

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
05 décembre 2019 (05.12.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/229253 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/18 (2006.01) A61P 25/32 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2019/064216

(22) Date de dépôt international :

31 mai 2019 (31.05.2019)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1854634 30 mai 2018 (30.05.2018) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE DE ROUEN NORMANDIE
[FR/FR] ; 1, rue Thomas Becket, 76821 MONT SAINT
AIGNAN (FR). CENTRE HOSPITALIER UNIVERSI-
TAIRE DE ROUEN [FR/FR] ; 1 rue de Germont, 76000
ROUEN (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE
ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)
[FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 PARIS (FR).

(72) Inventeurs : GONZALEZ, Bruno ; 25 le Clos des Tilleuls,
76250 La Vaupalière (FR). MARRET, Stéphane ; 121 rue
de Bihorel, 76000 ROUEN (FR). BEKRI, Soumeiya ; 13,
ter rue du Cantony, 76160 ST LEGER DU BOURG DENIS
(FR). LAQUERRIERE, Annie ; 14 rue de la vieille côte
du calvaire, 76240 BONSECOURS (FR). LECOINTRE,
Maryline ; 84, rue des Bucailles, 27520 Saint Léger du Ge-
netey (FR). LEGER, Cécile ; 17 rue Gambetta, 76140 Le
Petit Quevilly (FR).

(74) Mandataire : REGIMBEAU ; 20, rue de Chazelles, 75847
PARIS CEDEX 17 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR,
KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))

Publiée:

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))
— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2(a))

(54) Title: TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISORDERS USING PLGF

(54) Titre : TRAITEMENT DES TROUBLES NEUROLOGIQUES AVEC LE PIGF

(57) Abstract: The invention relates to a placental growth factor (PIGF) as a drug for use in the prevention and/or treatment of a neurological disorder, particularly a neurodevelopmental disorder. Such disorders are particularly linked to a cortical impairment in subjects having been exposed to alcohol in utero. The present invention also relates to a pharmaceutical composition or to a product comprising PIGF for the same therapeutic uses.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un facteur de croissance placentaire (PIGF) en tant que médicament pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique, particulièrement un trouble neurodéveloppemental. Ces troubles sont notamment liés à un déficit cortical, chez un sujet ayant été exposé in utero à l'alcool. La présente invention concerne également une composition pharmaceutique ou un produit comprenant le PIGF pour ces mêmes applications thérapeutiques.



WO 2019/229253 A1

Traitement des troubles neurologiques avec le PIGF

INTRODUCTION

La présente invention concerne le domaine des troubles neurologiques, en particulier des troubles neurodéveloppementaux, leur prévention et/ou leur traitement.

5 Les troubles neurologiques sont des maladies qui affectent le système nerveux, central comme périphérique. Ils touchent plus d'un milliard de personnes à travers le monde. Près de 200 millions en Europe seule seraient touchées par au moins un trouble du cerveau. Les lésions cérébrales représentent notamment la première cause de décès ou de handicap acquis chez le nouveau-né. Les troubles neurologiques sont donc un problème majeur de
10 santé publique dans nos sociétés.

Les troubles neurologiques sont des pathologies touchant le système nerveux, central ou périphérique. Ils peuvent notamment être associés à un défaut d'organisation corticale ; ce défaut pouvant lui-même résulter d'une altération de la neurogénèse, comme par exemple un défaut de migration ou de prolifération des neurones et/ou des cellules
15 gliales. Ainsi, il est connu depuis longtemps que les causes de la schizophrénie comportent un aspect neurodéveloppemental (Weinberger, 1996, *Neuropsychopharmacology*. **14** : 1s-11s ; McGrath & Feron, 2003, *Ann Med*, **35**(2) : 86-93). Le déficit de maturation des neurones GABA pourrait ainsi causer l'hypofonction du récepteur NMDA, laquelle est liée à la schizophrénie (Hardingham et al., 2016, ; *Nat Rev Neurosci*. **17**(2) : 125-134 Nakazawa
20 et al., 2017, *NPJ Schizophr*. **3** : 7-11). On peut aussi citer l'épilepsie (Bui et al, 2015, *Cold Spring Harb Perspect Med*. **5**(11)) dont la cause pourrait être un dysfonctionnement de la maturation, de la migration et de l'intégration des interneurones (Katsarou et al., 2017, *Epilepsia Open*. **2**(3) : 284-306) ou des cellules gliales (Niu et al., 2019, *Nat Neurosci*. **22**(5) : 709-718). Par ailleurs, un défaut de migration des oligodendrocytes entraîne
25 l'apparition d'une sclérose en plaque. De façon plus générale, un ensemble de troubles neuronaux semble résulter d'un défaut de migration des neurones GABA et/ou des oligodendrocytes (voir, par exemple, Ramamoorthi & Lin, 2011, *Trends Mol Med*. **17**(8) : 452-462 ; Katsarou et al., 2017).

L'alcool est un tératogène responsable d'atteintes physiques et comportementales. Chez
30 l'Homme, l'exposition prénatale à l'alcool peut conduire à des altérations du

neurodéveloppement. Ainsi, la consommation d'alcool au cours de la grossesse (alcoolisation fœtale) constitue la première cause de handicap et notamment de retard mental d'origine non génétique au monde et également en France.

Les dommages varient selon la période où le fœtus a été exposé, les taux d'alcoolémie, les facteurs génétiques et environnementaux, le mode de consommation (chronique, binge drinking, etc.). Ils peuvent entraîner dans leurs manifestations les plus prononcées des anomalies physiques et des troubles des fonctions cognitives.

Les effets délétères d'une exposition *in utero* à l'alcool sur le cerveau en développement sont maintenant bien décrits (Archibald *et al.*, 2001, *Dev. Med. Child Neurol.* 43, 148-154 ; Riley *et al.*, 2011, *Neuropsychol. Rev.* 21, 73-80). Plus précisément, il a été mis en évidence qu'une exposition *in utero* à l'alcool dégradait de nombreuses structures cérébrales, telles que le corps calleux, entraînant des troubles cognitifs et comportementaux chez ces enfants (Bakoyiannis *et al.*, 2014, *Rev. Neurosci.* 25, 631-639). En particulier, il a été décrit que cette exposition perturbait la migration cellulaire dans diverses structures cérébrales telles que les ganglions de la base, le cortex frontal ou encore le cervelet (Jones and Smith, 1973, *Lancet Lond. Engl.* 302, 999-1001). De nombreuses études se sont intéressées aux mécanismes impliqués dans les effets délétères d'une exposition à l'alcool pendant le neurodéveloppement. Elles ont permis de démontrer que l'alcool altérait très tôt le développement cérébral en impactant la formation du tube neural (Haghighi Poodeh *et al.*, 2014, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 173-178), la neurogenèse (Olateju *et al.*, 2017, *Metab. Brain Dis.* 1-14), la migration neuronale (Shenoda, 2017, *Neurochem. Res.* 42, 1279-1287), la mort des cellules neurales par apoptose (Ikonomidou *et al.*, 2000, *Science* 287, 1056-1060), la gliogenèse (Rubert *et al.*, 2006, *J. Neurosci. Res.* 84, 483-496) ou encore la myélinisation par les oligodendrocytes (Pons-Vázquez *et al.*, 2011, *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf.* 46, 514-522).

Cibler les troubles neurologiques et en particulier les troubles neurodéveloppementaux liés à un défaut d'organisation corticale, notamment ceux dus à l'exposition *in utero* à l'alcool, apparaît donc comme une stratégie thérapeutique afin de prévenir et/ou traiter le plus tôt possible l'apparition de maladies neuropsychiatriques graves. Plus particulièrement, dans le cas de l'exposition *in utero* à l'alcool, une telle stratégie pourrait permettre de réduire, voire éviter la présence des symptômes comme

l'hyperactivité, la perte de l'attention, la dépression, l'anxiété, les troubles émotionnels, les troubles d'apprentissage, l'irritabilité excessive et les problèmes comportementaux qui se révèlent souvent entre 4 et 5 ans avec la scolarisation et sont susceptibles d'impacter à long terme sur l'intégration sociale et professionnelle de ces futurs adultes.

- 5 Il n'existe à ce jour aucun traitement à visée curative et/ou préventive des troubles neurologiques et en particulier des troubles neurodéveloppementaux dus à l'exposition *in utero* à l'alcool d'un sujet.

- De nouvelles thérapeutiques des troubles liés à l'alcoolisation *in utero* sont donc requises, afin de traiter les troubles neurologiques et en particulier, les troubles du développement neuronal et les symptômes qui y sont associés.
- 10

Il existe donc de façon plus générale un besoin visant à développer une nouvelle stratégie thérapeutique des troubles neuronaux, notamment ceux liés à un déficit d'organisation corticale.

DESCRIPTION

- 15 De façon surprenante, les inventeurs ont maintenant montré que le PlGF a la capacité de rétablir la mise en place de l'organisation corticale via le rétablissement de l'organisation et du fonctionnement des interneurons et/ou des cellules gliales. Le PlGF offre donc une possibilité de traitement des troubles neurologiques, notamment ceux liés à un défaut d'organisation corticale.
- 20 Les inventeurs ont précédemment démontré que le dosage placentaire du facteur de croissance placentaire (PlGF) permet d'identifier, parmi les enfants exposés *in utero* à l'alcool, ceux qui ont subi des atteintes cérébrales (FR1555727). Ces enfants présentent notamment une diminution des taux de PlGF placentaire qui correspond à une angiogenèse cérébrale altérée.
- 25 Les inventeurs ont maintenant mis en évidence que l'exposition *in utero* à l'alcool impacte la mise en place de deux populations de cellules nerveuses, les oligodendrocytes et les interneurons GABAergiques, notamment en agissant sur la régulation de ces dernières par les cellules endothéliales. Ils ont notamment montré qu'une exposition *in utero* à l'alcool perturbe l'activité de deux régulateurs de la migration cellulaire, à savoir la

métalloprotéinase MMP-9 et la protéase tPA, dans les microvaisseaux localisés le long de la voie de migration des interneurones (en particulier, la voie de migration piale). Cette perturbation endothéliale est en outre corrélée à une activation des récepteurs du NMDA et à une augmentation de la mobilisation calcique dans les cellules endothéliales corticales, démontrant un effet direct de l'alcool sur l'activité des cellules endothéliales néonatales. D'autre part, les inventeurs ont révélé qu'une exposition chronique à l'alcool *in vivo* induit une dysfonction endothéliale associée à une dérégulation de l'expression des sous-unités du récepteur NMDA. L'exposition *in utero* à l'alcool, *via* ces différents mécanismes, conduit à une perturbation de la corticogénèse des interneurones. En particulier, elle entraîne une augmentation de la densité des interneurones GABAergiques dans les couches corticales superficielles néonatales.

De manière surprenante, les inventeurs ont découvert dans un modèle pré-clinique d'alcoolisation *in utero*, qu'une supplémentation en PlGF placentaire corrige l'action de l'alcool sur des processus impliqués dans le neurodéveloppement au niveau embryonnaire et après la naissance, en particulier au stade néonatal. Ces processus sont ceux impliqués principalement dans la genèse, la prolifération et la migration et le positionnement neuronal et/ou glial, en particulier dans le cortex cérébral.

En particulier, une supplémentation en PlGF placentaire, de préférence par surexpression après électroporation placentaire *in utero*, corrige les effets délétères neurologiques de l'alcool en rétablissant le positionnement et la densité corticale des oligodendrocytes et des interneurones GABAergiques.

Le facteur de croissance placentaire (PlGF) a été décrit dans l'art antérieur comme une cible pour le traitement des maladies cardiovasculaires, des rétinopathies, des maladies cutanées ou encore de cancers (Lu et al., *Discov Med*, 2016 21 : 349-61, Aprile et al., *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015 95:165-78 et Shibuya, *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2015, 15:135-44). Plus spécifiquement, le PlGF a été décrit dans le traitement de rétinopathies chez l'adulte (US2015013359) et chez l'enfant (Hard et al., *Fondation Act Paediatrica* 2011 100, pp. 1063-1065). Néanmoins, aucune étude ne suggère l'effet thérapeutique de PlGF dans le traitement des troubles neurologiques et en particulier, des troubles liés au neurodéveloppement. En outre, des traitements permettant de corriger l'effet néfaste de l'alcool sur le développement neuronal n'ont pas été suggérés.

La présente invention ouvre ainsi une nouvelle voie dans la prévention et/ou le traitement des troubles neurologiques (dont les symptômes sont tels que l'hyperactivité, la perte de l'attention, la dépression, l'anxiété, les troubles émotionnels, irritabilité excessive, problèmes comportementaux, etc.) dus particulièrement à des migrations neuronales et oligodendrocytaires anormales au niveau cérébral.

Dans un premier aspect, la présente invention concerne ainsi un facteur de croissance placentaire (PlGF) pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique chez un sujet. Plus particulièrement, la présente invention concerne le PlGF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique lié à un défaut d'organisation corticale chez un sujet. Encore plus particulièrement, la présente invention concerne le PlGF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique chez un sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero*.

On entend par « PlGF » ou « Placental growth factor » ou « facteur de croissance placentaire » (tous ces termes sont synonymes) une protéine de la famille des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Plus particulièrement, PlGF au sens de l'invention est une protéine de 149 acides aminés hautement similaire à VEGF-A qui est reconnue par le même récepteur que ce dernier, le VEGF-R1, mais qui n'est pas reconnue par le récepteur VEGF-R2. PlGF est fortement exprimé par le placenta, mais pas par le fœtus et en particulier par le cerveau fœtal. PlGF glycosylé en N-terminal est sécrété et fonctionne en dimère pour contrôler l'angiogenèse. Le terme « PlGF » se réfère notamment à l'ensemble des 4 isoformes PlGF1-4 : PlGF-1 et PlGF-3 sont des isoformes qui ne lient pas l'héparine tandis que PlGF-2 et PlGF-4 contiennent des domaines supplémentaires qui permettent de fixer l'héparine. Encore plus préférentiellement, on entend par PlGF une protéine humaine dont la séquence est choisie parmi l'une quelconque des isoformes identifiées par les numéros d'accèsion Uniprot P49763-2 (PlGF-1 dont la séquences d'acides aminés correspond à la SEQ ID NO :1) ; P49763-3 (PlGF-2 dont la séquences d'acides aminés correspond à la SEQ ID NO :2) ; P49763-1 (PlGF-3 dont la séquences d'acides aminés correspond à la SEQ ID NO :3) ; P49763-4 (PlGF-4 dont la séquences d'acides aminés correspond à la SEQ ID NO :4) présentées dans le listage de séquences annexé à la présente demande.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, un PlGF recombinant ou des analogues protéiques du PlGF humain peuvent être également utilisés dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique. Dans un mode de réalisation préféré, ledit trouble neurologique est lié à un déficit d'organisation corticale ; plus préférentiellement, il est présent chez un sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero*.

Particulièrement, le PlGF de la présente invention est obtenu, en utilisant un système de production de protéine recombinante procaryote ou eucaryote, notamment en i) cultivant un microorganisme ou des cellules eucaryotes transformé(es) à l'aide d'une séquence nucléotidique codant le PlGF humain (numéro d'accèsion NCBI du gène 5228; numéro d'accèsion des transcrits NM_002632.5 (SEQ ID NO :5), NM001207012.1 (SEQ ID NO :6), NM_001293643.1 (SEQ ID NO :7)) et ii) isolant la protéine produite par ledit microorganisme ou lesdites cellules eucaryotes. Cette technique est bien connue de l'homme du métier. Pour plus de détails la concernant, on pourra se référer à l'ouvrage ci-après : Recombinant DNA Technology I, Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; Annals of the New-York Academy of Sciences, Volume 646, 1991. La protéine PlGF est de préférence purifiée / isolée à partir de lysats de cellules et/ou de surnageants de cellules par lesquelles elle est exprimée et/ou sécrétée. Cette purification peut se faire par tout moyen connu de l'homme du métier. De nombreuses techniques de purification sont décrites dans Voet D et Voet JG, Techniques de purification des protéines et des acides nucléiques.

Les systèmes de production de protéine recombinante utilisent des vecteurs nucléotidiques comprenant des acides nucléiques codant les polypeptides à synthétiser, qui sont introduits dans des cellules hôtes qui produisent lesdits polypeptides (pour plus de détails, se référer à « Recombinant DNA Technology I », Editors Ales Prokop, Raskesh K Bajpai ; *Annals of the New-York Academy of Sciences*, Volume 646, 1991).

De nombreux vecteurs dans lesquels on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple répllication de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de cette séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule

hôte (par exemple, les plasmides sont de préférence introduits dans des cellules bactériennes, tandis que les YACs sont de préférence utilisés dans des levures). Ces vecteurs d'expression peuvent être des plasmides, des YACs, des cosmides, des rétrovirus, des épisomes dérivés d'EBV, et tous les vecteurs que l'homme du métier peut juger appropriés à l'expression desdites chaînes.

Les vecteurs selon l'invention comprennent l'acide nucléique codant le PlGF, ou une séquence similaire, ainsi que les moyens nécessaires à son expression. On entend par « moyen nécessaire à l'expression d'un peptide », le terme peptide étant utilisé pour toute molécule peptidique, telle que protéine, polyprotéine, polypeptide, etc., tout moyen qui permet d'obtenir le peptide, tel que notamment un promoteur, un terminateur de transcription, une origine de répllication et de préférence un marqueur de sélection. Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide sont liés de façon opérationnelle à la séquence d'acides nucléiques codant pour le fragment polypeptidique de l'invention. Par « liés de façon opérationnelle », on entend une juxtaposition desdits éléments nécessaires à l'expression du gène codant pour le fragment polypeptidique de l'invention, lesquels sont en une relation telle que cela leur permet de fonctionner de façon attendue. Par exemple, il peut exister des bases supplémentaires entre le promoteur et le gène codant le fragment polypeptidique de l'invention tant que leur relation fonctionnelle est préservée. Les moyens nécessaires à l'expression d'un peptide peuvent être des moyens homologues, c'est-à-dire naturellement compris dans le génome du vecteur utilisé, ou bien être hétérologues, c'est-à-dire rajouté de façon artificielle à partir d'un autre vecteur et/ou organisme. Dans ce dernier cas, lesdits moyens sont clonés avec le fragment polypeptidique à exprimer. Des exemples de promoteurs hétérologues comprennent les promoteurs viraux tels que le promoteur SV40 (Virus simien 40), le promoteur du gène de la thymidine-kinase du virus simplex de l'Herpès (TK-HSV-1), le LTR du virus du sarcome de Rous (RSV), le promoteur premier immédiat du cytomégalovirus (CMV) et le promoteur dernier majeur adénoviral (MLP), ainsi que tout promoteur cellulaire qui contrôle la transcription des gènes codant pour des peptides chez des eucaryotes supérieurs, tel que le promoteur du gène de phosphoglycérate-kinase (PGK) constitutif (Adra et al., *Gene* Volume 60, Issue 1, 1987, Pages 65-74), le promoteur des gènes spécifiques du foie alpha1-antitrypsine et FIX et le promoteur SM22 spécifique des cellules du muscle lisse (Moessler et al., *Development* 1996 Aug;122(8):2415-25). Les méthodes de suppression et d'insertion

de séquences d'ADN dans des vecteurs d'expression sont largement connues de l'homme du métier et consistent notamment en des étapes de digestion enzymatique et ligature. Les vecteurs de l'invention peuvent également comprendre des séquences nécessaires au ciblage des peptides vers des compartiments cellulaires particuliers. Un exemple de ciblage peut être le ciblage vers le réticulum endoplasmique obtenu en utilisant des séquences d'adressage du type de la séquence leader issue de la protéine E3 de l'adénovirus (Ciernik I. F., et al., *The Journal of Immunology*, vol. 162, 1999, pages 3915-3925).

Le terme « terminateur de transcription » désigne ici une séquence du génome qui marque la fin de la transcription d'un gène ou d'un opéron, en ARN messenger. Le mécanisme de terminaison de la transcription est différent chez les procaryotes et chez les eucaryotes. L'homme du métier connaît les signaux à utiliser en fonction des différents types cellulaires. Par exemple, si la cellule dans laquelle le vecteur va être introduit est une bactérie, il utilisera un terminateur Rho-indépendant (séquence répétée inversée suivie d'une série de T (uraciles sur l'ARN transcrit) ou un terminateur Rho-dépendant (constitué d'une séquence consensus reconnue par la protéine Rho).

Le terme « origine de réplication » (aussi appelée ori) est une séquence unique d'ADN permettant l'initiation de la réplication. C'est à partir de cette séquence que débute une réplication unidirectionnelle ou bidirectionnelle. L'homme du métier sait que la structure de l'origine de réplication varie d'une espèce à l'autre ; elle est donc spécifique d'une espèce bien qu'elle ait certaines caractéristiques communes entre espèces. Un complexe protéique se forme au niveau de cette séquence et permet l'ouverture de l'ADN et le démarrage de la réplication.

Les vecteurs comprenant la séquence génétique codant PIGF sont préparés par des méthodes couramment utilisées par l'homme du métier. Les clones résultants peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standards connues de l'homme du métier pour introduire des polynucléotides dans une cellule hôte. De telles méthodes peuvent être la transformation à l'aide de dextrane, la précipitation par du phosphate de calcium, la transfection à l'aide de polybrène, la fusion de protoplastes, l'électroporation, l'encapsulation des polynucléotides dans des liposomes, l'injection biolistique et la micro-injection directe d'ADN dans le noyau. On peut également associer ladite séquence (isolée

ou insérée dans un vecteur plasmidique) avec une substance lui permettant de franchir la membrane des cellules hôtes, telle qu'un transporteur comme un nanotransporteur ou une préparation de liposomes, ou de polymères cationiques. En outre, on peut avantageusement combiner ces méthodes, par exemple en utilisant l'électroporation associée à des liposomes.

