

(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
14 février 2019 (14.02.2019)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2019/030461 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/6886 (2018.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2018/052052

(22) Date de dépôt international :
09 août 2018 (09.08.2018)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1757662 11 août 2017 (11.08.2017) FR

(71) Déposants : UNIVERSITE CLAUDE BERNARD
LYON 1 [FR/FR] ; 43, bvd du 11 Novembre 1918, 69100
Villeurbanne (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RE-
CHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR] ; 3, rue
Michel Ange, 75016 Paris (FR). INSTITUT NATIONAL
DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM) [FR/FR] ; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris
(FR).

(72) Inventeurs : CASTELLANI, Valérie ; 20 rue Pierre Cu-
rie, 69500 BRON (FR). DELLOYE-BOURGEOIS, Cé-
line ; 16 rue de la Seiglière, 69740 GENAS (FR). JAC-
QUIER, Arnaud ; 8 chemin des Balmes, 69140 Rillieux-
la-Pape (FR).

(74) Mandataire : REGIMBEAU ; 20, rue de Chazelles, 75847
Paris Cedex 17 (FR).

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

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

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

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

(54) Title: NEUROBLASTOMA BIOMARKERS

(54) Titre : BIOMARQUEURS DU NEUROBLASTOME

(57) Abstract: The present invention relates to a process for the *in vitro* molecular characterization of a neuroblastoma tumour, comprising the following steps: a) measuring, in a sample of said tumour, the level of expression of one or more of the 18 genes encoding proteins selected from the group consisting of: *Sema3C*, *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3D*, *Sema3E*, *Sema3F*, *Sema4C*, *Sema4D*, *Sema6A*, *Sema6D*, *Plexin A1*, *Plexin A2*, *Plexin A3*, *Plexin A4*, *Plexin B1*, *Plexin D1*, *Neuropilin 1* and *Neuropilin 2*, b) comparing the level of expression of said gene or genes measured in step (a) with a reference value determined for the or each of said genes, c) determining the stage of the tumour from one of stages 1, 2, 3, 4 or 4S, as a function of the difference observed between the level of expression of at least one gene and the reference value thereof. The present application also relates to a modulator of the expression or of the activity of a protein selected from the group consisting of: *Sema3C*, *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3D*, *Sema3E*, *Sema3F*, *Sema4C*, *Sema4D*, *Sema6A*, *Sema6D*, *Plexin A1*, *Plexin A2*, *Plexin A3*, *Plexin A4*, *Plexin B1*, *Plexin C1*, *Plexin D1*, *Neuropilin 1* and *Neuropilin 2*, for use thereof in the treatment of the neuroblastoma.

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes: a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en: *Sema3C*, *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3D*, *Sema3E*, *Sema3F*, *Sema4C*, *Sema4D*, *Sema6A*, *Sema6D*, *Plexine A1*, *Plexine A2*, *Plexine A3*, *Plexine A4*, *Plexine B1*, *Plexine D1*, *Neuropiline 1* et *Neuropiline 2*, b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes, c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence. La présente demande concerne également un modulateur de l'expression ou de l'activité d'une protéine choisie parmi le groupe consistant en: *Sema3C*, *Sema3A*, *Sema3B*, *Sema3D*, *Sema3E*, *Sema3F*, *Sema4C*, *Sema4D*, *Sema6A*, *Sema6D*, *Plexine A1*, *Plexine A2*, *Plexine A3*, *Plexine A4*, *Plexine B1*, *Plexine C1*, *Plexine D1*, *Neuropiline 1* et *Neuropiline 2*, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome.

[Suite sur la page suivante]

Publiée:

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

BIOMARQUEURS DU NEUROBLASTOME

DOMAINE DE L'INVENTION

- 5 La présente invention concerne le domaine de l'oncologie, en particulier le diagnostic et le traitement du neuroblastome.

ETAT DE LA TECHNIQUE

- Le cancer est une maladie de l'homme et des animaux qui se traduit par une croissance incontrôlée des cellules endogènes. Le terme « cancer » est utilisé pour désigner la formation de tumeurs malignes et de néoplasmes (tumeurs ou carcinomes). Généralement, la croissance des cancers comporte deux étapes successives, en premier lieu la croissance tumorale locale et dans un second temps, la dissémination cancéreuse.

- La croissance tumorale locale consiste en l'apparition d'un clone tumoral, à partir d'une cellule « transformée », sous l'action d'agents carcinogènes initiateurs et promoteurs.
- 15 La prolifération cellulaire aboutit à la constitution de la tumeur.

La dissémination cancéreuse à partir de la tumeur initiale peut s'effectuer par dissémination régionale et/ou par développement de tumeurs secondaires appelées métastases. Ce phénomène est également désigné comme étant la phase métastatique.

- Les cancers dérivés des cellules de crêtes neurales sont caractérisés par l'apparition de tumeurs solides composées de cellules qui sont issues de la différenciation des cellules de la crête neurale, au cours de l'embryogenèse.

- La crête neurale désigne, chez l'embryon des craniates, une population de cellules transitoires et multipotentes générées à partir de la région la plus dorsale du tube neural. Les cellules de la crête neurale migrent dans l'ensemble de l'embryon au cours du développement et donnent naissance à une grande diversité de types cellulaires chez l'adulte. La crête neurale est à l'origine des mélanocytes (à l'exception des cellules pigmentaires de l'œil), d'une grande partie des os et des cartilages du squelette facial et du cou, de quelques cellules endocrines, et donne naissance à toutes les cellules gliales et à la majeure partie des neurones du système nerveux périphérique.

- 30 Les tumeurs issues des cellules de crête neurale sont de nature diverse et incluent notamment le neuroblastome, les mélanomes, les phéochromocytomes, les

paragangliomes, les chemodectomes, les neurogangliomes, les tumeurs PEC (perivascular epithelioid cell), les tumeurs neuro-ectodermes mélanotiques de l'enfance (MNTI), les carcinomes médullaires de la thyroïde, les tumeurs neuroendocrines gastro-entéro-pancréatiques, le sarcome d'Ewing et tumeurs de même famille, les tumeurs malignes des
5 gaines nerveuses périphériques (MPNSTs) (aussi appelées « Schwannoma malignes », « Neurofibrosarcome », et « Neurosarcome »), les neurofibromes, les perineuriomes, les neurothécomes, les myxomes de gaine nerveuse, certain type de médulloblastomes, et des tumeurs atypiques tératoïdes et rabdoïdes.

Parmi ces tumeurs issues des cellules dérivées de crêtes neurales, le
10 neuroblastome est un cancer pédiatrique responsable de plus de 15% de la mortalité infantile liée au cancer.

On distingue plusieurs stades cliniques du neuroblastome :

- Les stades 1, 2 et 3 sont caractérisés par la présence d'une tumeur plus ou moins volumineuse, mais strictement localisée dans l'abdomen, parfois le
15 long de la colonne vertébrale ou au niveau des glandes surrénales ;
- Le stade 4 correspond à la forme métastatique, de mauvais pronostic ;
- Le stade 4S se caractérise par la présence de métastases hépatiques et cutanées généralement importantes, mais jamais de métastase osseuse. Cette forme assez particulière régresse dans la grande majorité des cas, soit
20 spontanément, soit suite à une chimiothérapie peu agressive.

La caractérisation moléculaire des tumeurs issues de tissus embryonnaires est malaisée car il n'existe pas de tissu sain correspondant au tissu de la tumeur: en effet, les cellules des crêtes neurales ont disparu au cours du développement, et n'existent plus dans
25 un organisme mammifère après sa naissance. Ainsi, il n'existe pas de tissu de référence avec lequel on puisse comparer les taux d'expression des gènes exprimés différemment en cas de cancer.

Les neuroblastomes sont hautement hétérogènes. Actuellement, la caractérisation moléculaire des tumeurs de neuroblastome est principalement basée sur la détection de l'amplification du gène N-myc. En effet, la présence de multiples copies de
30 l'oncogène N-myc dans une cellule tumorale est associée à un risque élevé de développer des métastases, donc pour la tumeur de progresser vers le stade 4 métastatique.

Concernant le traitement du neuroblastome, il se base sur les techniques classiques telles que la chirurgie, la radiothérapie dont la curiethérapie, la chimiothérapie dont l'hormonothérapie, l'immunothérapie et plus récemment la thérapie anti-angiogénique.

5 Cependant, en dépit de progrès récents, ces techniques ne sont pas toutes efficaces, et engendrent, malheureusement fréquemment, une intolérance de la part des patients, ainsi que des effets secondaires sévères tels qu'une dépression médullaire, des vomissements, des nausées, une alopecie, une asthénie, une perte d'appétit, une anémie, une thrombopénie, ou une non préservation des tissus sains.

10 Par exemple, le neuroblastome de stade 4 est traité de manière intensive par chimiothérapie, avec des effets secondaires importants à court et long terme. Seulement 40% des patients guérissent, les autres présentant des rechutes successives avec une issue fatale. Les cas de rechute ne sont pas prédictibles, et aucune thérapie n'est actuellement disponible pour les traiter.

15 Ainsi, il existe actuellement un besoin de procédés permettant de mieux prédire l'évolution d'une tumeur, notamment de déterminer son degré d'agressivité et d'invasivité, sa probabilité de rechute après traitement classique, et de nouveaux actifs anticancéreux plus efficaces, qui agissent sélectivement sur les cellules cancéreuses et leurs voies de signalisation, qui soient moins toxiques, et qui entraînent moins, voire pas ou très peu d'effets secondaires.

20 Des cibles thérapeutiques spécifiques des cellules cancéreuses sont donc activement recherchées pour d'une part distinguer les tumeurs selon leur stade, et d'autre part pour identifier de nouveaux traitements ciblant les différents sous-types de neuroblastomes et qui soient mieux tolérés par les patients.

25 Afin d'identifier de telles cibles, des études de protéomique ont permis de montrer que certaines protéines sont sur-exprimées ou au contraire sous-exprimées dans les tumeurs de neuroblastome, lorsque celles-ci deviennent de type métastatique. Le taux d'expression de ces protéines, ou de leurs gènes associés, est ainsi un indicateur fiable de la sévérité et de l'agressivité de la tumeur.

30 De plus, le taux d'expression de plusieurs gènes codant pour ces protéines spécifiques permet de définir une « signature moléculaire » de la tumeur, d'anticiper son devenir, et donc d'adapter le traitement anti-cancéreux.

Enfin, les protéines identifiées comme étant des biomarqueurs peuvent être utilisées en tant que cibles thérapeutiques. Notamment, les protéines surexprimées dans les

tumeurs métastatiques agressives peuvent être avantageusement régulées grâce à des inhibiteurs spécifiques de leur expression, ce qui conduit les cellules tumorales à adopter un profil moins agressif.

5 Dans le cas des neuroblastomes, plusieurs cibles spécifiques ont été identifiées jusqu'à présent et sont en cours d'investigation thérapeutique, mais très peu ont abouti à des résultats précliniques encourageants.

10 Une surexpression du facteur anti-apoptose Bcl-2 a été mise en évidence dans des tumeurs neuroblastiques ; une inhibition de l'expression de ce facteur résulte en une apoptose massive des cellules tumorales traitées par un tel inhibiteur, validant l'intérêt de cette cible thérapeutique (Lamers *et al.*, 2012).

Une surexpression de l'oncogène Lin28B a été observée dans des cellules de neuroblastome agressif : ce composé agit en régulant négativement la quantité de microARNs de la famille let-7, ce qui entraîne un taux de protéine N-MYC élevé dans les cellules neuroblastiques, induisant l'agressivité de la tumeur. (Molenaar *et al.*, 2012)

15 Une surexpression de la Neuropiline 1 a été observée dans une lignée cellulaire issue de neuroblastome à croissance rapide, en comparaison avec une lignée cellulaire de même origine tissulaire mais à croissance plus lente (Marcus *et al.*, 2005).

20 Une forte expression de la protéine Sema3B a été décrite dans des ganglioneuromes bénins, alors que cette protéine est quasiment indétectable dans des tumeurs malignes de neuroblastome (McArdle *et al.*, 2004).

La demande US 2013/0102485 enseigne que la présence de microRNA de type miR-9 est caractéristique du stade 4 dans les tumeurs de neuroblastome. Une sous-expression de la protéine Plexine C1 dans des tumeurs de stade 4, comparativement à l'expression observée dans les tumeurs de stade 1 et 2, a également été rapportée.

25 D'autres biomarqueurs et cibles thérapeutiques doivent maintenant être identifiés, afin de développer de nouvelles options thérapeutiques pour les patients atteints d'un neuroblastome, et pour mieux distinguer les différents types de tumeurs, autrement que par exploration clinique. La présente invention a pour objet de satisfaire à ces besoins.

30 EXPOSE DE L'INVENTION

La présente invention concerne des procédés de diagnostic et de traitement du neuroblastome.

La présente invention concerne en particulier l'identification de protéines, toutes membres d'une même voie de signalisation cellulaire, dont le taux d'expression, considéré pour une ou plusieurs de ces protéines, varie en fonction du stade de la tumeur, notamment lorsque les cellules cancéreuses progressent d'un stade « non invasif » à un stade invasif, plus agressif.

Plus particulièrement, la présente invention concerne un procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes:

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

La présente invention concerne également un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome.

Plus particulièrement, la présente invention est relative à :

- Sema3C pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S),
- un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S) ; et
- Un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'une ou plusieurs plexine(s) choisie(s) parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome, quel que soit son stade.

DESCRIPTION DES FIGURES

Figure 1. Pour chaque gène biomarqueur codant pour la protéine mentionnée en haut de la figure, un graphique représente les niveaux d'expression du gène mesuré dans plusieurs échantillons de tumeurs, issues d'une cohorte de patients (Kocak and Wolf). Des résultats
5 similaires ont été obtenus sur une deuxième cohorte de patients (Shi and Fisher). Les résultats sont présentés dans l'ordre suivant, de gauche à droite : tumeurs de stade 1 (st1), stade 2 (st2), stade 3 (st3), stade 4 (st4) et stade 4S (st4S). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre d'échantillons pour chaque stade. Les taux d'expression sont reportés en ordonnées.

10 Si un stade se distingue des autres par un taux d'expression moyen/médian significativement différent, la légende indique : Stade différent / autres stades.

Une courbe de corrélation est présentée en bas de figure (en dessous), représentant une courbe de Kaplan-Meier (Kaplan curve) faisant le lien entre le taux d'expression du gène biomarqueur et le taux de survie sans rechute des patients (Follow up in months). L'existence
15 d'une corrélation entre le taux d'expression du gène et un mauvais pronostic de survie est indiquée en dessous de chaque graphe.

A) Figure 1A. Biomarqueurs spécifiques du stade 4.

B) Figure 1B. Biomarqueur spécifique des stades 4 et 4S métastatiques.

C) Figure 1C. Biomarqueurs spécifiques du stade 4S.

20 **Figure 2. Signature génétique des lignées cellulaires neuroblastiques SHEP et IGR-N91.**

Les taux d'expression des gènes codant pour les protéines Plexine A1, Plexine A2, Neuropiline 1, Neuropiline 2, Sema3F, Sema3D, Sema3C, Sema3B et Sema3A ont été mesurés dans des lignées cellulaires immortalisées issues de tumeurs neuroblastiques de
25 stade 4. Ces taux d'expression ont été normalisés par rapport à celui du gène HPRT.

Figure 3. Mesure du facteur de variation d'expression des gènes codant pour les protéines Sema3C, Sema3F et Sema3D, et comparaison avec une valeur de référence

La valeur de référence « 0 » représentée sur la figure correspond à une variation nulle entre le taux d'expression mesuré dans les cellules IGR-N91 avant leur greffe dans un embryon de
30 poulet, et le taux d'expression mesuré dans les cellules IGR-N91 après greffe et incubation pendant 48h de l'embryon greffé.

Les différences observées sont représentées en valeur positives (augmentation du taux d'expression) ou négatives (diminution du taux d'expression) par rapport à la valeur de référence des cellules « naïves » avant leur greffe dans l'embryon.

Figure 4. Effets de de l'introduction d'ARN interférents dirigés contre une séquence inerte *scramble* : *scr* (contrôle : CTL), contre la plexine A1 (PlxnA1) et contre la plexine A2 (PlxnA2)

- A)** Les ARN interférents sont introduits dans des cellules de lignées neuroblastiques SHEP et IGR-N91. La prolifération des cellules est mesurée grâce au kit *Cell Proliferation Reagent WST-1* (Merck).
- B)** Les trois ARN interférents sont introduits dans des cellules neuroblastiques SHEP. L'activation de la caspase-3 est mesurée par la technique DEVD-AFC qui consiste à mesurer la fluorescence émise par le clivage du composé DEVD-AFC par la caspase-3 activée.
- C)** Effets de l'inhibition de l'expression de la plexine A1 (PlxnA1) et de la plexine A2 (PlxnA2) par utilisation d'ARN interférents (siPLxnA1 et siPLxnA2) dans un test de croissance en agar mou sur les cellules neuroblastiques SHEP, en utilisant comme contrôle un ARN interférent dirigé contre une séquence inerte (siCTL). Les clones sont visualisés à l'aide de la fluorescence émise par la GFP, exprimée de manière stable dans les cellules SHEP.
- D)** Mesure de la taille et du nombre de clones formés en agar mou après inhibition de l'expression de la Plexine A1 et de la Plexine A2

Figure 5. Inhibition de l'expression des Plexines A1 et A2 avec les microRNA de la famille miR-30 sous forme polycistronique (« poly », incluant mir-30a, mi-30b, mir-30c') et avec le microRNA mir-30C seul (« c »)

- Les cellules HeLa ont été co-transfectées avec des constructions génétiques codant pour les gènes cibles (PlxnA1, PlxnA2 et Lin28b) intégrés dans un plasmide rapporteur de l'activité des miRNAs (pmiR-Glo luciferase reporter system, promega) et avec les constructions codant pour mir-30 sous forme polycistronique (miR-30 poly) ou pour mir-30C seul (miR-30c). L'expression de ces protéines de fusion est ensuite évaluée en fonction de l'activité de fluorescence mesurée sur les cellules (Firefly/ Renilla luciferase activity).

