

(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
31 décembre 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/000877 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/145

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

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/001913

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

(22) Date de dépôt international : 20 juin 2003 (20.06.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

02/07620 20 juin 2002 (20.06.2002) FR

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

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Cedex
16 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **TUFFER-
EAU, Marie-Christine** [FR/FR]; 35 avenue Jean Moulin,
F-75014 Paris (FR). **LANGÉVIN, Christelle** [FR/FR]; 4
Impasse du fond du Guichet, F-91400 Orsay (FR). **BENE-
JEAN, Jacqueline** [FR/FR]; 8 rue Maurice Ravel, F-91380
Chilly Mazarin (FR). **SISSOEFF, Ludmilla** [FR/FR]; 2
Square de la Poterne, F-91300 Massy (FR).

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

*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: PEPTIDES DERIVED FROM THE RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN G, LIGANDS OF THE LOW-AFFINITY RE-
CEPTOR OF NEUROTROPHINS (P75^{NTR}) AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : PEPTIDES ISSUS DE LA GLYCOPROTEINE G DU VIRUS DE LA RAGE, LIGANDS DU RECEPTEUR DE BASSE
AFFINITE DES NEUROTROPHINES (P75^{NTR}) ET LEURS APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to peptides derived from the rabies virus protein G, ligands of the low-affinity receptor of neu-
rotrophins (p75^{NTR}) and the applications thereof as a vector for the targeted transport of molecules of interest in cells expressing said
receptor, used in the treatment of genetic or acquired diseases involving a dysfunction of said cells, particularly neurodegenerative
diseases such as Parkinson's disease or Alzheimer's disease. Said peptides include at least one fragment comprising amino acid
residues 318 to 352 of the mature glycoprotein G of rabies virus.

(57) Abrégé : Peptides issus de la protéine G du virus de la rage, ligands du récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR})
et leurs applications comme vecteur pour le transport ciblé de molécules d'intérêt dans des cellules exprimant ce récepteur, utiles
pour le traitement des maladies génétiques ou acquises, impliquant un dysfonctionnement de ces cellules, notamment les maladies
neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer. Ces peptides incluent au moins un fragment
constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage.



WO 2004/000877 A2

**PEPTIDES ISSUS DE LA GLYCOPROTEINE G DU VIRUS DE LA RAGE,
LIGANDS DU RECEPTEUR DE BASSE AFFINITE DES NEUROTROPHINES
(P75^{NTR}) ET LEURS APPLICATIONS**

La présente invention est relative à des peptides issus de la glycoprotéine G du virus de la rage, ligands du récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}) et à leurs applications comme vecteur pour le transport ciblé de molécules d'intérêt dans des cellules exprimant ce récepteur, utile pour le traitement des maladies génétiques ou acquises, impliquant un dysfonctionnement de ces cellules, notamment les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer.

Le virus de la rage (RV) est un virus neurotrope responsable d'une encéphalomyélite mortelle chez l'homme et les mammifères domestiques et sauvages, transmis généralement par la morsure d'un animal infecté présentant des signes cliniques de la maladie.

Ce virus est un *Lyssavirus* (famille des *Rhabdoviridae*) ; il est classé dans le génotype 1 (GT1), les génotypes GT2 à GT7 correspondant respectivement au virus Lagos Bat (LB), Mokola (Mok), Duvenhague (Duv) et aux *Lyssavirus* de chauve-souris d'origine européenne (EBL de types 1 et 2) ou australienne (ABL).

Les *Lyssavirus* sont des virus enveloppés comprenant une unique glycoprotéine (G), associée en trimères, sous forme de spicules formant des protrusions à la surface de l'enveloppe lipidique.

La glycoprotéine G a trois fonctions majeures : (i) du fait de son interaction avec des récepteurs cellulaires, elle permet la fixation du virus aux cellules et est le déterminant majeur du neurotropisme des *Lyssavirus*, (ii) elle induit une immunité protectrice, humorale (anticorps neutralisants) et cellulaire, et (iii) elle permet la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, par un processus dépendant du pH.

La glycoprotéine G du virus de la rage (RVG) est une protéine transmembranaire de type I de 505 acides aminés comprenant un domaine externe de 439 acides aminés, un domaine transmembranaire de 22 acides aminés et un domaine C-terminal de 44 acides aminés. Trois sites potentiels de N-glycosylation ont été loca-

lisés : le premier situé au niveau de l'acide aminé en position 32 est glycosylé de façon très inefficace, le second en position 204 ou 247 est glycosylé uniquement dans certaines souches et le troisième, situé en position 319 est toujours glycosylé. Le repliement, le transport intracellulaire et l'oligomérisation ont été analysés pour les
5 souches Pasteur et ERA et il a été montré que la glycoprotéine G acquiert une organisation trimérique au niveau du réticulum endoplasmique. Un peptide de fusion potentiel a été localisé dans la région correspondant aux résidus d'acides aminés des positions 102 à 179.

La structure antigénique de la glycoprotéine G a été caractérisée de
10 façon extensive à l'aide d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette glycoprotéine. Environ 50 mutants de la glycoprotéine G résistants à la neutralisation par le virus de la rage (souche CVS) ont été isolés et classés en sites antigéniques indépendants en fonction de leur mutation et de leur réactivité avec les anticorps monoclonaux anti-G.

Deux sites conformationnels immunodominants (site II et site III),
15 deux sites mineurs (site a et épitope linéaire) et plusieurs autres épitopes ont été localisés dans le domaine externe de la glycoprotéine G :

- le site II est un site antigénique majeur, reconnu par 70 % des anticorps monoclonaux ; il est constitué par les résidus d'acides aminés correspondant aux positions 34 à 42 et 184 à 210, reliés par un pont disulfure entre les cystéines en position 35 et 207,
20

- le site III est un site conformationnel constitué par les résidus des positions 330 à 340 ; il joue un rôle essentiel dans la propagation et le pouvoir pathogène du virus : (i) la mutation du résidu Arg333 conduit à une perte de virulence pour les animaux adultes, le mutant Arg333 est capable d'infecter des neurones périphériques, mais se propage uniquement dans un nombre limité de catégories de neurones du système nerveux central et (ii) la mutation du résidu Lys330 abolit la pénétration du virus dans les neurones sensoriels et moteurs, après une infection par voie intramusculaire,
25

- le site a est constitué par les résidus des positions 342 et 343 et
30 l'épitope linéaire est constitué par les résidus correspondants aux positions 251 à 264.

La glycoprotéine G du virus de la rage adopte au moins deux conformations, dénommées N (neutre) et I (inactive pour la fusion). La glycoprotéine G en conformation I n'est plus reconnue par les anticorps monoclonaux du site II, mais le virus peut être neutralisé par des anticorps monoclonaux qui ne reconnaissent pas le virus lorsque la protéine est en conformation N. Cette propriété a été utilisée pour isoler des mutants résistants à la neutralisation induite en conditions acides ; les mutations correspondantes ont été localisées dans la région N-terminale de la glycoprotéine (entre les résidus correspondant aux positions 10 à 15) et à d'autres positions contrôlant le changement de conformation (positions 44, 282, 392 et 396).

À l'exception des étapes très précoces et finales de l'infection, au cours desquelles ils se multiplient dans des tissus non-neuronaux (glandes salivaires par exemple), les *Lyssavirus* se multiplient et se propagent exclusivement à l'intérieur des neurones. Le virus pénètre directement au niveau des terminaisons nerveuses du site d'inoculation ou après une multiplication limitée dans les myotubes ; il est ensuite transporté le long des axones, dans les corps cellulaires des neurones moteurs et sensoriels où il se réplique. Le bourgeonnement viral a lieu essentiellement dans les compartiments internes des neurones infectés et le virus est transporté au niveau des synapses par l'intermédiaire de vésicules.

Différents récepteurs potentiels du virus de la rage et de sa glycoprotéine G ont été proposés : des phospholipides (Perrin et al., *Annales Virologie*, 1982, 133, 403-422 ; Rupprecht et al., *Curr. Topics in Microbiol. And Immunol.*, 1994, 187, 1-339 ; Superti et al., *Archives of Virol.*, 1984, 81, 321-328), des gangliosides (Superti et al., *J. Gen. Virol.*, 1986, 67, 47-56) et des protéines spécifiques des neurones, incluant le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (Lentz et al., *Science*, 1984, 226, 847-848 ; *Brain Research*, 1986, 1, 211-219), la molécule d'adhésion des cellules neurales (NCAM, Thoulouze et al., *J. Virol.*, 72, 7181-7190) et le récepteur de basse affinité des neurotrophines p75^{NTR} (Tuffereau et al. *EMBO Journal*, 1998, 17, 7250-7259).

La p75^{NTR} est une glycoprotéine de type I de la superfamille des récepteurs du TNF, comprenant un domaine externe (ectodomaine) incluant quatre domaines riches en cystéine (CRD pour *Cystein Rich Domain*), impliqués dans la

liaison du ligand et la dimérisation du récepteur, une tige riche en sérine et thréonine qui est très glycosylée, ainsi qu'un domaine intracellulaire incluant un signal de mort cellulaire, potentiellement impliqué dans l'apoptose (Chao et al., *J. Neurol.*, 1994, 25, 1373-1385). La p75^{NTR} est exprimée dans de nombreux tissus neuronaux et non-
5 neuronaux chez le sujet jeune. Chez l'adulte, son expression est plus limitée ; elle est détectée dans plusieurs catégories de neurones, principalement au niveau des synapses, ainsi que dans d'autres tissus tels que le muscle, l'oreille interne, les testicules et les glandes sous-maxillaires.

La p75^{NTR} lie le NGF (*Nerve Growth Factor*) et d'autres neuro-
10 trophines, telles que le BDNF (*Brain-Derived Nerve Factor*) et les neurotrophines NT-3 et NT-4/5. Le domaine de liaison au récepteur des neurotrophines n'a pas été identifié de façon précise ; il a été montré que quelques acides aminés basiques sont indispensables, suggérant l'existence d'interactions ioniques entre les neurotrophines, chargées positivement, et le domaine externe, riche en résidus cystéine. L'hétéropolymère
15 formé par la liaison des neurotrophines au récepteur p75^{NTR} peut éventuellement s'associer avec une protéine de la famille Trk (TrkA, B ou C, en fonction du ligand) pour former un site de haute affinité pour les neurotrophines ; le complexe p75^{NTR}-NGF-TrkA est internalisé dans des vésicules et transporté de façon rétrograde au niveau des corps cellulaires des neurones (Lalli G. et al., *J. Cell Biol.*, 2002, 156, 2,
20 233-239).

Poursuivant leurs travaux, les Inventeurs ont maintenant identifié des fragments peptidiques de la glycoprotéine G du virus de la rage, capables de se lier spécifiquement au récepteur p75^{NTR}. Ces peptides, ligands du récepteur p75^{NTR} représentent des vecteurs capables d'adresser (ou cibler) et d'internaliser (par endocytose)
25 des molécules d'intérêt, de façon efficace, et spécifique dans des cellules exprimant ce récepteur, en particulier dans les neurones.

La présente invention a pour objet un peptide capable de se lier spécifiquement au récepteur p75^{NTR}, caractérisé en ce qu'il comprend entre 35 et 101 acides aminés et inclut au moins le fragment correspondant aux positions 318 à 352 de
30 la glycoprotéine G mature du virus de la rage, lesdites positions étant identiques pour toutes les souches du virus de la rage.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide, il est constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit peptide (peptide P1) correspond aux positions 318-352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage et présente la séquence suivante :

FNKTX₁MEADAHYX₂X₃X₄X₅X₆WX₇EX₈LPSX₉X₁₀CLX₁₁X₁₂GX₁₃RCH, (SEQ ID NO:1), dans laquelle : X₁ représente L ou I, X₂ représente K, T ou N, X₃ représente S ou P, X₄ représente V ou I, X₅ représente R, Q, M, L, I, S, K, G ou E, X₆ représente T ou E, X₇ représente N, I, T ou E, X₈ représente I ou L, X₉ représente K, T ou N, X₁₀ représente G ou E, X₁₁ : R ou E, X₁₂ : A ou V et X₁₃ représente G ou E.

De manière préférée, ledit peptide P1 présente la séquence SEQ ID NO:2 : FNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPSKGCLRVGGRCH.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit peptide (peptide P2), il correspond aux positions 291-391 de la glycoprotéine G du virus de la rage et présente la séquence suivante :

MTTKSVSFRRLSHLRKLVPGF GKAYTIFNKT X₁MEADAHYX₂X₃X₄X₅X₆WX₇EX₈LPSX₉X₁₀CLX₁₁X₁₂GX₁₃RCHPY₁VNGVFFNGY₂ILGY₃DY₄Y₅VLIPEMQSSLL (SEQ ID NO:31), dans laquelle : Y₁ représente H ou P, Y₂ représente I ou L, Y₃ représente P ou S, Y₄ représente G ou D et Y₅ représente N ou H.

De manière préférée, ledit peptide P2 présente la séquence SEQ ID NO :32 :

MTTKSVSFRRLSHLRKLVPGF GKAYTIFNKT LMEADAHYKSVRTWNEILPSKGC LRVGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLL.

La présente invention a également pour objet un peptide chimère, caractérisé en ce qu'il comprend, à son extrémité N-terminale, un peptide tel que défini ci-dessus, et à son extrémité C-terminale, un motif de trimérisation.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit peptide chimère, il comprend en outre, entre l'extrémité C-terminale dudit peptide et l'extrémité N-terminale dudit motif de trimérisation, un fragment de liaison comprenant entre 1 et 10 aminoacides, de préférence, un fragment comprenant au moins 8 glycines.

De manière avantageuse, du fait de leur capacité de liaison avec p75^{NTR}, lesdits peptides permettent un adressage spécifique aux cellules neuronales ainsi qu'une internalisation de molécules d'intérêt dans les cellules neuronales, notamment pour le traitement de maladies neurodégénératives.

5 En effet, ces peptides se lient de manière spécifique au récepteur de basse affinité du NGF (p75^{NTR}) et plus particulièrement au premier domaine riche en cystéines (CRD1) dudit récepteur, alors que les neurotrophines se fixent sur les deuxième et troisième domaines riches en cystéines (CRD2 et 3).

De manière surprenante, le peptide P1 selon l'invention présente
10 effectivement des propriétés d'adressage et d'internalisation dans les cellules neuronales, alors que ce n'est pas le cas pour le peptide correspondant strictement au site III (positions 330-340) ; en effet, le fragment 318-329 de la glycoprotéine mature du virus de la rage, à l'extrémité N-terminale et notamment la présence d'une phénylalanine à l'extrémité N-terminale (correspondant à la position 318 de la glycoprotéine mature)
15 et le fragment 341-352 de la glycoprotéine du virus de la rage mature, à l'extrémité C-terminale et notamment la présence d'une histidine en position C-terminale, dans le peptide selon l'invention sont nécessaires pour obtenir l'activité recherchée.

