

(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
4 mai 2006 (04.05.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/045939 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/04 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)

DEBANNE, Dominique [FR/FR]; 4, rue Falque, F-13006
MARSEILLE (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/002641

(74) Mandataire : **CABINET ORES**; 36 rue de St Péters-
bourg, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international :
24 octobre 2005 (24.10.2005)

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

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0411256 22 octobre 2004 (22.10.2004) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) :
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCI-
ENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016
PARIS (FR). **UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE
AIX-MARSEILLE 2** [FR/FR]; 58, bld Charles Livon,
F-13284 MARSEILLE Cedex 07 (FR). **UNIVERSITE
CLAUDE BERNARD DE LYON 1** [FR/FR]; Campus de
La Doua, Bât 210, 43 boulevard du 11 novembre 1918,
F-69622 VILLEURBANNE Cedex (FR).

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **ROUGON,
Geneviève** [FR/FR]; 2, boulevard des Cèdres, F-13009
MARSEILLE (FR). **CASTELLANI, Valérie** [FR/FR];
185 chemin du teysset, F-38890 SAINT CHEF (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: MODULATING SYNAPTIC TRANSMISSION BY SEMAPHORINS AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE PAR LES SEMAPHORINES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to the use of semaphorins for modulating synaptic transmission, and to application thereof for treating pathologies associated with a malfunctioning of neuronal activity and for screening active medicaments on these pathologies.

(57) Abrégé : La présente invention est relative à l'utilisation des sémaphorines pour moduler la transmission synaptique et à ses applications, pour le traitement des pathologies liées à un dérèglement de l'activité neuronale, et pour le criblage de médicaments actifs sur ces pathologies.



WO 2006/045939 A1

MODULATION DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE PAR LES SEMAPHORINES ET SES APPLICATIONS

La présente Invention est relative à l'utilisation des sémaphorines pour moduler la transmission synaptique et à ses applications, pour le traitement des pathologies liées à un dérèglement de l'activité neuronale, ainsi que pour le criblage de médicaments actifs sur ces pathologies.

Les pathologies liées à un dérèglement de l'activité neuronale, affectant notamment la neurotransmission, englobent de nombreuses maladies génétiques et acquises caractérisées par un dérèglement de l'activité électrique des réseaux de neurones (baisse d'activité ou hyperactivité) telles que par exemple : l'épilepsie, l'autisme, l'anxiété, l'angoisse, la dépression et les troubles bipolaires, le stress, l'hyperactivité, la schizophrénie, les troubles du sommeil, les troubles de la santé mentale, les troubles cognitifs, en particulier liés à l'âge, les ataxies, et les pathologies affectant la neurotransmission, en particulier les maladies génétiques affectant un récepteur de neurotransmetteur. Les épilepsies sont un exemple de dérégulation de l'activité électrique cérébrale conduisant à une hyperactivité neuronale. Les anxiétés se caractérisent également par le fait que certaines régions du cerveau sont hyperactives. A l'opposé, les troubles cognitifs, notamment liés à l'âge, sont des exemples de pathologies caractérisées par une diminution de l'activité des réseaux neuronaux.

Les traitements de ces pathologies, lorsqu'ils existent posent des problèmes liés notamment à des effets secondaires indésirables des molécules utilisées. Par exemple, les anxiolytiques comme les benzodiazépines permettent d'abaisser le niveau d'activité neuronale en favorisant les mécanismes d'inhibition. Toutefois, la cible moléculaire de ce traitement, le GABA, est très répandue dans le système nerveux. En conséquence, ce type de traitement induit des effets secondaires comme la somnolence et la réduction des réflexes.

Une meilleure compréhension du fonctionnement des réseaux neuronaux et notamment des molécules impliquées dans la régulation de l'activité de ces réseaux, permettrait de mettre au point des médicaments mieux adaptés au traitement des pathologies liées à leur dysfonctionnement.

La famille des sémaphorines regroupe des protéines de signalisation

intercellulaire, membranaires ou sécrétées, dont certaines ont une fonction de guidage des axones et l'une d'entre elle participe à la signalisation du système immunitaire.

Les sémaphorines sont caractérisées par la présence, à leur extrémité NH₂, d'un domaine d'environ 500 acides aminés comprenant 17 cystéines conservées (domaine « sémaphorine » ou « séma » ; pour une revue sur les sémaphorines voir
5 notamment Raper, J. A., Curr. Opin Neurobiol., 2000, 10, 88-). Les sémaphorines ont été divisées en 8 classes en fonction de l'organisation de domaines additionnels ; les classes 1 et 2 sont présentes chez les invertébrés, les classes 3 à 7 chez les vertébrés, alors que la dernière classe (classe V) est codée par des virus. Les sémaphorines de
10 classes 2, 3 et V sont sécrétées et les autres sont ancrées à la membrane cellulaire par une liaison de type phosphatidylinositol ou un domaine transmembranaire. Le domaine sémaphorine est un élément clé de la signalisation ; il a notamment été montré pour les sémaphorines de classe 3, que des sémaphorines tronquées comprenant uniquement le domaine sémaphorine sont biologiquement actives
15 lorsqu'elles sont produites sous la forme de dimère ; le domaine carboxy-terminal contenant des acides aminés basiques et un domaine immunoglobuline facilite la liaison des sémaphorines de classe 3 à leur récepteur.

Les récepteurs des sémaphorines sont des complexes multimoléculaires comprenant des neuropilines (NP-1 ou NP-2), des plexines et des
20 molécules d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines (L1 ; Raper et al., précité ; Castellani et al., Neuron, 2000, 27, 237-249) ; les neuropilines à elles seules sont capables de lier les sémaphorines mais la transduction du signal implique la présence de plexine et de molécule d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines qui jouent le rôle de co-récepteurs. En outre, il a été montré que les
25 différentes sémaphorines jouent le rôle d'agonistes ou d'antagonistes vis-à-vis des récepteurs NP-1 et NP-2 ; par exemple SémaA et SémaE sont des antagonistes du récepteur NP-1 et des agonistes du récepteur NP-2 (Takahashi et al., Nature Neuroscience, 1998, 1, 487-493).

Parmi les sémaphorines de vertébrés, les sémaphorines sécrétées
30 (classe 3) ont été particulièrement étudiées. Au moins six membres qui jouent un rôle important dans le développement du tissu nerveux, ont été identifiés (Séma3A à 3F). Ces molécules représentent un signal majeur de répulsion pour le guidage des axones,

empêchant ainsi les axones d'innervier des territoires inappropriés du tissu nerveux en développement (Raper, précité). Ainsi, les sémaphorines apportent des contraintes structurales au bourgeonnement associé au câblage physiologique du système nerveux (Giger et al., J. Neurosci. Res., 1998, 52, 27-). La régulation positive de leur
5 expression après une lésion suggère que les sémaphorines pourraient également limiter la régénération axonale chez l'adulte (Giger et al., précité ; Pasterkamp et al., Brain. Res. Dev., 2001, 35, 36- ; Niclou et al., Mol. Cell. Neurosci., 2003, 24, 902-). L'effet des sémaphorines sur le tissu nerveux en développement est lié à leur capacité à modeler la morphologie des terminaisons axonales ; elles provoquent des
10 réarrangements dynamiques de l'actine du cytosquelette qui induisent la rétraction ou l'extension des composants filopodes ou lamellipodes des cônes de croissance (Liu et Strittmatter, Curr. Opini., Cell. Biol., 2001, 13, 619-).

Il a notamment été montré qu'une forme soluble du récepteur L1 ou un peptide mimant L1 (ASNKL, FASNKL, FASNKLGTAM) sont capables d'inhiber
15 le signal de répulsion induit par Séma3A et sont donc utiles comme médicament pour favoriser la régénération neuronale/axonale et traiter les maladies neurodégénératives (Demande Internationale WO 03/089470).

En outre, le brevet US 5 639 856 et les Demandes US 2003/0032070 et US 2004/0121948 suggèrent d'utiliser des fragments peptidiques de sémaphorines
20 représentant des antagonistes de récepteurs de sémaphorines ou bien des inhibiteurs de sémaphorine (anticorps ou antisens spécifiques), pour bloquer le signal de répulsion induit par le sémaphorines au niveau du cône de croissance des neurones, de façon à favoriser la régénération neuronale/axonale post-traumatique et traiter les maladies neurodégénératives.

25 Les inventeurs ont montré que les sémaphorines qui jouent un rôle dans le développement des réseaux neuronaux au cours du développement embryonnaire sont également capables de moduler la transmission synaptique chez l'adulte.

La mise en évidence de cette nouvelle propriété des sémaphorines,
30 liée à la liaison des sémaphorines à un récepteur synaptique, ouvre des perspectives très intéressantes pour le traitement des pathologies liées à un dérèglement de l'activité neuronale.

En conséquence, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une molécule sélectionnée dans le groupe constitué par une sémaphorine et un modulateur de sémaphorine, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées à un dérèglement de l'activité neuronale.

5 **Définitions**

- On entend par sémaphorine, une protéine de la famille des sémaphorines telle que définie ci-dessus, un dérivé fonctionnel, notamment un variant fonctionnel de ladite sémaphorine, ou bien un polynucléotide (ADN ou ARN) codant ladite sémaphorine ou ledit dérivé, de préférence inclus dans un vecteur d'expression
10 actif dans les cellules de mammifères.

- On entend par modulateur un activateur ou un inhibiteur.

- On entend par modulateur de sémaphorine un modulateur de l'expression et/ou de la fonction d'une sémaphorine.

- On entend par fonction d'une sémaphorine, la fonction modulatrice
15 (activatrice ou inhibitrice) de la transmission synaptique de ladite sémaphorine ; cette fonction résulte de la liaison de ladite sémaphorine à un récepteur synaptique et de la transduction d'un signal médié par ledit récepteur.

- On entend par dérivé fonctionnel de sémaphorine, une sémaphorine modifiée possédant la fonction modulatrice de la transmission
20 synaptique telle que définie ci-dessus.

- On entend par récepteur de sémaphorine aussi bien un récepteur qu'un co-récepteur de ladite sémaphorine, à savoir : toute molécule de la membrane plasmique d'une cellule de mammifère qui est : (i) exprimée dans la région synaptique des neurones, (ii) capable de lier une sémaphorine et de transduire le
25 signal résultant de cette liaison (récepteur au sens strict) ou de transduire le signal résultant de cette liaison (co-récepteur), et d'induire une modulation de la transmission synaptique, du fait de cette liaison.