Figure 6. Rôle pro-métastatique de Sema3C

- A)** Construction génétique permettant d'induire, en présence de doxycycline, l'expression d'un sh-RNA dirigé contre l'ARN messager de Sema3C. Les résultats correspondants sont présentés dans le tableau 3.

B) Les cellules IGR-N91, après introduction transitoire de siRNA dirigés contre Sema3C, ou d'une construction contrôle, sont cultivées sous forme de gouttes, dans un milieu de culture avec ou sans Sema3C.

Les cellules sont cultivées *in vitro* dans un milieu contrôle (à gauche de la figure) ou dans un milieu contenant de la protéine Sema3C. Le pourcentage d'agrégation cellulaire est indiqué sur la courbe des ordonnées. Les points noirs représentent le pourcentage d'agrégation des cellules transformées avec un ARN interférent contrôle (siRNA scr). Les points gris représentent le pourcentage d'agrégation des cellules transformées avec un ARN interférent de type sh-RNA dirigé contre l'ARN messager de sema3C (siRNA Sema3c).

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

Remarques préliminaires

La présente invention est basée sur l'identification de gènes biomarqueurs, codant pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation des sémaphorines, dont le taux d'expression est différent d'une tumeur à l'autre, et cette différence de taux d'expression par rapport à une valeur de référence étant représentative du stade de la tumeur.

La voie de signalisation Sémaphorine/Neuropiline/Plexine est constituée d'un réseau de gènes fonctionnellement associés, codant pour des récepteurs (neuropilines et plexines) et des ligands (sémaphorines) sécrétés et/ou transmembranaires, dont les interactions médient des contrôles de la migration et de la prolifération cellulaire des cellules de neuroblastome.

Les sémaphorines ont été identifiées en premier lieu comme étant des facteurs guidant la progression des axones. Cette famille de protéines comprend plus de 30 membres, répartis en 8 classes : les classes 3 à 7 regroupant les sémaphorines exprimées chez les vertébrés. Toutes les sémaphorines sont caractérisées par la présence d'un domaine 'sema' d'environ 500 acides aminés, localisé près de l'extrémité N-terminale, essentiel pour l'activité de ces protéines. Les sémaphorines de classe 3 (Sema 3A, 3B, 3C, 3D, 3E et 3F) sont les seules à être sécrétées et non transmembranaires chez les vertébrés.

La famille des plexines regroupe neuf récepteurs transmembranaires, caractérisés par la présence dans leur domaine extracellulaire d'un domaine de type « sema » d'environ 500 acides aminés, similaire à celui présent dans les protéines de la famille des sémaphorines. Les plexines sont les récepteurs des sémaphorines, dans certains cas en association avec les neuropilines, et transmettent leur signal via l'activation de voies

intracellulaires. Les plexines possèdent toutes, dans leur domaine intracellulaire, un domaine GAP (GTPase-activating protein) séparé en deux par un domaine RBD (RHO-GTPase-binding domain). La dimérisation des plexines permettrait d'activer le domaine GAP.

5 Quatre classes de plexines ont été définies (A-D) en fonction de leur structure, et regroupe les neuf membres de la famille dénommés A1, A2, A3, A4, B1, B2, B3, C1 et D1.

Chaque plexine présente une spécificité pour la fixation d'une ou plusieurs sémaphorines. Par exemple, les plexines A sont les récepteurs des sémaphorines 6 : la plexine A1 fixe spécifiquement Sema6D, alors que les plexines A2 et A4 lient indifféremment les sémaphorines Sema6A et Sema6B. Toutes les plexines A sont capables de lier Sema3A.
10 La plexine A1 lie Sema3E.

D'abord identifiées pour leur rôle dans le développement du système nerveux, il a ensuite été montré que les plexines sont impliquées dans le développement embryonnaire et notamment dans les processus tels que l'angiogenèse, le développement du cœur, la morphogenèse squelettique et la morphogenèse rénale. (Pour revue, voir Perälä et al.,
15 2012).

Les récepteurs 'Neuropiline1' et 'Neuropiline2' (NPR1, NPR2) agissent en tant que co-récepteurs des sémaphorines, en association avec les plexines qui transmettent le signal à la cellule par l'activation de leur domaine GAP.

Les études portant sur l'implication fonctionnelle de cette voie de signalisation, dans le contexte du développement du système nerveux, montrent que les interactions contractées entre les membres de cette voie régulent le comportement des cellules. Ainsi, la co-expression des ligands et des récepteurs par une même cellule module la sensibilité de réponse de cette cellule aux sémaphorines sécrétées, présentes dans l'environnement extracellulaire. Par exemple, le couple Sema3A/Neuropiline1 exprimé par une cellule diminue la réponse de cette cellule à Sema3A exogène (Moret et al, 2007). De même, le couple
20 Sema3C/Neuropiline régule la réponse à Sema3A, Sema3C et Sema3F exogènes. Il diminue la sensibilité de la cellule aux deux premières et renforce au contraire la réponse à la troisième (Sanyas et al, 2012). D'une manière générale, il y a un contrôle du niveau d'expression des neuropilines à la surface cellulaire, qui détermine la sensibilité des cellules
25 aux ligands. De plus, la co-expression des plexines A et de leurs ligands sémaphorines transmembranaires inhibe la réponse cellulaire aux sémaphorines exogènes. Enfin, il a également été montré qu'en fonction des membres de la voie exprimés, et de ses effecteurs de signalisation au sein de la cellule, l'effet fonctionnel final peut être un effet promoteur ou
30

au contraire inhibiteur de la prolifération et de la migration cellulaire. Ces données expliquent que dans le contexte des cancers, les membres de cette voie de signalisation sont parfois identifiés comme des oncogènes, ou au contraire sont considérés comme des suppresseurs de tumeurs. Des mutations dans les gènes de cette voie de signalisation, comme sema6C et
5 plexine A1 ont par exemple été récemment décrites dans le génome de tumeurs de neuroblastome (Li *et al.*, 2017).

Procédé de caractérisation moléculaire d'une tumeur de neuroblastome

La présente invention concerne un procédé de caractérisation moléculaire *in vitro*
10 d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes:

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : une sémaphorine, une plexine et une neuropiline,
- b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une
15 valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

Il est entendu que la présente invention est relative à une tumeur de
20 neuroblastome, et que les sémaphorines, plexines et neuropilines concernées sont *de facto* celles exprimées par les cellules de neuroblastome.

Ainsi, la présente invention concerne un procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes:

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs
25 des 18 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une
30 valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

Au sens de l'invention, un procédé de caractérisation moléculaire désigne un procédé *in vitro* permettant d'obtenir des informations diverses sur la tumeur : stade, risque de dissémination dans l'organisme, agressivité, résistance à certains traitements thérapeutiques, etc..., cette caractérisation étant indépendante de l'examen clinique.

Les échantillons de tumeurs sont obtenus selon les techniques habituelles, par des expérimentateurs qualifiés. En particulier, des prélèvements sur des patients peuvent être réalisés au sein d'hôpitaux ou de cliniques, dans les services d'oncologie. Il est toutefois précisé que cette étape de prélèvement est exclue du procédé selon l'invention.

La mesure du taux d'expression d'un gène peut être réalisée selon toutes les techniques classiques bien connues de l'Homme du métier. Par exemple, des techniques couramment utilisées sont la qRT-PCR (quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction) et l'hybridation *in situ* sur coupes tissulaires et sur cellules.

L'expression du gène peut également être déterminée via le dosage de son produit, la protéine. Les techniques de mesure quantitative des protéines exprimées sont notamment la technique immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) pour les protéines circulantes, l'immunohistochimie sur coupes tissulaires ou cellules, et le Western blot pour la quantification protéique sur des lysats et/ou fluides.

La présente invention concerne également un procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes:

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux de production d'une ou plusieurs des 18 protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- b) Comparaison du taux de production de la ou desdites protéines mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour la ou chacune desdites protéines,
- c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

Ce procédé de caractérisation pourra être effectué en lieu et place de celui comprenant la mesure du taux d'expression des gènes, ou bien être effectué en sus du procédé comprenant la mesure du taux d'expression des gènes.

Par ailleurs, au sens de l'invention, la mesure du taux de production d'une ou plusieurs protéines inclut la mesure du taux de présence en surface des protéines membranaires ou associées à la membrane, et/ou du taux de sécrétion des protéines par la cellule.

5 En particulier, le taux de présence en surface de protéines membranaires ou associées à la membrane, et la quantité de protéines sécrétées par la cellule, pourront être comparés ce qui donnera des indications supplémentaires sur la caractérisation moléculaire de la tumeur.

10 L'expression « valeur de référence » désigne la valeur chiffrée d'un taux d'expression d'un gène dans une ou plusieurs tumeurs dont le(s) stade(s) est(sont) connu(s). Pour un gène (i), cette valeur sera désignée ci-dessous Vi.

 Selon un aspect préféré de l'invention, la valeur de référence Vi est une moyenne ou une médiane de plusieurs valeurs du taux d'expression d'un même gène, mesurées dans différentes tumeurs de stade connu.

15 Il est ainsi possible de définir une valeur de référence pour chaque gène, spécifique des tumeurs de stade 1, spécifique des tumeurs de stade 2, spécifique des tumeurs de stade 3, spécifique des tumeurs de stade 4 et spécifique des tumeurs de stade 4S. D'autres valeurs de référence peuvent être définies, comme cela sera présenté par la suite.

20 La comparaison de la valeur obtenue à l'étape (a) pour un gène (i), cette valeur étant désignée ci-après Ti, avec la valeur de référence Vi correspondante, permet de déterminer s'il existe, ou non, une différence entre ces deux valeurs.

25 Dans la présente demande, les termes « différence » et « variation » sont utilisés indistinctement, et désignent tous les deux soit une augmentation significative, soit une diminution significative, de la valeur du taux d'expression d'un gène Ti par rapport à sa valeur de référence Vi.

 Au sens de l'invention, une différence (augmentation ou diminution) est considérée comme étant significative par la réalisation de tests statistiques bien connus de l'Homme du métier.

30 Selon un mode de réalisation de l'invention, les valeurs de référence et de taux d'expression mesurés peuvent être normalisées, pour tenir compte de la quantité de biomasse cellulaire. Cette normalisation des valeurs relatives obtenues pour chaque gène

s'obtient en divisant ces valeurs par la valeur du taux d'expression d'un ARN messager représentatif de la quantité de cellules. L'ARN messager représentatif de la quantité de cellules peut notamment être celui de la protéine HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase). Cette même technique de normalisation des valeurs relatives
5 pourra être mise en œuvre lorsque les taux mesurés sont des taux de production de protéines.

Le procédé comprend de plus une étape c) de détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression T_i d'au moins un gène tel que cité ci-dessus, et sa valeur de référence V_i .

10 L'expression « détermination du stade » désigne un aspect particulier de la caractérisation moléculaire de la tumeur, consistant à attribuer à la tumeur un classement parmi les catégories suivantes : stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, ces stades cliniques ayant été définis par les praticiens hospitaliers. Toutefois, le procédé selon l'invention met ici en œuvre une technologie indépendante des investigations cliniques classiques.

15 De manière avantageuse, le procédé selon l'invention peut être réalisé par la mesure, dans l'échantillon de tumeur, du taux d'expression d'un seul gène choisi parmi ceux codants pour Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

20 En effet, chaque biomarqueur peut être utilisé de manière indépendante des autres biomarqueurs pour caractériser de façon moléculaire la tumeur d'où provient l'échantillon étudié.

Toutefois, il peut être pertinent de mesurer le taux d'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines choisies parmi les sémaphorines, les plexines et les neuropilines, afin d'obtenir une « cartographie » aussi dénommée « signature moléculaire »
25 d'une tumeur.

Une telle caractérisation moléculaire d'une tumeur permet aux expérimentateurs de déterminer, en fonction des différences observées avec les valeurs de référence V_i pour chaque gène (i), de la manière la plus précise possible le « statut » de la tumeur, ceci
30 incluant le stade, les risque de métastase, l'agressivité, l'invasivité et les chances de réponse à un traitement de ladite tumeur. Pour des tumeurs de même caractéristique, les variations de cette signature sont représentatives de différences entre les patients.

Avantageusement, la caractérisation moléculaire d'une tumeur selon le procédé de l'invention peut permettre au personnel soignant de choisir le traitement thérapeutique le plus adapté à la tumeur ainsi caractérisée, et ainsi de pratiquer une médecine personnalisée.

Lorsque le taux d'expression de plusieurs gènes est mesuré, il est entendu que le
 5 taux d'expression pourra être mesuré pour deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, quinze, seize, dix-sept, ou dix-huit gènes choisis parmi les gènes codants pour les protéines Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

10 Il est entendu que toutes les combinaisons possibles de deux, trois, quatre, cinq, six, sept, huit, neuf, dix, onze, douze, treize, quatorze, quinze, seize, dix-sept, ou dix-huit gènes choisis parmi les gènes codants pour les protéines Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2 sont
 15 comprises selon l'invention.

Parmi toutes ces combinaisons de 18 gènes, il sera notamment possible de mesurer le taux d'expression des gènes codants pour les protéines suivantes :

- au moins une sémaphorine, au moins une plexine et au moins une neuropiline ;
- 20 - au moins une sémaphorine et au moins une plexine ;
- au moins une sémaphorine et au moins une neuropiline ;
- au moins une sémaphorine ;
- au moins Sema3C ;
- au moins deux sémaphorines et au moins deux plexines ;
- 25 - au moins Sema3D, Sema4C, Plexine A3 et Plexine B1 ;
- au moins trois sémaphorines, au moins quatre plexines et au moins une neuropiline ;
- au moins Sema4C, Sema4D, Sema6D, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B2, Plexine D1 et Neuropiline 1.

30 Il est entendu que, selon le procédé de l'invention, les taux d'expression d'autres gènes que ceux cités ci-dessus pourront être mesurés, et les valeurs obtenues pourront être utilisées pour déterminer le stade de la tumeur. En particulier, le taux d'expression du gène codant pour la Plexine C1 pourra être mesuré, en sus des mesures préalablement décrites.

Selon une première mise en œuvre de l'invention, à l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 8 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema4D, Sema6D, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B2, Plexine D1 et Neuropiline 1.

5 De préférence, le taux d'expression du gène codant pour la Plexine C1 pourra également être mesuré lors de cette mise en œuvre.

Cette combinaison particulière de neuf biomarqueurs est particulièrement indiquée pour distinguer les tumeurs de stade 4, comme cela est présenté dans la figure 1A. En effet, tous ces gènes présentent un taux d'expression significativement différent de ceux
10 relevés dans des échantillons de tumeurs de stade 1, 2, 3 ou 4S.

Dans cette mise en œuvre, la valeur de référence V_i pour chaque gène est obtenue à partir de mesures de taux d'expression du gène (i) sur plusieurs tumeurs dont le stade 1, 2, 3 ou 4S est connu.

La valeur de référence V_i pourra en particulier être le résultat de la moyenne
15 arithmétique, ou de la médiane, calculée à partir des taux d'expression obtenus sur les tumeurs dont le stade 1, 2, 3 ou 4S est connu.

Selon une mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé de caractérisation *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, dans lequel:

- 20 - A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 8 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema4D, Sema6D, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B2, Plexine D1 et Neuropiline 1, et
- A l'étape (b), pour chaque gène, la valeur de référence est une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade
25 clinique 1, 2, 3 et 4S.

Selon une autre mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de détermination du stade d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes :

- 30 a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 8 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema4C, Sema4D, Sema6D, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B2, Plexine D1 et Neuropiline 1,

- b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes, cette valeur de référence étant une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, 3 et 4S, et
- 5 c) Détermination du stade de la tumeur en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

Selon cette mise en œuvre, dans les cas où une différence significative est observée entre le taux d'expression T_i d'un gène dans la tumeur dont le stade doit être déterminé, et sa valeur de référence V_i , cela signifiera que la tumeur est de stade 4.

10

Selon une deuxième mise en œuvre de l'invention, à l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 3 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema3D et Plexine B1.

15 Cette combinaison particulière de trois biomarqueurs est particulièrement indiquée pour distinguer les tumeurs de stade 4S, comme cela est présenté dans la figure 1C. En effet, tous ces gènes présentent un taux d'expression significativement différent de ceux relevés dans des échantillons de tumeurs de stade 1, 2, 3 ou 4.

Dans cette mise en œuvre, la valeur de référence V_i pour chaque gène est obtenue à partir de mesures de taux d'expression du gène (i) sur plusieurs tumeurs dont le

20 stade 1, 2, 3 ou 4 est connu.