Il en est de même pour le peptide P2, qui comprend également le fragment 318-352.

20 De manière plus précise, le mécanisme d'action des peptides selon l'invention peut être considéré comme le suivant :

- ciblage de la molécule d'intérêt à des cellules particulières, par l'intermédiaire de sa liaison au peptide selon l'invention ; cette liaison est de préférence (mais non exclusivement) covalente et s'effectue par l'intermédiaire d'un linker
25 clivable, qui après clivage, libérera la molécule d'intérêt dans la cellule ; ledit linker contient avantageusement un pont S-S qui sera réduit, un ester qui sera clivé dans les compartiments acides de la cellule ou un glycane.

- internalisation du complexe peptide selon l'invention + molécule d'intérêt dans des vésicules d'endocytose et

30 - libération de la molécule d'intérêt directement au niveau de son site d'action.

De manière avantageuse, dans le cadre de l'invention, un peptide de fusion n'est pas nécessaire.

Les peptides selon l'invention peuvent être obtenus, de manière avantageuse soit par synthèse chimique, soit par expression dans des systèmes
5 d'expression classique (bactéries, baculovirus recombinants, levures...) et purification à l'aide d'anticorps anti-G dirigés contre l'un des sites antigéniques contenus dans le dit peptide.

La présente invention a également pour objet une protéine chimère, caractérisée en ce qu'elle comprend à son extrémité N-terminale, l'ectodomaine de la
10 glycoprotéine G du virus de la rage correspondant aux positions 1-432 ou aux positions 1-439 de ladite glycoprotéine G, lequel ectodomaine inclut le peptide correspondant aux positions 318-352, et à son extrémité C-terminale, un motif de trimérisation.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite protéine chimère,
15 elle comprend en outre, entre l'extrémité C-terminale de l'ectodomaine de la glycoprotéine G du virus de la rage et l'extrémité N-terminale du motif de trimérisation, un fragment de liaison comprenant entre 1 et 10 aminoacides, de préférence, un fragment comprenant au moins 8 glycines.

Conformément à l'invention, ledit motif de trimérisation correspond
20 au domaine de 27 acides aminés provenant de la fibratine du bactériophage T4 et présente la séquence suivante :

G-Y-I-P-E-A-P-R-D-G-Q-A-Y-V-R-K-D-G-E-W-V-F-L-S-T-F-L. (SEQ ID NO: 16)
(Fib-foldon).

De manière surprenante, aussi bien le peptide chimère que la
25 protéine chimère selon l'invention interagissent de manière stable avec p75 ; en particulier, la protéine chimère forme des trimères plus stables que l'ectodomaine de la glycoprotéine G du virus de la rage (fragment 1-432 ou fragment 1-439) ; en effet, l'ectodomaine de la glycoprotéine G forme des trimères (à concentration élevée) qui se dissocient sous forme de monomères quand la concentration diminue.

30 La présente invention a également pour objet une molécule complexe, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide ou une protéine chimère,

tels que définis ci-dessus, associé, de manière covalente ou non, à une molécule d'intérêt, apte à traiter une maladie neurodégénérative.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule complexe, ledit peptide ou ladite protéine chimère et ladite molécule d'intérêt sont liés
5 de manière covalente par l'intermédiaire d'un lieu convenable.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, ledit lieu est clivable dans la cellule et comprend soit un pont S-S, soit un ester, soit un glycane.

Le peptide ou la protéine chimère selon l'invention est associé à la
10 molécule d'intérêt par toute méthode connue :

- lorsqu'il s'agit de peptides, l'association est réalisée par liaison peptidique ;

- lorsque la molécule d'intérêt n'est pas un peptide, l'association est réalisée à l'aide de systèmes de couplage ;

- 15 - des associations non covalentes sont également possibles.

La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour un peptide ou une protéine chimère, tels que définis ci-dessus.

Selon un mode de réalisation de ladite molécule d'acide nucléique,
20 elle code pour le peptide P1 tel que défini ci-dessus (peptide issu de la glycoprotéine G du virus de la rage).

Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation ladite molécule d'acide nucléique présente la séquence suivante : ttc aac aaa acc R₁ atg gaa
gct gat gct cac tac R₂ R₃ R₄ R₅ R₆ tgg R₇ gag R₈ atc ccc tca R₉ R₁₀ tgt ctg R₁₁ R₁₂ gga
25 R₁₃ agg tgt cat,

dans laquelle : R₁ représente un codon L ou un codon I, R₂ représente un codon K, un codon T ou un codon N, R₃ représente un codon S ou un codon P, R₄ représente un codon V ou un codon I, R₅ représente un codon R, un codon, Q, un codon M, un codon L, un codon I, un codon S, un codon K, un codon G ou un codon E, R₆ représente un
30 codon T ou un codon E, R₇ représente un codon N, un codon I, un codon T ou un codon E, R₈ représente un codon I ou un codon L, R₉ représente un codon K, un codon

T ou un codon N, R₁₀ représente un codon G ou un codon E, R₁₁ représente un codon R ou un codon E, R₁₂ représente un codon A ou un codon V et R₁₃ représente un codon G ou un codon E.

De manière préférée, ladite molécule d'acide nucléique présente la
5 séquence suivante :

ttc aac aaa acc ctg atg gaa gct gat gct cac tac aag tca gtc cgg acc tgg
aat gag atc atc ccc tca aag ggg tgt ctg aga gtt gga ggg agg tgt cat (SEQ ID NO:3)

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'acide nucléique, elle code pour le peptide P2 tel que défini ci-dessus.

10 Les différentes molécules d'acides nucléiques selon l'invention codant pour les fragments 318-352, 291-391 et 1-439 de la glycoprotéine G peuvent notamment être retrouvées à partir des bases de données de séquences et notamment à partir des numéros d'accès suivants : J02293 (souche ERA), CAD44953 et AJ506997.1 (souche CVS), U11748, U03764 ou U11758 (souche Ontario).

15 Elles incluent les variants de ces différentes molécules d'acides nucléiques qui codent pour un fragment ayant les mêmes propriétés que celles exposées ci-dessus.

La présente invention a également pour objet des vecteurs contenant une molécule d'acide nucléique codant pour un peptide ou une protéine chimère, tels
20 que définis ci-dessus et des cellules hôtes (bactéries, virus et notamment baculovirus et levures, notamment) comprenant ces vecteurs.

De tels vecteurs, convenablement sélectionnés, sont utiles comme vecteurs de thérapie génique.

La présente invention a également pour objet une composition
25 pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend essentiellement (i) un produit sélectionné dans le groupe constitué par une molécule complexe telle que définie ci-dessus, une molécule d'acide nucléique nue telle que définie ci-dessus ou un vecteur tel que défini ci-dessus, ladite molécule d'acide nucléique ou ledit vecteur étant associés à une molécule d'intérêt et (ii) au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
30

La présente invention a également pour objet un outil de criblage spécifique de molécules modulant la liaison entre la glycoprotéine G du virus de la rage et le récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}) spécifique des cellules neuronales, caractérisé en ce qu'il comprend :

- 5 - des cellules exprimant un peptide selon l'invention comprenant au moins le fragment correspondant aux résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage et notamment les peptides P1 ou P2 selon l'invention, tels que définis ci-dessus, un peptide chimère tel que défini ci-dessus ou une protéine chimère telle que définie ci-dessus (élément de liaison 1) ; et
- 10 - des cellules exprimant le récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}), de préférence, uniquement le CRD1 dudit récepteur (élément de liaison 2).

Selon un mode de réalisation avantageux dudit outil de criblage, lesdites cellules expriment un peptide sélectionné dans le groupe constitué par le
15 peptide P1 constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage, le peptide P2 constitué par les résidus d'acides aminés 291-391 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage et une protéine chimère, telle que définie ci-dessus.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit outil de
20 criblage, il comprend des cellules exprimant le peptide P1 constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage tel que défini ci-dessus.

En variante, au moins l'un des deux éléments de liaison est sous une forme soluble.

25 Par exemple :

- la forme soluble du peptide est constituée notamment par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage, obtenue de préférence par synthèse.
- la forme soluble du récepteur de basse affinité des neurotrophines
30 (p75^{NTR}) est constituée d'au moins le fragment CRD1 et d'au plus l'ectodomaine du récepteur p75 fusionné à un fragment Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine.

La présente invention a en outre pour objet une méthode de sélection de ligands spécifiques du récepteur p75, caractérisée en ce qu'elle comprend essentiellement :

- la mise en contact d'un outil de criblage tel que défini ci-dessus,
- 5 dans un milieu approprié avec un ligand potentiel marqué et
- la mesure du produit marqué éventuellement lié.

La méthode mise en œuvre peut être soit une méthode directe, soit une méthode par compétition.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une
10 protéine chimère ou d'un peptide, tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament utile pour le traitement des maladies génétiques ou acquises impliquant un dysfonctionnement des cellules exprimant le récepteur p75^{NTR}, notamment des maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer.

15 La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une protéine chimère ou d'un peptide, tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber les inhibiteurs de la myéline ; de tels produits favorisent ainsi la régénération neuronale, notamment en cas de traumatisme ou de lésion de la moelle épinière.

20 La présente invention a également pour objet, l'utilisation d'une protéine chimère ou d'un peptide, tels que définis ci-dessus, pour la préparation d'un médicament utile dans le traitement des cancers.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des
25 exemples de mise en œuvre du peptide de la présente invention, au Tableau résumant les séquences de la Demande ainsi qu'aux dessins annexés dans lesquels :

- La figure 1 illustre l'expression de la protéine recombinante p75-Fc dans les cellules COS : la figure 1A illustre la structure du récepteur p75^{NTR} (p75-Fc) soluble dimérique comprenant le domaine externe ou ectodomaine du p75^{NTR} (p75ECD) fusionné au domaine Fc de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine (hIgG1Fc)
30 du récepteur soluble p75-Fc ; la figure 1B illustre l'analyse, en *Western-blot*, de

l'expression de la protéine p75-Fc dans le surnageant de cellules COS transfectées de façon transitoire par le plasmide recombinant (P-p75/Fc), et la figure 1C illustre l'analyse, en SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, de la protéine p75-Fc purifiée en colonne de protéine A-Sépharose.

5 - La figure 2 illustre l'analyse de l'interaction du récepteur soluble p75-Fc avec le virus de la rage : - la figure 2A illustre l'analyse en ELISA ; la figure 2B montre que la protéine p75-Fc neutralise la souche CVS.

- La figure 3 illustre l'interaction entre le mutant srr et la protéine p75-Fc ou des anticorps monoclonaux anti-G (figure 3A) ; les complexes immuns sont
10 analysés par SDS-PAGE et autoradiographie (figure 3B).

- La figure 4 illustre la liaison des mutants srr à une forme membranaire du récepteur p756 : la figure 4A illustre l'expression de la RVG à la surface cellulaire ; la figure 4B illustre la liaison des cellules marquées Sf21-p75 à des monocouches de cellules BSR infectées par le CVS ou des mutants srr.

15 - La figure 5 illustre la maturation des mutants srr.

- La figure 6 illustre la liaison de ^{125}I -RVG aux cellules PC12 : figure 6A : résultats obtenus par incubation de 20 ng/ml de ^{125}I -RVG ou de 10 ng/ml de ^{125}I -NGF avec des cellules PC12 en présence de compétiteurs non radioactifs ; figure 6B : plot Scatchard.

20 - La figure 7 illustre la liaison de la RGV aux mutants CRD1 : des mutations ponctuelles dans le plasmide CRD1 et la protéine est exprimée dans des cellules COS-7 ; les cellules sont biotinylées à leur surface, lysées et les extraits sont précipités avec des billes de streptavidine, puis le récepteur p75 est détecté par *Western-blot*.

25 - Les figures 8A et 8B illustrent la liaison de ^{125}I -RVG aux mutants ponctuels de CRD1.

- La figure 9 représente schématiquement les glycoprotéines G solubles du virus de la rage, exprimées dans le système baculovirus : Fib-foldon correspond au motif de trimérisation et représente la séquence ID NO :16 ; H_6 = 6 histidines ; G_8 = glycines ; I = Isoleucine ; L = Leucine ; Q = glutamine ; PS-G =
30 peptide signal glycoprotéine ; PS-M = peptide signal de la mellitine. Dans la construc-

tion B, le dernier acide aminé de l'ectodomaine de la glycoprotéine G (une lysine) est remplacé par une arginine.

- La figure 10 représente le taux d'expression des protéines solubles A, B et C, telles que définies à la figure 9 : un aliquot des surnageants des cellules d'insectes infectées par les recombinants baculovirus A, B ou C a été analysé en gel de polyacrylamide-SDS en condition réductrice. La présence de glycoprotéine G a été révélée par *Western-blot* (immunoempreinte) avec l'anticorps 17D2.

- La figure 11 représente l'oligomérisation des glycoprotéines G recombinantes (A, B et C) : analyse par sédimentation à l'équilibre en gradient 5-20 % de saccharose des protéines produites dans le surnageant des cellules d'insectes infectées par le baculovirus recombinants.

Tableau résumant les séquences de la Demande

Numéro d'identification	Séquences
SEQ ID NO:1	Séquence générale du peptide correspondant aux résidus 318-352 de la protéine G mature du virus de la rage
SEQ ID NO:2	Séquence particulière du peptide correspondant aux résidus 318-352 de la protéine G mature du virus de la rage (P1)
SEQ ID NO:3	Séquence nucléique codant pour le peptide de SEQ ID NO:2
SEQ ID NO:4	amorce RA1
SEQ ID NO:5	amorce RB12
SEQ ID NO:6	amorce RB13
SEQ ID NO:7	amorce RB14
SEQ ID NO:8	amorce RB10
SEQ ID NO:9	amorce RA11
SEQ ID NO:10	amorce RB5
SEQ ID NO:11	amorce RA12
SEQ ID NO:12	amorce RA13
SEQ ID NO:13	amorce RA9
SEQ ID NO:14	amorce
SEQ ID NO:15	amorce
SEQ ID NO:16	Fib-foldon
SEQ ID NO:17	amorce x2 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:18	amorce x8 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:19	amorce x9 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:20	amorce y3 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:21	amorce y7 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:22	amorce y8 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:23	amorce y9 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:24	amorce CA1 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:25	amorce CB13 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:26	amorce CB18 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:27	amorce CB19 (oligonucléotide G)
SEQ ID NO:28	amorce FA2 (oligonucléotide fibritine)
SEQ ID NO:29	amorce FA3 (oligonucléotide fibritine)
SEQ ID NO:30	amorce FB1 (oligonucléotide fibritine)
SEQ ID NO:31	séquence générale du peptide P2 (résidus 291-391)
SEQ ID NO:32	séquence particulière du peptide P2

EXEMPLE 1 : MATERIELS ET METHODES**1) Cellules, virus et anticorps**

5

- Les cellules BSR (Sato et al., Arch. Virol., 1977, 53, 269-273), un clone de cellules BHK-21, sont cultivées dans du milieu MEM modifié par Glasgow (GIBCO BRL) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, à 37 °C, dans un incu-

bateur humide, en présence de 5 % de CO₂. Elles sont utilisées pour produire le virus de la rage (RV) et le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) (Thoulouze, J. Virol., 1998, **72**, 7181-7190).

