



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2006/12/15
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2007/06/28
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2008/06/13
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2006/051367
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2007/071874
(30) Priorité/Priority: 2005/12/16 (FR0553921)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 5/06* (2006.01),
A61K 38/05 (2006.01), *G01N 33/68* (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM), FR

(72) Inventeurs/Inventors:
HIBERT, MARCEL, FR;
CHABANE, HADJILA, FR;
BONNET, DOMINIQUE, FR;
HAIECH, JACQUES, FR;
RENAULT-MIHARA, FRANCOIS, JP;
CHNEIWEISS, HERVE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : NOUVEAUX COMPOSES INTERAGISSANT AVEC PEA-15
(54) Title: NOVEL COMPOUNDS WHICH INTERACT WITH PEA-15

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention se rapporte à de nouveaux composés pseudo-peptidiques de formule définie, aptes à interagir avec la protéine PEA- 15 et leur utilisation dans des procédés de criblage et un procédé de diagnostic d'états pathologiques susceptibles d'impliquer PEA-15.



(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
28 juin 2007 (28.06.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/071874 A3(51) Classification internationale des brevets :
C07K 5/06 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)

(74) Mandataire : LE COUPANEC, Pascale; NONY & ASSOCIES, 3 Rue De Penthièvre, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/051367(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(22) Date de dépôt international :
15 décembre 2006 (15.12.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0553921 16 décembre 2005 (16.12.2005) FR(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101 Rue De Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée :

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : HIBERT, Marcel [FR/FR]; 21 Rue Alfred Kastler, F-67114 Eschau (FR). CHABANE, Hadjila [FR/FR]; 10 Rue Du Lieutenant Homps, F2 - Lot 105, F-67400 Illkirch (FR). BONNET, Dominique [FR/FR]; 20 Rue Du Faisan, F-67118 Geispolsheim (FR). HAIECH, Jacques [FR/FR]; 2 Rue Du Dome, F-67000 Strasbourg (FR). RENAULT-MIHARA, François [FR/JP]; 8-16-13 Fukazawa, Setagaya-ku, Tokyo, 158-0081 (JP). CHNEI-WEISS, Hervé [FR/FR]; 20 Rue Des 4 Fils, F-75003 Paris (FR).— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 16 août 2007

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

(54) Title: NOVEL COMPOUNDS WHICH INTERACT WITH PEA-15

(54) Titre : NOUVEAUX COMPOSES INTERAGISSANT AVEC PEA-15

(57) Abstract: The present invention relates to novel pseudopeptide compounds of defined formula, capable of interacting with the PEA-15 protein and to the use thereof in screening methods and to a method of diagnosing pathological conditions which may involve PEA-15.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouveaux composés pseudo-peptidiques de formule définie, aptes à interagir avec la protéine PEA- 15 et leur utilisation dans des procédés de criblage et un procédé de diagnostic d'états pathologiques susceptibles d'impliquer PEA-15.

WO 2007/071874 A3

Nouveaux composés interagissant avec PEA-15

La présente invention a pour objet des composés susceptibles d'interagir avec la protéine PEA-15 (Phosphoprotéine Enrichie dans les Astrocytes, d'un poids moléculaire de 15 kDa), leurs dérivés fluorescents, ainsi que la mise en œuvre de ces composés dans des procédés de criblage et de diagnostic, et des compositions pharmaceutiques.

PEA-15 est une petite protéine cytoplasmique de 130 acides aminés abondamment exprimée dans le cerveau, en particulier dans les astrocytes, et, plus faiblement, de manière ubiquitaire dans de nombreux autres tissus.

La structure de cette protéine, très conservée parmi les vertébrés, comprend à l'extrémité N-terminale un domaine effecteur de mort (Death Effector Domain, DED) de 80 acides aminés, et un domaine NES (Nuclear Export Signal), et une extrémité C-terminale de structure peu organisée contenant des sites de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC), et par la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de type II.

La séquence génomique de PEA-15 est composée de quatre exons et s'étend sur environ 10,2 kb d'ADN génomique (Wolford *et al.*, 2000, Gene, 241:143).

PEA-15 est présente *in vivo* sous différentes formes : non phosphorylée, mono- et bi-phosphorylée, présentant chacune une activité biologique différente.

PEA-15 est une protéine multifonctionnelle susceptible d'interagir avec de nombreux partenaires au moyen de ses différents domaines fonctionnels, et selon son degré de phosphorylation (Renault *et al.*, Biochem. Pharmacol, 2003, 66:1581). A ce jour, sept partenaires de PEA-15 ont été identifiés, intervenant dans les multiples fonctions remplies par cette protéine, à savoir FADD, caspase 8, Omi/HtraA2, ERK1/2, Akt, Rsk2, et la phospholipase D1. Par ces multiples interactions, PEA-15 paraît jouer un rôle central dans de nombreux processus cellulaires physiologiques et/ou pathologiques.

Il a été montré que cette protéine possède, notamment, les propriétés d'inhiber l'apoptose, d'inhiber l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, d'être impliquée dans le rétablissement de la signalisation des intégrines inhibée par l'expression de l'oncogène H-Ras, d'inhiber la prolifération cellulaire, et d'être impliquée dans le transport du glucose et la sécrétion d'insuline (Renault *et al.*, Biochem. Pharmacol., 2003, 66 :1581).

Par exemple, il a été observé que la suppression de l'expression de PEA-15 dans les astrocytes se traduit par une augmentation de la sensibilité de ces derniers à l'apoptose induite par le TNF alpha (Kitsberg et al., J. Neurosci., 1999, 19:8244) et que la

réduction de l'expression de cette protéine entraîne une augmentation de la prolifération de différentes lignées cellulaires telles que les astrocytes, les lymphocytes et les hépatocytes (Formstecher et al., Dev. Cell., 2001, 1:239). Il a également été observé que l'expression de la protéine inhibe également la migration cellulaire.

5 Par ailleurs, cette protéine pourrait également être impliquée dans la genèse et/ou le développement des tumeurs primitives cérébrales, ainsi que dans les processus métastatiques.

Par exemple, une augmentation de l'expression de PEA-15 a été observée dans différentes tumeurs telles que les gliomes, le cancer de l'ovaire, le cancer du rein, le cancer
10 du sein, dans les carcinomes hépatocellulaires, les lymphomes ou les mélanomes (Hwang et al., Genomics, 1997, 42 :540 ; Bera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91 :9789).

De même, la surexpression de cette protéine dans des souris transgéniques augmente leur sensibilité aux cancers de la peau induits chimiquement (Formisano et al., Oncogene, 2005, 24:7012).

15 Par contre, l'expression de PEA-15 dans un tissu induit une inhibition de la permissivité de ce dernier vis-à-vis de l'invasion par des cellules tumorales.

Il a également été montré que des cellules du cancer du sein pouvaient être sensibilisées à la chimiothérapie par diminution de l'expression de PEA-15 (Stassi et al., Cancer Res., 2005, 65:6668).

20 WO 2004/108961 propose l'utilisation de PEA-15 à titre de marqueur et de cible thérapeutique pour les papillomes.

En outre, une surexpression de PEA-15 a été observée dans les fibroblastes, les muscles striés et le tissu adipeux de patients affectés par le diabète de type II (Condorelli et al., EMBO. J., 1997, 17 :3858), et il a été montré que la suppression de l'expression de
25 cette protéine permettait de restaurer la sécrétion d'insuline en réponse au glucose.

Une surexpression de cette protéine est également observée dans certains processus inflammatoire.

EP 1 189 060 propose l'utilisation de PEA-15 à titre de marqueur et de cible thérapeutique dans les maladies neurodégénératives.

30 Par conséquent, il apparaît que PEA-15 pourrait servir de cible thérapeutique dans de nombreux états pathologiques. Or, à ce jour, on ne dispose pas de composés aisément accessibles susceptibles de moduler l'activité de cette protéine.

Par ailleurs, on ne dispose pas non plus d'outils susceptibles de permettre de cribler aisément de tels composés.

Par conséquent, il existe un besoin d'accéder facilement à des composés susceptibles d'interagir avec PEA-15 et de moduler son activité.

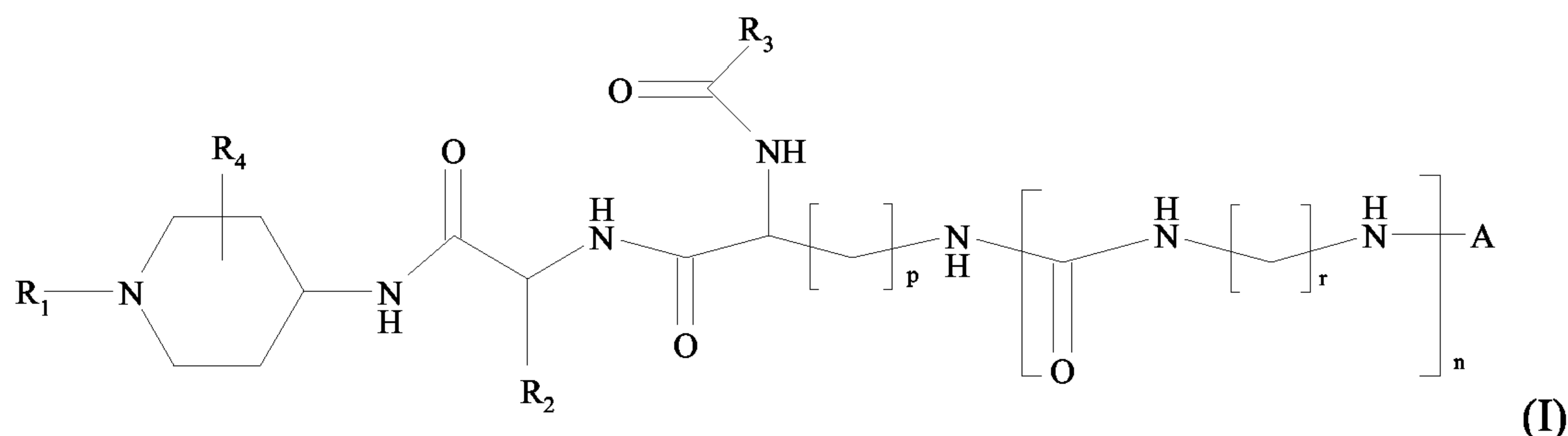
5 Il existe également un besoin de disposer d'outils de criblage de composés susceptibles de moduler l'activité biologique de PEA-15.

Il existe également un besoin de disposer de nouveaux composés pour le traitement d'état pathologique tel que le cancer et le diabète de type II.

10 Il existe également un besoin de disposer d'outils pour le diagnostic et/ou le pronostic d'états pathologiques impliquant PEA-15, et notamment une altération de son expression voire de son activité biologique, tels que le diabète de type II, le cancer, notamment les gliomes, les carcinomes, ou des états pathologiques impliquant un excès ou un défaut d'apoptose ou de prolifération cellulaire, par exemple.

La présente invention a pour but de donner satisfaction en ces termes.

15 De manière inattendue, les inventeurs ont observé que des composés de formule générale (I) suivante :



dans laquelle n, p, r, R₁, R₂, R₃, R₄ et A sont tels que définis par la suite, sont susceptibles d'interagir avec PEA-15 et d'en moduler l'activité.

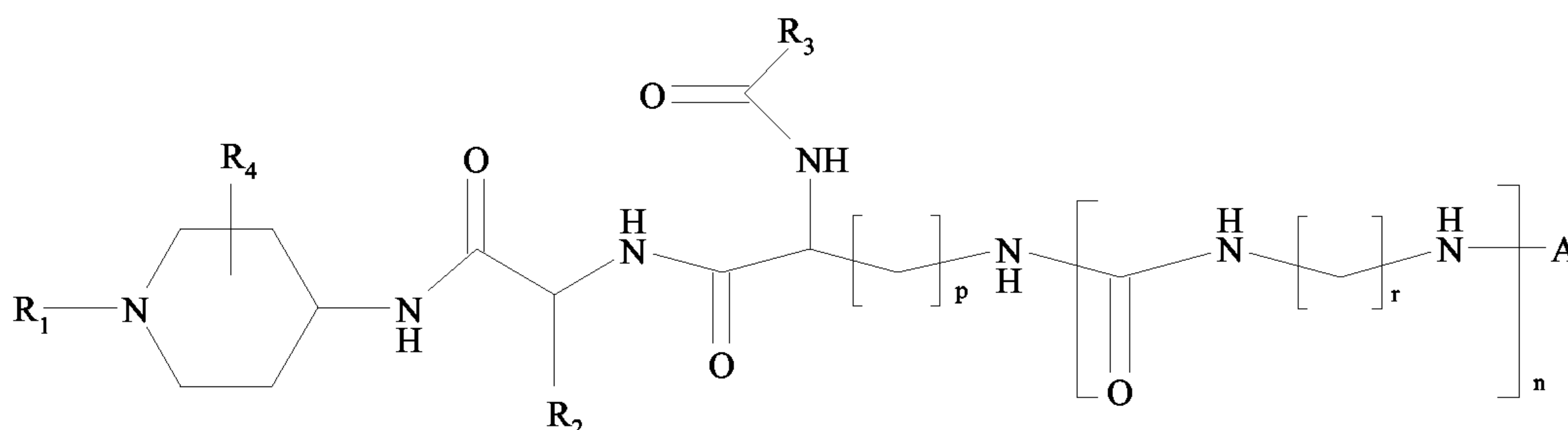
20 Ainsi, les inventeurs ont observé qu'un composé conforme à l'invention, comme par exemple le composé fluorescent 6D6-1, détaillé par la suite, est capable d'interagir de manière spécifique avec une protéine de PEA-15 et de moduler son activité biologique.

25 Par ailleurs, les inventeurs ont également observé qu'il était possible d'utiliser un composé de l'invention notamment fluorescent en combinaison avec une protéine de fusion fluorescente GFP-PEA-15 (Green Fluorescent Protein) pour développer des procédés mettant en oeuvre un transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET)

permettant, par exemple, le criblage d'agents susceptibles d'interagir avec PEA-15 ainsi que le diagnostic et/ou le pronostic d'états pathologiques impliquant PEA-15.

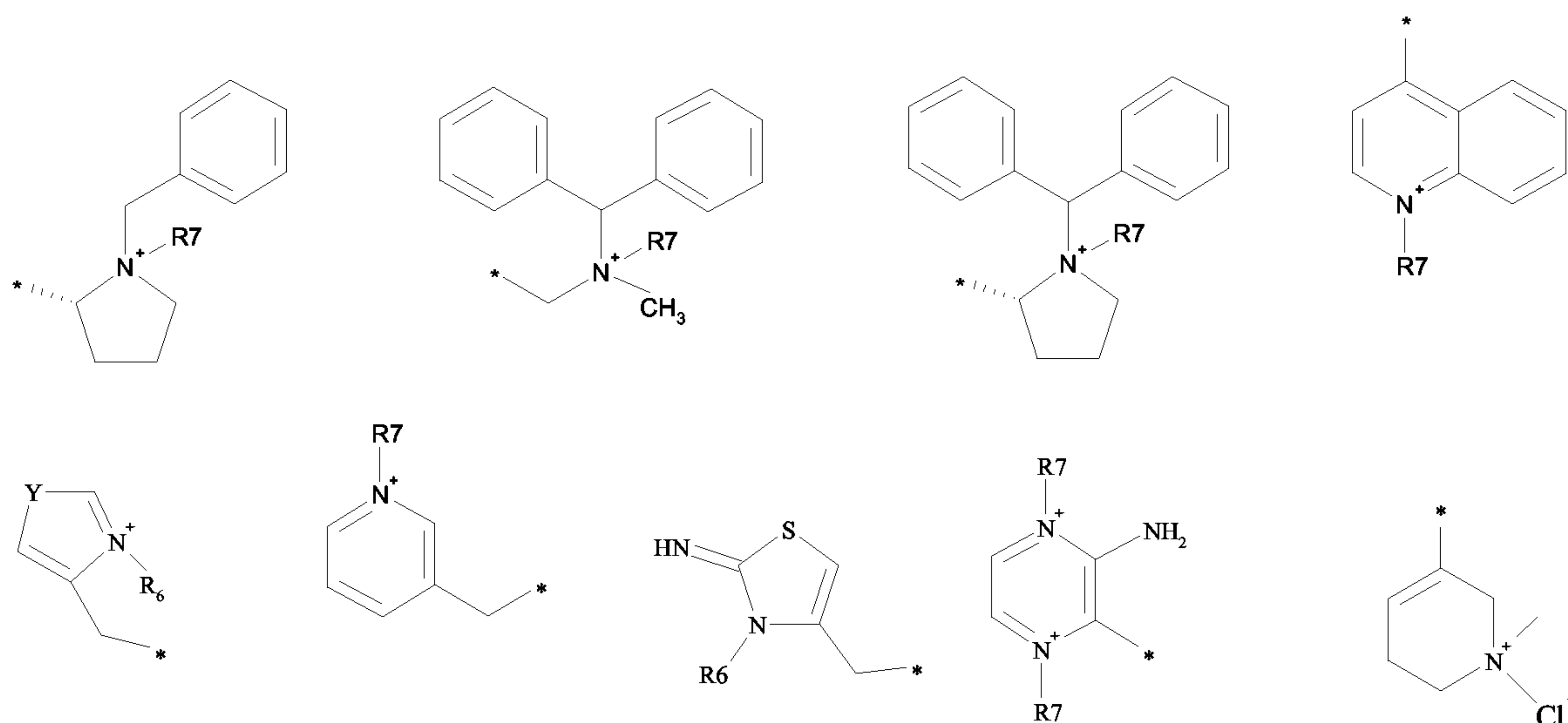
Il est également possible d'utiliser un tel composé notamment fluorescent en combinaison avec une protéine de fusion GST-PEA 15 pour mettre en œuvre un procédé de criblage par compétition permettant d'identifier des agents susceptibles d'interagir avec PEA15.

Ainsi, selon un de ses premiers aspects, la présente invention se rapporte à un composé de formule (I) suivante :



dans laquelle :

- n peut être égal à 0 ou 1,
- p peut représenter un nombre entier variant de 1 à 6, et en particulier variant de 2 à 4,
- r peut représenter un nombre entier variant de 1 à 12, et en particulier variant de 2 à 6, et en particulier est égal à 4,
- R_1 peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C_1 à C_{20} , saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C_3 à C_{10} , saturé ou insaturé, un radical aryle en C_6 à C_{10} , optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C_1 à C_6 , ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C_1 à C_{10} ,
- R_2 peut représenter une chaîne latérale d'acide aminé ou d'un dérivé d'acide aminé,
- $-COR_3$ peut représenter un radical acyle porteur d'une entité basique R_3 notamment choisie parmi les radicaux de formules suivantes :



- dans lesquelles * symbolise une liaison covalente avec le radical acyle, Y peut représenter N ou N+R₇, et R₆ et R₇ peuvent représenter, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₂₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C₁ à C₁₀,

- R₄ peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₁₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C₁ à C₁₀,

- A peut représenter un radical dérivé d'un reste xanthène, notamment un reste phényl-9 xanthène, d'un reste acridine, notamment un reste phényl-9 acridine, ou d'un reste 4-bora-3a,4a-diaza indacène,

- et ses dérivés.

Au sens de l'invention, on entend désigner par « reste » au regard d'une molécule donnée, la molécule sous la forme d'un radical.

Avantageusement, A peut représenter un marqueur fluorescent.

Selon un autre de ses aspects, la présente invention se rapporte à un procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou un de ses analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

(a) mettre en présence, au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé notamment fluorescent conforme à l'invention, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(b) A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

(c) mesurer un premier signal S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(d) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un milieu présumé contenir au moins un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(e) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(f) comparer les premier et second signaux S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « analogue de protéine PEA-15 » un composé de type peptidique, présentant une homologie de séquences avec PEA-15 et une activité biologique similaire, ainsi que des variants susceptibles de résulter de l'épissage alternatif de l'ARNm codant pour cette protéine, comme par exemple celui décrit par Underhill et al. (Mamm. Genome, 2001, 12:172), ainsi que des fragments de cette protéine ou de ces composés de type peptidique présentant la capacité de lier un composé de formule conforme à l'invention. Par « activité biologique », on entend désigner les propriétés biologiques de la protéine PEA-15, notamment telles qu'indiquées précédemment.

Par « homologie de séquences », on entend désigner une identité de séquence d'au moins 85 %, en particulier d'au moins 90 % et plus particulièrement d'au moins 95 % de l'analogue avec la protéine PEA-15, et en particulier les séquences caractéristiques de PEA-15 (Renault et al., Biochem. Pharmacol. 2003, 66 :1581), à savoir le domaine DED, et notamment la séquence conservée RxDLF, le domaine NES (Nuclear Export Signal), les

séquences peptidiques impliquées dans l'interaction de la protéine PEA-15 avec ses différents partenaires protéiques (par exemple ERK1/2, Akt, FADD, caspase 8) et les séquences peptidiques comprenant les sites de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) ou la protéine kinase calcium/calmoduline-dépendante de type II, à savoir
5 respectivement les motifs LTRIPSAKK (S104) et DIRQPSEEIIK (S116) (S: sérine phosphorylée).

La nature des modifications susceptibles d'être introduites dans une protéine pour obtenir des analogues tels que définis ci-dessus et les procédés pour les mettre en œuvre relèvent des connaissances et de la pratique de routine de l'homme de l'art.

10 Selon un autre de ses aspects, la présente invention a pour objet un procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou un de ses analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

(a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 liée à un support avec un composé conforme à l'invention, dans des conditions propices à une interaction avec
15 ladite protéine,

(b) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a),

(c) mettre en présence l'ensemble obtenu à l'étape a) avec un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

20 (d) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c),

(e) comparer S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention se rapporte à un
25 procédé de diagnostic et/ou de pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15 par détection et, éventuellement, par quantification de PEA-15 dans un échantillon biologique prélevé chez un individu comprenant au moins les étapes consistant à :

(a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé, notamment fluorescent,
30 conforme à l'invention dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(b) A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

(c) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape
5 a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(d) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un échantillon biologique présumé comprendre au moins une protéine PEA-15 dans des conditions propices à l'interaction de ladite protéine PEA-15 de l'échantillon biologique avec ledit
10 composé selon l'invention,

(e) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(f) comparer S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle
15 présence de la protéine PEA-15 dans ledit échantillon biologique, et éventuellement une conclusion relative à la quantité de ladite protéine.

Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention se rapporte également à un complexe isolé comprenant au moins une protéine PEA-15 et au moins un composé de formule conforme à l'invention.

