l'invention permet l'établissement d'un diagnostic à partir d'un simple échantillon biologique, et
20 notamment un échantillon sanguin, du patient, ce qui rend un tel diagnostic simple et peu coûteux. En outre, le suivi dans le temps du profil d'expression du biomarqueur selon l'invention chez un patient atteint d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique permet d'étudier l'évolution de la maladie avec ou sans traitement, ou de pronostiquer son évolution. Notamment, le biomarqueur pourrait être utilisé pour déterminer le stade de la
25 maladie. Enfin, l'utilisation du profil d'expression du gène GPR15 selon l'invention permet de sélectionner le traitement le plus adéquat pour les patients et/ou de sélectionner les patients nécessitant un suivi clinique particulier.

Ainsi l'invention a pour objet un procédé *in vitro* ou *ex vivo* de diagnostic et/ou de pronostic et/ou d'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire
30 chronique chez un sujet, selon lequel on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15.

Dans un exemple particulier de l'invention, le procédé est mis en œuvre pour diagnostiquer/pronostiquer/évaluer l'évolution de l'asthme chez un sujet, une sous-expression du gène GPR15 étant indicative de l'asthme.

Dans un autre exemple particulier de l'invention, le procédé est mis en œuvre pour
5 diagnostiquer/pronostiquer/évaluer l'évolution d'une BPCO chez un sujet, une surexpression du gène GPR15 étant indicative d'une BPCO. Ainsi, la présente invention est relative à un procédé *in vitro* de diagnostic de la BPCO chez un sujet, dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène du récepteur couplé aux protéines G 15 (GPR15) et on compare le niveau d'expression du
10 gène GPR15 à un niveau d'expression de référence prenant en compte l'âge du patient, une surexpression de GPR15 étant indicative de BPCO.

Ainsi, la présente invention est relative à un procédé *in vitro* de diagnostic permettant de déterminer si un patient est atteint d'asthme ou d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du patient le
15 niveau d'expression du gène du récepteur couplé aux protéines G 15 (GPR15), une sous-expression de GPR15 étant indicative de l'asthme et une surexpression de GPR15 étant indicative d'une BPCO.

Le niveau d'expression du gène GPR15 dans l'échantillon biologique du sujet à diagnostiquer/pronostiquer est comparé à un niveau d'expression de référence. De
20 préférence, le niveau d'expression de référence prend en compte l'âge du patient.

La présente invention est relative à un procédé *in vitro* de diagnostic de l'asthme et/ou la BPCO chez un sujet, dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15 et on compare le niveau d'expression du gène GPR15 à un niveau d'expression de référence prenant en compte l'âge du patient, une
25 surexpression de GPR15 étant indicative de BPCO et une sous-expression de GPR15 étant indicative de l'asthme.

Selon l'invention, on mesure avantageusement le niveau d'expression du gène GPR15 au niveau nucléique et/ou protéique, par exemple en mesurant la quantité d'ARNm transcrit et/ou en mesurant la quantité de protéine GPR15 à l'aide d'au moins une méthode
30 spécifique de mesure de l'expression de GPR15. Les techniques permettant de détecter l'expression du gène GPR15 au niveau nucléique sont bien connues de l'homme du métier.

La détection peut notamment être réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel, une technique microfluidique, une puce à ADN, le séquençage à haut débit des ARNm, ou toute technique appropriée de quantification de l'ARNm, telle que puce à ARN, méthodes LCR (« *Ligase Chain Reaction* »), TMA (« *Transcription Mediated Amplification* »), PCE
5 (« *enzyme amplified immunoassay* ») et ADNb (« *branched DNA signal amplification* »), etc. Les techniques permettant de détecter l'expression du gène GPR15 au niveau protéique sont également bien connues de l'homme du métier et peuvent notamment inclure la cytométrie en flux, l'immunocytochimie quantitative, l'ELISA cellulaire, le test protéique Taqman® (Taqman® Protein Assay, Applied Biosystems), des puces à protéines
10 ou anticorps couplés ou non à la spectrométrie de masse, la liaison de ligands marqués, etc.

Selon un exemple de mise en œuvre de l'invention, l'échantillon biologique est un échantillon de sang total, la détection du produit de l'expression du gène GPR15 se faisant de préférence sur la population leucocytaire totale.

Un autre objet de l'invention porte sur l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif
15 spécifique du produit de l'expression du gène GPR15, choisi de préférence parmi un anticorps monoclonal ou polyclonal ou tout autre type de molécules ou macromolécules capables d'interagir de manière spécifique avec la protéine GPR15, un ligand, naturel ou synthétique, ou une séquence nucléique, capable de s'hybrider spécifiquement avec un fragment de l'ARNm codant pour GPR15, pour le diagnostic et/ou le pronostic et/ou
20 l'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet. La maladie inflammatoire pulmonaire chronique peut être l'asthme ou la BPCO. L'invention porte sur l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 pour le diagnostic de l'asthme ou le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO chez un sujet. La présente invention concerne
25 également l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 et des informations relatives à des niveaux d'expression de GPR15 de référence prenant en compte l'âge pour le diagnostic de la BPCO chez un sujet.

L'invention a également pour objet l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un produit de l'expression du gène de GPR15 comme biomarqueur pour le diagnostic et/ou le pronostic
30 et/ou l'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet. De préférence, la maladie inflammatoire pulmonaire chronique est l'asthme ou la BPCO. En outre, l'invention est relative à l'utilisation *in vitro* ou *ex vivo* d'un produit de

l'expression du gène de GPR15 comme biomarqueur pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO chez un sujet.

Brève description des figures

Figure 1 : représentation schématique de l'arbre de décisions ayant conduit à la sélection
5 de GRP15 en tant que biomarqueur des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques.

Figure 2 : Boxplot (boîtes à moustaches) montrant le profil d'expression du gène GPR15 chez des patients atteints d'asthme ou de BPCO par rapport au profil d'expression chez des volontaires contrôles ne présentant pas ces maladies.

Figure 3 : Expression du gène GPR15 chez les patients atteints d'asthme ou de BPCO
10 *versus* contrôles ne présentant pas ces maladies représentée en cycles seuil d'amplification (Ct) en fonction de l'âge.

Description détaillée de l'invention

La présente invention est basée sur l'étude du profil d'expression du gène récepteur couplé aux protéines G 15 [GPR15, GPCR15, ou BOB (Brother of Bonzo)].

15 La famille des récepteurs couplés aux protéines G regroupe de nombreux récepteurs membranaires, dont GPR15. Le gène codant GPR15 est situé chez l'homme sur le chromosome 3q11.2-q13.1 (Heiber *et al*, Genomics 32, 462-465, 1995). Jusqu'à présent, un lien entre GPR15 et l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) a été mis en évidence (Blaak *et al*, Journal of virology, 79: 1686-1700, 2005, – Okamoto &
20 Shikano, Journal of Biological Chemistry 286, 7171-7181, 2001). GPR15 serait un co-récepteur de l'entrée du VIH dans les lymphocytes circulants.