- Les cellules COS-7 (fournies par Brian Seed, MGH Boston), sont
5 cultivées dans du milieu DMEM (GIBCO BRL) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin, à 37 °C, dans un incubateur humide, en présence de 5 % de CO₂.

- Les cellules Sf21 de *Spodoptera frugiperda* (INVITROGEN) sont cultivées à 28 °C dans du milieu TC100 (GIBCO BRL) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin.

10 - Les cellules PC12 sont cultivées dans un milieu MEM (GIBCO BRL), en présence de sérum de veau fœtal à 10 %.

- Le virus de la rage de souche CVS (*Challenge Virus Strain*) est amplifié et titré par la technique des plages, selon les protocoles décrits dans Raux et al., *Virology*, 1995, 210, 400-408. Dix clones de CVS, qui ont été antérieurement uti-
15 sés pour sélectionner des mutants qui sont neutralisés à pH acide (Raux et al., 1995 précité), ont été utilisés dans cette sélection.

- Un baculovirus recombinant exprimant la p75^{NTR} humaine (Tuffereau et al., *J. Gen. Virol.*, 2001, **82**, 2861-2867) a été utilisé pour infecter des cellules Sf21.

20 - Un anticorps polyclonal anti-IgG est utilisé (Jackson Laboratories)
- Des anticorps monoclonaux sont également mis en œuvre :
. les anticorps monoclonaux anti-G 30AA5 et 40DC2 se lient au site II (Préhaud et al., *J. Virol.*, 1988, **62**, 1-7),

. Les anticorps monoclonaux 50AD1 et 41BC2 se lient au site III
25 (Tuffereau et al., *Virol.*, 1989, **172**, 206-212)

. L'anticorps monoclonal 9B4 se lie au site a (Benmansour et al., *J. Virol.*, 1991, 65, 4198-4203),

. L'anticorps monoclonal 17D2 se lie à l'épitope linéaire (Lafay et al., *J. Gen. Virol.*, 1996, **77**, 339-346) et

30 . L'anticorps 21H8 se lie à la conformation spécifique des conditions acides (Raux et al., 1995, précité)

Ces anticorps sont préparés et caractérisés, conformément aux méthodes connues de l'homme du métier.

2) Constructions p75

Des mutants dans lesquels le domaine riche en cystéine (CRD) est délété sont obtenus par la technique de PCR-recombinante, utilisant un plasmide p75 comprenant la totalité de la séquence codante du gène p75 humain, amplifié avec des oligonucléotides spécifiques et sous-cloné dans le site BamHI du plasmide pcDNA1 [Invitrogen, réf.V490-20, 1992 (bactéries MC1061/P3, sélection ampicil-line+tétracycline)], comme matrice et des amorces spécifiques pour introduire des délétions CRD dans la partie extracellulaire de la protéine.

Le Tableau I ci-après précise les amorces qui ont été utilisées pour obtenir les mutants de délétion.

Tableau I : amorces (SEQ ID NO :4 à 13) utilisées pour les mutants de délétion

Nom du mutant	PCR : fragment a	PCR : fragment b
CRD1	RA1 : gcgggatcccgggcgatgggggcag RB12 : gccagggatctcctcacacgggtctggtt	RA11 : aaccagaccgtgtgtgaggagatccctggc RB5 : cgcggatcctcatcacaccggggatgtggc
CRD1-2	RA1 : gcgggatcccgggcgatgggggcag RB13 : gccagggatctcctcgacacggcgtcgtc	RA12 : gacgacgccgtgtgcgaggagatccctggc RB5 : cgcggatcctcatcacaccggggatgtggc
CRD1-2-3	RA1 : gcgggatcccgggcgatgggggcag RB14 : gccagggatctcctcgacacgggtgttctg	RA13 : cagaacaccgtgtgcgaggagatccctggc RB5 : cgcggatcctcatcacaccggggatgtggc
CRD2-3-4	RA1 : gcgggatcccgggcgatgggggcag RB10 : cacgctgtccaggcaggcacctccaaggga	RA9 : tcccttgagggtgcctgcctggacagcgtg RB5 : cgcggatcctcatcacaccggggatgtggc

Dans une première étape, deux fragments de PCR (a et b) sont obtenus puis une PCR de fusion est réalisée en utilisant les amorces RA1 et RB5 et les fragments PCR a+b.

Des mutations ponctuelles sont introduites dans CDR1 à l'aide du kit de mutagenèse dirigée QuickChangeTM (Stratagene). Les mutations sont introduites dans le gène par amplification à l'aide de l'ADN-polymérase Pfu TurboTM et de deux amorces synthétiques portant la mutation désirée.

L'incorporation des amorces génère un plasmide muté. Après amplification, la matrice d'ADN (méthylée ou héli-méthylée) est digérée pendant 1 heure à 37°C par l'endonucléase C DpnI et le produit de digestion est utilisé pour transformer des bactéries MC1061.

5 3) Expression d'un récepteur p75 soluble (p75-Fc)

Un vecteur d'expression contenant l'ectodomaine du récepteur p75^{NTR} (acides aminés 1 à 222, numéro d'accèsion Genbank n° M14764 et Johnson et al., *Cell*, 1986, 47, 545-554) cloné en phase avec le domaine constant de la chaîne lourde d'une IgG1 humaine (Aruffo et al., *Cell*, 1990, 61, 1303-1313 ; Langner et al.,
10 *Arch. Virol.*, 1993, 130, 157-170) a été construit (figure 1A) en suivant les étapes suivantes. Un fragment d'ADNc de la p75^{NTR} a été amplifié par PCR à l'aide de la polymérase Tfu (PROMEGA) et d'un couple d'amorces comprenant une amorce sens, complémentaire de la séquence signal, contenant un site *XhoI* (5'CGCGGGCTCGAGATGGACGGGCCGCGC3', SEQ ID NO:14) et une amorce
15 anti-sens correspondant à la séquence 3' de la tige O-glycosylée, contenant un site *BamHI* 5' GCGGATCCCATCGGCCAGGGATC3', SEQ ID NO:15). Le produit d'amplification obtenu est digéré par les enzymes *BamHI* et *XhoI* et inséré entre les sites correspondant du plasmide (Langner et al., *Arch. Virol.*, 1993, 130, 157-170) pour donner le plasmide recombinant P-p75/Fc. L'insert cloné dans le plasmide
20 recombinant P-p75/Fc a été vérifié par séquençage.

Des cellules COS ont été transfectées de façon transitoire par le plasmide recombinant P-p75/Fc par la technique du DEAE-dextran. Le surnageant de culture a été récolté 72 h après la transfection, clarifié par centrifugation à basse vitesse et chargé sur une colonne de protéine A-Sépharose (SIGMA). La protéine p75-
25 Fc a été éluée dans un tampon 0,1 M glycine pH 3 et neutralisée par addition de 1 M Tris HCl pH8, à la concentration finale 50 mM. La protéine ainsi obtenue a été dialysée contre un tampon PBS (10 mM phosphate (pH 7), 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl), à l'aide du système de dialyse *FastDialyzer Interbiotech* (INTERCHIM) et conservée à -80°C. La concentration en protéine a été déterminée par la méthode de Bradford à
30 l'aide d'un réactif commercial (PIERCE). La protéine purifiée a été analysée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) et colora-

tion au Bleu de Coomassie et par *Western-blot*, à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-p75.

4) Préparation de RVG et de VSVG

Les glycoprotéines de RV (RVG) et de VSV (VSVG) sont purifiées en utilisant la méthode décrite par Gaudin Y. et al., (*Virology*, 1992, 187, 627-632) légèrement modifiée. Brièvement, les virus purifiés sont traités avec 1 % de CHAPS (3-[(3-cholaminopropyl)diméthyl-ammonio-1-propane sulfonate) en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (chymostatine, leupeptine, antipapaine et pepstatine à 2 µg/ml chaque et 16 µg d'aprotinine par ml) pendant 30 minutes à 37°C.

Les virions solubilisés sont déposés sur un gradient de saccharose à 20 % dans du PBS contenant 1 % de CHAPS et centrifugés pendant 1 heure (SW41, 35K, 4°C). Les surnageants contenant la majorité des glycoprotéines sont concentrés dans un Centricon 30 (Amicon) puis chargés sur gradient de saccharose à 5-20 % dans 10 mM de NaCl, 10 mM de tampon Tris pH8 contenant 1 % de CHAPS et centrifugés pendant 16 heures à 35.000 tours par minute dans un rotor SW41 (Beckman).

Les fractions contenant la glycoprotéine trimérique correspondant au coefficient de sédimentation 9S sont mélangées et chargées sur une colonne DEAE-Trisacryl (IBF, Biotechnics) dans un mélange de NaCl 10 mM, Tris 10 mM pH 8 contenant 1% de CHAPS.

Les glycoprotéines sont éluées par un tampon comprenant 250 mM NaCl, 20 mM Tris 10 mM pH 7,5 contenant 1% de CHAPS. Le détergent est éliminé par des dialyses successives contre du tampon PBS et la concentration en protéine est déterminée par la méthode de quantification de Bradford. Le produit protéique final consiste en des rosettes pures de RVG ou de VSVG, ayant en moyenne 10 trimères par rosette et à une concentration allant de 0,8 à 1 mg/ml.

5) Méthodes d'étude de la liaison RVG ou peptide selon l'invention-récepteur p75 : Tests de liaison de la RVG ou du peptide selon l'invention

5.a. Méthode à la β -galactosidase

Des cellules COS-7 transfectées ont été traitées avec 10 µg de RVG purifié dans 1,5 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum foetal bovin (FBS) pendant 2 heures à température ambiante.

Les cellules sont lavées 3 fois et fixées à l'aide de 4 % de para-formaldéhyde froid. Les cellules sont ensuite incubées avec des anticorps spécifiques anti-G et un anticorps anti-souris de chèvre conjugué à la β -galactosidase (Southern Biotechnology Associates), en utilisant un substrat X-Gal tel que décrit dans Tuffereau
5 et al., (*EMBO J.*, 1998, 17, 7250-7259).

5.b. Méthode mettant en œuvre de la RVG ou un peptide selon l'invention radiomarké

L'iodation de la RVG ou d'un peptide selon l'invention est réalisée par la méthode à la lactoperoxidase jusqu'à obtention d'une activité spécifique
10 moyenne de $7,5 \times 10^7$ cpm/ μ g. La RVG ou le peptide selon l'invention radiomarké est purifiée par chromatographie d'exclusion de taille en utilisant une colonne Séphadex G25.

Pour les essais de compétition de fixation, les cellules sont mises en suspension dans des tubes Eppendorf avec 20 ng/ml de 125 I-RVG (environ 30 pM, en
15 considérant un trimère accessible à la fixation par rosette) dans du PBS contenant 1 mg/ml de sérumalbumine bovine (BSA), 1 mM de $MgCl_2$, et 0,5 mM de $CaCl_2$, en présence ou en l'absence de compétiteurs non radioactifs (froids). Les tubes sont ensuite soumis à une agitation douce à 4°C pendant au moins 2 heures pour favoriser la fixation, et le ligand lié est séparé du ligand libre par une centrifugation rapide des
20 cellules dans une microcentrifugeuse Eppendorf à 4°C.

La fixation non-spécifique (bruit de fond) est déterminée par l'utilisation d'un excès de RVG non-marquée (400 fois).

5.c. Neutralisation des virus par un anticorps monoclonal anti-G ou par le récepteur soluble p75-Fc

25 Des virus CVS [10^3 unités formant plaque (ufp ou pfu)] sont incubés avec des liquides d'ascites (dilué au 1/100) d'anticorps 30AA5 ou avec différentes quantités de p75-Fc ou d'anticorps anti-G (de 1 à 10 μ g). Lorsque cela est spécifié, 10 μ g d'anticorps anti-d'IgG humaines sont ajoutés et incubés pendant 1 h à 37°C. L'efficacité de la neutralisation est mesurée par la technique des plaques sur des cellules
30 BSR : le titre viral est déterminé par des expériences de formation de plaques sur des monocouches de cellules BSR.

5.d. Immunoprécipitation de la RVG par des anticorps monoclonaux anti-G ou par le p75-Fc

Des cellules BSR (10^6 cellules dans des boîtes de 35 mm) sont infectées avec chaque virus (*multiplicity of infection* ou moi 2). 24 heures après l'infection, les cellules sont radiomarquées pendant 1 heure à 37°C avec 50 µCi de ^{35}S -méthionine et de ^{35}S -cystéine (Promix, Amersham) dans un milieu MEM sans méthionine ni cystéine (GIBCO). Des extraits cellulaires dans un tampon TRIS (0,05 M Tris-HCl pH 8 ; 0,15 M NaCl), supplémenté avec 1 % de CHAPS (3-[(3-cholaminopropyl)diméthyl-ammonio-1-propane sulfonate) en présence d'un mélange d'inhibiteurs de protéases (chymostatine, leupeptine, antipapaïne et pepstatine à 2 µg/ml chaque et 16 µg d'aprotinine par ml). Après incubation de 30 min dans de la glace, les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12 000 g, pendant 15 min. Les extraits cellulaires sont incubés 1 heure à 4°C avec différents anticorps monoclonaux (2 µl de liquide d'ascite) ou de p75-Fc (4 µg) pré-adsorbé sur de la protéine A-Sépharose. Les immuns-complexes sont analysés par SDS-PAGE à 12 %. La RVG immunoprécipitée est détectée par autoradiographie (films Kodak Biomax).

5.e. SDS-PAGE et analyse par immunoempreinte

Des échantillons de protéine sont portés à ébullition pendant 5 min dans un tampon de Laemmli. L'électrophorèse est réalisée dans un gel SDS-PAGE discontinu. Les protéines sont ensuite colorées au Bleu de Coomassie puis transférées sur des membranes de nitrocellulose (BA85, Schleicher et Schuell). Les membranes sont saturées avec 5 % de lait écrémé dans un tampon, TBS (Tris-buffer saline) contenant 0,05 % de Tween 20 pendant 30 min puis incubées pendant 1 heure avec un anticorps de chèvre anti-souris conjugué à la peroxydase (Sigma). Les immuns-complexes sont détectés après lavage dans un tampon TBS-Tween par chemiluminescence (ECL).