À titre d'exemples de microorganismes qui conviennent aux fins de l'invention, on peut citer les levures (Buckholz RG, *Current Opinion in Biotechnology* vol. 4, no. 5, 1993, pages 538 - 42) et les bactéries (Olins et Lee, *Current Opinion in Biotechnology* vol. 4, no. 5, 1993, pages 520 - 5). À titre d'exemples de cellules eucaryotes, on peut citer les cellules provenant d'animaux tels que les mammifères (Edwards CP et Aruffo A, *Current Opinion in Biotechnology* vol. 4, no. 5, 1993, pages 558 - 63), les reptiles, et équivalent. On peut également utiliser les cellules de plantes. Parmi les cellules de mammifère, on peut notamment utiliser les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), du singe (cellules COS et Vero), du rein de hamster nain (cellules BHK), du rein de cochon (cellules PK 15) et du rein de lapin (cellules RK13, les lignées cellulaires humaines de l'ostéosarcome (cellules 143 B), les lignées cellulaires humaines HeLa et les lignées cellulaires humaines de l'hépatome (du type cellules Hep G2). Il est également possible d'utiliser des cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en œuvre des baculovirus par exemple (Luckow VA, *Journal of Virology* vol. 67, no. 8, 1993, pages 4566 - 79). Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, la cellule hôte utilisée pour produire le fragment de l'invention est une bactérie, de préférence la bactérie *E. coli*.

L'homme du métier connaît les conditions dans lesquelles cultiver ces cellules, ainsi que les conditions expérimentales nécessaires à l'expression des fragments polypeptidiques par ces cellules.

Le procédé de production de PlGF recombinant peut comprendre les étapes suivantes :

- a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte comprenant le vecteur codant pour PlGF ; et
- b) l'isolement du PlGF produit à l'étape a).

Le PLGF peut être isolé (purifié) à partir de la cellule l'exprimant. Dans ce cas, une étape préalable de lyse desdites cellules pourra être nécessaire.

Les milieux et conditions de culture associées à chaque type cellulaire utilisé pour la production de protéines recombinantes sont bien connus de l'homme du métier.

- 5 L'isolement (ou la purification) de PLGF peut se faire par tout moyen connu de l'homme du métier. On citera par exemple la précipitation différentielle ou l'ultracentrifugation. Il peut être également avantageux de purifier le PLGF par chromatographie d'échange ionique, par chromatographie d'affinité, par tamisage moléculaire, ou par isofocalisation. Toutes ces techniques sont décrites dans Voet D et Voet JG, Techniques de purification
10 des protéines et des acides nucléiques, chapitre 6, *Biochimie*, 2^{de} édition.

- Plus précisément, dans une première étape, le matériel dont on veut extraire la protéine (tissu animal ou végétal, bactéries, etc.) est généralement broyé. Divers appareils (« Waring Blender », appareil Potter-Eveljhem, « Polytron », etc.) peuvent être employés à cette fin. Cette homogénéisation se fait dans un tampon de composition appropriée,
15 bien connue de l'homme du métier. L'homogénat ainsi obtenu est ensuite clarifié, le plus souvent par centrifugation, pour éliminer les grosses particules peu ou mal broyées ou encore pour obtenir la fraction cellulaire contenant la protéine recherchée. Si la protéine est justement dans un compartiment cellulaire, on utilise généralement un détergent doux (Triton X-100, Tween 20, désoxycholate de sodium, etc.) pour la libérer en dissolvant les
20 membranes de ce compartiment. L'emploi de détergent doit souvent être fait de façon contrôlée car ils peuvent briser les lysosomes, ce qui libère des enzymes hydrolytiques (protéases, nucléases, etc.) qui peuvent attaquer et détruire les protéines ou autres molécules qu'on veut isoler. Des précautions particulières doivent être prises si on travaille avec des protéines sensibles à la dégradation ou peu nombreuses. Une solution
25 fréquente à ce problème est l'inclusion dans les solutions d'inhibiteurs de protéases qui sont physiologiques (inhibiteurs de trypsine, antipaïne, leupeptine, etc.) ou artificiels (E64, PMSF, etc.). Ensuite diverses techniques existent pour isoler la protéine recherchée.

- Une des méthodes se prêtant le mieux à de gros volumes est la précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Les chromatographies d'échange ionique ou les chromatographies
30 d'affinité, applicables aussi à de gros volumes d'échantillon mais ayant un assez bon

pouvoir de séparation, constituent de bonnes méthodes intermédiaires. Pour finaliser la purification, le tamisage moléculaire ou l'isofocalisation sont souvent utilisés. Ces techniques permettent de raffiner la pureté, mais nécessitent de très petits volumes de protéines concentrées. Il est souvent avantageux, entre ces étapes, d'éliminer les sels ou produits utilisés dans ces chromatographies. Ceci peut être obtenu par dialyse ou par ultrafiltration.

Il peut aussi être avantageux d'utiliser un vecteur portant une séquence permettant d'identifier le PLGF de l'invention. De plus, il peut être avantageux de faciliter la sécrétion dans un système procaryote ou eucaryote. En effet, dans ce cas, la protéine recombinante d'intérêt sera présente dans le surnageant de la culture cellulaire plutôt qu'à l'intérieur des cellules hôtes.

Le PLGF peut être produit à des taux atteignant au moins 1mg par litre, de préférence 2 mg par litre, de manière encore plus préférée, 5mg par litre de culture cellulaire.

De manière alternative, il est possible de préparer le PLGF par synthèse chimique. L'homme du métier connaît les procédés de synthèse chimique, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou utilisant des phases solides partielles, par condensation de la protéine ou par une synthèse en solution classique. Les fragments de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production. Cette synthèse chimique peut être couplée à une approche de génie génétique ou par génie génétique seul en utilisant les techniques bien connues de l'homme du métier et décrites par exemple dans Sambrook J. et al., *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*, 1989. Les réactifs et produits de départ sont commercialement disponibles, ou peuvent être synthétisés par des techniques conventionnelles bien connues (voir par exemple, WO 00/12508, WO 2005/085260).

En particulier des analogues de PLGF peuvent être synthétisés en utilisant la technique décrite par Zheng et al. (*Acta Ophthalmologica* 2012 90(7) : e512 - e523).

Comme indiqué précédemment, la présente invention a pour objet un PLGF pour son utilisation dans la prévention et le traitement d'un trouble neurologique chez un sujet, en particulier un trouble neurologique lié à un déficit d'organisation corticale, et encore plus particulièrement chez un sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero*.

5 On entend par « trouble neurologique » des pathologies touchant le système nerveux, central ou périphérique, c'est-à-dire l'ensemble des troubles dus à une atteinte des nerfs, de la moelle épinière, du tronc cérébral, du cervelet ou du cerveau (dont l'ensemble constitue le système nerveux). Les troubles neurologiques ont souvent pour effet des troubles moteurs, des troubles cognitifs, des troubles sensitifs et/ou sensoriels. Les
10 troubles neurologiques au sens de l'invention comprennent entre autres la schizophrénie, la sclérose en plaque, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrome de Dravet (DS), la lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS), le syndrome de Miller-Dieker, les troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF), la maladie
15 d'Alzheimer, la démence à corps de Lewy (DCL), la dégénérescence fronto-temporale (DFT), l'atrophie multisystématisée, la chorée de Huntington, la maladie de Charcot, les dystonies, la maladie de Parkinson, les troubles bipolaires, la dépression, troubles obsessionnels compulsifs (TOC), etc.

On entend par « système nerveux » un système biologique animal responsable de la
20 coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps. Plus particulièrement, le « système nerveux » selon l'invention est un groupe organisé de cellules spécialisées pour la conduction des stimuli électrochimiques à partir des récepteurs sensoriels à travers un réseau vers le site auquel une réponse se produit. On distingue le système nerveux central et le système nerveux
25 périphérique.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « système nerveux central ou SNC » désigne un système constitué par l'encéphale comprenant le cerveau, et plus particulièrement le cortex cérébral, le tronc cérébral, et le cervelet situés dans la boîte crânienne, et la moelle épinière située dans le canal rachidien. Le rôle du système nerveux
30 central est de recevoir, enregistrer et interpréter les signaux qui parviennent de la périphérie, et d'organiser la réponse à envoyer. Le système nerveux central est souvent

opposé au système nerveux périphérique qui est constitué par les nerfs crâniens et les nerfs spinaux, rattachés au système nerveux central. Les éléments du système nerveux central sont les cellules nerveuses, à savoir : les neurones et les cellules gliales.

Par « cortex cérébral », on entend ici la substance grise périphérique des hémisphères
5 cérébraux. Le cortex se compose de trois couches (pour l'archi- et le paléo-cortex) à six couches (pour le néocortex) renfermant différentes classes de neurones, notamment les interneurones, et de cellules gliales. La formation du cortex cérébral au cours du développement fait intervenir la multiplication des précurseurs des neurones, suivie de leur migration vers des zones spécifiques du cortex. Les cellules gliales se multiplient et
10 migrent de façon similaire, leurs progéniteurs étant différents de ceux des neurones. Toute altération de ce processus de multiplication et/ou de migration des cellules nerveuses conduit à une défaillance de la mise en place de l'organisation corticale, entraînant un déficit d'organisation corticale.

Dans le contexte de la présente invention, on entend par « la mise en place de
15 l'organisation corticale » les processus aboutissant à l'organisation du cortex cérébral (ou encore nommé néocortex dans la présente description). La mise en place du cortex cérébral est une opération complexe qui met en jeu la production d'une variété remarquable de neurones excitateurs et inhibiteurs, qui sont ensuite assemblés en circuits fonctionnels qui s'organisent en couches et en aires. Par « déficit d'organisation
20 corticale », on entend ici toute altération de l'organisation du cortex cérébral. Les pathologies du développement cortical sont nombreuses et variées ; elles jouent un rôle important dans l'étiologie de nombreuses pathologies neuropsychiatriques. Dans certains cas, il s'agit de pathologies sévères de la mise en place du cortex à des stades précoces du développement comme des malformations et des désordres de lamination, mais il peut
25 aussi s'agir d'altérations plus subtiles de la formation et du raffinement des connexions nerveuses qui altèrent la balance excitation/inhibition. Par exemple, une altération du balance excitation/inhibition peut être due à un déficit de maturation des interneurones GABAérgiques causé par une diminution de la fonction des récepteurs NMDAR. Ces altérations de l'organisation corticale comprennent notamment les malformations dues à
30 une anomalie du développement cortical (MDC), lesquelles désignent un large spectre de malformations cérébrales constituées pendant l'embryogenèse. Les MDC sont responsables

- d'épilepsie, de troubles neurologiques et cognitifs de sévérité variable, en relation avec le stade de survenue des troubles et l'étendue de la malformation. On distingue entre autres les troubles de la prolifération neuronale et gliale (hémimégalencéphalie, sclérose tubéreuse de Bourneville, dysplasie corticale focale type Taylor [DCFT], tumeur dysembryoplasique neuroépithéliale [DNT] et gangliogliome), les troubles de la migration neuronale (lissencéphalie, hétérotopie laminaire sous-corticale et nodulaire périventriculaire ou sous-corticale) et les troubles de l'organisation corticale (polymicrogyrie, schizencéphalie). En ce qui concerne les effets de l'exposition fœtale à l'alcool, ceux-ci peuvent notamment se traduire par une altération du développement du cortex cérébral qui intervient entre le 3^{ème} et le 7^{ème} mois de grossesse à partir de la partie dorsale du télencéphale. Particulièrement, cette altération concerne la prolifération, la migration, la différenciation, la synaptogénèse et l'apoptose des cellules neuronales et/ou des cellules gliales qui constituent le cortex cérébral. Spécifiquement, l'exposition fœtale à l'alcool altère la migration des cellules nerveuses et/ou des cellules gliales.
- 15 Dans le contexte de la présente invention, les termes « neurones » ou « cellules neuronales » désignent une cellule anatomiquement et physiologiquement spécialisée dans la réception, l'intégration et la transmission d'informations. Les neurones possèdent ainsi des structures propres (axones, dendrites et synapses) leur permettant d'exercer la transmission nerveuse.
- 20 Dans le contexte de la présente invention, le terme « cellules gliales » désigne les cellules qui constituent le tissu de soutien du système nerveux. Elles assurent le lien avec les vaisseaux sanguins et apportent les nutriments essentiels au fonctionnement métabolique du système nerveux. On distingue plusieurs types de cellules gliales, comme par exemple, les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, et les cellules épendymaires.
- 25 Selon un mode de réalisation préféré, la présente invention a pour objet un PI GF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique chez un sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero*, ledit trouble neurologique étant un trouble de neurodéveloppement. Préférentiellement, le trouble neurologique est lié à un déficit d'organisation corticale. Plus préférentiellement, le sujet souffrant dudit trouble
- 30 neurologique a été exposé à l'alcool *in utero*.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « trouble de neurodéveloppement » ou trouble du développement neurologique » ou « trouble neurodéveloppemental » se rapporte à un ensemble d'affections qui débutent au stade embryonnaire et qui affectent le développement du système nerveux, en particulier le développement du système nerveux central.

Selon un mode de réalisation préféré, le trouble neurodéveloppemental est une défaillance dans la mise en place du système nerveux central, notamment du cortex cérébral. Celle-ci affecte préférentiellement, la prolifération, la migration la croissance et/ou la différenciation des cellules nerveuses et ou des cellules gliales, en particulier chez un sujet exposé à l'alcool *in utero*.

Dans le contexte de la présente invention l'expression « la mise en place du système nerveux central » signifie la compartimentalisation du SNC à laquelle aboutit le neurodéveloppement. Cette compartimentalisation peut être affectée par différents facteurs endogènes, tels qu'une mutation génétique, une altération de réseau vasculaire cérébral etc., ou des facteurs exogènes tel que l'exposition à des composés toxiques et en particulier, l'exposition *in utero* à l'alcool, ce qui aboutit par exemple à la mise en place d'agrégats de neurones, localisés ou diffus.

Dans le contexte de la présente invention, l'expression « la prolifération de cellules neuronales et/ou des cellules gliales » désigne la capacité des cellules souches neuronales et gliales à se multiplier, ce qui résulte ultimement dans la production des neurones et de la glie radiale, lesquels sont nécessaires à la formation définitive d'une structure neuronale, notamment à la formation du cortex cérébral. Lorsque la prolifération des cellules nerveuses est affectée suite à une exposition *in utero* à l'alcool, cette prolifération affectée, se traduit par exemple, par une modification, le plus souvent, par une diminution du nombre des cellules neuronales et/ou gliales de manière générale dans plusieurs structures cérébrales. En particulier, il peut s'agir d'une modification du nombre de neurones dans le néocortex. La désorganisation du réseau vasculaire cérébral qui participe à la migration des cellules nerveuses peut entraîner par exemple une altération de la migration des neurones GABAergiques vers le cortex cérébral (Won et al., 2013, *Nat Commun.*, 4 :2149).

Dans le contexte de la présente invention, l'expression « la migration des cellules neuronales et/ou des cellules gliales » désigne le processus par lequel ces cellules migrent d'un endroit ou d'une structure du système nerveux central où elles sont normalement produites vers un autre endroit ou une autre structure de ce système où elles participent à la formation d'une structure neuronale particulière et à son fonctionnement. La migration cellulaire neuronales et/ou gliale peut être diminuée, voir totalement empêchée, à cause de différents facteurs endogènes, tels qu'une mutation génétique, une altération de réseau vasculaire cérébral etc., ou de facteurs exogènes tel que l'exposition à des composés toxiques et en particulier, l'exposition *in utero* à l'alcool. Le résultat d'une migration cellulaire affectée est un dysfonctionnement de la structure neuronale vers laquelle les cellules nerveuses et/ou gliales devaient migrer. Alternativement, les facteurs endogènes et/ou exogènes mentionnés plus haut (comme par exemple l'exposition fœtale à l'alcool) peuvent provoquer également une migration accrue des cellules nerveuses entraînant une augmentation anormale de la densité des structures neuronales qui empêchent également leur fonctionnement. Par exemple une altération de la migration des cellules neuronales et/ou des cellules gliales entraîne le plus fréquemment une réorganisation du cortex cérébral qui se traduit par une microcéphalie. Une altération de la migration des neurones NMDA et des interneurons GABAérgiques entraînera le plus souvent une perte d'équilibre entre les processus d'excitation et d'inhibition du SNC.

Particulièrement, ces facteurs endogènes et/ou exogènes, comme par exemple l'alcoolisation fœtale, peuvent affecter les migrations radiale et tangentielle de cellules nerveuses dans le cortex cérébral et empêcher ainsi une corticogenèse correcte.

Dans le contexte de la présente invention, l'expression « la croissance des cellules neuronales et/ou des cellules gliales » désigne le processus par lequel ces cellules accumulent de la masse et augmentent leur taille physique. Une altération de la croissance de ces cellules sous l'effet des facteurs endogènes et/ou exogènes mentionnés plus haut (comme par exemple l'exposition fœtale à l'alcool) peut notamment provoquer un retard de croissance morphologique intra-utérine, une microcéphalie ou à la réduction de la taille du cortex préfrontal.

Dans le contexte de la présente invention, l'expression « la différenciation des cellules nerveuses » renvoie au processus par lequel des cellules précurseurs se différencient en cellules neuronales et/ou gliales ayant des structures et des fonctions spécifiques. Une défaillance de ce processus peut, par exemple, se traduire par l'impossibilité pour les
5 cellules gliales de se différencier en oligodendrocytes ou en astrocytes impliqués dans les processus de migration cellulaire, de myélinisation des fibres nerveuses et de régulation de l'homéostasie nerveuse.

L'altération de l'expression de gènes spécifiques des neurones et/ou des cellules gliales (par exemple le gène GluN1 codant une sous-unité du récepteur NMDAR des interneurons
10 GABAérgiques), la désorganisation du réseau vasculaire cérébrale et/ou l'exposition à des facteurs extérieurs toxiques, en particulier, la consommation d'alcool pendant la grossesse, entraînent souvent l'apparition d'un ou plusieurs des troubles neurodéveloppementaux mentionnés ci-dessus.

Selon un mode de réalisation plus préféré de la présente invention, le trouble
15 neurodéveloppemental est une défaillance de la mise en place de l'organisation corticale (ou néocorticale).

Ainsi, selon la présente invention, le PLGF est utilisé dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurodéveloppemental qui est une défaillance dans la mise en place de l'organisation corticale.

20 Selon un autre mode de réalisation, les troubles du neurodéveloppement, notamment ceux résultant de l'exposition d'un sujet à l'alcool *in utero*, sont associés à la perturbation de la gliogenèse des astrocytes et/ou des oligodendrocytes, à une perturbation de la productions des progéniteurs neuronaux, ou encore à une ventriculomégalie associée à des anomalies des ganglions de la base, du corps calleux, de l'hippocampe, de
25 l'hypothalamus, de l'hypophyse, du cervelet, du bulbe olfactif, du diencéphale ou du tronc cérébral.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, le trouble neurodéveloppemental est une défaillance de la migration des cellules neuronales et/ou des cellules gliales ou une défaillance de leur prolifération. De manière préférée, le

trouble neurodéveloppemental est une défaillance de la migration des cellules neuronales et/ou des cellules gliales.

De manière encore plus préférée, cette défaillance est une défaillance dans la migration des interneurones GABAergiques et/ou des oligodendrocytes.

- 5 Dans le contexte de la présente invention, le terme « interneurone » désigne un neurone bi ou multipolaire qui établit de multiples connexions entre un réseau afférent et un réseau efférent. La majorité des interneurones sont inhibiteurs et sécrètent un neurotransmetteur caractéristique, le GABA (acide γ -aminobutyrique).

- 10 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, le trouble neurologique est une interneuronopathie. Le terme « interneuronopathie » désigne un groupe de maladies liées à un développement, à une migration et/ou à un fonctionnement altéré des interneurones. Les interneuronopathies telles qu'on les entend ici comprennent par exemple la schizophrénie, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrome de Dravet (DS), la
15 lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS) et le syndrome de Miller-Dieker.

- Dans le contexte de la présente invention, le terme « interneurones GABAergiques » désigne des interneurones utilisant le GABA comme neurotransmetteur. Ces interneurones représentent 20 à 30 % des neurones corticaux et sont localisés autour des neurones
20 pyramidaux excitateurs afin d'en assurer leur régulation. Il existe chez l'Homme deux lignages de précurseurs d'interneurones GABAergiques distincts par leurs origines embryonnaires. Le premier lignage, qui représente 65 % de l'innervation corticale GABAergique, est originaire des ZV et ZSV du télencéphale dorsal. Le second lignage est originaire des éminences ganglionnaires (EG) du télencéphale ventral et représente 35 %
25 des interneurones GABAergiques. Dans le cortex cérébral mature, l'homéostasie de l'activité neuronale est assurée par une balance entre les systèmes neuronaux excitateur et inhibiteur. La composante inhibitrice est assurée en majorité par les interneurones GABAergiques.

- Au sens de la présente invention, l'expression « migration des interneurones
30 GABAergiques » désigne un processus qui débute par la migration des progéniteurs

GABAergiques du télencéphale où ils sont générés pour atteindre leur position définitive dans le néocortex mais également au niveau du stratum de l'hippocampe ou encore dans les bulbes olfactifs. Chez l'Homme, une partie de ces neurones migrent par voie radiale et l'autre par voie tangentielle. Ils existent deux voies de migration tangentielle
5 différentes : une voie superficielle ou piale et une voie profonde ou périventriculaire. La principale vague de migration des neurones corticaux s'étend de la 10ème à la 25ème SG, même si certains progéniteurs GABAergiques commencent à migrer avant cette période. Pendant leur phase de migration tangentielle, les progéniteurs GABAergiques vont se servir du réseau vasculaire déjà mis en place comme support physique et comme guide de
10 leur migration. En effet, les cellules endothéliales du réseau vasculaire cérébral vont sécréter du GABA qui va se fixer sur les récepteurs GABA-A et GABA-B exprimés par les précurseurs GABAergiques en migration. La fixation du GABA va ainsi agir comme un signal de guidage assurant la communication entre la cellule en migration et la cellule endothéliale. Une fois leur migration tangentielle achevée, les précurseurs GABAergiques
15 doivent migrer radialement afin d'atteindre leur destination finale au sein de la plaque corticale. Les interneurones GABA utilisent également la glie radiaire comme support de migration et comme support structural de leur positionnement dans le néocortex.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, le PLGF est utilisé pour prévenir et/ou traiter un trouble neurodéveloppemental causé par la défaillance de la
20 migration de la voie piale des interneurones GABAergiques. Plus préférentiellement, ladite défaillance de la migration de la voie piale des interneurones GABAergiques est induite par l'alcoolisation *in utero*, par exemple à travers une dysfonction endothéliale

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, le PLGF est utilisé pour prévenir et/ou traiter un trouble neurodéveloppemental causé par une défaillance
25 de la prolifération, la croissance, la migration et/ou la différenciation des cellules gliales, en particulier par une défaillance de la migration des oligodendrocytes. Plus préférentiellement, cette défaillance est causée par une alcoolisation *in utero*.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « oligodendrocyte » désigne une cellule du système nerveux central appartenant à la névroglie interstitielle (il s'agit d'une
30 cellule de soutien). On la retrouve ces cellules aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche. Dans la substance grise, les oligodendrocytes ont une position

proche des péricaryons (corps cellulaires) des neurones et ont un rôle métabolique. Dans la substance blanche, ils ont le rôle de myélinisation axonale. Elles proviennent des précurseurs de cellules gliales (glioblastes) du tube neuronal embryonnaire. Chez les mammifères, les oligodendrocytes qui vont coloniser le corps calleux et le néocortex sont
5 générés au niveau des éminences ganglionnaires et migrent selon un processus vasculo-dépendant (Tsai et al., *Science*, 2016).