La valeur de référence V_i pourra en particulier être le résultat de la moyenne arithmétique, ou de la médiane, calculée à partir des taux d'expression obtenus sur des tumeurs dont le stade 1, 2, 3 ou 4 est connu.

25 Selon une mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé de caractérisation *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, dans lequel:

- A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 3 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema3D et Plexine B1, et
 - A l'étape (b), pour chaque gène, la valeur de référence est une médiane
- 30 du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, 3 et 4.

Selon une autre mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de détermination du stade d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 3 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema4C, Sema3D et Plexine B1,
- 10 b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes, cette valeur de référence étant une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, 3 et 4, et
- c) Détermination du stade de la tumeur en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

15 Selon cette mise en œuvre, dans les cas où une différence significative est observée entre le taux d'expression T_i d'un gène dans la tumeur dont le stade doit être déterminé, et sa valeur de référence V_i , cela signifiera que la tumeur est de stade 4S.

Selon une troisième mise en œuvre de l'invention, à l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour au moins le gène codant pour la protéine Sema3C.

20 L'utilisation de ce biomarqueur est particulièrement indiquée pour distinguer les tumeurs de stade 4 ou 4S, c'est-à-dire les tumeurs de type métastatiques, comme cela est présenté dans la figure 1B. En effet, ce gène présente un taux d'expression significativement différent (son expression est nettement diminuée) de ceux relevés dans des échantillons de tumeurs de stade 1, 2, et 3.

25 Dans cette mise en œuvre, la valeur de référence V pour ce gène est obtenue à partir de mesures de taux d'expression du gène codant pour Sema3C sur plusieurs tumeurs dont le stade 1, 2, ou 3 est connu.

La valeur de référence V pourra en particulier être le résultat de la moyenne arithmétique, ou de la médiane, calculée à partir des taux d'expression obtenus sur des tumeurs dont le stade 1, 2, 3 est connu.

30 Selon une mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé de caractérisation *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, dans lequel:

- A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour au moins le gène codant pour la protéine Sema3C; et
- A l'étape (b), la valeur de référence est une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2 et 3.

Selon une autre mise en œuvre spécifique, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de détermination du stade d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes :

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'au moins le gène codant pour la protéine Sema3C,
- b) Comparaison du taux d'expression du gène mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le gène codant pour Sema3C, cette valeur de référence étant une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, et 3, et
- c) Détermination du stade de la tumeur en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins ce gène et sa valeur de référence.

Selon cette mise en œuvre, dans les cas où une différence significative est observée entre le taux d'expression T du gène *sema3C* dans la tumeur dont le stade doit être déterminé, et sa valeur de référence V, cela signifiera que la tumeur est de stade 4 ou 4S et est donc à un stade métastatique.

Procédé de suivi (« monitoring ») d'une tumeur de neuroblastome

Le procédé selon la présente invention permet avantageusement de suivre l'évolution d'une tumeur chez un patient donné.

Pour cela, le procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur sera réalisé sur des échantillons issus de la même tumeur, mais obtenus à des moments différents, notamment avant et après le début d'un traitement thérapeutique, ou avant et après une intervention chirurgicale, ou encore après une rémission puis lors d'une récurrence de la tumeur.

Plus généralement, l'étape préalable d'obtention de l'échantillon de la tumeur pourra être réalisée à un moment T_1 , et la valeur de référence sera celle obtenue par mesure

du taux d'expression d'un gène sur un échantillon de tumeur obtenu à un moment T_0 , T_0 étant antérieur à T_1 .

Ainsi, l'invention concerne un procédé *in vitro* de suivi de l'évolution d'une tumeur de neuroblastome chez un patient, comprenant les étapes suivantes :

- 5 a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur à un temps T_1 du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines telles que listées précédemment,
- b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- 10 ladite valeur de référence déterminée pour chaque gène ayant été obtenue par la mesure du taux d'expression dudit gène dans un échantillon de tumeur du même patient à un temps T_0 , T_0 étant antérieur à T_1 .

 Selon une mise en œuvre particulière du procédé, le temps T_1 est situé chronologiquement après le début de l'administration d'un traitement thérapeutique au patient ; et le temps T_0 est situé chronologiquement avant le début dudit traitement.

Ainsi, la comparaison du profil moléculaire de la tumeur avant et après le début du traitement permet d'évaluer les effets thérapeutiques du traitement, et éventuellement de l'adapter pour améliorer ses effets.

 Selon cet aspect, la présente invention concerne un procédé *in vitro* de suivi de l'évolution d'une tumeur de neuroblastome chez un patient, comprenant les étapes suivantes :

- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- 25 b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- ladite valeur de référence déterminée pour chaque gène ayant été obtenue par la mesure du taux d'expression dudit gène dans un échantillon de ladite tumeur du même patient obtenu à un temps T_0 , T_0 étant antérieur à T_1 .
- 30

Puces à ADN et kits de diagnostic

L'invention est aussi relative à une puce à ADN portant au moins 18 sondes oligonucléotidiques, chacune des sondes étant spécifique d'un gène parmi les gènes codant pour les protéines suivantes : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

Selon une mise en œuvre particulière, ladite puce à ADN portera au moins les 18 sondes oligonucléotidiques spécifiques des gènes codant pour les protéines citées ci-dessus.

Selon une mise en œuvre particulière, ladite puce à ADN portera d'autres sondes oligonucléotidiques en sus des 18 citées ci-dessus, et notamment pourra porter une sonde spécifique du gène codant pour la protéine Plexine C1.

La présente invention concerne également un kit de diagnostic permettant de mettre en œuvre le procédé tel que décrit ci-dessus, comprenant les composants suivants :

- Une puce à ADN telle que décrite ci-dessus, et
- Des réactifs permettant la quantification, dans un échantillon de tumeur de neuroblastome, du taux d'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes codant pour les protéines suivantes : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

L'invention concerne également l'utilisation de cette puce à ADN et/ou de ce kit de diagnostic pour caractériser *in vitro* une tumeur de neuroblastome, d'un point de vue moléculaire.

L'invention concerne également l'utilisation de cette puce à ADN et/ou de ce kit de diagnostic pour suivre *in vitro* l'évolution d'une tumeur de neuroblastome chez un patient.

Composés thérapeutiques pour leur utilisation dans le traitement du neuroblastome

On entend par « traiter le cancer » le fait de ralentir ou d'inhiber totalement le développement d'une tumeur chez le patient, et/ou le fait de faire disparaître complètement du corps du patient toutes les cellules cancéreuses et en particulier la tumeur d'origine.

Plus spécifiquement, la notion de « traitement du neuroblastome » recouvre plusieurs aspects tels que la réduction de la taille de la tumeur, la disparition de la tumeur primaire et/ou des tumeurs secondaires (métastases) et la prévention des récives.

Des compositions pharmaceutiques destinées à traiter certains cancers, 5 comprenant des sémaphorines, ont préalablement été décrites (voir notamment la demande internationale WO 2009/056091). Toutefois, aucune de ces compositions n'avait été envisagée pour traiter de manière spécifique le neuroblastome.

La présente invention décrit des cibles thérapeutiques pour le traitement du neuroblastome : il s'agit des protéines Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, 10 Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

Par composé thérapeutique, on entend un composé efficace pour ralentir ou inhiber le développement d'une tumeur de neuroblastome chez le patient, et/ou un composé permettant de faire disparaître une tumeur de neuroblastome. Par « tumeur » on entend une 15 tumeur primaire ou une tumeur secondaire (métastase) issue de la dissémination de la tumeur primaire.

Plus spécifiquement, au sens de l'invention, un tel composé thérapeutique consiste en un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, 20 Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

L'invention concerne donc un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, 25 Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome.

Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, le modulateur de l'expression ou de l'activité est celui d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, 30 Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

L'expression « modulateur de l'expression ou de l'activité » désigne un composé capable d'influencer de manière spécifique l'expression ou l'activité d'une protéine choisie parmi la liste ci-dessus.

5 Il pourra s'agir, en fonction de la protéine ciblée, d'un activateur ou d'un inhibiteur de ladite expression ou activité.

L'Homme du métier saura choisir parmi les différents composés susceptibles de présenter l'activité requise : par exemple, l'inhibition de l'expression d'une protéine pourra être réalisée à l'aide d'ARN interférents ou de microARNs ; l'inhibition de son activité pourra être réalisée par l'utilisation d'antagonistes, notamment des anticorps ; et la stimulation de son expression pourra être obtenue grâce à des composés stabilisateurs des molécules d'ARN messagers.

15 Il est à noter que les séquences de ces protéines, notamment des protéines humaines, ainsi que les séquences des gènes codant ces protéines, sont accessibles dans les bases de données publiques et peuvent être utilisées pour générer des composés inhibiteurs ou activateurs de l'expression ou de l'activité desdites protéines.

La présente invention concerne également une méthode pour traiter le neuroblastome, comprenant l'administration à un patient atteint de ce cancer d'un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, 20 Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2.

Selon une mise en œuvre particulière, ledit modulateur est un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C, et le neuroblastome traité est un neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S).

25 L'invention concerne également la protéine Sema3C pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S).

En effet, les inventeurs ont identifié le rôle pro-métastatique d'une diminution de l'expression de Sema3C : comme cela est montré en figure 6B, et dans le tableau 3, en cas de diminution de l'expression de Sema3C, les cellules qui auparavant avaient un 30 comportement cohésif se désagrègent et migrent vers d'autres tissus. Les résultats présentés en figure 6B démontrent que la cohésion de ces cellules peut être rétablie par ajout d'une protéine Sema3C exogène.

Ainsi, la protéine Sema3C ou tout composé capable d'activer son expression ou son activité, ou encore tout composé capable de mimer son activité, sont susceptibles d'être utilisé dans le traitement du neuroblastome de stade métastatique.

5 Il est entendu que le terme « Sema3C » désigne à la fois la protéine en tant que telle, mais également ses formes dérivées ainsi que des peptides ou des agonistes mimant l'activité de cette protéine, et inclut également les acides nucléiques codant pour une protéine Sema3C, humaine ou non, ou leurs homologues codant pour une protéine d'une autre espèce, présentant la même fonction biologique.

10 L'invention concerne également une méthode pour traiter le neuroblastome de stade métastatique, et/ou pour prévenir les métastases chez un patient présentant une tumeur de neuroblastome à un stade non-métastatique, comprenant l'administration audit patient d'une protéine Sema3C, ou d'un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C.

15 Selon une mise en œuvre particulière, ledit modulateur pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome est un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine choisie parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1.

Selon une mise en œuvre particulière, ledit modulateur est un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine choisie parmi Plexine A1 et Plexine A2.

20 Plus particulièrement, ledit modulateur est un inhibiteur de l'expression ou de l'activité de la Plexine A1.

Plus particulièrement, ledit modulateur est un inhibiteur de l'expression ou de l'activité de la Plexine A2.

25 La présente invention concerne également une méthode pour traiter le neuroblastome, comprenant l'administration à un patient atteint de ce cancer d'un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine choisie parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1.

Selon un premier mode réalisation de l'invention, l'inhibiteur d'au moins une plexine est un inhibiteur de son activité.

30 Un inhibiteur de l'activité d'une plexine est un composé agissant sur l'une des activités ci-dessous, en la contrariant :

(i) la capacité de la plexine à former un homodimère,

(ii) sa capacité à lier son ou ses ligand(s) naturel(s),

(iii) sa capacité à activer l'une des voies de signalisation intracellulaire suite à la fixation du ou de ses ligand(s) naturel(s).

Un inhibiteur agissant sur la capacité de la plexine à former un homodimère sera
5 notamment une molécule protéique, en particulier un peptide ou un anticorps, capable de modifier la conformation spatiale de la plexine afin d'empêcher sa dimérisation avec une autre plexine.

Un inhibiteur agissant sur la capacité de la plexine lier son ou ses ligand(s) naturel(s), telle qu'une sémaphorine, sera notamment une molécule protéique, en particulier
10 un peptide ou un anticorps, capable de modifier la conformation spatiale de la plexine afin d'empêcher la liaison de la sémaphorine, et/ou capable de bloquer ou d'encombrer stériquement le site de fixation de la sémaphorine.

Un inhibiteur agissant l'une des voies de signalisation intracellulaire activée par une plexine sera notamment une molécule protéique, en particulier un peptide ou un
15 anticorps, capable de modifier la conformation spatiale de la plexine afin d'empêcher l'activation des domaines catalytiques présents dans le domaine intracellulaire de la plexine, ou de bloquer le site de liaison aux protéines intracellulaires impliquées dans cette voie de signalisation.

Il est entendu qu'un même inhibiteur de l'activité d'au moins une plexine pourra
20 agir sur plusieurs capacités de ladite plexine, comme par exemple sur sa capacité à former un homodimère et à lier son ligand naturel.

Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, l'inhibiteur de l'activité d'au moins une plexine est choisi parmi un anticorps ou un peptide.

Selon un deuxième mode de réalisation de l'invention, l'inhibiteur d'au moins une
25 plexine est un inhibiteur de son expression.

L'homme du métier connaît de nombreux moyens de réduire l'expression d'une protéine, qui incluent de manière non limitative toutes les technologies de modification génétique, et tous les facteurs inhibant la transcription du gène codant pour une plexine, ou encore la traduction de l'ARN messager vers la protéine ; ces moyens englobent l'utilisation
30 d'ARN interférents et de microARNs.

Un tel inhibiteur de l'expression de la plexine sera en particulier un inhibiteur réduisant efficacement, c'est-à-dire d'au moins 40%, ou mieux d'au moins 60%, ou encore mieux d'au moins 80%, l'expression de la plexine contre laquelle il est dirigé.

Plus particulièrement, l'inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine peut être un inhibiteur d'expression choisi parmi un ARN interférent et un micro-ARN.

Selon une mise en œuvre particulière de l'invention, l'inhibiteur est un ARN interférent inhibant l'expression d'au moins une plexine.

5 Les ARN interférents sont des ARNs s'hybridant à l'ARN messager (ARNm) produit d'expression du gène comprenant la séquence codant pour la plexine. Les ARNs interférents inhibent la traduction soit par simple encombrement stérique, soit en favorisant le clivage de l'ARNm.

10 Les technologies d'ARN interférents et leur usage *in vitro* et *in vivo* sont bien connues de l'homme du métier, et sont décrits dans de nombreux articles scientifiques et demandes de brevet. De manière préférentielle, les ARN interférents sont préparés et sélectionnés pour obtenir au moins 40 % d'inhibition de l'expression du gène cible dans une cellule, voire au moins 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % voire plus de 99 % d'inhibition.

15 Parmi les ARN interférents, les « siRNA » pour Small Interfering RNA ou ARN interférent de petite taille, sont des séquences courtes d'environ 15 à 30 paires de bases (bp), de préférence de 19 à 25 bp. Le design et la préparation des siRNA et leur utilisation pour la transfection de cellules *in vivo* et *in vitro* sont bien connus et décrits dans de nombreuses publications.

20 Les siRNA peuvent être conçus et préparés en employant des logiciels appropriés disponibles en ligne, bien connus de l'homme du métier.

Les siRNA peuvent également être commandés auprès de sociétés commerciales spécialisées, telles que Santa Cruz et Sigma-Aldrich, qui fournissent sur demande des siRNA pré-désignés.

25 Parmi les ARN interférents, on citera également les « shRNA » ou petits ARN en épingle à cheveux, qui sont des ARN adoptant une structure en tige et boucle.

30 La présente invention concerne également un vecteur pour l'expression d'un ARN interférent tel que défini ci-dessus et ci-après, lequel vecteur comprenant un acide nucléique comprenant une séquence codant pour ledit ARN interférent placé sous le contrôle d'un ou plusieurs éléments de régulation permettant l'expression dudit ARN interférent dans une cellule hôte.

L'invention concerne aussi un vecteur pour la délivrance d'un ARN interférent dans une cellule hôte, caractérisé en ce qu'il comprend un ARN interférent selon l'invention,

défini ci-dessus et ci-après et des moyens permettant la délivrance dudit ARN interférant dans une cellule hôte. De tels moyens sont connus de l'homme du métier, comme par exemple les lipides lipofectamines (<http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=4005>) ou Mirus (<http://www.mirusbio.com/products/rnai/index.asp>).

5 Des ARN interférents capables d'inhiber l'expression de certaines plexines ont été décrits dans l'art antérieur, et sont incorporés dans la présente demande par référence.

On peut citer notamment :

- des ARN interférents inhibant l'expression de la plexine A1 ont été utilisés pour élucider les voies de signalisation activées en réponse à la fixation de la sémaphorine Sema6D (Catalano *et al.*, 2009) ;
- 10 - des ARN interférents de type shRNA inhibant l'expression des plexines A1, A2, A3 et A4 ont été utilisés dans des cellules endothéliales HUVEC (Kigel *et al.*, 2011) ;
- des ARN interférents de type shRNA inhibant l'expression de la plexine A1 ont été introduits dans des cellules gastriques cancéreuses MGC803, entraînant une
- 15 diminution des niveaux de VEGFR2 (Lu *et al.*, 2016) ;
- des ARN interférents de type shRNA inhibant l'expression de la plexine A1 ont été utilisés dans des cellules de carcinome pulmonaire (Yamada *et al.*, 2016).

Selon une autre mise en œuvre particulière de l'invention, l'inhibiteur est un micro-ARN inhibant l'expression d'au moins une plexine.