5.f. ELISA

Du virus de la rage (souche CVS), purifié selon les techniques classiques telles que décrites dans Gaudin et al. (Virolog., 1992, 187, 627-632), a été dilué dans du tampon TD (137 M NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM NaHPO_4 , 25 mM Tris-HCl, pH 7,5), réparti dans une plaque à 96 puits (50 ng/puits dans 50 µl), puis les

plaques ont été séchées une nuit à 37°C. Les plaques ont été saturées par une solution de PBS contenant 10 % (P/V) de poudre de lait écrémé. Des dilutions sériées de la protéine p75-Fc purifiée ou d'une IgG humaine (JACKSON) ont été ajoutées (50 µl/puits) puis la plaque a été incubée 2 h à 37°C dans un incubateur humide. Les
5 plaques ont été ensuite rincées trois fois avec du tampon PBS contenant 1 % de poudre de lait écrémé. Un anticorps anti-IgG humaine couplé à la phosphatase alcaline (SIGMA), dilué au 1/1000 dans le même tampon a été ajouté dans chaque puits (50 µl) et la plaque a été incubée 1 h à 37°C. Les plaques ont ensuite été rincées trois fois avec du tampon PBS, puis une solution de p-nitrophényl-phosphate (1,33 mM dans 1 M
10 Tris HCl, pH 8) a été ajoutée dans chaque puits (200 µl) et la densité optique a été mesurée à 405 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre (Mini Reader, DYNATECH).

5.g. Fixation des cellules Sf 21 exprimant le récepteur p75 aux cellules BSR infectées par le virus de la rage

Des essais de fixation entre des cellules BSR infectées par différents
15 mutants et des cellules d'insectes (Sf21) infectées par un baculovirus recombinant et exprimant le p75^{NTR} à leur surface (p75-Sf21) ont déjà été décrits (Tuffereau C. et al., *J. Gen. Virol.*, 2001, 82, 2861-2867).

Brièvement, une suspension de cellules p75-Sf21 radiomarquées est ajoutée à une monocouche de cellules BSR infectées par différents mutants (moi de 2
20 pour 30 h) et incubées pour 30 minutes à température ambiante.

Les cellules p75-Sf21 non fixées sont éliminées par trois lavages au PBS et la fixation spécifique est mesurée par comptage de la radioactivité associée aux cellules BSR infectées.

Parallèlement, l'expression de RVG à la surface des cellules BSR
25 infectées par le virus de la rage est déterminée par une immunoprécipitation de surface en utilisant des anticorps anti-G (30AA5 et 21H8) selon la technique décrite dans Tuffereau C. et al., (*J. Gen. Virol.*, 2001, 82 : 2861-2867).

6) Sélection de mutants RVG (mutants srr)

Des clones de virus CVS (10⁶ pfu) sont incubés avec 5 µg de p75-
30 Fc, pendant 1 heure à 37°C, puis avec 10 µg d'IgG anti-humaines pendant 1 heure à 37°C.

Le virus non-neutralisé est étalé sur une monocouche de cellules BSR dans des plaques de 24 puits. Après 3 heures à 37°C, les cellules surnageantes sont collectées et soumises à un nouveau cycle de neutralisation-amplification. Chaque clone est amplifié trois ou quatre fois, en présence de p75-Fc et d'IgG anti-humaines et
5 les plaques testées pour la sélection de variants. Les plaques sont prélevées, amplifiées dans des cellules BSR et chaque variant est soumis à un test de neutralisation utilisant du p75-Fc et des IgG anti-humaines. Seuls les variants présentant une résistance à la neutralisation par p75-Fc supérieure à 90 % ont été de nouveau amplifiés et caractérisés.

10 L'ARN total est extrait des cellules BSR infectées à l'aide du kit RNAGents® total RNA (Promega).

L'ADN complémentaire (ADNc) du gène RVG est obtenu par la technique de RT-PCR : d'abord avec de la transcriptase inverse d'AMV (Promega) puis ensuite avec de la Taq polymérase (Promega) en utilisant des amorces spécifiques
15 du gène RVG. Le fragment d'ADNc est alors purifié et séquencé en utilisant un kit de séquençage à la T7 (T7-sequencing kit, Amersham).

7) Expériences d'impulsion-chasse

Les expériences sont réalisées comme décrit dans Gaudin et al. (Gaudin et al., J. Virol., 1997, 71, 3742-3750). Des monocouches de cellules BSR sont
20 infectées par du virus CSV ou des mutants srr à une moi de 5. Après 24 heures, les cellules sont préincubées dans un milieu sans méthionine ni cystéine pendant 1 heure. Les cellules sont ensuite marquées avec 100 µCi de 35-S-méthionine et 35S-cystéine (Promix, Amersham), pendant 3 min. Un milieu préchauffé contenant un excès de méthionine et de cystéine non marquées est ajouté pour des périodes de chasse. Les
25 cellules sont lysées et la RVG est immunoprécipitée, comme indiqué en 5.d.

EXEMPLE 2: Expression d'une forme soluble du récepteur p75

La forme soluble du récepteur p75 est obtenue conformément à l'exemple 1.3).

Les résultats de l'analyse du surnageant cellulaire présentés à la
30 figure 1B montrent la présence d'une protéine reconnue par des anticorps anti-p75, qui possède un poids moléculaire apparent d'environ 97,4 kD, correspondant à celui

attendu pour une protéine de fusion p75-Fc. La protéine p75-Fc est également reconnue par un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope conformationnel de la p75 (anticorps ME20.4 reconnaissant les domaines riches en cystéine (CRDs 3 et 4) et par un sérum polyclonal anti-IgG humaine.

5 La p75-Fc a été purifiée sur une colonne de protéine A-Sepharose avec un rendement de 5 µg/ml. L'analyse en SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie, de la protéine purifiée montre que la protéine p75-Fc obtenue est pure à 90 % (figure 1C).

10 **EXEMPLE 3 : Analyse de l'interaction entre la protéine soluble p75-Fc et le virus de la rage (Tests ELISA et de neutralisation)**

- Analyse en ELISA

La liaison du récepteur soluble avec le virus de la rage a été analysée en ELISA, selon le protocole décrit à l'exemple 1.5.f.

15 Un test ELISA a été utilisé pour étudier la fixation du récepteur soluble au virus de la rage.

Une boîte estensemencée avec du virus de la rage (lignée CVS) et incubée avec différentes quantités de p75-Fc ou d'immunoglobulines G humaines.

20 Une expérience représentative est présentée à la figure 2A. La p75-Fc se fixe au virus de manière concentration-dépendante, avec un Kd estimé de 400 nM. Les immunoglobulines G humaines ne se fixent pas au virus de la rage dans les mêmes conditions. L'interaction spécifique entre la forme soluble du récepteur p75 et le virus de la rage indique qu'aucun cofacteur n'est requis pour cette interaction. Ceci est en accord avec la capacité de la p75-Fc à co-précipiter avec la RVG solubilisée à partir du virus par des détergents sous forme de monomères ou de trimères.

25 - Neutralisation du pouvoir infectieux du virus de la rage

La capacité de la protéine soluble p75-Fc à neutraliser le pouvoir infectieux du virus de la rage a été étudiée, conformément au protocole décrit à l'exemple 1.5.c.

30 Les titres ne diminuent pas en présence de p75-Fc jusqu'à 20 µg et sont brutalement diminués de moitié en présence de concentrations plus élevées de la molécule.

Bien que le test ELISA montre que la p75-Fc interagit avec le virus de la rage, elle ne neutralise pas efficacement son pouvoir infectieux (figure 2B).

EXEMPLE 4 : Sélection et caractérisation des mutants Srr

A. Sélection des mutants

5 Le but est de cartographier le domaine de la RVG impliqué dans la fixation de la p75 par la sélection de mutants qui ne sont pas neutralisés par la forme soluble du récepteur. Ainsi, on a augmenté l'efficacité neutralisante de la protéine chimère p75-Fc : l'efficacité neutralisante est dépendante du nombre de molécules d'immunoglobulines fixées au virus (Flamand A. et al., *Virology*, 1993, 194 : 302-
10 313). L'hypothèse a été faite que la fixation de la p75-Fc au virus ne prévient pas l'interaction entre le virus de la rage et les cellules et dès lors l'infection.

Pour augmenter le pouvoir neutralisant du récepteur soluble p75-Fc, une étape d'incubation avec une immunoglobuline G anti-humaine spécifique de la partie Fc de la chimère a été ajoutée. Cet anticorps ne doit pas interférer avec
15 l'interaction entre le récepteur p75-Fc et la RVG, qui se produit au niveau de la partie N-terminale du récepteur p75.

Le virus a préalablement été incubé avec une quantité allant de 1 à 10 µg de p75-Fc, puis avec 10 µg d'immunoglobuline G anti-humaine (Tableau II).

Tableau II : Neutralisation du virus de la rage par la protéine soluble p75-Fc

Agents neutralisants	Neutralisation
Anticorps monoclonaux anti-G (30AA5) (1)	> 99,99 %
Protéine p75-Fc seule (2)	< 10 %
Protéine p75-Fc+anticorps anti-Fc humain (3)	> 90 %
IgG humaine seule (4)	
Anticorps anti-Fc humain seule (5)	< 10 %
IgG humaine + Anticorps anti-Fc humain (6)	< 10 %

20

(1) : dilution au 1/100 de liquide d'ascite de 30AA5

(2) : 1 à 10 µg de p75-Fc

(3) : 1 à 10 µg de p75-Fc et 10 µg d'anticorps anti-Fc

(4) : 1 à 10 µg d'IgG humaine

(5) : 10 µg d' IgG humaine et

(6) : 5 µg d' IgG humaine et 10 µg d'anticorps anti-Fc

Bien que l'anticorps anti-Fc humain seul n'affecte pas le pouvoir infectieux du virus de la rage, une neutralisation significative (> 90 %) a été obtenue
5 quand cet anticorps est ajouté aux complexes virus/p75-Fc. Cependant, une incubation avec un anticorps neutralisant spécifique du site II (30AA5) aboutit à un effet neutralisant identique (> 99,99 %) et une augmentation de la concentration en anticorps n'améliore pas significativement la neutralisation.

Pour augmenter la chance de sélection d'un mutant, 10 populations
10 clonées de CVS 3 ont été soumises à plusieurs passages, en présence de 5 µg de p75-Fc et de 10 µg d'anticorps anti-immunoglobuline G humaine. Les particules virales sont amplifiées sur des monocouches de cellules BSR qui n'expriment pas le récepteur p75^{NTR} mais expriment d'autres récepteurs conduisant à l'infection cellulaire et à l'amplification des mutants Srr.

15 Plusieurs populations virales se sont révélées plus résistantes à la neutralisation par la p75-Fc et les immunoglobulines G anti-humaines.

Après trois ou quatre passages en conditions neutralisantes, les populations virales clonées ont été titrées par la technique de formation de plaques en présence ou en l'absence de la p75-Fc et d'anticorps anti-Fc. Des plaques individuali-
20 sées ont été prélevées, amplifiées et de nouveau mises en présence avec la p75-Fc et l'anticorps anti-immunoglobuline G humaine.

Au total, 14 mutants provenant de 8 clones CVS ont été isolés. Neuf ont été totalement caractérisés. Le gène complet de la glycoprotéine a été séquencé pour quatre d'entre eux et des séquences partielles ont été obtenues pour les autres
25 (Tableau III).

Tableau III : Caractérisation des variants résistants à la neutralisation par la protéine p75-Fc

Nom du mutant	Virus	Phénotype des plaques	AA n°	Nature de la substitution	Codon
2-4	CVS clone 2	Petit	352	H→R	CAT→CGT
4-1	CVS clone 4	Petit	352	H→R	CAT→CGT
5-4	CVS clone 5	Grand	318	F→V	TTC→GTC
6-5	CVS clone 6	Petit	318	F→S	TTC→TCC
7-5	CVS clone 7	Grand	352	H→Y	CAT→TAT
8-2	CVS clone 8	Grand	318	F→V	TTC→GTC
8-4			318	F→V	TTC→GTC
9-1	CVS clone 9	Petit	352	H→R	CAT→CGT
10-5	CVS clone 10	Petit	318	F→S	TTC→TCC

Comme supposé, en fonction de la procédure de sélection, les deux mutants issus du même clone (n°8) contiennent la même mutation. Aucun mutant n'a été isolé de deux des clones (n°1 et 3), alors qu'un (clone 3) est devenu globalement résistant à la neutralisation.

Le clone 1 était encore neutralisé par la p75-Fc + l'anticorps anti-immunoglobuline G humaine, même après quatre passages en présence de ces molécules.

Seules quatre substitutions différentes ont été identifiées sur les huit mutants indépendants. Deux ont été localisées à la position 318 de la glycoprotéine virale (F318V et F318S) à proximité du site de N-glycosylation et deux ont été localisées à la position 352 (H352R et H352Y).

Les mutants F318S et H352R conduisent à la formation de petites plaques sur des cellules BSR. Les deux autres mutants donnent des plaques de plus grandes tailles (Tableau III).

B. Caractérisation des mutants srr

1. Interaction avec un anticorps anti-G

Aucune mutation n'a été antérieurement décrite aux positions 318 et 352. L'interaction entre les mutants et les anticorps anti-G dirigés contre le site II (30AA5, 40DC2), le site III (50AD1, 41BC2), le site a (9B4), l'épitope linéaire (17D2) et l'anticorps spécifique de la conformation liée aux conditions acides (21H8) a été étudiée.

Cinq de ces anticorps sont neutralisants et neutralisent les mutants Srr (Tableau IV).

10 **Tableau IV : Interaction des mutants srr avec les anticorps monoclonaux anti-G**

	21H8 ^a	Site II ^{abc} 30AA5- 40DC2	Site III 41BC2 ^{ac}	Site III 50AD1 ^{bc}	Site a ^{ac} 9B4	Site linéaire ^a 17D2	P75-Fc ^{ac}
CVS	+	+	+	+	+	+	+
F318V	+	+	+	+	+	+	-
F318S	+	+	+	+	+	+	-
H352Y	+	+	+	+	+	+	-
H352R	+	+	+	+	+	+	-

^a : caractérisation par immunoprécipitation

^b : caractérisation par immunofluorescence

^c : caractérisation par neutralisation.