L'effet de ladite sémaphorine ou dudit modulateur de sémaphorine sur la transmission synaptique peut être mesuré par les techniques classiques
30 d'électrophysiologie connues de l'Homme du métier comme par exemple : le *patch-clamp*, l'enregistrement extra-cellulaire ou l'utilisation de sondes sensibles au potentiel.

- On entend par pathologie liée à un dérèglement de l'activité neuronale, affectant notamment la neurotransmission, toute maladie génétique ou acquise caractérisée par un dérèglement de l'activité électrique des réseaux de neurones (baisse d'activité ou hyperactivité) telle que par exemple l'une des

5 pathologies précitées.

L'invention englobe l'utilisation de sémaphorines de n'importe quelle espèce (vertébré ou invertébré). Les séquences de sémaphorines de certaines espèces (séquences d'ADNc et séquences en acides aminés correspondantes) sont disponibles dans les bases de données de séquences, notamment dans GENBANK et

10 dans la base de données du NCBI.

Les séquences de sémaphorines d'autres espèces peuvent être déterminées par clonage de l'ADNc correspondant, à l'aide d'amorces choisies à partir des séquences connues, selon les techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'Homme du métier.

L'invention englobe également l'utilisation de dérivés de sémaphorine (sémaphorines modifiées), notamment de variants de sémaphorine correspondant à une protéine fonctionnelle telle que définie ci-dessus. Les modifications qui sont introduites dans ladite protéine par les techniques classiques connues de l'Homme du métier, incluent de façon non-limitative : mutation (insertion,

15 déletion, substitution) d'au moins un acide aminé dans la séquence de ladite sémaphorine (obtention de variants de sémaphorine), addition d'une séquence de fusion (obtention d'une protéine de fusion ou protéine chimérique), substitution de résidus d'acides aminés par des résidus d'acides aminés non-naturels (acides aminés D ou analogues d'acides aminés), modification de la liaison peptidique, cyclisation,

20 addition de groupements chimiques au niveau des chaînes latérales des acides aminés, couplage à une molécule d'intérêt, notamment une molécule permettant le passage de la barrière hémato-méningée ; ledit couplage est réalisé par l'intermédiaire d'une liaison non-covalente ou covalente telle qu'une liaison peptidique (obtention d'une sémaphorine chimérique). En outre, lorsque ladite sémaphorine correspond à une

25 protéine membranaire, elle peut avantageusement être tronquée, notamment par déletion du domaine transmembranaire, de façon à obtenir une protéine sécrétée. Ces modifications sont destinées en particulier à moduler (augmenter ou diminuer)

30

l'affinité ou la spécificité des sémaphorines pour un de leur récepteur, à augmenter la stabilité, la pénétration et la diffusion dans le tissu nerveux, ou à faciliter la purification desdites protéines.

Les vecteurs dans lesquels on peut insérer une séquence d'intérêt dans une cassette d'expression contenant les éléments régulateurs de transcription et de traduction appropriés (promoteur, activateur, intron, codon d'initiation (ATG), codon stop, signal de polyadénylation), afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote, sont connus de l'Homme du métier ; 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 la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte). On peut utiliser entre autres les acides nucléiques nus (ADN, ARN, linéaire ou circulaire), notamment les plasmides, et les vecteurs viraux tels que les adénovirus, notamment les adénovirus canins, les rétrovirus, les lentivirus, les herpesvirus, les AAV (Adeno-Associated-Virus), les poxvirus, et en particulier les canarypox, les rhabdovirus et le virus de l'encéphalite vénézuélienne. De préférence, on utilise des vecteurs possédant un tropisme naturel pour le tissu nerveux (herpesvirus, rhabdovirus, virus de l'encéphalite vénézuélienne) ou induit par la formation de pseudo-particules virales comprenant une protéine d'enveloppe d'un virus neurotrophe comme notamment la glycoprotéine du virus de la rage (lentivirus pseudotypé, par exemple).

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ladite sémaphorine est sécrétée ; de préférence il s'agit d'une sémaphorine de classe 3, comme par exemple Séma3A.

Parmi les modulateurs de sémaphorine, on peut citer les substances qui modulent la réponse des sémaphorines dans le guidage axonal, ainsi que les agonistes et les antagonistes de récepteur de sémaphorine.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit modulateur est sélectionné dans le groupe constitué par les nucléotides cycliques et le monoxyde d'azote.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit modulateur est un agoniste ou un antagoniste d'un récepteur de sémaphorine,

lequel récepteur étant sélectionné dans le groupe constitué par : les neuropilines, les plexines et les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM).

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, ledit modulateur est un agoniste ou un antagoniste d'un récepteur de sémaphorine, lequel récepteur étant exprimé dans la région synaptique des neurones.

Selon une disposition avantageuse de ces modes de réalisation, ledit récepteur est la neuropiline NP-1.

Un agoniste de récepteur de sémaphorine est défini dans la présente invention, par toute molécule capable de mimer l'effet de ladite sémaphorine sur un récepteur synaptique, c'est-à-dire une molécule capable de mimer la liaison de la sémaphorine audit récepteur synaptique et/ou d'induire la transduction du signal médié par ledit récepteur ou l'un de ses co-récepteurs.

Un antagoniste de récepteur de sémaphorine est défini dans la présente invention par, toute molécule capable d'inhiber/bloquer l'effet de ladite sémaphorine sur un récepteur synaptique, c'est-à-dire une molécule capable d'inhiber la liaison de la sémaphorine audit récepteur synaptique et/ou d'inhiber la transduction du signal médié par ledit récepteur ou l'un de ses co-récepteurs ; en outre l'inhibition de cette liaison peut être de nature compétitive (antagoniste se liant au récepteur) ou non-compétitive (antagoniste se liant à la sémaphorine).

Cette définition englobe les sémaphorines dans la mesure où les différentes sémaphorines jouent le rôle d'agonistes ou d'antagonistes, vis-à-vis des récepteurs NP-1 et NP-2 ; par exemple SémaA et SémaE sont des antagonistes du récepteur NP-1 et des agonistes du récepteur NP-2 (Takahashi et al., Nature Neuroscience, 1998, 1, 487-493).

Des molécules capables de mimer la liaison d'une sémaphorine à un récepteur synaptique sont notamment des fragments de sémaphorine incluant le site de liaison audit récepteur ou d'autres molécules, notamment des peptides mimant le site de liaison au récepteur de ladite sémaphorine (mimotope de sémaphorine).

Des molécules capables d'inhiber la liaison d'une sémaphorine à un récepteur synaptique sont notamment des fragments de ladite sémaphorine incluant le site de liaison audit récepteur ou des fragments de récepteur incluant le site de liaison à

ladite sémaphorine, ou bien d'autres molécules, notamment des peptides mimant, soit le site de liaison au récepteur de ladite sémaphorine (mimotope de la sémaphorine), soit le site de liaison à la sémaphorine du dit récepteur (mimotope du récepteur).

Parmi ces fragments, on peut citer notamment les peptides décrits
5 dans le Brevet US 5639856 et dans la Demande Internationale WO 03/089470.

D'autres mimotopes peuvent notamment être isolés, par criblage d'une banque de molécules, par un test de liaison à un anticorps dirigé contre ledit site de liaison de la sémaphorine (mimotope de sémaphorine) ou du récepteur de la sémaphorine (mimotope de récepteur).

10 En outre, d'autres agonistes ou antagonistes de récepteur de sémaphorine peuvent également être identifiés par un test fonctionnel permettant de mesurer la transmission synaptique, à l'aide d'une méthode connue de l'Homme du métier, comme précisé ci-dessus.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite
15 utilisation, ladite molécule est associée à au moins une substance permettant le franchissement de la barrière hémato-méningée. Parmi ces substances, on peut citer notamment des peptides membranaires, tels que les peptides Pep:TransTM (<http://www.syntem.com/english/techpeptrans.html>).

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de ladite
20 utilisation, ladite pathologie est caractérisée par un dérèglement de l'activité électrique des réseaux de neurones (baisse d'activité ou hyperactivité) et est sélectionnée dans le groupe constitué par : l'épilepsie, l'autisme, l'anxiété, l'angoisse, la dépression et les troubles bipolaires, le stress, l'hyperactivité, la schizophrénie, les troubles du sommeil, les troubles de la santé mentale, les troubles cognitifs, en particulier liés à
25 l'âge, les ataxies, et les pathologies affectant la neurotransmission, en particulier les maladies génétiques affectant un récepteur de neurotransmetteur.

Conformément à l'invention, ladite molécule (sémaphorine ou modulateur de sémaphorine) est sous la forme d'une composition comprenant un véhicule pharmaceutiquement acceptable, et/ou une substance porteuse.

30 Les véhicules pharmaceutiquement acceptables, les substances porteuses et les adjuvants sont ceux classiquement utilisés.

Les substances porteuses sont avantageusement sélectionnées dans le groupe constitué par : les liposomes unilamellaires ou multilamellaires, les ISCOMS, les virosomes, les pseudoparticules virales, les micelles de saponine, les microsphères solides de nature saccharidique (poly(lactide-co-glycolide)) ou aurifère, et les
5 nanoparticules.

Ladite composition se présente sous une forme galénique adaptée à une administration par voie parentérale (sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intra-péritonéale, intra-rachidienne), entérale (orale, sublinguale), ou locale (intracérébrale : intra-thécale ou intraventriculaire) ou par toute autre voie, et
10 éventuellement par voies multiples.

Elle peut être administrée en une ou plusieurs fois ou en libération continue (perfusion), notamment au moyen de micropompes osmotiques ou associés à tout moyen physique ou chimique, notamment à des agents encapsulants comme les systèmes de dispersion colloïdaux et les polymères, afin d'avoir une dose
15 thérapeutiquement efficace au site d'action (tissu nerveux).

Elle peut se présenter sous la forme de comprimés, simples ou dragéifiés, de gélules, de granules, de sirop, de suppositoires, de préparations injectables, de pommades, de crèmes, de gels, d'aérosol, lesquels sont préparés selon les méthodes usuelles. Dans ces formes galéniques, ladite molécule est incorporée à
20 des excipients habituellement employés dans des compositions pharmaceutiques, tels que le talc, la gomme arabique, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le beurre de cacao, les véhicules aqueux ou non, les corps gras d'origine animale ou végétale, les dérivés paraffiniques, les glycols, les divers agents mouillants, dispersants ou émulsifiants, les conservateurs.