20 Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention concerne également une trousse pour criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou l'un de ses analogues, comprenant :

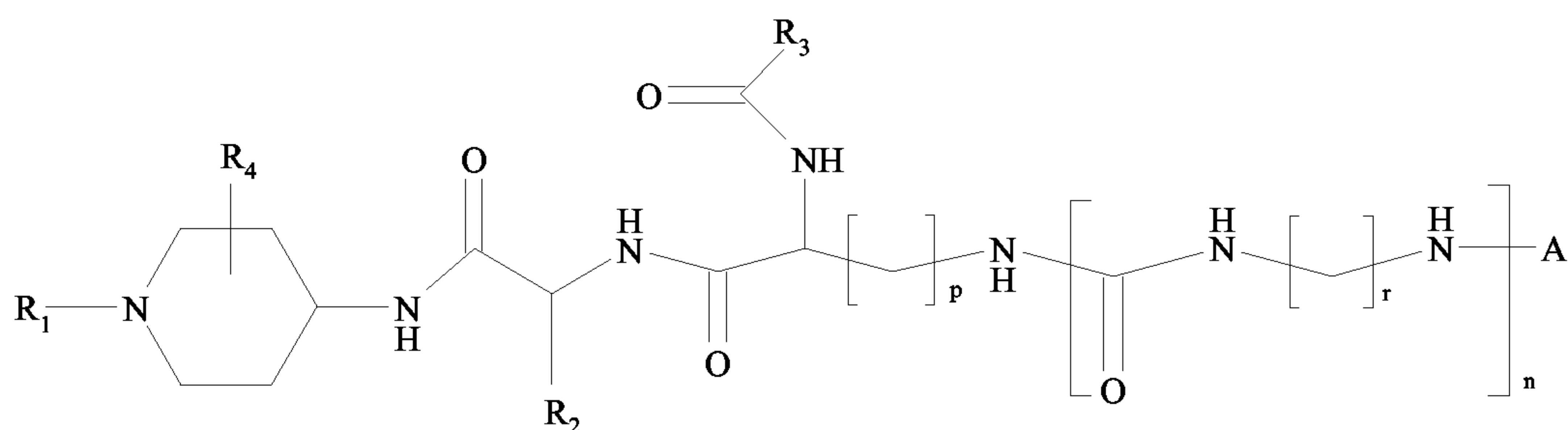
- au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D ou un marqueur de purification, et
- 25 - au moins un composé conforme à l'invention,

le cas échéant, A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence.

30 COMPOSES

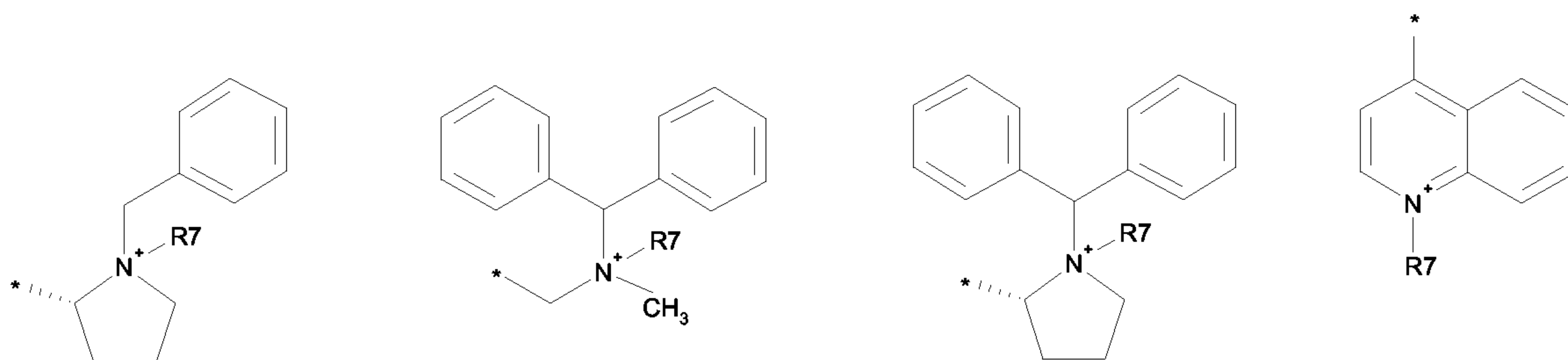
Les composés de l'invention sont de formule générale (I) suivante :

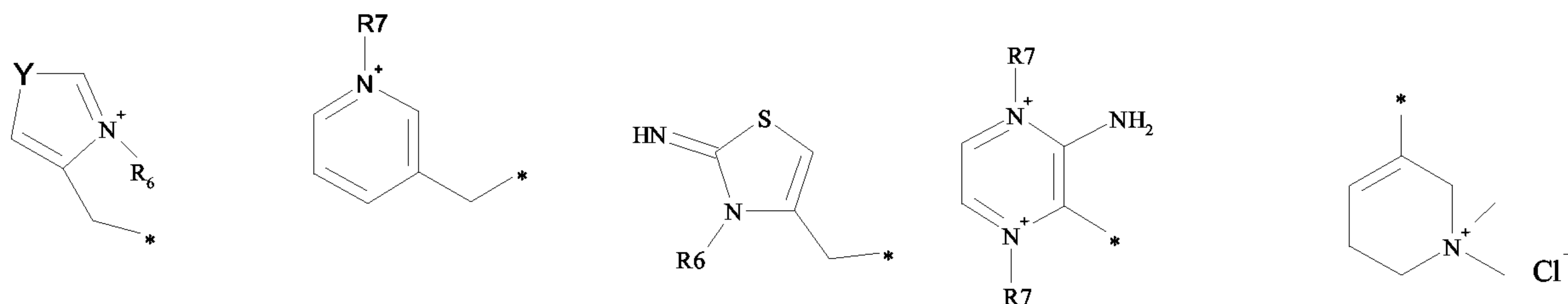
(I)



dans laquelle :

- n peut être égal à 0 ou 1,
- 5 - p peut représenter un nombre entier variant de 1 à 6, et en particulier variant de 2 à 4,
- r peut représenter un nombre entier variant de 1 à 12, et en particulier variant de 2 à 6, et en particulier égal à 4,
- R₁ peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₂₀,
10 saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀ substitué par un ou plusieurs atome(s) d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C₁ à C₁₀,
- R₂ peut représenter une chaîne latérale d'acide aminé ou d'un dérivé d'acide
15 aminé,
- -COR₃ peut représenter un radical acyle porteur d'une entité basique R₃ notamment choisie parmi les radicaux de formules suivantes :





- dans lesquelles * symbolise une liaison covalente avec le radical acyle, Y peut représenter N ou N⁺-R₇, et R₆ et R₇ peuvent représenter, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₂₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C₁ à C₁₀,

- R₄ peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₁₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en C₁ à C₁₀,

- A peut représenter un radical dérivé d'un reste xanthène, notamment d'un reste phényl-9 xanthène, d'un reste acridine, notamment d'un reste phényl-9 acridine, ou d'un reste 4-bora-3a,4a-diaza indacène,

- et ses dérivés.

Selon un mode de réalisation, A peut représenter un marqueur fluorescent.

Au sens de l'invention, on entend désigner par « reste » au regard d'une molécule donnée, la molécule sous la forme d'un radical.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « dérivé », des formes tautomères, des formes stéréoisomères, des formes polymorphes, des sels pharmaceutiquement acceptables et des solvates pharmaceutiquement acceptables.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « forme tautomère », l'un des isomères dont les structures diffèrent par la position d'un atome, en général d'hydrogène, et d'une ou de plusieurs liaisons multiples et qui sont capables de se transformer facilement et réversiblement l'un dans l'autre.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « forme stéréoisomère » des isomères de molécules de constitution identique, et qui ne diffèrent que par un ou des arrangement(s) différents de leurs atomes dans l'espace.

5 Au sens de la présente invention, on entend désigner par « sels pharmaceutiquement acceptables » des composés obtenus par réaction d'un composé de formule générale (I) avec une base ou un acide.

A titre d'exemple de base convenant à l'invention on peut mentionner l'hydroxyde de sodium, le méthoxyde de sodium, l'hydruide de sodium, le t-butoxyde de potassium, l'hydroxyde de calcium, l'hydroxyde de magnésium, et analogues, et leurs
10 mélanges, dans des solvants tels que le THF (tétrahydrofurane), le méthanol, le t-butanol, le dioxane, l'isopropanol, l'éthanol, leurs analogues, et leurs mélanges.

Les bases organiques comme la lysine, l'arginine, la diéthanolamine, la choline, la trométhamine, la guanidine et leurs dérivés peuvent également être utilisés.

A titre d'exemple de sels d'addition d'acide convenant à l'invention, on peut
15 citer ceux susceptibles d'être préparés par réaction d'un composé de formule générale (I) avec un acide tel que l'acide chlorhydrique, l'acide bromhydrique, l'acide nitrique, l'acide sulfurique, l'acide phosphorique, l'acide p-toluènesulfonique, l'acide méthanesulfonique, l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide maléique, l'acide salicylique, l'acide hydroxynaphtoïque, l'acide ascorbique, l'acide palmitique, l'acide succinique, l'acide
20 benzoïque, l'acide benzènesulfonique, l'acide tartrique, et analogues, et leurs mélanges, dans les solvants tels que l'acétate d'éthyle, l'éther, des solvants alcooliques, l'acétone, le THF, le dioxane, leurs analogues et leurs mélanges.

On entend désigner par « forme polymorphe », des composés obtenus par cristallisation d'un composé de formule générale (I) dans différentes conditions, telles que
25 par exemple l'utilisation de différents solvants, généralement utilisés pour la cristallisation. La cristallisation à différentes températures impliquent, par exemple, différents modes de refroidissement, par exemple des refroidissements très rapides à très lents impliquant des étapes de chauffage ou fusion de composés suivi par un refroidissement graduel ou rapide. La présence de formes polymorphes peut être déterminée au moyen d'analyses par
30 spectroscopie RMN, par spectroscopie IR (infrarouge), par DSC (Differential Scanning Calorimetry), par diffraction de rayons X ou d'autres techniques analogues.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « radical alkyle », un radical hydrocarboné linéaire, ou ramifié, saturé ou insaturé, de 1 à 20 atomes de carbone, en particulier de 2 à 18 atomes de carbone, en particulier de 3 à 16 atomes de carbone, en particulier de 4 à 12 atomes et plus particulièrement de 6 à 10 atomes de carbone, susceptible d'être substitué par des radicaux tels que définis ci-après.

A titre d'exemple, sont inclus dans cette définition des radicaux tels que méthyle, éthyle, isopropyle, n-butyle, t-butyle, t-butylméthyle, n-propyle, pentyle, n-hexyle, 2-éthylbutyle, heptyle, octyle, nonyle, ou décyle.

Au sens de la présente invention, on entend par « radical cycloalkyle », un cycle alkylène, optionnellement ramifié, saturé ou insaturé, de 3 à 10 atomes de carbone, en particulier en C₄ à C₈ et plus particulièrement en C₆, tel que le cyclopropyle, le cyclopentyle, le cyclohexyle, le cyclohexylméthyle, le cycloheptyle.

Au sens de la présente invention, on entend par « radical aryle », un cycle aromatique comprenant de 1 à 3 noyaux aromatiques, éventuellement fusionnés, de 6 à 20 atomes de carbone, notamment de 10 à 14 atomes de carbone, comprenant optionnellement un plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N et S, et le cas échéant étant substitués par des radicaux tels que définis ci-dessus et ci-après.

A titre d'exemple de radicaux aryle convenant à la mise en œuvre de l'invention il est possible de mentionner le radical phényle, le radical benzyle, le radical phenétyle, le radical naphtyle, le radical anthryle, et tous les cycles aromatiques comprenant un plusieurs hétéroatomes choisis parmi O, N et S, tel que par exemple la pyridine, le thiophène, le pyrrole, le furanne, la quinoléine, l'acridine, le xanthène, le 4-bora-3a,4a diaza indacène.

Au sens de la présente invention, on entend par « radical alkoxy », un radical -OR dans lequel le reste alkyle est un radical hydrocarboné linéaire, ramifié ou cyclique, condensé ou non, saturé ou insaturé de 1 à 20 atomes de carbone, en particulier de 2 à 18 atomes de carbone, en particulier de 3 à 16 atomes de carbone, en particulier de 4 à 12 atomes et plus particulièrement de 6 à 10 atomes de carbone.

On peut citer, à titre d'exemple, les groupes méthoxy, éthoxy, propoxy, butoxy, n-butoxy, isobutoxy, sec-butoxy, n-pentoxy, isopentoxy, sec-pentoxy, t-pentoxy, hexyloxy, méthoxyéthoxy, méthoxypropoxy, éthoxyéthoxy, éthoxypropoxy et analogues.

Au sens de la présente invention, on entend par « radical acyle », un radical hydrocarboné linéaire, ramifié ou cyclique, condensé ou non, saturé ou insaturé,

comprenant une fonction C=O et ayant de 1 à 10 atomes de carbone, en particulier de 2 à 8 atomes de carbone et de préférence de 3 à 6 atomes de carbone et plus particulièrement de 4 atomes de carbone par exemple, un radical formyle, un radical acétyle, un radical succinyle, un radical benzoyle, un radical 1-naphtoyle ou 2-naphtoyle.

5

La chaîne hydrocarbonée des radicaux précités peut être, le cas échéant, interrompue par un ou plusieurs hétéroatomes choisis, par exemple, parmi O, N et S, pour former, par exemple, un radical hétéroalkyle comme un radical alkyléther, un radical alkylester ou un hétérocycle.

10

Au sens de la présente invention, on entend par « radical hétérocyclique », par exemple, et de manière non limitative, un radical furanyle, un radical thiophényle, un radical pyrrolyle, un radical oxazolyle, un radical isoxazolyle, un radical thiazolyle, un radical isothiazolyle, un radical imidazolyle, un radical pyrazolyle, un radical furazanyle, un radical pyranyle, un radical pyridinyle, un radical pyridadinyne, un radical pyrimidinyle

15

ou un radical pyradinyne, un radical furannyle, un radical quinoléinyne.

Les radicaux définis ci-dessus peuvent le cas échéant être substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène.

Au sens de la présente invention, on entend par « atome d'halogène », un atome de F, Cl, Br ou I. Les atomes d'halogène avantageusement mis en œuvre dans la présente

20

En particulier, les radicaux alkylhalogénés peuvent être des radicaux perfluoroalkyles de formule générale C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10, en particulier de 2 à 8 et plus particulièrement de 3 à 6.

25

Selon un mode de réalisation, R_1 peut représenter notamment un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C_1 - C_{18} , un radical alkyle en C_2 - C_{16} , par exemple un radical aryle en C_6 à C_{10} , par exemple optionnellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène.

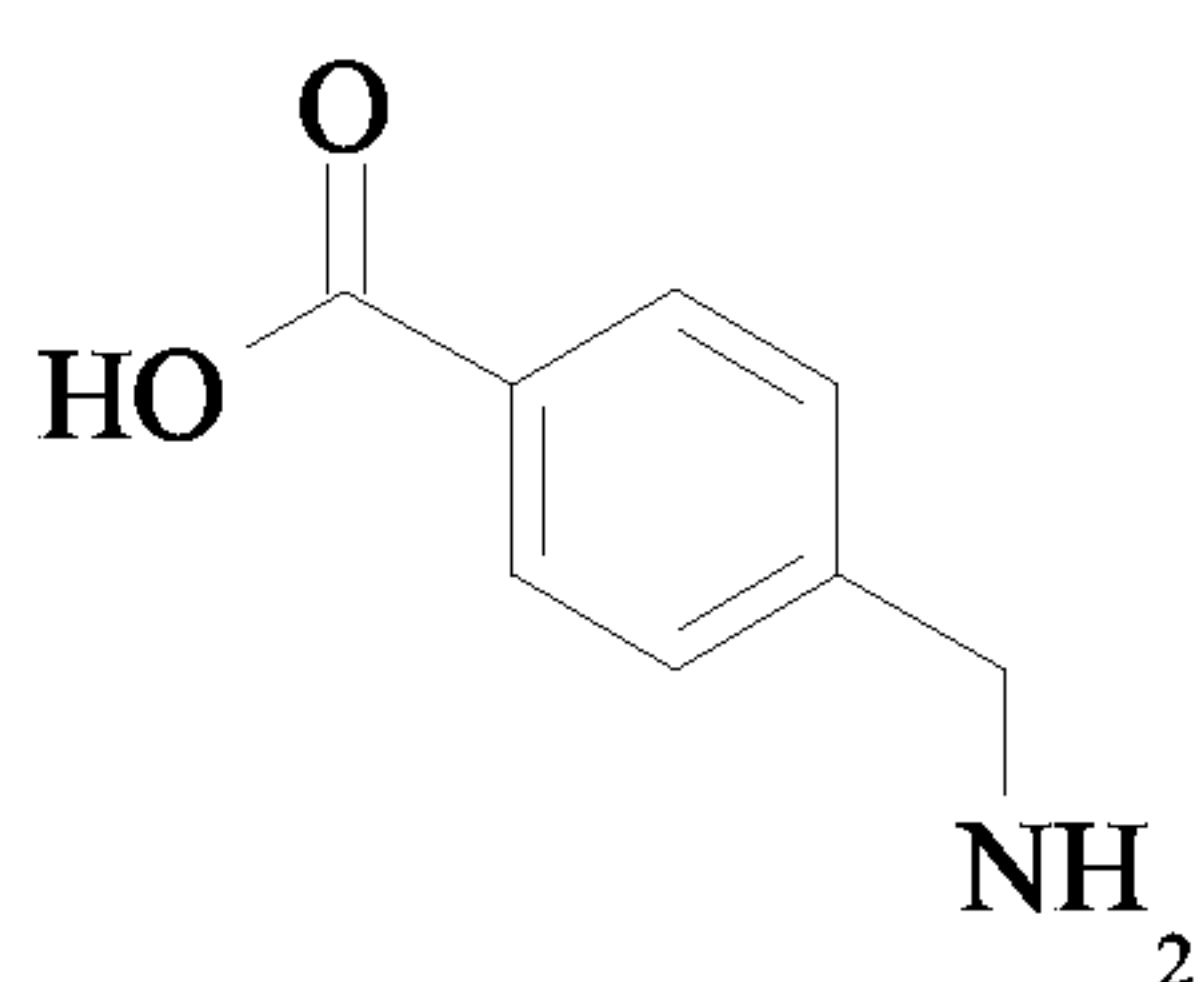
30

En particulier, R_1 peut représenter notamment un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phényyle, ou un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10, en particulier de 2 à 8 et plus particulièrement de 3 à 6.

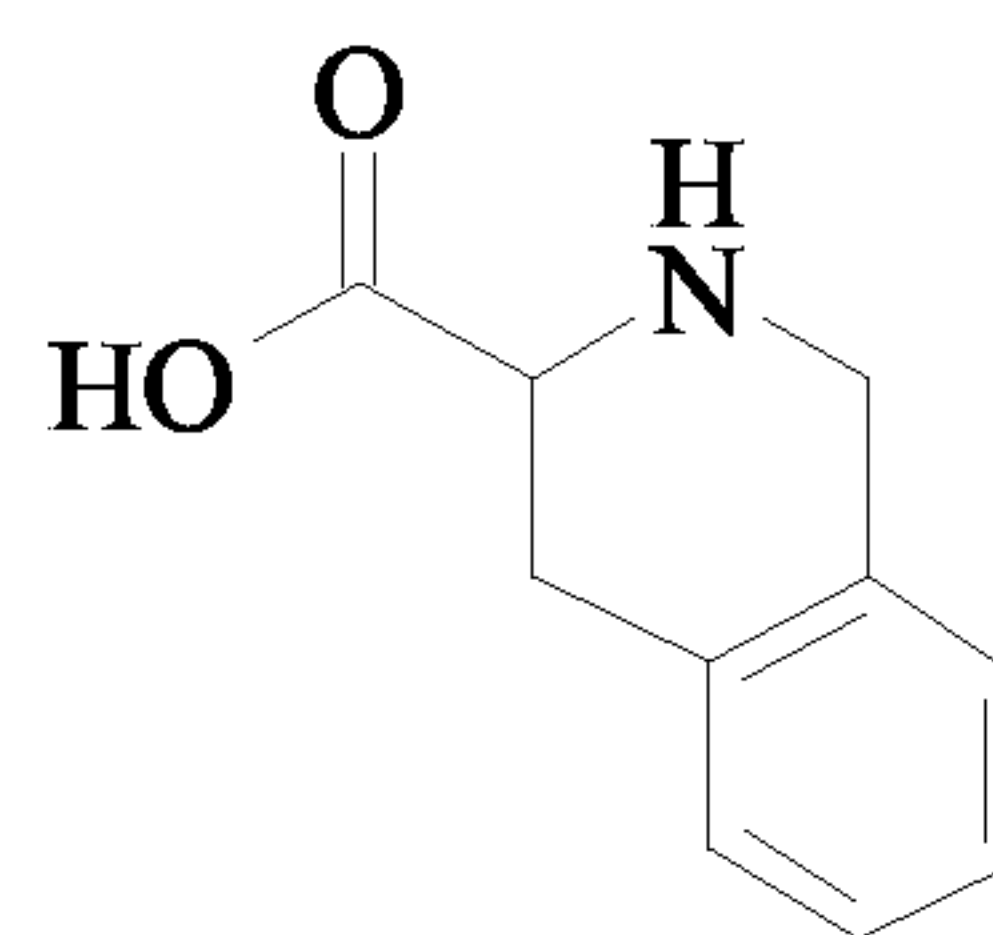
En particulier, R_1 peut être un radical méthyle ou un radical benzyle.

Selon un mode de réalisation, R_2 peut représenter une chaîne latérale d'un acide aminé ou dérivé d'acide aminé choisi, par exemple, parmi l'alanine, la glutamine, la leucine, la glycine, le tryptophane, la β -alanine, la phénylalanine, la 4-chloro-phénylalanine, l'acide isonipécotinique, l'acide 4-aminométhylbenzoïque, l'acide 3-tétrahydroisoquinoléinique et l'histidine libre ou benzylée.