La RVG de différents mutants Srr est immunoprécipitée par tous les anticorps testés, mais pas par la p75-Fc, alors que la glycoprotéine CVS est immunoprécipitée par tous les anticorps et par la p75-Fc (Fig. 3A). Comme l'anticorps 50AD1 (spécifique du site III) est une immunoglobuline M et ne peut pas être suivie par immunoprécipitation, sa fixation aux mutants du virus de la rage a été suivie par immunofluorescence. Cette fixation a été trouvée normale (Fig. 3B).

20 Pour réaliser l'immunofluorescence, les cellules BSR infectées par la souche CVS ou les mutants srr depuis 18 heures, sont incubées avec l'anticorps 50AD1 (dilution 100 dans un tampon EPT, pH 7,4 : NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 7,4 mM, KH₂PO₄ 2,4 mM :) pendant deux heures, puis lavées et fixées par traitement en

présence de paraformaldéhyde 4 % dans l'EPT pendant 15 minutes, lavées et incubées avec l'anticorps secondaire conjugué FITC (Pierce) dilué 100 fois dans le tampon EPT pendant 1 heure à l'obscurité. Les cellules sont observées avec un microscope à fluorescence Olympus B40.

5 Ces résultats suggèrent que les mutations 318 et 352 sont localisées à l'extérieur du site antigénique préalablement caractérisé (Tableau III).

2. Interaction avec le p75^{NTR} fixé à la membrane

La fixation des glycoprotéines de mutants Srr à la forme fixée à la membrane du p75^{NTR} a été étudiée.

10 Il a été démontré que la fixation entre des cellules BSR infectées par le virus de la rage et des cellules Sf21 infectées par un virus recombinant et exprimant la p75-Fc à leur surface (p75-Sf21) est spécifique (Tuffereau C. et al., *J. Gen. Virol.*, 2001, 82 : 2861-2867).

L'expression de la forme mutée de la RVG de srr a été suivie par
15 immunoprécipitation avec deux anticorps anti-G (Fig. 4A). Les cellules infectées par les mutants F318V et H342Y expriment deux fois plus de glycoprotéines que les cellules infectées par le CVS, alors qu'une quantité identique de protéines a été détectée dans les cellules infectées par les mutants F318S et H352R. Aucune cellule p75-Sf21 radiomarquée ne se fixe à la monocouche cellulaire ayant été infectée avec
20 n'importe lequel des mutants Srr quand bien même ils contiennent une quantité normale de la glycoprotéine à leur surface. A l'inverse on détecte une fixation très importante quand la monocouche a été infectée avec du CVS (Fig. 4B).

Les substitutions des acides aminés 318 ou 352 abolissent
l'interaction avec le p75^{NTR} qu'elle soit sous forme soluble ou sous la forme d'un
25 récepteur fixé à la membrane.

3. Repliement de la RVG des mutants Srr :

Les profils de migration des glycoprotéines des mutants F318V et H352 sont modifiés (Fig. 3A et 4A). La RVG migre comme un doublet chez le CVS (2/3 des molécules portant deux chaînes sucres et 1/3 des molécules portant une seule
30 chaîne sucree), alors que les glycoprotéines de Srr migrent comme un triplet.

Ces différences corrént avec le phénotype des plaques : F318V et H352R produisant des plaques plus petites que CVS. Cela suggère que le transport/repliement de la glycoprotéine puisse être affecté dans ces mutants.

Des expériences d'impulsion-chasse (Gaudin Y., *J. Virol.*, 1997, 71, 3742-3750) ont été utilisées pour comparer la maturation de la RVG chez les mutants Srr (F318S et H352R) et chez le CVS. Immédiatement après l'impulsion une RVG de CVS néo-synthétisée, immunoprécipitée par l'anticorps 17D2, migre comme un doublet : une bande correspondant à l'addition d'une chaîne sucrée à haute teneur en mannose et une correspondant à l'addition de deux chaînes sucrées.

L'addition des sucres complexes dans l'appareil de Golgi augmente le poids moléculaire se traduisant par la présence de bandes additionnelles de haut poids moléculaire et par une diminution/disparition des bandes plus petites.

Aucune différence majeure n'est observée entre le CVS et les mutants après 20 minutes de chasse.

Les bandes les plus larges apparaissent plus lentement chez les mutants que chez le CVS.

La glycoprotéine immature (la bande la plus petite) est encore présente après 120 minutes de chasse chez les mutants Srr (F318S et H352R).

EXEMPLE 5 : Quantification de l'affinité de liaison RVG-récepteur p75

La RVG est radiomarquée (^{125}I -RVG), de manière à obtenir une activité spécifique de $7,5 \cdot 10^4$ cpm/ng, à l'aide de la méthode à la lactoperoxydase (voir exemple 1.5.b).

Sa liaison aux cellules PC12 est mesurée en présence d'un excès de RVG froide, de NGF ou de VSVG.

Des expériences comparatives sont effectuées en parallèle avec du NGF froid.

Les deux ligands se lient aux cellules P12 (figure 6A) ; la protéine contrôle VSVG ne déplace aucun des deux ligands. On observe qu'un excès de NGF froid n'entre pas en compétition dans la liaison de l' ^{125}I -RVG ; un excès de RVG froid ne déplace pas l' ^{125}I -NGF. Des résultats similaires sont obtenus avec des cellules PC12 qui expriment le récepteur p75 mais pas trk.

Ces résultats illustrent la spécificité de la liaison de RVG pour le récepteur p75.

La liaison de RVG aux cellules PC12 présente une haute affinité, avec un K_d de 35 ± 5 pM (figure 6B).

5 **EXEMPLE 6 : Mise en évidence du site de liaison du récepteur p75**

Différents mutants p75 ont été construits pour mettre en évidence le site de liaison. Pour maintenir un repliement correct des mutants, l'intégrité de chaque CRD est préservée.

10 Les mutants contiennent 1, 2 ou 3 CRD connectés via un linker O-glycosylé aux domaines TM et cytoplasmique du l'hp75.

Des cellules COS-7 sont transfectées avec différents plasmides et l'expression des mutants est analysée par Western-blot avec un anticorps anti-domaine cytoplasmique de p75.

15 Les différents mutants migrent sur un gel SDS-PAGE, conformément à leur poids moléculaire.

Dans le cas du mutant CRD1, la protéine migre en tant que doublet.

L'expression à la surface cellulaire de tous les mutants a été confirmée par immunofluorescence, bien qu'à des taux différents.

20 RVG se lie à tous les mutants, à l'exception de celui dans lequel CRD1 est délété.

Par ailleurs, seul CRD1 est nécessaire pour obtenir une liaison de RVG.

25 L'analyse des différents mutants montre notamment que la glutamine en position 33 est nécessaire pour la liaison à RVG ; en effet, la mutation Q33E abolit complètement la liaison à RVG, alors qu'une mutation en position 32 (N32Q) n'a pas d'effet sur la liaison (figure 7 et figures 8A et 8B).

EXEMPLE 7 : Expression de formes solubles de la glycoprotéine du virus de la rage à l'aide de baculovirus recombinants.

1-Obtention des baculovirus recombinants

a) Construction des plasmides :

5 ***A1) dans le vecteur pAcYM1***

Dans un premier temps, des plasmides recombinants chez lesquels la séquence du peptide signal est celle de la glycoprotéine G virale ont été construits. Les plasmides recombinants ont été obtenus dans le vecteur d'expression pAcYM1 (Matsura et al., J. Gen., Virol., 1987, 68, 1233-1250).

10 G-(PV)₁₋₄₃₉ : La séquence du gène de la glycoprotéine (comprenant les 19 acides aminés du peptide signal et les 439 de la forme mature de la protéine G de la souche PV) a été amplifiée par RT- PCR avec le couple d'amorces (x2 et y3) et en utilisant les messagers du gène de la glycoprotéine G de la souche PV comme matrice.

15 G-(CVS)₁₋₄₃₉ : La séquence du gène de la glycoprotéine (comprenant les 19 acides aminés du peptide signal et les 439 de la forme mature de la protéine G de la souche CVS) a été amplifiée par RT- PCR avec le couple d'amorces (CA1 et y3) et en utilisant un plasmide contenant le gène entier de la glycoprotéine de la souche CVS dans le vecteur pcDNA1 (Invitrogen) comme matrice.

20 G-(CVS)₁₋₄₃₂ : La séquence du gène de la glycoprotéine (comprenant les 19 acides aminés du peptide signal et les 432 de la forme mature de la protéine G de la souche CVS) a été amplifiée par RT- PCR avec le couple d'amorces (CA1 et CB13) et en utilisant un plasmide contenant le gène entier de la glycoprotéine de la souche CVS dans le vecteur pcDNA1 (Invitrogen) comme matrice.

25 ***A2) Dans le vecteur pVT-Bac***

Dans un deuxième temps, le peptide signal de la glycoprotéine G du virus de la rage a été remplacé par celui de la mellitine ; la séquence (comprenant les acides aminés 1 à 439 de la forme mature de la glycoprotéine G du virus de la rage) a été clonée dans le vecteur d'expression pVT-Bac (Tessier et al., 1991, Gene, 98, 177-
30 183) derrière le peptide signal de la mellitine.

Trois constructions ont été réalisées (Figure 9).

1. **Pour la construction A**, une séquence de 6 histidines a été ajoutée à l'extrémité C-terminale. La protéine contient 445 acides aminés. La séquence nucléotidique codant pour la glycoprotéine G a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces (x8 et y7) en utilisant le plasmide pcDNA1G_{wt} (Gaudin et al, 5 1999 ; J. Gen. Virol. 80, 1647-1656) contenant le gène entier de la glycoprotéine G de la souche PV dans le vecteur pcDNA1 (Invitrogen) comme matrice.

Les expériences réalisées avec la protéine G-(PV)₁₋₄₃₉ ont montré que le degré d'oligomérisation de la glycoprotéine G dépendait de sa concentration. A haute concentration elle était sous forme de trimères et à basse concentration elle était 10 sous forme de monomères. Or le trimère de glycoprotéine G a une affinité beaucoup plus forte pour p75 que le monomère. Afin de stabiliser le trimère, un motif de trimérisation à l'extrémité C-terminale de l'ectodomaine, a été ajouté. Ce motif (appelé foldon, SEQ ID NO :) provient de la fibritine du bactériophage T4. Il a été montré que ce motif était responsable de la trimérisation de la fibritine (Letarov et al., 1999, 15 Biochemistry 64, 817-823, Tao et al., 1997, Structure 15, 789-798) mais était également capable d'induire la trimérisation de protéines recombinantes [fibre d'adénovirus (Krasnikh et al., 2001, J. Virol 75, 4176-4183 ; gp120 HIV (Yang et al, 2002, J. Virol. 76, 4634-4642) quand il était fusionné avec celles-ci.

Le plasmide pT412w13 est dérivé du plasmide pGEM-T (Promega) 20 par insertion des gènes gènes 12, wac (fibritine) et 13 du bactériophage T4 ; ce plasmide a été fourni aux Inventeurs par Andrey Letarov.

2. **Pour la construction B**, une séquence contenant le motif de trimérisation de 27 acides aminés de la fibritine du phage T4 suivi de 6 Histidines a été ajoutée à l'extrémité C-terminale. Deux acides aminés supplémentaires (Isoleucine 25 et Leucine) apportés par le site de clonage BamHI existent entre la séquence codant la glycoprotéine G et celle de la fibritine. La protéine contient 464 acides aminés. La séquence nucléotidique de G a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces (CA18 et CB18) en utilisant un plasmide contenant le gène entier de la glycoprotéine de la souche CVS dans le vecteur pcDNA1 (Invitrogen). La séquence du motif de triméri- 30 sation (foldon, SEQ ID NO :) de la fibritine a été amplifiée par PCR à l'aide d'un

couple d'amorces (FA2-et FB1) en utilisant le plasmide pT412w13 comme matrice. Les deux produits d'amplification ont été clonés en fusion dans le vecteur pVT-Bac.

3. **Pour la construction C**, une séquence de 8 glycines a été introduite entre la séquence codant pour la glycoprotéine G et le motif de trimérisation de la fibritine. Deux acides aminés supplémentaires (Leucine et Glutamine) apportés par le site de clonage (PstI) existent entre la séquence codant la glycoprotéine G et les 8 glycines. La protéine contient 472 acides aminés. La séquence nucléotidique de G a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces (x8 et CB19) en utilisant le plasmide pcDNA1G_{wt} (Gaudin et al, 1999) comme matrice. La séquence du motif de trimérisation de la fibritine précédée des 8 glycines a été amplifiée par PCR à l'aide d'un couple d'amorces (FA3 et FB1) en utilisant le plasmide pT412w13 comme matrice. Les deux produits d'amplification ont été clonés en fusion dans le vecteur pVT-Bac.

b) Obtention des baculovirus recombinants

Des recombinants baculovirus ont été obtenus pour chaque plasmide après co-transfection de cellules de lépidoptères SF21 avec le baculovirus *lac Z* linéarisé et les plasmides A, B ou C comme décrit précédemment (Tuffereau et al., 1998, J Virol 72, 1085-1091). Des stocks viraux de chacun des recombinants ont été obtenus et dosés en cellules Sf21.

2- Production des protéines recombinantes

Des mono-couches de cellules Sf21 ont été infectées à une multiplicité d'infection de 3 par les différents baculovirus recombinants. Après 1 heure d'adsorption à température ambiante, 10 ml de Milieu TC100 + 2 % SVF est ajouté et les cellules sont incubées à 28°C pendant 3 jours. Trois jours post-infection, les cellules et le milieu sont récupérés, centrifugés (2 000 rpm, 10 min, Beckman J6) pour éliminer les cellules et les débris cellulaires.

Les protéines contenues dans le surnageant sont ensuite directement analysées en conditions réductrices par électrophorèse en gel de poly-acrylamide (10%). Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et les glycoprotéines recombinantes sont révélées par *Western blot* à l'aide d'un anticorps anti-glycoprotéine G (17D2).

La figure 10 illustre la production des 3 différentes protéines recombinantes (A, B et C). Comme attendu, leur migration en gel est en accord avec leur poids moléculaire. C est la molécule la plus lourde et migre donc moins vite dans le gel que B et A. D'autre part, on peut remarquer que la quantité de protéine produite n'est pas équivalente. La protéine recombinante A est produite en beaucoup plus grande quantité que les protéines B et C.

3- Purification des protéines recombinantes sur colonne d'immuno-affinité.

a) Préparation de la colonne d'immunoaffinité

L'anticorps monoclonal anti-glycoprotéine 21H8 est une IgG1. Elle a été purifiée sur protéine G-Sépharose (Sigma) puis couplée de façon covalente à de l'agarose activée (AminoLink Plus® Immobilization Kit, Pierce) selon le protocole fourni. L'efficacité du couplage est supérieure à 90%.

b) Purification de la glycoprotéine G recombinante

La mise au point de la purification a été réalisée avec la protéine recombinante soluble G-(PV)₁₋₄₃₉ et peut être appliquée aux autres protéines recombinantes car elles sont également reconnues par l'anticorps 21H8.