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un PlGF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurodéveloppemental lié à une perturbation de l'activité des métalloprotéinases matricielle (MMP) et/ou d'un
10 inhibiteur de celle-ci. Plus préférentiellement, cette perturbation est causée par une alcoolisation *in utero*.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « métalloprotéinase matricielle ou MMP » désigne une famille des protéases capables de dégrader des éléments de la lame basale endothéliale de la matrice extracellulaire lorsqu'elles sont activées.

15 Dans le contexte de la présente invention le terme « inhibiteur de métalloprotéase » désigne une α -macroglobuline ou des protéines inhibitrices telles que TIMP « Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease », qui peuvent former des complexes non covalents avec la métalloprotéinase sous sa forme active.

Selon un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un PlGF pour son
20 utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurodéveloppemental lié à une perturbation de l'activité des métalloprotéases matricielle MMP-2 et/ou MMP-9, préférentiellement MMP-9.

Dans le contexte de la présente invention, le terme « MMP-9 » (dont la séquence d'acides aminés correspond à la SEQ ID NO :8 ; référence Uniprot : P14780 et référence NCBI
25 correspondant à la séquence d'acides nucléiques : Genbank : NG_011468.1) désigne une métalloprotéinase qui appartient à la famille des gélatinases et est principalement sécrétée par les cellules endothéliales et en petite quantité par les astrocytes. Le glutamate, *via* le récepteur NMDA, peut entraîner l'activation de ces MMP-9 en induisant la sécrétion de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA dont la séquence d'acides
30 aminés correspond à la SEQ ID NO :9 ; référence Uniprot : P00750 et référence NCBI

correspondant à la séquence d'acides nucléiques : Genbank : NG_023264.1) endothélial qui va alors provoquer le clivage du plasminogène en plasmine, permettant ainsi le clivage du prodomaine des MMP-9 et son activation (Figure 3).

5 Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un PlGF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurodéveloppemental lié à une perturbation de l'activité de l'inhibiteur tPA (l'activateur tissulaire du plasminogène). Plus préférentiellement, cette perturbation est causée par une alcoolisation *in utero*.

10 Selon un mode de réalisation particulièrement préféré, la présente invention concerne un PlGF pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurodéveloppemental lié à une perturbation de l'activité de la métalloprotéase matricielle MMP-9 et/ou de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). Plus préférentiellement, cette perturbation est causée par une alcoolisation *in utero*.

15 Dans ce cas particulier, la perturbation de l'activité de MMP-9 et/ou de tPA dépend notamment de la manière dont se passe l'exposition à l'alcool *in utero*, à savoir, de manière chronique (de l'alcool, même en faible quantité absorbée de manière régulière au cours de la grossesse) ou de manière aiguë (une forte quantité d'alcool même absorbée une seule fois au cours de la grossesse).

20 Les inventeurs ont démontré qu'un traitement aigu à l'alcool (absorption d'une quantité d'alcool importante en une seule fois) conduit à une inhibition de l'activité de MMP-9 et/ou de tPA au niveau de la voie de migration piale ce qui diminue la migration neuronale et/ou gliale.

25 Au contraire, une exposition chronique à l'alcool exacerbe l'activité de MMP-9 et/ou de tPA provoquant ainsi une migration accrue des interneurones GABAergiques vers le néocortex ou leur densité se trouve augmenter plus que la normale.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, les troubles neurologiques et en particulier les troubles neurodéveloppementaux sont de préférence ceux qui se manifestent typiquement précocement durant le développement. Ils sont caractérisés par des déficits du développement qui entraînent une altération du fonctionnement

personnel, social, scolaire ou professionnel. Les troubles du développement neurologique s'exprimant parfois par un retard mental et plus souvent par des difficultés d'apprentissage, difficulté de mémorisation, perte de concentration, hyperactivité, dépression, instabilité émotionnelle et troubles comportementaux etc. De tels troubles

5 sont choisis par exemple dans le groupe comprenant la schizophrénie, la sclérose en plaque, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrome de Dravet (DS), la lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS), le syndrome de Miller-Dieker et les troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF).

10 La majorité des enfants qui ont été exposés à l'alcool *in utero* présente des troubles neurologiques qui s'expriment par des troubles d'inadaptation et du comportement qui se révèlent progressivement avec l'âge (comprenant des difficultés d'allaitement et d'alimentation, des troubles du sommeil puis, à l'âge scolaire, des anomalies du comportement, des troubles cognitifs retentissant sur l'apprentissage, des déficits

15 intellectuels avec un QI abaissé de 20 points (1 à 2 écarts type), des difficultés d'apprentissage de la lecture (dyslexie) et plus encore du calcul (dyscalculie), des troubles de l'attention accompagnés d'hyperactivité ou d'hypercinésie. Ils sont connus sous le nom de Syndrome Déficitaire de l'Attention avec hyper kinésie (SDAH) (ou Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) en anglais).

20 Selon un mode de réalisation, la présente invention concerne un PlGF pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'un trouble neurologique chez un sujet exposé *in utero* à l'alcool, ledit trouble se manifestant par un ou plusieurs symptômes choisis dans le groupe comprenant la diminution de la masse cervicale, l'hyperactivité, la perte de l'attention, la difficulté d'apprentissage, la difficulté de mémorisation, la dépression,

25 l'anxiété, les troubles émotionnels, l'irritabilité excessive et les problèmes comportementaux.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention le sujet traité est un sujet ayant été exposé *in utero* à l'alcool qui est choisi parmi un embryon, un fœtus ou un enfant, de préférence un fœtus ou un enfant, en particulier, un enfant prématuré.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, la présente invention concerne un PlGF pour son utilisation dans le traitement et/ou la prévention d'un trouble neurologique dû à l'exposition *in utero* à l'alcool chez un enfant prématuré.

5 La période entre la 30^{ème} semaine gestationnelle et le terme de la grossesse est essentielle pour la corticogenèse cérébrale. Il est ainsi particulièrement préféré d'administrer le PlGF à un fœtus, notamment à un fœtus exposé *in utero* à l'alcool à cette période précisément.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, lorsque le sujet est un enfant prématuré, le traitement consistera à supplémenter en PlGF ce sujet sur la période *ex utero* correspondante aux semaines de vie intra-utérines perdues. De préférence, la
10 fenêtre de traitement peut s'étendre de la 30^{ème} semaine gestationnelle au terme théorique (40 semaines gestationnelles), période durant laquelle l'angiogenèse cérébrale chez l'Homme est particulièrement intense.

On entend par « sujet » selon l'invention un humain, et de préférence un embryon, un fœtus ou un enfant. Un « embryon », tel qu'on l'entend ici, correspond à un ovocyte
15 fécondé de moins de trois mois. Par « fœtus », on entend ici un individu pris avant la naissance et dont l'âge gestationnel est compris entre 3 et 9 mois. Après l'accouchement, le sujet devient un enfant. Par « enfant », on entend selon l'invention un individu dont l'âge est inférieur à 3 ans. Sont ainsi compris dans la catégorie des enfants selon l'invention, les nouveau-nés, dont l'âge est compris entre 0 et 1 mois, les nourrissons, qui
20 ont entre 1 mois et 2 ans, et les enfants proprement dits, qui sont âgés d'au moins 2 ans. Un « nouveau-né », comme on l'entend ici, peut aussi bien être né à terme qu'être prématuré. Dans le contexte de la présente demande le terme « prématuré » désigne un enfant né vivant avant 37 semaines d'aménorrhée. Ce terme recouvre trois sous-catégories : la prématurité extrême (<28 semaines); la grande prématurité (entre la 28^e et la 32^e
25 semaine); la prématurité moyenne, voire tardive (entre la 32^e et la 37^e semaine). Dans la présente invention les enfants prématurés traités par PlGF sont de préférence dans la catégorie de prématurité moyenne, voire tardive.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, le sujet est un sujet avec des troubles d'alcoolisation fœtale (sujet TCAF) ou un sujet SAF (atteint du syndrome
30 d'alcoolisation fœtale).

L'expression « un sujet avec des troubles d'alcoolisation fœtale » ou « sujet TCAF » telle qu'utilisée ici se rapporte à un embryon, un fœtus ou un sujet, en particulier humain, qui est exposé ou susceptible d'être exposé à l'alcool *in utero* et qui souffre de troubles d'alcoolisation fœtale ou qui est en danger de développer en raison de la consommation maternelle d'alcool une des conditions liées aux troubles d'alcoolisation fœtale par exemple, un trouble neurologique. Lorsqu'un sujet TCAF est atteint en particulier par un SAF, on parle dans ce cas d'un « sujet SAF ».

Par « traitement », on entend ici toute action permettant de diminuer ou d'éradiquer les symptômes ou les causes des troubles neurologiques. Un traitement au sens de l'invention peut comprendre l'administration de PlGF (ou la supplémentation par PlGF), d'une composition pharmaceutique ou d'un produit le comprenant avec ou sans un suivi psychothérapeutique.

Par « prévention », on entend ici toute action permettant de prévenir complètement ou partiellement le risque d'apparition des symptômes ou les causes des troubles neurologiques dus à l'alcoolisation fœtale. Une prévention au sens de la présente invention comprend l'administration de PlGF, d'une composition pharmaceutique, à un sujet exposé *in utero* à l'alcool ou à un sujet ayant été exposé *in utero* à l'alcool mais pour lequel les symptômes des troubles neurologiques ne sont pas encore apparus et le développement cérébral est toujours en cours. Les inventeurs mettent à profit le fait que le PlGF est un facteur placentaire naturellement présent à ces stades du développement fœtal chez un sujet sain ce qui présente l'avantage d'une utilisation aisée de PlGF par compensation dans la prévention des troubles neurologiques.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, le facteur de croissance placentaire est administré en une quantité thérapeutiquement efficace à un sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero*.

Dans le contexte de l'invention, « une quantité thérapeutiquement efficace » signifie une quantité suffisante pour influencer le cours thérapeutique d'un état pathologique particulier. Une quantité thérapeutiquement efficace est également celle à laquelle tous les effets toxiques ou secondaires de l'agent sont compensés par les effets thérapeutiquement bénéfiques du principe actif utilisé.

Selon un autre mode de réalisation de la présente invention, le facteur de croissance placentaire (PlGF) est administré *in utero* et/ou *ex utero*. Il est ainsi envisageable de débiter un traitement (ou une prévention) par l'administration de PlGF durant la période intra-utérine et de le continuer après l'accouchement notamment lorsque l'enfant est né prématurément et qu'il perd par conséquent l'apport physiologique du PlGF placentaire.

De préférence, le PlGF sera administré seul ou dans une composition pharmaceutique par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, sous-cutanée, ou orale. De manière plus préférée, le PlGF sera administré à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

- 10 En particulier, lorsque l'administration de PlGF est effectuée *in utero*, celle-ci a lieu de préférence directement au niveau placentaire afin d'atteindre plus rapidement le cerveau fœtal et éviter la dégradation de la protéine par l'organisme maternel.

- 15 Lorsque l'administration de PlGF a lieu après la naissance, de préférence, celui-ci est administré par voie parentérale, de préférence intraveineuse surtout s'il s'agit d'un enfant prématuré ou d'un nouveau-né.

- 20 Les modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

- 25 Lorsque le PlGF est administré sous forme de compositions pharmaceutiques, pour l'administration sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique locale, le PlGF peut être administré sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques au sujet en ayant besoin. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie intramusculaire, intraveineuse.

Comme indiqué ci-dessus, le choix de la voie d'administration la plus appropriée dépendra du moment où cette administration sera effectuée. En particulier, lorsque l'administration d'une composition cosmétique comprenant PlGF est effectuée *in utero*,

celle-ci se fera par voie intermusculaire ou voie intraveineuse, de préférence au niveau placentaire. L'administration de la composition pharmaceutique comprenant le PlGF à un enfant nouveau-né ou un enfant prématuré est faite de préférence par voie intraveineuse.

- 5 Pour une administration parentérale, intranasale ou intraoculaire, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles.

- 10 Les formes pour l'administration parentérale sont obtenues de façon conventionnelle par mélange du PlGF avec des tampons, des agents stabilisants, des conservateurs, des agents solubilisant, des agents isotoniques et des agents de mise en suspension. Conformément aux techniques connues, ces mélanges sont ensuite stérilisés puis conditionnés sous la forme d'injections intraveineuses.

- 15 A titre de tampon, l'homme du métier pourra utiliser des tampons à base de sels de phosphate organique. Des exemples d'agents de mise en suspension englobent le méthylcellulose, l'hydroxyéthylcellulose, l'hydroxypropylcellulose, l'acacia et la carboxyméthylcellulose sodique. En outre, des stabilisants utiles selon l'invention sont le sulfite de sodium et le métrasulfite de sodium, tandis que l'on peut citer le p-hydroxybenzoate de sodium, l'acide sorbique, le crésol et le chlorocrésol en tant que
20 conservateurs.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention peuvent être formulées de manière à être administrées au patient par une unique voie ou par des voies différentes.

La posologie dépend naturellement de la forme sous laquelle le PlGF sera administré, du mode d'administration, de l'indication thérapeutique, de l'âge du patient et de son état.

- 25 La dose à administrer est préférablement de 0,001 à 250 mg/kg de PlGF par jour, de préférence de 0,01 à 100 mg/kg de PlGF par jour, de manière plus préférée de 0,1 à 50 mg/kg de PlGF par jour et de manière encore plus préférée de 1 à 25 mg/kg de PlGF par jour.

La dose unitaire du PlGF comprend de préférence de 0,1 à 50 mg/kg de ce composé.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, la dose initialement administrée du PlGF pourra être ajustée si nécessaire au cours d'un traitement en fonction de la réponse à ce traitement du sujet traité. L'Homme du métier se basant sur ces connaissances générales et sur la présente description saura ajuster la dose de PlGF de manière à optimiser son effet thérapeutique.

Comme mentionné plus haut dans la description, le facteur de croissance placentaire (PlGF) peut être utilisé également sous la forme de principe actif dans une composition pharmaceutique.

- 10 Selon un second aspect, la présente invention concerne ainsi une composition pharmaceutique comprenant un facteur de croissance placentaire (PlGF) tel que défini ci-dessus et un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement des troubles neurologiques, notamment des troubles neurologiques causés par l'alcoolisation fœtale *in utero*.
- 15 La composition pharmaceutique selon la présente invention peut être utilisée dans la prévention et/ou le traitement de différents types de troubles neurologiques dus à l'exposition à l'alcool *in utero* d'un sujet comme décrit pour le PlGF ci-dessous. En particulier, ces TCAF sont des troubles neurodéveloppementaux dues à l'exposition à l'alcool *in utero*.
- 20 La composition de la présente invention peut être également utilisée pour améliorer la migration des neurones et/ou des cellules gliales leur du développement cérébral, particulièrement la migration vers le néocortex, d'un sujet souffrant d'une parmi les maladies sélectionnées dans le groupe comprenant la schizophrénie, la sclérose en plaque, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrom de Dravet (DS), la lissencéphalie classique,
- 25 de d'Ohtahara (OS) et le syndrom de Dravet (DS), la lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS), le syndrome de Miller-Dieker, l'autisme, les troubles causés par l'exposition à l'alcool *in utero* (TCAF).

On entend par « véhicule pharmaceutiquement acceptable » au sens de la présente invention, toute matière qui est appropriée à une utilisation dans un produit

pharmaceutique. À titre d'exemple de véhicule pharmaceutiquement acceptable, on peut citer le lactose, l'amidon éventuellement modifié, la cellulose, l'hydroxypropylméthyl cellulose, le mannitol, le sorbitol, le xylitol, le dextrose, le sulfate de calcium, le phosphate de calcium, le lactate de calcium, les dextrans, l'inositol, le carbonate de calcium, la glycine, la bentonite et leurs mélanges.

La composition pharmaceutique selon l'invention peut se présenter sous différentes formes et être administrée de différentes manières comme indiquées plus haut en détails.

Selon un mode de réalisation, la composition pharmaceutique de la présente invention comprend un PlGF en tant que principe actif en une concentration comprise entre 0.001 mg/kg et 250 mg/kg en poids par rapport au poids total du sujet auquel la composition pharmaceutique sera administrée.

Préférentiellement, la concentration de PlGF est comprise entre 0,01 mg/kg et 100 mg/kg en poids par rapport au poids du sujet auquel la composition pharmaceutique sera administrée et encore plus particulièrement, entre 0,15 mg/kg et 50 mg/kg en poids par rapport au poids du sujet auquel la composition pharmaceutique sera administrée ou encore, entre 1 mg/kg et 25 mg/kg en poids par rapport au poids total du sujet auquel la composition sera administrée.

Les inventeurs ont démontré que l'augmentation de la quantité de PlGF est particulièrement efficace dans le rétablissement de la corticogénèse cérébrale permettant ainsi de corriger les atteintes neuronales induites par les facteurs endogènes et/ou exogènes mentionnés plus haut, comme par exemple l'exposition à l'alcool *in utero*, notamment les atteintes neuronales liées à un déficit cortical.

Selon un mode de réalisation de la présente invention, le PlGF ou la composition pharmaceutique le comprenant est donc utilisé pour le traitement et/ou la prévention des troubles neurologiques, notamment des troubles neurologiques liés à un déficit cortical, plus particulièrement des troubles neurologiques dus à l'exposition à l'alcool *in utero*.

En outre, les inventeurs ont également démontré que l'augmentation de la quantité de PlGF permet d'atténuer ou de faire disparaître les symptômes par lesquels se manifestent les troubles neurologiques, en particulier les troubles neurodéveloppementaux. Dans un

mode préféré de réalisation, ces troubles sont liés à un déficit cortical ; dans un mode plus préféré de réalisation, ces troubles sont dus à l'exposition à l'alcool *in utero*.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne ainsi un PlGF ou une composition pharmaceutique le comprenant pour son utilisation dans la prévention et/ou
5 le traitement des troubles neurologiques, en particulier des troubles neurodéveloppementaux. Dans un mode préféré de réalisation, ces troubles sont liés à un déficit cortical ; dans un mode plus préféré de réalisation, ces troubles sont dus à l'exposition à l'alcool *in utero* d'un sujet.

Un quatrième aspect de l'invention a pour objet une méthode de traitement de troubles
10 neurologiques, de préférence des troubles neurodéveloppementaux. Dans un mode préféré de réalisation, ces troubles sont liés à un déficit cortical ; dans un mode plus préféré de réalisation, ces troubles sont dus à l'alcoolisation fœtale chez un sujet. Ladite méthode comprend une étape d'administration ou surexpression de PlGF ou l'administration d'une composition pharmaceutique le comprenant à un sujet présentant
15 de tels troubles.

Cette méthode de traitement peut comprendre au préalable une étape de diagnostic de troubles neurologiques, particulièrement des troubles neurodéveloppementaux. Dans un mode préféré de réalisation, ces troubles sont liés à un déficit cortical ; dans un mode plus préféré de réalisation, ces troubles sont dus à l'exposition à l'alcool *in utero* du sujet.

20 Selon un cinquième aspect la présente invention concerne le facteur de croissance placentaire (PlGF), une composition pharmaceutique ou un produit le comprenant selon l'invention pour l'utilisation dans le traitement d'un trouble neurologique, ladite utilisation comprenant une étape préalable à l'identification du sujet, ladite identification comprenant les étapes suivantes:

- 25
- a) mesure de la quantité de PlGF dans un échantillon biologique dudit sujet, de préférence provenant du placenta ou du sang du cordon ombilical ;
 - b) comparaison de la quantité de PlGF de l'étape a) avec une référence qui est une mesure de la quantité de PlGF dans un individu sain, et

- c) détermination d'un trouble neurologique ou du risque de développer un trouble neurologique chez ledit sujet.

On entend par « échantillon biologique » selon l'invention tout échantillon qui peut être prélevé à partir d'un sujet. Alternativement, l'échantillon biologique est un échantillon
5 provenant du placenta, notamment du cordon ombilical. En effet, le PlGF est exprimé par des cellules du placenta tout au long de la grossesse. Cela permet de doser le PlGF sans attenter à l'intégrité du sujet, en particulier quand celui-ci est un embryon ou un fœtus. De façon générale, l'échantillon biologique doit permettre la détermination du taux d'expression de PlGF. L'échantillon à tester peut être utilisé comme obtenu directement
10 à partir de la source biologique ou à la suite d'un prétraitement pour modifier le caractère de l'échantillon. Par exemple, un tel prétraitement peut inclure la préparation de plasma à partir de sang, la dilution de fluides visqueux et ainsi de suite. Des procédés de prétraitement peuvent aussi impliquer la filtration, la précipitation, la dilution, la distillation, le mélange, la concentration, l'inactivation de composants perturbateurs,
15 l'addition des réactifs, une lyse, etc. En outre, il peut être bénéfique de modifier un échantillon d'essai solide pour former un milieu liquide ou pour libérer l'analyte.