Tel qu'utilisé dans le présent document, le terme "GPR15" fait référence au récepteur couplé aux protéines G 15. Il est décrit dans les bases de données géniques sous les références suivantes : HGNC : 4469 ; GeneID : 2838 ; RefSeq Protein : NP_005281.1 ;
25 RefSeq ARN : NM_005290.1. Bien entendu, GPR15 est relatif à celle de l'humain.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence une corrélation entre l'expression de GPR15 et les maladies inflammatoires pulmonaires chroniques. Plus particulièrement, les inventeurs ont découvert que l'analyse du profil d'expression du gène

GPR15 permet de déterminer de manière fiable si un sujet est atteint d'une maladie pulmonaire inflammatoire chronique, et avantageusement de différencier les sujets atteints d'asthme des sujets atteints d'une BPCO.

Aussi, l'invention propose d'utiliser un produit de l'expression du gène GPR15 comme
5 biomarqueur, notamment pour diagnostiquer une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, mais également pour le pronostic et le suivi de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique. De préférence, la maladie inflammatoire pulmonaire chronique est l'asthme ou la BPCO. En particulier, elle propose d'utiliser un produit de l'expression du gène GPR15 comme biomarqueur pour le diagnostic différentiel de
10 l'asthme et de la BPCO, c'est-à-dire pour différencier les sujets atteints d'asthme des sujets atteints d'une BPCO.

Plus particulièrement, l'invention propose un procédé *in vitro* ou *ex vivo* de diagnostic et/ou de pronostic et/ou d'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet selon lequel on mesure dans un échantillon biologique
15 du sujet le niveau d'expression du gène récepteur couplé aux protéines G 15 (GPR15).

Dans le contexte de la présente invention, un « sujet » ou un « patient » inclut tout sujet ou patient mammifère, et de préférence un sujet ou un patient humain, incluant notamment les enfants et les adultes.

Par « maladies inflammatoires pulmonaires chroniques », on entend les maladies
20 inflammatoires chroniques des voies aériennes, et plus spécifiquement l'asthme et la broncho-pneumopathie chronique obstructive, incluant les bronchites chroniques et l'emphysème.

Dans le contexte de l'invention, le « diagnostic » a pour objet la détection et/ou identification chez un sujet d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, quelque
25 soit son stade. Notamment, le diagnostic permet de déterminer si un sujet est atteint d'asthme ou d'une BPCO.

Le « pronostic » s'entend de l'évaluation de la maladie quant à la susceptibilité de développer la maladie, et/ou quant à la susceptibilité d'évolution vers un stade/degré plus avancé, et/ou quant aux risques de complications et d'exacerbations, et/ou quant à son
30 issue, etc.

L' « évaluation de l'évolution de la maladie » correspond à l'analyse dans le temps de l'évolution de la maladie préalablement diagnostiquée ou pronostiquée. Un tel suivi dans le temps peut permettre de sélectionner, de valider et/ou d'adapter un traitement. Il permet également de déterminer l'intensité du suivi clinique nécessaire pour le patient. Ce suivi
5 permet de déterminer à tout moment si un traitement est nécessaire.

L'invention propose également une méthode pour fournir des informations pouvant être utiles pour diagnostiquer et/ou pronostiquer et/ou évaluer l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet, selon laquelle on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15. De préférence, la
10 maladie inflammatoire pulmonaire chronique est l'asthme ou la BPCO. Plus particulièrement, l'invention propose une méthode pour fournir des informations pouvant être utiles pour diagnostiquer de manière différentielle l'asthme et la BPCO chez un patient, c'est-à-dire pour différencier les sujets atteints d'asthme des sujets atteints d'une BPCO. Selon l'invention, GPR15 peut être utilisé comme biomarqueur pour le pronostic
15 et/ou le diagnostic d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, et plus spécifiquement la BPCO et l'asthme, ainsi que pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO.

De même, GPR15 peut être utilisé comme biomarqueur pour le suivi d'un sujet diagnostiqué comme présentant une maladie inflammatoire pulmonaire chronique et/ou
20 pronostiqué comme susceptible de développer une telle maladie et/ou de développer une maladie de stade plus avancé/sévère et/ou de développer des complications et/ou des exacerbations. De préférence, la maladie inflammatoire pulmonaire chronique est l'asthme. Alternativement, la maladie inflammatoire pulmonaire chronique est la BPCO.

Un tel biomarqueur peut également être utilisé pour la sélection de sujets atteints d'une
25 maladie inflammatoire pulmonaire chronique susceptibles de bénéficier d'un traitement particulier et/ou pour évaluer l'évolution de la maladie chez des sujets atteints d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique au cours d'un traitement. GPR15 peut ainsi servir de biomarqueur pour la sélection, l'évaluation et l'adaptation du traitement d'un sujet atteint d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique. L'invention est tout
30 particulièrement utile pour choisir le traitement approprié suivant le fait que le patient souffre d'asthme ou de BPCO.

Selon l'invention, GPR15 est utilisé comme biomarqueur des maladies inflammatoires pulmonaires chroniques, et plus spécifiquement l'asthme et la BPCO.

Le profil d'expression du gène GPR15 peut être réalisé de différentes manières, notamment en mesurant, en déterminant ou en dosant la quantité du produit d'expression
5 de ce gène à partir d'un échantillon biologique du sujet. L'échantillon est de préférence un échantillon cellulaire provenant d'un fluide biologique du sujet, tel que le sang. Dans un mode de réalisation préféré, l'échantillon du sujet est un échantillon contenant des leucocytes. Les méthodes selon la présente invention peuvent comprendre une étape de prélèvement et/ou une étape de préparation/purification de l'échantillon.

10 Le produit d'expression du gène GPR15 correspond à un produit transcrit ou traduit de ce gène, tel que l'ARNm ou le récepteur couplé aux protéines G GPR15 lui-même.

La quantité de la protéine GPR15 peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme de l'art. De manière classique, ces méthodes comprennent une étape de mise en contact de l'échantillon avec un ligand sélectif de la protéine GPR15, tel qu'un anticorps
15 dirigé contre des épitopes spécifiques de GPR15, un fragment ou un dérivé de cet anticorps, ou un ligand endogène ou une petite molécule se liant au récepteur avec une forte affinité.

D'une manière générale, les anticorps anti-GPR15 utilisés dans la présente invention sont des anticorps ou toute molécule protéique ou autre se liant spécifiquement à GPR15 avec
20 une affinité submicromolaire. Ce sont par exemple des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux monospécifiques, c'est à dire qui ne reconnaissent spécifiquement qu'un épitope. De préférence, les anticorps seront spécifiques de la partie extracellulaire du récepteur.

Ces anticorps peuvent notamment être obtenus par toute méthode de production
25 conventionnelle. Notamment, un anticorps anti-GPR15 peut être obtenu par immunisation d'un animal non humain (lapin, souris, etc.) à l'aide du GPR15 ou d'une séquence antigénique de celui-ci, prélèvement puis épuisement de l'antisérum obtenu par exemple sur un immunoabsorbant contenant GPR15, selon des méthodes connues de l'homme du métier.