Le surnageant des cellules d'insectes contenant la glycoprotéine soluble est dialysée contre du tampon phosphate pendant quelques heures, puis incubée avec 2 ml d'agarose couplé à l'anticorps 21H8 pendant une nuit à 4° C. L'agarose est ensuite transférée dans une colonne. Un lavage avec 10 ml de tampon Tris-HCl 100 mM pH 8 puis un autre avec 10 ml de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8 sont réalisés ; la glycoprotéine est éluée à pH acide (100 mM glycine, pH 3) et neutralisée par addition de 100 mM de Tris-HCl pH 8. Alternativement, après lavages de la colonne avec du tampon phosphate 10 mM pH 8, elle peut-être éluée à pH basique (diéthylamine, pH 11,5) et neutralisée par addition de tampon Phosphate 1M, pH 6,8. Les glycoprotéines recombinantes purifiées sont ensuite dialysées contre du tampon phosphate pH 7,5 et dosées par la méthode de Lowry.

Après purification, les glycoprotéines G solubles interagissent toujours avec p75.

4- Interaction des glycoprotéines G recombinantes solubles avec p75.

Des cellules COS7 transfectées par le plasmide hp75 et exprimant p75 à leur surface ont été incubées soit avec le surnageant des cellules d'insecte infectées par les baculovirus recombinants et contenant les glycoprotéines G solubles, soit avec la protéine G-(PV)₁₋₄₃₉ purifiée. La fixation des glycoprotéines a été mise en évidence en utilisant le test de coloration à la β -galactosidase comme décrit dans le paragraphe.

Les différentes protéines recombinantes sont capables d'interagir avec p75 et la purification par colonne d'immunoaffinité n'altère pas les propriétés d'interaction avec p75.

5- Oligomérisation des protéines (analyse par sédimentation à l'équilibre en gradient de saccharose)

Des gradients de 12 ml de saccharose 5 à 20 % (poids/volume), préparés dans du tampon TD ont été coulés. 400 μ L de surnageant contenant les protéines recombinantes ont été déposés à la surface du gradient. Après 16 heures de centrifugation à 32 000 rpm (Rotor SW41, Beckman, 4°C), les gradients sont récoltés en fraction de 1 ml (la fraction 1 correspondant au fond du gradient et la fraction 12 au haut du gradient). Un aliquot de chaque fraction est analysé par PAGE comme décrit précédemment. La présence de G est révélée par immunoblot à l'aide de l'anticorps anti-G 17D2.

La figure 11 illustre les résultats obtenus :

Bien que la forme soluble A soit produite en beaucoup plus grande quantité que la forme C, sa migration en gradient est celle d'un monomère alors que celle de C correspond à un trimère. La forme B, produite en très faible quantité, a un comportement intermédiaire suggérant que les trimères formés ne sont pas très stables et se dissocient comme l'indique leur sédimentation à une position intermédiaire entre le monomère et le trimère.

Ces résultats montrent que la présence de la fibratine à l'extrémité C-terminale de la protéine chimère permet de stabiliser le trimère. Cette stabilisation est plus efficace si un linker de 8 glycines sépare le motif de la fibratine de l'ectodomaine de la glycoprotéine G.

EXEMPLE 8 : Expression d'un sous-domaine de la glycoprotéine en bactéries.Clonage :

La séquence nucléotidique correspondant aux acides aminés 291 à 391 de la glycoprotéine de la souche PV a été clonée dans le vecteur d'expression
 5 pET22 b(+) (Novagen).

Les constructions G₂₉₁₋₃₉₁ et G₂₉₁₋₃₉₁-H₆ ont été obtenues par amplification par PCR avec les couples d'amorces respectifs (x9 et y8) et (x9 et y9) et en utilisant le plasmide pcDNA1G_{wt} (Gaudin et al, 1999) comme matrice.

Expression des polypeptides :

Des essais de production après induction par 1 mM d'IPTG dans les
 10 bactéries BL21 ont été réalisés selon le protocole fourni (Novagen). Après induction, le polypeptide est synthétisé (en faible quantité) et reconnu par un anti-sérum polyclonal anti-G.

Glycoprotéines solubles exprimées en baculovirus

15

Nom de la construction	Amorces pour G	Amorces pour Fibratine	matrice	vecteur
G-(PV) ₁₋₄₃₉	x2 et y3		G(PV)	pAc-YM1
G-(CVS) ₁₋₄₃₉	CA1 et Y3		G(CVS)	pAc-YM1
G-(CVS) ₁₋₄₃₂	CA1 et CB13		G(CVS)	pAc-YM1
A	x8 et y7		G(PV)	pVT-Bac
B	CA18 et CB18	FA2 et FB1	G(CVS)	pVT-Bac
C	x8 et CB19	FA3 et FB1	G(PV)	pVT-Bac

Polypeptides exprimés en bactéries

Nom de la construction	Amorces pour G	Matrice	vecteur
g ₂₉₁₋₃₉₁	x9 et y8	G-(PV)	pET-22b(+)
g ₂₉₁₋₃₉₁ -H ₆	x9 et y9	G-(PV)	pET-22b(+)

20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

25

REVENDICATIONS

1°) Peptide capable de se lier spécifiquement au récepteur p75^{NTR}, caractérisé en ce qu'il comprend entre 35 et 101 acides aminés et inclut au moins le fragment correspondant aux positions 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage.

2°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage.

3°) Peptide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence SEQ ID NO:1 suivante :

FNKTX₁MEADAHYX₂X₃X₄X₅X₆WX₇EX₈LPSX₉X₁₀CLX₁₁X₁₂GX₁₃RCH,
dans laquelle : X₁ représente L ou I, X₂ représente K, T ou N, X₃ représente S ou P, X₄ représente V ou I, X₅ représente R, Q, M, L, I, S, K, G ou E, X₆ représente T ou E, X₇ représente N, I, T ou E, X₈ représente I ou L, X₉ représente K, T ou N, X₁₀ représente G ou E, X₁₁ : R ou E, X₁₂ : A ou V et X₁₃ représente G ou E.

4°) Peptide selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence SEQ ID NO:2 :

FNKTLMEADAHYKSVRTWNEILPSKGCLRVGGRCH.

5°) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il correspond aux positions 291-391 de la glycoprotéine G du virus de la rage et présente la séquence SEQ ID NO: 31 suivante :

MTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGFKAYTIFNKTX₁MEADAHYX₂X₃X₄X₅X₆WX₇EX₈LPSX₉X₁₀CLX₁₁X₁₂GX₁₃RCHPY₁VNGVFFNGY₂ILGY₃DY₄Y₅VLIPEMQSSLL,
dans laquelle : Y₁ représente H ou P, Y₂ représente I ou L, Y₃ représente P ou S, Y₄ représente G ou D et Y₅ représente N ou H.

6°) Peptide selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il est constitué par la séquence SEQ ID NO: 32.

MTTKSVSFRRLSHLRKLVPFGFKAYTIFNKTLM EADAHYKSVRTWNEILPSKGCLR VGGRCHPHVNGVFFNGIILGPDGNVLIPEMQSSLL.

7°) Peptide chimère, caractérisé en ce qu'il comprend, à son extrémité N-terminale, un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, et à son extrémité C-terminale, un motif de trimérisation.

8°) Peptide chimère selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend en outre, entre l'extrémité C-terminale dudit peptide et l'extrémité N-terminale dudit motif de trimérisation, un fragment de liaison comprenant entre 1 et 10 aminoacides.

9°) Peptide chimère selon la revendication 7 ou la revendication 8, caractérisé en ce que ledit fragment de liaison comprend au moins 8 glycines.

10°) Protéine chimère, caractérisée en ce qu'elle comprend à son extrémité N-terminale, l'ectodomaine de la glycoprotéine G du virus de la rage correspondant aux positions 1-432 ou aux positions 1-439 de ladite glycoprotéine G, et à son extrémité C-terminale, un motif de trimérisation.

11°) Protéine chimère selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, entre l'extrémité C-terminale dudit ectodomaine de la glycoprotéine G du virus de la rage et l'extrémité N-terminale du motif de trimérisation, un fragment de liaison comprenant entre 1 et 10 aminoacides.

12°) Protéine chimère selon la revendication 11, caractérisée en ce que ledit fragment de liaison comprend au moins 8 glycines.

13°) Peptide chimère selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que ledit motif de trimérisation correspond au domaine de 27 acides aminés provenant de la fibrine du bactériophage T4.

14°) Peptide chimère selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou protéine chimère selon la revendication 13, caractérisée en ce que ledit motif de trimérisation est constitué par la séquence suivante :

G-Y-I-P-E-A-P-R-D-G-Q-A-Y-V-R-K-D-G-E-W-V-F-L-S-T-F-L. (SEQ ID NO: 16).

15°) Molécule complexe, caractérisée en ce qu'elle comprend un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, associé à une molécule d'intérêt, apte à traiter une maladie neurodégénérative.

16°) Molécule complexe selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit peptide ou ladite protéine chimère et ladite molécule d'intérêt sont liés de manière covalente par l'intermédiaire d'un lieu convenable.

17°) Molécule complexe selon la revendication 15 ou la revendication 16, caractérisée en ce que ledit lieu comprend soit un pont S-S, soit un ester, soit un glycane.

18°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14.

19°) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 18, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence suivante :

ttc aac aaa acc R₁ atg gaa gct gat gct cac tac R₂ R₃ R₄ R₅ R₆ tgg R₇
gag R₈ atc ccc tca R₉ R₁₀ tgt ctg R₁₁ R₁₂ gga R₁₃ agg tgt cat,
dans laquelle : R₁ représente un codon L ou un codon I, R₂ représente un codon K, un
codon T ou un codon N, R₃ représente un codon S ou un codon P, R₄ représente un
codon V ou un codon I, R₅ représente un codon R, un codon, Q, un codon M, un codon
L, un codon I, un codon S, un codon K, un codon G ou un codon E, R₆ représente un
codon T ou un codon E, R₇ représente un codon N, un codon I, un codon T ou un
codon E, R₈ représente un codon I ou un codon L, R₉ représente un codon K, un codon
T ou un codon N, R₁₀ représente un codon G ou un codon E, R₁₁ représente un codon
R ou un codon E, R₁₂ représente un codon A ou un codon V et R₁₃ représente un codon
G ou un codon E.

20°) Molécule d'acide nucléique selon la revendication 18 ou la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est correspond à la séquence SEQ ID NO:3
suivante : ttc aac aaa acc ctg atg gaa gct gat gct cac tac aag tca gtc cgg acc tgg aat gag
atc atc ccc tca aag ggg tgt ctg aga gtt gga ggg agg tgt cat.

21°) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il inclut une molécule d'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

22°) Cellule hôte, caractérisée en ce qu'elle inclut un vecteur selon la revendication 21.

23°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend essentiellement (i) un produit sélectionné dans le groupe constitué par une molécule complexe selon l'une quelconque des revendications 15 à 17, une molécule d'acide nucléique nue selon l'une quelconque des revendications 18 à 20 ou un vecteur selon la revendication 21, ladite molécule d'acide nucléique ou ledit vecteur étant associés à une molécule d'intérêt et (ii) au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

24°) Outil de criblage spécifique de molécules modulant la liaison entre la glycoprotéine G du virus de la rage et le récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}) spécifique des cellules neuronales, caractérisé en ce qu'il comprend :

- des cellules exprimant un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, un peptide chimère selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 (élément de liaison 1) ;

- des cellules exprimant le récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}), de préférence, uniquement le CRD1 dudit récepteur (élément de liaison 2).

25°) Outil de criblage selon la revendication 24, caractérisé en ce que lesdites cellules exprimant un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, expriment le peptide constitué par les résidus d'acides aminés 318 à 352 de la glycoprotéine G mature du virus de la rage selon la revendication 2.

26°) Outil de criblage selon la revendication 24 ou la revendication 25, caractérisé en ce qu'au moins l'un des deux éléments de liaison est sous une forme soluble.

27°) Outil de criblage selon la revendication 26, caractérisé en ce que la forme soluble du récepteur de basse affinité des neurotrophines (p75^{NTR}) est constituée d'au moins le fragment CRD1 et au plus par l'ectodomaine du récepteur p75 fusionné à un fragment Fc d'une immunoglobuline IgG1 humaine.

28°) Méthode de sélection de ligands spécifiques du récepteur p75, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la mise en contact d'un outil de criblage selon l'une quelconque des revendications 24 à 27, dans un milieu approprié avec un ligand potentiel marqué et

- la mesure du produit marqué éventuellement lié.

- 5 29°) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou d'une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, pour la préparation d'un médicament utile pour le traitement des maladies génétiques ou acquises impliquant un dysfonctionnement des cellules exprimant le récepteur p75^{NTR}, notamment des maladies neurodégénératives telles que la maladie de
10 Parkinson ou la maladie d'Alzheimer.

 30°) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou d'une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, pour la préparation d'un médicament favorisant la régénération neuronale, notamment en cas de traumatisme ou de lésion de la moelle épinière.

- 15 31°) Utilisation d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 ou d'une protéine chimère selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, pour la préparation d'un médicament utile dans le traitement des cancers.