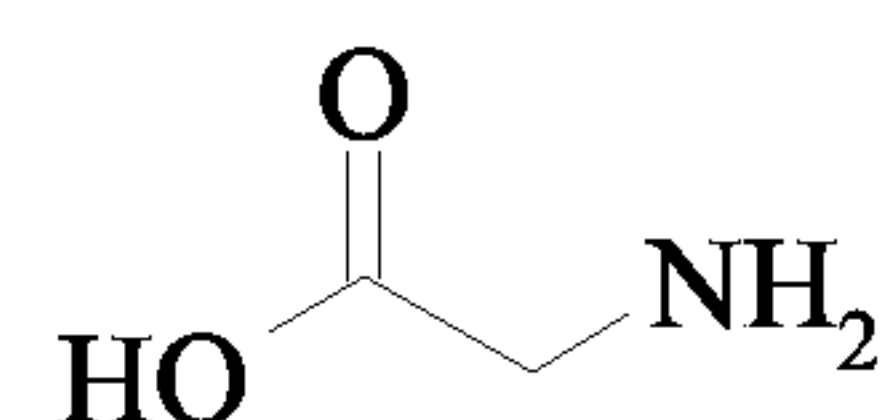
L'acide aminé ou dérivé d'acide aminé peut, par exemple, être choisi parmi :