- La quantité de protéine GPR15 peut être mesurée en utilisant des techniques de cytométrie en flux, des tests immunologiques (ELISA, EIA, RIA, etc.), des tests radioimmunologiques, chemiluminescents ou fluorescents, des immunoélectrophorèses, immunoprécipitations, l'utilisation de la spectrométrie de masse, etc. Le procédé comporte
- 5 le plus souvent une étape de révélation du marquage, tel qu'un marquage fluorescent, radioactif, enzymatique, ou par molécule colorée, ou plus généralement tout marquage permettant de mettre en évidence la formation du complexe antigène/anticorps ou toute méthode biophysique permettant de mettre en évidence l'interaction entre GPR15 et une molécule soit protéique soit synthétique (aptamère, ligand, ...)
- 10 Selon l'invention, les ARNm du gène GPR15 peuvent être détectés par toute méthode connue de l'homme de l'art. Généralement, ces méthodes requièrent une première étape d'extraction des acides nucléiques contenus dans l'échantillon biologique, par des techniques bien connues de l'homme du métier, utilisant par exemple des enzymes lysant, des solutions chimiques adaptées ou des résines d'extraction spécifiques. On procède
- 15 ensuite à la mise en contact desdits ARNm avec une sonde d'acide nucléique, avantageusement marquée, spécifique des ARNm de GPR15, dans des conditions permettant l'hybridation avec lesdits ARNm, suivie d'un dosage des formes hybrides obtenues, avantageusement marquées. Les ARNm extraits peuvent également être préalablement amplifiés (par exemple par la technique de RT-PCR). Les techniques de RT-
- 20 PCR (« reverse transcription polymerase chain reaction ») et notamment la RT-PCR quantitative en temps réel, sont particulièrement préférées. Alternativement, d'autres méthodes de détection d'acides nucléiques peuvent être employées, telles que les méthodes LCR (« Ligase Chain Reaction »), TMA (« Transcription Mediated Amplification »), PCE (« enzyme amplified immunoassay »), ADNb (« branched DNA signal amplification ») et
- 25 séquençage à haut débit. Typiquement, la détection d'ARN du gène GPR15 est réalisée par :
- l'obtention d'ARN totaux ou messagers à partir d'un échantillon biologique, tel qu'un échantillon de sang total,
 - la synthèse d'ADNc par reverse transcription,
 - 30 - une amplification par PCR de l'ADNc en présence d'amorces d'oligonucléotides spécifiques du gène GPR15,

- la quantification du produit de la PCR, en particulier par mise contact avec une sonde d'acide nucléique, avantageusement marquée, spécifique des ARNm de GPR15 (détection indirecte), en particulier dans des conditions permettant l'hybridation, suivie d'un dosage des formes hybrides obtenues, 5 avantageusement marquées.

Selon un mode particulier de l'invention, le profil d'expression d'un produit du gène GPR15 dans un échantillon biologique d'un patient est comparé au profil d'expression de référence d'un produit du gène GPR15. Ce profil d'expression de référence peut être celui obtenu à partir d'un échantillon biologique témoin. Bien entendu, le profil d'expression 10 témoin peut correspondre à une moyenne ou une médiane des profils d'expression obtenus pour un panel d'échantillons biologiques témoins. Les niveaux d'expression obtenus dans les échantillons des sujets à analyser et dans les échantillons témoins sont avantageusement normalisés en utilisant le niveau d'expression de protéines connues pour avoir un niveau d'expression stable chez les sujets présentant une maladie inflammatoire pulmonaire 15 chronique et chez les sujets sains, tel que HPRT1 (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase 1), TBP (TATA binding protein) ou TFRC (Transferrin receptor protein 1) pour l'ARNm des leucocytes humains et tel que la β -actine ou la GAPDH (glycéraldéhyde 3-phospho-déshydrogénase) pour les échantillons protéiques.

20 Préférentiellement, les produits du gène GPR15 analysés pour réaliser le profil d'expression du patient dans un échantillon biologique et pour réaliser le profil d'expression témoin sont identiques, de même que la nature des échantillons utilisés. Ils peuvent cependant comporter d'éventuelles mutations qui seront mises en évidence par séquençage.

25 Dans un exemple de réalisation, le profil d'expression de référence est réalisé à partir d'échantillons biologiques de sujets non susceptibles de présenter une maladie inflammatoire pulmonaire chronique. Un tel profil d'expression de référence permet notamment de diagnostiquer une maladie inflammatoire pulmonaire chronique à un stade très précoce de la maladie.

30 Dans un autre exemple de réalisation, le profil d'expression de référence est réalisé à partir d'échantillons biologiques de sujets présentant une maladie inflammatoire pulmonaire

chronique diagnostiquée, et dont le stade/degré est avantageusement connu. Il peut être particulièrement intéressant de réaliser des profils d'expression de référence, à partir d'échantillons biologiques de sujets diagnostiqués comme présentant une maladie inflammatoire pulmonaire chronique, pour chacun des stades de la maladie. De tels profils
5 peuvent être notamment utiles pour le suivi de l'évolution de la maladie chez un sujet, afin notamment d'évaluer les risques de complication et/ou d'exacerbation, et/ou de sélectionner, adapter, modifier, débiter ou cesser un traitement.

Par exemple, dans le cas de l'asthme, il est possible de réaliser des profils d'expression de référence à partir de sujets diagnostiqués comme présentant un asthme qualifié de
10 « contrôlé » ou de « non contrôlé » selon la classification GINA (« global initiative for asthma ») (2006, 2011), ou selon des stades de sévérité : intermittent ou persistant léger, modéré ou sévère (GINA 2002). L'asthme peut également être qualifié en fonction de facteurs favorisants comme l'allergie, on parle alors d'asthme allergique ou non allergique.

De même, dans le cas de la BPCO, il est possible de réaliser des profils d'expression de
15 référence à partir de sujets diagnostiqués comme présentant des bronchites chroniques, à partir de sujets diagnostiqués comme présentant un emphysème, et à partir de sujets diagnostiqués comme présentant des bronchites chroniques et un emphysème. Il est également possible de tenir compte du degré d'obstruction bronchique (indice de Tiffeneau : $VEMS/CVF < 70\%$). Par exemple, il est possible de réaliser des profils
20 d'expression de référence à partir de sujets présentant une bronchite chronique légère ($VEMS \geq 80\%$), modérée ($50\% \leq VEMS \leq 80\%$), sévère ($30\% \leq VEMS \leq 50\%$) et très sévère ($VEM < 30\%$).

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de GPR15 et l'âge du sujet. Cette observation a été étendue à l'ensemble des
25 patients atteints d'asthme, de ceux atteints de BPCO et pour tous les sujets contrôles. Plus particulièrement, comme le montre la Figure 3, les patients atteints d'asthme présentent des niveaux d'expression de GPR15 faibles (notamment, un nombre important de cycles d'amplification est nécessaire pour être détecté) et constants en fonction de l'âge. A contrario, il a été observé que les sujets témoins (sains) et les sujets BPCO présentent un
30 niveau d'expression de GPR15 diminuant en fonction de l'âge. Pour la BPCO, les inventeurs ont mis en évidence que le paramètre de l'âge devait absolument être pris en compte. Ainsi, préférentiellement, le niveau d'expression de référence prend en compte

l'âge du patient. Cependant, il peut être également remarqué que pour différencier la BPCO et l'asthme, le paramètre de l'âge du sujet peut éventuellement être négligé car les deux groupes sont suffisamment distincts l'un de l'autre. Des profils d'expression de référence peuvent donc être réalisés en fonction de l'âge des sujets témoins. Le niveau
5 d'expression de GPR15 pour un patient est alors avantageusement comparé au niveau de référence de témoins de la même classe d'âge (âge du patient $\pm$ 2,5 ans).