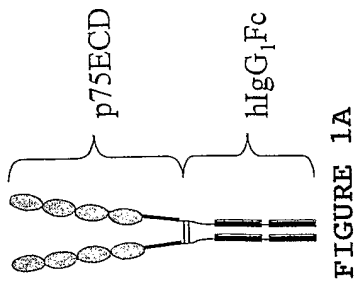


FIGURE 1A

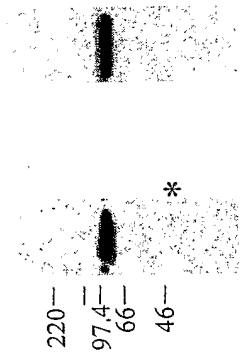


FIGURE 1B

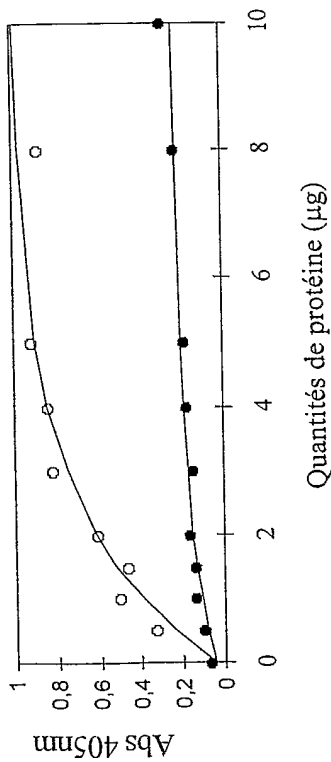


FIGURE 2A

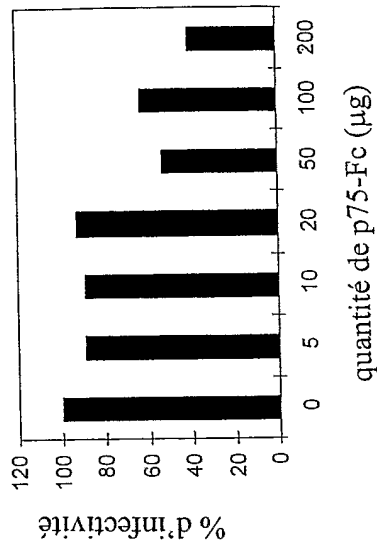


FIGURE 2B

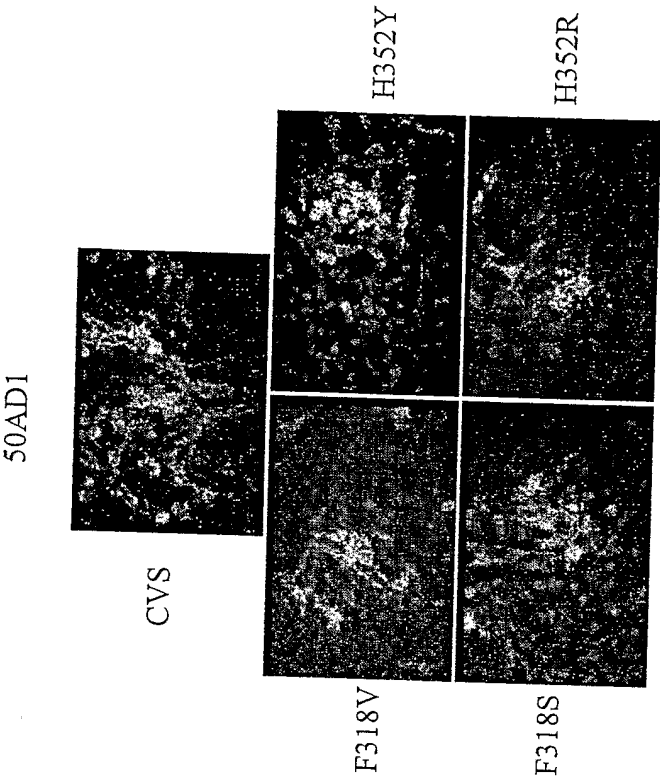


FIGURE 3B



FIGURE 3A

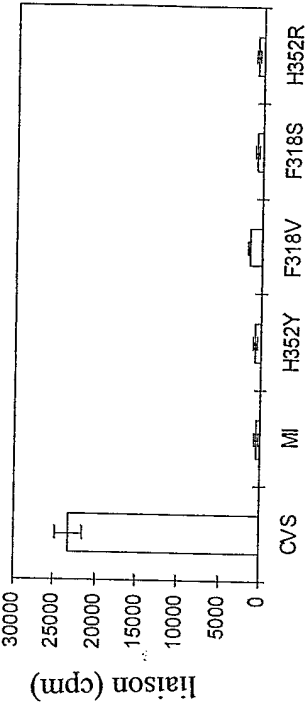


FIGURE 4B

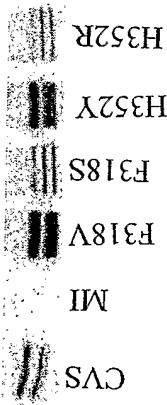


FIGURE 4A

4/10

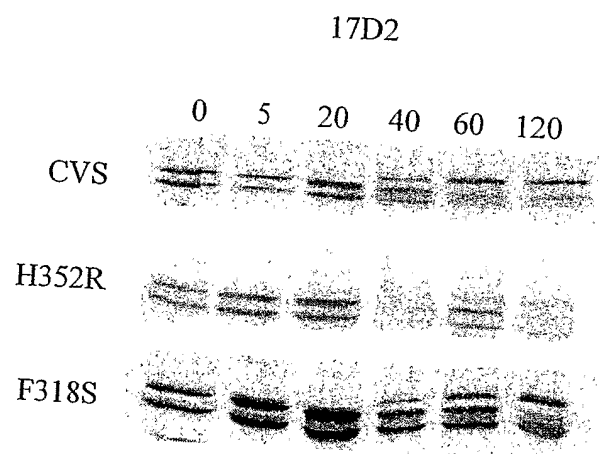


FIGURE 5

5/10

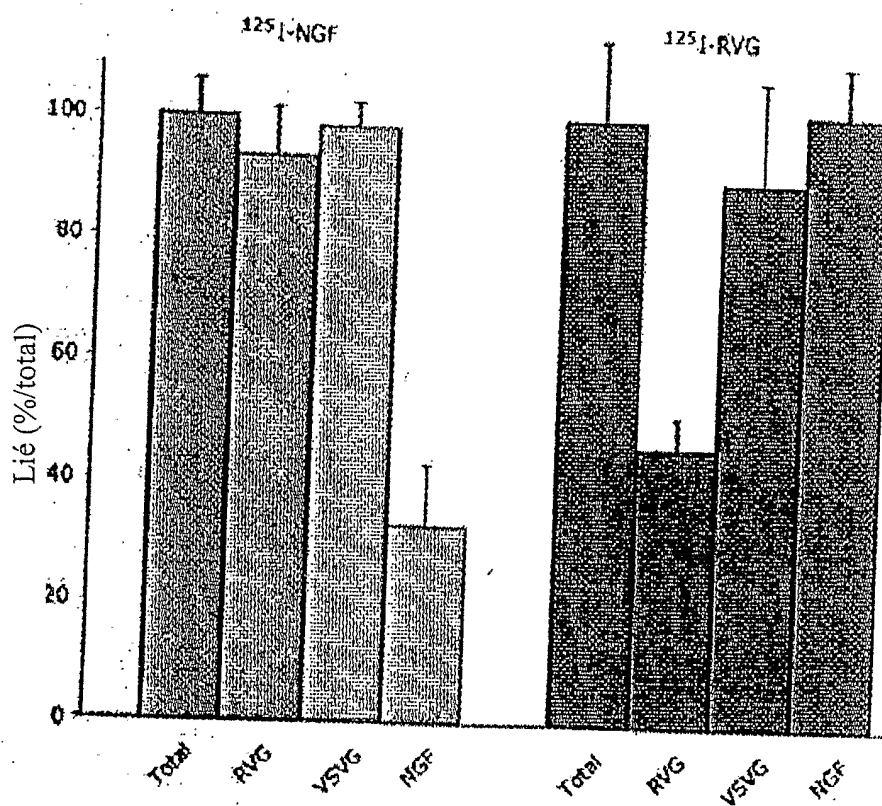


FIGURE 6A

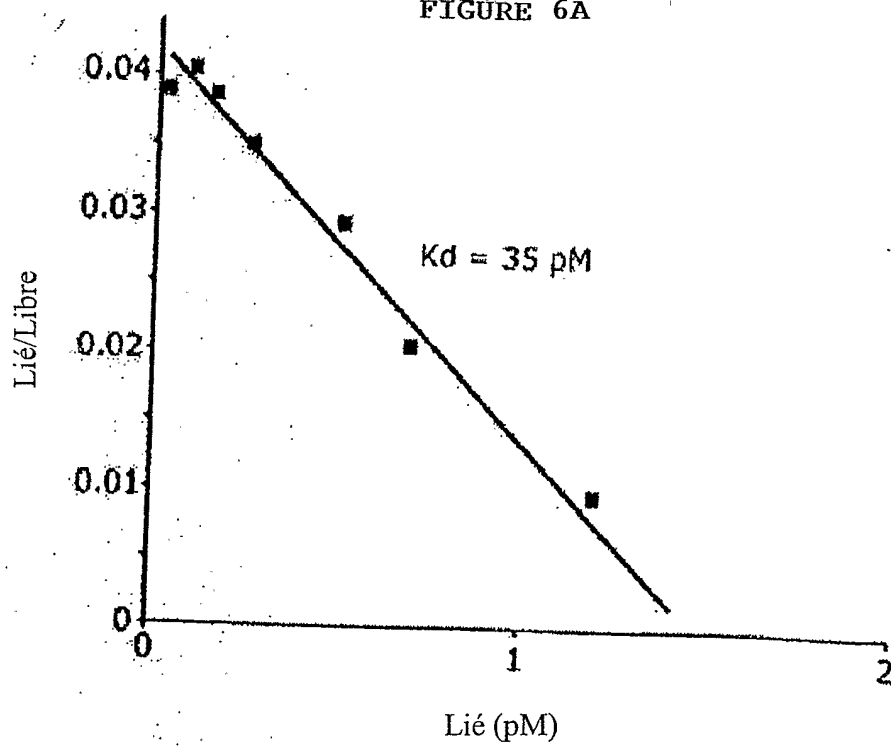


FIGURE 6B

6/10

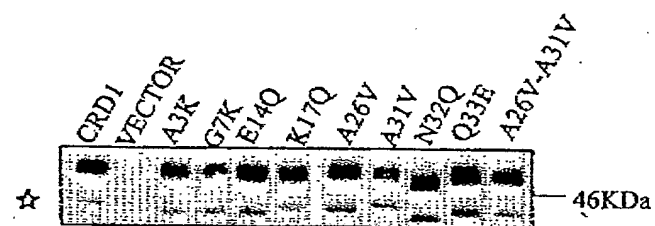


FIGURE 7

7/10

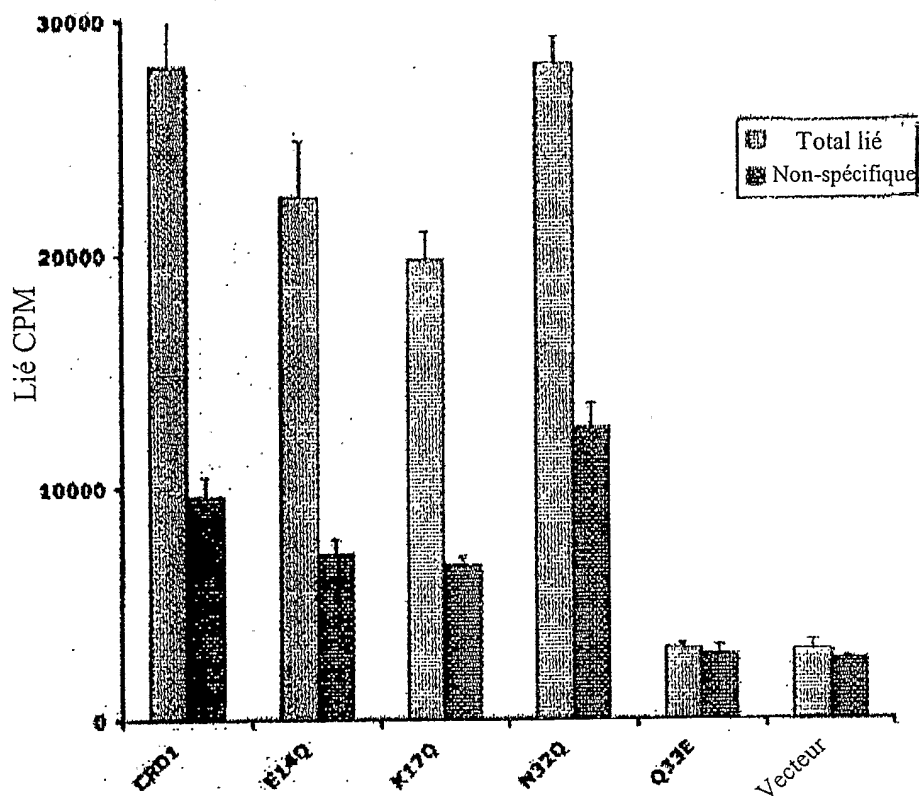


FIGURE 8A

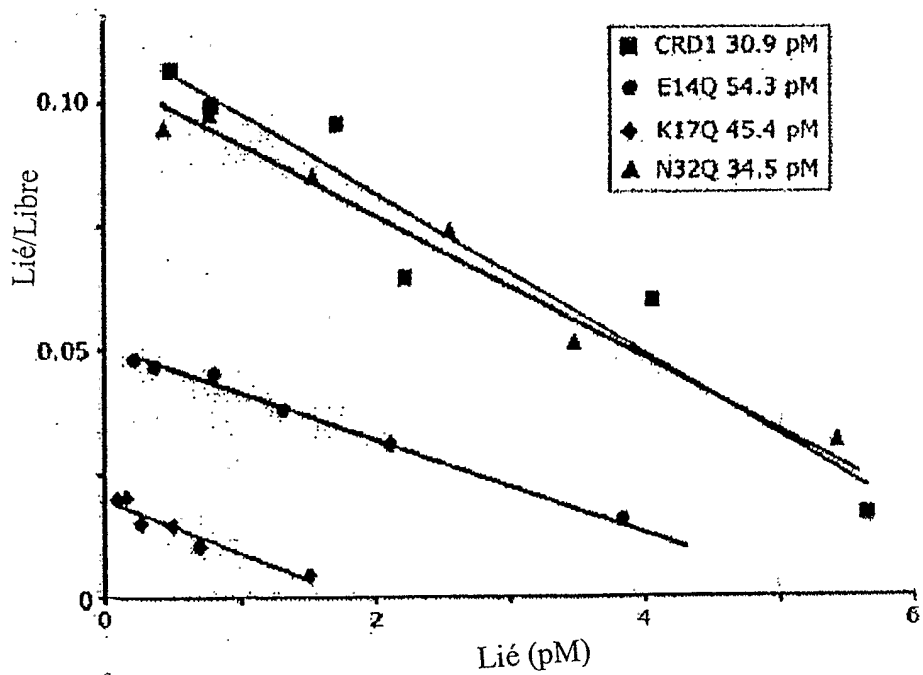


FIGURE 8B

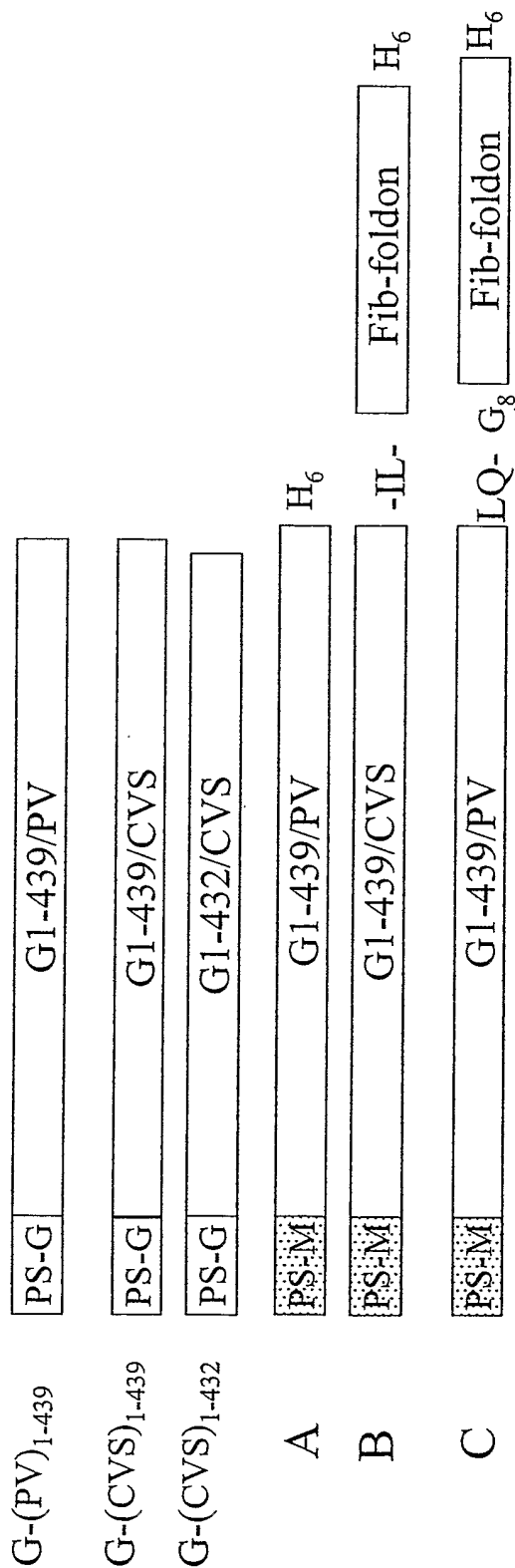


FIGURE 9

9/10

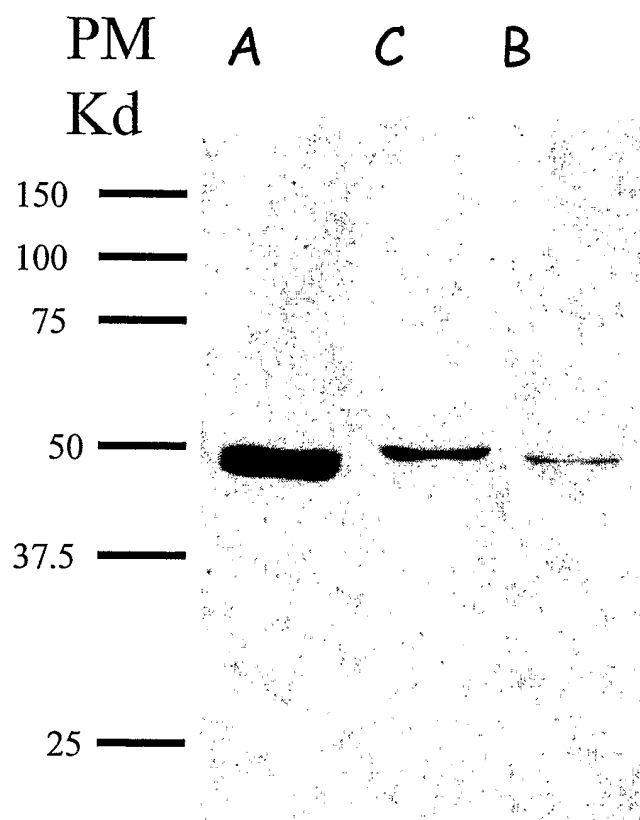


FIGURE 10

10/10

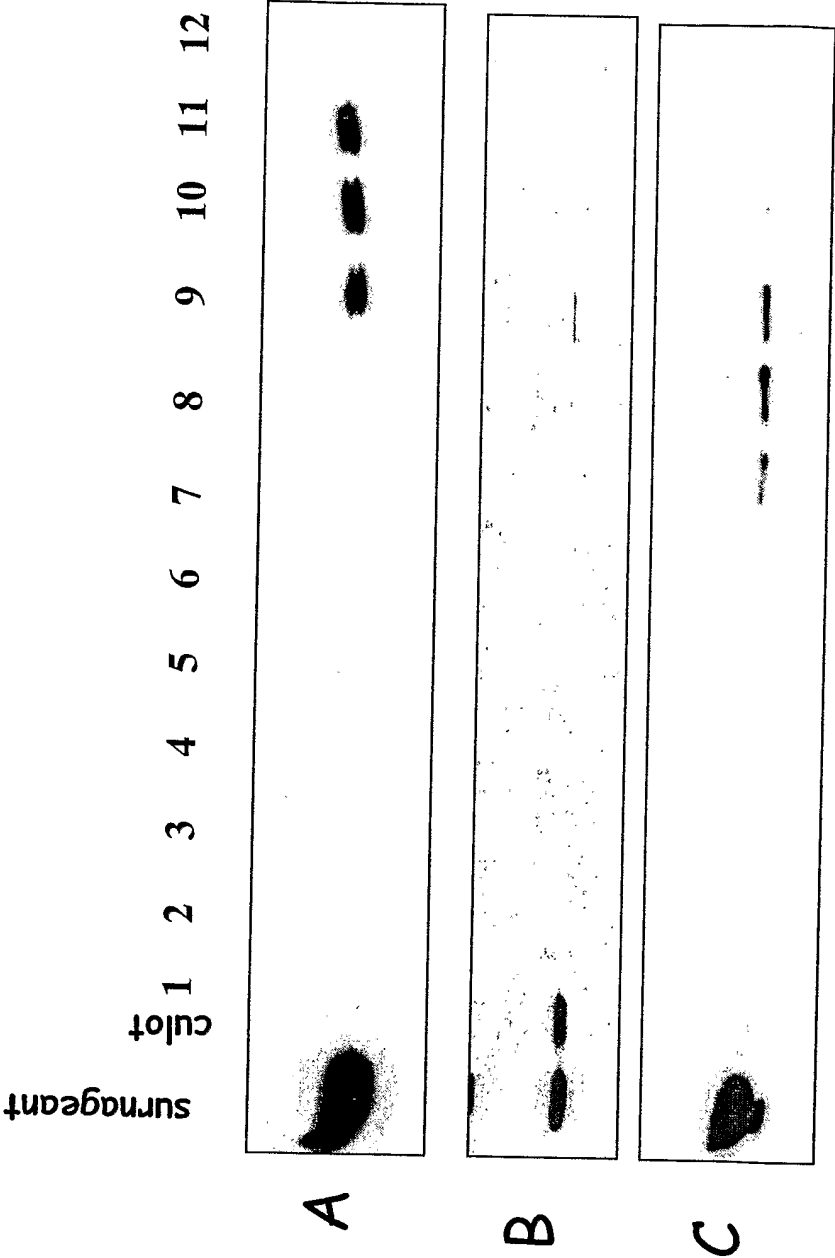


FIGURE 11

0644-0078-SEQ.ST25
SEQUENCE LISTING

- <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS
TUFFERAU, Marie-Christine
LANGEVIN, Christelle
BENEJEAN, Jacqueline
SISSOEFF, Ludmilla
- <120> Peptides issus de la protéine G du virus de la rage,
ligands du récepteur de basse affinité des neurotrophines
(P75 NTR) et leurs applications
- <130> BLOcp-F06440078
- <150> FR0207620
- <151> 2002-06-20
- <160> 32
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 35
- <212> PRT
- <213> virus de la rage
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (5)..(5)
- <223> Xaa= Leu ou Ile
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <222> (13)..(13)
- <223> Xaa= Lys, Thr ou Asn

0644-0078-SEQ.ST25

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (14)..(14)

<223> Xaa= Ser ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (15)..(15)

<223> Xaa= Val ou Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> Xaa= Arg, Gln, Met, Leu, Ile, Ser, Lys, Gly ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (17)..(17)

<223> Xaa= Thr ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)

<223> Xaa= Asn, Ile, Thr ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (21)..(21)

<223> Xaa= Ile ou Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (25)..(25)

0644-0078-SEQ.ST25

<223> Xaa= Lys, Thr ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (26)..(26)

<223> Xaa= Gly ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (29)..(29)

<223> Xaa= Arg ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (30)..(30)

<223> Xaa= Ala ou Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (32)..(32)

<223> Xaa= Gly ou Glu

<400> 1

Phe	Asn	Lys	Thr	Xaa	Met	Glu	Ala	Asp	Ala	His	Tyr	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5				10						15	

Xaa	Trp	Xaa	Glu	Xaa	Leu	Pro	Ser	Xaa	Xaa	Cys	Leu	Xaa	Xaa	Gly	Xaa
			20					25					30		

Arg	Cys	His
		35

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> virus de la rage

0644-0078-SEQ.ST25

<400> 2

Phe Asn Lys Thr Leu Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Arg
 1 5 10 15

Thr Trp Asn Glu Ile Leu Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly
 20 25 30

Arg Cys His
 35

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> virus de la rage

<400> 3
 ttcaacaaaa ccctgatgga agctgatgct cactacaagt cagtccggac ctggaatgag 60
 atcatcccct caaaggggtg tctgagagtt ggagggaggt gtcatt 105

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 4
 gcgggatccc gggcgatggg ggcag 25

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 5
 gccagggatc tcctcacaca cggtctggtt 30

<210> 6

0644-0078-SEQ.ST25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 6

gccagggatc tcctcgaca cggcgtcgtc

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 7

gccagggatc tcctcgaca cggtgttctg

30

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 8

cacgctgtcc aggcaggcac ctccaaggga

30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 9

aaccagaccg tgtgtgagga gatccctggc

30

0644-0078-SEQ.ST25

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10

cgcggtatcct catcacaccg gggatgtggc

30

<210> 11

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 11

gacgacgccg tgtgagagga gatccctggc

30

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 12

cagaacaccg tgtgagagga gatccctggc

30

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

0644-0078-SEQ.ST25

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 13

tcccttgag gtgcctgcct ggacagcgtg

30

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 14

cgcggtctcg agatggacgg gccgcgc

27

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 15