20 Les micro-ARN, en abrégé miARN, sont des acides ribonucléiques (ARN) simple-brin, courts (de 21 à 24 nucléotides), exprimés uniquement dans les cellules eucaryotes.

Les miARN sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'inhiber l'expression d'un gène : leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression traductionnelle ou à la dégradation de cet

25 ARN messager.

Chez l'Homme, les micro-ARN sont abondants dans un grand nombre de types cellulaires, et cibleraient environ 60 % des gènes. Ainsi, des thérapies fondées sur les miARN sont actuellement à l'étude, ces thérapies visant à inhiber spécifiquement l'expression de certains gènes, notamment impliqués dans les processus tumoraux.

30 Ainsi, l'inhibition de l'expression d'au moins une plexine pourra être réalisée par l'utilisation d'au moins un micro-ARN ciblant spécifiquement cette plexine.

Selon un aspect préféré de l'invention, le microARN utilisé pour le traitement du neuroblastome est un microARN de la famille des miR-30.

L'expression de la famille miR-30 est très fortement diminuée dans les neuroblastomes agressifs, suggérant que ceux-ci pourraient réguler la croissance tumorale des neuroblastomes.

Les résultats des expériences menées par les inventeurs, présentés en figure 5, 5 démontrent que ce microARN a un net effet sur l'expression des plexines A1 et A2, l'inhibition d'expression étant significative et étant accompagnée d'un effet fonctionnel puisque les cellules de neuroblastome présentent une prolifération diminuée lorsque l'expression des plexines est ainsi inhibée.

La présente invention concerne également un vecteur pour l'expression d'un 10 micro-ARN tel que défini ci-dessus, lequel vecteur comprenant un acide nucléique comprenant une séquence codant pour ledit micro-ARN placé sous le contrôle d'un ou plusieurs éléments de régulation permettant l'expression dudit micro-ARN dans une cellule hôte.

L'invention concerne aussi un vecteur pour la délivrance d'un micro-ARN dans 15 une cellule hôte, caractérisé en ce qu'il comprend un micro-ARN tel que défini ci-dessus, et des moyens permettant la délivrance dudit micro-ARN dans une cellule hôte.

La présente invention concerne également une composition pharmaceutique pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome, comprenant dans un milieu 20 pharmaceutiquement acceptable, au moins un composé thérapeutique choisi parmi le groupe consistant en :

- un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, 25 Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C,
- Sema3C, et
- un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine choisie 30 parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1.

Un milieu pharmaceutiquement acceptable désigne un véhicule permettant de conserver et d'administrer l'inhibiteur selon l'invention, et optionnellement des excipients,

dont l'administration à un individu ou un animal ne s'accompagne pas d'effets délétères significatifs, et qui sont bien connus de l'homme du métier.

Une composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'invention peut comprendre tout excipient pharmaceutique nécessaire, tels que des agents tampons ou des agents pour ajuster le pH ou l'isotonicité, ou encore des agents mouillants. Une composition pharmaceutique selon l'invention peut également comprendre un ou plusieurs agents anti-oxydants, et/ou un ou plusieurs agents conservateurs.

Une composition pharmaceutique telle que décrite ci-dessus peut être administrée par toute voie convenable, telle que la voie orale, buccale, sublinguale, ophtalmique, rectale, topique, ou par la voie parentérale, notamment par une voie intrapéritonéale, intradermique, sous-cutanée, intraveineuse ou intramusculaire.

Une composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'invention peut être formulée pour l'administration par voie orale, sous forme d'un comprimé, d'une capsule ou d'une gélule, à libération prolongée ou contrôlée, d'une pilule, d'une poudre, d'une solution, d'une suspension, d'un sirop ou d'une émulsion.

Selon un autre mode de réalisation, une composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'invention peut être préparée pour une administration par voie parentérale, sous une forme injectable. Un polypeptide ou un acide nucléique tels que décrits dans l'invention peut être formulé avec différents véhicules, tels qu'un liposome ou un polymère de transfection.

Une composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'invention peut de préférence comprendre un acide nucléique, notamment un ARN interférent ou un microARN tels que définis dans la présente description, en suspension dans un véhicule pharmaceutiquement acceptable, par exemple un véhicule aqueux. Différents véhicules aqueux peuvent être utilisés, par exemple de l'eau, une solution tampon saline, une solution de glycine à 0,4 % ou 0,3 %, ou une solution d'acide hyaluronique.

Une composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'invention peut être stérilisée par toute méthode conventionnelle connue, telle que la filtration. La solution aqueuse résultante peut être conditionnée pour être utilisée en l'état, ou être lyophilisée. Une préparation lyophilisée peut être combinée avec une solution stérile avant utilisation.

Selon une mise en œuvre préférée de l'invention, la composition pharmaceutique comprend une quantité efficace d'un composé thérapeutique tel que défini ci-dessus.

Une quantité efficace d'un composé thérapeutique est une quantité qui, seule ou en combinaison avec des doses ultérieures, induit la réponse désirée, à savoir un effet antiprolifératif à l'égard des cellules cancéreuses. La quantité efficace d'un tel inhibiteur peut dépendre d'un paramètre ou d'une pluralité de paramètres, tel que la voie d'administration, l'administration en dose unique ou multiple, les caractéristiques du patient, ce qui englobe l'âge, la condition physique, la taille, le poids et la présence d'affections en plus de celle traitée. Ces paramètres et leurs influences sont bien connus de l'homme de l'art et peuvent être déterminés par toute méthode connue.

Préférentiellement, ladite composition pharmaceutique comprend en tant que composé thérapeutique un ARN interférent ou un microARN inhibant l'expression d'au moins une plexine choisie parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1, et notamment un microARN de la famille des miR-30.

La présente invention concerne également un produit de combinaison pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome comprenant :

- au moins un composé thérapeutique choisi parmi le groupe consistant en :
 - un modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
 - un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C,
 - Sema3C, et
 - un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine d'au moins une plexine choisie parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1,

- au moins un agent de chimiothérapie ou un agent anti-angiogénique ou un agent d'immunothérapie.

Un agent de chimiothérapie convenant à l'invention peut être choisi parmi des cytostatiques, des antimétabolites, des substances intercalantes de l'ADN, des composés inhibiteurs des topoisomérases I and II, des inhibiteurs de tubuline, des agents alkylants, la néocarcinostatine, la calichéamicine, la dynémicine or l'espéramicine A, des composés

inhibiteurs des ribosomes, des inhibiteurs des tyrosine phosphokinases, des composés induisant la différenciation cellulaire, ou des inhibiteurs de l'histone déacétylase.

En particulier, un agent de chimiothérapie convenant à l'invention peut être choisi, de manière non limitative :

- 5
 - parmi des cytostatiques et des antimétabolites, tels que la 5-fluorouracile, la 5-fluoro-cytidine, la 5-fluoro-uridine, la cytosine arabinoside ou le méthotrexate,
 - parmi des substances intercalantes de l'ADN, telle que la doxorubicine, la daunomycin, l'idarubicin, l'épirubicin ou le mitoxantrone,
- 10
 - parmi des composés inhibiteurs des topoisomérases I and II, telles que la camptothécine, l'étoposide ou le m-AMSA,
 - parmi des inhibiteurs de tubuline, telle que la vincristine, la vinblastine, la vindésine, le taxol, le nocodazole ou la colchicine,
 - parmi des agents alkylants, telle que la cyclophosphamide, la mitomycin C, la rachelmycine, le cisplatine, le gaz moutarde phosphoramidate, le melphalan, la bléomycine, la N-bis(2-chloroethyl)-4-hydroxyaniline,
- 15
 - parmi la néocarzinostatine, la calichéamicine, la dynémicine ou l'espéramicine A,
 - parmi des composés inhibiteurs des ribosomes, telle que la verrucarine A,
- 20
 - parmi des inhibiteurs des tyrosine phosphokinases, telle que la quercétine, la génistéine, l'erbstatine, la tyrphostine ou la rohitukin et ses dérivés,
 - parmi des composés induisant la différenciation cellulaire, tel que l'acide rétinoïque, l'acide butyrique, les esters de phorbol ou l'aclacinomycine, ou encore
- 25
 - parmi des inhibiteurs de l'histone déacétylase, tel que CI-994 ou MS275.

Un agent inhibant l'angiogénèse convenant à l'invention peut être choisi parmi les listes suivantes, non limitatives :

- des anticorps monoclonaux ciblant le VEGF tel que le Bevacizumab,
- des composés protéiques mimant des domaines des récepteurs du VEGF,
- 30
 - tel que l'Aflibercept,
 - des inhibiteurs des tyrosine phosphokinases tel que le Sorafenib, le Sunitinib, le Pazopanib, l'Axitinib, le Vantetanib ou le Cabozantinib,
 - des analogues de la rapamycine tel que le Temsirolimus ou l'Everolimus.

Un agent d'immunothérapie convenant à l'invention peut être choisi parmi

- des cytokines, telle que l'interleukine-2,
- des cellules du système immunitaire, notamment des cellules immunitaires du patient prélevées, activées et réinjectées à ce dernier, ou
- des anticorps dirigés contre les cellules cancéreuses.

5

Un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'au moins une plexine peut également être mis en œuvre en association avec un traitement de radiothérapie.

Un traitement de radiothérapie susceptible de convenir à l'invention peut être une radiothérapie externe utilisant une source externe de rayons X, une curiethérapie consistant à mettre en contact la source radioactive avec la tumeur, ou une radiothérapie métabolique

10

vectorielle. Ces méthodes sont connues de l'homme de l'art.

La présente invention concerne également un produit de combinaison tel que défini ci-dessous, pour son utilisation simultanée, séparée ou séquentielle dans le traitement du neuroblastome.

15

EXEMPLES

Tableau 1. Liste des outils génétiques et de leur provenance

Nom du produit	Fournisseur	Référence
siRNA Universal Negative Control #1	Sigma-Aldrich-Aldrich	SIC001
human Sema3C siRNA (NM_006379)	Sigma-Aldrich-Aldrich	SASI_Hs01_00161889
Human Sema3C#2 siRNA (NM_006379)	Sigma-Aldrich-Aldrich	SASI_Hs01_00161890
SMARTvector Inducible Non-targeting mCMV turboRFP Control	Dharmacon	VSC6571
SMARTvector Inducible Human SEMA3C mCMV-TurboRFP shRNA	Dharmacon	V3SH7676-08EG10512 (shRNA sequence V3SH7670-225814784)
human PlexinA1 siRNA	Sigma-Aldrich-Aldrich	SASI_Hs01_00010384
human PlexinA2 siRNA	Sigma-Aldrich-Aldrich	SASI_Hs01_00153626

miR-30 polycistron	N/A	hsa-miR-30c-2 (acc number : MI0000254, HUGO :) hsa-miR-30d (MI0000255, MIR30D) hsa-miR-30a (MI0000088, MIR30A) hsa-miR-30e (MI0000749, MIR30E) hsa-miR-30b (MI0000441, MIR30B)
--------------------	-----	--

L'analyse statistique des données a été réalisée avec le logiciel Prism 6.0e (GraphPad).

Exemple 1. Profils d'expression des gènes de la voie de signalisation des séphorines dans des échantillons de tumeurs de neuroblastome de différents stades

- 5 Les cohortes de patients étudiés sont présentées dans les références bibliographiques suivantes :
- Cohorte GSE45480 de Wolf & Kocak : Kocak *et al.*, 2013 ; cette cohorte référence 649 échantillons de tumeurs ;
 - Cohorte GSE49710 de Shi & Fisher: Wang *et al.*, 2014 ; cette cohorte regroupe 498 échantillons de tumeurs.
- 10

La micropuce Agilent-020382 44k (GPL16876) a été utilisée. Les analyses bioinformatiques ont été réalisées avec la plateforme Genomics Analysis and Visualization Platform (<http://r2.amc.nl>).

a) Biomarqueurs du stade 4

- 15 La figure 1A présente les mesures de taux d'expression réalisées sur des échantillons de tumeurs neuroblastiques, issus de la cohorte de patients GSE45480 de Wolf & Kocak.
- Une ou deux sondes ont été utilisées pour chaque gène.
- Les résultats obtenus sur la cohorte GSE49710 de Shi & Fisher (non montrés) sont identiques à ceux ici présentés, et ce pour chacun des gènes étudiés.
- 20 Neuf gènes présentent des différences significatives d'expression dans des échantillons de tumeurs de stade 4, par rapport à l'expression mesurée dans des tumeurs de stades 1, 2, 3 et 4S.
- Sept de ces gènes présentent de plus une corrélation avec un mauvais pronostic. Seuls les taux d'expression des plexines D1 et B2 ne sont pas liés à un mauvais pronostic de survie.

b) Biomarqueurs des stades 4 et 4S métastatiques

La figure 1B présente la mesure de taux d'expression du gène codant pour Sema3C réalisée sur des échantillons de tumeurs neuroblastiques, issus de la cohorte de patients de Kocak (GSE45480).

5 Les résultats obtenus sur les cohortes de Kocak et de Shi & Fisher sont identiques.

Le gène *sema3C* présente une variation significative d'expression dans les échantillons de tumeurs de stade 4 et 4S, par rapport aux tumeurs des stades 1, 2 et 3. Il s'agit d'une diminution de l'expression de Sema3C.

De plus, une corrélation avec un mauvais pronostic de survie est établie.

10 **c) Biomarqueurs spécifiques du stade 4S**

La figure 1C présente les mesures de taux d'expression réalisées sur des échantillons de tumeurs neuroblastiques, issus de la cohorte de patients de Kocak (GSE45480)

Les résultats obtenus sur la cohorte de Shi & Fisher sont identiques (non montrés).

15 Les gènes codant pour Sema3D, Plexine B1 et Sema4C présentent une différence significative d'expression dans les échantillons de tumeurs de stade 4S, par rapport aux taux d'expression observés dans des tumeurs des stades 1, 2, 3 et 4.

Les différences observées sont les suivantes : pour Sema3D, une diminution de l'expression du gène dans les tumeurs 4S. et pour Plexine B1 et Sema4C, une augmentation significative d'expression dans les tumeurs 4S.

20 **Exemple 2. Profils d'expression de neuf gènes de la voie de signalisation des sémaphorines dans des lignées cellulaires immortalisées issues de tumeurs de neuroblastome de stade 4**

25 a) Le taux d'expression de sept gènes a été mesuré dans un panel de 26 lignées primaires et 4 lignées immortalisées issues de tumeurs de neuroblastome de stade 4. L'expression quantifiée par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) révèle des différences de taux d'expression pour chaque gène, d'une lignée à l'autre. (Résultats non montrés)

30 b) Le taux d'expression de neuf gènes a été mesuré dans des cellules immortalisées issues de neuroblastome, les lignées IGR-N91 et SHEP. La technique employée est la RT-qPCR, le taux d'acide nucléique amplifié étant normalisé par rapport à celui du gène codant pour la protéine de ménage HPRT. La figure 2 présente ces différents niveaux d'expression, variables d'une lignée à l'autre.

Ces résultats mettent en évidence l'expression de ces neuf gènes par les cellules de neuroblastome.

Il est entendu que le taux d'expression de ces gènes ici présenté ne permet pas de déduire, avec ces seules données, que ces gènes peuvent servir de biomarqueurs.

- 5 En effet, ce sont les différences d'expression observées entre un stade et un autre qui sont significatives au regard d'un procédé de diagnostic ou de suivi.

Exemple 3. Profils d'expression de gènes de la voie de signalisation des sémaphorines dans des échantillons de tumeurs de neuroblastome de stade 4, après greffe dans des embryons de poulet HH14 et incubation pendant 48 heures

- 10 Des tumeurs de neuroblastome ont été produites *in vivo* par microgreffe de cellules tumorales humaines dans les tissus d'un embryon aviaire, un modèle de tumorignèse exposé dans la demande de brevet WO 2016/005398.

Des tumeurs se forment dans les dérivés sympathiques de l'hôte, mimant le site des tumeurs primaires des patients atteints de neuroblastome.

- 15 Les tumeurs sont ensuite été prélevées et leur transcriptome est comparé par RNAseq (séquençage aléatoire du transcriptome entier) à celui de ces mêmes cellules avant leur greffe (« naive tumors »).

Cette analyse a révélé une signature de modifications d'expression de 13 gènes du réseau Sémaphorine/Neuropiline/Plexine, qui corrèle les données d'analyse des expressions dans

- 20 les cohortes de patients.

- a) Des cellules de la lignée cellulaire neuroblastique IGR-N91 ont été greffées dans un embryon de poulet selon le protocole exposé dans la demande de brevet WO 2016/005398.

- Après 48 heures d'incubation, les tumeurs qui se sont développées au sein de l'embryon ont
25 été prélevées et analysées. Les taux d'expression des gènes codant pour Sema3C, Sema3F et Sema3D ont été déterminés par RT-PCR quantitative, à la fois sur les cellules IGR-N91 avant la greffe (« naive cells »), et sur les tumeurs prélevées dans l'embryon de poulet 48 après cette greffe.

- La figure 3 présente les variations d'expression observées entre les cellules avant leur
30 implantation dans l'embryon, et les cellules ayant formé une tumeur *in vivo* dans un modèle animal. Les gènes codant pour Sema3C et Sema3F présentent une diminution d'expression

après implantation *in vivo* ; au contraire le gène Sema3D présente une forte augmentation de son taux d'expression. Ces données confirment les résultats obtenus par RNASeq.

b) Des cellules issues de tumeurs de neuroblastome ont été greffées dans un embryon de poulet selon le protocole exposé dans la demande de brevet WO 2016/005398.