La protéine PlGF est une protéine sécrétée (DeFalco, Exp Mol Med. 44(1): 1-9, 2012). Les échantillons biologiques préférés pour la détermination du taux d'expression de ladite protéine comprennent en particulier les échantillons de sang, de plasma, ou de lymphe.
20 De préférence, l'échantillon biologique est un échantillon de sang. De façon encore plus préférée, l'échantillon biologique est un échantillon de sang du placenta ou de sang de cordon. Celui-ci est en effet habituellement recueilli lors de l'accouchement. Le sang des vaisseaux placentaires peut alors être obtenu pour mesurer le taux de PlGF.

Selon un mode de réalisation de la présente méthode, lorsque la quantité de PlGF mesurée
25 à l'étape a) est inférieure à la référence le sujet est déterminé comme souffrant de ou ayant un risque de développer un trouble neurologique et en particulier un trouble neurodéveloppemental. Dans un mode préféré de réalisation, ces troubles sont liés à un déficit cortical ; dans un mode plus préféré de réalisation, ces troubles sont dus à l'exposition à l'alcool *in utero*.

Selon la présente invention, la quantité de PlGF est mesurée lorsqu'un sujet présente au moins un symptôme pouvant être lié à un trouble neurologique et en particulier un trouble neurodéveloppemental. La quantité de PlGF sera également mesurée lorsqu'un sujet ne présente pas un ou plusieurs troubles particuliers liés à un facteur de risque (facteurs
5 endogènes, tels qu'une mutation génétique, une altération de réseau vasculaire cérébral etc., ou facteurs exogènes tels que l'exposition à des composés toxiques et en particulier, l'exposition *in utero* à l'alcool) mais pour qui l'exposition à un tel facteur de risque pendant cette période a été avérée ou supposée.

Dans un mode particulier de réalisation, la quantité de PlGF est mesurée lorsqu'un sujet
10 présente au moins un symptôme d'au moins un trouble pouvant être lié à l'exposition à l'alcool intra-utérine. La quantité de PlGF sera également mesurée lorsqu'un sujet ne présente pas un ou plusieurs symptômes de troubles particuliers liés à l'exposition d'alcool intra-utérine mais pour qui l'exposition à l'alcool pendant cette période a été avérée ou supposée. Ainsi, la mesure de la quantité de PlGF comme décrit ci-dessus permettra de
15 confirmer ou d'infirmer un trouble neurologique ou le risque d'en développer un avant la prise en charge thérapeutique.

Selon un mode de réalisation, la quantité de PlGF est déterminée en mesurant la quantité de transcrits codant le PlGF ou la quantité du polypeptide.

Le taux d'expression génique ou protéique peut être mesuré par de nombreuses méthodes
20 qui sont à la disposition de l'homme du métier. Il peut y avoir plusieurs étapes intermédiaires entre le prélèvement de l'échantillon biologique et la mesure de l'expression de PlGF, lesdites étapes correspondant à l'extraction à partir dudit échantillon d'un échantillon d'ARNm (ou de l'ADNc correspondant) ou d'un échantillon de protéine. Celui-ci peut ensuite être directement utilisé pour mesurer l'expression de PlGF.
25 La préparation ou l'extraction d'ARNm (ainsi que la rétrotranscription de celui-ci en ADNc) ou de protéines à partir d'un échantillon cellulaire ne sont que des procédures de routine bien connues de l'homme du métier.

Une fois qu'un échantillon d'ARNm (ou d'ADNc correspondant) ou de protéine est obtenu, l'expression de PlGF, au niveau soit des ARNm (c'est-à-dire dans l'ensemble des ARNm ou
30 des ADNc présents dans l'échantillon), soit des protéines (c'est-à-dire dans l'ensemble des

protéines présentes dans l'échantillon), peut être mesurée. La méthode utilisée pour ce faire dépend alors du type de transformation (ARNm, ADNc ou protéine) et du type d'échantillon disponible.

Quand l'expression de PlGF est mesurée au niveau de l'ARNm (ou d'ADNc correspondant),
5 n'importe quelle technologie habituellement utilisée par l'homme du métier peut être mise en œuvre. Ces technologies d'analyse du niveau d'expression des gènes, comme par exemple l'analyse du transcriptome, incluent des méthodes bien connues telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction, si on part d'ADN), la RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, si on part d'ARN) ou la RT-PCR quantitative ou encore les puces d'acides nucléiques (dont
10 les puces à ADN et les puces à oligonucléotides) pour un plus haut débit.

Par « puces d'acides nucléiques », on entend ici plusieurs sondes d'acides nucléiques différentes qui sont attachées à un substrat, lequel peut être une micropuce, une lame de verre, ou une bille de la taille d'une microsphère. La micropuce peut être constituée de polymères, de plastiques, de résines, de polysaccharides, de silice ou d'un matériau à
15 base de silice, de carbone, de métaux, de verre inorganique, ou de nitrocellulose.

Les sondes peuvent être des acides nucléiques tels que les ADNc (« puce à ADNc »), les ARNm (« puce à ARNm ») ou des oligonucléotides (« puce à oligonucléotides »), lesdits oligonucléotides pouvant typiquement avoir une longueur comprise entre environ 25 et 60 nucléotides.

20 Pour déterminer le profil d'expression d'un gène particulier, un acide nucléique correspondant à tout ou partie dudit gène est marqué, puis mis en contact avec la puce dans des conditions d'hybridation, conduisant à la formation de complexes entre ledit acide nucléique cible marqué et les sondes attachées à la surface de la puce qui sont complémentaires de cet acide nucléique. La présence de complexes hybridés marqués est
25 ensuite détectée.

Ces technologies permettent de suivre le niveau d'expression d'un gène en particulier ou de plusieurs gènes voire même de tous les gènes du génome (full genome ou full transcriptome) dans un échantillon biologique (cellules, tissus ...). Ces technologies sont utilisées en routine par l'homme du métier et il n'est donc pas besoin de les détailler ici.

Alternativement, il est possible d'utiliser toute technologie actuelle ou future permettant de déterminer l'expression des gènes sur la base de la quantité d'ARNm dans l'échantillon. Par exemple, l'homme du métier peut mesurer l'expression d'un gène par hybridation avec une sonde d'acide nucléique marquée, comme par exemple par Northern blot (pour l'ARNm) ou par Southern blot (pour l'ADNc), mais aussi par des techniques telles que la méthode d'analyse sérielle de l'expression des gènes (SAGE) et ses dérivés, tels que LongSAGE, SuperSAGE, DeepSAGE, etc. Il est aussi possible d'utiliser des puces à tissu (aussi connues en tant que TMAs : « tissue microarrays »). Les tests habituellement employés avec les puces à tissu comprennent l'immunohistochimie et l'hybridation fluorescente in situ. Pour l'analyse au niveau de l'ARNm, les puces à tissu peuvent être couplées avec l'hybridation fluorescente in situ. Enfin, il est possible d'utiliser le séquençage massif en parallèle pour déterminer la quantité d'ARNm dans l'échantillon (RNA-Seq ou « Whole Transcriptome Shotgun Sequencing »). À cet effet, plusieurs méthodes de séquençage massif en parallèle sont disponibles. De telles méthodes sont décrites dans, par exemple, US 4,882,127, U.S. 4,849,077; U.S. 7,556,922; U.S. 6,723,513; WO 03/066896; WO 2007/111924; US 2008/0020392; WO 2006/084132; US 2009/0186349; US 2009/0181860; US 2009/0181385; US 2006/0275782; EP-B1-1141399; Shendure & Ji, *Nat Biotechnol.*, **26**(10): 1135-45, 2008; Pihlak *et al.*, *Nat Biotechnol.*, **26**(6) : 676- 684, 2008 ; Fuller *et al.*, *Nature Biotechnol.*, **27**(11): 1013-1023, 2009; Mardis, *Genome Med.*, **1**(4): 40, 2009; Metzker, *Nature Rev. Genet.*, **11**(1): 31-46, 2010.

De préférence, l'expression du PLGF est mesurée au niveau protéique par une méthode sélectionnée parmi l'immunohistologie, l'immunoprécipitation, le western blot, le dot blot, l'ELISA ou l'ELISPOT, les puces à protéines, les puces à anticorps, ou les puces à tissu couplées à l'immunohistochimie, les techniques de FRET ou de BRET, les méthodes de microscopie ou d'histochimie, dont notamment les méthodes de microscopie confocale et de microscopie électronique, les méthodes basées sur l'utilisation d'une ou plusieurs longueurs d'onde d'excitation et d'une méthode optique adaptée, comme une méthode électrochimique (les techniques voltamétrie et d'ampérométrie), le microscope à force atomique, et les méthodes de radiofréquence, comme la spectroscopie résonance multipolaire, confocale et non-confocale, détection de fluorescence, luminescence, chemiluminescence, absorbance, réflectance, transmittance, and biréfringence ou index de réfraction (par exemple, par résonance des plasmons de surface, par ellipsométrie, par

méthode de miroir résonnant, etc.), cytométrie de flux, imagerie par résonance radioisotopique ou magnétique, analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE); par spectrophotométrie HPLC-Mass, par chromatographie liquide/spectrophotométrie de masse/spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

- 5 Plus préférentiellement, la quantité de PlGF est déterminée par une méthode choisie parmi l'immunoprécipitation, l'immunohistologie, le western blot, le dot blot, l'ELISA ou l'ELISPOT, les puces à protéines, les puces à anticorps, ou les puces à tissu couplées à l'immunohistochimie. Des anticorps dirigés contre PlGF sont disponibles commercialement (voir par exemple, R&D Systems, Santa Cruz, Abcam, etc.) et peuvent être utilisés dans
10 les méthodes de l'invention. Encore plus préférentiellement, l'expression du PlGF est mesurée par Western Blot ou par ELISA.

En outre, la quantité de PlGF est normalisée par rapport à un marqueur témoin qui peut être un gène choisi parmi B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 et HMBS, ou un polypeptide choisi parmi le produit
15 desdits gènes.

Le taux de PlGF ainsi mesuré est comparé par la suite à un taux d'expression de PlGF de référence afin de déterminer s'il s'agit d'un sujet atteint d'un trouble neurologique dû à l'exposition à l'alcool *in utero*.

Par « un taux d'expression de PlGF de référence », on entend au sens de la présente
20 demande tout taux d'expression dudit facteur utilisé à titre de référence. Par exemple, un taux d'expression de référence peut être obtenu en mesurant le taux d'expression de PlGF dans un échantillon biologique, par exemple un placenta ou le sang ombilical, d'un sujet sain, c'est-à-dire un sujet qui n'a pas été exposé à l'alcool *in utero*.

L'invention sera décrite plus précisément au moyen des exemples ci-dessous. Lesdits
25 exemples sont fournis ici à titre d'illustration et ne sont pas, sauf indication contraire, destinés à être limitatifs.

LÉGENDES DES FIGURES

Figure 1. Effets de la surexpression placentaire de PlGF in utero sur le positionnement des oligodendrocytes et des interneurons GABA dans le cerveau fœtal lors de l'exposition intra-utérine à l'alcool. **A :** Une approche d'activation PGF/CRISPR/dCas9 couplée à une électroporation du placenta in utero a été réalisée à 13 jours de gestation (GD13) et la surexpression de PlGF a été contrôlée à GD20. Dans le groupe « Alcool », l'exposition *in utero* à l'alcool a lieu entre GD15 et GD20. **B,C :** Visualisation du positionnement et de la densité des précurseurs des oligodendrocytes et des interneurons GABA à l'aide des marqueurs respectifs Olig2 et Lhx6. Les immunohistochimies ont été effectuées chez le fœtus E20 issues de souris gravides exposées à du NaCl (« Control ») ou de l'alcool (« Alcohol »). Il est à noter chez les sujets « CRISPR-Pgf-Act - » du groupe « Alcohol », le fort rétrécissement de la couche d'oligodendrocytes (B) et d'interneurons GABA (C) en migration après une exposition à l'alcool. **D :** Quantification de l'aire associée à l'immunomarquage Olig2 après traitement d'image par segmentation. Barre d'échelle : 400 µm.

Figure 2. Effets d'un traitement *in vitro* aigu de tranches organotypiques de cortex de souris âgées de 2 jours sur l'activité endothéliale de la MMP9. **A :** zymographie sur gel montrant que le glutamate accroît l'activité MMP9 alors que l'éthanol la diminue. **B,C :** zymographie *in situ* démontrant que l'activité MMP9 est endothéliale et localisée au niveau de la route de migration piale des interneurons GABA. **D :** Quantification des effets du glutamate et de l'alcool sur la cinétique de dégradation du substrat DQ-gélatin-FITC au niveau de la route de migration piale.

Figure 3. Effets d'un traitement *in vitro* aigu de tranches organotypiques de cortex de souris âgées de 2 jours sur l'activité MMP9 chez la souris invalidée pour le tPA. **A :** Rappel de l'interaction fonctionnelle entre le tPA et la MMP9. **B :** Démonstration de l'absence d'effet du glutamate sur l'activation de la MMP9 chez la souris tPA^{-/-}. **C-E :** zymographie *in situ* démontrant que l'activité tPA-like est endothéliale et localisée au niveau de la route de migration piale des interneurons GABA. **F :** Quantification des effets du glutamate et de l'alcool sur la cinétique de dégradation du substrat DQ-casein-FITC (substrat tPA-like) au niveau de la route de migration piale. **G :** Quantification des effets

du glutamate et de l'alcool sur la cinétique de dégradation du substrat DQ-gélatin-FITC (MMP-like) au niveau de la route de migration piale chez la souris tPA.

Figure 4. Démonstration d'un effet direct du glutamate et de l'alcool sur l'activité des cellules endothéliales corticales de nouveau-né. A,B : Visualisation par immunohistochimie de la sous-unité indispensable GluN1 du récepteur NMDA sur des microvaisseaux corticaux et des cellules endothéliales à P2. C,D : Effet du glutamate sur l'activité calcique (D) des cellules endothéliales préalablement chargées par la sonde calcique FURA2 (C). E : Effet de l'alcool sur l'activité calcique stimulée par le glutamate sur les cellules endothéliales.

Figure 5. Effet d'une alcoolisation chronique *in utero* sur l'activité endothéliale et l'expression des sous-unités du récepteur NMDA. A,B : Contrairement aux effets aigus caractérisés *in vitro*, une exposition chronique *in utero* à l'alcool de E15 à E20, exacerbe les effets du glutamate sur la mobilisation calcique. C-E : L'exposition chronique *in utero* va notamment induire une augmentation de l'expression de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA. F,G : L'exposition chronique *in utero* va également exacerber l'activité MMP9-like au niveau de la route de migration piale.

Figure 6 Effet d'une alcoolisation chronique *in utero* sur le positionnement des interneurons GABA au niveau des couches corticales superficielles. A-C : L'alcoolisation *in utero* induit une augmentation de la densité des interneurons Gad67GFP dans les couches superficielles. D-F : Effet de l'alcoolisation *in utero* sur l'expression de la GFP et de marqueurs d'interneurones GABA. G,H : Effet de l'alcoolisation *in utero* sur l'expression la densité des épines dendritiques des interneurons Gad67GFP.

Figure 7. Effet du traitement par l'éthanol aigu sur l'activation de la caspase-3 dans les éminences ganglionnaires des coupes cultivées E15. A-C: Immunohistochimie montrant l'immunomarquage de la caspase-3 basale clivée observée dans des coupes de cerveau E15 dans des conditions témoins après 3 heures de culture dans un milieu aCSF (*artificial cerebrospinal fluid* ;A). Le carré en pointillés indique la région de l'éminence ganglionnaire visualisée à un grossissement plus élevé (B,C). L'immunoréactivité étant cytoplasmique (flèches) ou associée à des cellules fragmentées (tête de flèche). D: Quantification au cours du temps par Western blot du clivage de la caspase-3 dans des

éminences ganglionnaires microdisséquées cultivées dans de l'aCSF en l'absence ou en présence d'éthanol (50 mM). De la kétamine (100 μ M) a été utilisée comme témoin positif.

5 **E:** Quantification en fonction du temps de l'activité de type caspase-3 dans des éminences ganglionnaires microdisséquées exposées à un CSF en l'absence ou en présence d'éthanol (50 mM). De la kétamine (100 μ M) a été utilisée comme témoin positif. Pour chaque expérience (Western blot et activité caspase), la contre-hémi-tranche a été utilisée comme témoin de l'hémi-tranche traitée. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs hémi-tranche témoin en utilisant un test t apparié.

EXEMPLES

10 **Matériels et méthodes**

Animaux

Les souris NMRI (Naval Medical Research Institute), de type sauvage et transgénique ont été achetées auprès de Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Des souris transgéniques FVB-Tg (GadGFP) 45704Swn (# 003718) ont été obtenues auprès du Jackson Laboratory
 15 (Bar Harbor, ME). Dans ces souris transgéniques, les interneurons GABAergiques issus des éminences ganglionnaires (GE) expriment une protéine fluorescente verte sous le contrôle du promoteur du gène Gad1 de la souris. Des souris knockout tPA (tPA - / -) en C57Bl6 / 129 (tPA - / - en rapport 87,5 / 12,5%) ont été développées et fournies par le Centre de Biologie Moléculaire et Vasculaire, Université de Louvain, Belgique (Carmeliet et al.,
 20 1993). Les animaux ont été maintenus dans une pièce à température contrôlée ($21 \pm 1^\circ$ C) avec un cycle lumière / obscurité de 12h / 12h (lumières allumées de 7h à 19h) et accès libre aux aliments et à l'eau du robinet. Le soin et la manipulation des animaux sont conformes aux recommandations des directives françaises et européennes pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (Directive du Conseil 86/609 / CEE, numéro de
 25 licence 21CAE035) et sous la surveillance des enquêteurs autorisés (BJG, autorisation n° 7687 du ministère de l'Agriculture et de la Pêche).

Produits chimiques

Les produits chimiques utilisés dans les présents exemples sont : le glutamate, le bleu de Coomassie, l'isolectine-B4-TRITC / FITC, le tampon phosphate salin (PBS), la sérumalbumine bovine (BSA), le Triton X-100 et l'anticorps primaire β -actine qui
5 proviennent de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) ; le gel Tris-glycine SDS-PAGE (contenant 0,1% de gélatine comme substrat de gélatinases), le tampon de renaturation, le tampon de développement, la DQ-gélatine-FITC, la DQ-caséine-FITC qui proviennent d'Invitrogen (Cergy Pontoise, France) ; le paraformaldéhyde (PFA), obtenu
auprès de Labonord (Templemars, France), l'anticorps primaire GFP provient d'Abcam
10 (Cambridge, Royaume-Uni), l'anticorps primaire de la somatostatine provenait de Santa Cruz Biotechnology (CA, USA), l'anticorps primaire caspase-3 clivé provenait de Cell Signaling (Massachusetts, USA), les anticorps secondaires Alexa Fluor® 488 âne anti-lapin IgG (A-21206) utilisé pour immunohistochimie provenaient d'Invitrogen, le kit de caspase homogène 3/7 Apo-ONE provient de Promega (Fitchburg, WI, USA).

Exposition in utero-éthanol

De l'éthanol absolu (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) a été dilué dans du chlorure de sodium à 0,09% (NaCl). Les souris gravides ont reçu une injection sous-cutanée unique (s.c.) par jour de 3 g / kg d'éthanol ou de NaCl à 0,09% entre le jour de gestation
15 (GD15) et le GD20 à 11 heures. La dose administrée d'éthanol était basée sur une étude antérieure (Jégou et al., 2012, *Ann. Neurol.* 72, 952-960) et a abouti à un taux
20 d'alcoolémie (BAL) de 1,5 g / L 30 min après l'injection. Cette valeur de BAL représentative de l'ivresse chez l'homme était inférieure à 0,5 g / L après 3 heures. Les traitements ont été réalisés chez des souris de type sauvage et Gad67GFP.

Préparation et traitement de coupes cérébrales cultivées à partir d'embryons de souris et de souris nouveau-nés

Des coupes de cerveau ont été obtenues à partir de souris embryonnaires de jour E15 ou de souris postnatales 2 (P2). Des études antérieures démontrent qu'à ce stade, de nombreux interneurons immatures GABAergiques migrant toujours le long de la voie migratoire (Inada et al., 2011, *PloS One* 6, e27048). Les souris ont été sacrifiées par

décapitation et les cerveaux rapidement disséqués pour isoler les hémisphères. Le néocortex a été immédiatement placé dans le liquide céphalorachidien artificiel (aCSF) glacé (en mM): NaCl, 125; KCL, 3; CaCl₂, 2; NaH₂PO₄, 1,2; NaHCO₃, 26; D-glucose, 10; pH 7,4. Des coupes transversales (250 µm) ont été coupées à 4 ° C en utilisant un vibreur VT1000S Leica (Rueil-Malmaison, France), puis transférées dans des plaques Costar 24 puits (Cambridge, MA) récupération de 30 min. 37 ° C dans un incubateur humidifié sous atmosphère contrôlée de 5% de CO₂ / 95% d'air. Ensuite, les coupes ont été lavées avec l'aCSF frais et traités 3h à 37 ° C avec du glutamate (100 µM) et de l'éthanol (50 mM) seul ou en combinaison.

10 *Mesure de l'activité caspase-3*

Pour mesurer l'activité caspase-3, des coupes cérébrales E15 de souris NMRI ont été microdisséquées, homogénéisées dans 500 µL de tampon de lyse hypotonique et 20 µg de protéines incubées à 30°C avec 100 µL de tampon caspase-3, 1 µL du substrat de la caspase-3 Z-DEVD-R110 fourni avec le kit homogène caséase-3/7 Apo-ONE (Promega). Pour chaque condition, le côté contralatéral de la tranche a été utilisé comme témoin. L'intensité de fluorescence a été quantifiée toutes les 5 minutes pendant 2 heures à une excitation sur des longueurs d'onde d'émission de 485 et 520 nm, respectivement, en utilisant un lecteur de plaque de caméléon (Mustionkatu, Turku, Finlande).