L'apparition des symptômes de la maladie se faisant tardivement pour les patients atteints de BPCO (>40 ans) et plus précocement pour les malades asthmatiques, l'âge de la population témoin s'étage préférentiellement de 18 à 85 ans.

- 10 Une telle classification en fonction de la classe d'âges peut être particulièrement intéressante pour le diagnostic ou le pronostic de maladies pulmonaires chroniques connues pour se déclarer à un âge particulier. Cette classification peut également s'avérer utile pour l'évaluation de l'évolution de la maladie, et notamment pour les BPCO, dont l'évolution en fonction de l'âge du patient peut être rapide et/ou critique.
- 15 Les différents critères exposés ci-dessus pour la réalisation de profils d'expression témoins ne sont pas exclusifs les uns des autres. Par exemple, il peut être particulièrement intéressant de réaliser des profils d'expression de référence en fonction du stade de la maladie et de l'âge des sujets.

Les inventeurs ont découvert que les patients atteints d'asthme présentent un profil
20 d'expression du gène GPR15 opposé au profil d'expression des patients atteints d'une BPCO. Ainsi, l'utilisation du biomarqueur GPR15 se révèle particulièrement pertinente pour déterminer de manière fiable si un sujet est atteint de l'une ou l'autre de ces deux maladies pulmonaires chroniques.

Plus précisément, les sujets atteints d'asthme présentent une diminution de l'expression du
25 produit du gène GPR15 par rapport à l'expression du produit du gène GPR15 chez un sujet témoin, non atteint de cette maladie. A l'inverse les sujets atteints d'une BPCO présentent une surexpression du produit du gène GPR15 par rapport à l'expression du produit du gène GPR15 chez un sujet témoin, non atteint de cette maladie.

Dans un exemple de mise en œuvre de l'invention, le procédé comprend une étape pour déterminer si le niveau d'expression du produit du gène GPR15 chez un sujet est élevé ou faible par rapport au niveau d'expression de référence.

Dans un exemple de mise en œuvre, on considère que le niveau d'expression de référence correspond à un niveau d'expression normal du produit du gène GPR15, c'est-à-dire hors toute maladie inflammatoire pulmonaire chronique. Le niveau d'expression chez le sujet est considéré comme élevé, et donc présente une surexpression, si ledit niveau est par exemple au moins supérieur de 20, 30, 40 ou 50% au niveau d'expression de référence après normalisation, et préférentiellement au moins supérieur de 100%, 150% ou 200%. A l'inverse, le niveau d'expression chez le sujet est considéré comme faible, et donc présente une sous-expression, si ledit niveau est par exemple au moins inférieur de 20, 30, 40 ou 50% au niveau d'expression de référence après normalisation, et préférentiellement au moins inférieur de 100%, 150% ou 200%. Le propre niveau d'expression du produit du gène GPR15 du patient à un temps t donné peut servir de niveau d'expression de référence pour le suivi de l'évolution de la maladie dudit patient à un temps $t+1$. Une surexpression ou une sous-expression du produit du gène GPR15 du patient à $t+1$ par rapport au niveau d'expression du produit du gène GPR15 du patient au temps t peut être indicative d'une amélioration ou d'une dégradation de l'état de santé dudit patient en fonction de la maladie observée.

Dans un autre exemple de mise en œuvre, on considère que le niveau d'expression de référence correspond à un niveau d'expression du produit du gène GPR15 pour une population de patients souffrant d'asthme pour le diagnostic de l'asthme ou de la BPCO pour le diagnostic de celle-ci. Ainsi, des courbes ou nuages de référence seront définis pour l'asthme et/ou la BPCO en fonction de l'âge. Une fois que l'expression du produit du gène GPR15 pour le sujet à diagnostiquer a été déterminée, celle-ci sera comparée à ces courbes ou nuages de référence en tenant compte de l'âge du patient et il pourra être déterminé si le sujet souffre de BPCO ou d'asthme.

Par ailleurs, il est proposé d'utiliser le profil d'expression du gène GPR15 pour déterminer le stade d'une maladie pulmonaire chronique, en particulier la BPCO. Ainsi, des références d'expression du gène GPR15 seraient déterminées pour chaque stade de la BPCO. De préférence, ces références d'expression du gène GPR15 tiennent compte du stade de la BPCO et de l'âge du patient. Ainsi, la présente invention est relative à une méthode *in vitro*

pour déterminer le stade de BPCO chez un sujet, dans laquelle on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15, on compare le niveau d'expression du gène GPR15 à des niveaux d'expression de référence prenant en compte le stade de la BPCO et de préférence l'âge du sujet, et sur la base de cette
5 comparaison, on détermine le stade de la BPCO chez le sujet. L'information d'un malade sera positionnée par rapport à un ensemble de données de référence permettant ainsi de déterminer l'état de la pathologie du patient considéré. Les modes de réalisation particuliers décrits ci-dessus sont applicables dans cette méthode.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif
10 spécifique du produit de l'expression du gène GPR15, choisi parmi un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre GPR15 ou toute molécule protéique ou autre se liant spécifiquement à GPR15 avec une affinité submicromolaire, une sonde capable de s'hybrider spécifiquement avec un fragment de l'ARNm ou de l'ADNc codant pour GPR15, et au moins une paire d'amorces d'acide nucléique spécifiques de l'ARNm ou de
15 l'ADNc codant pour GPR15, pour le diagnostic et/ou le pronostic et/ou l'évaluation de l'évolution d'une maladie inflammatoire pulmonaire chronique chez un sujet. De préférence, la maladie inflammatoire pulmonaire chronique est l'asthme ou la BPCO. En outre, l'invention porte sur l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de
20 la BPCO chez un sujet.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention concerne l'utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 et des informations relatives à des niveaux d'expression de GPR15 de référence prenant en compte l'âge pour le diagnostic de la BPCO. En particulier, les informations pourront être
25 une courbe/nuage de référence de l'expression de GPR15 chez des individus contrôles en fonction de l'âge, et/ou une courbe/nuage de référence de l'expression de GPR15 chez des sujets asthmatiques en fonction de l'âge, et/ou une courbe/nuage de référence de l'expression de GPR15 chez des sujets souffrant de BPCO en fonction de l'âge.

Dans un mode de réalisation supplémentaire, l'invention concerne l'utilisation d'un kit
30 pour déterminer le stade de la BPCO, comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 et des informations relatives à des niveaux d'expression de GPR15 de référence prenant en compte le stade de la BPCO et

facultativement l'âge. En particulier, les informations pourront être une courbe/nuage de référence de l'expression de GPR15 chez des individus souffrant de la BPCO en fonction du stade de la maladie et facultativement de l'âge. L'information d'un malade sera positionnée par rapport à un ensemble de données de référence permettant ainsi de
5 déterminer l'état de la pathologie du patient considéré.

Dans un exemple de réalisation particulier de l'invention, le kit peut comporter un moyen pour détecter le complexe formé entre la protéine GPR15 et le ligand, et/ou un moyen pour détecter l'hybridation d'au moins une sonde spécifique à un fragment de l'ARNm ou de l'ADNc codant pour GPR15 et/ou des moyens pour amplifier et/ou détecter ledit ARNm
10 ou ADNc.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront dans la partie expérimentale suivante, qui doit être regardée à titre illustratif, ne limitant en aucune façon l'étendue de la protection recherchée.