gcggatccca tcggccaggg atc

23

<210> 16

<211> 27

<212> PRT

<213> bactériographe T4

<400> 16

Gly	Tyr	Ile	Pro	Glu	Ala	Pro	Arg	Asp	Gly	Gln	Ala	Tyr	Val	Arg	Lys
1				5					10					15	

Asp	Gly	Glu	Trp	Val	Phe	Leu	Ser	Thr	Phe	Leu
			20					25		

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

0644-0078-SEQ.ST25

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 17

gccggatcca gactcaagga aagatg

26

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 18

gccggatccc aaattcccta ttacac

27

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 19

gggaattcca tatgaccacc aagtcagtg

29

<210> 20

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 20

gccggatccc tacttcccc agttcgggag a

31

<210> 21

0644-0078-SEQ.ST25

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 21

gccggatccc tagtggtggt ggtggtggtg cttccccag ttcgggag

48

<210> 22

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 22

ccgctcgagc tacgaggata ccaacaactc caaatgttgc

40

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 23

ccgctcgagc gaggatacca acaactccaa atgttgc

37

<210> 24

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 24

cgcgggatcc agacttaagg aaagatggtt cc

32

0644-0078-SEQ.ST25

<210> 25

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 25

cgcggtatcct cagtgggtggt ggtgggtggtg cagggtcaacc cctgagat 48

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 26

cgcggtatccc aagttcccca tttta 24

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 27

cgccctgcagc tttccccagt tcgg 24

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

0644-0078-SEQ.ST25

<223> Description de la séquence artificielle: amorce
<400> 28
cgcggtatcct cggttatatt cctgaa 26

<210> 29
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
<400> 29
cgctgcagg gtggtggagg aggtggtgga ggtggttata ttcctgaa 48

<210> 30
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorce
<400> 30
cgcgatttct taatggtgat ggtgatggtg taaaaaggta gaaaggaa 48

<210> 31
<211> 91
<212> PRT
<213> virus de la rage

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (32)..(32)
<223> Xaa= Leu ou Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (40)..(40)

0644-0078-SEQ.ST25

<223> Xaa= Lys, Thr ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (41)..(41)

<223> Xaa= Ser ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> Xaa= Val ou Ile

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (43)..(43)

<223> Xaa= Arg, Gln, Met, Leu, Ile, Ser, Lys, Gly ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> Xaa= Thr ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (46)..(46)

<223> Xaa= Asn, Ile, Thr ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (48)..(48)

<223> Xaa= Ile ou Leu

<220>

<221> MISC_FEATURE

0644-0078-SEQ.ST25

<222> (52)..(52)

<223> Xaa= Lys, Thr ou Asn

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Xaa= Gly ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (56)..(56)

<223> Xaa= Arg ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa= Ala ou Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (59)..(59)

<223> Xaa= Gly ou Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (64)..(64)

<223> Xaa= His ou Pro

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (73)..(73)

<223> Xaa= Ile ou Leu

<220>

0644-0078-SEQ.ST25

<221> MISC_FEATURE

<222> (77)..(77)

<223> Xaa= Pro ou Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (79)..(79)

<223> Xaa= Gly ou Asp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (80)..(80)

<223> Xaa= Asn ou His

<400> 31

Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg Arg Leu Ser His Leu Arg Lys
 1 5 10 15

Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr Thr Ile Phe Asn Lys Thr Xaa
 20 25 30

Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Glu Xaa
 35 40 45

Leu Pro Ser Xaa Xaa Cys Leu Xaa Xaa Gly Xaa Arg Cys His Pro Xaa
 50 55 60

Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Xaa Ile Leu Gly Xaa Asp Xaa Xaa
 65 70 75 80

Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu
 85 90

<210> 32

<211> 91

<212> PRT

<213> virus de la rage

<400> 32

Met Thr Thr Lys Ser Val Ser Phe Arg Arg Leu Ser His Leu Arg Lys
 1 5 10 15

0644-0078-SEQ.ST25

Leu Val Pro Gly Phe Gly Lys Ala Tyr Thr Ile Phe Asn Lys Thr Leu
20 25 30

Met Glu Ala Asp Ala His Tyr Lys Ser Val Arg Thr Trp Asn Glu Ile
35 40 45

Leu Pro Ser Lys Gly Cys Leu Arg Val Gly Gly Arg Cys His Pro His
50 55 60

Val Asn Gly Val Phe Phe Asn Gly Ile Ile Leu Gly Pro Asp Gly Asn
65 70 75 80

Val Leu Ile Pro Glu Met Gln Ser Ser Leu Leu
85 90