Immunohistochimie

Des tranches de cerveau préalablement fixées avec 4% de PFA dans du PBS ont été incubées pendant une nuit à 4 ° C avec divers anticorps primaires dilués dans du tampon d'incubation (PBS contenant 1% de BSA et 3% de Triton X-100). Ensuite, les tranches ont été rincées deux fois avec du PBS pendant 20 minutes et incubées avec le même tampon d'incubation contenant l'anticorps secondaire adéquat. Les noyaux cellulaires ont été visualisés en incubant des coupes pendant 5 min avec 1 µg / ml de Hoechst 33258 dans du PBS. Des signaux fluorescents ont été observés avec un microscope Leica DMI 6000B. Le contrôle de la liaison non spécifique de l'anticorps secondaire a été effectué en omettant les anticorps primaires.

SDS-PAGE zymographie de la gélatine

Les zymogrammes de la gélatine ont révélé des activités des métalloprotéases matricielles-2 et -9 (MMP-2 et -9) dans les cortex microdisséqués P2. Les tranches de cerveau cultivées ont été incubées pendant 3 h dans différents traitements. Des cortices microdisséquées à partir de coupes ont été lavées dans de l'aCSF frais et homogénéisées dans 50 µL de tampon de lyse (Hepes 50 µM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, glycérophosphate 10 mM, fluorure de sodium 100 mM, Triton X100 1%). Après centrifugation des homogénats (20 000 g x 15 min), les surnageants ont été recueillis et les concentrations en protéines ont été déterminées par le test de Bradford. Les protéines ont été chargées (30 µg / puits) et séparées par électrophorèse. Ensuite, les gels ont été incubés dans un tampon de renaturation pendant 30 min à la température ambiante, et dans le tampon de développement pendant 30 autres minutes à température ambiante. Après transfert dans du tampon de développement frais, les gels ont été incubés pendant 5 jours à 37°C, colorés dans du bleu de Coomassie à 0,5% pendant 1 heure et rincés pendant 1 heure dans de l'eau distillée. Des bandes claires sur fond bleu indiquent la digestion de la gélatine dans le gel par les gélatinases. Les images numériques des gels ont été acquises et les bandes de digestion ont été quantifiées en utilisant le logiciel Explora Nova Mercator (La Rochelle, France). Des expériences ont été réalisées dans des coupes cultivées de souris de type sauvage et de tPA - / - pour des traitements aigus et à partir d'un modèle chronique d'exposition à l'alcool *in vivo*.

Zymographie de la caséine in situ

La zymographie de la caséine *in situ* a été réalisée sur des coupes de cerveau de 250 µm préalablement colorées par l'isolectine-B4-TRITC afin de localiser le réseau vasculaire de la voie de migration piale. Après 2 lavages pendant 10 min avec un CSF, les tranches ont été incubées pendant 3 h avec DQ-caséine-FITC (1/125), en présence de glutamate (100 µM) et d'alcool (50 mM) seul ou en association. La quantification de la fluorescence FITC, indicative d'une digestion cellulaire spécifique du substrat a été réalisée par vidéo-microscopie en utilisant un système vidéo-microscope fluorescent DMI 6000B Leica (Reuil-Malmaison, France) comme décrit pour la zymographie *in situ* de la gélatinase. Des expériences ont été réalisées dans des coupes de culture de souris de type sauvage pour

des traitements aigus (exposition à une quantité d'alcool importante de manière non chronique) et à partir d'un modèle chronique d'exposition à l'alcool *in vivo*.

Cultures de cellules endothéliales corticales P2

Des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau primaire de souris C57BL 6 isolées à partir de tissu cérébral de souris P2 ont été achetées chez Cell Biologics (Chicago, IL, USA). Les cellules ont été cultivées à 37°C, dans un environnement humidifié, en présence de 5% de CO₂. Elles ont été supplémentées tous les 2 jours avec un milieu de culture complet de cellules endothéliales de souris, sur des boîtes de 60 mm de diamètre ou des plaques de 12 puits. Deux jours après la confluence, les cellules ont été incubées pendant 24 h avec un milieu sans sérum. Les cellules ont ensuite été traitées avec de l'éthanol 50 mM ou un CSF pendant 30 min avant le test de calcimétrie.

Mesure des taux de calcium intracellulaire

Des cultures de cellules endothéliales ou des tranches de cerveau organotypiques obtenues à partir de souris P2 ont été incubées pendant 15 min dans un CSF contenant 10 µM de fura-2 AM et 0,03% de F-127 pluronique. Les cultures ou coupes endothéliales ont ensuite été lavées deux fois pendant 5 minutes dans un CSF à 37°C et les coupes ont été transférées dans une boîte de 35 mm contenant 1 mL d'aCSF et immobilisées en utilisant une maille de nylon. La température de l'aCSF a été maintenue constante à 37°C et les cellules cultivées ou les tranches ont été rincées avec un CSF. Un volume de glutamate 400 µM seul ou en présence d'éthanol 100 mM a été perfusé dans un volume égal d'aCSF baignant la tranche pour atteindre une concentration finale de 200 µM et 50 µM, respectivement. Les signaux fluorescents associés à Fura-2 sans calcium et lié au calcium ont été mesurés en excitant alternativement les coupes à 340 et 380 nm en utilisant un microscope fluorescent Leica DM équipé d'une roue à obturateur rapide. La fluorescence émise a été recueillie à 510 nm et le rapport des deux signaux a été calculé en utilisant un logiciel métamorphique (Roper Scientific, Evry, France). Les données ont été exportées vers le logiciel de biostatistique Prism (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA), qui a été utilisé pour calculer l'intensité de fluorescence maximale et l'aire sous la courbe (AUC). Des expériences ont été réalisées dans des coupes de culture de souris de type sauvage

pour des traitements aigus (exposition à une quantité d'alcool importante de manière non chronique) et à partir d'un modèle chronique d'exposition à l'alcool *in vivo*.

Western blot

Des cortex micro-disséqués de souris Gad67-GFP ont été rapidement homogénéisés dans
5 du tampon de lyse glacé. Après centrifugation, les surnageants ont été recueillis et les
concentrations en protéines ont été déterminées par dosage de Bradford. Le culot a été
dénaturé à 100 ° C pendant 5 min dans 50 ul de Tris / HCl (pH 7,5) contenant 20% de
glycerol, 0,7 M de 2-mercaptoéthanol, 0,004% (poids / volume) de bleu de bromophénol
et 3% (poids / volume) le dodécylsulfate de sodium (SDS) est ensuite soumis à une
10 électrophorèse sur un gel SDS-polyacrylamide à 10%. Après séparation, les protéines ont
été transférées électriquement sur une membrane de polyvinylidifluorure (PerkinElmer
Life Sciences, Boston, MA). La membrane a été incubée avec une solution bloquante (1%
BSA dans une solution saline tamponnée au Tris contenant 0,05% de Tween 20) à
température ambiante pendant 1 h et incubée pendant la nuit avec des anticorps
15 primaires dirigés contre la somatostatine, GluN1, GluN2A, GluN2B, clivée-caspase3, GFP,
Dlx1 et l'actine (cf. tableau 1 ci-dessous). Après incubation avec les anticorps secondaires
correspondants couplés à la peroxydase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), les
protéines ont été visualisées en utilisant un système de détection d'immunoblotting par
chimiluminescence ECL Plus amélioré (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg,
20 Allemagne). L'intensité des bandes immunoréactives a été quantifiée à l'aide d'un système
d'analyse par blot (Laboratoires Bio-Rad, Marne la coquette, France) et la β -actine a été
utilisée comme témoin de chargement. Les marqueurs commerciaux (norme Seebblue
prestained, Invitrogen) ont été utilisés comme standards de poids moléculaire.

25

30

Anticorps	Référence commerciale	Espèces purifiées	Fournisseur	Dilution	Solution d'incubation
Caspase-3 clivée	IHC, WB: 9661L	lapin	Cell Signaling	IHC: 1/400 WB: 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X100 in PBS WB: Milk (5% TBST)
Dlx1	WB: ab111202	Lapin	Abcam	1/1000	Lait (5% TBST)
GFP	WB: Ab6673	Chèvre	Abcam	1/1000	Lait (5% TBST)
GluN1	IHC, WB: sc1467	Chèvre	Santa Cruz	IHC: 1/400 WB: 1/1000	IHC: 1% BSA, 3% Triton X100 in PBS WB: Milk (5% TBST)
GluN2A	WB: sc31540	Chèvre	Santa Cruz	WB: 1/1000	Lait (5% TBST)
GluN2B	WB: sc1468	Chèvre	Santa Cruz	WB: 1/1000	Lait (5% TBST)
Somatostatine	WB: SC13099	Lapin	Santa Cruz	1/1000	BSA (5% TBST)
Actine	WB: A5441	Souris	Sigma-Aldrich	1/5000	Lait (5% TBST)

Tableau 1 : Origine et caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour les études immunohistochimiques et le Western blot réalisés dans des tissus de souris.

Quantification des interneurones GFP-positifs chez les souris Gad67-GFP

- 5 Pour la mesure de la densité cellulaire positive GFP chez des souris Gad67-GFP P15, les images ont été acquises et enregistrées au format TIFF en utilisant un microscope Leica DMI 6000B. Les images ont ensuite été ouvertes dans le logiciel Mercator et les régions d'intérêt (ROI) ont été dessinées. Ensuite, une trame de comptage a été définie dans la ROI et un seuil a été établi afin de différencier les cellules positives FITC de l'arrière-plan. Par un processus de
- 10 segmentation, l'ordinateur a calculé le nombre et la zone cumulée d'objets dans la ROI, donnant le nombre de cellules et la densité cellulaire, respectivement.

Quantification de la morphologie du rachis et de la densité du rachis chez des souris transgéniques Gad67-GFP

Le réseau fin de dendrites secondaires et tertiaires a été acquis chez des souris Gad67-GFP en utilisant un système d'imagerie laser confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystems AG).

- 5 La série d'images Z-stack a ensuite été déconnectée à l'aide du logiciel AutoQuant X3 et chargée dans le logiciel d'imagerie IMARIS (Bitplane, Zurich, Suisse) pour la reconstruction 3D. La fonction *Traceur de filaments* a été utilisée pour attribuer et classer les épines, donnant la densité de la colonne vertébrale et les catégories de rachis (trapus, filopodes ou en forme de champignon). Pour une tranche donnée, 2 ROI ont été définies, 2 à 3 dendrites ont été
- 10 quantifiées par ROI et le nombre total de neurites quantifiés a été fixé à 20 par groupe.

Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel biostatistique Prism. Les tests utilisés pour chaque expérience, le nombre d'expériences indépendantes et les valeurs p ont été résumés dans le tableau 2 ci-dessous.

15 Tableau 2 : Analyse statistique

Expériences	Test	n Expériences indépendants	p valeur *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001
Zymographie de gel Effet de l'EtOH sur l'activité MMP9 induite par le glutamate (Figure 2A)	ANOVA unidirectionnelle Post-test de Tukey	n=8	ANOVA F 15.1 p<0.0001*** Post-test de Tukey Ctrl vs Glut p=0.0011** Glut vs Glut+EtOH p=0.0022##
Zymography In situ Effet de glutamate et de l'EtOH sur l'activité MMPs sur tranches P2 (Fig. 2D)	ANOVA bidirectionnelle Post-test Bonferroni	n=13 (Ctrl and Glut) n=4 (EtOH) n=5 (Glut + EtOH)	ANOVA Interaction F 0.5707 p=0.9792, ns Traitment F 22.26 p<0.0001**** Temps F 8.782 p<0.0001**** Post-test Bonferroni Pour t=180 min Glut vs Ctrl p<0.01**

			Glut + EtOH vs Glut p<0.01##
Zymography In situ Effet de glutamate et de l'EtOH sur l'activité MMPs sur tranches de type sauvage (Fig. 3B gauche))	t test non apparié	n= 3	Ctrl vs Glut, p = 0.0006***
Zymography In situ Effet de glutamate et de l'EtOH sur l'activité MMPs sur tranches des souris KO t-PA (Fig. 3B, droite)	t test non apparié	n= 3	Ctrl vs Glut, p = 0.5114, ns
Zymography In situ Effet de glutamate et de l'EtOH sur l'activité caséine sur tranches de type sauvage (Fig. 3F)	ANOVA bidirectionnelle Post-test Bonferroni	n=7 (Ctrl) n=8 (Glut n=5 (EtOH, EtOH + Glut)	ANOVA Interaction F 0.6615 p=0.9325, ns Traitement F 52.62 p<0.0001**** Temps F 8.300 p<0.0001**** Post-test Bonferroni Pour t=180 min Glut vs Glut + EtOH p<0.001###
Zymography in situ Effet de glutamate et de l'EtOH sur l'activité MMP des souris KO tPA (Fig. 3G)	ANOVA bidirectionnelle Post-test Bonferroni	n=5 (Ctrl, EtOH) n=6 (Glut, EtOH + Glut)	ANOVA Interaction F 0.1418 p=1.000, ns Traitement F 2.055 p=0.1069, ns Temps F 4.668 p<0.0001**** Post-test Bonferroni Différences non statistiques
Calcimétrie sur des cellules endothéliales (Fig.4E)	ANOVA unidirectionnelle Post-test de Tukey	n=3 valeur moyenne de 30 cellules (10 cellules par expérience de 3 expériences indépendantes)	ANOVA F 421 p<0.0001*** Post-test de Tukey Ctrl vs Glut p<0.0001**** Glut vs Glut+EtOH p<0.0001####
Calcimétrie sur des tranches P2 (Fig.5B)	Test Mann- Whitney	n=10 (Ctrl) n=7 (in utero EtOH)	Ctrl vs in utero EtOH p=0.0136**

Western blot GluN1 P2 (Fig. 5C)	t test non apparié	n=3 (11 échantillons de 3 progénitures différentes)	Ctrl vs EtOH p=0.0051 **
Western blot GluN2A P2 (Fig. 5D)	t test non apparié	n=3 (11 échantillons de 3 progénitures différentes)	Ctrl vs EtOH p=0.3553, ns
Western blot GluN2B P2 (Fig. 5E)	t test non apparié	n=3 (11 échantillons de 3 progénitures différentes)	Ctrl vs EtOH p=0.17, ns
Zymographie in situ Effet du glutamate sur l'activité MMP9 (Fig. 5F)	ANOVA bidirectionnelle Post-test de Tukey	n=14 (Ctrl) n=16 (Glut)	ANOVA Interaction F 5.085 p<0.0001*** Traitement F 136 p<0.0001*** Time F 59.65 p<0.0001*** Post-test Bonferroni De t=120 à t=180 min Ctrl vs Glut p<0.001***
Zymography In situ Effet d'un traitement in utero par 'EtOH sur l'activité MMPs (Fig. 5G)	ANOVA bidirectionnelle Post-test de Tukey	n=2	La valeur n convient d'être augmentée pour l'analyse statistique
Densité des cellules GFP positives dans les souris Gad67-GFP (Fig. 6C)	t test non apparié	n=8 (mâles) n=9 (femelles)	Ctrl mâles vs EtOH mâles p=0.0499* Ctrl femelles vs EtOH femelles p=0.0947, ns Ctrl vs EtOH p=0.0139*
GFP Western blot dans des souris Gad67-GFP (Fig. 6D)	t test non apparié	n=9 (mâles) n=9 (femelles)	Ctrl mâles vs EtOH mâles p=0.0244* Ctrl femelles vs EtOH femelles p=0.0535, ns Ctrl vs EtOH p=0.0025**
Dlx1 Western blot dans des souris Gad67- GFP (Fig. 6E)	t test non apparié	n=6 (mâles) n=7 (femelles)	Ctrl mâles vs EtOH mâles p=0.0278* Ctrl femelles vs EtOH femelles p=0.3658, ns Ctrl vs EtOH p=0.0403*

Somatostatine Western blot dans des souris Gad67-GFP (Fig. 6F)	t test non apparié	n=15 (mâles) n=15(femelles)	Ctrl mâles vs EtOH mâles p=0.5977, ns Ctrl femelles vs EtOH femelles p=0.3912, ns Ctrl vs EtOH p=0.2361, ns
Densité des tours dans des souris Gad67GFP (Fig. 6H)	t test non apparié	n =20 fibres analysées de 3 animaux	Ctrl vs EtOH p=0.0013**
Caspase-3 clivée Western blot (Fig. 7D)	t test apparié - Test de Wilcoxon	n=5 (3h and 6h) n=2 (24h Eth) n=4 (24h Ket)	Ctrl vs EtOH 3 heures p>0.9999, ns Ctrl vs EtOH 6 heures p=0.5381, ns Ctrl vs Ket 24 heures p=0.0007***
Activité de la caspase-3 (Fig 7E)	t test apparié - Test de Wilcoxon	n=4 (0h) n=15 (3h and 6h Eth) n=12 (24h Eth) n=10 (24h ket)	Ctrl vs EtOH 0 heures p=0.8750, ns Ctrl vs EtOH 3 heures p=0.7197, ns Ctrl vs EtOH 6 heures p=0.1205, ns Ctrl vs EtOH 24 heures p=0.3804, ns Ctrl vs Ket 24 heures p=0.0378*

Résultats

Effets de la surexpression placentaire de PlGF in utero sur le positionnement des oligodendrocytes et des interneurons GABA lors de l'exposition intra-utérine à l'alcool

- 5 Les résultats montrés dans la Figure 1 indiquent que l'alcoolisation *in utero* altère fortement le positionnement des oligodendrocytes en migration (Olig2 ; Figure 1B) et des interneurons GABA en migration (Lhx6 ; Figure 1C). La surexpression du PlGF placentaire (CRISPR-PlGF-Act+) restaure un profil histologique comparable aux contrôles. D'un point de vue quantitatif, la surexpression de PlGF après l'électroporation *in utero* des plasmides
- 10 PGF/CRISPR-dCas9 (sujets « CRIPR-P/gf-Act + »), n'a pas d'effet sur la densité des cellules nerveuses dans les groupes « Contrôles ». En revanche, elle augmente l'épaisseur de la couche d'oligodendrocytes dans le groupe « Alcool » compensant ainsi les effets néfastes de l'alcool sur l'organisation nerveuse et permet de rétablir un phénotype proche de celui des contrôles. VL/LV : ventricule latéral. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les

interneurones GABA ce qui démontre la capacité de PlGF à améliorer la migration vasculo-dépendante de ces cellules nerveuses dans le néocortex.

L'alcool altère l'activité endothéliale de la MMP-9 dans la route de migration piale de coupes corticales cultivées des souriceaux nouveau-nés P2

5 Des expériences de zymographie en gel réalisées à P2 lorsque les interneurones GABA migrent le long de la voie migratoire piale (Anderson et al., 2001, Development. 128, 353-363. ; Xu et al., 2011, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 70, 841-858), ont révélé que le traitement des tranches corticales avec du glutamate (100 μ M) de l'activité MMP-9 ($p < 0,001$; Figure 2A) augmente l'activité MMP-9. La co-incubation des tranches avec de
10 l'alcool (50 mM) empêche significativement l'effet du glutamate sur l'activité MMP-9 ($p < 0,01$; Figure 2A). Les images par zymographies *in situ* réalisées dans des coupes corticales cultivées ont montré que la fluorescence (qui résulte du clivage de la DQ-gélatine-FITC, un substrat des MMPs) est principalement endothéliale et localisée au niveau des vaisseaux tangentiels de la voie migratoire piale (Figure 2B, C; flèches) et le long des microvaisseaux radiaux dans les couches superficielles corticales (Figure 2B,C; têtes de flèches). Comme
15 observé dans les expériences de gel SDS-page, l'incubation de tranches de culture avec du glutamate (100 μ M) a augmenté de manière significative l'activité MMP-endothélial associée (Figure 2D) et cet effet a été nettement bloqué par l'éthanol (50 mM, Figure 2D). Ces résultats montrent pour la première fois que l'alcool perturbe l'activité des cellules
20 endothéliales de la voie de migration piale.

L'alcool altère l'activité du tPA endothélial dans les coupes corticales cultivées chez des souriceaux nouveau-nés

Il a été démontré que l'activation de la MMP-9 endothéliale est régulée par la protéase endothéliale tPA (Jin et al., 2010, Neurobiol. Dis. 38, 376-385. ; Omouendze et al., 2013, PloS One 8, e71263, Figure 3A). Les inventeurs ont étudié l'effet de l'alcool sur l'activité
25 du tPA. Les images obtenues par zymographie sur gel de coupes corticales P2 ont montré que le glutamate (100 μ M) a augmenté l'activité de tPA (Figure 3B). Comme pour MMP-9, des expériences de zymographie *in situ* ont été menées dans des coupes corticales cultivées en utilisant le substrat tPA DQ-caséine-FITC afin de visualiser l'activité de type
30 tPA (Figure 3C-E). Le co-marquage des microvaisseaux corticaux avec l'isolectine-TRITC a

démontré que le signal fluorescent résultant de l'activité protéolytique était principalement endothélial et co-localisé avec les vaisseaux de la voie de migration piale (Figure 3C-E) et les microvaisseaux radiaux apicaux (Figure 3C-E; flèches). La cinétique de la protéolyse DQ-caséine-FITC dans les microvaisseaux a montré que l'alcool (50 mM) inhibait significativement l'activité de type tPA induite par le glutamate (Figure 3F). Dans des tranches de culture d'animaux inactivés par le tPA (tPA -/-), le glutamate (100 μ M) et l'alcool (50 mM) n'ont pas réussi à réguler l'activité MMP-9 endothéliale démontrant ainsi une activation de MMP9 dépendante du Tpa (Figure 3G).