- 5 Après 48 heures d'incubation, les tumeurs qui se sont développées au sein de l'embryon ont été prélevées et analysées. Les taux d'expression de 13 gènes ont été déterminés par extrait des résultats de séquençage aléatoire du transcriptome entier, à la fois sur les cellules tumorales avant la greffe (« naïve cells »), et sur les tumeurs prélevées dans l'embryon de poulet 48 après cette greffe.
- 10 Le tableau 2 ci-dessous présente les différences d'expression observées entre les cellules avant leur implantation dans l'embryon, et les cellules ayant formé une tumeur *in vivo* dans un modèle animal.

Tableau 2. Variation du taux d'expression de 13 gènes de la voie de signalisation des sémaphorines après développement de tumeurs *in vivo* dans un modèle animal

Numéro d'accension (plateforme NCBI)	Locus chromosomique	Gène codant pour la protéine :	Moyenne du taux d'expression dans les tumeurs prélevées	Moyenne du taux d'expression dans les « naïve cells »	Variation entre les deux types de cellules	p-value (eqvar)
NM_006080	chr7:83587658-83824217	SEMA3A	8,53902	6,96972	1,22516	0,439958
NM_006379	chr7:80371853-80548667	SEMA3C	7,2216	14,9633	-2,07202	0,09333
NM_152754	chr7:84624871-84751247	SEMA3D	3,08308	1,3208	2,33426	0,0246087
NM_012431	chr7:82993221-83278479	SEMA3E	2,09159	2,7487	-1,31417	0,441106
NM_004186	chr3:50192847-50226508	SEMA3F	1,39908	3,14351	-2,24683	0,0962234
NM_017789	chr2:97525472-97535735	SEMA4C	1,74128	2,81916	-1,61901	0,153451
NM_020796	chr5:115779250-115910551	SEMA6A	4,71055	3,40428	1,38371	0,140427
NM_00119899	chr15:47476402-48066420	SEMA6D	4,1238	4,9143	-1,19169	0,55635

NM_153618	chr15:48010685-48066420	SEMA6D	5,57269	3,1809	1,75192	0,1914
NM_025179	chr1:208195587-208417665	PLXNA2	2,30759	2,92134	-1,26597	0,587959
NM_0011055 43	chr7:132068246-132261323	PLXNA4	0,515186	2,28353	-4,43243	0,0424805
NM_020911	chr7:131808090-132261323	PLXNA4	2,00981	4,12258	-2,05123	0,0928033
NM_015103	chr3:129274055-129325582	PLXND1	2,68071	2,64011	1,01538	0,939199
NM_003873	chr10:33466418-33623833	NRP1	10,2367	15,0383	-1,46906	0,403491
NR_045259	chr10:33466418-33623833	NRP1	10,9158	12,2219	-1,11966	0,814142
NM_201266	chr2:206547223-206662857	NRP2	4,96087	4,94254	1,00371	0,99542

Les 13 gènes dont le taux d'expression a été mesuré sur les cellules avant et après implantation dans l'embryon de poulet subissent des variations d'expression différentielles entre ces deux états.

- 5 L'analyse des variations d'expression montre que les gènes codant pour les protéines *Sema3C*, *Sema3F*, *Sema4C* et *Plexine A4* ont une expression réduite dans les cellules formant les tumeurs sympathiques, tandis que l'expression des gènes *Sema3D* et *Sema6D* est nettement augmentée.

- 10 Grâce à ce test *in vivo*, il est montré que ces 13 gènes sont des biomarqueurs pertinents dont l'expression est modulée en fonction du stade de la tumeur et de son environnement (ici, ré-implantation des cellules dans un environnement embryonnaire).

Exemple 4. Inhibition de l'expression des plexines A1 et A2 dans des lignées cellulaires neuroblastiques, grâce à des ARN interférents

- 15 a) **Effets des ARN interférents dirigés contre les plexines sur la prolifération cellulaire et la mort par apoptose**

Afin de savoir si les récepteurs *Plexine A1* et/ou *A2* ont un rôle oncogène dans le neuroblastome, leur expression a été inhibée par la technique d'ARN interférence, dans deux types de lignées cellulaires : les lignées neuroblastiques *SHEP* et *IGR-N91* (Figure 4 A).

- 20 Dans les cellules contrôle désignées par 'CTL', un ARN interférent contrôle (siRNA dirigé contre une séquence inerte) est introduit par transfection.

L'inhibition de l'expression des protéines Plexine A1 (PlxnA1) ou A2 (PlxnA2) réduit la prolifération des cellules cancéreuses neuroblastiques. L'effet sur la prolifération cellulaire est important, jusqu'à -70% lors de l'inhibition de l'expression de la Plexine A1, et jusqu'à plus de -30% lors de l'inhibition de l'expression de la Plexine A2.

- 5 De plus, l'inhibition de l'expression de la Plexine A1 provoque une activation significative de l'activité de la caspase 3 (Figure 4B), et par conséquent de la mort des cellules traitées par apoptose.

Cet effet n'est cependant pas observé lors de l'inhibition de l'expression de la Plexine A2. Il est donc probable que les deux plexines ne sont pas impliquées dans les mêmes processus
10 cellulaires.

b) Inhibition de l'expression des plexines A1 ou A2 par ARN interférents, sur des cellules en culture en agar mou

Une diminution significative de la survie et de la prolifération est observée dans le test de croissance en agar mou, se traduisant par une réduction des colonies de cellules, à la fois en
15 taille et en nombre (Figure 4C et 4D). Le test est réalisé sur les cellules neuroblastiques SHEP exprimant de manière stable la GFP.

Exemple 5. Inhibition de l'expression des plexines A1 et A2 dans des lignées cellulaires neuroblastiques, grâce à des micro-RNA

- 20 Par analyse bioinformatique (www.targetscan.org), les plexines A1 et A2 ont été identifiées comme étant de potentielles cibles des microRNAs de la famille miR-30.

L'expérience présentée est réalisée sur des cellules de la lignée HeLa co-transfectées avec mir-30 (sous forme polycistronique ou mir-30c seul) et des constructions génétiques codant pour les gènes cibles (PlxnA1, PlxnA2 ou Lin28b) intégrés dans un plasmide rapporteur de
25 l'activité des miRNAs (pmiR-Glo luciferase reporter system, promega).

La figure 5 montre que la forme polycistronique de la famille de microRNAs miR-30, tout comme la forme mir-30c seule, permettent d'obtenir une réduction significative de l'expression des Plexines A1 et A2, respectivement de 35% et de 45%, *in vitro*.

- Pour comparaison, les effets sur l'oncogène Lin28B, cible connue de la famille mir-30
30 (expression protéique réduite de 40%) ont également été mesurés.

Exemple 6. Effet fonctionnel de la sous-expression de Sema3C dans des lignées cellulaires neuroblastiques

Dans des échantillons de tumeurs de patients, le taux d'expression de Sema3C est nettement diminué dans les tumeurs métastatiques de stade 4 ou 4S, par rapport au taux d'expression observé dans les tumeurs de stade 1, 2 ou 3 (voir figure 1B).

Afin de connaître les effets sur les cellules de cette nette sous-expression de Sema3C dans les tumeurs de stade 4 ou 4S, une diminution de l'expression d'un facteur 2 de Sema3C a été reproduite dans des cellules de lignée neuroblastique IGR-N91.

Un ARN interférent de type sh-RNA, inductible par la doxycycline, a été introduit de façon stable dans les cellules IGR-N91 : la figure 6A présente la construction moléculaire réalisée.

Les cellules ainsi transformées ont été greffées dans les tissus d'un embryon de poulet. Une tumeur s'est ainsi formée *in vivo*. L'injection de doxycycline dans l'embryon, en diminuant de moitié l'expression de Sema3C dans la tumeur, a généré un signal pro-métastatique pour cette tumeur. Les cellules tumorales se sont désolidarisées du tissu tumoral primaire et ont migré en empruntant des voies de dissémination le long de l'aorte dorsale et des nerfs périphériques.

Le tableau 3 ci-dessous récapitule les effets *in vivo* de cette diminution de l'expression de Sema3C :

Tableau 3. Effets de l'inhibition inductible de Sema3C sur des cellules

	IGR-N91 :: sh-RNA scr.		IGR-N91 :: sh-RNA sema3C	
% d'embryons présentant les éléments suivants :	Controle (n=8)	+ Doxycycline (n=6)	Controle (n=11)	+ Doxycycline (n=12)
Tumeurs implantées dans les tissus sympatho-adrénaux	100	100	100	100
Dissémination loco-régionale	88	67	82	92
Dissémination à distance (métastases)	38	33	45	92

Dans les embryons contrôles, 33 à 45 % d'embryons présentent une dissémination distance des tumeurs primaires. Mais en présence d'un sh-RNA diminuant de moitié l'expression de Sema3C, le taux d'embryons présentant une dissémination à distance de la tumeur primaire est de 92%, soit presque la totalité des embryons qui sont touchés par un
5 phénomène métastatique de la tumeur primaire *in vivo*.

Un essai *ex vivo* a ensuite été développé pour modéliser les effets induits par le changement de niveau d'expression de Sema3c sur la cohésion des cellules tumorales de neuroblastome.

Les cellules IGR-N91, après introduction transitoire de siRNA dirigés contre Sema3C,
10 ou d'une construction contrôle, sont cultivées sous forme de gouttes, dans un milieu de culture avec (à droite) ou sans Sema3C (à gauche de la figure 6B).

Le pourcentage d'agrégation cellulaire est indiqué sur la courbe des ordonnées. Les points noirs représentent le pourcentage d'agrégation des cellules transformées avec un ARN interférent contrôle (siRNA scr). Les points gris représentent le pourcentage
15 d'agrégation des cellules transformées avec un ARN interférent de type sh-RNA dirigé contre l'ARN messager de sema3C (siRNA Sema3c).

En présence de Sema3C, les cellules transformées avec siRNA Sema3c (grises) retrouvent le comportement d'agrégation qu'elles avaient perdu suite à l'inhibition de l'expression de Sema3C.

REFERENCES

BREVETS

WO 2016/005398

US 2013/0102485

5 WO 2009/050691

NON BREVETS

Lamers F, Schild L, den Hartog IJ, Ebus ME, Westerhout EM, Ora I, Koster J, Versteeg R, Caron HN, Molenaar JJ. *Targeted BCL2 inhibition effectively inhibits neuroblastoma tumour growth*. Eur J Cancer. 2012 Nov;48(16):3093-103.

- 10 Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, Mestdagh P, van Sluis P, Valentijn LJ, van Nes J, Broekmans M, Haneveld F, Volckmann R, Bray I, Heukamp L, Sprüssel A, Thor T, Kieckbusch K, Klein-Hitpass L, Fischer M, Vandesompele J, Schramm A, van Noesel MM, Varesio L, Speleman F, Eggert A, Stallings RL, Caron HN, Versteeg R, Schulte JH. *LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression*. Nat Genet. 2012 Nov;44(11):1199-206.
- 15

Marcus K, Johnson M, Adam RM, O'Reilly MS, Donovan M, Atala A, Freeman MR, Soker S. *Tumor cell-associated neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor expression as determinants of tumor growth in neuroblastoma*. Neuropathology. 2005 Sep;25(3):178-87.

- McArdle L, McDermott M, Purcell R, Grehan D, O'Meara A, Breatnach F, Catchpoole D, Culhane AC, Jeffery I, Gallagher WM, Stallings RL. *Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q*. Carcinogenesis. 2004 Sep;25(9):1599-609.
- 20

Perälä N, Sariola H, Immonen T. *More than nervous: the emerging roles of plexins*. Differentiation. 2012 Jan;83(1):77-91.

- 25 Moret F, Renaudot C, Bozon M, Castellani V. *Semaphorin and neuropilin co-expression in motoneurons sets axon sensitivity to environmental semaphorin sources during motor axon pathfinding*. Development. 2007 Dec;134(24):4491-501.

- Sanyas I, Bozon M, Moret F, Castellani V. *Motoneuronal Sema3C is essential for setting stereotyped motor tract positioning in limb-derived chemotropic semaphorins*. Development. 2012 Oct;139(19):3633-43.
- Li Y, Ohira M, Zhou Y, Xiong T, Luo W, Yang C, Li X, Gao Z, Zhou R, Nakamura Y, Kamijo T,
 5 Kaneko Y, Taketani T, Ueyama J, Tajiri T, Zhang H, Wang J, Yang H, Yin Y, Nakagawara A. *Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway*. Oncotarget. 2017 May 23.
- Catalano A, Lazzarini R, Di Nuzzo S, Orciari S, Procopio A. *The plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-kappaB to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells*. Cancer Res. 2009 Feb
 10 15;69(4):1485-93.
- Kigel B, Rabinowicz N, Varshavsky A, Kessler O, Neufeld G. *Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling*. Blood. 2011 Oct 13;118(15):4285-96.
- Lu Y, Xu Q, Chen L, Zuo Y, Liu S, Hu Y, Li X, Li Y, Zhao X. *Expression of semaphorin 6D and its receptor plexin-A1 in gastric cancer and their association with tumor angiogenesis*. Oncol Lett. 2016 Nov;12(5):3967-3974.
 15
- Yamada D, Watanabe S, Kawahara K, Maeda T. *Plexin A1 signaling confers malignant phenotypes in lung cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Nov 4;480(1):75-80.
- Kocak H, Ackermann S, Hero B, Kahlert Y, Oberthuer A, Juraeva D, Roels F, Theissen J, Westermann F, Deubzer H, Ehemann V, Brors B, Odenthal M, Berthold F, Fischer M. *Hox-C9 activates the intrinsic pathway of apoptosis and is associated with spontaneous regression in neuroblastoma*. Cell Death Dis. 2013 Apr 11;4:e586.
 20
- Wang C, Gong B, Bushel PR, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Xu J, Fang H, Hong H, Shen J, Su Z, Meehan J, Li X, Yang L, Li H, Łabaj PP, Kreil DP, Megherbi D, Gaj S, Caiment F, van Delft J, Kleinjans J, Scherer A, Devanarayan V, Wang J, Yang Y, Qian HR, Lancashire LJ, Bessarabova M, Nikolsky Y, Furlanello C, Chierici M, Albanese D, Jurman G, Riccadonna S, Filosi M, Visintainer R, Zhang KK, Li J, Hsieh JH, Svoboda DL, Fuscoe JC, Deng Y, Shi L, Paules RS, Auerbach SS, Tong W. *The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance*. Nat Biotechnol. 2014 Sep;32(9):926-32.
 25
 30

REVENDICATIONS

1. Procédé de caractérisation moléculaire *in vitro* d'une tumeur de neuroblastome, comprenant les étapes suivantes:

- 5 a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines choisies parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2,
- 10 b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- 15 c) Détermination du stade de la tumeur parmi l'un des stades 1, 2, 3, 4 ou 4S, en fonction de la différence observée entre le taux d'expression d'au moins un gène et sa valeur de référence.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

- 20 - A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 8 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema4D, Sema6D, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B2, Plexine D1 et Neuropiline 1; et que
- A l'étape (b), pour chaque gène, la valeur de référence est une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, 3 et 4S.

25 3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :

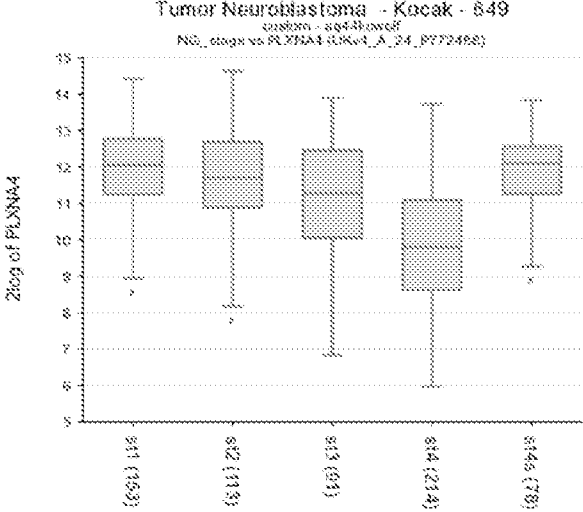
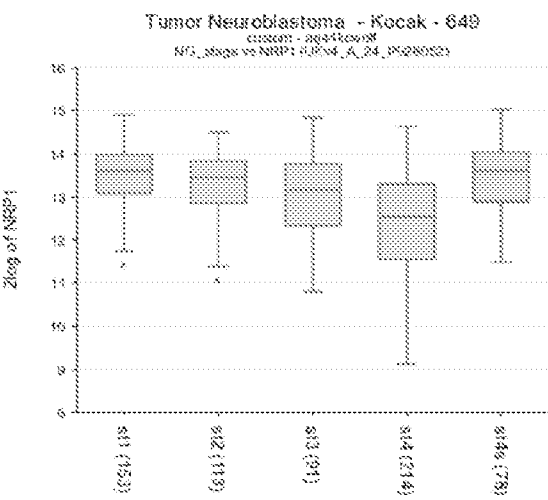
- A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour un ou plusieurs des 3 gènes codant pour les protéines suivantes: Sema4C, Sema3D et Plexine B1 ; et que
- 30 - A l'étape (b), pour chaque gène, la valeur de référence est une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2, 3 et 4.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que :
- A l'étape (a), la mesure du taux d'expression est effectuée pour au moins le gène codant pour la protéine Sema3C; et que
 - A l'étape (b), la valeur de référence est une médiane du taux d'expression dudit gène mesuré sur des tumeurs de stade clinique 1, 2 et 3.
- 5
5. Procédé *in vitro* de suivi de l'évolution d'une tumeur de neuroblastome chez un patient, comprenant les étapes suivantes :
- a) Mesure dans un échantillon de ladite tumeur à un temps T_1 du taux d'expression d'un ou plusieurs des 18 gènes codant pour les protéines telles que listées en revendication 1,
 - b) Comparaison du taux d'expression du ou desdits gènes mesuré à l'étape (a) avec une valeur de référence déterminée pour le ou chacun desdits gènes,
- 10
- ladite valeur de référence déterminée pour chaque gène ayant été obtenue par la mesure du taux d'expression dudit gène dans un échantillon de tumeur du même patient à un temps T_0 , T_0 étant antérieur à T_1 .
- 15
6. Modulateur de l'expression ou de l'activité d'au moins une protéine choisie parmi le groupe consistant en : Sema3C, Sema3A, Sema3B, Sema3D, Sema3E, Sema3F, Sema4C, Sema4D, Sema6A, Sema6D, Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1, Plexine D1, Neuropiline 1 et Neuropiline 2, pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome.
- 20
7. Modulateur pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit modulateur est un activateur de l'expression ou de l'activité de Sema3C, et que le neuroblastome est un neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S).
- 25
8. Sema3C pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome de stade métastatique (4 ou 4S).
- 30
9. Modulateur pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'une ou plusieurs plexine(s) choisie(s) parmi Plexine A1, Plexine A2, Plexine A3, Plexine A4, Plexine B1, Plexine C1 et Plexine D1.