EXPERIMENTATIONS

15 Matériel et méthode

Caractéristiques des patients

Les patients asthmatiques et leurs contrôles génétiquement appariés (ascendant, descendant, fratrie) sont recrutés aux services de pneumologie à l'hôpital de Nantes (Pr A. Magnan) et de Marseille (Pr P. Chanez). Les caractéristiques de ces volontaires sont
20 décrites dans le tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : Caractéristiques des patients asthmatiques et leurs contrôles apparentés

N° du sujet	Sexe	Age	Fumeur (paquets-années)	Ancienneté (nombre d'année)	Stade de gravité	% VEMS de base	PD20 (µg MCh)	Dernière exacerbation	Phadiatop
A101	F	65	NFu	20	Sévère	75	ND	20/04/08	Négatif
A102	F	48	EX 1	20	Sévère	45	ND	1/05/08	Négatif
A1002	F	71	NFu	51	Sévère	53	ND	Nombreuses	Négatif
A1003	H	19	NFu	18	Sévère	65	ND	5 dans l'année précédente	Pos (der.p)
A1004	F	41	NFu	23	Sévère	55	ND	6 dans l'année précédente	Positif
A1005	H	20	NFu	19	Sévère	100	Positive	Aucune	Positif
A1006	F	54	Fu	19	Sévère	72	ND	10 dans l'année	Négatif
A3006	F	63	NFu	63	Sévère	67	ND	20/06/10	Négatif
A3007	F	55	NFu	33	Sévère	79	ND	30/03/09	Positif (IgE chat)
C101	H	39	NFu			100	ND		Négatif
C102	F	48	EX 20			100	> 500		Négatif
C1001	H	52	NFu			103	> 3100		Négatif
C1003	H	47	EX			97	> 3100		Négatif
C1004	F	18	?			114	> 3100		Négatif
C1005	F	52	EX 20			100	Négatif		Négatif
C1006	F	24	Fu 10			102	> 500		Négatif
C3004	F	42	NFu			90	> 1600		Négatif
C3005	H	43	Fu 10			104	> 1600		Négatif
C3006	H	65	NFu			76	> 1600		Négatif

F = Femme ; H = Homme ; Fu = Fumeur ; NFu = Non Fumeur ; Ex = Ex-Fumeur ; ND = Non Déterminé

VEMS = Volume expiratoire maximum seconde.

5 PD20 = Dose de métacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

Dernière exacerbation : dernière hospitalisation due à une infection respiratoire liée à une amplification des symptômes de la maladie

Phadiatop : test d'évaluation allergique

10 Les patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive ou BPCO et leurs contrôles environnementaux appariés (conjoint, voisin) sont recrutés au service de pneumologie des hôpitaux universitaires de Strasbourg (Pr R. Kessler). Les caractéristiques de ces volontaires sont décrites dans le tableau 2 ci-dessous.

Tableau 2 : Caractéristiques des patients BPCO et leurs contrôles environnementaux appariés

N° du sujet	Sexe	Age	Fumeur (paquets-années)	Ancienneté (nombre d'année)	VEMS (%)	VEMS/CVF (%)	Stade de gravité	PD20 (µg MCh)	Dernière exacerbation	Phadia-top
B2003	H	67	Fu 40	9	65	46	Modéré		Sep-08	ND
B2004	H	69	EX 80	1	61	38	Modéré		Juin-08	Négatif
B2005	H	80	Ex 10	7	42	52	Sévère		2007	Négatif
B2006	F	57	Fu 40	2	89	62	Modéré		nov-09	Positif
B2007	F	47	EX 30	3	66	51	Modéré		juil-09	Négatif
B2009	F	80	Fu 90	ND	59	62	Modéré		oct-09	Négatif
B2010	H	72	EX 50	1	51	41	Modéré		fev-2010	Positif
B2014	F	58	Fu 30	4	70	61	Modéré		2009	Négatif
B2015	H	62	Fu 40	2	57	41	Modéré		ND	Négatif
B2016	F	63	EX 80	3	75	54	Modéré		6/07/07	Négatif
C2001	F	75	Passif		141	84		> 1500		ND
C2002	F	37	Fu 20		121	87		> 3100		ND
C2003	F	67	Passif		99	82		> 2080		ND
C2004	F	62	Passif		115	83		> 3100		Négatif
C2006	F	51	EX 30		99	86		> 3100		Négatif
C2007	F	48	NFu		105	88		> 3100		Négatif
C2008	F	62	NFu		121	87		> 3100		Négatif
C2010	F	68	Fu 30		129	78		> 1500		Négatif
C2014	H	37	Fu 15		96	77		> 3100		Négatif
C2016	F	74	NFu		115	74		> 3100		Négatif

F = Femme ; H = Homme ; Fu = Fumeur ; NFu = Non Fumeur ; Ex = Ex-Fumeur ; Passif = Tabagisme Passif

VEMS = Volume expiratoire maximum seconde.

5 Indice de Tiffeneau : rapport VEMS/CVF (Capacité Vitale Forcée) en pourcentage. Chez un patient obstructif : VEMS/CVF < 70%

PD20 = Dose de métacholine provoquant une chute de 20% du VEMS.

Stade de gravité = stade modéré : 80 à 50% de la valeur théorique du VEMS ; Stade sévère : 50 à 30% de la valeur théorique du VEMS

10 Dernière exacerbation : dernière hospitalisation due à une infection respiratoire liée à une amplification des symptômes de la maladie

Phadiatop : test d'évaluation de la sensibilisation aux pneumallergènes communs

L'étude a été réalisée après saisine du Comité Consultatif de Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB) Alsace N°1 en date du 14 juin 2005, conformément à la loi Huriet N°88-1138 du 20 décembre 1988 modifiée du code de la
5 santé publique, et a été déclarée auprès de la Haute Autorité de Santé. Les amendements au protocole (promotion, investigateurs complémentaires) ont été saisis par le comité de protection des personnes (CPP Est n°IV).

Obtention des leucocytes

Les leucocytes totaux sont obtenus à partir du sang total (20 ml) prélevé sur EDTA. Six ml
10 de sang sont injectés à travers un filtre microporeux LeukoLOCK™ (*Fractionation & Stabilization Kit*, Life Technologies™) retenant les leucocytes. Le filtre est rincé à l'aide de PBS, puis de RNeasy® permettant la conservation des ARN et stocké à -80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN.

Extraction et purification des ARN

15 Après décongélation, la solution de RNeasy® est éliminée par injection d'air dans le filtre à l'aide d'une seringue. Une solution *Lysing/Binding solution concentrate* (*Total RNA isolation Kit*, LeukoLOCK™) permettant la lyse des cellules est ajoutée au filtre. Le lysat est récupéré dans un tube Falcon 15 ml et traité par la protéinase K du kit. Les ARN sont fixés sur des billes par ajout de *RNA Binding Beads* et centrifugés. Le surnageant est
20 éliminé, les billes lavées 3 fois par une solution contenant de l'isopropanol puis de l'éthanol. Les ARN sont alors élués (50µl ; solution d'éluion, LeukoLOCK™) dans un tube Eppendorf qui peut être conservé à -80°C.