Le glutamate et l'alcool régulent directement l'activité des cellules endothéliales néonatales

Alors que les tranches cultivées présentent l'avantage d'interactions cellule-cellule semi-conservées, ce modèle ne permet pas de discriminer les effets directs ou indirects. Parce qu'il a été montré récemment que les cellules endothéliales néonatales expriment des récepteurs fonctionnels NMDA (Legros et al., 2009), les inventeurs ont recherché, par calcimétrie, un effet direct de l'alcool sur des cellules endothéliales cultivées à partir de microvaisseaux corticaux P2 (Figure 4). Les expériences d'immunohistochimie ont confirmé l'expression de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA à la fois sur des microvaisseaux isolés et sur des cellules endothéliales néonatales en culture (Figure 4A,B). Quatre jours après l'ensemencement, les cellules endothéliales étaient confluentes et des expériences de calcimétrie ont été menées après chargement des cellules avec la sonde ratiométrique FURA2 (Figure 4C). La perfusion de cellules cultivées avec du glutamate (200 μ M) induit une augmentation des taux de calcium intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$; Figure 4D,E). Le pourcentage de cellules répondantes est de $45\% \pm 5\%$. La co-perfusion d'alcool (50 mM) réduit significativement la mobilisation de $[Ca^{2+}]_i$ induite par le glutamate (Figure 4E).

Les résultats ci-dessus démontrent que lorsqu'ils sont coadministrés, l'alcool inhibe significativement l'effet du glutamate à la fois dans les tranches cultivées et dans les cellules endothéliales cultivées. Ces résultats constituent ainsi la première démonstration d'une interaction fonctionnelle directe glutamate / alcool sur les cellules endothéliales

néonatales cultivées le long de la voie de la migration piale des interneurones GABAergiques.

Effet de l'exposition in utero chronique à l'alcool sur l'activité MMP-9 endothéliale

Afin de confirmer *in vivo* les effets obtenus *in vitro* sur des coupes en culture et des
5 cellules endothéliales suite à une exposition à l'éthanol, les inventeurs ont étudié l'effet
du glutamate sur la mobilisation de Ca^{2+} et l'activité endothéliale des nouveau-nés
précédemment exposés *in utero* à l'alcool (Figure 5). De manière inattendue, la
quantification de la mobilisation du calcium dans les couches corticales superficielles a
révélé que l'effet du glutamate (100 μ M) sur $[Ca^{2+}]_i$ était nettement exacerbé dans les
10 tranches de nouveau-nés précédemment exposés *in utero* à l'alcool (Figure 5A, B). Fait
intéressant, cet effet fonctionnel de l'alcool a été associée à une surexpression majeure
de la sous-unité corticale GluN1 du récepteur NMDA (Figure 5C) et une tendance similaire
a été trouvée pour les sous-unités GluN2A et GluN2B (Figure 5D, E). En ce qui concerne
les activités de la protéase endothéliale, le traitement des coupes corticales P2 chez les
15 nouveau-nés précédemment exposés *in utero* à l'alcool et au glutamate (100 μ M) a
entraîné une activité exacerbée MMP-9 dans les microvaisseaux de la voie de migration
piale (Figure 5F, G).

Ces résultats indiquent que les effets de l'alcool au niveau cérébral sur la voie de
migration piale endothéliale des interneurones GABAergiques vont différés selon le mode
20 d'exposition (chronique ou aigu).

L'exposition à l'alcool in vivo altère la densité des interneurones GABA corticaux

Puisque les interneurones GABAergiques migrant le long de la voie de migration piale
peuplent préférentiellement les couches corticales superficielles (Miyoshi et Fishell, 2011,
Cereb. Cortex N. Y. N 1991 21, 845-852), les inventeurs ont étudié l'effet de l'exposition
25 *in vivo* et *in utero* à l'alcool sur le positionnement de interneurons Gad67GFP. En effet,
les données décrites dans Oliva et al., 2000, (*J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 3354-
3368) ont montré que ces interneurones étaient préférentiellement localisés dans les
couches corticales II-IV. Au stade P15 du développement fœtal de la souris, le
positionnement des neurones Gad67GFP est achevé (Southwell et al., 2012, *Nature* 491,

109-113.). L'analyse morphométrique indique que l'exposition à l'alcool *in utero* augmente significativement ($18,4\% \pm 3,9$; $p < 0,05$) la densité des interneurones Gad67GFP dans les couches superficielles (Figure 6A-C). Cet effet a été observé à la fois chez les femelles et les mâles (Figure 6C). Les résultats du Western blot ont confirmé les données histologiques et ont révélé un effet encore plus prononcé de l'exposition à l'alcool *in utero* aux niveaux de protéines eGFP ($150\% \pm 48$; $p < 0,01$), suggérant que l'alcool altérerait non seulement la densité des interneurones, mais aussi leur taux d'expression (Figure 6D).

Des expériences de Western blot ont également été réalisées pour cibler deux marqueurs des interneurones GABA, Dlx1 et la somatostatine, SSt (Figure 6E, F). En comparaison avec le groupe témoin, l'exposition à l'alcool *in utero* a augmenté significativement les niveaux de Dlx1 dans les extraits de cortex microdisséqué (Figure 6E). L'effet a été retrouvé chez les mâles et les femelles. En revanche, aucun effet significatif n'a été trouvé concernant SSt même si, contrairement à Dlx1, les niveaux de SSt ont tendance à diminuer (Figure 6F).

Puisque la morphologie des épines dendritiques constitue une bonne indication du processus de différenciation neuronale (Bourne et Harris, 2008, *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47-67 ; Dailey et Smith, 1996, *J. Neurosci.* 16, 2983-2994), les inventeurs ont étudié les effets de l'exposition à l'alcool *in utero* en se basant sur l'observation des épines des interneurones Gad67-GFP (Figure 6G, H). La visualisation et la quantification de différents sous-types d'épines dendritiques ont montré que l'exposition *in utero* à l'alcool ne modifiait pas la distribution des filipodia, des stubbies et des champignons (Figure 6G). En revanche, l'exposition *in utero* à l'alcool augmente significativement la densité cellulaire des épines dendritiques (Figure 6H).

Enfin, le traitement des coupes corticales à de l'éthanol (50 mM) ne modifie pas significativement ni le clivage ni l'activité de la caspase-3 (Figure 7).

L'ensemble de ces résultats indiquent que l'exposition chronique à l'alcool exacerbe l'activité des protéases endothéliales MMP-9 et tPA au niveau de la voie de migration piale et se traduit par une augmentation anormale de la densité des interneurones GABAergiques au niveau des couches corticales superficielles. Ainsi, en favorisant la

dégradation de la matrice extracellulaire, une alcoolisation chronique favoriserait la migration vasculo-dépendante des interneurones GABA le long de la voie de migration piale.

5

Conclusion

Au vu des différents résultats obtenus par les inventeurs chez la Souris gravide, il apparait que :

- 10 • la surexpression de PlGF au niveau placentaire permet l'amélioration de la neurogénèse et l'organisation neuronale embryonnaires et chez les nouveau-nés après une exposition *in utero* à l'alcool ;
- 15 • la surexpression de PlGF dans le placenta d'une souris gravide exposée à l'alcool permet de corriger, chez les souriceaux, les anomalies de migration corticale de cellules nerveuses telles que les interneurones GABAergiques et les oligodendrocytes qui utilisent un mode de migration vasculo-dépendant ;
- 20 • la surexpression de PlGF peut être utilisée efficacement en tant que médicament dans le traitement des troubles neurologiques, en particulier, des troubles neurodéveloppementaux liés à une organisation néocorticale défailante due à l'exposition *in utero* à l'alcool.

REVENDICATIONS

1. Facteur de croissance placentaire (PlGF) pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique chez un sujet.
- 5 2. PlGF pour son utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le trouble neurologique est lié à un déficit cortical.
3. PlGF pour son utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le sujet a été exposé à l'alcool *in utero*.
4. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée
10 en ce que le trouble neurologique est un trouble neurodéveloppemental.
5. PlGF pour son utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que le trouble neurodéveloppemental est une défaillance dans la mise en place du système nerveux central, particulièrement une défaillance choisie parmi une défaillance de la prolifération, de la migration, de la croissance et/ou de la différenciation des cellules
15 neuronales et/ou des cellules gliales.
6. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le trouble neurologique est une interneuronopathie.
7. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que le trouble neurodéveloppemental est une défaillance de la migration des
20 cellules neuronales et/ou des cellules gliales, particulièrement une défaillance dans la migration des interneurones GABAergiques et/ou des oligodendrocytes.
8. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que le trouble neurodéveloppemental est causé par une perturbation de l'activité d'une métalloprotéinase matricielle lors d'une alcoolisation *in utero*, en
25 particulier de l'activité de la métalloprotéinase matricielle MMP-9 et/ou de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA).

9. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le trouble neurologique se manifeste par un ou plusieurs symptômes choisis dans le groupe comprenant la diminution de la masse cervicale, l'hyperactivité, la perte de l'attention, la difficulté d'apprentissage, la difficulté de mémorisation, la
5 dépression, l'anxiété, les troubles émotionnelles, l'irritabilité excessive et les problèmes comportementaux.
10. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisée en ce que le trouble neurologique est sélectionné dans le groupe comprenant la schizophrénie, la sclérose en plaque, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment
10 le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrome de Dravet (DS), la lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS), le syndrome de Miller-Dieker et les troubles causés par l'alcoolisation fœtale (TCAF).
11. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ledit PlGF possède la séquence représentée par une parmi SEQ
15 ID NO : 1 à SEQ ID NO :4.
12. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que ledit PlGF est obtenu par génie génétique ou par synthèse chimique.
13. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 3 à 12,
20 caractérisée en ce que le sujet ayant été exposé à l'alcool *in utero* est choisi parmi un embryon, un fœtus et un enfant, en particulier un enfant prématuré.
14. Composition pharmaceutique pour son utilisation dans la prévention et/ou le traitement d'un trouble neurologique, préférentiellement un trouble neurologique lié à un déficit cortical, chez un sujet, notamment un sujet exposé à l'alcool *in utero*,
25 ladite composition pharmaceutique comprenant un PlGF tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 13 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
15. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 14, caractérisée en ce que ledit trouble est une interneuronopathie et/ou une défaillance dans la mise en place du système nerveux central, particulièrement une défaillance

choisie parmi une défaillance de la prolifération, de la migration, de la croissance et/ou de la différenciation des cellules gliales.

- 5 16. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 14 ou 15, caractérisée en ce que ledit trouble neurologique est sélectionné dans le groupe comprenant la schizophrénie, la sclérose en plaque, l'autisme, l'encéphalite épileptique, notamment le syndrome de West (WS), le syndrome de d'Ohtahara (OS) et le syndrome de Dravet (DS), la lissencéphalie classique, l'inflammation du système nerveux central (CNS), le syndrome de Miller-Dieker et les troubles causés par l'alcoolisation foétale (TCAF).
- 10 17. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit trouble est un TCAF.
- 15 18. PlGF pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications 14 à 17, caractérisés en ce que ladite utilisation comprend une étape préalable d'identification du sujet, ladite identification comprenant les étapes suivantes :
- 20 a) mesure de la quantité de PlGF dans un échantillon biologique dudit sujet, de préférence provenant du placenta ou du sang du cordon ombilical ;
- b) comparaison de la quantité de PlGF de l'étape a) avec une référence qui est une mesure de la quantité de PlGF chez un sujet sain, et
- c) détermination d'un trouble neurologique ou risque de développer un tel trouble chez ledit sujet.
- 25 19. PlGF ou composition pour leur utilisation selon la revendication 18, caractérisés en ce que le sujet souffre d'un trouble neurologique ou risque de développer un tel trouble si la quantité mesurée de PlGF à l'étape a) est inférieure à la référence de l'étape b).
20. PlGF ou composition pour leur utilisation selon la revendication 18 ou 19, caractérisés en ce que le trouble neurologique est lié à un déficit cortical.

21. PlGF ou composition pour leur utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, caractérisés en ce que le sujet a été exposé à l'alcool *in utero*.

22. PlGF ou composition pour leur utilisation selon l'une quelconque des revendications 18 à 21, caractérisés en ce que la quantité de PlGF est déterminée en mesurant la
5 quantité d'acide nucléique PlGF ou la quantité du polypeptide PlGF.

23. PlGF ou composition pour leur utilisation selon la revendication 22, caractérisés en ce que la quantité de PlGF est mesurée par une méthode sélectionnée parmi le Northern blot, le Southern blot, la PCR, la RT-PCR, la RT-PCR quantitative, le SAGE et ses dérivés, les puces d'acides nucléiques, notamment les puces à ADNc, les puces à
10 oligonucléotides et les puces à ARNm, les puces à tissu et le RNA-Seq et/ou par une méthode sélectionnée parmi l'immunohistologie, l'immunoprécipitation, le western blot, le dot blot, l'ELISA ou l'ELISPOT, les puces à protéines, les puces à anticorps, ou les puces à tissu couplées à l'immunohistochimie, les techniques de FRET ou de BRET, les méthodes de microscopie ou d'histochimie, dont notamment les méthodes de
15 microscopie confocale et de microscopie électronique, les méthodes basées sur l'utilisation d'une ou plusieurs longueurs d'onde d'excitation et d'une méthode optique adaptée, comme une méthode électrochimique (les techniques voltamétrie et d'ampérométrie), le microscope à force atomique, et les méthodes de radiofréquence, comme la spectroscopie résonance multipolaire, confocale et non-confocale, détection de fluorescence, luminescence, chemiluminescence, absorbance,
20 réflectance, transmittance, and biréfringence ou index de réfraction (par exemple, par résonance des plasmons de surface, par ellipsométrie, par méthode de miroir résonnant, etc.), cytométrie de flux, imagerie par résonance radioisotopique ou magnétique, analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE); par spectrophotométrie HPLC-Mass, par chromatographie liquide/spectrophotométrie de
25 masse/spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

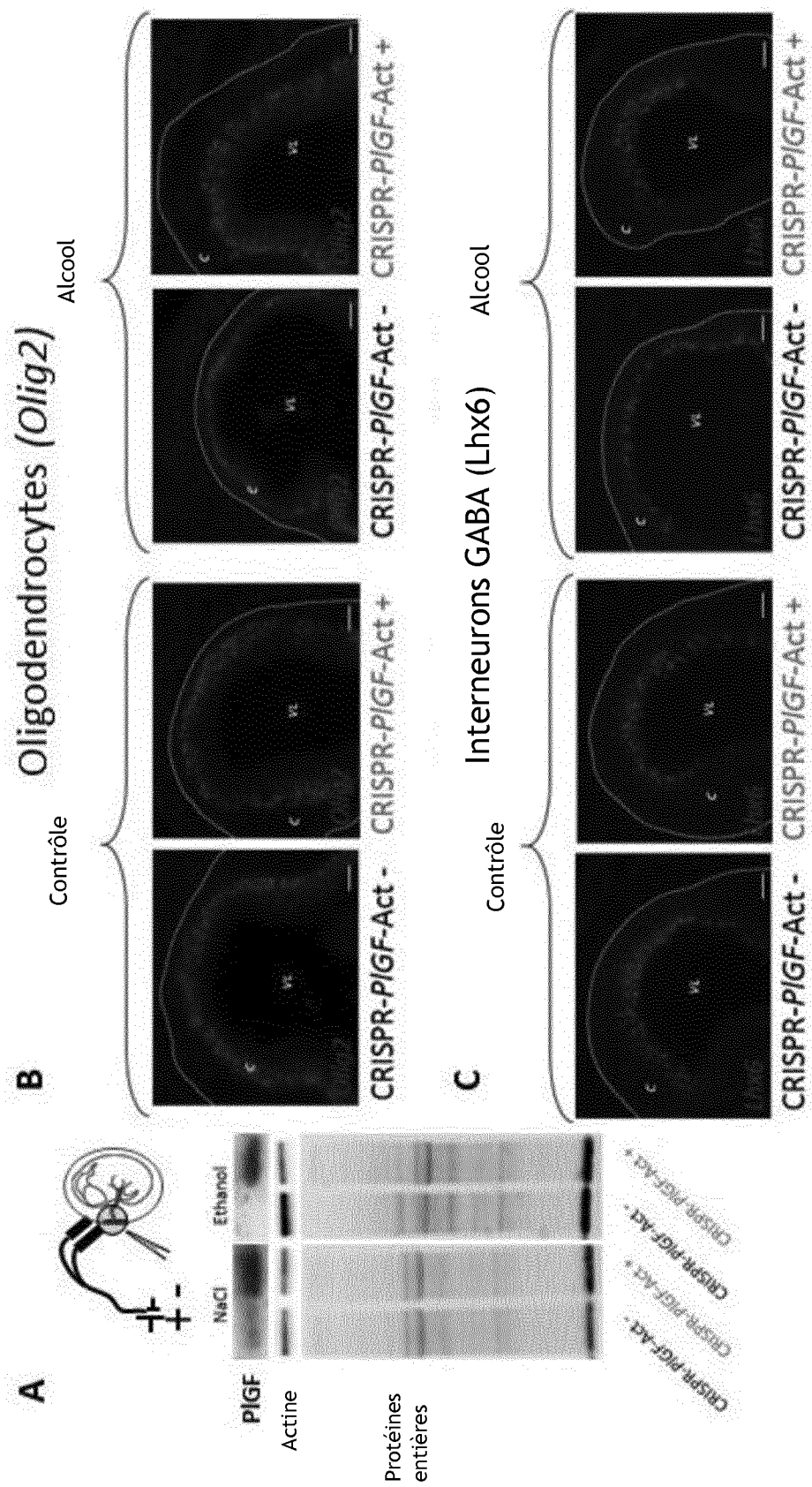


Figure 1

D

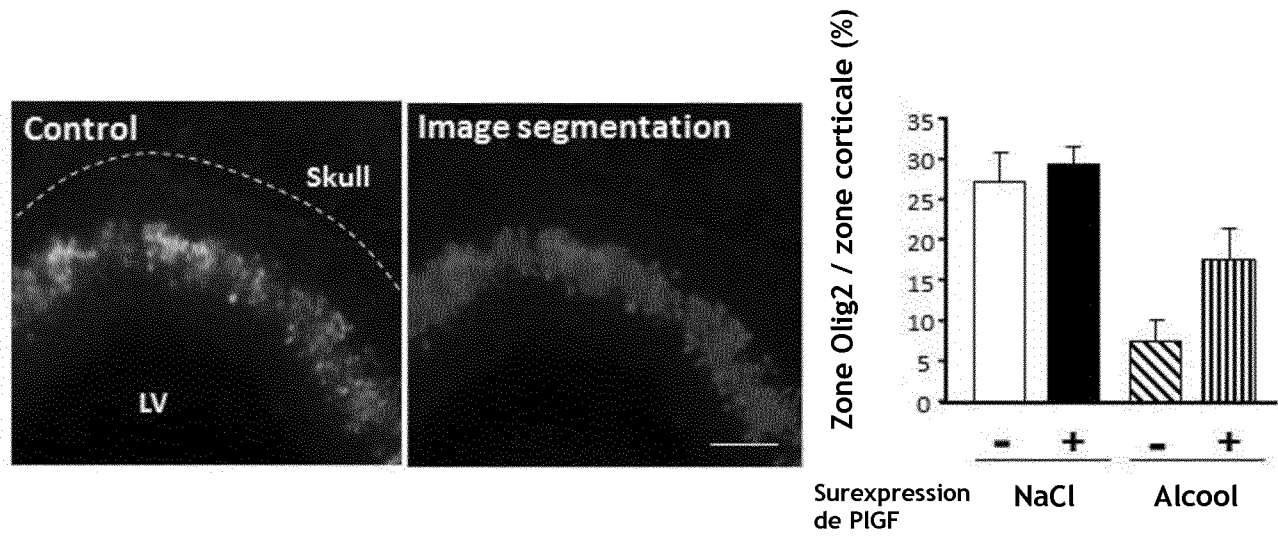


Figure 1 (suite)