10. Modulateur pour son utilisation selon la revendication 9, caractérisé en ce que ledit modulateur est un inhibiteur d'expression choisi parmi un ARN interférent et un micro-ARN, et en particulier en ce que ledit inhibiteur d'expression est un microRNA de la famille des miR-30.
- 5 11. Composition pharmaceutique pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome comprenant, dans un milieu pharmaceutiquement acceptable, au moins un composé thérapeutique choisi parmi le groupe consistant en :
- un modulateur de l'expression ou de l'activité d'une protéine tel que défini dans l'une des revendications 6, 7, 9 et 10, et
 - 10 - Sema3C.
12. Produit de combinaison pour son utilisation dans le traitement du neuroblastome comprenant :
- au moins un composé thérapeutique choisi parmi le groupe consistant en : un modulateur de l'expression ou de l'activité d'une protéine tel que défini dans l'une des revendications 6, 7, 9 et 10 et Sema3C, et
 - 15 - au moins un agent de chimiothérapie ou un agent anti-angiogénique ou un agent d'immunothérapie.

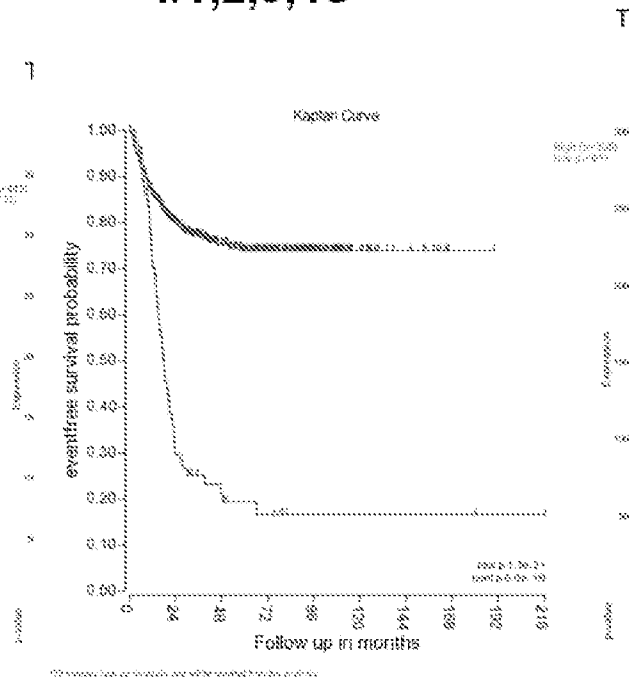
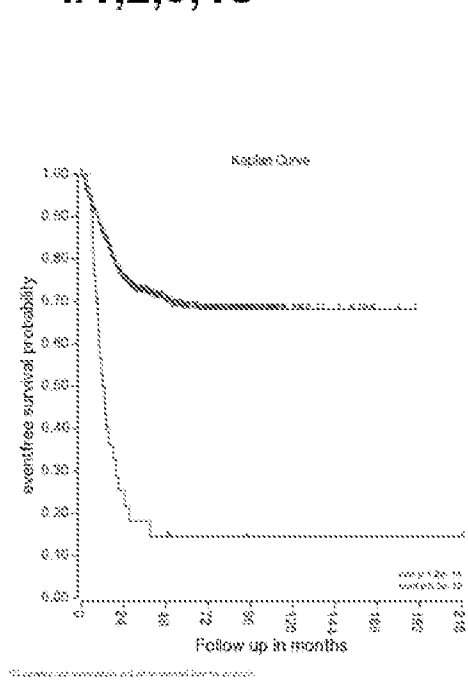
Neuropiline1

Plexine A4



4/1,2,3,4S

4/1,2,3,4S

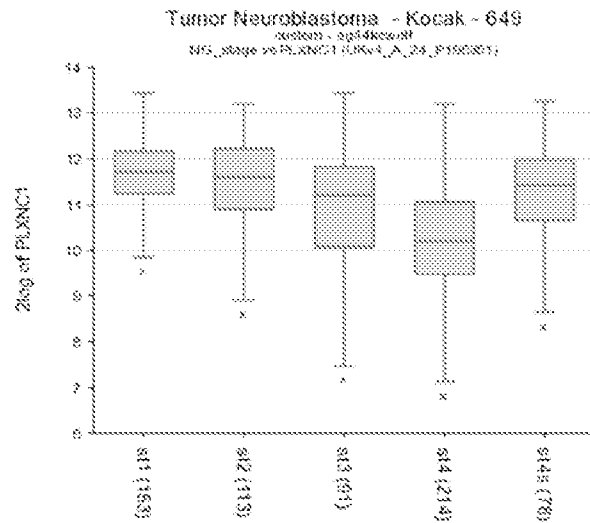


corrélation mauvais
pronostic

corrélation mauvais
pronostic

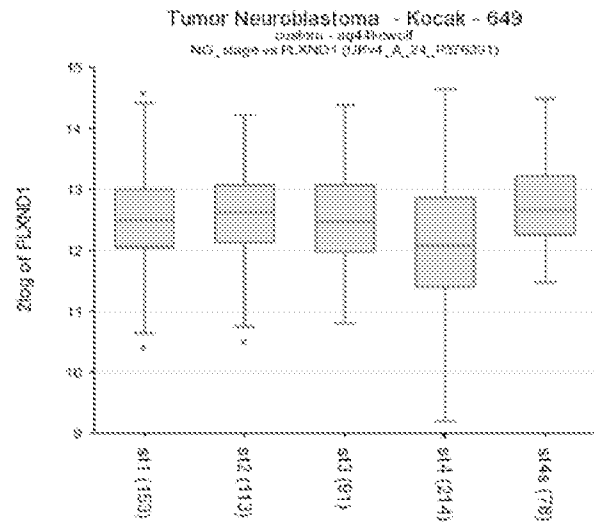
Figure 1A

Plexine C1

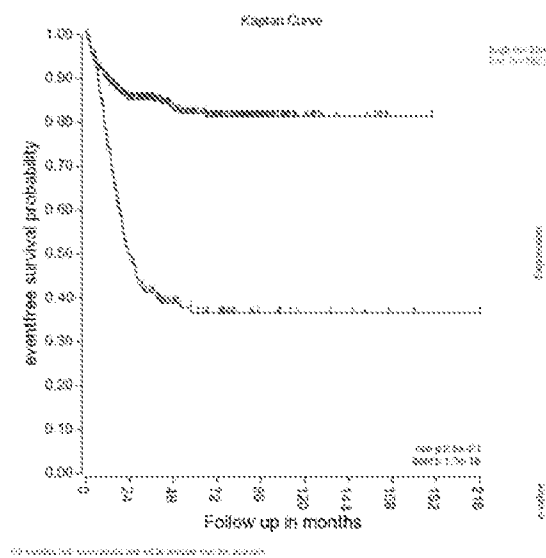


4/1,2,3,4S

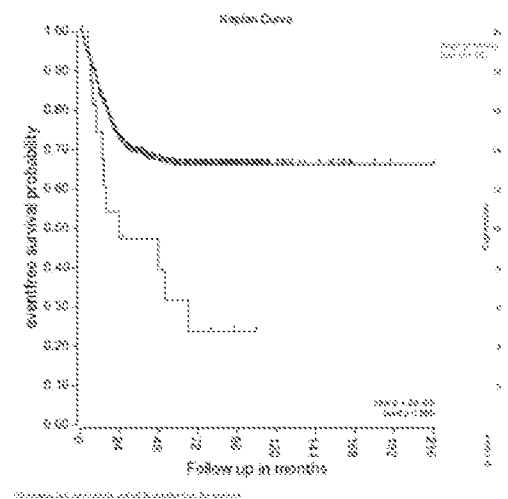
Plexine D1



4/1,2,3,4S

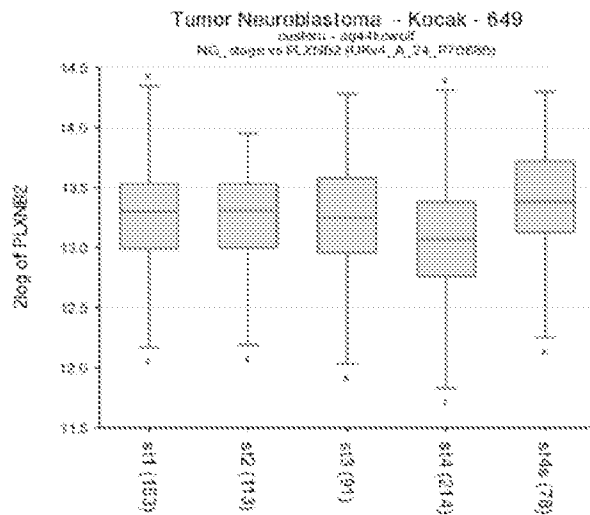
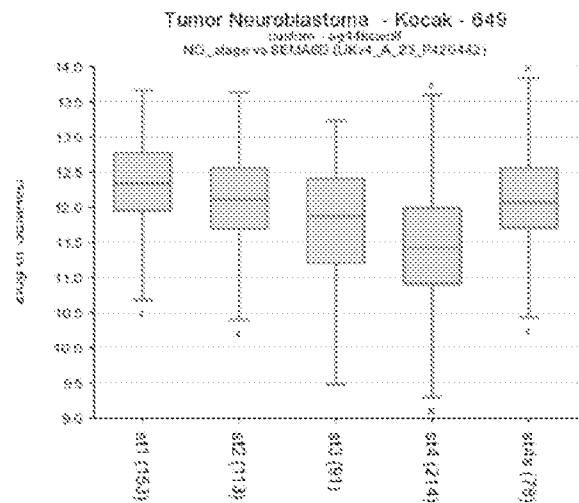
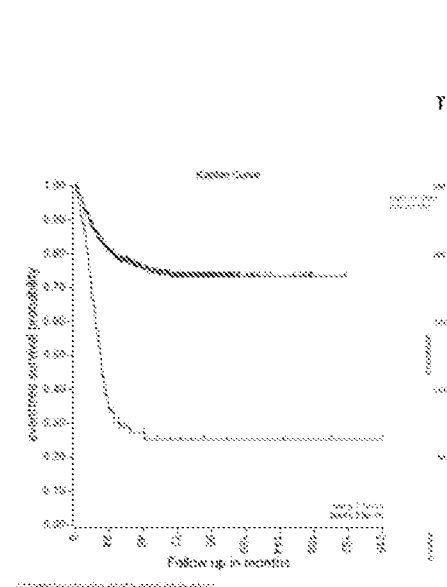
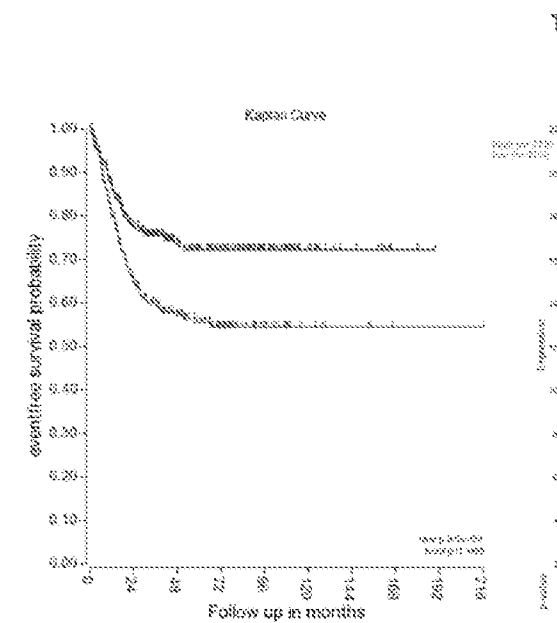


corrélation mauvais
pronostic

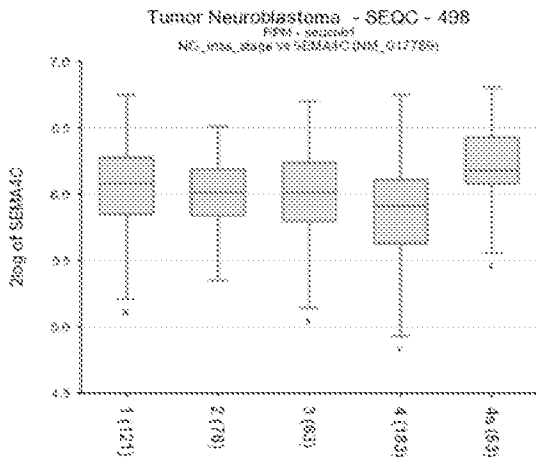


pas de corrélation mauvais
pronostic

Figure 1A (suite)

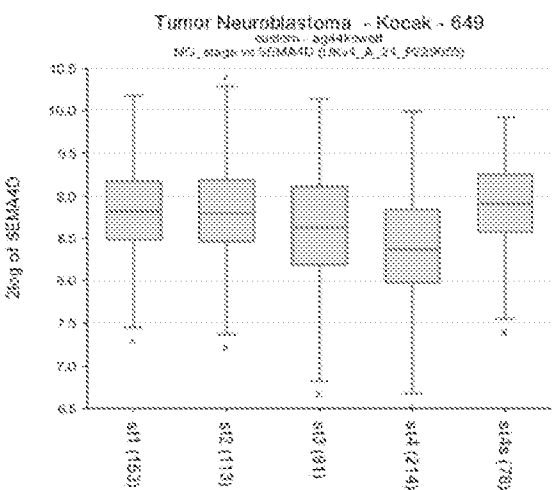
Plexine B2**4/1,2,3,4S****sema6D****4/1,2,3,4S****Figure 1A (suite)**

sema4C

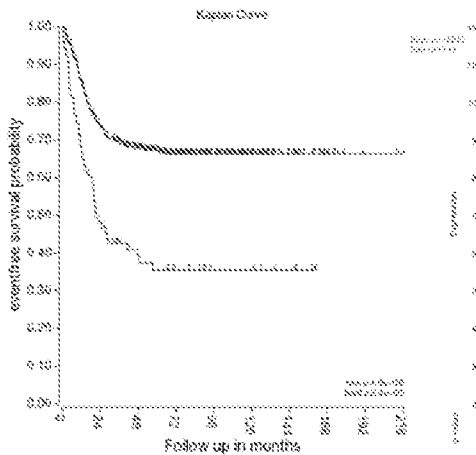


4/1,2,3,4S

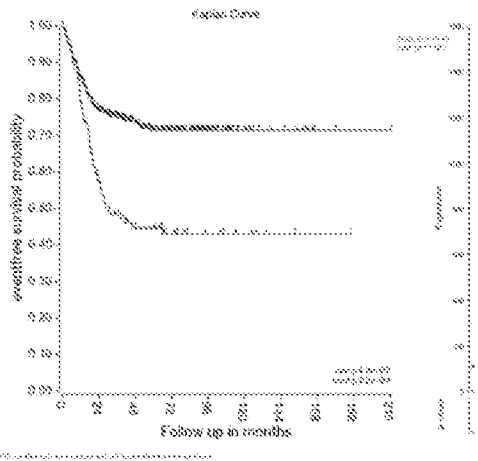
sema4D



4/1,2,3,4S



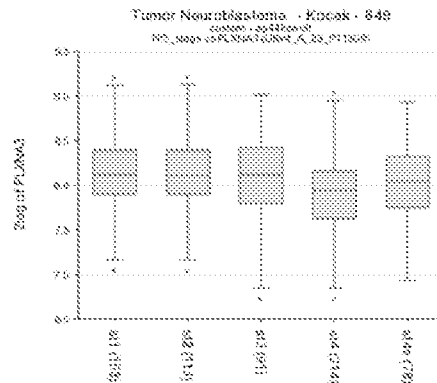
**corrélation mauvais
pronostic**



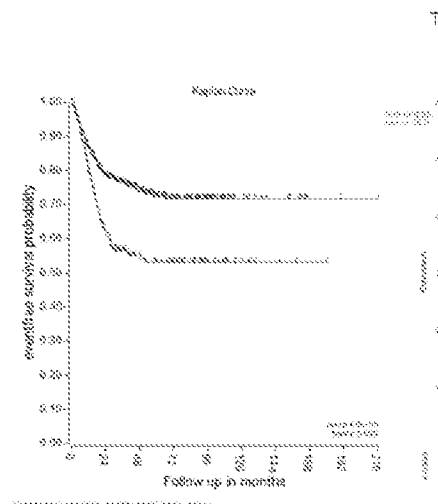
**corrélation mauvais
pronostic**

Figure 1A (suite)