25 Ladite molécule est destinée à être introduite *in vivo* dans les cellules-cibles (neurones), soit par diffusion passive, soit en utilisant des méthodes physiques telles que la microinjection, soit en l'associant à toute(s) substance(s) permettant le passage de la barrière hémato-méningée.

Elle peut notamment être administrée directement au niveau de son
30 site d'action (cerveau, moelle épinière). Alternativement, elle peut être administrée par voie parentérale, après avoir été préalablement intégrée dans un liposome ou une nanoparticule qui contient avantageusement un peptide permettant le franchissement

de la barrière hémato-méningée.

La posologie utile varie en fonction de l'affection à traiter, de la voie et du rythme d'administration, ainsi que de la nature et du poids de l'espèce à traiter (humaine ou animale).

5 La présente invention a également pour objet un procédé de criblage de molécules capables de moduler la transmission synaptique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- a) la mise en contact d'une banque de molécules à tester avec au moins un récepteur de sémaphorine, et
- 10 b) la sélection des molécules capables de moduler la transmission synaptique.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit récepteur est sélectionné dans le groupe constitué par les neuropilines, les plexines et les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM).

15 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, ledit récepteur est exprimé dans la région synaptique des neurones.

Selon une disposition avantageuse des modes de mise en œuvre précédents dudit procédé, ledit récepteur est la neuropiline NP-1.

20 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, il comprend, une étape de pré-sélection des molécules capables de se lier au(x)dit(s) récepteur(s), préalablement à l'étape b) de sélection.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre dudit procédé, l'étape b) est réalisée en compétition avec une sémaphorine sécrétée, de préférence de classe 3, de manière préférée de type 3A (Séma3A).

25 La banque de molécules est un ensemble de molécules apparentées par leur structure, leur origine ou leur fonction, notamment une banque combinatoire incluant des molécules qui diffèrent entre elles par le remplacement systématique ou aléatoire de leurs constituants élémentaires. Il s'agit par exemple d'une banque d'oligomères tels que des peptides, des oligonucléotides (aptamères) et des
30 oligosaccharides, d'une banque d'anticorps ou de fragments d'anticorps, ou bien d'une banque de molécules organiques autres que des oligomères, cycliques ou non-cycliques, notamment des petites molécules organiques, c'est-à-dire de masse

moléculaire inférieure à 2500 Da, de préférence inférieure à 2000 Da, de manière préférée inférieure à 1500 Da, de manière plus préférée inférieure à 1000 Da, de manière encore plus préférée inférieure à 750 Da.

Le criblage de la banque de molécules et l'identification des
5 molécules capables de se lier à la cible (sémaphorine ou récepteur de sémaphorine) sont réalisées par toute méthode connue de l'Homme du métier permettant la mesure de l'interaction entre deux partenaires (ELISA, transfert d'énergie par résonance (FRET), polarisation de fluorescence, résonance plasmonique de surface). Le criblage est réalisé à l'aide d'une cible ou d'un dérivé de la cible tel qu'un fragment
10 comprenant au moins le site d'intérêt, un mimotope, ou bien encore un anticorps anti-idiotypique représentant l'image interne dudit site d'intérêt de la cible. La dite cible et ses dérivés ou bien l'anticorps ou le fragment d'anticorps sont éventuellement, immobilisés sur un support approprié, et/ou marqués par tout moyen permettant l'obtention d'un signal mesurable, connus de l'Homme du métier. En outre, la
15 spécificité de la liaison peut être démontrée par un test de liaison en compétition, avec un ligand (sémaphorine/récepteur) marqué.

L'identification des molécules capables de moduler la transmission synaptique est réalisée par un test fonctionnel, à l'aide d'une méthode connue de l'Homme du métier, comme précisé ci-dessus ; il s'agit, notamment d'un test *in vitro*
20 ou *ex vivo*, dans un système cellulaire approprié (lignée cellulaire ou échantillon de tissu nerveux mis en culture (culture en tranche ou culture organotypique), ou bien *in vivo*, chez un organisme approprié. Les cellules en culture peuvent être immortalisées ou en culture primaire, adhérentes ou en suspension. L'organisme vivant peut être n'importe quel organisme de laboratoire ou d'étude (rongeurs, porcs, bovins, ovins...)
25 transgénique ou non-transgénique.

Parmi les systèmes cellulaires et les organismes appropriés, on peut citer notamment ceux qui sont des modèles d'un processus pathologique caractérisé par un dysfonctionnement de l'activité des réseaux neuronaux ou une anomalie de
décharge des neurones.

30 Les polynucléotides tels que définis dans l'invention sont obtenus par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.

AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). Par exemple, ils peuvent être obtenus par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR, par criblage de banques d'ADN génomique par hybridation avec une sonde homologue, ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

5 Les vecteurs recombinants sont construits et introduits dans des cellules hôtes par les méthodes classiques d'ADN recombinant et de génie génétique, qui sont connues en elles-mêmes.

Les protéines et dérivées (protéines de fusion ou protéine chimérique) sont produites à partir des ADNc correspondants, obtenus par tout moyen
10 connu de l'homme du métier ; l'ADNc est cloné dans un vecteur d'expression eucaryote ou procaryote et la protéine ou le fragment produits dans les cellules modifiées par le vecteur recombinant sont purifiés par tout moyen approprié, notamment par chromatographie d'affinité.

Les peptides peuvent être synthétisés en phase solide, selon la
15 technique Fmoc, originellement décrite par Merrifield et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 85: 2149-) et purifiés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à
20 des exemples de mise en œuvre de l'objet de la présente invention, avec référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 illustre la diminution de la transmission de l'excitation synaptique, induite par Séma3A. (A) Cinétique de variation de la pente du potentiel d'excitation post-synaptique (EPSP) après application de Séma3A dans le bain de
25 liquide céphalo-rachidien artificiel. Le graphique supérieur représente la superposition de deux courbes de potentiel d'excitation post-synaptique correspondant aux coupes d'hippocampe incubées en présence de surnageant contrôle (trait fin, étoile vide), ou 15 minutes après incubation en présence de surnageant contenant Séma3A (trait épais, étoile pleine). (B) Résumé des modifications normalisées de la pente d'EPSP, après
30 application de surnageant contrôle (CS), de surnageant Séma3A dilué 10 fois (Séma3A/10), de surnageant Séma3A dilué 5 fois (Séma3A/5), et de surnageant Séma3A ou LIFc, non-dilués. (C) La stimulation répétée (panneau supérieur) ou

prolongée (panneau inférieur) par Séma3A, induit une diminution de la transmission synaptique répétée (panneau supérieur) ou prolongée (panneau inférieur).

- la figure 2 illustre la mise en évidence de sites de liaison à la sémaphorine 3A, dans la région CA1 de l'hippocampe de l'adulte. Séma3A a été
5 incubée avec des coupes de cerveau et détectée dans la couche correspondant aux corps cellulaires et dans les régions correspondant aux dendrites apicales et distales des cellules pyramidales. L'organisation cellulaire du tissu a été visualisée par coloration au bisbenzimidazole. Echelle = panneaux de gauche (a, b, c, e, f, h, i) : 250 µm ; panneaux de droite (d, g, j) : 25 µm.

10 - la figure 3 illustre l'expression de NP-1 dans l'hippocampe de l'adulte et sa localisation pré-synaptique. (A-a) Hybridation *in situ* montrant que le transcrit NP-1 est détecté dans le *gyrus dentate*, et les régions CA1 et CA3. (A, b-d) Observations confocales d'expériences d'immunocytochimie sur des coupes de cerveau adulte, pour la détection, dans la région CA1, de la protéine NP-1 (b) et
15 d'un marqueur synaptique (synaptophysine (SYN) ; c et d (agrandissement d'une région de c)). Echelle = 10 µm. La colocalisation avec la synaptophysine indique que NP-1 est distribué dans le compartiment pré-synaptique. (B) Analyse du contenu en synaptophysine, PSD-95 et NP-1 d'extraits d'hippocampe adulte, de synaptosomes, de la fraction de densité non-post-synaptique (non-PSD pour *non-Post-Synaptic Density*)
20 et de plusieurs fractions de densité post-synaptique (PSDI, PSDII, PSDIII). Les immunoblots indiquent que le compartiment pré-synaptique est enrichi en NP-1 comme en synaptophysine. En revanche, NP-1 n'est pas présente dans les fractions PSD, contrairement au marqueur post-synaptique PSD-95 qui est présent en grande quantité dans ces fractions PSD.

25 - la figure 4 illustre l'expression de NP-1 dans des cultures de neurones différenciés de l'hippocampe. (A à C) Co-marquage de NP-1 avec NeuN (A), parvalbumine (B) et quantification des neurones doublement marqués (C) montrant qu'une proportion élevée de neurones incluant des neurones positifs pour la parvalbumine, expriment NP-1. (D-E) Double marquage de NP-1 avec le marqueur
30 somatodendritique MAP2 (D) et le marqueur axonal Tau (E), illustrant la distribution de NP-1 dans les deux types de compartiments neuritiques. La flèche en (D) illustre un neurite MAP2-/NP1+, en (E) un neurite Tau-/NP-1+. (F) NP-1 est exprimé dans

certains mais pas tous les prolongements des neurites primaires. Barre d'échelle (A-F) 10 μ m.

- la figure 5 illustre la présence de NP-1 au niveau des synapses de neurones de l'hippocampe en culture. (A-B) Co-marquage de NP-1 avec les marqueurs synaptiques dans des cultures de neurones de l'hippocampe différenciés *in vitro* (DIV). Le marquage de la synaptophysine (A) et du marqueur de la famille PSD-95 (B) montre que la synaptogénèse se produit dans des neurites exprimant NP-1 et que NP-1 est localisée au niveau des synapses. La flèche en B montre l'apposition des fluorescences du marqueur de la famille PSD-95 et de NP-1. Barre d'échelle : 10 μ m.

10 - la figure 6 illustre l'induction de la phosphorylation de Erk, par Séma3A, dans les neurones différenciés de l'hippocampe. (A-B) Immunomarquage de pErk1/2 montrant une augmentation de la fluorescence de pErk dans le corps cellulaire et les neurites de cultures de neurones traitées par Séma3A, par comparaison avec le contrôle (A) et l'analyse quantitative du marquage (B). * $p > 0,01$ (test de Student). Barres d'échelle : 10 μ m.