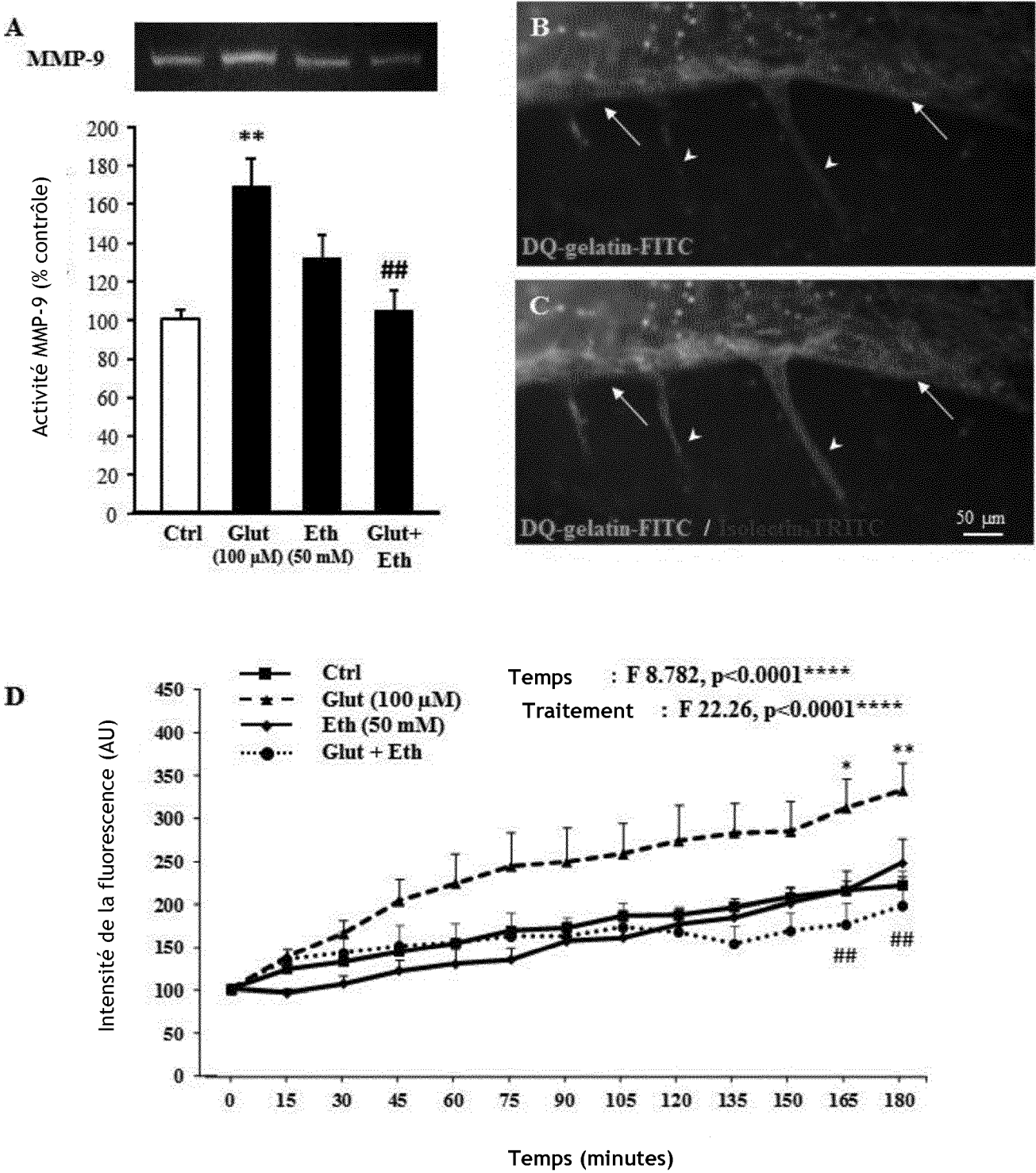


Figure 2

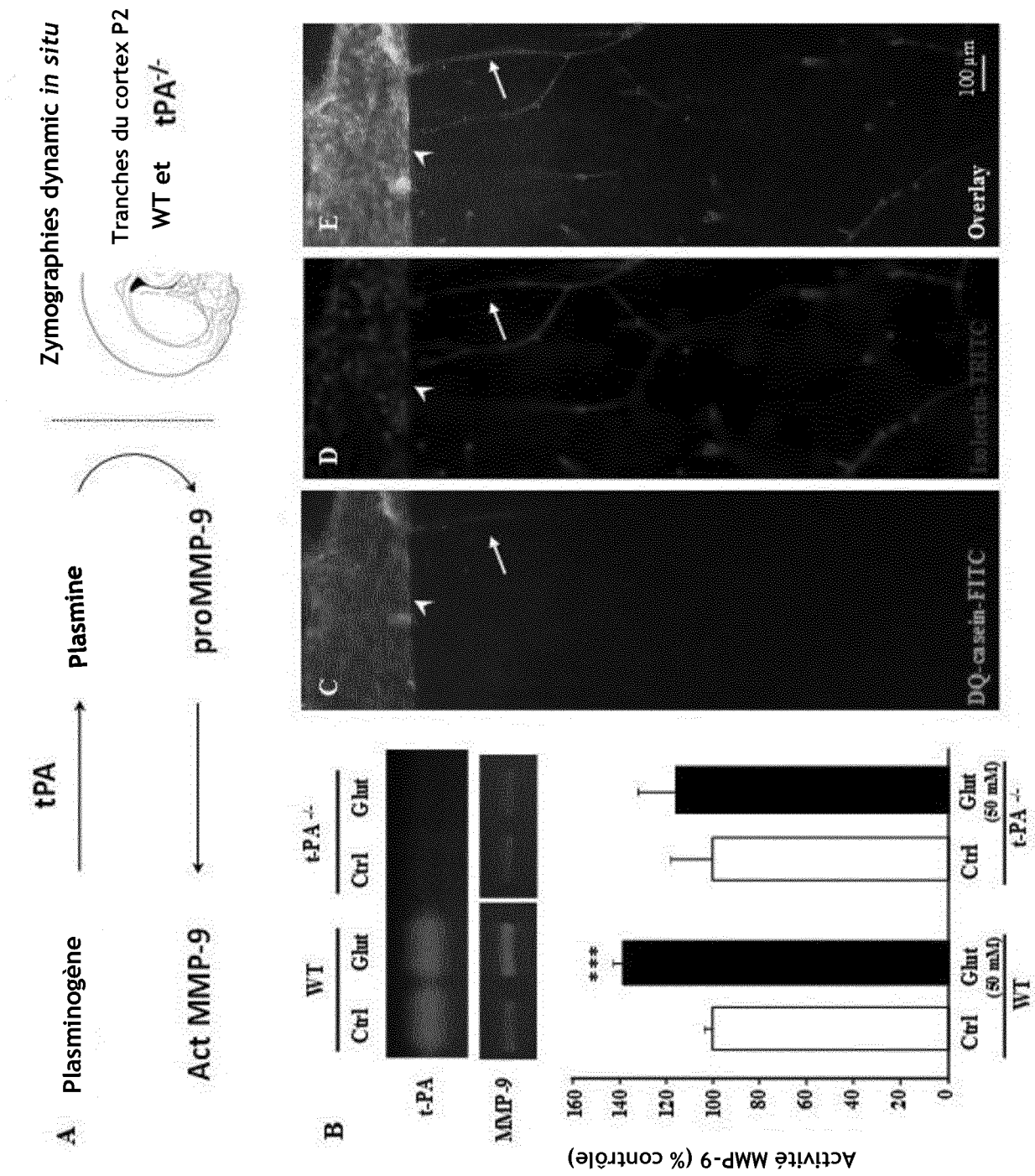


Figure 3

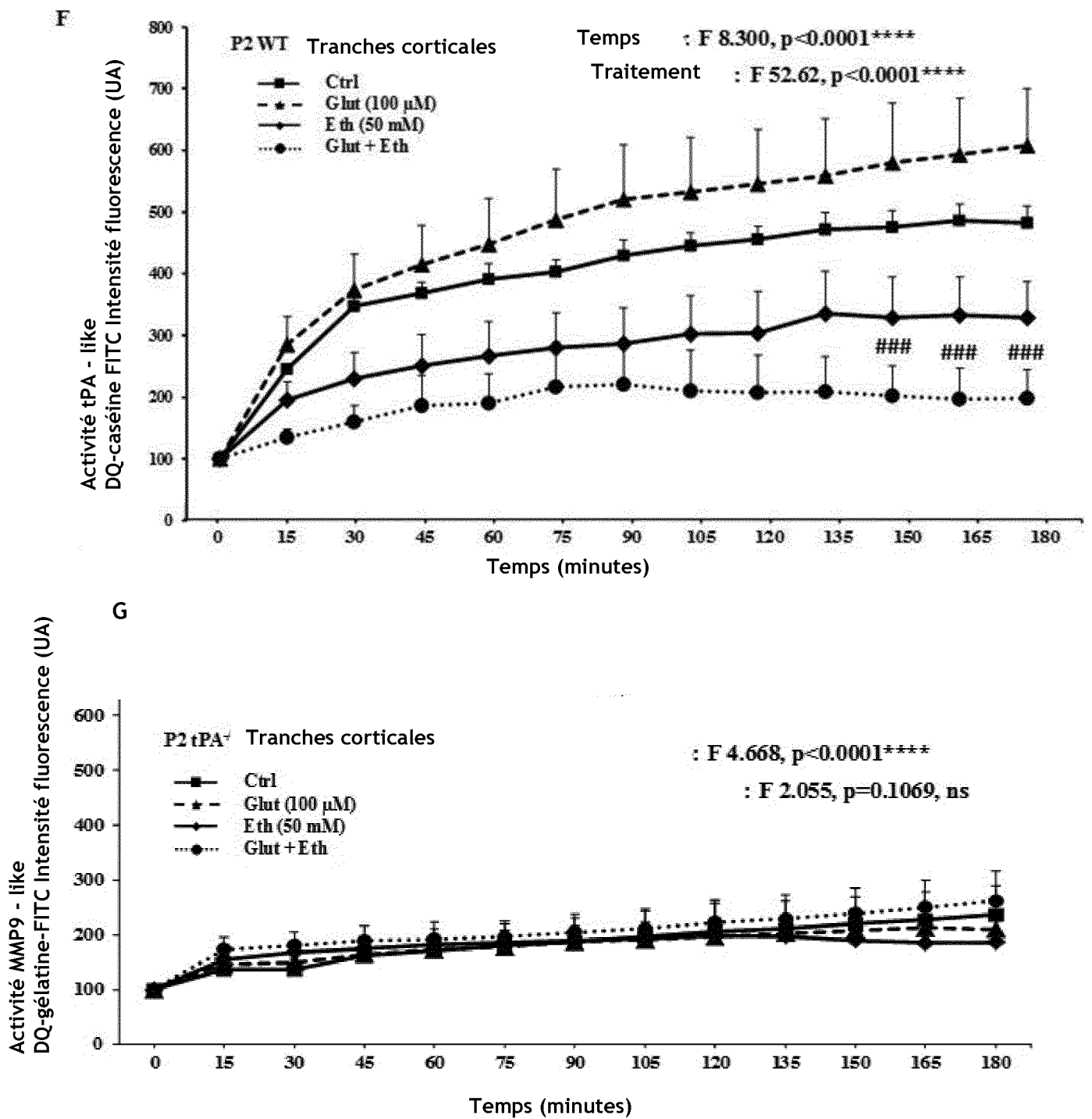


Figure 3 (suite)

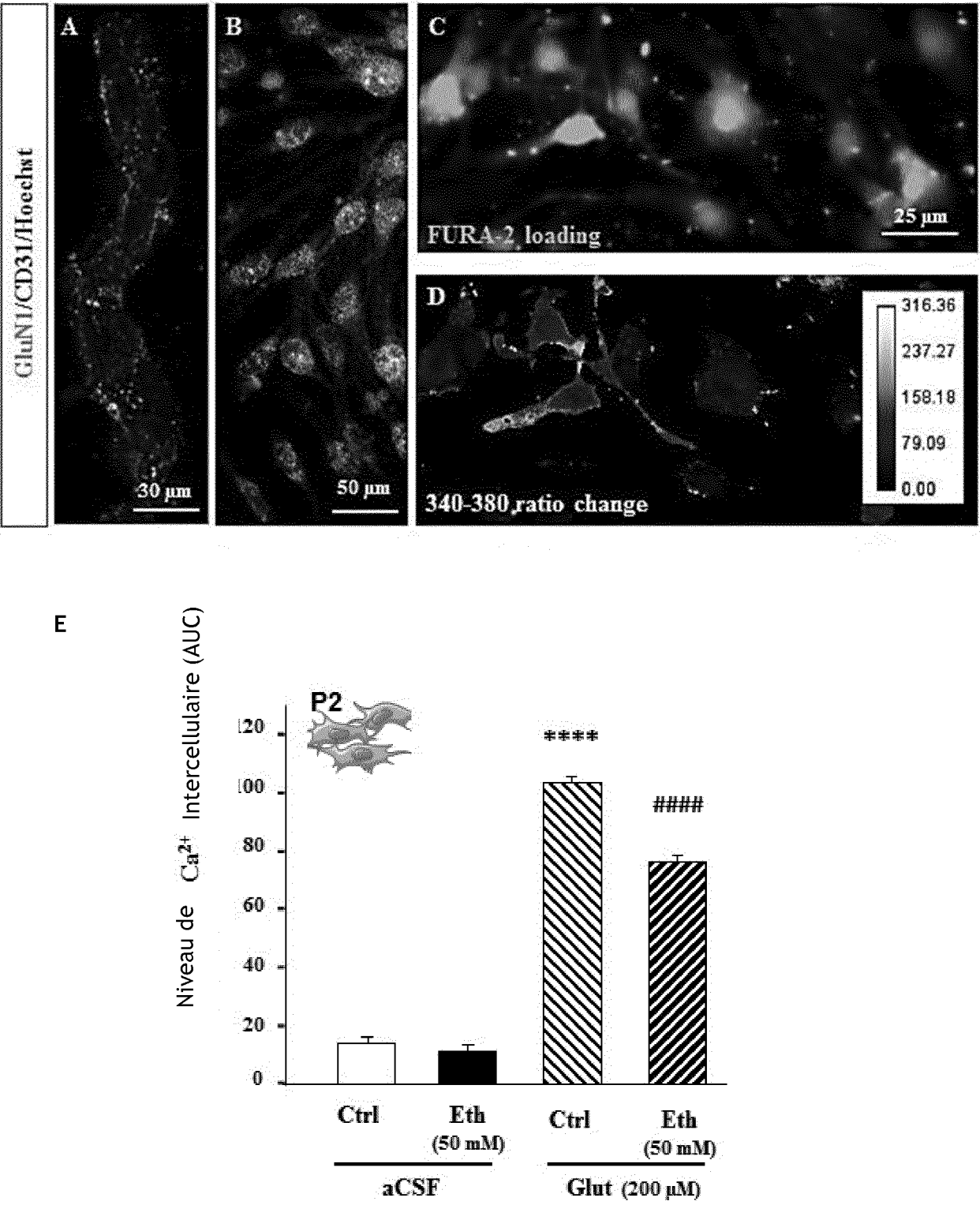


Figure 4

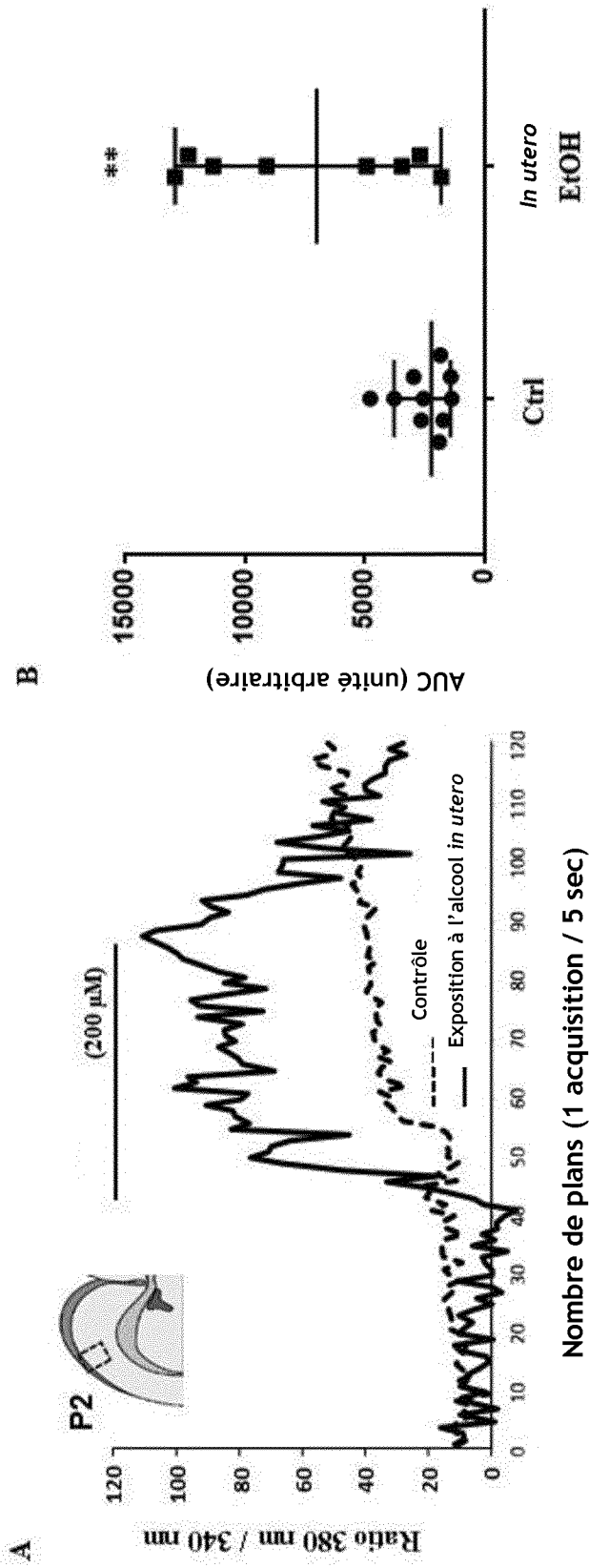


Figure 5

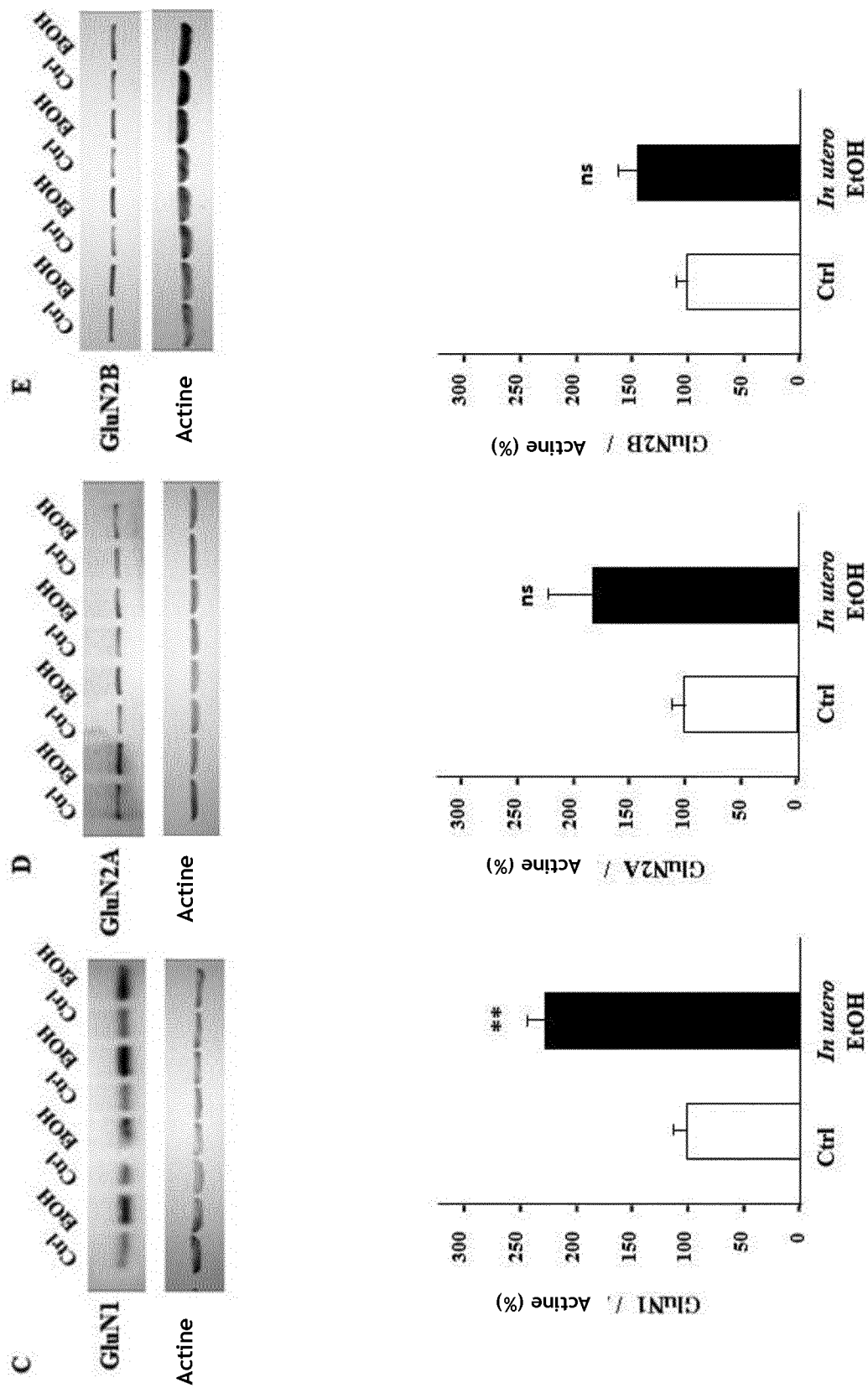


Figure 5 (suite)

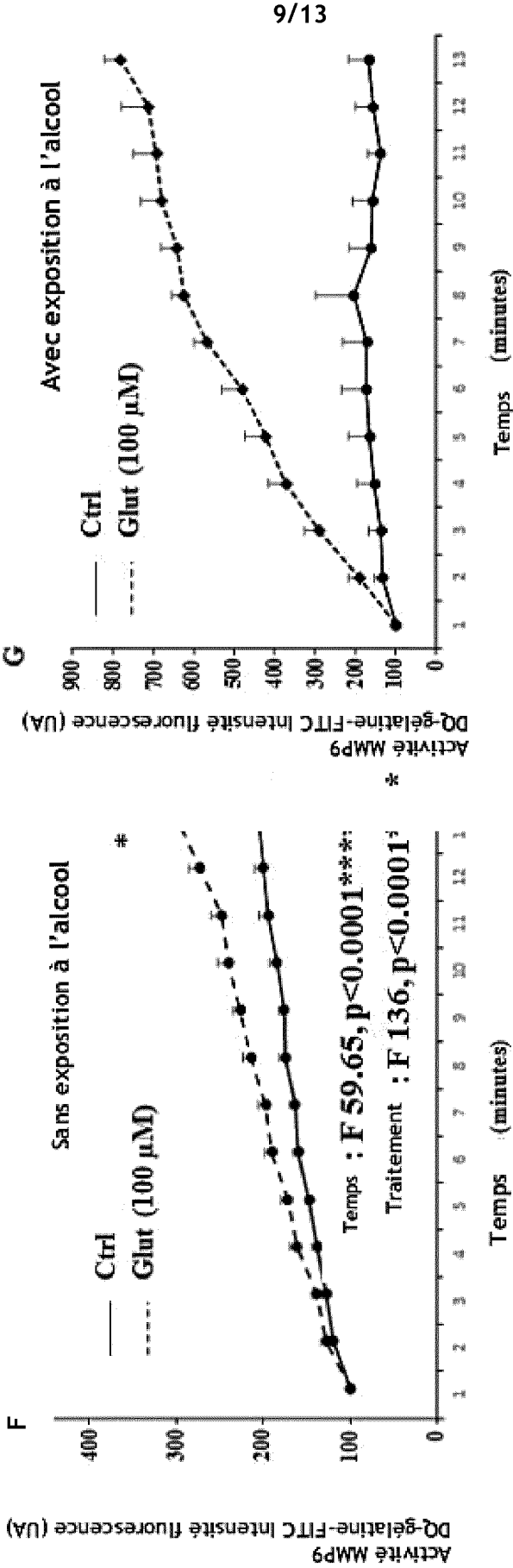


Figure 5 (suite)