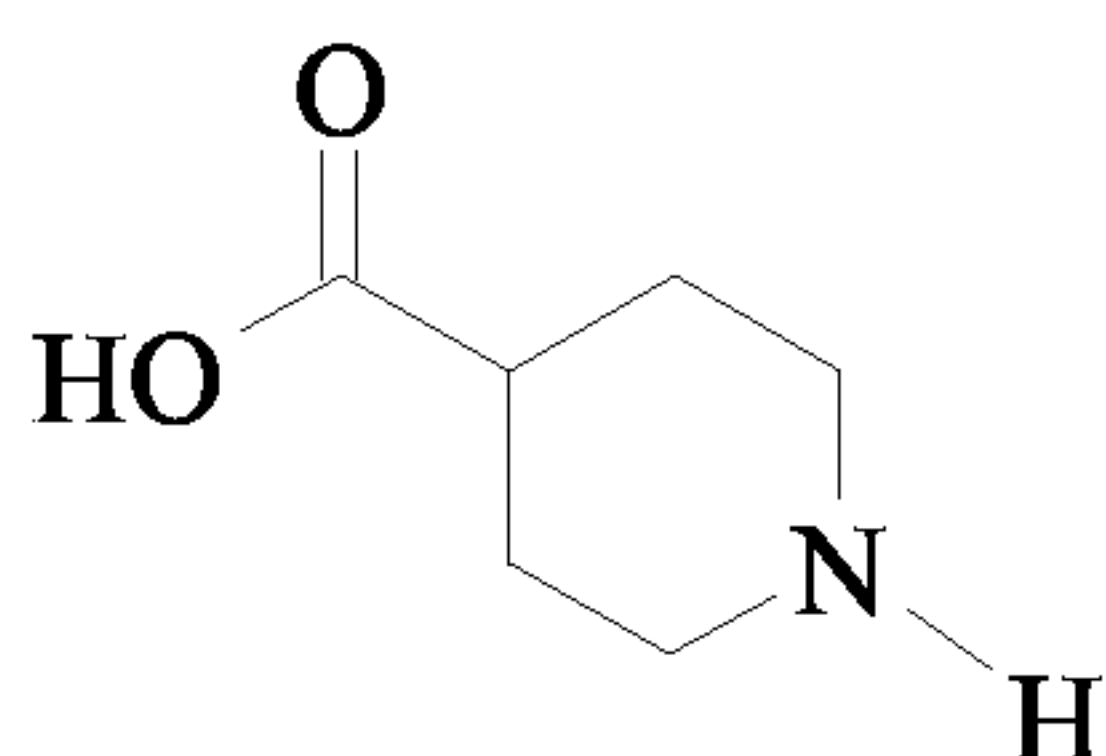
acide 4-amino-méthylbenzoïque



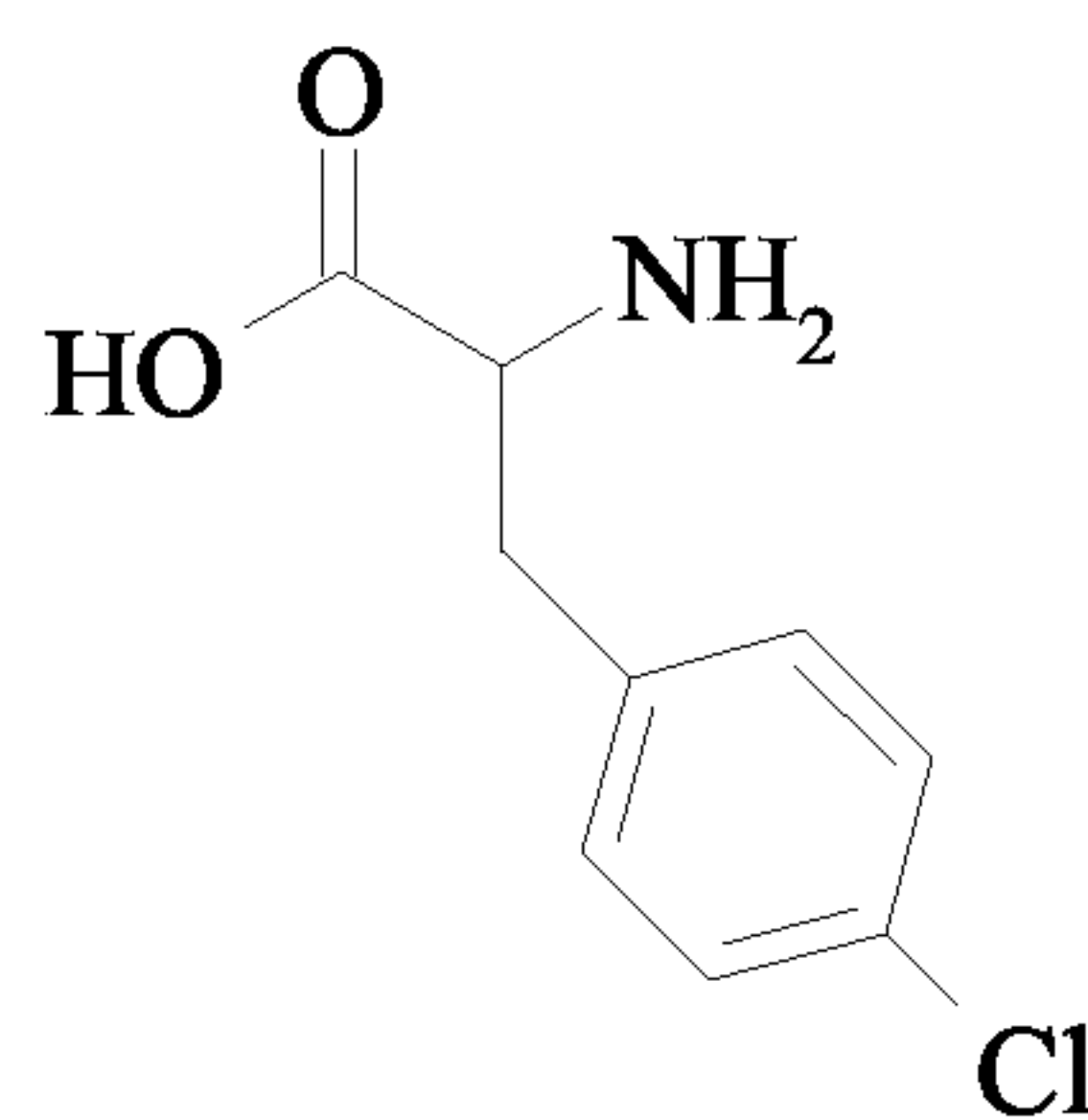
acide 3-tétrahydroisoquinoléinique



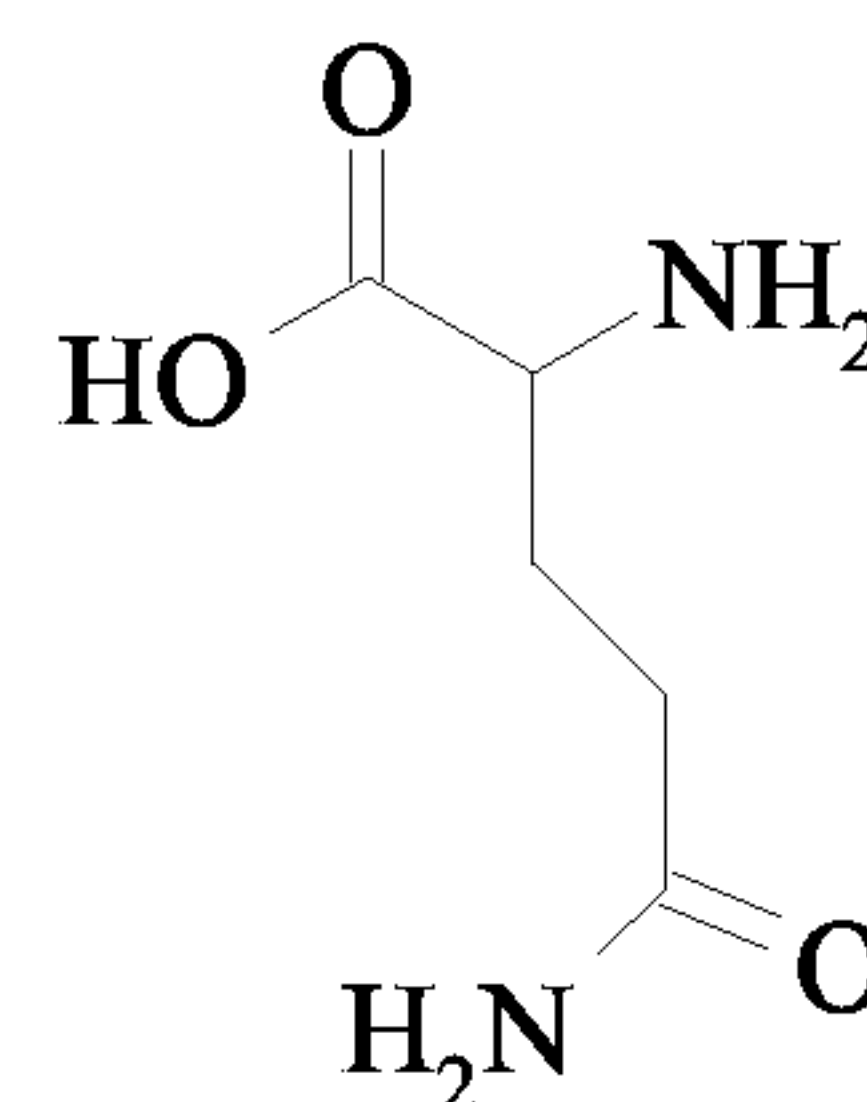
glycine



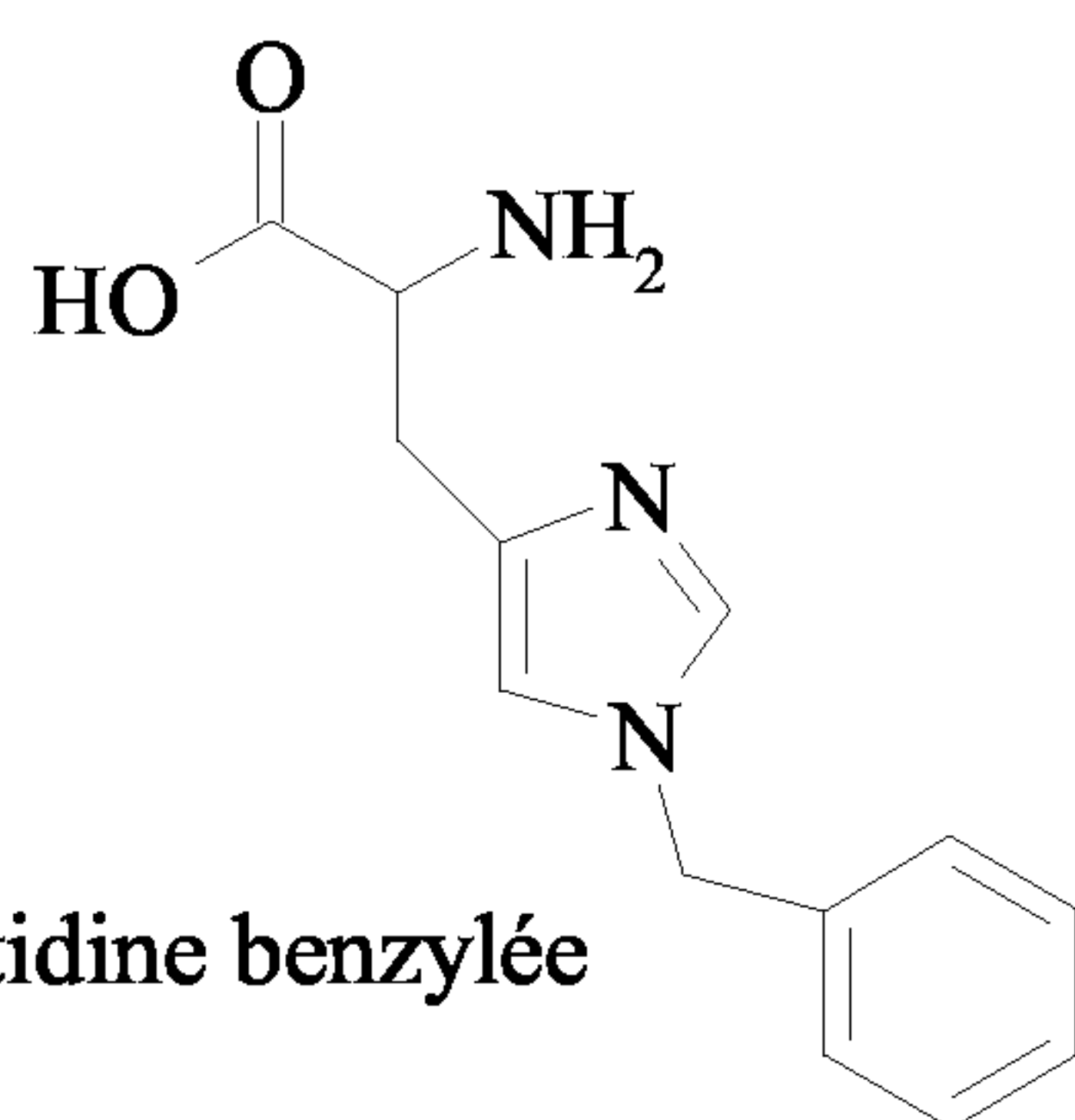
acide isonipécotinique



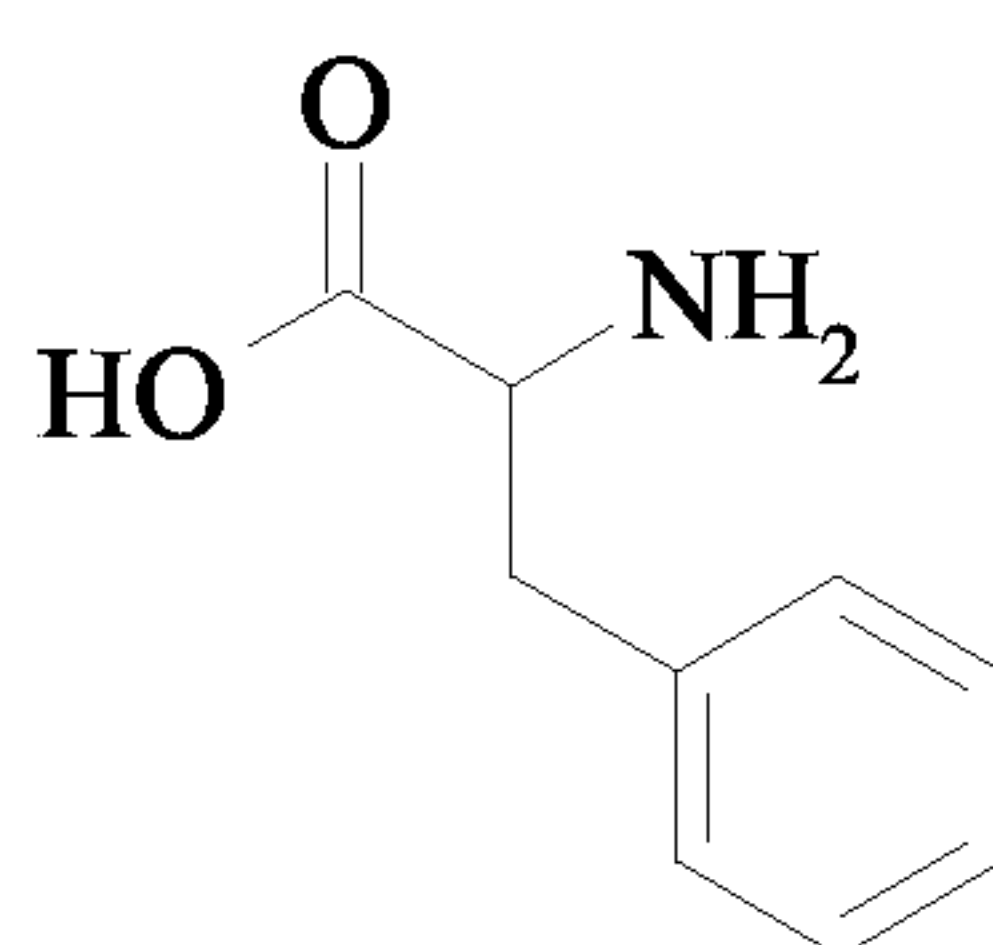
4-chloro-phénylalanine



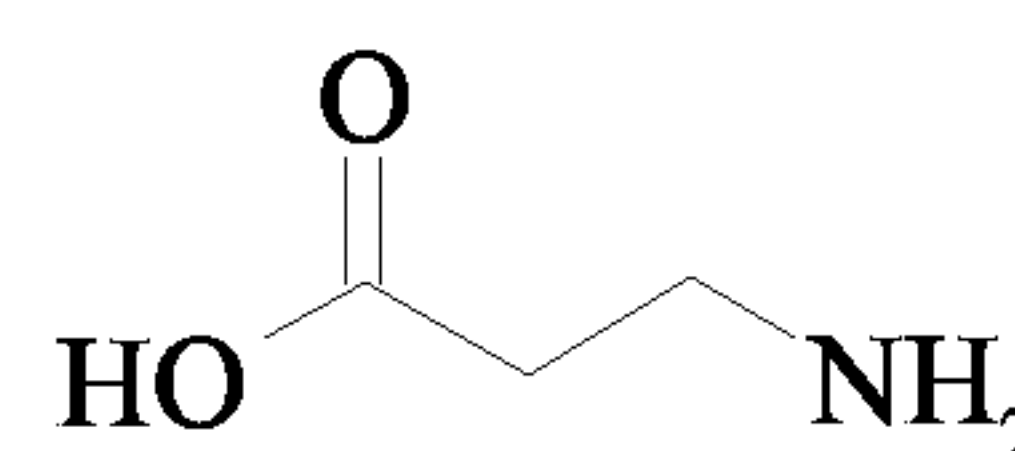
glutamine



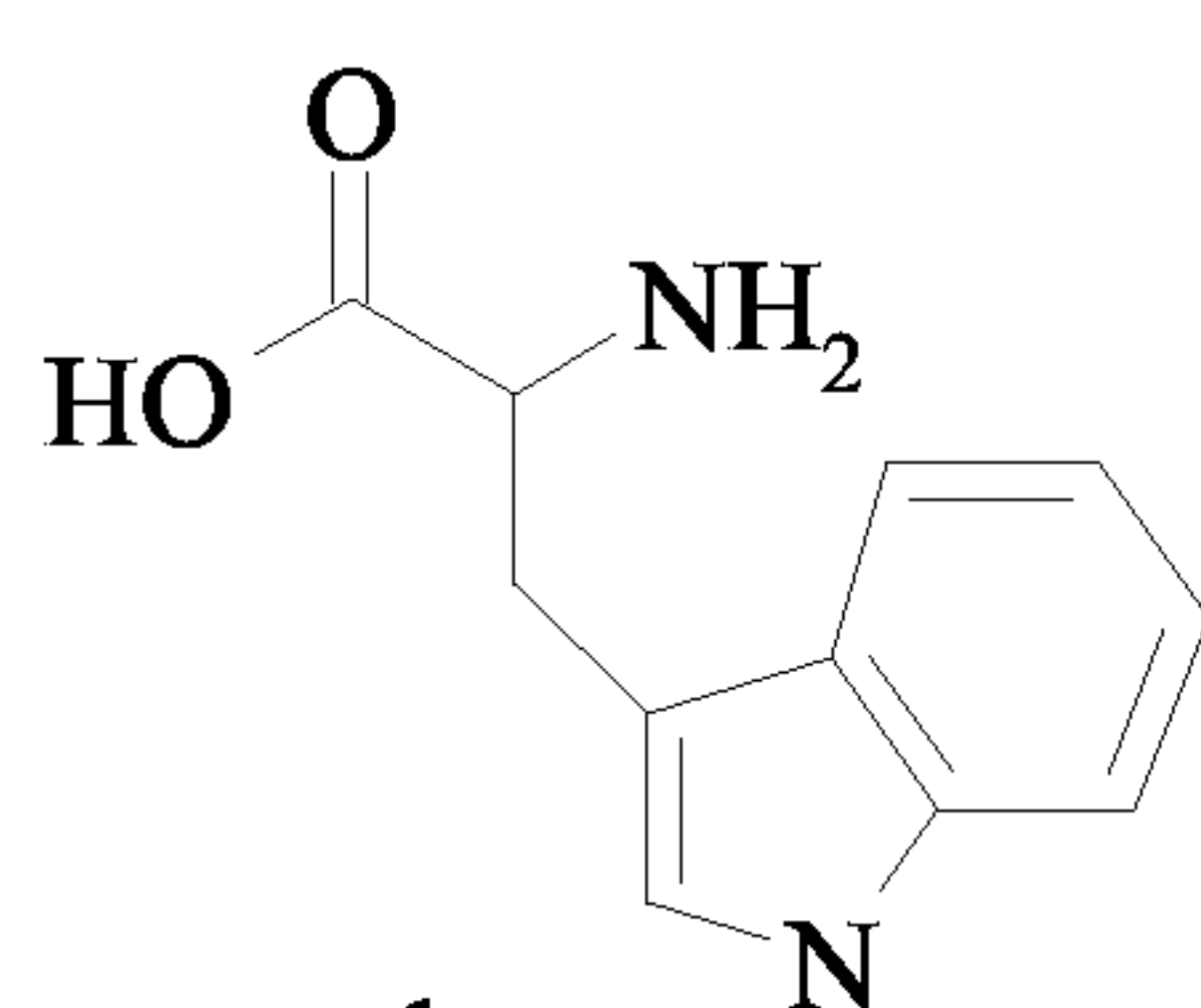
histidine benzylée



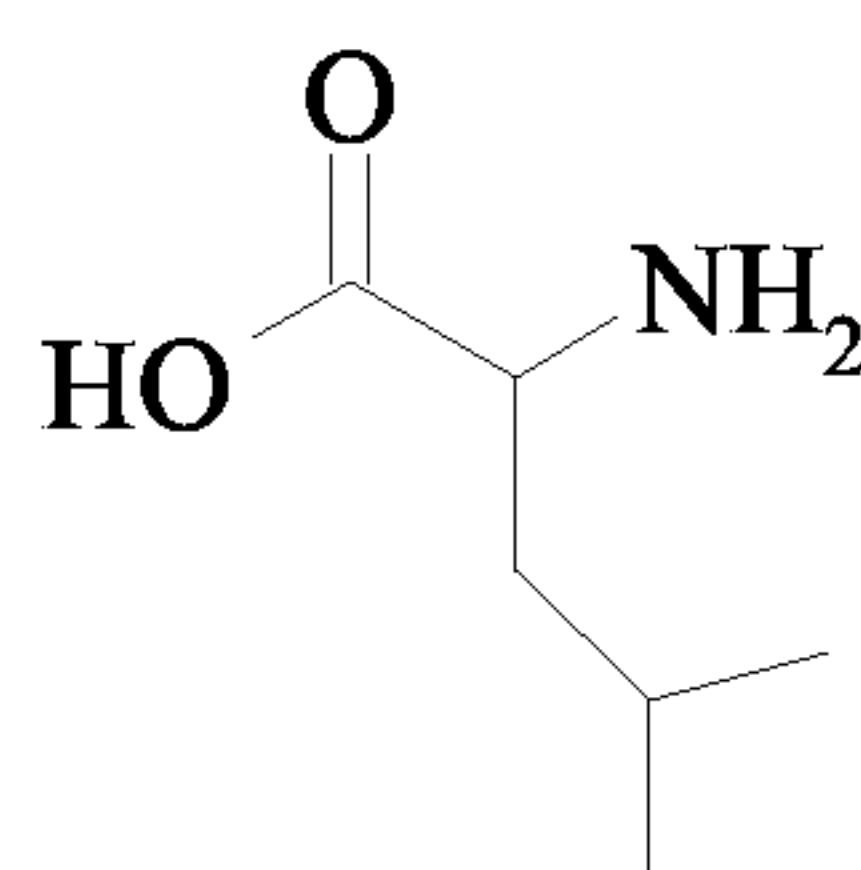
phénylalanine



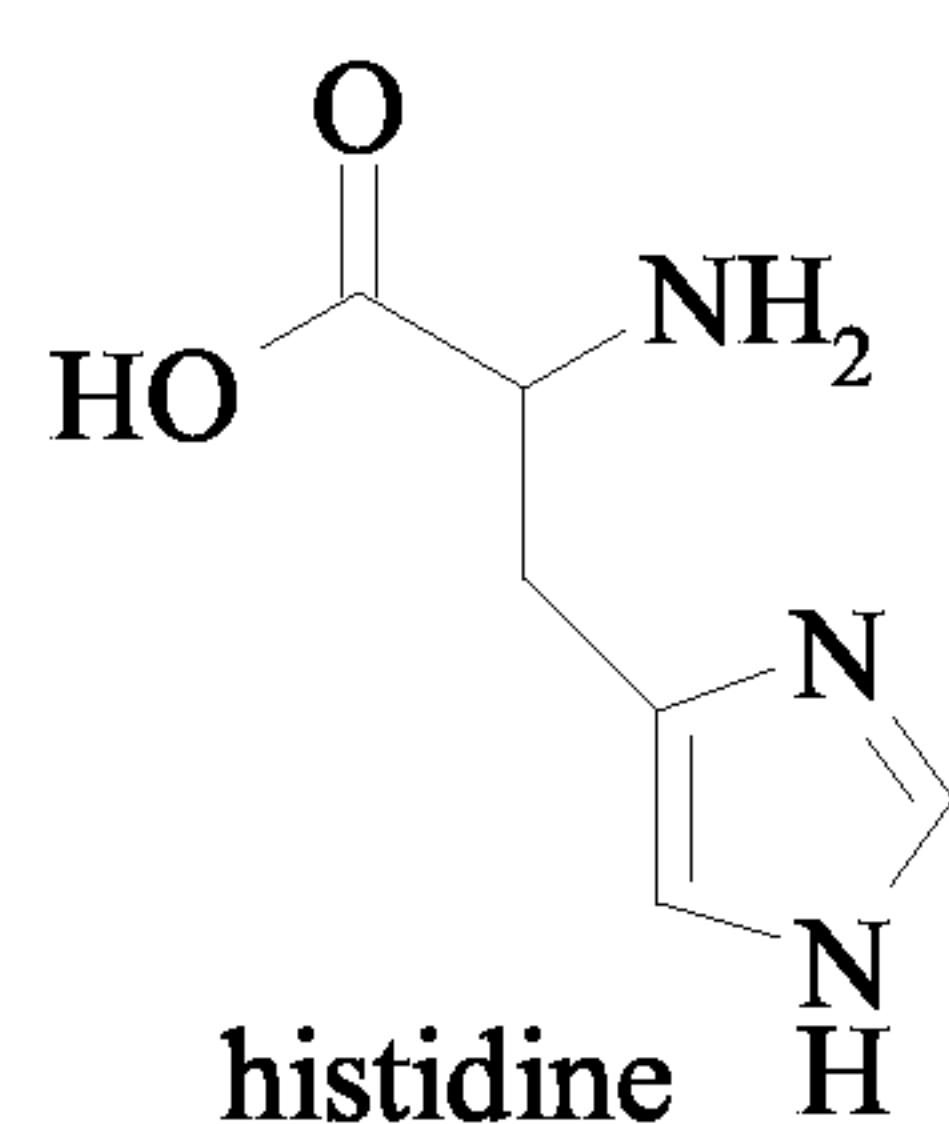
β-alanine



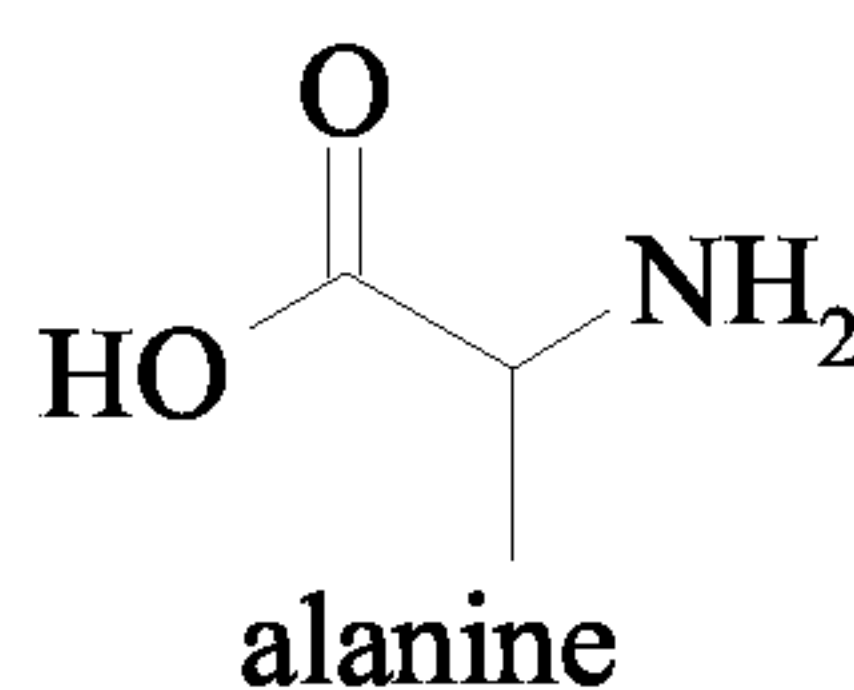
tryptophane



leucine

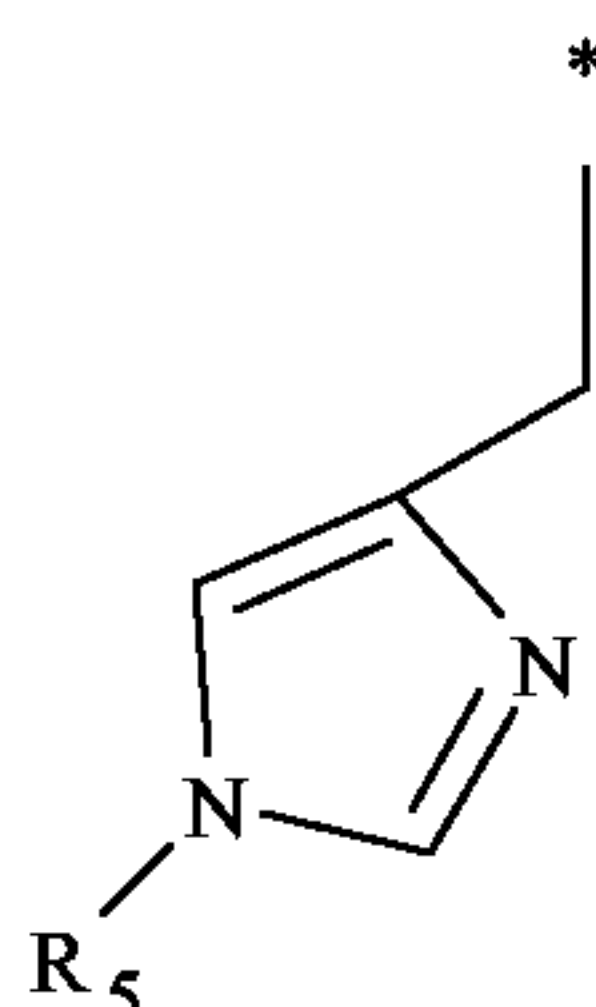


histidine



alanine

Selon un mode de réalisation, R₂ peut être de formule (VI) suivante :



dans laquelle

- * symbolise une liaison covalente avec le reste d'un composé de formule générale (I), et

- 5 - R_5 peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C_1 à C_{20} , saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C_3 à C_{10} , saturé ou insaturé, un radical aryle en C_6 à C_{10} , optionnellement substitué par un ou plusieurs atome(s) d'halogène.

10 Selon un mode de réalisation, les radicaux alkyle ou cycloalkyle susceptibles de figurer le radical R_5 peuvent être également substitués par les radicaux tels que définis précédemment ou voir leurs chaînes hydrocarbonées interrompues par un ou plusieurs hétéroatomes tels que définis précédemment.

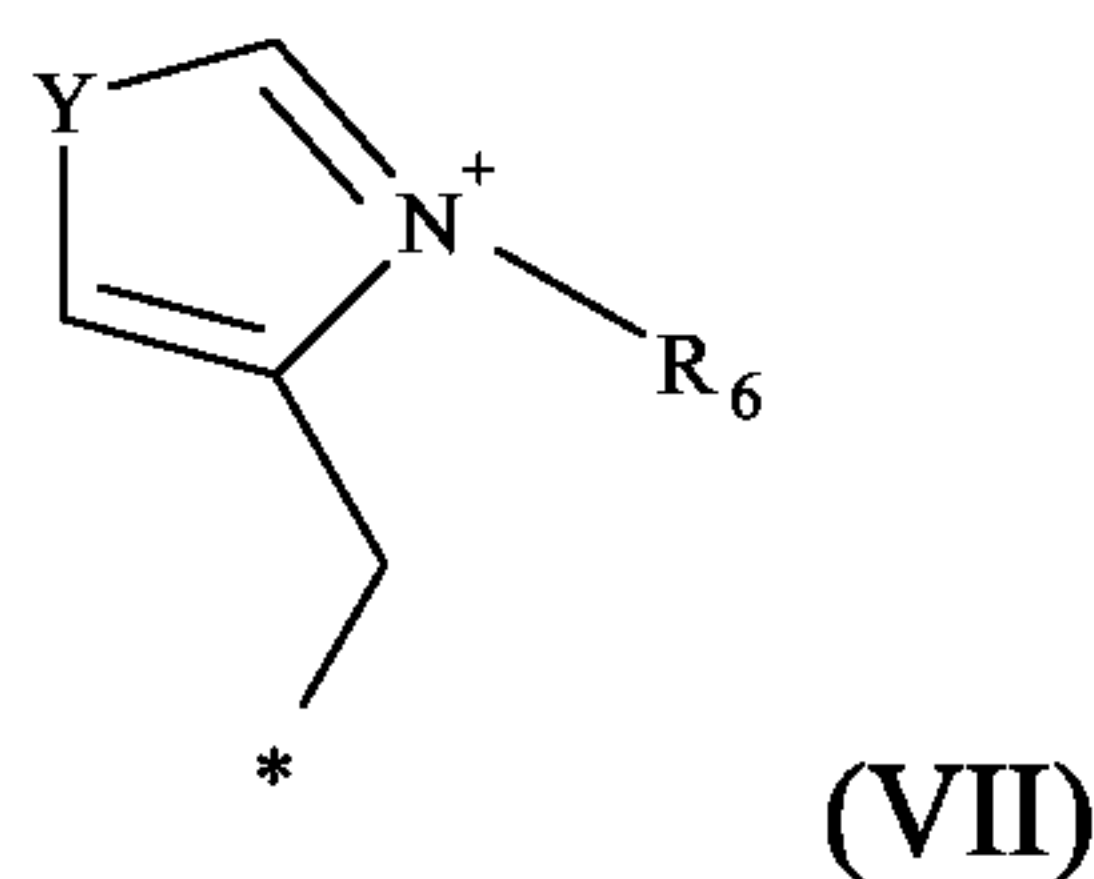
15 En particulier, R_5 peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C_1 - C_{18} , un radical alkyle en C_2 - C_{16} , un radical aryle en C_6 à C_{10} , optionnellement substitués par un ou plusieurs atome(s) d'halogène.

En particulier, R_5 peut représenter un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phényl, un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10, en particulier de 2 à 8 et plus particulièrement de 3 à 6.

20 En particulier, R_5 peut être un radical méthyle ou un radical benzyle.

R_2 peut notamment être une histidine ou un dérivé d'histidine tel qu'une histidine benzylée.

25 Selon un mode de réalisation, $-COR_3$ peut être un radical acyle, notamment un radical acétyl, substitué par une entité basique R_3 telle que définie précédemment. En particulier, cette entité basique R_3 peut être un radical de formule (VII) suivante :



dans laquelle :

- * symbolise une liaison avec le radical acyle,

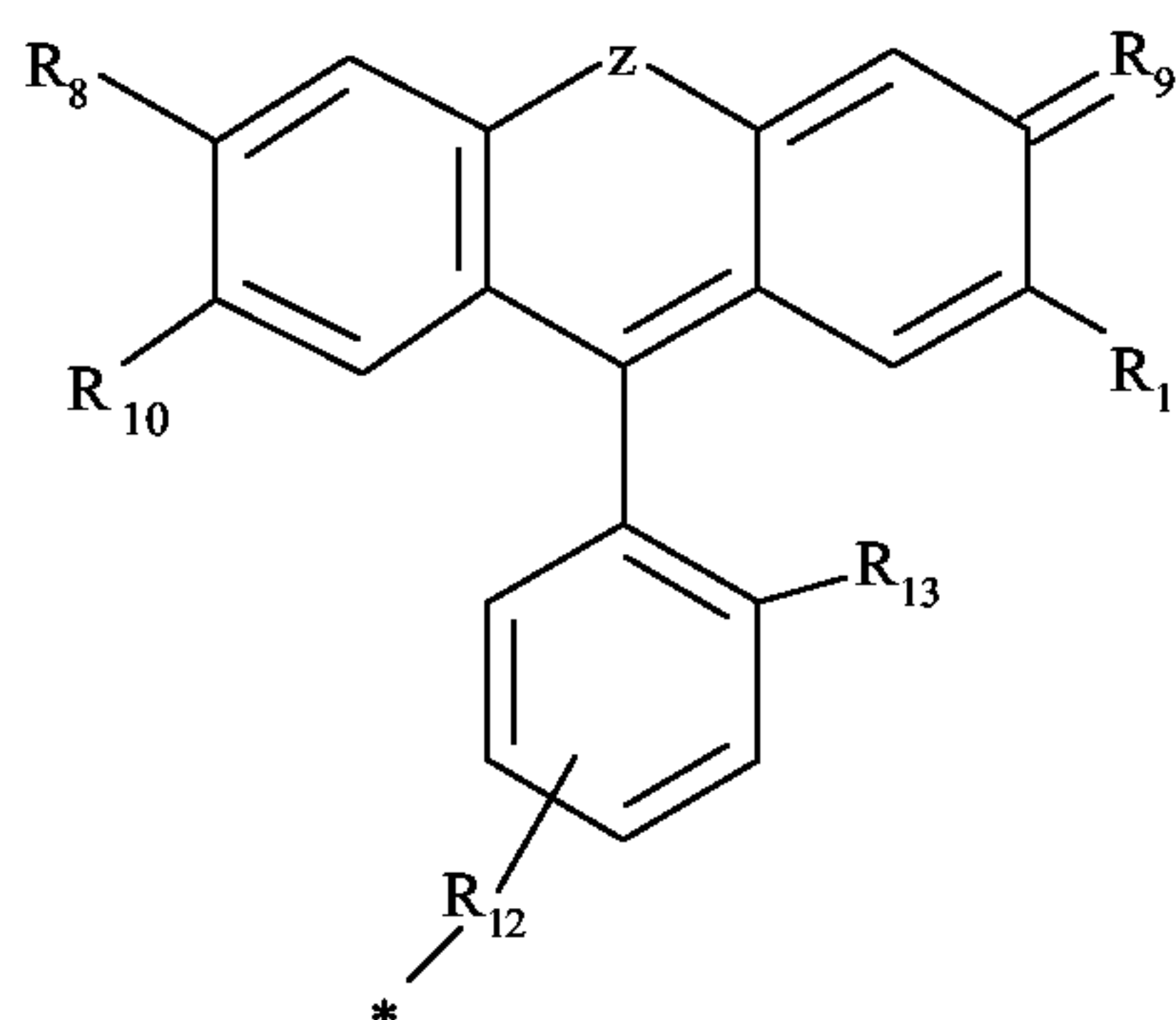
- Y peut représenter N ou N⁺R₇, et

5 - R₆ et R₇ peuvent représenter, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁-C₁₈, un radical alkyle en C₂-C₁₆, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitués par un ou plusieurs atome(s) d'halogène.

10 En particulier, R₆ et R₇ peuvent représenter, indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phénétyle, un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10, en particulier de 2 à 8 et plus particulièrement de 3 à 6.

15 En particulier, R₆ et R₇ peuvent être indépendamment l'un de l'autre un radical méthyle ou un radical benzyle

Selon un mode de réalisation, le radical A peut représenter un radical de formule générale (Va) :



20 dans laquelle :

- * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I),

- Z = O ou NH,

- $R_8 = R_9 = N(R')_2$ avec R' pouvant représenter un radical alkyle en C_1 à C_6 , en particulier un radical alkyle en C_2 - C_4 ou $R_8 = OH$ et $R_9 = O$,

- $R_{10} = R_{11} = H$ ou X , avec $X = F, Cl, Br$, en particulier $X = F$

5 ou d'une part R_8 et R_{10} et/ou d'autre part R_9 et R_{11} peuvent respectivement former un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons condensé avec le reste acridine ou xanthène, le cas échéant substitué par un, deux, trois, voire plus de groupements méthyle et dont l'hétéroatome est placé en α du reste acridine ou xanthène et est choisi parmi N ou O,

- $R_{12} = *-NHSO_2-$ ou $*-NHCO-$, avec $*$ symbolisant une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I)

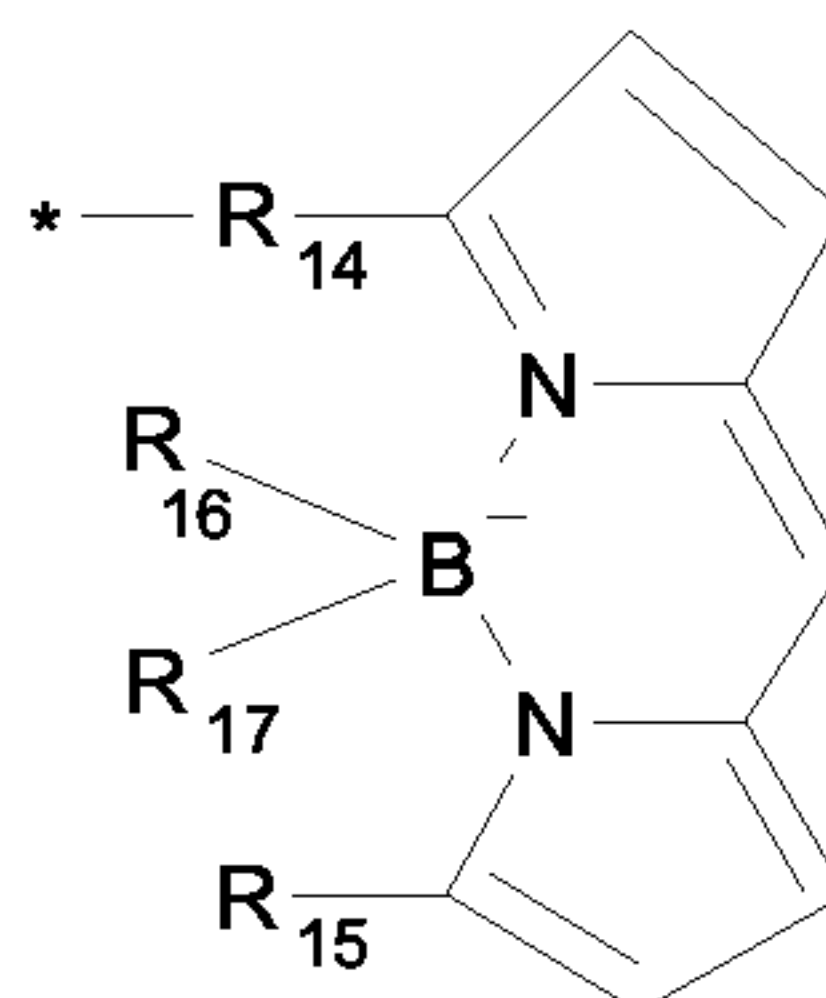
10 - $R_{13} = H, HSO_3^-$ ou $COOH$.

En particulier, le radical de formule (Va) peut être tel que $R_8 = R_9 = NMe_2$ ou NEt_2 ,

En particulier, le radical A de formule (Va) peut être tel que R_{12} peut être en position ortho, méta ou para.