- la figure 7 illustre l'effet du traitement par Séma3A sur le marquage du marqueur synaptique synaptophysine. (A) Microphotographies de neurofilaments et marquage de la synaptophysine dans des neurones de l'hippocampe à DIV15, traités par Séma3A ou non-traités, illustrant la diminution de la fluorescence de la synaptophysine induite par Séma3A. La fluorescence totale et la surface moyenne de chaque point sont réduits, comme déterminé par l'analyse quantitative de la fluorescence (B). * $p > 0,01$ (test de Student). Barres d'échelle : 5 μ m.

- la figure 8 représente un modèle du mécanisme de diminution de la transmission synaptique induit par Séma3A. **A** : Séma3A agit sur les axones en développement et induit une rétraction des filopodes et des lamellipodes formant le cône de croissance. Cette rétraction qui est initiée par la liaison de Séma3A avec NP-1, conduit à un effondrement du cône de croissance. **B** : Dans la région CA1 de l'hippocampe, chez l'adulte, le récepteur NP-1 de Séma3A est exprimé au niveau de la membrane pré-synaptique. Séma3A qui pourrait être sécrétée par les afférences entorhinales, se lie à la protéine NP-1 du complexe moléculaire formant le récepteur et active le récepteur. Cette activation induit une réponse de rétraction morphologique de la synapse, semblable à celle de la rétraction du cône de croissance se produisant lors

du guidage axonal. Cet effondrement diminue la transmission synaptique en augmentant la taille de l'espace intersynaptique.

Exemple 1 : L'application de sémaphorine exogène diminue la transmission synaptique

5 1) Matériels et méthodes

a) Electrophysiologie

Des coupes d'hippocampe (400 μm) ont été préparées à partir de souris âgées de six à huit semaines. Les coupes ont été réalisées dans une solution (280 mM sucrose, 26mM NaHCO_3 , 10 mM D-glucose, 1,3 mM KCl, 1mM CaCl_2 ,
10 10 mM MgCl_2) et maintenues pendant une heure à température ambiante, dans un liquide céphalo-rachidien artificiel (ACSF) oxygéné (95 % O_2 / 5 % CO_2 ; ACSF : 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,8 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 3mM CaCl_2 , X mM D-glucose).

Chaque coupe a été transférée dans une chambre d'enregistrement
15 contenant du liquide céphalo-rachidien artificiel oxygéné comme ci-dessus et maintenue à 34°C. Les neurones ont été visualisés par vidéomicroscopie infrarouge (DIC pour *Differential Interference Contrast*). Toutes les expériences ont été réalisées en présence de picrotoxine (100 μM SIGMA), un antagoniste du récepteur au GABA de type A. La région CA1 a été séparée de la région CA3 par section au couteau de la
20 coupe d'hippocampe avant la mesure, de façon à éviter une activité épileptiforme. Les potentiels d'excitation post-synaptique (EPSP) des champs extracellulaires ont été enregistrés dans le *stratum radiatum*, à l'aide de microélectrodes de mesure en verre, remplies de NaCl 3M. Les électrodes de stimulation en verre, remplies de tampon salin extracellulaire, ont été placées dans le *stratum radiatum*. Les stimuli (durée de
25 0,1 à 0,15 mS) de 0,1 à 3mA ont été délivrés à une fréquence de 0,3 Hz pour les mesures de la transmission synaptique basale. Toutes les drogues ont été appliquées dans le bain de liquide céphalo-rachidien artificiel. Les signaux analogues ont été filtrés à 3 kHz et l'acquisition des séquences de 400 ms a été réalisée à un rythme de
30 moyenne $\pm$ écart type, ont été analysés à l'aide du test de Mann-Whitney.

b) Production de sémaphorine et de L1Fc

Des cellules COS7 ont été transfectées de façon transitoire par un vecteur recombinant d'expression de la Séma3A fusionnée à une étiquette myc, à l'aide de lipofectamineTM, comme décrit dans Castellani et al., Neuron, 2000, 27, 237-247. Trois jours plus tard, le surnageant cellulaire a été récolté et dialysé pendant 3 jours, contre du liquide céphalo-rachidien artificiel. Le surnageant contenant L1Fc a été obtenu de façon similaire, à partir de cellules sécrétant L1Fc, transfectées de façon stable (Castellani et al., précité). Le surnageant contrôle est constitué par du surnageant de cellules non-transfectées, dialysé avec du liquide céphalo-rachidien artificiel.

2) Résultats

L'effet des sémaphorines sur la transmission synaptique a été étudié dans l'hippocampe avec la sémaphorine 3A (Séma3A). Les potentiels d'excitation post-synaptiques des champs extracellulaires (EPSP) évoqués par la stimulation des collatérales de Schaffer ont été enregistrés dans la région CA1 de fines coupes d'hippocampe de souris âgées de 6 à 8 semaines. L'application de Séma3A exogène dans le bain, diminue de façon significative la pente de la courbe d'EPSP à 80 % $\pm$ 9 % de celle du groupe contrôle (n = 5 coupes, test de Mann-Whitney, p<0,001, figure 1A). La diminution de la transmission synaptique est dose dépendante, étant donné que l'application de Séma3A diluée d'un facteur 5 induit une réduction plus faible mais néanmoins significative, de la transmission synaptique (91 % $\pm$ 7 %, n = 3 coupes, p<0,05 ; figure 1B). Aucun abaissement du niveau de transmission n'est induit par l'application de Séma3A diluée d'un facteur 10 (103 $\pm$ 6 %, n = 3 coupes, p>0,1, figure 1B).

De plus, l'application de surnageant contrôle, obtenu dans des conditions similaires, mais dépourvu de Séma3A, n'a aucun effet significatif sur la pente de la courbe d'EPSP (97 % $\pm$ 5 %, n = 5 coupes, p>0,1, figure 1B). Cette diminution de la transmission synaptique, induite par Séma3A n'est pas associée à une réduction de la volée pré-synaptique (100 $\pm$ 1 %, n = 3, p>0,1), indiquant que Séma3A n'a pas d'effet sur l'excitabilité des axones pré-synaptiques. De plus, l'abaissement du niveau de transmission synaptique induit par Séma3A n'est pas

associé à une augmentation significative du rapport de l'amplitude des réponses à une stimulation couplée ($104 \pm 7 \%$, $n = 5$, $p > 0,1$), suggérant que Séma3A n'agit pas en réduisant la probabilité de libération du neurotransmetteur.

La diminution de la transmission synaptique est liée de façon étroite à la présence de Séma3A dans le cerveau. Ainsi, l'application répétitive ou prolongée de Séma3A, induit une diminution de la transmission synaptique répétitive ou prolongée (figure 1C).

En revanche, l'application dans le bain des coupes d'hippocampe, d'une forme soluble de la molécule d'adhésion cellulaire de la superfamille des immunoglobulines L1 (L1Fc) qui stimule efficacement la pousse des neurites, n'a pas d'effet sur la transmission synaptique ($107 \pm 11 \%$, $n = 3$ coupes, $p > 0,5$, figure 1B) dans un intervalle de temps comparable à celui de Séma3A.

Exemple 2 : Analyse des sites de liaison à la Séma3A de l'hippocampe adulte

1) Matériels et méthodes

Les surnageants des cellules transfectées ou non de l'exemple 1 ont été utilisés pour localiser les sites de liaison à la Sémaphorine 3A de l'hippocampe adulte, par immunomarquage. De manière plus précise, des coupes sagittales de cerveau de souris ($30 \mu\text{m}$) ont été préparées à l'aide d'un vibratome. Les molécules de Séma3A-myc ont été pré-agrégées avec des immunoglobulines anti-c myc ($50 \mu\text{g/ml}$, hybridome 9E10, SIGMA), pendant 1 heure, puis incubées pendant 1 heure avec des coupes en suspension. L'immunodétection a été réalisée à l'aide d'un anticorps secondaire marqué au rouge Texas. Après des lavages en PBS, les coupes ont été contre-colorées avec du bisbenzimidé ($1 : 10000$), pendant 5 minutes, puis montées avant l'observation.

2) Résultats

La distribution des sites de liaison à la Sémaphorine 3A de l'hippocampe adulte, a été analysée par incubation de coupes sagittales de cerveau avec une protéine Séma3A recombinante marquée par un épitope myc. Les molécules de Séma3A ont été pré-agrégées avec des anticorps anti-myc avant l'incubation avec les coupes de cerveau. Dans ces conditions, la liaison de Séma3A est visualisée par un marquage dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe, ainsi que dans le *stratum granulosum* et le *dentate gyrus*. Dans la région CA1, le marquage est distribué dans la

couche de cellules pyramidales et dans la région apicale des dendrites, où les collatérales de Schaffer se terminent (Figure 2). Ainsi, des sites de liaison de Séma3A existent à un moment et à une localisation appropriée pour médier les changements dans la transmission synaptique, qui sont induits par l'application de Séma3A.

5 **Exemple 3 : NP-1 est localisé dans le compartiment pré-synaptique**

1) Matériels et méthodes

a) Hybridation *in situ*

La sonde d'ARN antisens complémentaire du transcrit NP-1 a été marquée à l'une de ses extrémités, à l'aide du système de transcription *in vitro* pour sonde à ARN (*Riboprobe In vitro Transcription Systems* ; PROMEGA) et du mélange pour marquage de l'ARN à la Digoxygénine (*DIG-RNA Labelling Mix* ; ROCHE). Les photos ont été prises avec un appareil photographique (DX 30 CCD ; KAPPA), à l'aide du logiciel fourni par le fabricant (KAPPA).

b) Immunohistochimie

15 Les tissus fixés ont été coupés (30 µm d'épaisseur) à l'aide d'un vibratome. Les coupes ont été incubées dans du PBS 0,1 M, pH 7,4, additionné de 20 % de sérum de veau fœtal, puis elles ont été incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire : anticorps polyclonal de lapin anti-NP-1 (1 : 1000) ; anticorps monoclonal de souris anti-synaptophysine (1 : 100, ROCHE) ; anticorps monoclonal de rat (IgG) anti-L1 de souris (1 : 100 ; R&D SYSTEMS), anticorps monoclonal de souris (IgG) anti-PSD-95 (1 : 100, ABR). Après des lavages, les coupes ont été incubées avec un anticorps de chèvre anti-immunoglobuline de lapin, couplé à la fluorescéine (NP-1) ou un anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé au rouge Texas (synaptophysine ou PSD-95) ou anti-IgG de rat couplé au rouge Texas (L1), dilué au 1 : 400 (JACKSON IMMUNORESEARCH). Les images confocales ont été obtenues à l'aide d'un microscope (Axiovert 135M, ZEISS) muni d'un objectif à immersion (63x) et d'un système d'imagerie pour confocale à enregistrement laser (LSM 410, ZEISS).

c) Fractionnement post-synaptique de densité et immuno-empreintes (immunoblots)

30 Les fractions de densité post-synaptique (PSD pour *Post-Synaptic Density*) de l'hippocampe de souris ont été préparées comme décrit dans Cho et al., Neuron, 1992, 9, 929. Brièvement, des extraits d'hippocampe de souris ont été centrifugés pour éliminer les noyaux et les débris tissulaires, le surnageant a ensuite

été centrifugé à 10 000 g, de façon à obtenir un culot brut de membranes (P2). Une fraction enrichie en synaptosomes a été préparée par centrifugation en gradient discontinu de saccharose du culot P2 remis en suspension. Pour extraire la fraction PSDI, les synaptosomes ont été dilués dans 0,5 % de Triton X-100.