Plexine A3



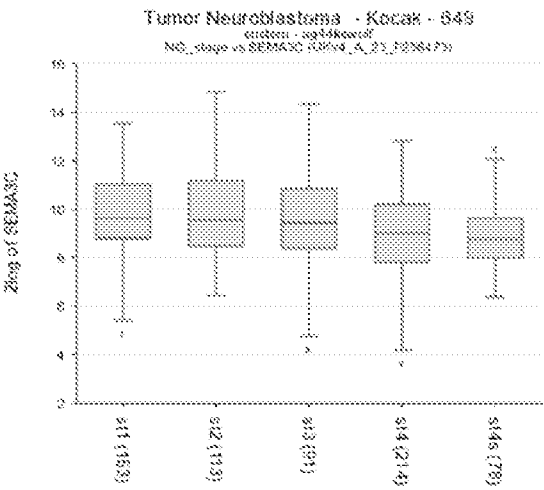
4/1,2,3, 4S



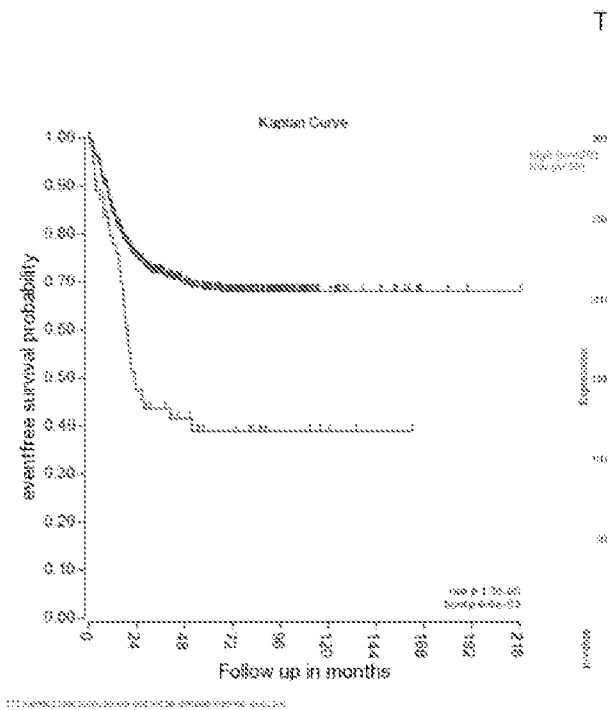
**corrélation mauvais
pronostic**

Figure 1A (suite et fin)

sema3C



4,4S/1,2,3



corrélation mauvais
pronostic

Figure 1B

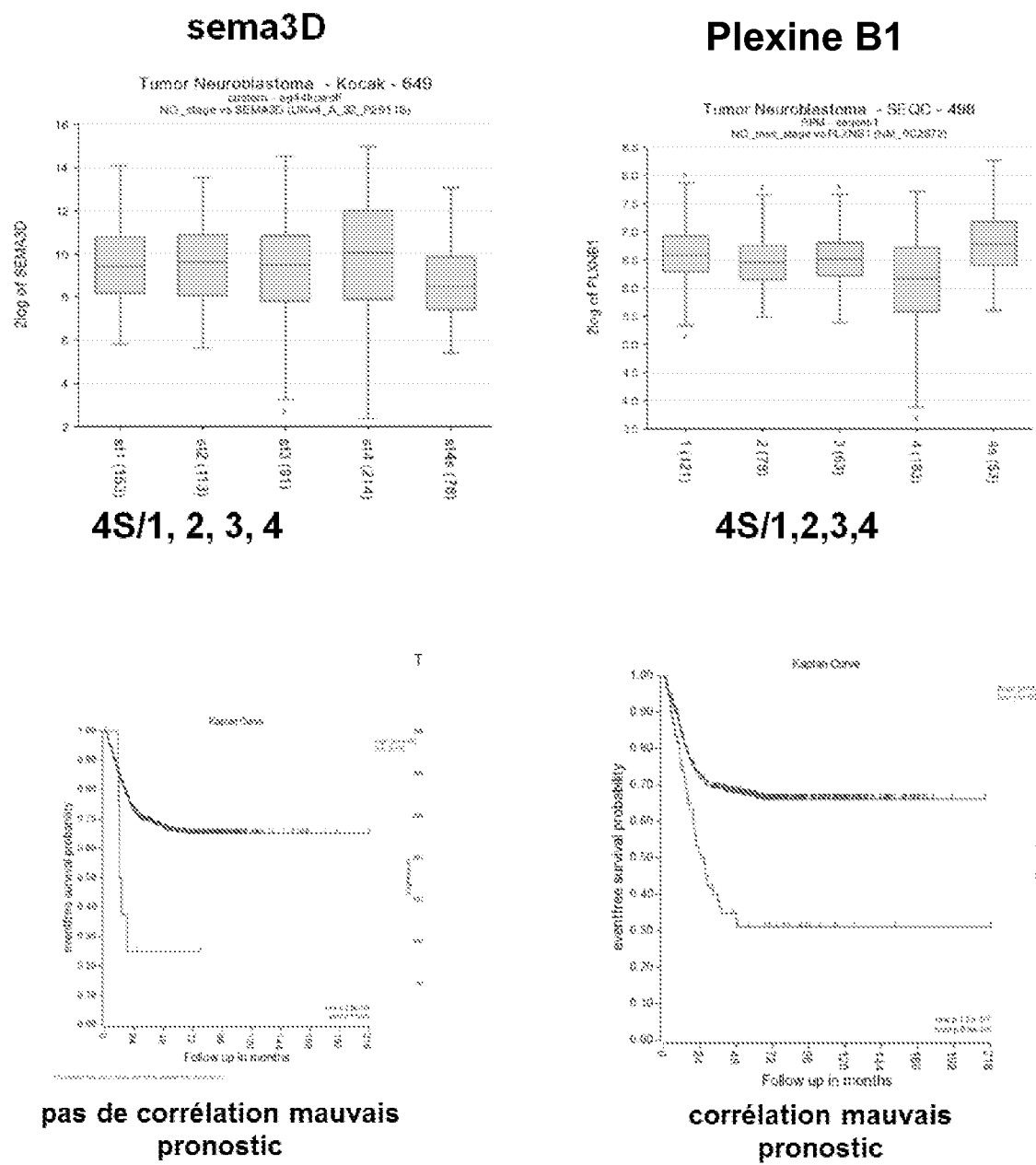
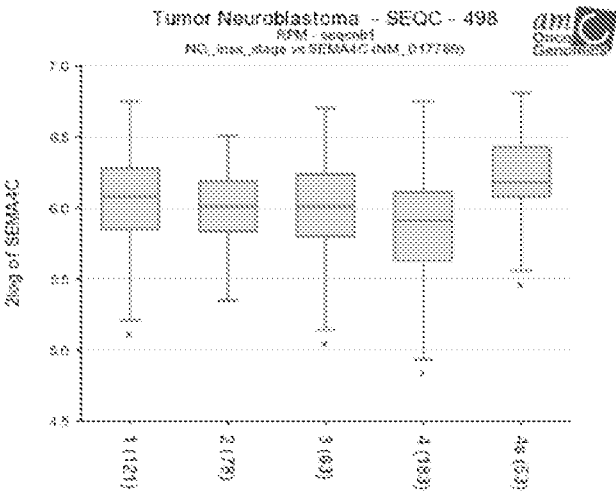
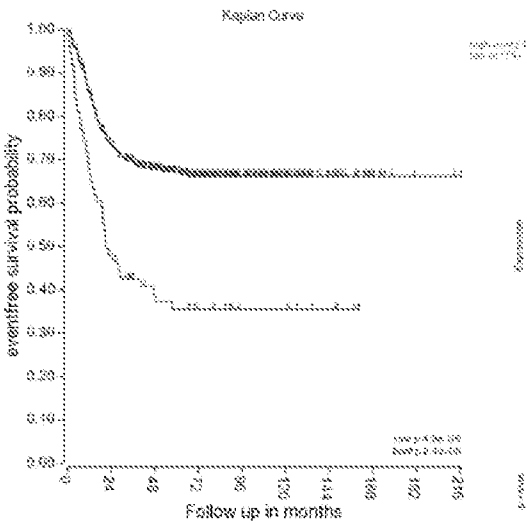


Figure 1C

sema4C



4S/1, 2, 3, 4



corrélation mauvais
pronostic

Figure 1C (suite et fin)

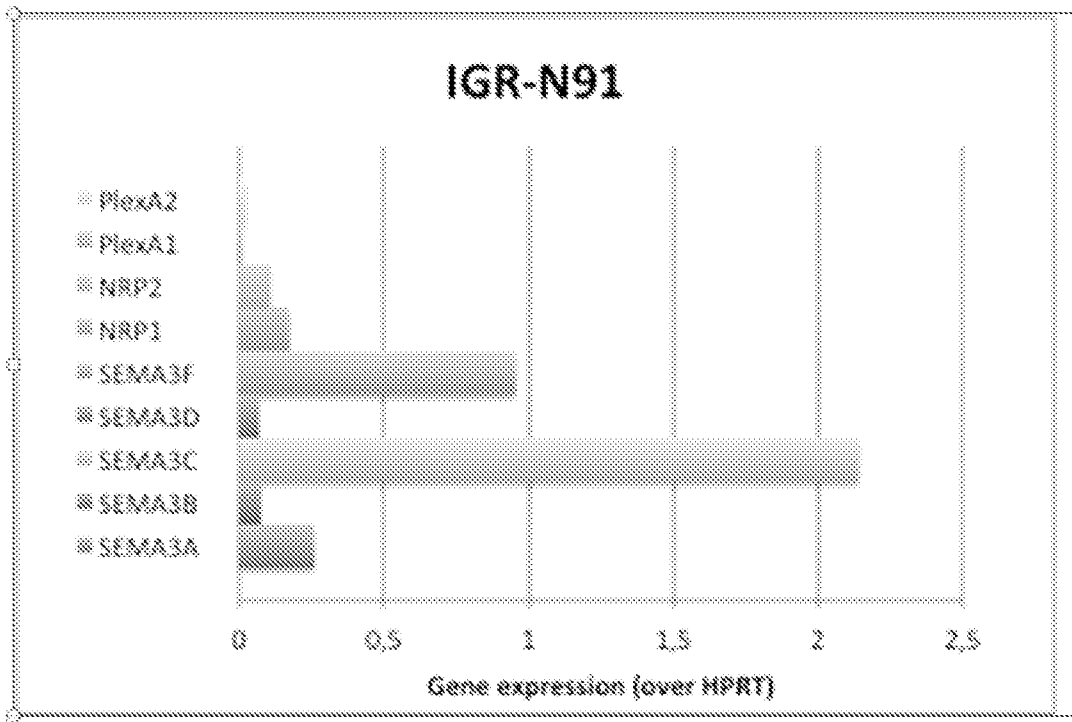
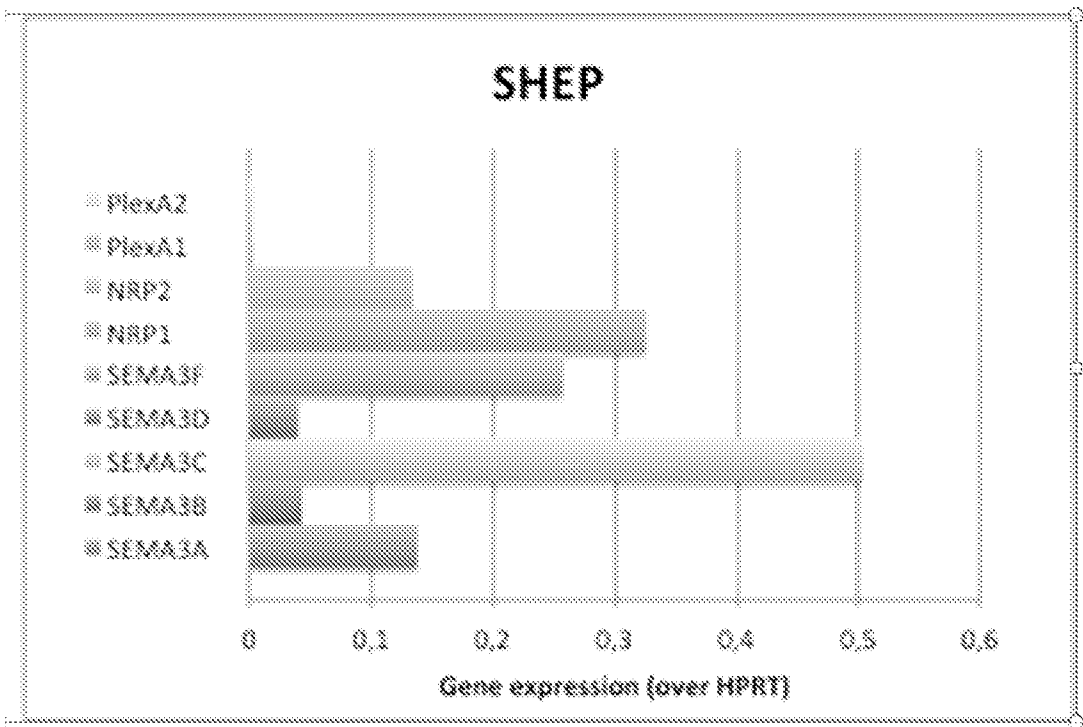


Figure 2

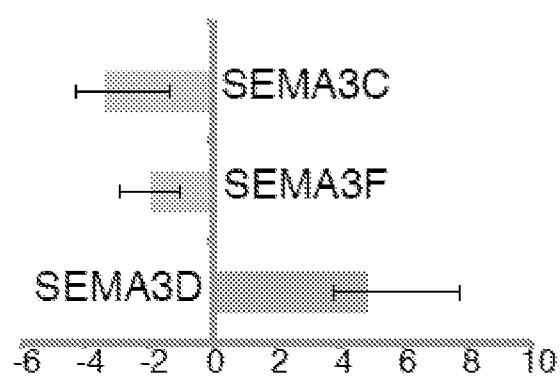
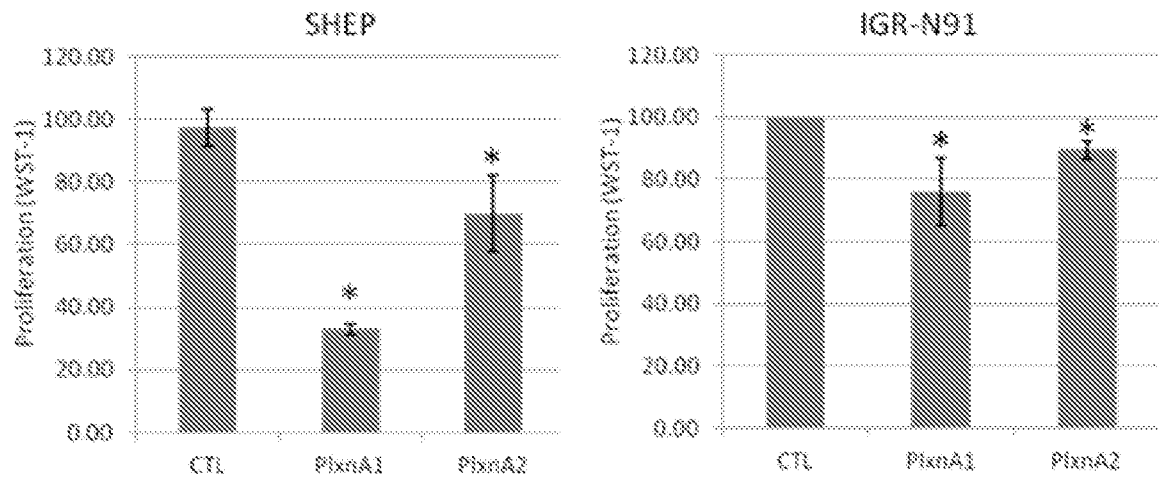