Les ARN totaux sont purifiés par centrifugation sur gel de silice qui présente une affinité élevée pour l'ARN (*RNeasy® mini kit*, Qiagen), élués par eau DEPC (50 µl) et récupérés
25 dans un tube Eppendorf qui est stocké à -80°C.

Quantification et qualité de l'ARN

Les ARN totaux sont quantifiés par deux techniques différentes : 1) spectrophotomètre NanoDrop® (Thermo Scientific) de grande précision permettant l'analyse de microvolumes (1 µl) résultant en un spectre d'absorption de 230 à 350 nm ; un ARN de bonne qualité est

défini par des rapports A_{260}/A_{280} proche de 2 et A_{230}/A_{260} compris entre 1,8 et 2,2 ; 2) mesure de fluorescence (Fluoromètre QubitTM, Qiagen) grâce à un intercalant fluorescent *Quant-itTM RNA assay Kit* (Qiagen). Le résultat est exprimé en concentration d'ARN proportionnelle à la fluorescence émise. Cette concentration est comparée à celle obtenue
5 sur le NanoDrop[®]. Un rapport compris entre 0,9 et 1,1 permet l'acceptation de l'ARN pour la poursuite de l'analyse. Dans le cas contraire, l'ARN est éliminé (Figure 1).

Intégrité des ARN

L'intégrité de l'ARN est mesurée par électrophorèse capillaire automatisée (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) utilisant des puces "*RNA 6000 Nano LabChip*" (Agilent
10 Technologies). Un agent fluorescent se liant à l'ARN est ajouté ; l'ARN est soumis à un champ électrique et la fluorescence émise est mesurée. La qualité de l'ARN est évaluée par le rapport ARNr 28S / ARNr 18S et par l'analyse d'un électrophorégramme complet incluant les ARN dégradés de petite taille, résultant en une valeur de RIN (*RNA Integrity Number*). L'intégrité de l'ARN est validée par un rapport 28S/18S > 1,8 et un RIN > 7
15 (Figure 1).

Contamination par l'ADN génomique

L'analyse des RCPGs en PCR quantitative nécessite la vérification de l'absence d'ADN génomique résiduel qui pourrait interférer. Cette validation est réalisée par amplification d'un gène hautement exprimé sur les échantillons d'ARN à l'aide d'un couple d'amorces
20 dessinées sur un seul exon (*TaqMan[®] Gene Expression Assay*). Une absence d'amplification lors de la PCR valide l'absence d'ADN génomique dans l'échantillon. Les ARN ne satisfaisant pas à cette étape sont éliminés (Figure 1).

Transcription inverse

Lors de la transcription inverse, une expérience permettant de valider l'absence
25 d'inhibiteurs de PCR dans les échantillons d'ARN est mise en place. Elle implique l'introduction d'un ARN étranger ne comportant aucune séquence homologue d'ARN eucaryote (*Alien[®]*, Stratagene) dans les échantillons. Les ARN totaux (1 µg) ayant passé le crible *Go-NoGo* représenté sur le schéma 1 sont additionnés de l'ARN *Alien[®]* (2 µl, 10⁶ copies) et soumis à transcription inverse à 37°C pendant 2h en présence d'une transcriptase
30 inverse d'origine virale la *Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (MuLV, Life*

TechnologiesTM). Le mélange réactionnel (commercialisé par Life TechnologiesTM) comprend la *MuLV*, les désoxynucléotides triphosphate, les amorces dégénérées, des inhibiteurs de RNase dans le tampon RT du kit dans un volume final de 100 µl.

Validation de l'absence d'inhibiteurs de PCR

- 5 L'amplification par PCR en temps réel est réalisée en plaques 96 puits sur ABI PRISM[®] 7000 (Life Technologies). L'ADNc Alien[®] en présence d'ADNc d'intérêt est amplifié à l'aide d'amorces Alien[®] (Stratagène). Les valeurs de cycle seuil d'amplification (Ct) d'Alien[®] sont comparées en présence et en absence d'échantillons d'ADNc à différentes dilutions. La dilution permettant l'amplification de l'ADNc Alien[®] non modifiée
10 correspond à une dilution au 1/3^e de l'échantillon d'ADNc d'intérêt. Cette dilution correspond à une dilution suffisante des résidus de traitement des échantillons (phénol, éthanol, guanidine, EDTA) jouant le rôle d'inhibiteurs de PCR.

Quantification de l'expression génique des RCPGs

- La quantification de l'expression génique des RCPGs par PCR quantitative en temps réel
15 est réalisée sur ABI PRISM[®] 7900 (Life TechnologiesTM) en carte microfluidique 384 puits « *TaqMan[®] Low Density Array* » (TLDA, Life TechnologiesTM). Chaque puits de la carte TLDA contient une sonde TaqMan[®] lyophilisée et un couple d'amorces spécifiques. Parmi les 384 couples d'amorces, 360 sont spécifiques des gènes RCPGs, 20 de gènes domestiques et 4 d'un gène contrôle, le 18S. L'amplification se déroule pendant 2 h dans
20 un volume réactionnel final de 2 µl. Les résultats d'expression du gène biomarqueur mis en évidence sont confirmés par PCR quantitative en plaque 96 puits sur ABI PRISM[®] 7000.

Analyse statistique et expression des résultats

- Les résultats des amplifications sont délivrés pour chaque gène en valeur de cycle seuil d'amplification (Ct) par le logiciel *RQ Study* intégré à l'ABI PRISM[®] 7900.
- 25 Les analyses statistiques ont été réalisées avec le tableur Excel et le logiciel R.

RESULTATS ET ANALYSE

Les valeurs de l'expression de GPR15 chez les contrôles asthme et les contrôles BPCO ne sont pas significativement différentes ($p=0.20728197$) ; les deux ensembles contrôles ont

donc été fusionnés pour constituer l'ensemble « contrôle », augmentant ainsi la puissance d'analyse.

Les résultats de l'expression de GPR15 sont représentés graphiquement : i) en boîtes à moustaches (Figure 2), ii) en dispersion point-par-point du Ct en fonction de l'âge des patients et une droite résumant la variation en fonction de l'âge pour chaque groupe (Figure 3).

Les valeurs d'expression de GPR15 pour les patients BPCO et le groupe contrôle sont significativement différents ($p=0.00164019$) (figure 2).

Les valeurs d'expression de GPR15 pour les patients Asthmatiques et le groupe contrôle sont aussi significativement différents ($p=0.02535037$) (figure 2).

L'analyse de l'expression de GPR15 dans le groupe contrôle montre une corrélation de l'expression avec l'âge du patient ($r^2=0.32$) de même que dans le groupe BPCO ($r^2=0.51$).

La figure 3 illustre cette dépendance de la valeur d'expression de GPR15 dans les différents groupes de patients avec la variable âge.

Trois valeurs atypiques sont observées dans le groupe BPCO : il s'agit d'un asthmatique fumeur (A1006), pour lequel le diagnostic est à confirmer ; un sujet contrôle fumeur (C2010, 30 paquets/année) ; et un sujet contrôle non fumeur (C1001) avec un indice de Tiffeneau (VEMS/CVF%) à 78 et qu'il faudra revoir.