5 Les fractions PSD II et III ont été remises en suspension et centrifugées respectivement dans du Triton X-100 (0,5 %) ou du Sarcosyle (6 %). Les échantillons ont été mélangés dans du tampon de migration contenant du SDS et des quantités égales de protéines ont été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (7,5 %) contenant du SDS (SDS-PAGE), puis elles ont été transférées
10 sur une membrane de nitrocellulose. L'immunoréactivité a été révélée avec un système de chimioluminescence. Les anticorps suivants ont été utilisés : anticorps monoclonal de souris (IgG) anti-GluR2 (1 : 100, CHEMICON INC.), anticorps monoclonal de souris (IgG) anti-synaptophysine (1 : 1000, ROCHE PRODUCTS), anticorps monoclonal de souris (IgG) anti-PSD95 (1 : 1000, AFFINITY BIO
15 REAGENTS) et anticorps polyclonal de lapin anti-NP-1 (1 : 1000).

2) Résultats

La localisation cellulaire des sites de liaison à Séma3A a été analysée en se concentrant sur NP-1. Dans un premier temps, l'expression de NP-1 et de Séma3A dans l'hippocampe de souris adulte, a été étudiée par hybridation *in situ*.
20 Le transcrit NP-1 est détecté dans les régions CA1 et CA3 et dans le *gyrus dentate* du cerveau adulte (figure 3). Le transcrit Séma3A est produit de façon abondante dans le *gyrus dentate* mais est absent dans les régions CA1 et CA3. La détection immunocytochimique de NP-1 révèle un profil d'expression ressemblant à celui des sites de liaison à la sémaphorine 3A, comme le *stratum pyramidale* et le *stratum*
25 *radiatum* de la région CA1. La distribution de la protéine NP-1 a été analysée en même temps que celle du marqueur synaptique synaptophysine dans une expérience de double-marquage en immunofluorescence. Les analyses confocales montrent que l'expression de NP-1 est sous la forme de points et co-localise avec le marquage de la synaptophysine dans la région CA1. Ces observations indiquent que NP-1 est un
30 constituant des synapses de l'hippocampe (Figure 3). La localisation sub-cellulaire de NP-1 dans les compartiments synaptiques a été examinée plus en détail, par double marquage de NP-1 et du marqueur post-synaptique PSD-95. L'imagerie confocale

montre que les marquages de NP-1 et de PSD-95 ne co-localisent pas mais sont étroitement apposées, indiquant que NP-1 possède une localisation pré-synaptique. L'expression synaptique de NP-1 et sa localisation pré-synaptique ont été confirmées à partir des fractions synaptosomales et PSD (*Post-Synaptic Density*), séparées par centrifugation en gradient de saccharose et extraction par le triton/sarcosyle. Les préparations ont été contrôlées par détection de marqueurs pré- et post-synaptiques, en immunoblot. Le marqueur pré-synaptique synaptophysine est détecté uniquement dans la fraction synaptosomale mais pas dans la fraction PSD. En revanche, le marqueur post-synaptique sous-unité Glu R2 du récepteur au glutamate de type AMPA, est détecté uniquement dans la fraction PSD (figure 3). Les résultats confirment ceux du double-marquage avec la synaptophysine, et démontrent la présence de NP-1 dans la fraction synaptosomale mais pas dans la fraction PSD, indiquant que NP-1 possède une localisation pré-synaptique (Figure 3). Ces profils d'expression sont compatibles avec un rôle de NP1/Séma3A au niveau des synapses, ayant des répercussions sur les neurones de la région CA1 (Figure8).

Exemple 4 : Expression et localisation de la neuropiline 1 (NP-1) au cours de la différenciation des neurones de l'hippocampe.

1) Matériels et méthodes

Les hippocampes de souris nouveaux-nés ont été prélevés et dissociés. Les neurones ont été cultivés *in vitro* sur des supports recouverts de poly-lysine, dans du milieu DMEM/F12 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fetal et du B27, pendant 1 à 21 jours (DIV).

Les neurones ont ensuite été fixés avec une solution de paraformaldéhyde (PFA 4%). Dans certaines expériences, la fixation à la PFA a été précédée d'un traitement d'une durée de 20 minutes avec du surnageant contenant Sema3A (1nM), préparé comme décrit à l'exemple 1. La détection des différents marqueurs a été réalisée par immunocytochimie avec les anticorps spécifiques suivants : anti-MAP2 (CHEMICON, 1/200), anti-NeuN (CHEMICON, 1/200), anti-synaptophysine (SIGMA, 1/100), anti-famille PSD (clone K28/86.2, 1/150), anti parvalbumine (SIGMA, 1/400), anti-NF200Kd (SIGMA, 1/400), anti-Tau (SIGMA, 1/100). Deux anticorps anti-NP1 ont été utilisés : un anticorps polyclonal de lapin (α 36, 1/1000) et un anticorps monoclonal de chèvre (R α D, 1/100).

La spécificité du marquage a été contrôlée pour chaque anticorps, par incubation en présence de l'anticorps secondaire mais en l'absence de l'anticorps primaire. Les cellules ont été perméabilisées avec du Triton X-100 (0,3 %), pendant 15 minutes. Pour l'analyse quantitative, les cellules ont été préparées pour la détection immunocytochimique de la synaptophysine et visualisées au microscope (Axiovert 200 M, ZEISS). Les images ont été enregistrées dans des conditions d'exposition identiques et exportées dans les logiciels Adobe photoshopTM (Adobe systems Inc) et NIH image. Pour l'analyse de la surface et de la longueur des points de synaptophysine, les images ont été traitées à un seuil de 48.

10 2) Résultats

NP1 est exprimée dans les neurones de l'hippocampe, depuis les stades précoces jusqu'aux stades très différenciés, comme illustré par l'immunomarquage de la protéine NP-1 au 21^{ème} jour de différenciation *in vitro* (DIV 21, figure 4A, 4E). Le double marquage de NP-1 et du marqueur nucléaire pan-neuronal NeuN, indique que 83 % des neurones de l'hippocampe expriment NP-1. En outre, 80 % de neurones exprimant la parvalbumine expriment également NP-1 à un niveau élevé (Figure 4A, 4C). Toutefois, le marquage de NP-1 a aussi été détecté dans des neurones n'exprimant pas la parvalbumine, indiquant que l'expression de NP-1 n'est pas restreinte à cette population d'interneurones.

20 Au niveau subcellulaire, la protéine NP-1 est répartie à la fois le long des axones et des dendrites, comme visualisé par le co-marquage avec les marqueurs axonaux et somatodendritiques Tau et MAP2 (Figures 4D, 4E). Toutefois, quelques dendrites et prolongements axonaux négatifs ont été observés, indiquant que NP-1 est adressée vers la majorité mais non la totalité des compartiments neuritiques des neurones de l'hippocampe. En particulier, NP-1 est souvent absente dans des prolongements complexes des arborescences dendritiques ou des axones. La présence de NP-1 au niveau des synapses a été examinée dans des cultures de neurones d'hippocampe à DIV15, par double-immunomarquage de NP1 et des marqueurs pré-et post-synaptiques, synaptophysine (Syn) et famille PSD-95. De façon intéressante, un niveau d'expression élevé de NP1 est observé dans les neurites qui forment des synapses et le marquage est renforcé au niveau des points de synaptophysine, indiquant que NP-1, même s'il n'est pas exclusivement adressé vers les synapses, est

certainement présent dans ce compartiment (Figure 5A). Des expériences d'immunomarquage avec un second marqueur des vésicules synaptiques, SV2 montrent un profil similaire de localisation de NP-1. NP-1 est également présente dans de nombreuses mais pas dans la totalité des synapses visualisées avec un marqueur de la famille PSD-95. On observe des zones d'apposition entre les fluorescences de NP-1 et de PSD-95 (figure 5B). Ces résultats indiquent que NP-1 est présente au niveau des synapses formées par des neurones différenciés en culture.

Exemple 5 : Séma3A induit l'activation de la MAPK Erk dans les neurones différenciés de l'hippocampe

1) Matériels et méthodes

La détection immunocytochimique des marqueurs est réalisée comme décrit à l'exemple 4. La pErk est détectée à l'aide d'un anticorps spécifique (anti-phospho Erk $\frac{1}{2}$, SANTACRUZ, 1/100). Pour l'analyse du marquage de la pErk, un champ a été sélectionné au hasard dans le contrôle (neurones non-traités) et un seuil a été fixé pour éteindre la fluorescence des corps cellulaires ou des neurites. Les corps cellulaires et les neurones avec des neurites qui restent fluorescents dans le contrôle, ont ensuite été comptés dans des champs sélectionnés au hasard. La quantification de la fluorescence des cellules traitées par Séma3A a été quantifiée dans des conditions similaires, après application du seuil.