Figure 3

A. Sur la proliferation



B. Sur la mort par apoptose

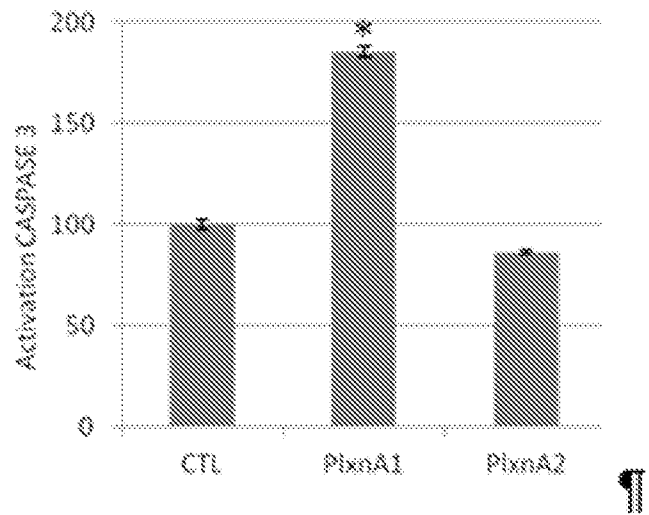
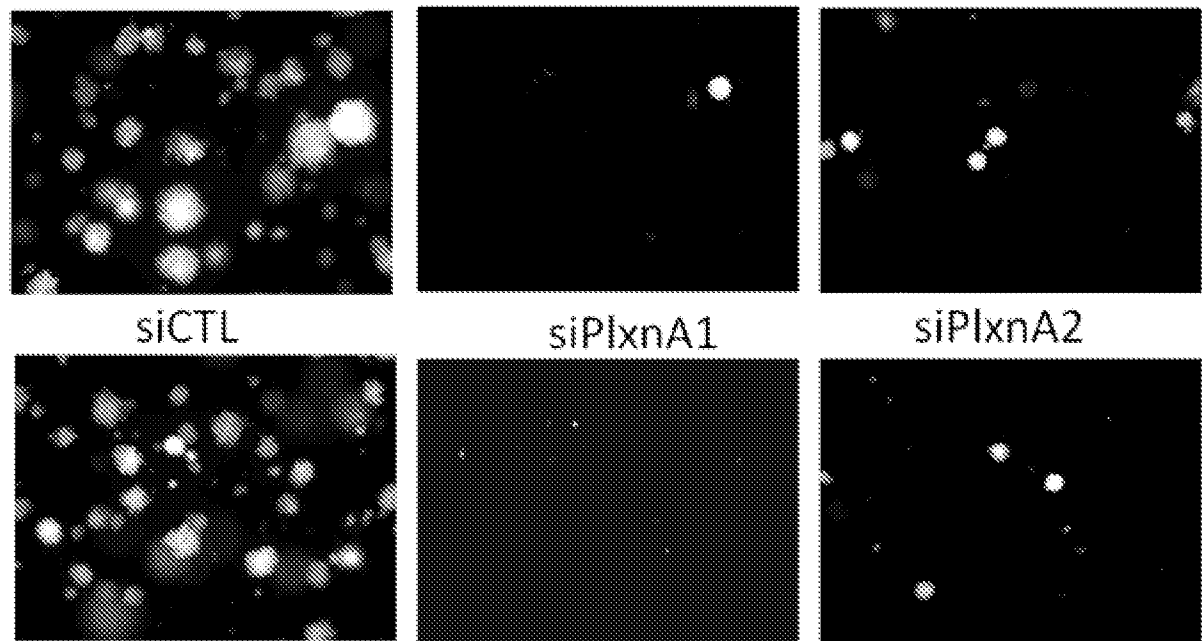


Figure 4

C



D

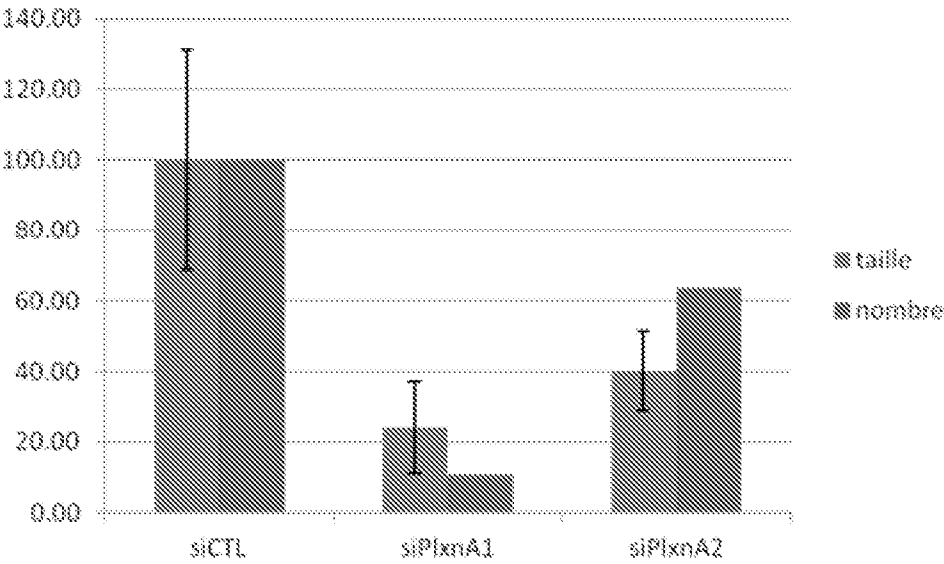


Figure 4 (suite et fin)

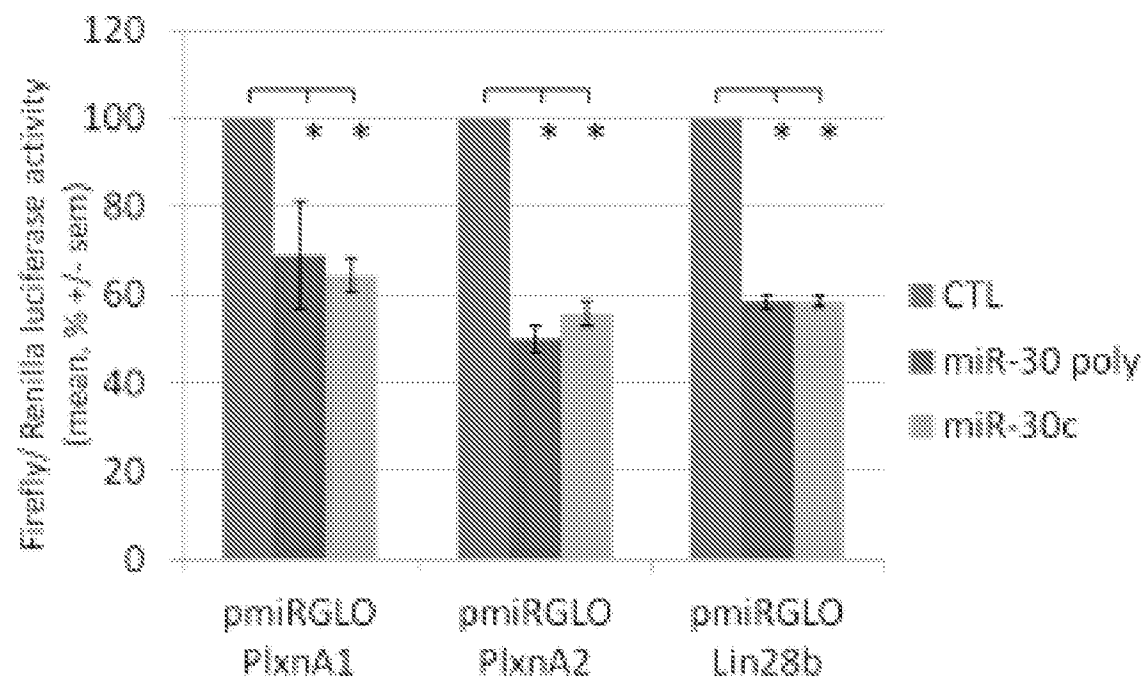
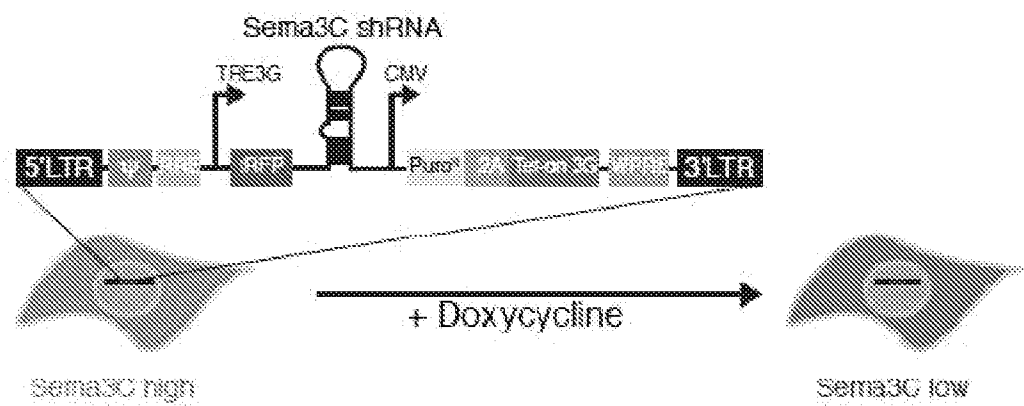


Figure 5

A



B

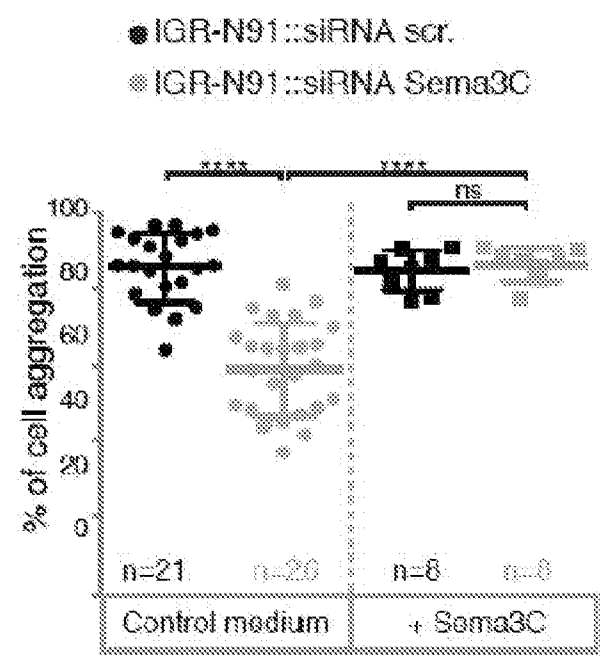


Figure 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/052052

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6886
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Karen Marcus ET AL: "Tumor cell-associated neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor expression as determinants of tumor growth in neuroblastoma", Neuropathology, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 178-187, XP055450789, Melbourne, Australia DOI: 10.1111/j.1440-1789.2005.00610.x Retrieved from the Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1789.2005.00610.x/pdf page 183 et figure 4 ----- -/-	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2018

Date of mailing of the international search report

21/11/2018

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Hennard, Christophe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2018/052052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MCARDLE L ET AL: "Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q", CARCINOGENESIS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 25, no. 9, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 1599-1609, XP002578140, ISSN: 0143-3334, DOI: 10.1093/CARCIN/BGH173 [retrieved on 2004-04-16] page 1608	1-12
A	----- N. MEJHERT ET AL: "Semaphorin 3C is a novel adipokine linked to extracellular matrix composition", DIABETOLOGIA, vol. 56, no. 8, 12 May 2013 (2013-05-12), pages 1792-1801, XP055450795, BERLIN, DE ISSN: 0012-186X, DOI: 10.1007/s00125-013-2931-z page 1795, colonne 1	1-12
X	----- WO 2009/050691 A2 (RAPPAPORT FAMILY INST FOR RES [IL]; NEUFELD GERA [IL]; KIGEL BOAZ [IL]) 23 April 2009 (2009-04-23)	6,11
Y	revendications	1-12
Y	----- E. E. EVANS ET AL: "Antibody Blockade of Semaphorin 4D Promotes Immune Infiltration into Tumor and Enhances Response to Other Immunomodulatory Therapies", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 3, no. 6, 22 January 2015 (2015-01-22), pages 689-701, XP055333625, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0171 page 692 colonne 1	1
Y	----- US 2013/102485 A1 (LEE INHAN [US]) 25 April 2013 (2013-04-25) page 8, tableau 1 ----- -/--	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2018/052052

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H JIA ET AL: "Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 102, no. 3, 19 January 2010 (2010-01-19), pages 541-552, XP055450804, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bjc.6605539 page 548, "Discussion" -----	1
Y	MITRA FAKHARI ET AL: "Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma", CANCER., vol. 94, no. 1, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 258-263, XP055523201, US ISSN: 0008-543X, DOI: 10.1002/cncr.10177 page 260, figure 1 -----	1-12
Y	NAIR ET AL: "High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene", CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 174, no. 2, 21 April 2007 (2007-04-21), pages 100-110, XP022041109, ISSN: 0165-4608, DOI: 10.1016/J.CANCERGENCYTO.2006.11.017 pages 105-107 -----	1-12
Y	WO 2008/055889 A1 (UNIV OSAKA [JP]; BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; BOEHRINGER INGELHEIM P) 15 May 2008 (2008-05-15) revendications ; page 15, ligne 5 -----	6-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2018/052052

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009050691	A2	23-04-2009	
		AU 2008313274 A1	23-04-2009
		CA 2702655 A1	23-04-2009
		EP 2210092 A2	28-07-2010
		EP 2781223 A1	24-09-2014
		ES 2505440 T3	09-10-2014
		ES 2620487 T3	28-06-2017
		IL 225049 A	31-05-2016
		US 2010247516 A1	30-09-2010
		US 2012101029 A1	26-04-2012
		US 2013287726 A1	31-10-2013
		WO 2009050691 A2	23-04-2009

US 2013102485	A1	25-04-2013	NONE

WO 2008055889	A1	15-05-2008	NONE

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. C12Q1/6886
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

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

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	Karen Marcus ET AL: "Tumor cell-associated neuropilin-1 and vascular endothelial growth factor expression as determinants of tumor growth in neuroblastoma", Neuropathology, 1 septembre 2005 (2005-09-01), pages 178-187, XP055450789, Melbourne, Australia DOI: 10.1111/j.1440-1789.2005.00610.x Extrait de l'Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1440-1789.2005.00610.x/pdf page 183 et figure 4 ----- -/-	1-12



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 novembre 2018

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/11/2018

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

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

Fonctionnaire autorisé

Hennard, Christophe

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MCARDLE L ET AL: "Oligonucleotide microarray analysis of gene expression in neuroblastoma displaying loss of chromosome 11q", CARCINOGENESIS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 25, no. 9, 1 septembre 2004 (2004-09-01), pages 1599-1609, XP002578140, ISSN: 0143-3334, DOI: 10.1093/CARCIN/BGH173 [extrait le 2004-04-16] page 1608	1-12
A	N. MEJHERT ET AL: "Semaphorin 3C is a novel adipokine linked to extracellular matrix composition", DIABETOLOGIA, vol. 56, no. 8, 12 mai 2013 (2013-05-12), pages 1792-1801, XP055450795, BERLIN, DE ISSN: 0012-186X, DOI: 10.1007/s00125-013-2931-z page 1795, colonne 1	1-12
X	WO 2009/050691 A2 (RAPPAPORT FAMILY INST FOR RES [IL]; NEUFELD GERA [IL]; KIGEL BOAZ [IL]) 23 avril 2009 (2009-04-23)	6,11
Y	revendications	1-12
Y	E. E. EVANS ET AL: "Antibody Blockade of Semaphorin 4D Promotes Immune Infiltration into Tumor and Enhances Response to Other Immunomodulatory Therapies", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH, vol. 3, no. 6, 22 janvier 2015 (2015-01-22), pages 689-701, XP055333625, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0171 page 692 colonne 1	1
Y	US 2013/102485 A1 (LEE INHAN [US]) 25 avril 2013 (2013-04-25) page 8, tableau 1	1-12
	-/--	

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	H JIA ET AL: "Neuropilin-1 antagonism in human carcinoma cells inhibits migration and enhances chemosensitivity", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 102, no. 3, 19 janvier 2010 (2010-01-19), pages 541-552, XP055450804, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bjc.6605539 page 548, "Discussion" -----	1
Y	MITRA FAKHARI ET AL: "Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma", CANCER., vol. 94, no. 1, 1 janvier 2002 (2002-01-01), pages 258-263, XP055523201, US ISSN: 0008-543X, DOI: 10.1002/cncr.10177 page 260, figure 1 -----	1-12
Y	NAIR ET AL: "High-resolution analysis of 3p deletion in neuroblastoma and differential methylation of the SEMA3B tumor suppressor gene", CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 174, no. 2, 21 avril 2007 (2007-04-21), pages 100-110, XP022041109, ISSN: 0165-4608, DOI: 10.1016/J.CANCERGENCYTO.2006.11.017 pages 105-107 -----	1-12
Y	WO 2008/055889 A1 (UNIV OSAKA [JP]; BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]; BOEHRINGER INGELHEIM P) 15 mai 2008 (2008-05-15) revendications ; page 15, ligne 5 -----	6-12

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2018/052052

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009050691 A2	23-04-2009	AU 2008313274 A1	23-04-2009
		CA 2702655 A1	23-04-2009
		EP 2210092 A2	28-07-2010
		EP 2781223 A1	24-09-2014
		ES 2505440 T3	09-10-2014
		ES 2620487 T3	28-06-2017
		IL 225049 A	31-05-2016
		US 2010247516 A1	30-09-2010
		US 2012101029 A1	26-04-2012
		US 2013287726 A1	31-10-2013
		WO 2009050691 A2	23-04-2009

US 2013102485 A1	25-04-2013	AUCUN	

WO 2008055889 A1	15-05-2008	AUCUN	