REVENDEICATIONS

- 5 1- Procédé *in vitro* de diagnostic permettant de déterminer si un patient est atteint d'asthme ou d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du patient le niveau d'expression du gène du récepteur couplé aux protéines G 15 (GPR15), une sous-expression de GPR15 étant indicative de l'asthme et une surexpression de GPR15 étant indicative d'une BPCO.
- 10 2- Procédé *in vitro* de diagnostic de l'asthme chez un sujet, dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15, une sous-expression de GPR15 étant indicative de l'asthme.
- 15 3- Procédé *in vitro* selon la revendication 1 ou 2, dans lequel on compare le niveau d'expression du gène GPR15 à un niveau d'expression de référence.
- 4- Procédé *in vitro* selon la revendication 3, dans lequel le niveau d'expression de référence prend en compte l'âge du patient.
- 20 5- Procédé *in vitro* de diagnostic de la BPCO chez un sujet, dans lequel on mesure dans un échantillon biologique du sujet le niveau d'expression du gène GPR15 et on compare le niveau d'expression du gène GPR15 à un niveau d'expression de référence prenant en compte l'âge du patient, une surexpression de GPR15
- 25 étant indicative de BPCO.
- 6- Procédé *in vitro* selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le niveau d'expression du gène GPR15 est déterminé en mesurant la quantité de protéine GPR15.
- 30 7- Procédé *in vitro* selon la revendication 6, dans lequel la quantité de protéine GPR15 est mesurée par immunofluorescence, chemiluminescence,

immunohistochimie, immunocytochimie, ELISA, le test protéique Taqman®, puce à protéines ou anticorps.

5 8- Procédé *in vitro* selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel le niveau d'expression du gène GPR15 est déterminé en mesurant la quantité d'ARNm codant la protéine GPR15.

10 9- Procédé *in vitro* selon la revendication 8, selon lequel la quantité d'ARNm de GPR15 est mesurée par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel, par technique microfluidique, puce à ARN, méthodes LCR, TMA, PCE, ADNb ou séquençage à haut débit.

15 10- Procédé *in vitro* selon l'une des revendications 1 à 9, dans lequel l'échantillon biologique est un échantillon sanguin.

11- Procédé *in vitro* selon la revendication 10, dans lequel le produit de l'expression du gène GPR15 est détecté dans les leucocytes.

20 12- Utilisation d'un kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO chez un sujet ou pour le diagnostic de l'asthme chez un sujet, ou pour le diagnostic de la BPCO chez un sujet en tenant compte de son âge.

25 13- Utilisation d'un kit pour le diagnostic de la BPCO chez un sujet, le kit comprenant au moins un réactif spécifique du produit de l'expression du gène GPR15 et des informations relatives à des niveaux d'expression de GPR15 de référence prenant en compte l'âge.

30 14- Utilisation selon la revendication 12 ou 13, dans laquelle le réactif est choisi parmi un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé contre le GPR15, un ligand naturel ou synthétique du GPR15, une séquence nucléique capable de s'hybrider spécifiquement avec un fragment de l'ARNm codant la protéine GPR15.

- 15- Utilisation *in vitro* d'un produit de l'expression du gène GPR15 pour le diagnostic pour le diagnostic différentiel de l'asthme et de la BPCO chez un sujet, pour le diagnostic de l'asthme chez un sujet, ou pour le diagnostic de la BPCO chez un sujet en tenant compte de son âge.