2) Résultats

Des études récentes des cascades de signalisations induites par Séma3A, pendant le guidage des axones, ont mis en évidence le rôle déterminant de la kinase régulée par un signal extracellulaire, Erk, de la sous-famille MAPK, dans l'effondrement du cône de croissance induite par Séma3A (Campbell et Holt, Neuron, 2003, 37, 939-952 ; Bagnard et al., Mol. Cell. Neurosci., 2004, 25, 722-731). De façon intéressante, Erk est apparue comme un effecteur majeur du remodelage structural et fonctionnel à la base de la plasticité cellulaire (Goldin et Segal, Eur. J. Neurosci., 2003, 17, 2529-2539). La réponse des neurones adultes à Séma3A a été étudiée par l'analyse de l'effet de Séma3A sur l'activation de la MAPK Erk dans des neurones différenciés. Dans les cultures de neurones de l'hippocampe au stade DIV15, le traitement par Séma3A induit la phosphorylation de Erk1/2 ; le marquage n'est pas limité aux corps cellulaires mais est aussi détecté dans les compartiments neuritiques

(Figure 6A). L'analyse quantitative de la fluorescence indique que le traitement par Séma3A induit une augmentation d'un facteur 2,7, de la population de neurones positifs pour pErk, par rapport au contrôle (Figure 6B, 141 neurones de deux cultures indépendantes par condition, $p < 0,005$). De plus, après l'application de Séma3A, la

5 proportion de neurones avec des neurites pErk positifs, passe de 8 % à 72 % (Figure 6B, 113 neurones de deux cultures indépendantes par condition, $p < 0,001$). L'activation de la MAPK Erk induite par Séma3A suggère que les propriétés fonctionnelles de ce facteur sont conservées dans les neurones en développement et les neurones matures. Du fait de la localisation subcellulaire de NP-1 au niveau des

10 synapses de l'hippocampe, il peut être envisagé que la diminution de la transmission synaptique induite par Séma3A serait due à une rétraction morphologique de la membrane pré-synaptique, semblable à l'effondrement du cône de croissance provoqué par ce facteur sur les axones en croissance. Pour vérifier cette hypothèse, une double-immunodétection du marqueur axonal NF200 et de la synaptophysine a

15 été effectuée sur des cultures de neurones de l'hippocampe au stade DIV15, traitées ou non par Séma3A, puis la taille des points de synaptophysine a été mesurée. De façon surprenante, cette analyse révèle que Séma3A induit une réduction de 30% de la surface totale couverte par la fluorescence de la synaptophysine (Figure 7A,B). En comparaison, aucune modification du marquage de NF200 n'est observée entre les

20 cellules traitées et non-traitées. Des mesures de la fluorescence de chaque point indique une réduction statistiquement significative de la surface moyenne des points, indiquant une rétractation de l'élément pré-synaptique (Total de 1001 points de deux cultures indépendantes, $p < 0,01$).

REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'un modulateur de sémaphorine, pour la préparation d'un médicament apte à moduler la transmission synaptique, destiné au traitement des pathologies liées à un dérèglement de l'activité électrique des neurones.

5 2°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit modulateur est un agoniste ou un antagoniste d'un récepteur de sémaphorine.

3°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit agoniste ou antagoniste est une sémaphorine.

10 4°) Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que ladite sémaphorine est une sémaphorine sécrétée.

5°) Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que ladite sémaphorine sécrétée est de classe 3.

6°) Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite sémaphorine de classe 3 est Séma3A.

15 7°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit modulateur est un agoniste ou un antagoniste d'un récepteur de sémaphorine, lequel récepteur étant sélectionné dans le groupe constitué par : les neuropilines, les plexines et les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines (IgCAM).

20 8°) Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit modulateur est un agoniste ou un antagoniste d'un récepteur de sémaphorine, lequel récepteur étant exprimé dans la région synaptique des neurones.

9°) Utilisation selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisée en ce que ledit récepteur est la neuropiline NP-1.

25 10°) Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit modulateur est sélectionné dans le groupe constitué par les nucléotides cycliques et le monoxyde d'azote.

11°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite molécule est associée à une substance permettant le franchissement de la barrière hémato-méningée.

30 12°) Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que ladite pathologie est caractérisée par un dérèglement de l'activité électrique des réseaux de neurones et est sélectionnée dans le groupe

constitué par : l'épilepsie, l'autisme, l'anxiété, l'angoisse, la dépression et les troubles bipolaires, le stress, l'hyperactivité, la schizophrénie, les troubles du sommeil, les troubles de la santé mentale, les troubles de la mémoire, les troubles cognitifs, en particulier liés à l'âge, les ataxies, et les pathologies affectant la neurotransmission, en
5 particulier les maladies génétiques affectant un récepteur de neurotransmetteur.

13°) Procédé de criblage de molécules capables de moduler la transmission synaptique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

a) la mise en contact d'une banque de molécules à tester, avec au
10 moins un récepteur de sémaphorine, et

b) la sélection des molécules capables de moduler la transmission synaptique.

14°) Procédé de criblage selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit récepteur est sélectionné dans le groupe constitué par les neuropilines, les
15 plexines et les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines.

15°) Procédé de criblage selon la revendication 13, caractérisé en ce que ledit récepteur est exprimé dans la région pré-synaptique des neurones.

16°) Procédé de criblage selon la revendication 14 ou la revendication 15, caractérisé en ce que ledit récepteur est la neuropiline NP-1.

20 17°) Procédé de criblage selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de pré-sélection des molécules capables de se lier au(x)dit(s) récepteur(s), préalablement à l'étape b) de sélection.

18°) Procédé de criblage selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite étape de pré-sélection est réalisée en compétition avec une sémaphorine
25 sécrétée, de préférence de classe 3, de manière préférée Séma3A.