15 En particulier, lorsque $R_{12} = *-NHSO_2-$, il peut être avantageusement en position ortho.

Selon un mode de réalisation, A peut représenter un radical de formule générale (Vb) :



20

dans laquelle :

- $*$ symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I),

- R_{14} peut représenter un reste acyle en C_2 à C_4 ,

- R_{15} peut représenter un radical hétérocyclique en C_5 à C_7 , et notamment un

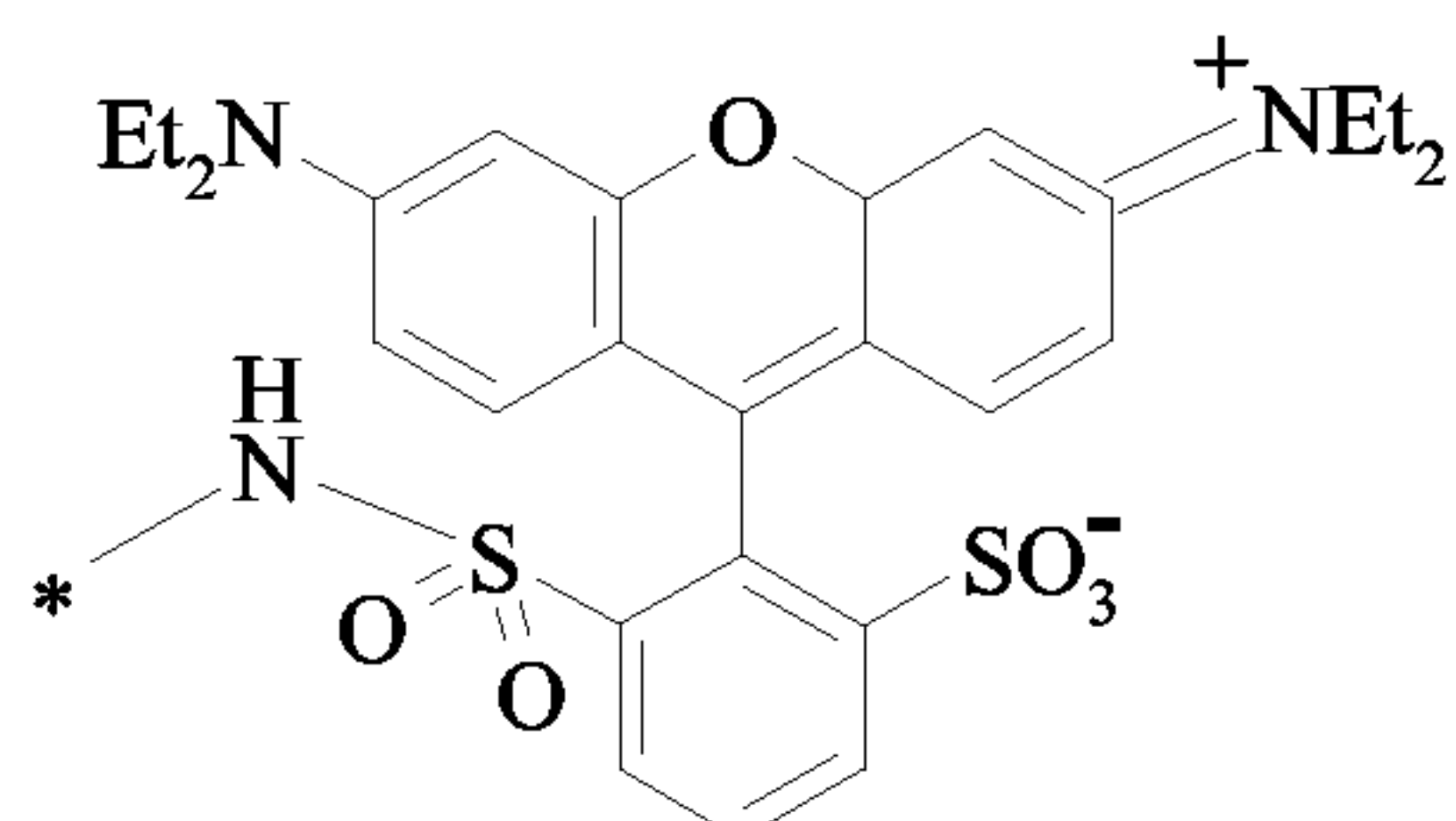
25 radical thiophenyl, et

- $R_{16} = R_{17} = X$, avec $X = F, Cl$ ou Br , et notamment F .

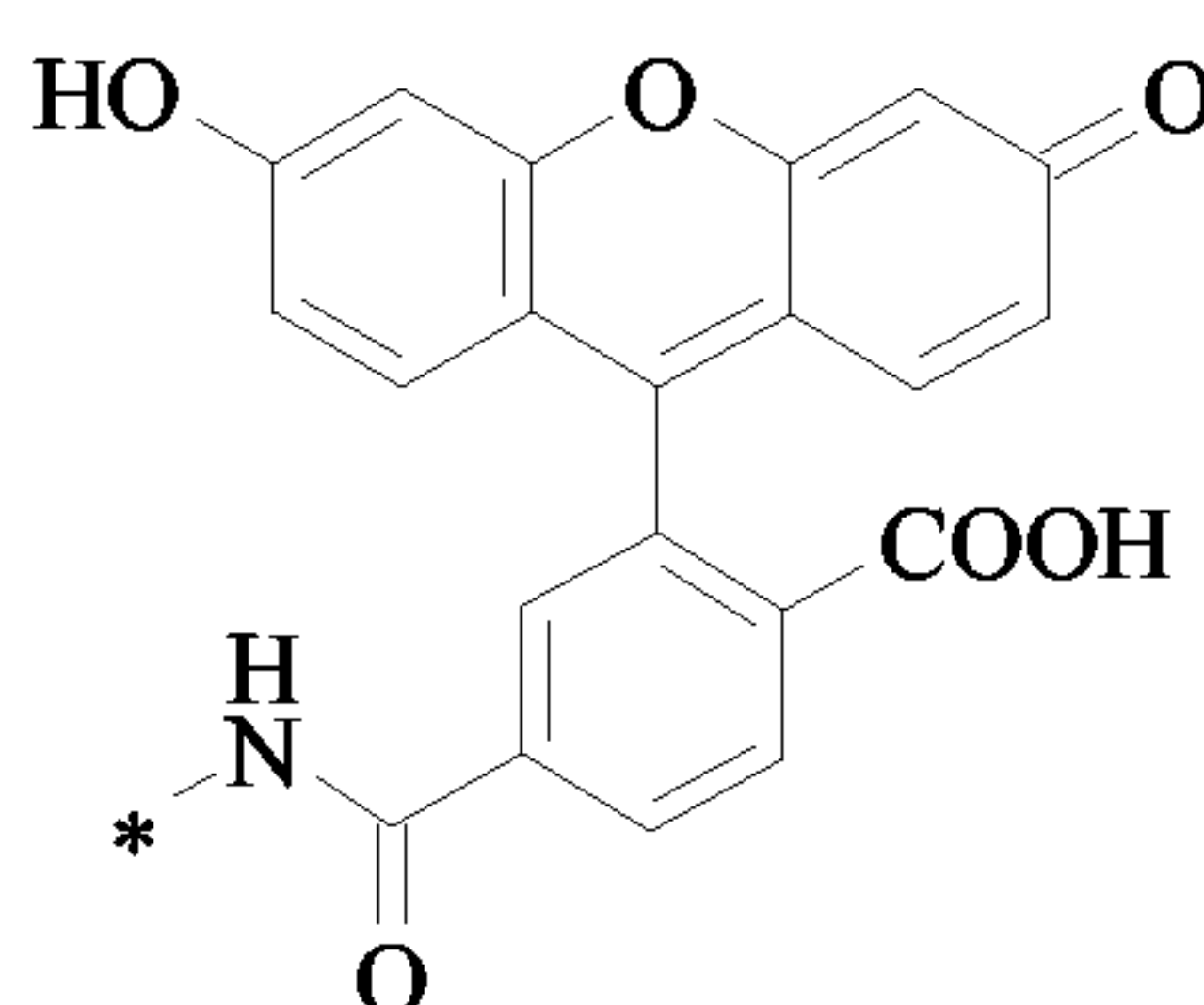
Selon un mode de réalisation, les radicaux de formule (Va) et (Vb) peuvent être des radicaux de marqueurs fluorescents.

A titre d'exemples de marqueurs fluorescents susceptibles de convenir à la mise en œuvre de la présente invention, il est possible de mentionner la rhodamine et ses dérivés tels que la tetraméthylrhodamine, la rhodamine Red-X (lissamine), le Bodipy et ses dérivés, le Texas Red[®] et ses dérivés, la fluoresceine et ses dérivés, l'Alexa[®] et ses dérivés ainsi que l'Oregon Green[®] et ses dérivés.

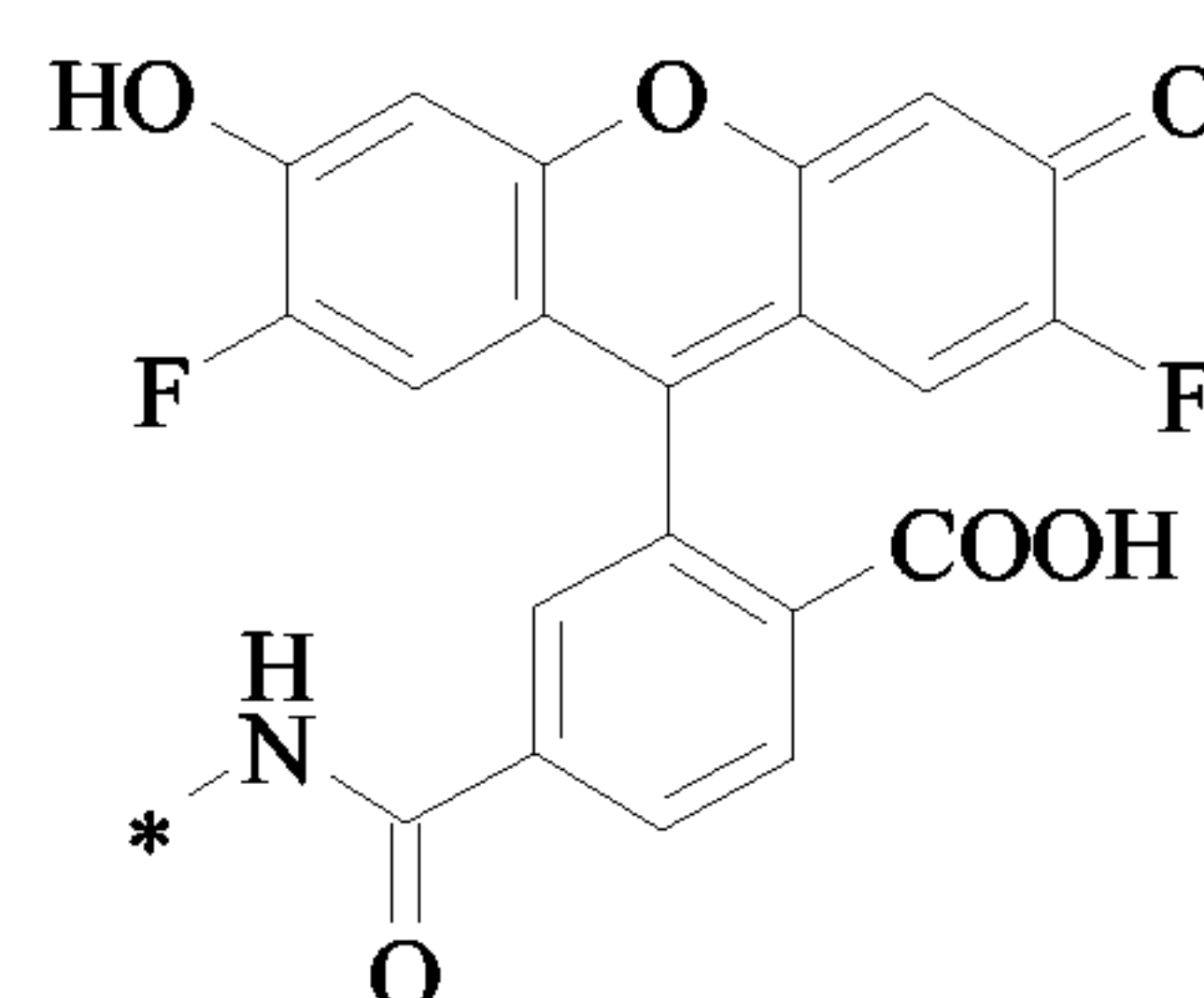
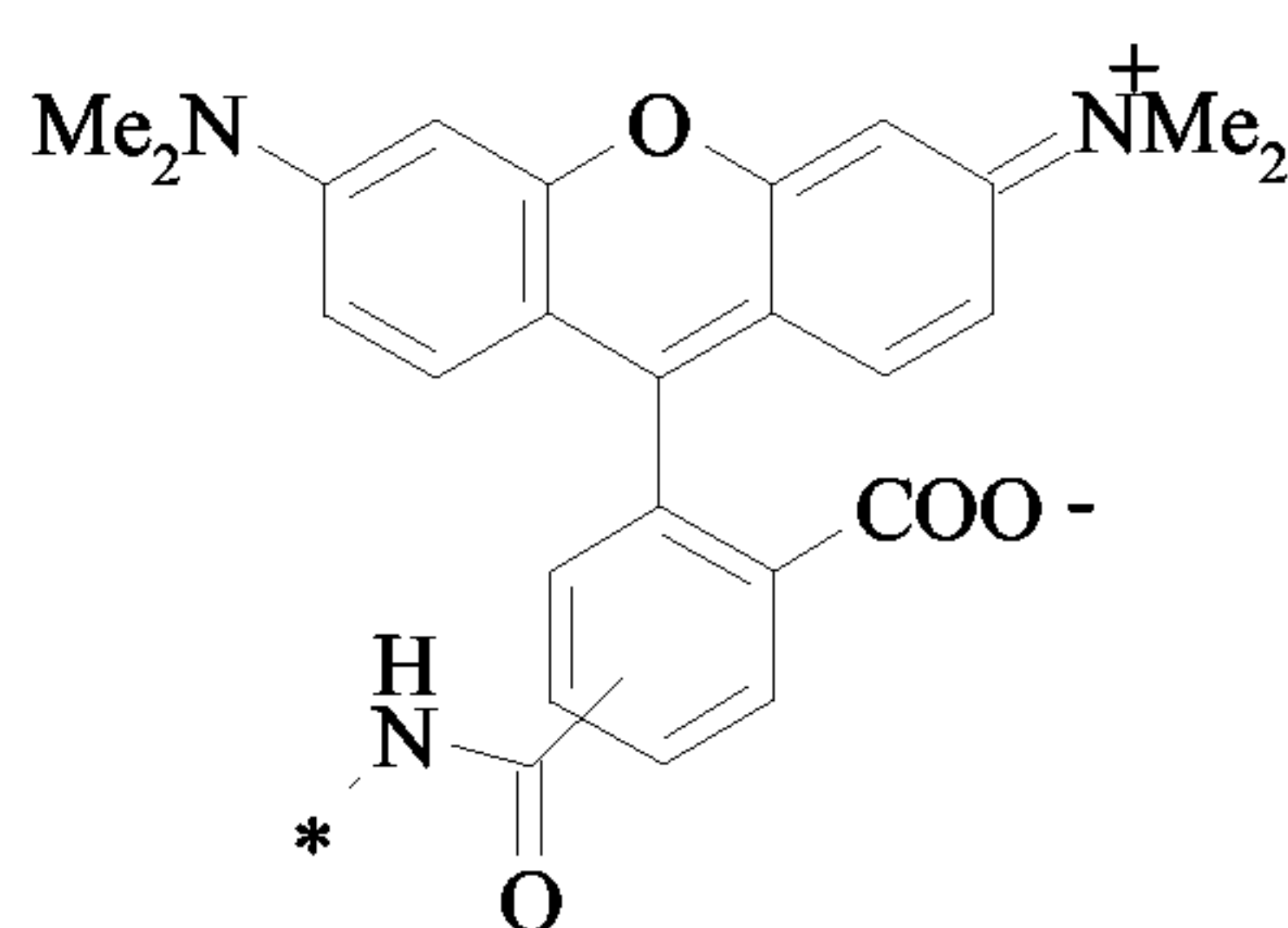
Selon un mode de réalisation, le radical A peut représenter un marqueur fluorescent choisi parmi des marqueurs fluorescents de formule(s) suivante(s) :



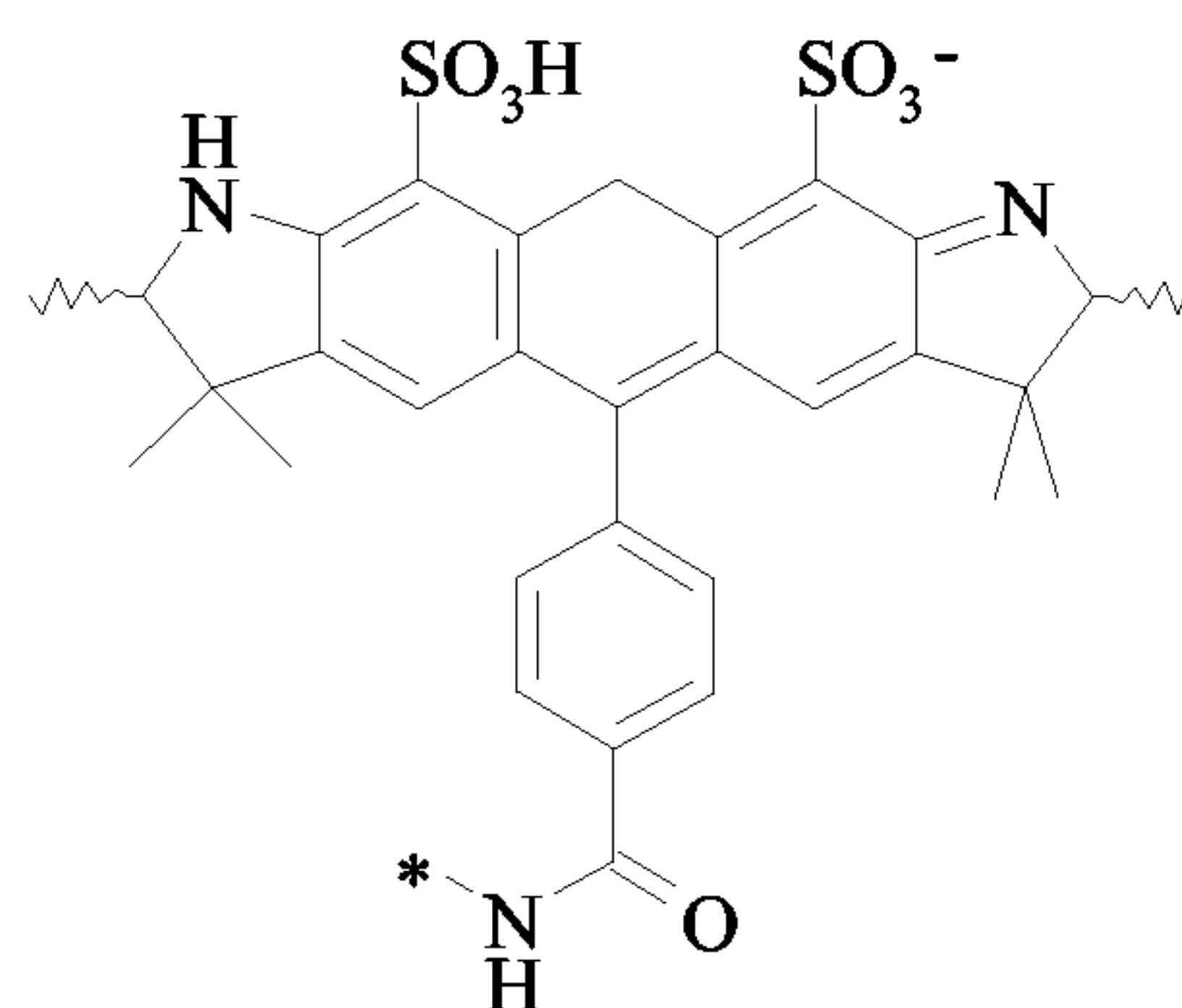
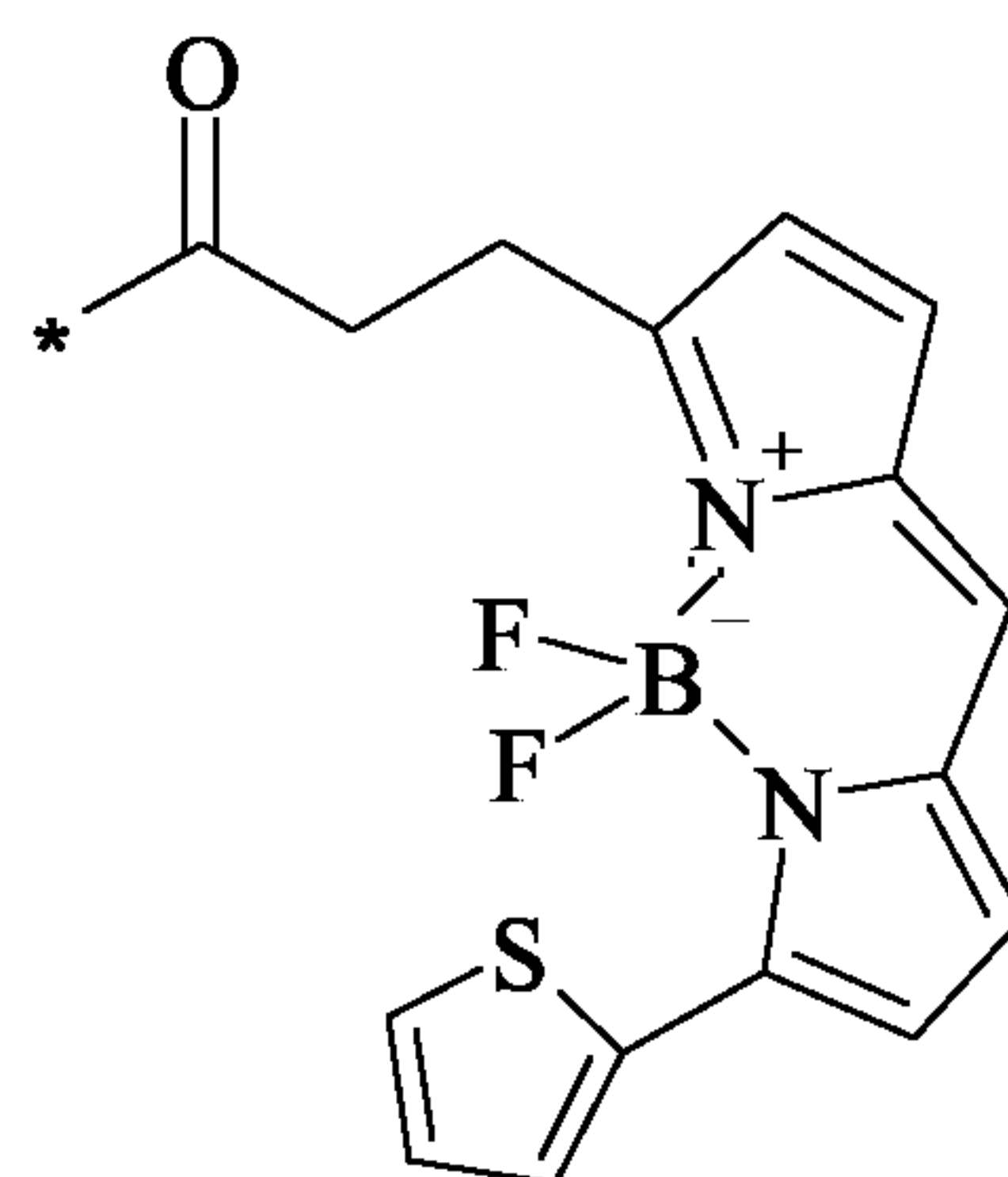
Sulfonylrhodamine (lissamine)