Figure 1

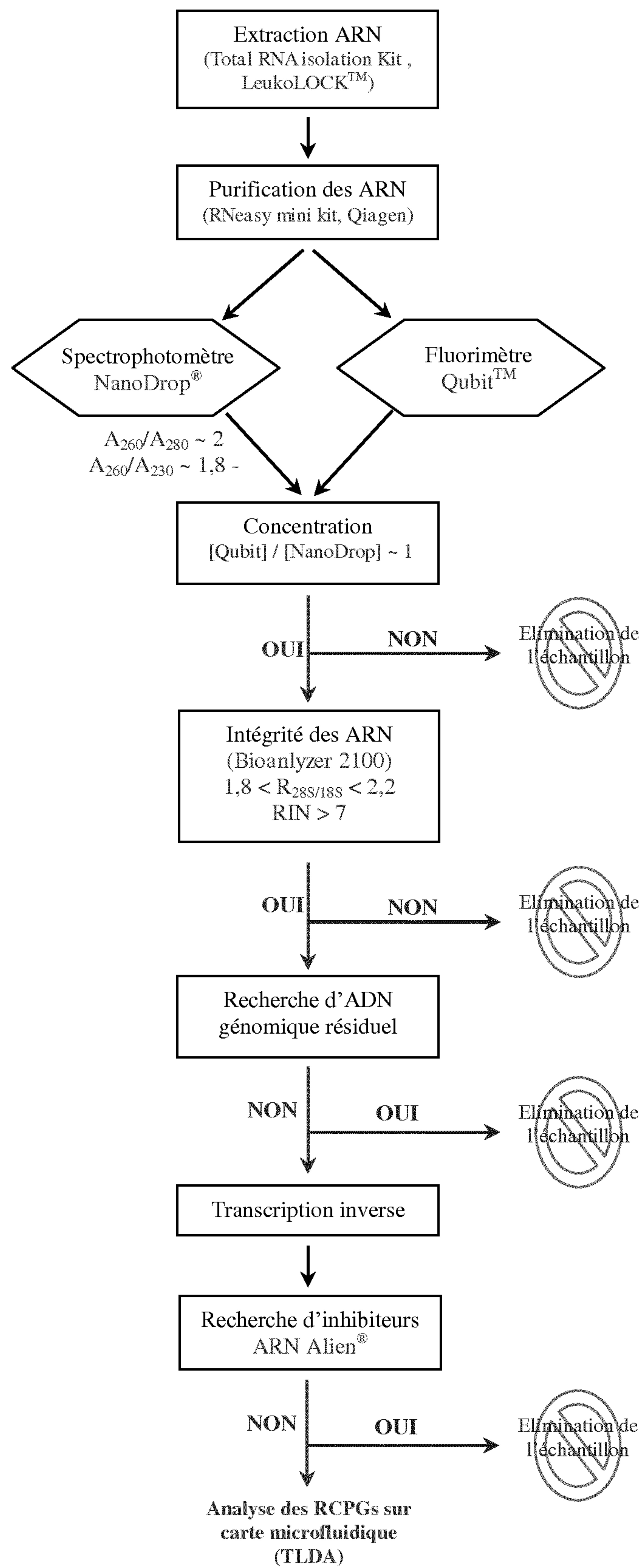


Figure 2

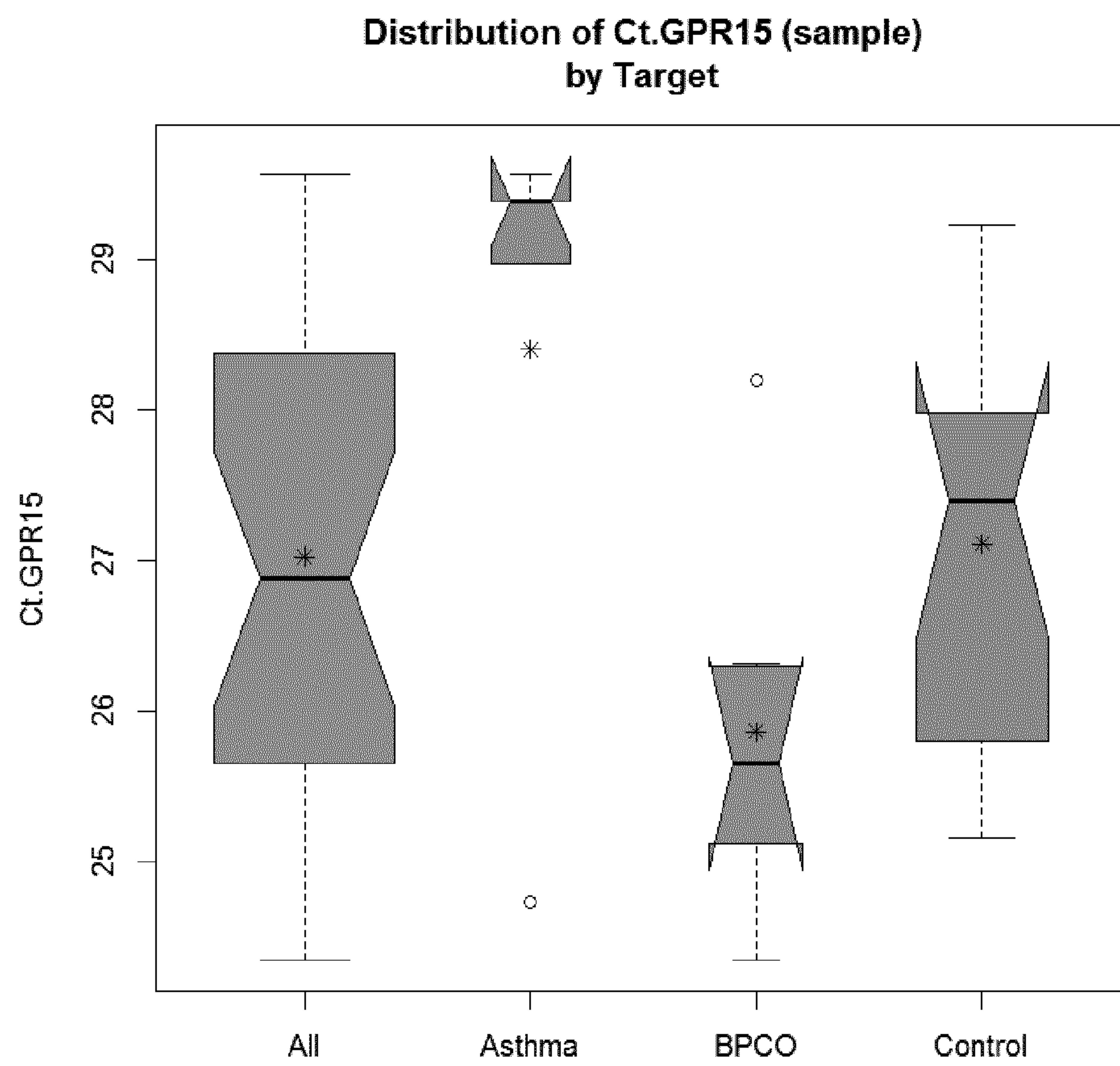


Figure 3

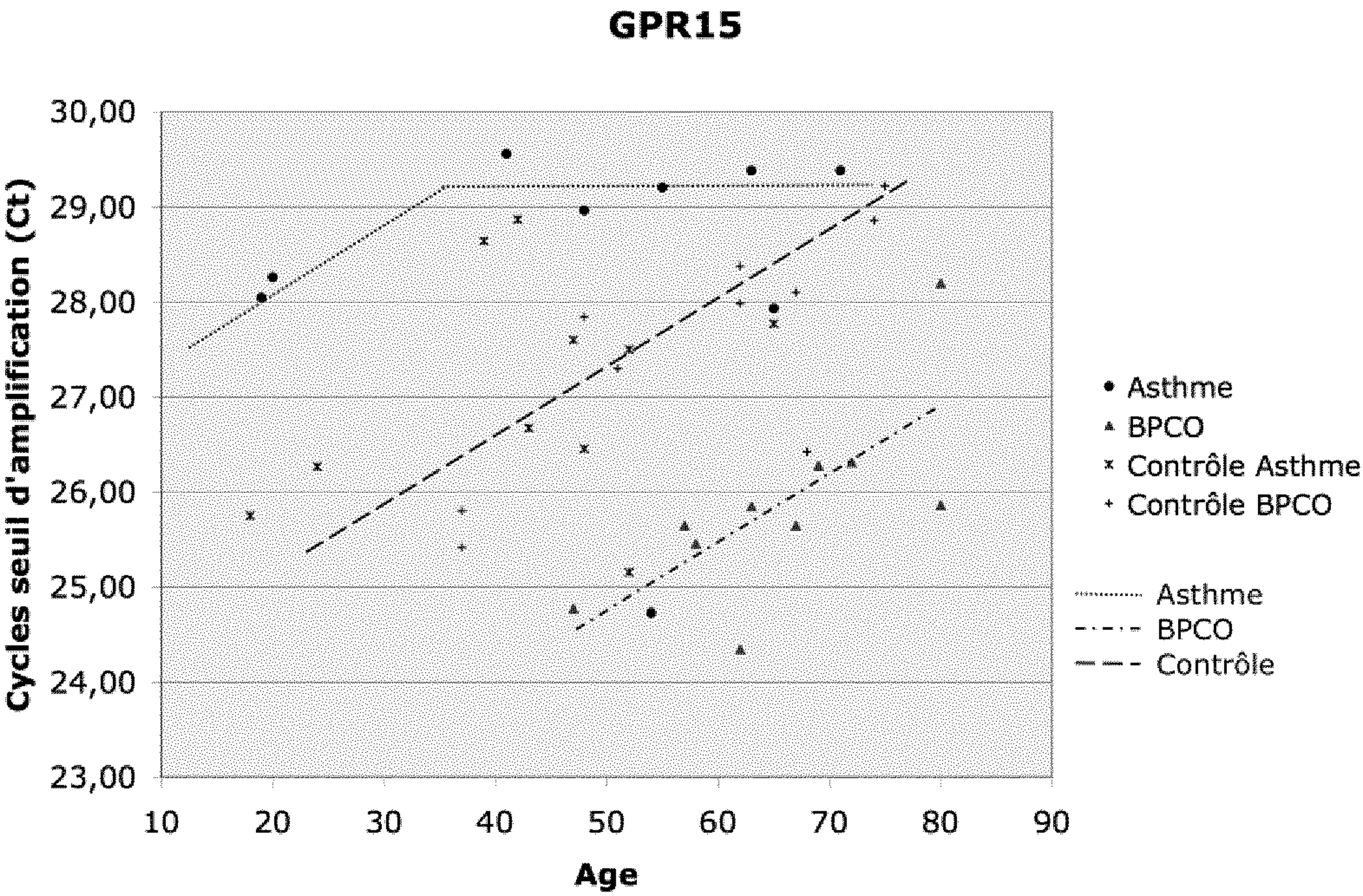


Figure 3

GPR15