1/8

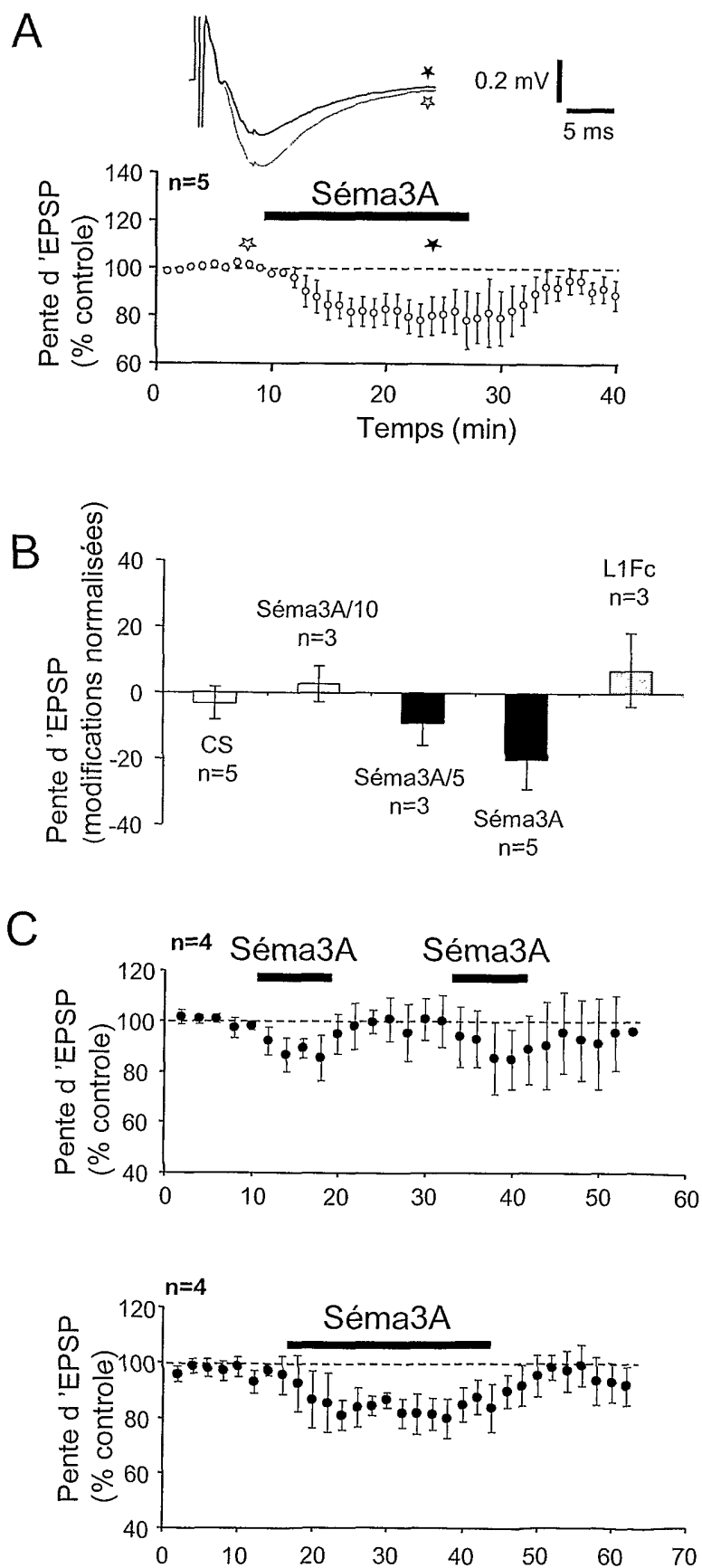


Figure 1

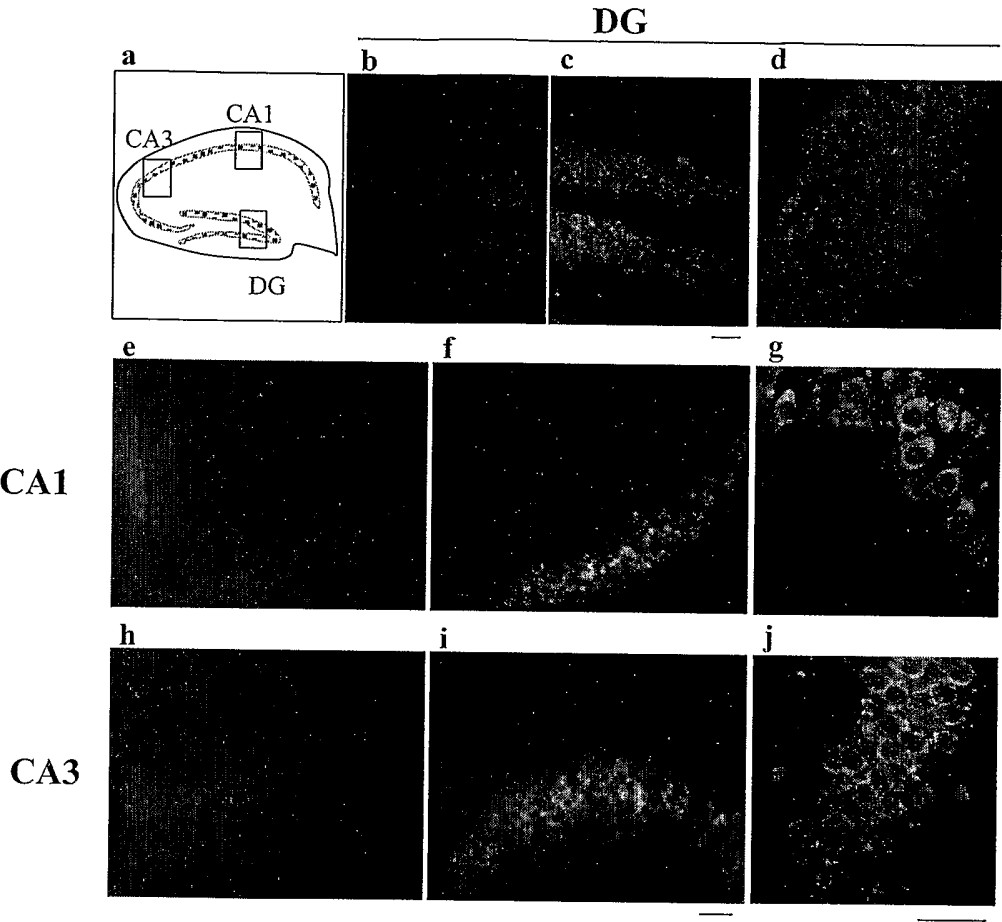
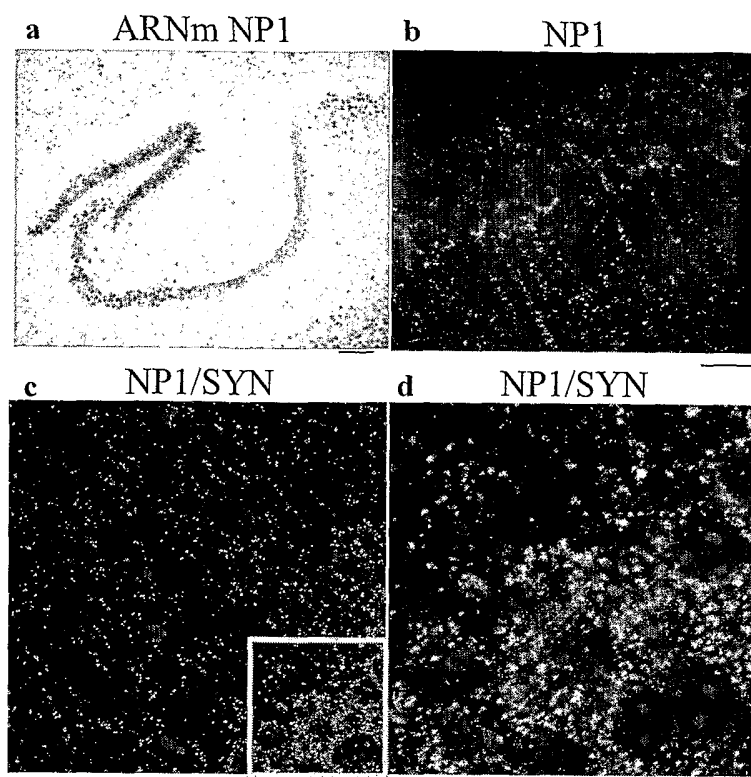
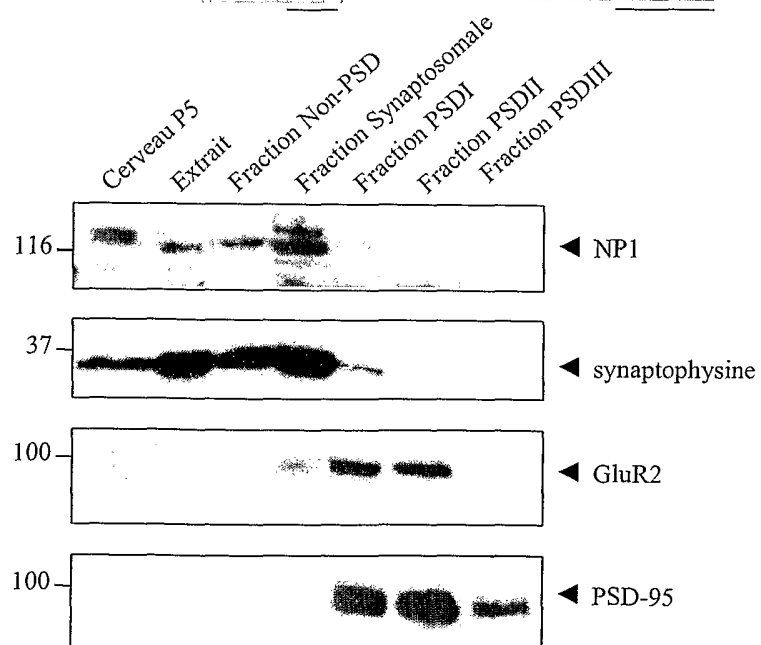