Fluoresceine

Oregon Green[®]

Tetraméthylrhodamine

Alexa 532[®]

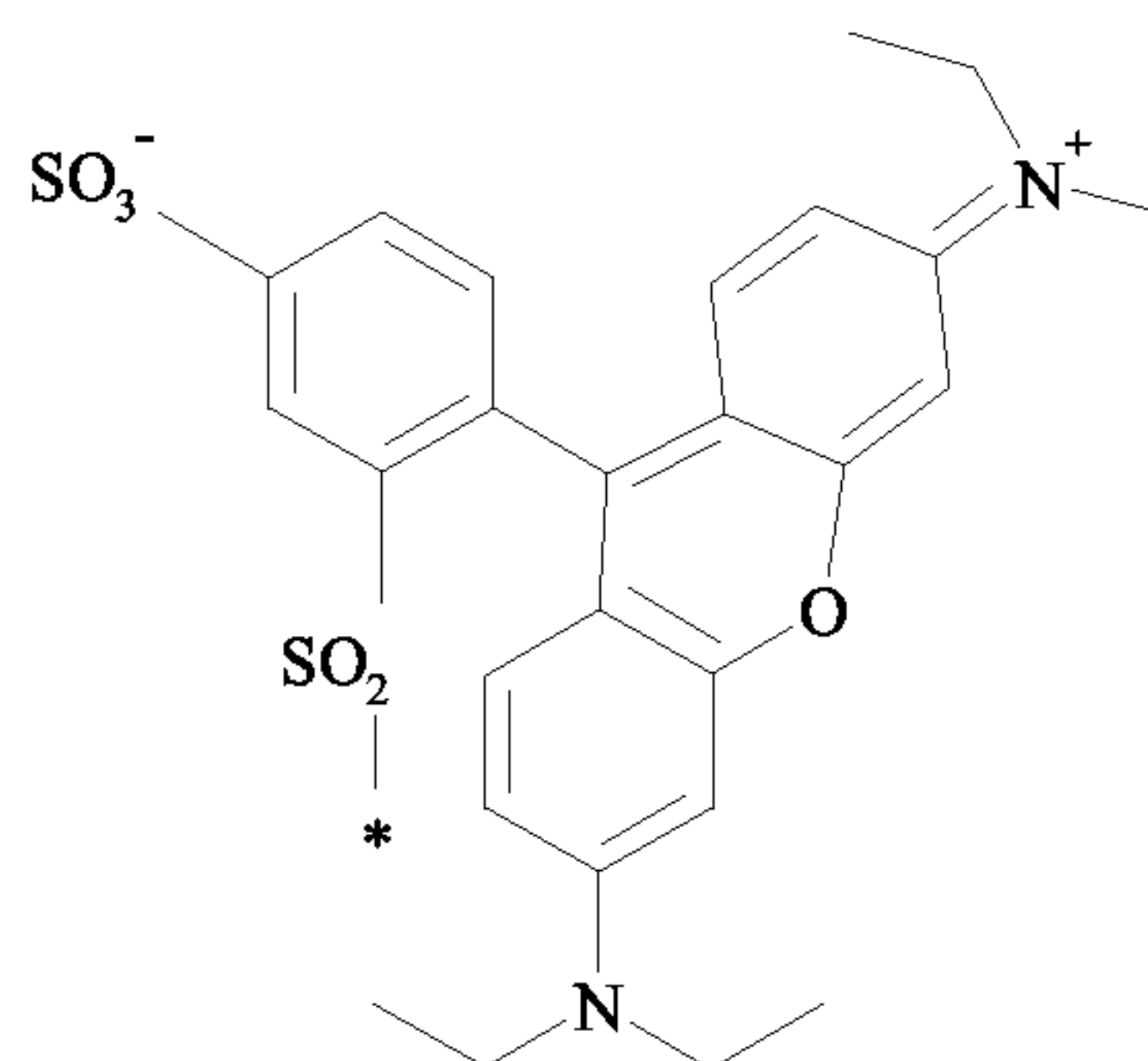
Bodipy

dans laquelle * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I) selon l'invention.

Selon un mode de réalisation, le marqueur fluorescent A peut être choisi parmi des marqueurs fluorescents dérivés de la rhodamine, comme par exemple un dérivé de la sulfonylrhodamine B.

En particulier, le reste du composé de formule générale (I) peut être lié en position ortho au dérivé de la sulfonylrhodamine (lissamine).

Notamment, le radical dérivé de lissamine peut être représenté par le radical de formule suivante :

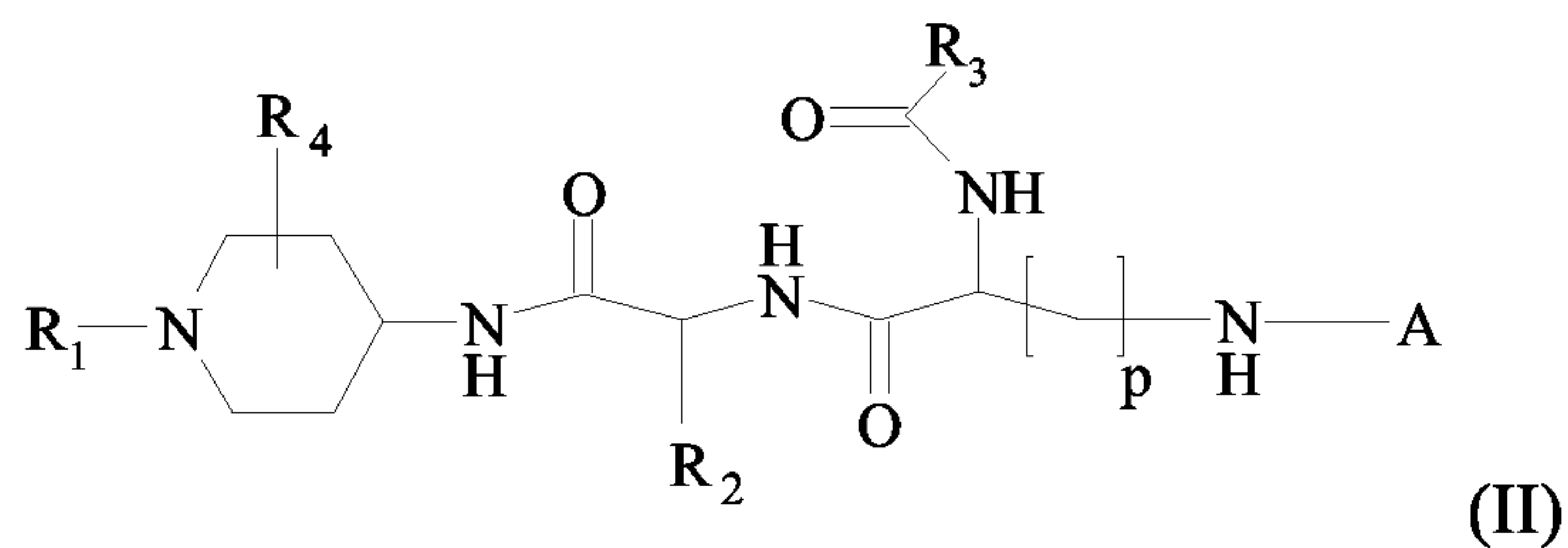


Lissamine

dans laquelle * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I) selon l'invention.

Selon un mode de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être de formule générale (I) dans laquelle n peut être égal à 0.

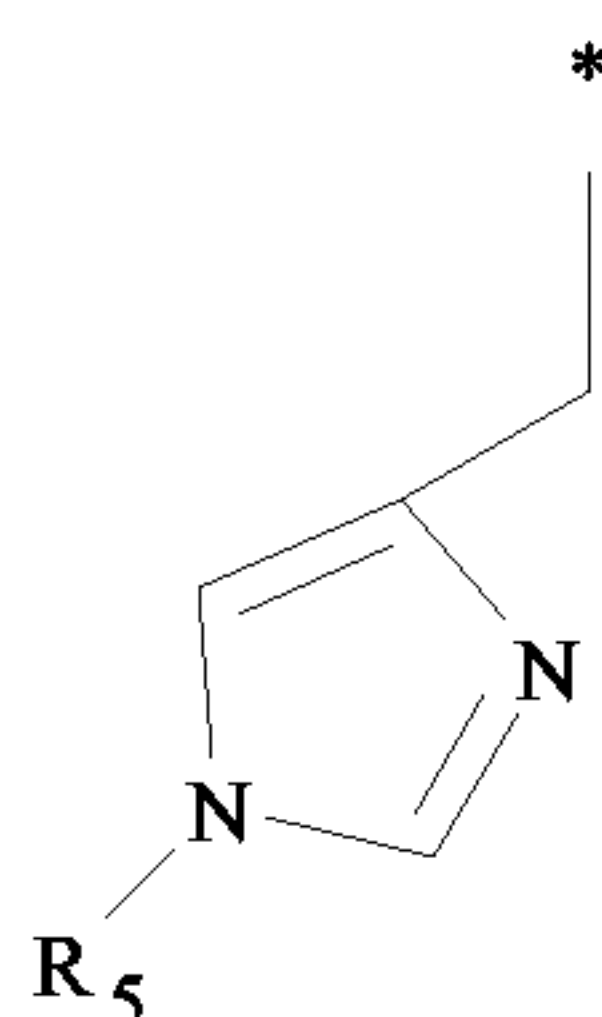
Selon un mode de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être représenté, par exemple, par la formule générale (II) suivante :



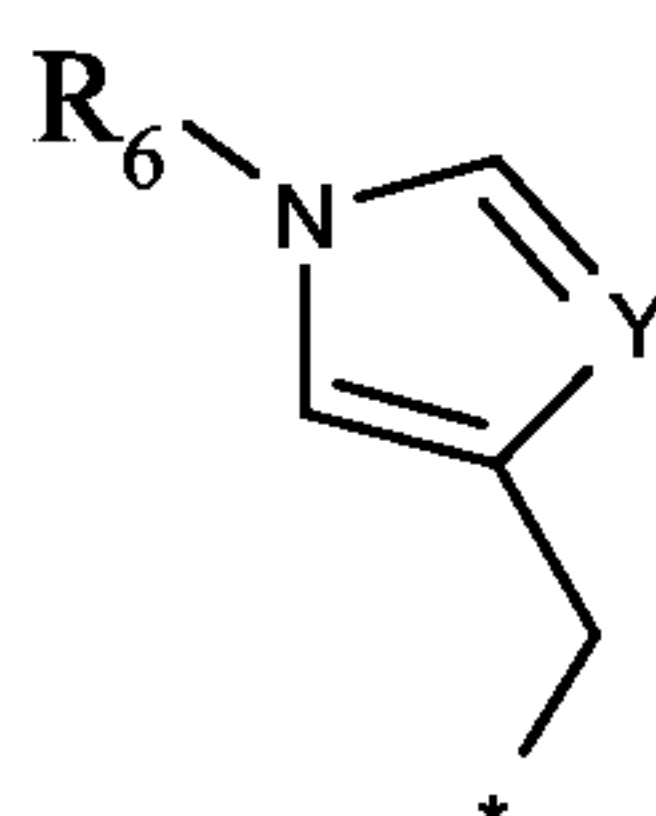
dans laquelle :

- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , A et p peuvent être, par exemple, tels que définis précédemment.

Selon un mode de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être de formule générale (I) dans laquelle n peut être égal à 0, p peut être égal à 4, R_1 peut
5 représenter un radical méthyle, R_2 peut représenter un radical de formule suivante :



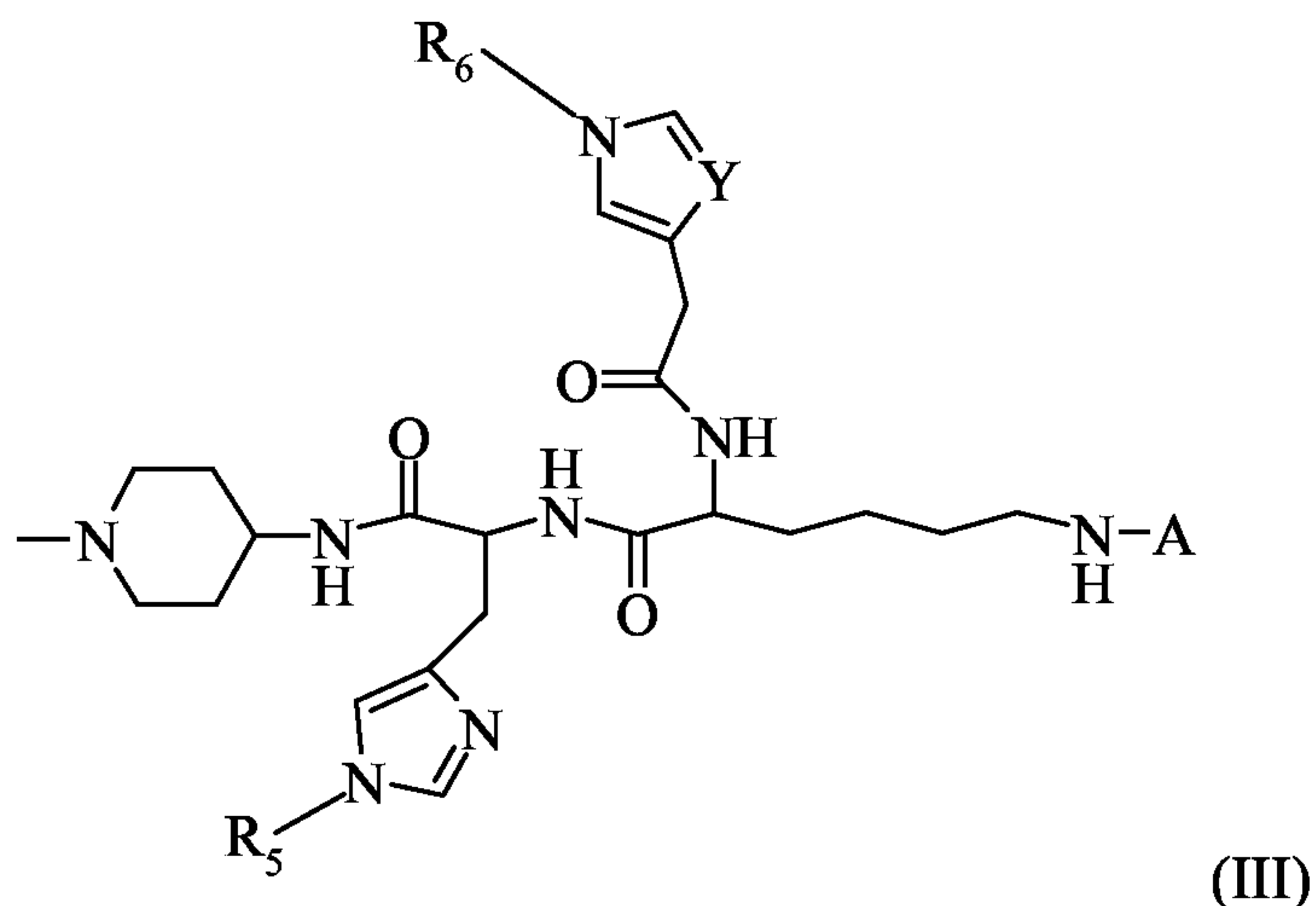
dans laquelle * et R_5 peuvent être tels que définis précédemment, et $-COR_3$ peut représenter un radical acyle, notamment acétyle, substitué par une entité basique R_3 , de formule suivante :



10

dans laquelle * symbolise une liaison covalente avec le radical acyle, et Y et R_6 peuvent être tels que définis précédemment, et R_4 peut être un atome d'hydrogène.

Selon un mode de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être de formule générale (III) suivante :



15

(III)

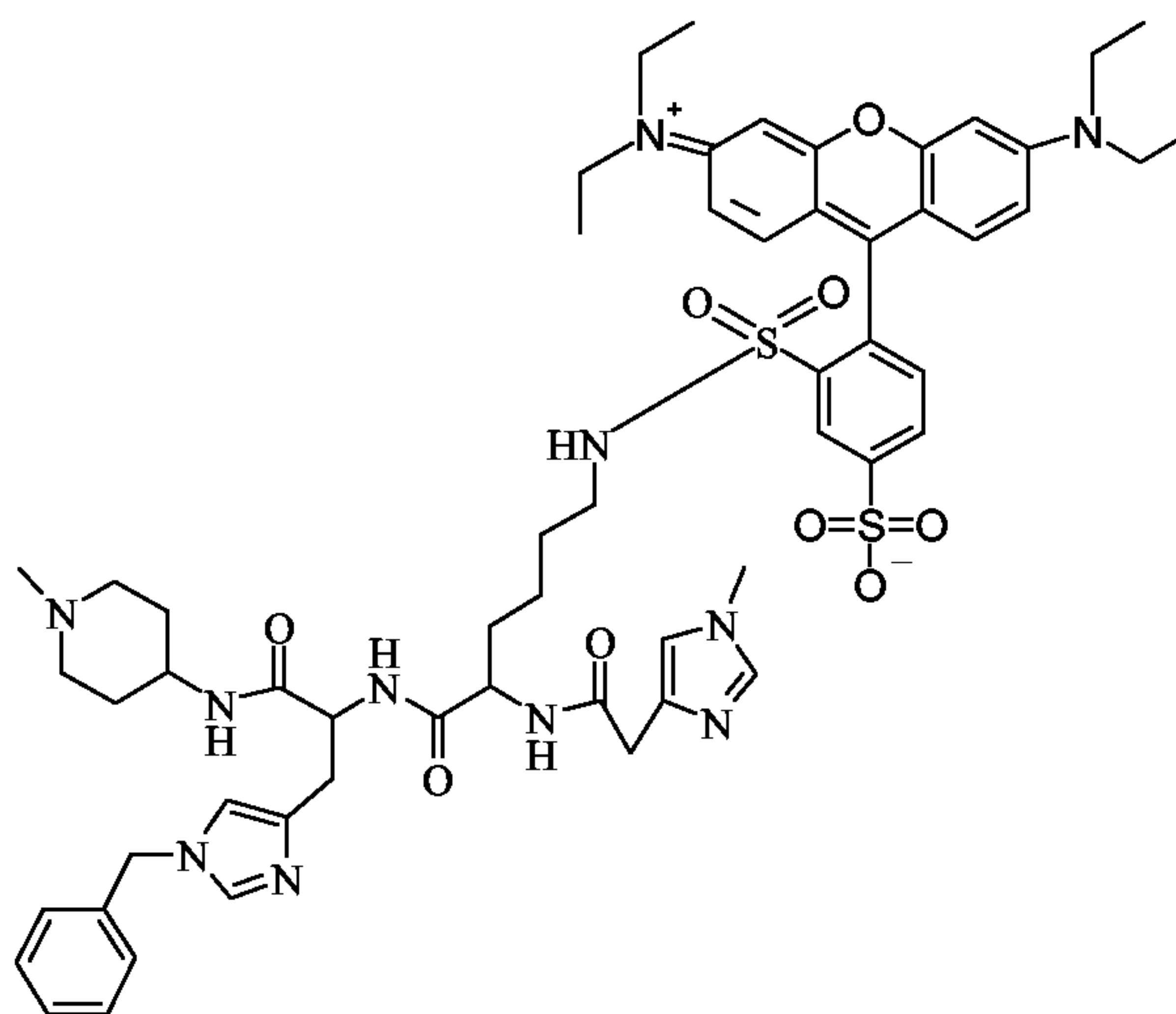
dans laquelle A, R_5 , Y et R_6 peuvent être tel que défini précédemment.

Selon un mode de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être un composé de formule générale (III) telle que définie précédemment dans laquelle le marqueur fluorescent A peut être, par exemple, un radical sulfonylrhodamine tel que défini précédemment, et notamment tel que le reste du composé de formule (III) soit en ortho du radical sulfonylrhodamine, R₅ peut être un radical benzyle, Y peut être N et R₆ peut être un radical méthyle.

Avantageusement, un composé conforme à l'invention n'est pas un composé de formule générale (I) telle que définie précédemment dans laquelle le marqueur fluorescent A est un radical sulfonylrhodamine (lissamine) tel que le reste du composé de formule (I) soit en para du radical sulfonylrhodamine.

Avantageusement, un composé conforme à l'invention n'est pas un composé de formule générale (III) telle que définie précédemment dans laquelle le marqueur fluorescent A est un radical sulfonylrhodamine (lissamine) tel que le reste du composé de formule (III) soit en para du radical sulfonylrhodamine, et R₅ est un radical benzyle, Y est N et R₆ est un radical méthyle.

Selon une variante de réalisation, un composé conforme à l'invention peut être représenté par la formule (IV) suivante :



PROCEDE DE SYNTHESE

Des composés conformes à l'invention peuvent être obtenus soit sous forme d'une bibliothèque de composés de formules variées, soit sous forme de composés isolés sous une forme pure ou en mélange de stéréoisomères.

Le procédé de synthèse peut être effectué sur une résine de polystyrène de type REM (REgenerated Michael), constitué d'une résine hydroxyméthylpolystyrène fonctionnalisée par un ester acrylique accepteur de Michael.

La résine de type REM convient particulièrement à la synthèse de bibliothèque
5 d'amines tertiaires, *via* une addition initiale de type Michael d'une amine afin de fixer cette dernière au support suivie de la synthèse de la molécule sur support et enfin sa coupure du support selon un processus de quaternisation de l'amine puis une élimination de type HOFMANN.

Après fixation d'une amine secondaire sur le support solide, les autres résidus
10 peuvent être introduits au moyen de méthodes de couplage de peptides classiques, utilisant l'activation DIC/HOBt (1,3-diisopropylcarbodiimide/1-hydroxybenzotriazole).