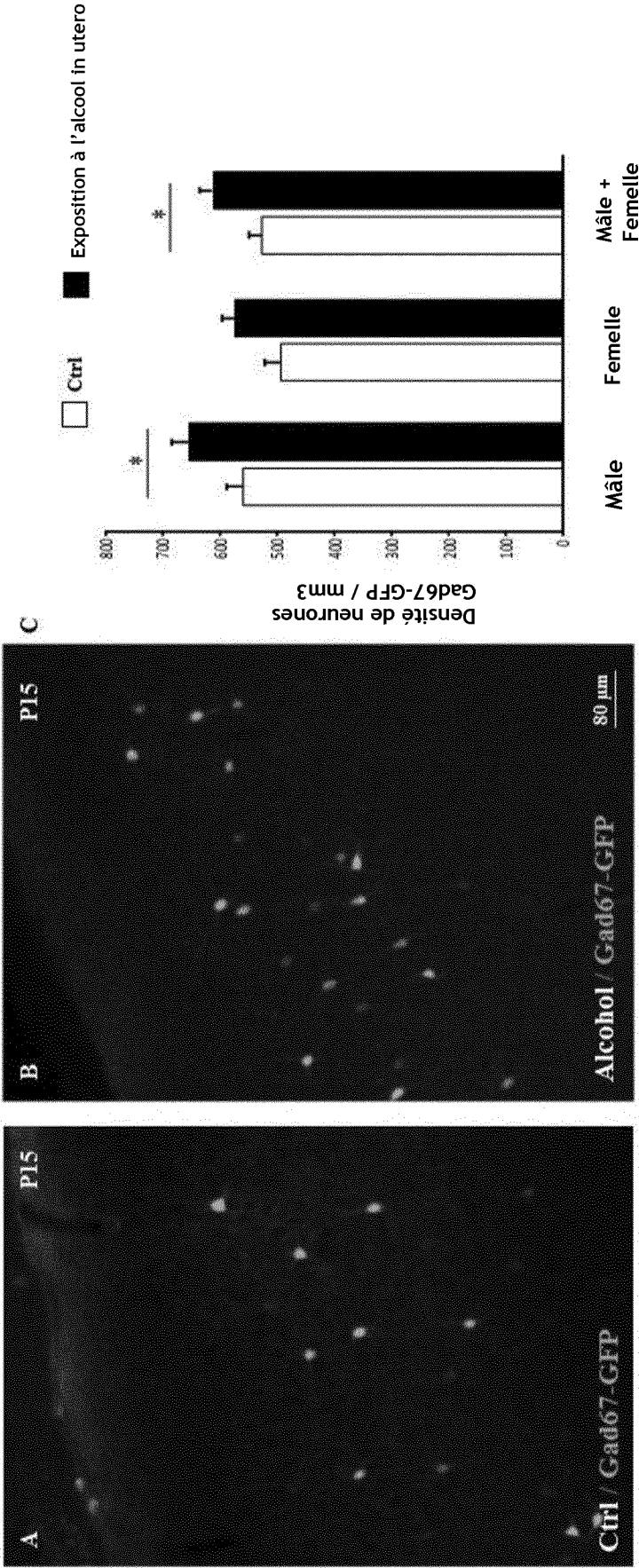


Figure 6

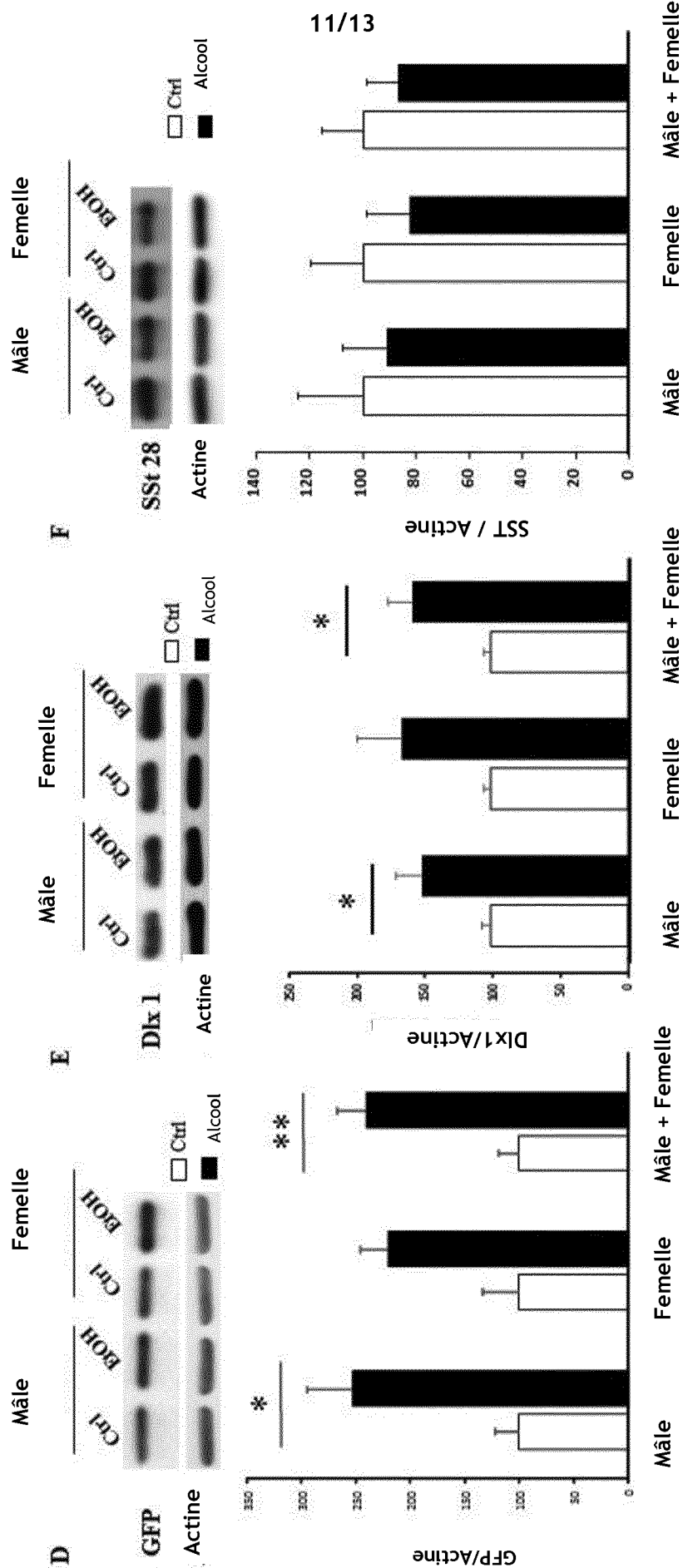


Figure 6 (suite)

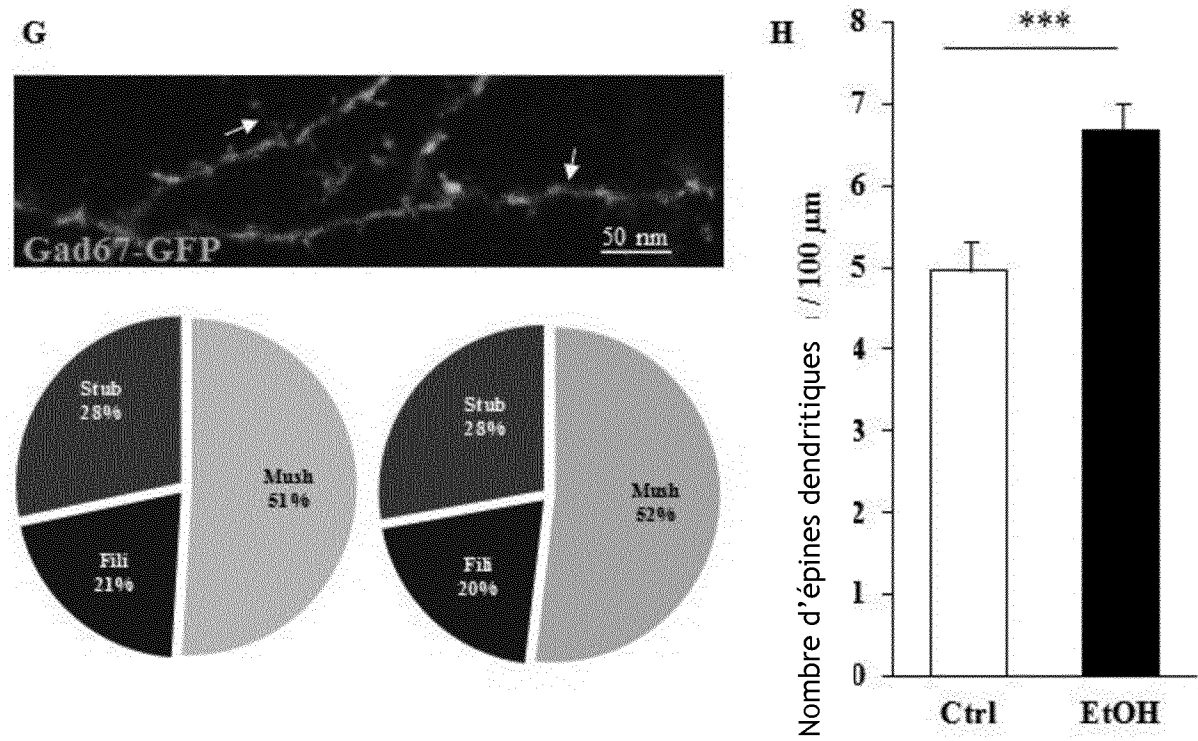


Figure 6 (suite)

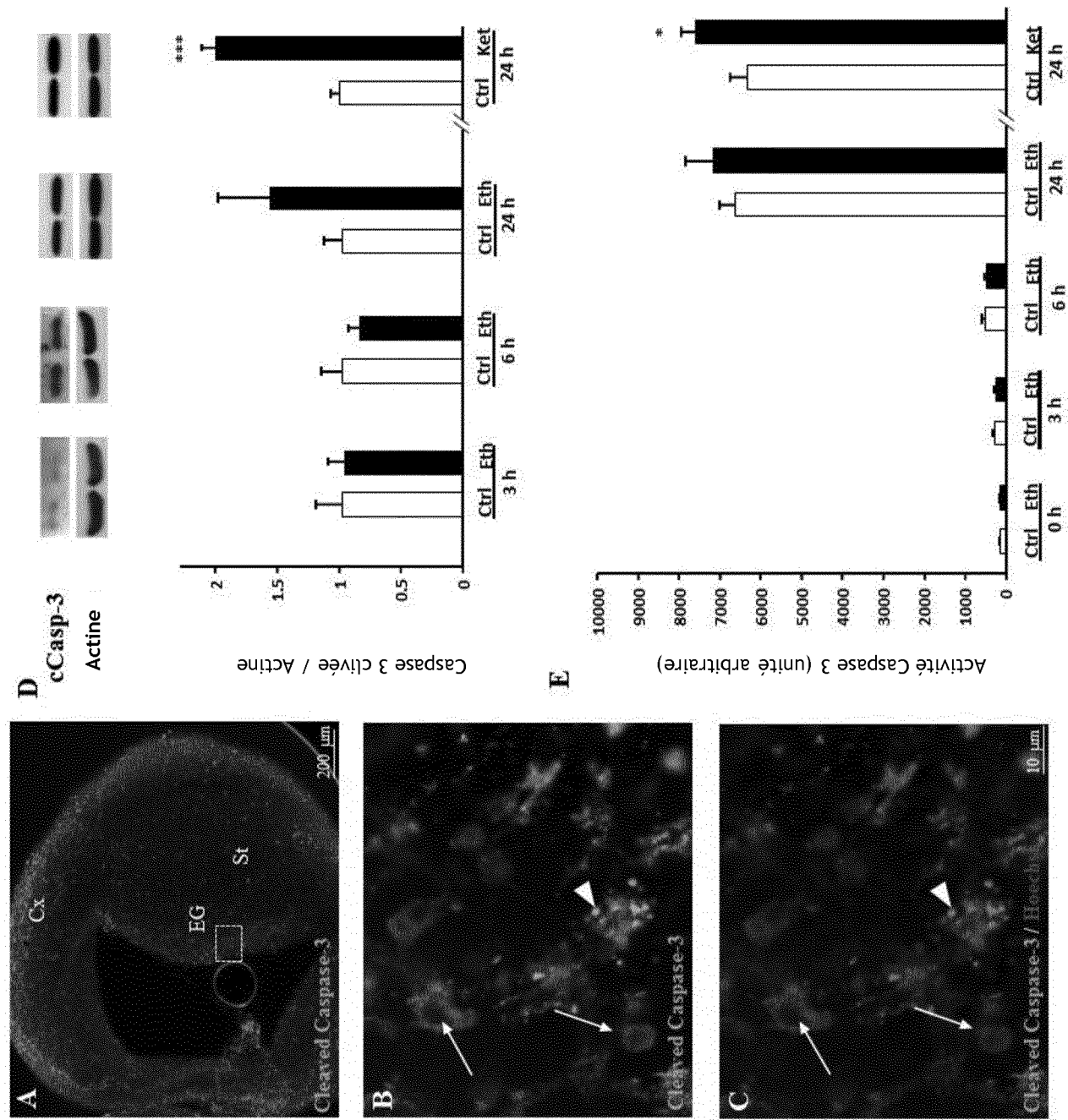


Figure 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/064216

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**A61K 38/18**(2006.01)i; **G01N 33/68**(2006.01)i; **A61P 25/32**(2006.01)i; **A61P 25/28**(2006.01)i

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)

A61K; G01N; A61P

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATTHIEU LECUYER ET AL. "PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure" <i>ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS</i> , Vol. 5, No. 1, 06 June 2017 (2017-06-06), DOI: 10.1186/s40478-017-0444-6 XP055547089	1-17
Y	abstract; page 2, column 1, paragraph 2; figures page 3, column 2, paragraph 3	1-23
Y	SYLVIE JEGOU ET AL. "Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain" <i>ANNALS OF NEUROLOGY</i> , BOSTON, US, Vol. 72, No. 6, 31 December 2012 (2012-12-31), pages 952-960 DOI: 10.1002/ana.23699 ISSN: 0364-5134, XP055261686 abstract; figures	1-23
Y	WO 2008075363 A1 (YISSUM RES DEV CO [IL]; HADASIT MED RES SERVICE [IL]; KESHET ELI [IL];) 26 June 2008 (2008-06-26) page 1, line 13 - line 24; claims	1-23



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 application or patent 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

03 September 2019

Date of mailing of the international search report

13 September 2019

Name and mailing address of the ISA/EP

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Netherlands

Telephone No. (+31-70)340-2040

Facsimile No. (+31-70)340-3016

Authorized officer

Langer, Astrid

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHABALLE LINDA ET AL. "Placental growth factor: a tissue modelling factor with therapeutic potentials in neurology?" <i>ACTA NEUROLOGICA BELGICA</i> MAR 2011, Vol. 111, No. 1, March 2011 (2011-03), pages 10-17 ISSN: 0300-9009, XP009510722 abstract; figures	1-23
Y	CARMELIET PETER ET AL. "VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration" <i>CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES</i> , Vol. 70, No. 10, May 2013 (2013-05), pages 1763-1778 XP055547298 abstract; figures	1-23
Y	WO 2014117155 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES [US]) 31 July 2014 (2014-07-31) claims	1-23
Y	KESHAV K. GUPTA ET AL. "An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment" <i>ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH</i> , US, Vol. 40, No. 8, 04 July 2016 (2016-07-04), pages 1594-1602 DOI: 10.1111/acer.13135 ISSN: 0145-6008, XP055404686 abstract; figures; tables	1-23
Y	PIIA VUORELA ET AL. "Hepatocyte Growth Factor, Epidermal Growth Factor, and Placenta Growth Factor Concentrations in Peripheral Blood of Pregnant Women With Alcohol Abuse" <i>ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH</i> , US, Vol. 26, No. 5, 01 May 2002 (2002-05-01), pages 682-687 DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02591.x ISSN: 0145-6008, XP055261678 abstract; figures	18-23
Y	FR 3037657 A1 (CENTRE HOSPITALIER UNIV DE ROUEN [FR]; UNIV DE ROUEN [FR]; INST NAT DE) 23 December 2016 (2016-12-23) claims	18-23
X,P	WO 2018100143 A1 (UNIV DE ROUEN NORMANDIE [FR]; CENTRE HOSPITALIER UNIV DE ROUEN [FR]; I) 07 June 2018 (2018-06-07) the whole document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2019/064216

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/EP2019/064216

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2008075363	A1	26 June 2008	AT	547523	T	15 March 2012
				CA	2673222	A1	26 June 2008
				EP	2099913	A1	16 September 2009
				JP	2010512781	A	30 April 2010
				US	2010136012	A1	03 June 2010
				US	2013084583	A1	04 April 2013
				US	2014295454	A1	02 October 2014
				WO	2008075363	A1	26 June 2008
WO	2014117155	A1	31 July 2014	EP	2948164	A1	02 December 2015
				US	2015368309	A1	24 December 2015
				WO	2014117155	A1	31 July 2014
FR	3037657	A1	23 December 2016	AU	2016282842	A1	25 January 2018
				BR	112017027707	A2	11 September 2018
				CA	2990304	A1	29 December 2016
				CN	108450002	A	24 August 2018
				EP	3311174	A1	25 April 2018
				FR	3037657	A1	23 December 2016
				JP	2018519819	A	26 July 2018
				KR	20180063036	A	11 June 2018
				US	2018195124	A1	12 July 2018
				WO	2016207253	A1	29 December 2016
WO	2018100143	A1	07 June 2018	AU	2017367175	A1	20 June 2019
				CA	3045080	A1	07 June 2018
				EP	3548060	A1	09 October 2019
				FR	3059550	A1	08 June 2018
				WO	2018100143	A1	07 June 2018

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2019/064216

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K38/18 G01N33/68 A61P25/32 A61P25/28 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) A61K G01N A61P		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS 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	MATTHIEU LECUYER ET AL: "PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure", ACTA NEUROPATHOLOGICA COMMUNICATIONS, vol. 5, no. 1, 6 juin 2017 (2017-06-06), XP055547089, DOI: 10.1186/s40478-017-0444-6	1-17
Y	Abstract; page 2, colonne 1, alinéa 2; figures page 3, colonne 2, alinéa 3 ----- -/--	1-23
☒ 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 3 septembre 2019		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 13/09/2019
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 Langer, Astrid

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	SYLVIE JEGOU ET AL: "Prenatal Alcohol Exposure Affects Vasculature Development in the Neonatal Brain", ANNALS OF NEUROLOGY., vol. 72, no. 6, 31 décembre 2012 (2012-12-31), pages 952-960, XP055261686, BOSTON, US ISSN: 0364-5134, DOI: 10.1002/ana.23699 abrégé; figures -----	1-23
Y	WO 2008/075363 A1 (YISSUM RES DEV CO [IL]; HADASIT MED RES SERVICE [IL]; KESHET ELI [IL];) 26 juin 2008 (2008-06-26) page 1, ligne 13 - ligne 24; revendications -----	1-23
Y	CHABALLE LINDA ET AL: "Placental growth factor: a tissue modelling factor with therapeutic potentials in neurology?", ACTA NEUROLOGICA BELGICA MAR 2011, vol. 111, no. 1, mars 2011 (2011-03), pages 10-17, XP009510722, ISSN: 0300-9009 abrégé; figures -----	1-23
Y	CARMELIET PETER ET AL: "VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration", CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES, vol. 70, no. 10, mai 2013 (2013-05), pages 1763-1778, XP055547298, abrégé; figures -----	1-23
Y	WO 2014/117155 A1 (SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES [US]) 31 juillet 2014 (2014-07-31) revendications -----	1-23
Y	KESHAV K. GUPTA ET AL: "An Update on Fetal Alcohol Syndrome-Pathogenesis, Risks, and Treatment", ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH., vol. 40, no. 8, 4 juillet 2016 (2016-07-04), pages 1594-1602, XP055404686, US ISSN: 0145-6008, DOI: 10.1111/acer.13135 abrégé; figures; tableaux ----- -/--	1-23

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	PIIA VUORELA ET AL: "Hepatocyte Growth Factor, Epidermal Growth Factor, and Placenta Growth Factor Concentrations in Peripheral Blood of Pregnant Women With Alcohol Abuse", ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH., vol. 26, no. 5, 1 mai 2002 (2002-05-01), pages 682-687, XP055261678, US ISSN: 0145-6008, DOI: 10.1111/j.1530-0277.2002.tb02591.x abrégé; figures -----	18-23
Y	FR 3 037 657 A1 (CENTRE HOSPITALIER UNIV DE ROUEN [FR]; UNIV DE ROUEN [FR]; INST NAT DE) 23 décembre 2016 (2016-12-23) revendications -----	18-23
X,P	WO 2018/100143 A1 (UNIV DE ROUEN NORMANDIE [FR]; CENTRE HOSPITALIER UNIV DE ROUEN [FR]; I) 7 juin 2018 (2018-06-07) le document en entier -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2019/064216

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2008075363	A1	26-06-2008	AT 547523 T	15-03-2012
			CA 2673222 A1	26-06-2008
			EP 2099913 A1	16-09-2009
			JP 2010512781 A	30-04-2010
			US 2010136012 A1	03-06-2010
			US 2013084583 A1	04-04-2013
			US 2014295454 A1	02-10-2014
			WO 2008075363 A1	26-06-2008

WO 2014117155	A1	31-07-2014	EP 2948164 A1	02-12-2015
			US 2015368309 A1	24-12-2015
			WO 2014117155 A1	31-07-2014

FR 3037657	A1	23-12-2016	AU 2016282842 A1	25-01-2018
			BR 112017027707 A2	11-09-2018
			CA 2990304 A1	29-12-2016
			CN 108450002 A	24-08-2018
			EP 3311174 A1	25-04-2018
			FR 3037657 A1	23-12-2016
			JP 2018519819 A	26-07-2018
			KR 20180063036 A	11-06-2018
			US 2018195124 A1	12-07-2018
			WO 2016207253 A1	29-12-2016

WO 2018100143	A1	07-06-2018	AU 2017367175 A1	20-06-2019
			CA 3045080 A1	07-06-2018
			FR 3059550 A1	08-06-2018
			WO 2018100143 A1	07-06-2018