Figure 2

3/8

A**B****Figure 3**

4/8

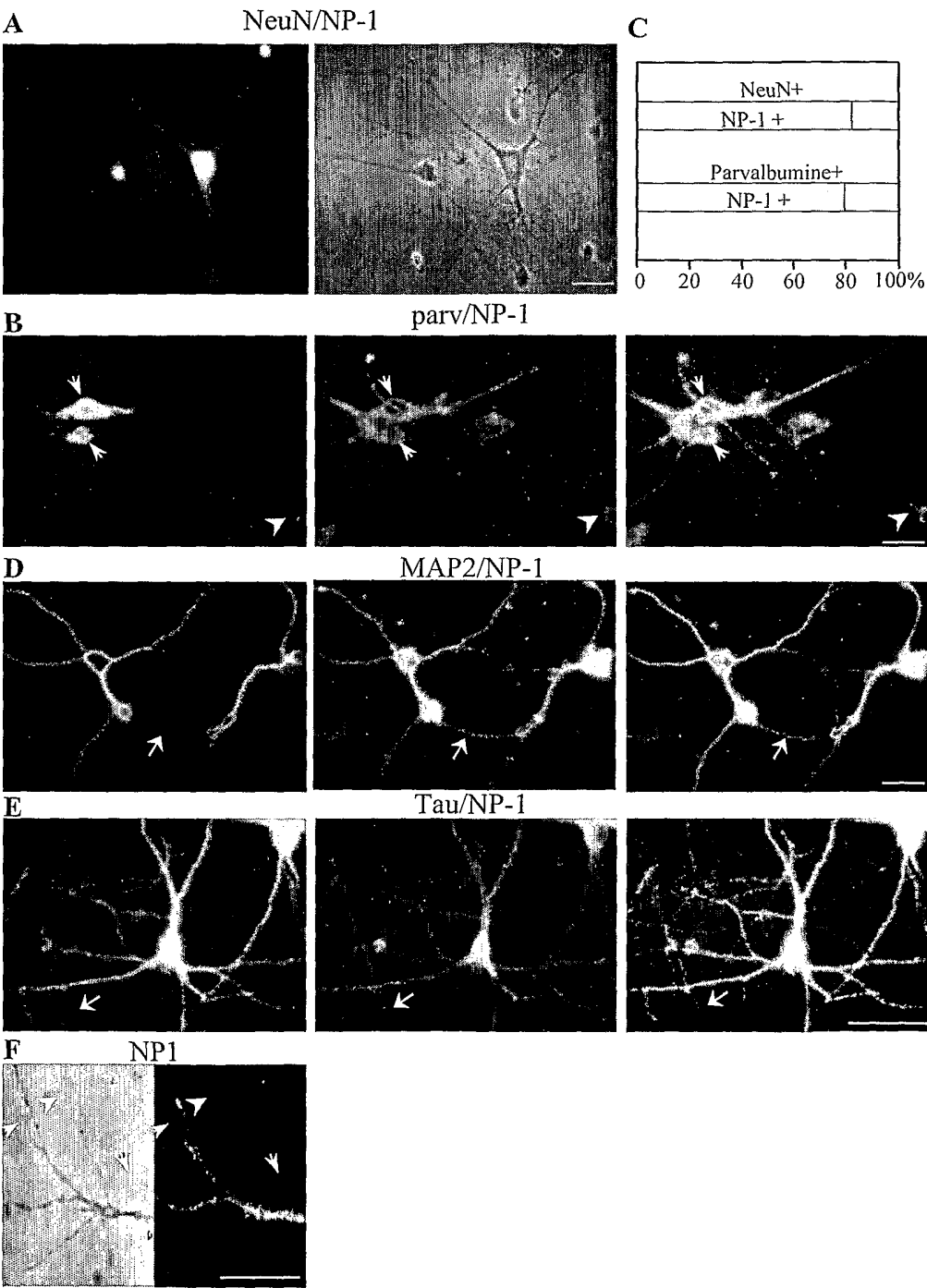


Figure 4

5/8

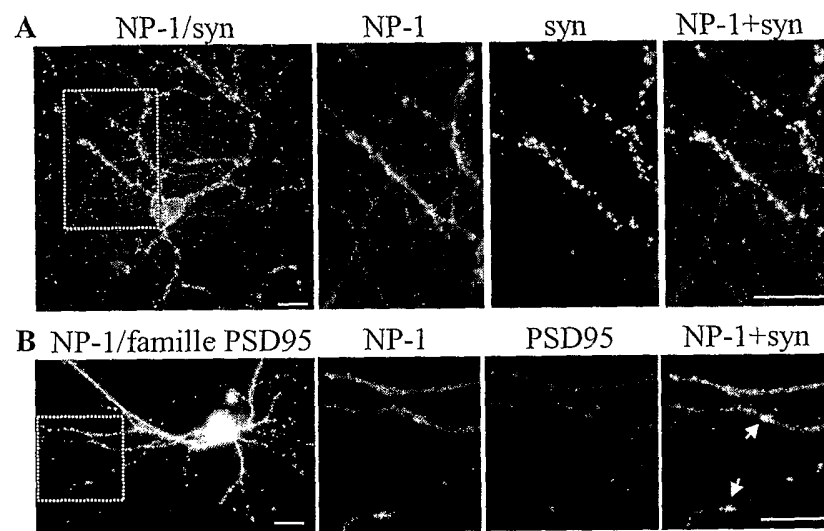


Figure 5

6/8

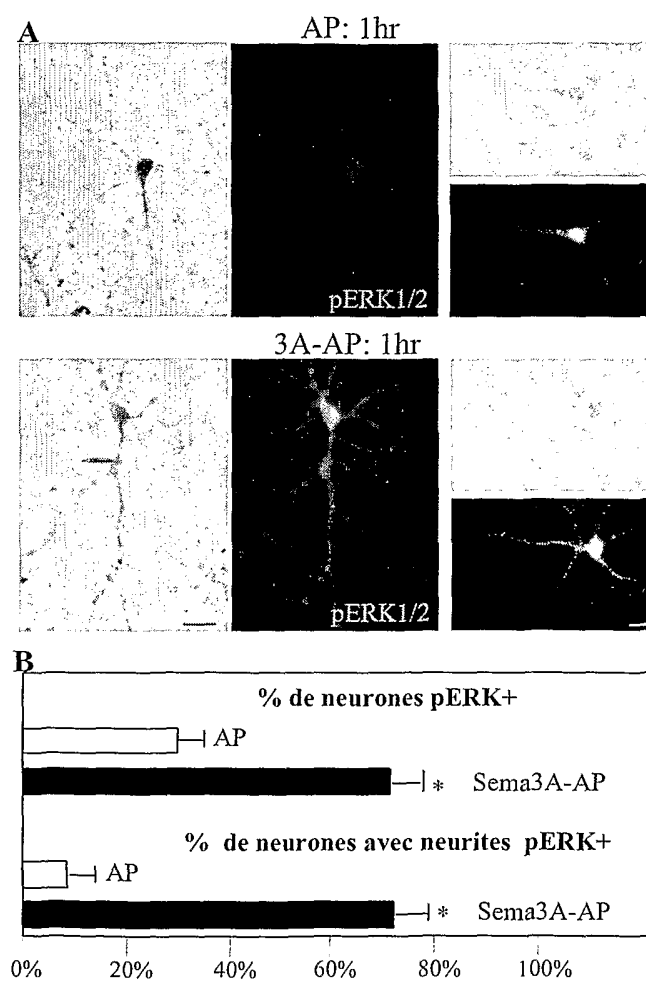
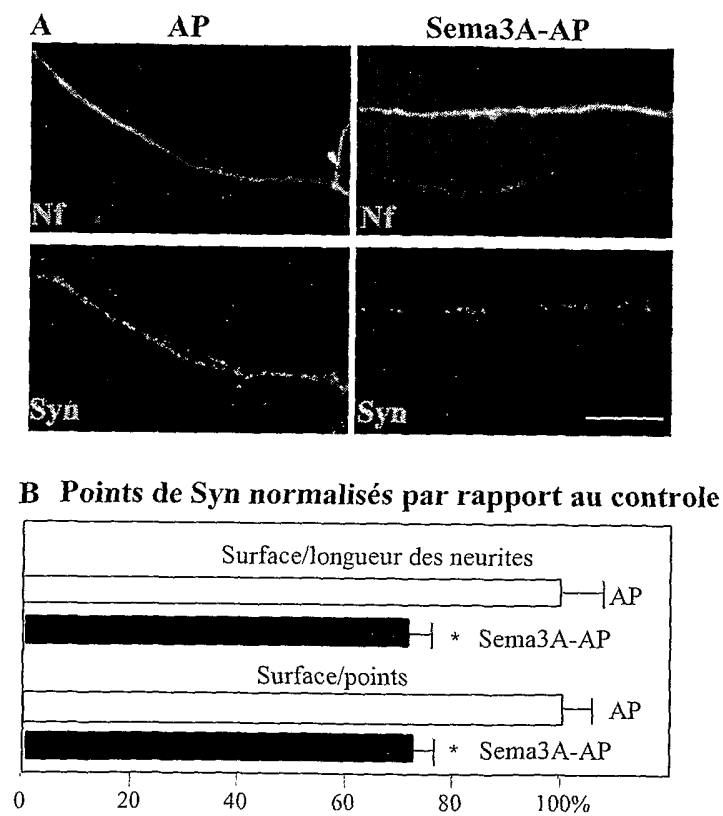


Figure 6

7/8

**Figure 7**

8/8

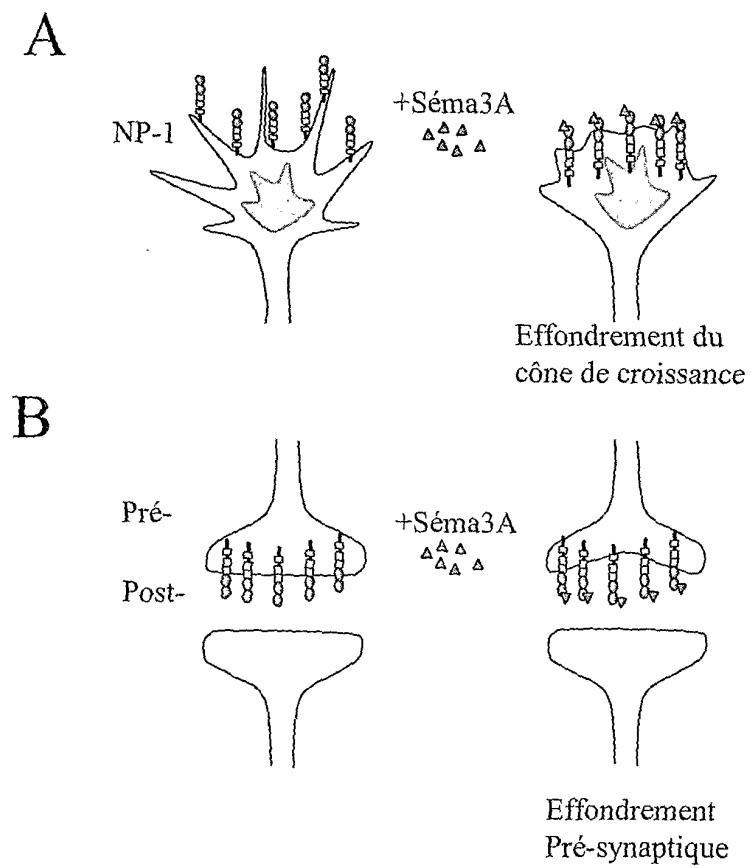


Figure 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/002641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K31/04 A61K31/522 G01N33/68 A61K38/17		
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		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, 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	US 2003/032070 A1 (GOOD PAUL F ET AL) 13 February 2003 (2003-02-13) paragraphs '0004!, '0033! -----	1-9, 12
X	US 2004/121948 A1 (BOYLE BRYAN J ET AL) 24 June 2004 (2004-06-24) paragraphs '0009!, '0021!, '0022!, '0205! -----	1-4, 7-9, 12
X	US 5 639 856 A (GOODMAN ET AL) 17 June 1997 (1997-06-17) cited in the application columns 1-2 ----- -/--	1-4, 7-9
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 January 2006		Date of mailing of the international search report 03/02/2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Durrenberger, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2005/002641

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/089470 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ; UNIVERSITE DE LA MEDITE) 30 October 2003 (2003-10-30) cited in the application page 1, lines 4-11 page 7, lines 9-29 -----	1,2,7-9
A	CASTELLANI V ET AL: "Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 21, no. 23, 2 December 2002 (2002-12-02), pages 6348-6357, XP002331702 ISSN: 0261-4189 the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2005/002641

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003032070 A1	13-02-2003	US 2005266504 A1	01-12-2005
US 2004121948 A1	24-06-2004	NONE	
US 5639856 A	17-06-1997	AT 214286 T	15-03-2002
		AU 683494 B2	13-11-1997
		AU 7724094 A	03-04-1995
		CA 2171638 A1	23-03-1995
		DE 69430130 D1	18-04-2002
		DE 69430130 T2	22-08-2002
		DK 721342 T3	15-07-2002
		EP 0721342 A1	17-07-1996
		ES 2173922 T3	01-11-2002
		JP 3544378 B2	21-07-2004
		JP 9505725 T	10-06-1997
		PT 721342 T	30-09-2002
		WO 9507706 A1	23-03-1995
		US 6013781 A	11-01-2000
		US 5807826 A	15-09-1998
WO 03089470 A	30-10-2003	AU 2003230144 A1	03-11-2003
		CA 2492655 A1	30-10-2003
		CN 1656119 A	17-08-2005
		EP 1354892 A1	22-10-2003

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/002641

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

A61K31/04 A61K31/522 G01N33/68 A61K38/17

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

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 réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, EMBASE, MEDLINE, 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	US 2003/032070 A1 (GOOD PAUL F ET AL) 13 février 2003 (2003-02-13) alinéas '0004!, '0033! -----	1-9, 12
X	US 2004/121948 A1 (BOYLE BRYAN J ET AL) 24 juin 2004 (2004-06-24) alinéas '0009!, '0021!, '0022!, '0205! -----	1-4, 7-9, 12
X	US 5 639 856 A (GOODMAN ET AL) 17 juin 1997 (1997-06-17) cité dans la demande colonnes 1-2 ----- -/-	1-4, 7-9

☒ 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

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 janvier 2006

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

03/02/2006

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, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Durrenberger, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2005/002641

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 03/089470 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ; UNIVERSITE DE LA MEDITE) 30 octobre 2003 (2003-10-30) cité dans la demande page 1, ligne 4-11 page 7, ligne 9-29	1,2,7-9
A	----- CASTELLANI V ET AL: "Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A." EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 21, no. 23, 2 décembre 2002 (2002-12-02), pages 6348-6357, XP002331702 ISSN: 0261-4189 le document en entier -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2005/002641

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003032070 A1	13-02-2003	US 2005266504 A1	01-12-2005
US 2004121948 A1	24-06-2004	AUCUN	
US 5639856 A	17-06-1997	AT 214286 T	15-03-2002
		AU 683494 B2	13-11-1997
		AU 7724094 A	03-04-1995
		CA 2171638 A1	23-03-1995
		DE 69430130 D1	18-04-2002
		DE 69430130 T2	22-08-2002
		DK 721342 T3	15-07-2002
		EP 0721342 A1	17-07-1996
		ES 2173922 T3	01-11-2002
		JP 3544378 B2	21-07-2004
		JP 9505725 T	10-06-1997
		PT 721342 T	30-09-2002
		WO 9507706 A1	23-03-1995
		US 6013781 A	11-01-2000
		US 5807826 A	15-09-1998
WO 03089470 A	30-10-2003	AU 2003230144 A1	03-11-2003
		CA 2492655 A1	30-10-2003
		CN 1656119 A	17-08-2005
		EP 1354892 A1	22-10-2003