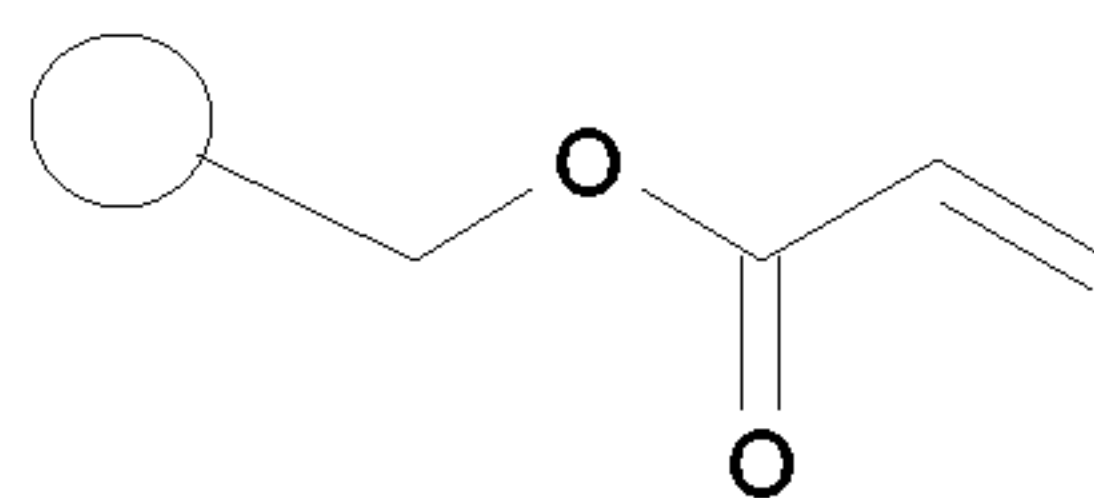
Un radical A, par exemple, de type sulforhodamine (lissamine, par exemple), peut être greffé directement sur une fonction amine, par exemple du radical ϵ -NH₂ d'une lysine ou sur un espaceur greffé sur le radical ϵ -NH₂ de la lysine, tel qu'un espaceur
15 diamino-butane, au moyen d'une liaison uréthane.

La libération du ou des composés de la résine peut être effectuée après alkylation de l'amine secondaire en présence par exemple d'un halogénure d'alkyle tel qu'un iodure de méthyle, ou un bromure de benzyle, suivi d'un traitement en présence d'une résine basique échangeuse d'ions de type Amberlite IRA-95.

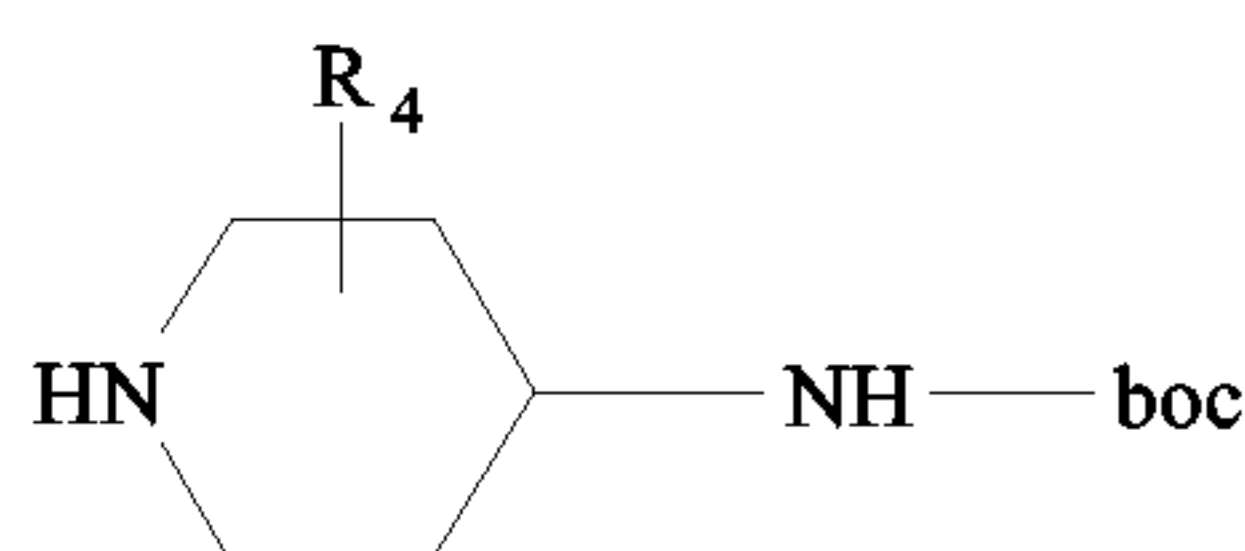
Selon un mode de réalisation, un tel procédé de synthèse conforme à
20 l'invention peut être réalisé en parallèle sur des plaques, par exemple des plaques de 96 puits, en utilisant un équipement FLEXCHEM (Robbins Scientific).

Selon un mode de réalisation, un composé selon l'invention peut être obtenu selon un procédé de préparation sur support solide comprenant au moins les étapes
25 consistant à :

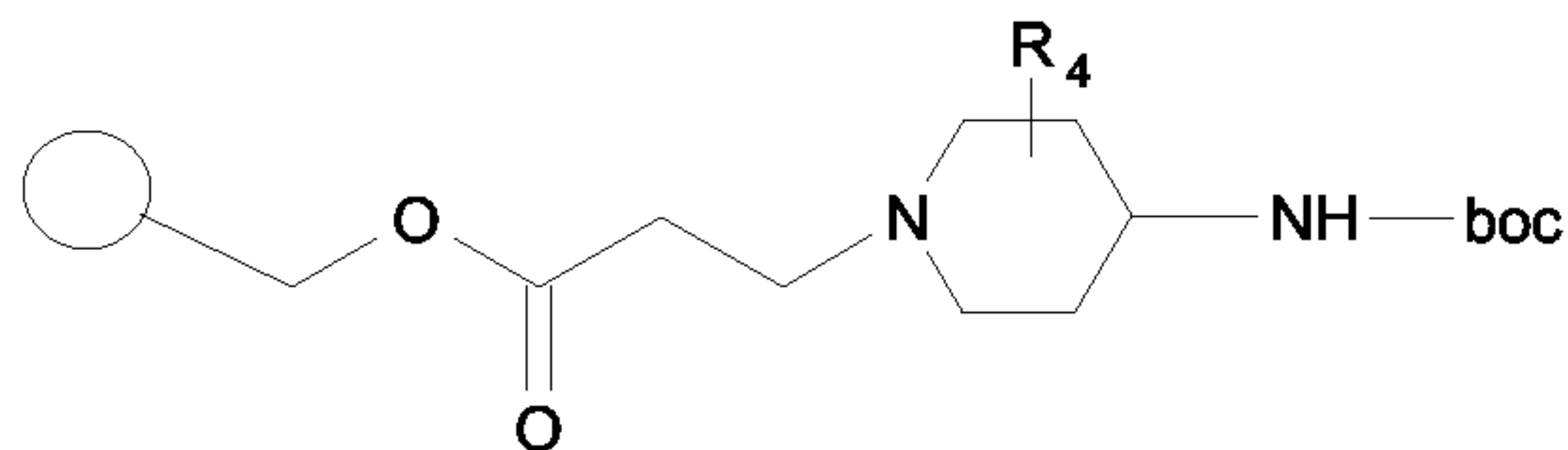
a. coupler sur un support solide de formule



un composé de formule :

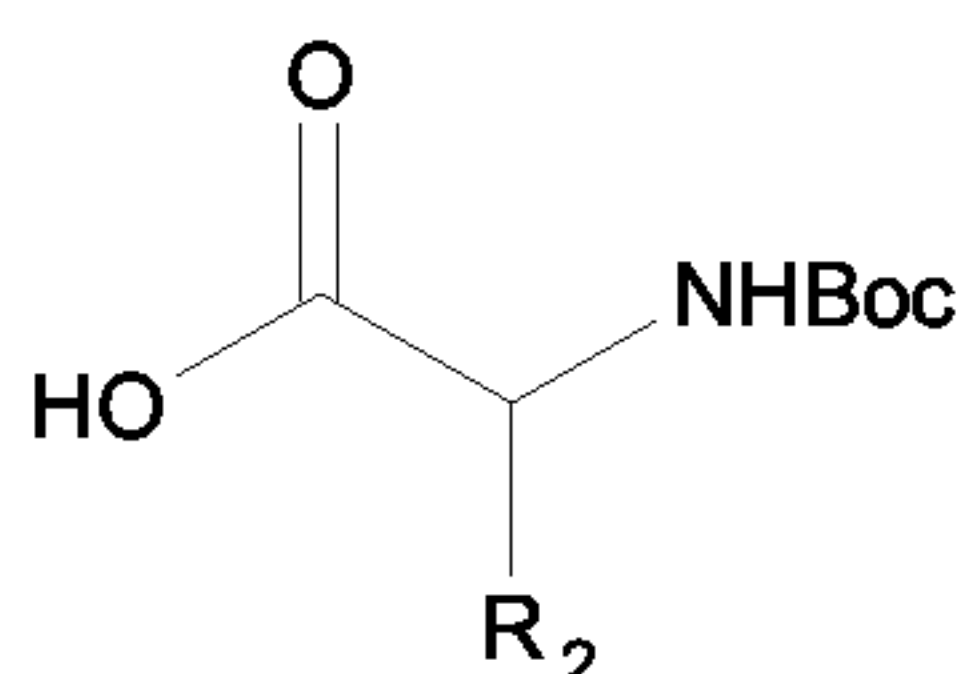


pour obtenir un composé de formule (1) suivante :

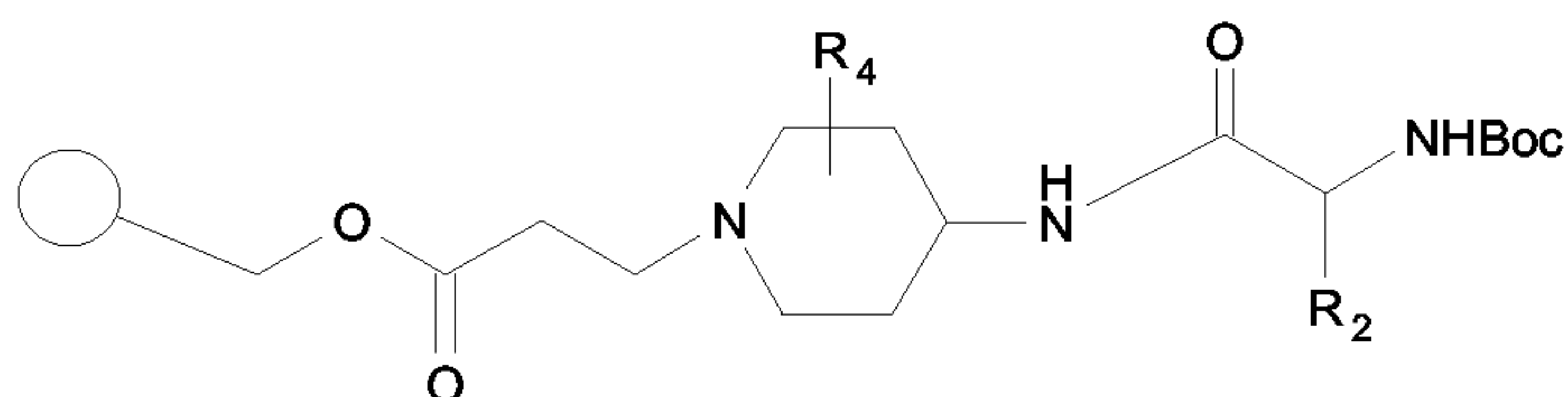


R₄ peut être tel que défini ci-dessus.

- 5 b. déprotéger le composé de formule (1), puis de coupler ledit composé déprotégé avec le composé de formule :

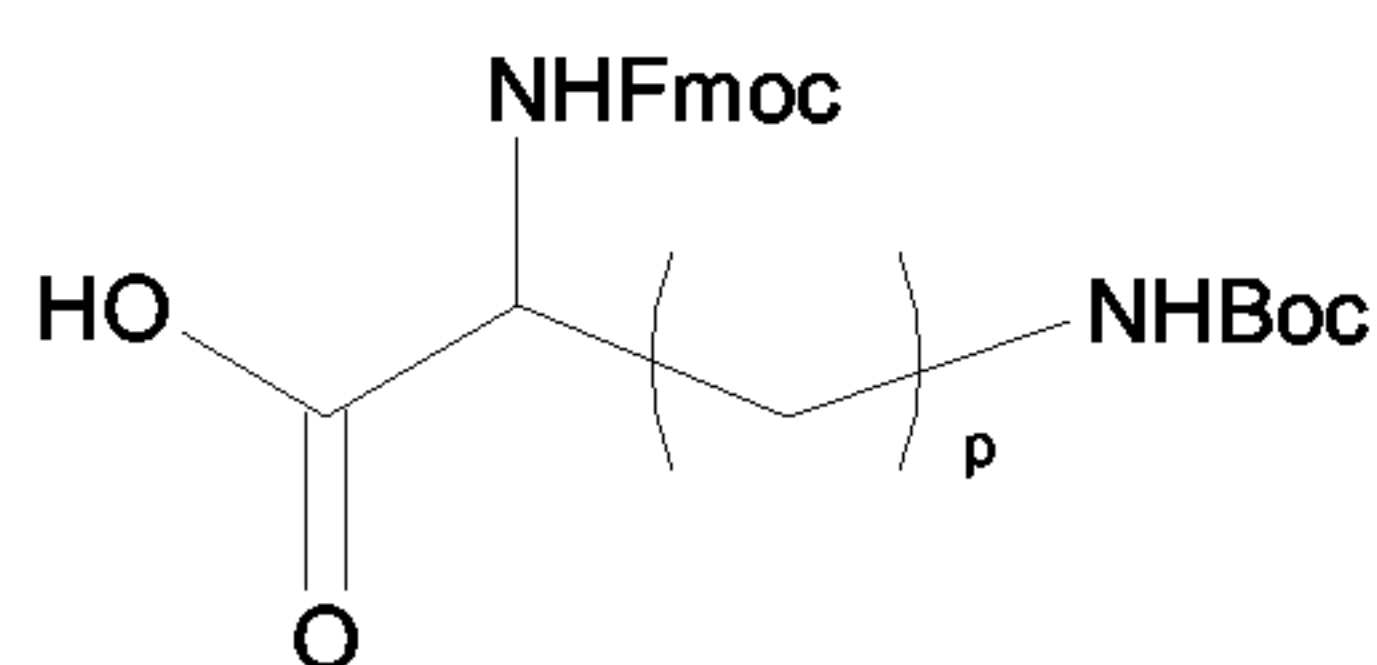


pour obtenir un composé de formule (2) suivante :

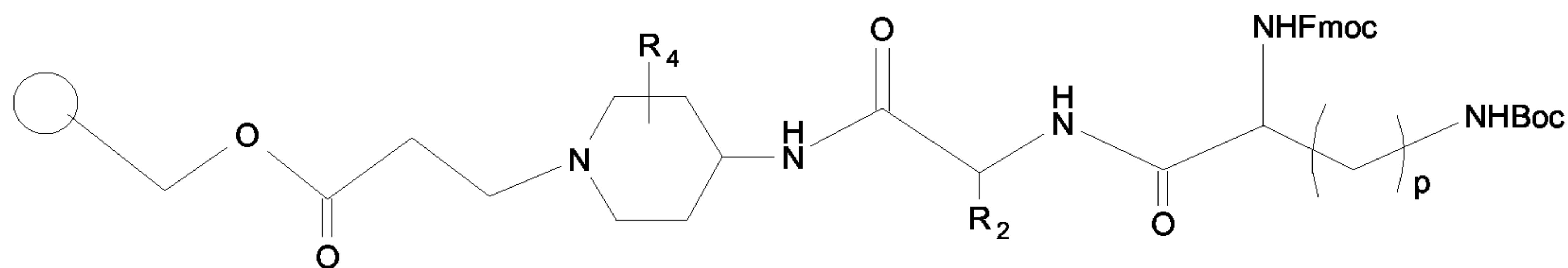


R₂ pouvant être tel que défini ci-dessus,

- 10 c. déprotéger le composé de formule (2), puis coupler ledit composé déprotégé avec le composé de formule suivante:

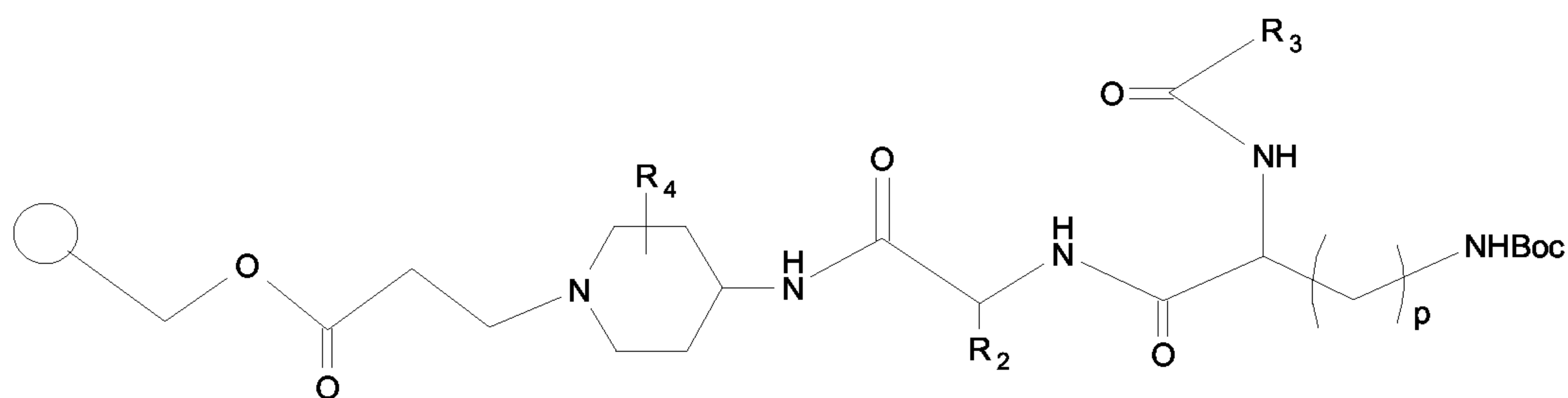


pour obtenir un composé de formule (3) suivante :



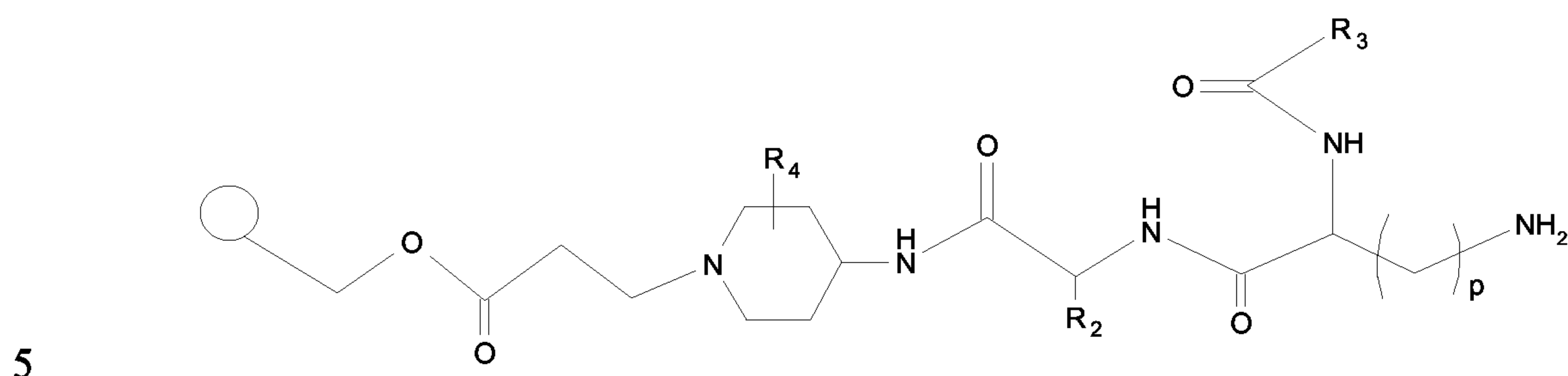
- 15 p pouvant être tel que défini ci-dessus,

d. déprotéger du groupe Fmoc le composé de formule (3), puis coupler ledit composé déprotégé avec un composé R₃COOH pour obtenir un composé de formule (4) suivante :

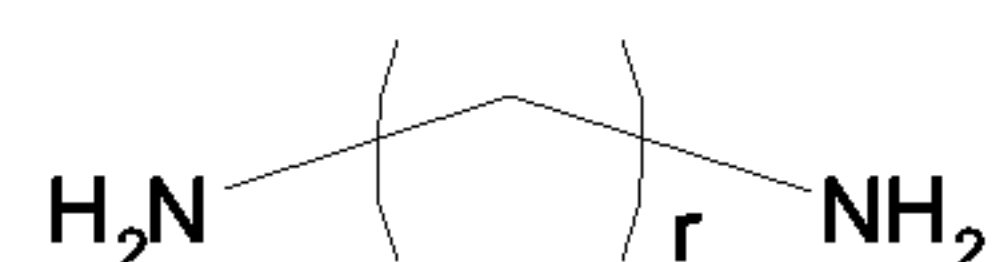


COR₃ pouvant être tel que défini ci-dessus,

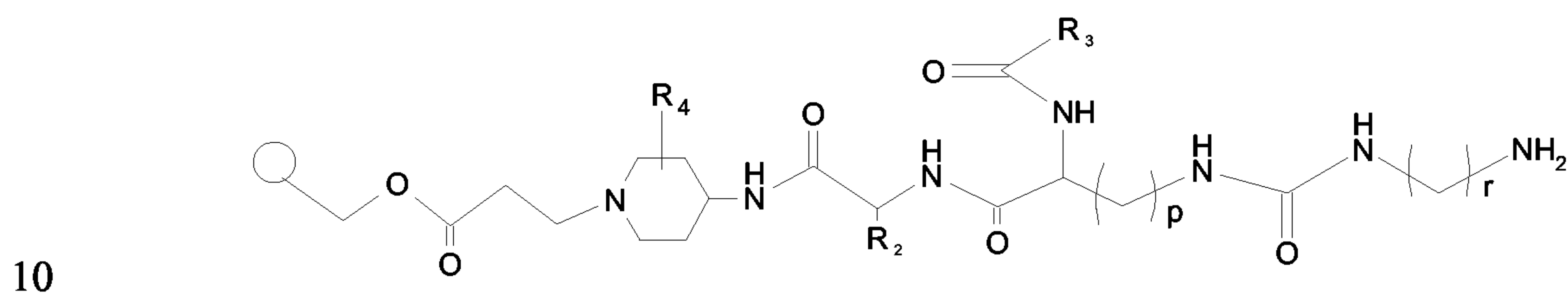
e. déprotéger le composé de formule (4), pour obtenir un composé de formule (5) suivante :



f. optionnellement, faire réagir le composé de formule (5) avec le p-nitrophénylchloroformate puis avec une diamine de formule

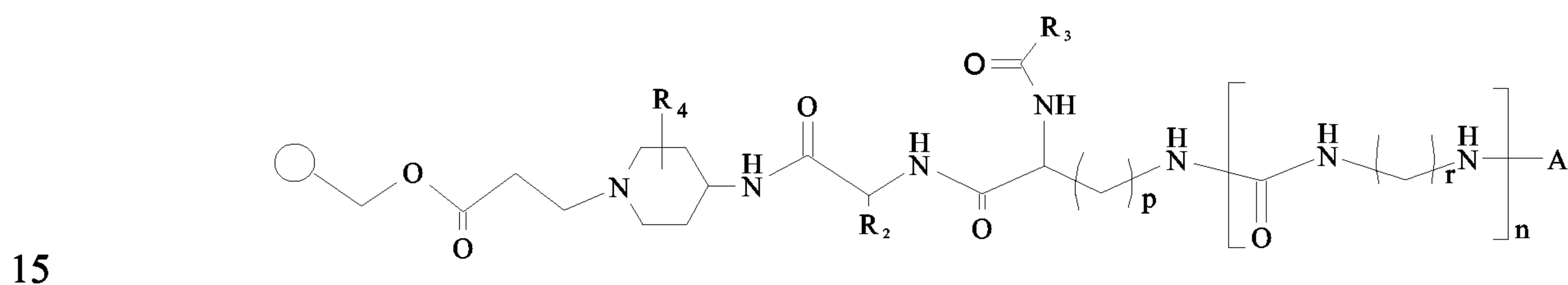


pour obtenir un composé de formule (6) suivante :



r pouvant être tel que défini ci-dessus,

g. faire réagir le composé de formule (5) ou le composé de formule (6) avec un traceur électrophile, notamment avec A-Cl, pour obtenir un composé de formule (7) suivante :



R₂, R₃, A, n, p et r étant tels que définis précédemment.

h. cliver le composé de formule (7) avec un composé de formule R1X, R1 pouvant être tel que défini ci-dessus, et X pouvant représenter un atome d'halogène, notamment I ou Br, pour obtenir un composé de formule (I) tel que défini précédemment.

5 PROCEDE DE CRIBLAGE ET DE DIAGNOSTIC

La présente invention a également pour objet un procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15 ou un de ses analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

10 (a) mettre en présence, au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé fluorescent, conforme à l'invention, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine, A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

15 (b) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(c) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un milieu présumé contenir au moins un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

20 (d) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

25 (e) comparer le premier et second signal S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par l'expression « A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence », un couple de marqueurs fluorescents dont le spectre d'émission de l'un (donneur d'énergie de fluorescence) recouvre tout ou partie du spectre d'excitation de l'autre (accepteur d'énergie de fluorescence). En particulier, le spectre d'excitation du donneur ne recouvre pas, ou

qu'en très faible partie, le spectre d'excitation de l'accepteur, évitant ou réduisant ainsi l'apparition de faux positifs.

Selon un mode de réalisation, les premier et second signaux peuvent être des signaux fluorescents de l'accepteur et/ou du donneur d'énergie.

5 En présence d'un composé portant un accepteur d'énergie de fluorescence susceptible d'interagir avec un composé portant un donneur d'énergie de fluorescence, l'irradiation de l'ensemble à une longueur du spectre d'excitation du donneur d'énergie de fluorescence peut produire un transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).

10 Au sens de l'invention, on entend désigner par « transfert d'énergie de fluorescence », un processus physique, dépendant de la distance, par lequel de l'énergie est transmise, de manière non radiative, d'un chromophore excité, le donneur d'énergie de fluorescence, à un autre chromophore, l'accepteur d'énergie de fluorescence, par interaction dipole-dipole.

15 La manifestation d'un tel transfert peut se détecter par une modulation du signal fluorescent du donneur et/ou du signal fluorescent de l'accepteur, comme par exemple la diminution d'amplitude du signal fluorescent du donneur de fluorescence et/ou par une augmentation d'amplitude du signal fluorescent de l'accepteur.

20 Les variations d'amplitude du signal fluorescent du donneur peuvent être concomitantes avec les variations d'amplitude du signal fluorescent de l'accepteur. Alternativement, un des signaux fluorescents peut varier sans qu'une variation de l'autre signal fluorescent puisse être détectée.

 Les conditions et les paramètres à ajuster pour effectuer un transfert d'énergie de fluorescence relèvent de la pratique de l'homme du métier qui peut se référer par exemple à Sekar and Periasamy (J. Cell. Biol., 2003, 160:629).

25 Selon un mode de réalisation, la comparaison des premier et second signaux peut permettre de détecter une modulation d'amplitude d'un signal fluorescent.

 Au sens de la présente invention, on entend désigner par « modulation d'amplitude d'un signal fluorescent », dans le contexte du transfert d'énergie par résonance de fluorescence, toute modulation de l'amplitude du signal de fluorescence du donneur, de 30 l'amplitude du spectre d'excitation ou l'amplitude du signal d'émission du donneur tel que défini précédemment.

Une modulation de ces signaux de fluorescence peut traduire une éventuelle interaction de l'agent à cribler avec une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D. Une telle interaction étant susceptible d'entraîner la dissociation d'un complexe protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D/composé selon l'invention.

5 Selon un mode de réalisation, un procédé de criblage selon l'invention peut comprendre, en outre, une étape consistant à préparer au moins un échantillon contrôle dans lequel ledit milieu ajouté à l'étape c), du procédé selon l'invention définie précédemment, est dépourvu d'agent à cribler.

10 Le ou les échantillons contrôles peuvent être préparés, selon un procédé conforme à l'invention, simultanément ou indépendamment de la mise en œuvre d'un tel procédé pour le criblage d'un agent susceptible d'interagir avec PEA-15.

 Un procédé selon l'invention peut comprendre une étape consistant à comparer un signal S_3 mesuré à partir d'un échantillon contrôle avec les signaux S_1 et S_2 tels que
15 définis précédemment pour en tirer une information sur ledit agent à cribler.

 Une différence entre les signaux ainsi comparés peut être informatif de la présence, de la quantité, et/ou d'une interaction avec PEA-15, d'un agent à cribler dans un échantillon.

20 Selon un mode de réalisation, le marqueur fluorescent D porté par la protéine PEA-15 peut être choisi, de manière non limitative, parmi une protéine, telle qu'une protéine fluorescente, un marqueur fluorescent, par exemple choisi parmi un dérivé de la fluoresceine, un dérivé de la rhodamine, un dérivé de l'Alexa 532[®], un dérivé du Bodipy ou un dérivé de l'Oregon Green[®], sous réserve que D et A soient tels que définis ci-dessus.

25 Selon un mode de réalisation, la protéine fluorescente peut être choisie, de manière non exhaustive, parmi la Green Fluorescent Protein, ou un de ses variants fluorescents, tels que la Yellow Fluorescent Protein (YFP), la Cyan Fluorescent Protein (GFP) ou la Red Fluorescent Protein (RFP) ou le DS Red ou un de ses variants.

30 Selon un mode de réalisation, la protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent peut être notamment une protéine de fusion, par exemple GFP-PEA-15. Une telle protéine peut être obtenue par toute technique de biologie moléculaire connue de l'homme du métier, et notamment celles décrites dans « Molecular Cloning : A Laboratory Manual », Cold Spring Harbor, Laboratory Cold Spring Harbor, NY, 1989, 2d Ed.

La construction et l'obtention de vecteur d'expression contenant une protéine de fusion, telle que par exemple GFP-PEA-15 relève des connaissances et de la pratique habituelles de l'homme du métier. Les séquences codant pour ces protéines sont par exemple disponibles dans des banques de données, sur le site www.ncbi.nlm.nih.gov ou sur le site ca.expasy.org, et également commercialement.

Des vecteurs d'expression, contenant une séquence d'acides nucléiques codant pour la GFP (ou un de ses variants) ou le DS Red peuvent être disponible commercialement, notamment auprès de sociétés telles que Invitrogen ou Clontech.

L'expression de tels vecteurs peut se faire dans toute cellule hôte adaptée, et la récupération de la protéine de fusion ou le cas échéant de l'acide nucléique codant par une telle protéine, comme l'ARNm ou l'ADNc, peut se faire par tout moyen adapté connu de l'homme de l'art.

Par exemple, une protéine de fusion GFP-PEA-15 a été décrite par KITSBERG *et al.* (J. Neurosci., 1999,19:8244).

Selon un mode de réalisation, un procédé de criblage conforme à l'invention peut être mis en œuvre, par exemple, en utilisant un composé conforme à l'invention de formule (IV).

Selon un mode de réalisation, la protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D peut être une protéine de fusion GFP-PEA-15.

Selon un mode de réalisation, un procédé de criblage conforme à l'invention peut être effectué *ex vivo* ou *in vitro*.

Par exemple, un procédé conforme à l'invention mis en œuvre peut être effectué *ex vivo* à partir d'un tissu prélevé à partir d'un animal de laboratoire modifié génétiquement pour que ses cellules expriment, de manière tissu spécifique ou non, une protéine de fusion GFP-PEA-15.

Un procédé conforme à l'invention réalisé peut être effectué *in vitro* notamment *in cellulo* à partir de cellules intactes, ou *ex cellulo*, par exemple dans un lysat de cellules ou après séparation des éléments d'intérêts, comme la protéine de fusion GFP-PEA-15.

Un procédé de criblage conforme à l'invention peut être effectué *in cellulo* dans des cellules exprimant la protéine de fusion selon l'invention, soit après transfection de cellules, primaires ou en lignées, au moyen d'un vecteur d'expression tel que défini

précédemment, soit par mise en culture de cellules prélevées chez un animal de laboratoire modifié génétiquement de manière à exprimer une construction comme défini ci-dessus, soit par perfusion de cellules primaires ou en lignées, par exemple au moyen d'une micropipette ou de tout autre moyen connu de l'homme de l'art, d'une protéine de fusion
5 selon l'invention, ou d'une séquence d'acide nucléique codant pour cette protéine de fusion.

Selon un autre de ses aspects, la présente invention se rapporte à un procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou un de ses
10 analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

(a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 liée à un support avec un composé conforme à l'invention, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(b) mesurer un premier signal S1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape
15 a),

(c) mettre en présence l'ensemble obtenu à l'étape a) avec un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(d) mesurer un second signal S2, de même nature que S1, caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c),

(e) comparer S1 et S2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle
20 interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

Selon un mode de réalisation, la protéine PEA-15 peut être liée à un support au moyen d'un marqueur dit « marqueur de purification ».

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « marqueur de
25 purification », toute structure susceptible d'être utilisée à des fins de liaison entre la protéine PEA-15 et un support.

Un marqueur de purification peut être, par exemple et de manière non limitative, une étiquette FLAG, une étiquette polyHistidine, ou une protéine GST(Glutathion S Transferase).

30 Une protéine PEA-15 liée à un marqueur de purification tel que défini précédemment peut être une protéine de fusion obtenue par toutes méthodes de biologie moléculaire connues de l'homme de l'art, notamment comme indiqué ci-dessus.

Par exemple une protéine de fusion GST-PEA-15 peut être obtenue selon le protocole décrit par Kitsberg et al. (J. Neurosci, 1999, 19 : 8244).

Selon le marqueur de purification considérée, un support convenant à la mise de l'invention peut être, par exemple et de manière non exhaustive, une surface d'une bille
5 de Sepharose ou d'une plaque pour culture de cellules recouverte de glutathion tel que des plaques 96 puits commercialisées par SIGMA (ref. P3233), une colonne de nickel, un anticorps anti-FLAG lié à une colonne de protéine G ou de protéine A, ou à la surface d'une bille de Sepharose ou au fond d'un puits d'une plaque de culture de cellules.

Par ailleurs pour une mise en œuvre d'un procédé selon, la protéine PEA-15
10 peut être liée à la surface d'une sensor ship, pour une mise en œuvre dans un procédé de détection d'un signal par résonance plasmonique de surface, selon des moyens connus de l'homme de l'art.

Selon un mode de réalisation, le composé selon l'invention peut être fluorescent et le premier signal S_1 et le second signal S_2 peuvent être des signaux de
15 fluorescence.

La mesure de ces signaux peut être obtenue par toutes méthodes de spectrofluorimétrie ou d'imagerie par fluorescence, connues de l'homme de l'art. Les conditions d'excitation et d'enregistrement de l'émission de fluorescence sont à adapter selon différents facteurs connus de l'homme de l'art, tels que, par exemple et de manière
20 non exhaustive, la nature du marqueur fluorescent A, le support sur lequel est la protéine PEA-15.

Une éventuelle interaction de la protéine PEA-15 avec un agent à cribler entraînant le déplacement du composé selon l'invention préalablement lié peut être détectée par une différence d'intensité de fluorescence entre les deux signaux S_1 et S_2 .

25 Selon un autre mode de réalisation, le premier signal S_1 et le second signal S_2 peuvent être des signaux obtenus par résonance plasmonique de surface, par exemple au moyen d'un appareil de type Biacore[®], selon des protocoles connus de l'homme de l'art.

Ces signaux sont indépendants de la nature fluorescente ou non d'un composé selon l'invention.

30 Ainsi dans cette mise en œuvre du procédé précédemment décrit, le composé conforme à l'invention peut ne pas être fluorescent.

La protéine PEA-15 peut être fixée sur une sensor ship comme décrit précédemment.

Un composé selon l'invention peut être mis en contact avec ladite protéine fixée au sensor ship. Les interactions entre le composé et la protéine peuvent être détectées
5 par résonance plasmonique de surface. Une éventuelle interaction de la protéine PEA-15 avec un agent à cribler entraînant le déplacement du composé selon l'invention préalablement lié peut être détectée par résonance plasmonique de surface.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention a pour objet un
10 procédé de diagnostic et/ou de pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15 par détection et, éventuellement, quantification de la protéine PEA-15 dans au moins un échantillon biologique présumé comprendre ladite protéine comprenant au moins les étapes consistant à :

(a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur
15 fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé fluorescent conforme à l'invention dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

(b) A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

20 (c) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

(d) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un échantillon biologique présumé comprendre au moins une protéine PEA-15 dans des conditions
25 propices à l'interaction de ladite protéine PEA-15 de l'échantillon biologique avec ledit composé selon l'invention,

(e) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

30 (f) comparer S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle présence de la protéine PEA-15 dans ledit échantillon biologique, et éventuellement une conclusion relative à la quantité de ladite protéine.

Une comparaison du premier et du second signal peut permettre une détection d'une modulation d'amplitude d'un signal fluorescent. Une telle modulation peut être informatif de la présence, et éventuellement, de la quantité de protéine PEA-15 éventuellement présente dans l'échantillon.

5 La détermination de la présence et éventuellement de la quantité de la protéine PEA-15, éventuellement comparée à des valeurs de références obtenues, soit à partir d'un échantillon contrôle comprenant une quantité connue de cette protéine, soit à partir d'un échantillon biologique sain, éventuellement en parallèle avec la mesure précédente, peut être informatif d'un état pathologique impliquant notamment PEA-15 et/ou une évolution
10 d'un tel état.

A titre d'exemple d'état pathologique susceptible d'être diagnostiqué et/ou pronostiqué par un procédé selon l'invention, on peut mentionner le cancer, et notamment les gliomes, les cancers des ovaires, les cancers du sein, les cancers du rein, les mélanomes, et également le diabète de type II.

15 Un échantillon biologique peut être obtenu à partir d'un tissu biologique ou d'un fluide corporel.

Un procédé selon l'invention peut comprendre une étape consistant à comparer un signal S_3 mesuré à partir d'un échantillon contrôle avec les signaux S_1 et S_2 tels que définis précédemment pour en tirer une information la présence et, éventuellement, la
20 quantité de PEA-15 dans un échantillon biologique.

Selon un mode de réalisation, le premier et le second signal peuvent être comparé à un ou plusieurs signaux fluorescents détectés à partir d'un ou plusieurs échantillon(s) contrôle(s). De tels échantillons contrôles peuvent être obtenus en mettant en œuvre un procédé selon l'invention et en remplaçant à l'étape c) l'échantillon biologique
25 par un ou des échantillon(s) comprenant une quantité connue de protéine PEA-15.

Le ou les échantillons contrôles peuvent être préparés selon un procédé conforme à l'invention simultanément ou indépendamment de la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention pour la détection et, éventuellement, la quantification de la protéine PEA-15 dans un échantillon biologique.

30 Selon un mode de réalisation, il est possible de faire varier les quantités connues de PEA-15 du ou des échantillon(s) contrôle(s) ou la quantité de protéine PEA-15

portant un marqueur fluorescent D et ou de composé fluorescent conforme à l'invention de façon au pouvoir obtenir une gamme étalon.

Une corrélation d'un signal de fluorescence à l'une des quantités variables précédemment définies peut être ainsi réalisée.

5 Ainsi, une corrélation d'un signal de FRET peut être établie avec des quantités connues de protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, de composé fluorescent conforme à l'invention de protéine PEA-15.

Selon un mode de réalisation, la protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D peut, notamment, être telle que définie précédemment.

10 Selon un mode de réalisation, une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D peut être une protéine de fusion de type GFP-PEA-15.

Selon un mode de réalisation, le composé conforme à l'invention peut être tel que défini précédemment, et notamment peut être de formule (IV) tel que précisé ci-dessus.

15 De nombreuses variations d'un procédé de diagnostic selon l'invention peuvent être envisagées et le cas échéant combinées à des caractéristiques d'un procédé de criblage selon l'invention.

20 Ainsi, selon un mode de réalisation, l'invention concerne un procédé de diagnostic et/ou de pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15 mis en œuvre selon les principes indiqués ci-dessus pour le procédé de criblage, par exemple, mettant en œuvre une détection par résonance plasmonique de surface, dans lequel, l'agent à cribler est remplacé par l'échantillon biologique.

La PEA-15 éventuellement présente dans un tel échantillon pourra se lier au composé conforme à l'invention et modifier ainsi le signal enregistré.

25

TROUSSE POUR CRIBLAGE OU DIAGNOSTIC

La présente invention a également pour objet une trousse pour criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou d'un de ses analogues ou pour le diagnostic et/ou le pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15

30 comprenant :

- au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D ou un marqueur de purification, et

- au moins un composé conforme à l'invention,

le cas échéant, A et D étant tels qu'ils peuvent définir un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence.

5 Selon un mode de réalisation, la protéine PEA-15 portant un marqueur de fluorescence D ou un marqueur de purification peut être telle que définie précédemment.

Selon un mode de réalisation, lorsque la trousse selon l'invention est plus particulièrement mise en œuvre pour le diagnostic et/ou pronostic d'un état pathologique, elle peut comprendre en outre au moins une protéine PEA-15 non marquée.

10 Selon un mode de réalisation, la protéine de fusion formée d'une protéine PEA-15 avec une protéine fluorescente ou la protéine PEA-15 non marquée peuvent être présentes dans une trousse conforme à l'invention sous la forme d'une séquence d'acides nucléiques codant pour lesdites protéines, telle qu'un ADNc, un ARNm, ou un vecteur d'expression.

15

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE

Selon un mode de réalisation, la présente invention a également pour objet un composé conforme à l'invention pour une utilisation à titre d'agent actif dans une composition pharmaceutique.

20 Au sens de la présente invention, on entend désigner par « composition pharmaceutique », une composition ou une substance présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard de maladies humaines ou animales, ainsi qu'une substance ou composition destinée à être utilisée afin d'établir un diagnostic et/ou de pronostic d'un état pathologique ou non, ou de restaurer, corriger ou modifier les
25 fonctions organiques d'un individu.

La méthode de diagnostic et/ou de pronostic susceptible d'être mise en œuvre par une composition pharmaceutique selon l'invention peut être effectuée *in vitro* ou *ex vivo*.

30 Une composition pharmaceutique conforme à l'invention peut comprendre un composé conforme à l'invention de formule générale (I), ou un de ses dérivés tels qu'une forme tautomère, une forme stéréoisomère, une forme polymorphe, un sel pharmaceutiquement acceptable, ou un solvate pharmaceutiquement acceptable, en

combinaison avec des véhicules, des diluants, ou des excipients usuellement utilisés en pharmacie.

Une composition pharmaceutique conforme à l'invention peut être présentée sous une forme galénique usuellement utilisée dans le domaine, telle que des comprimés,
5 des gélules, une poudre, un sirop, une solution, une suspension.

Une composition pharmaceutique conforme à l'invention peut être présentée sous une forme galénique convenant à l'administration par d'autres voies, telles que la voie orale, la voie nasale, la voie sublinguale, la voie topique, la voie ophtalmique, la voie rectale, etc.

10 Une composition cosmétique conforme à l'invention peut également être présentée sous une forme stérile convenant à une administration par voie parentérale, telle que la voie sous-cutanée, transdermique, intramusculaire, intraveineuse, intra-artérielle, intra-cardiaque, etc.

Une composition pharmaceutique conforme à l'invention peut également être
15 présentée sous une forme lyophilisée, combinée au moment de son utilisation avec une solution aqueuse stérile ou non.

En particulier, la solution aqueuse peut être stérile si la composition conforme à l'invention est destinée à une administration parentérale.

La quantité de composé conforme à l'invention présente dans une composition
20 pharmaceutique est à ajuster, par exemple, selon la voie d'administration, le type d'individu à traiter, la nature de la pathologie à traiter.

L'ajustement des quantités et des posologies en fonction de ces paramètres est connu de l'homme de l'art.

Une composition conforme à l'invention comprend généralement une quantité
25 suffisante d'un composé conforme à l'invention.

On entend désigner par « quantité suffisante », la quantité nécessaire à l'obtention d'un effet recherché. Au sens de la présente invention, un tel effet peut être par exemple la réduction ou le traitement des symptômes présentés par un individu présumé atteint d'une pathologie telle qu'un cancer ou un diabète de type II.

30 Le cancer peut être par exemple un gliome, un cancer du rein, un cancer du sein, ou un mélanome.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un composé conforme à l'invention pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15.

5 La protéine PEA-15 peut être impliquée soit par une altération de son expression, à savoir par exemple une surexpression ou un manque d'expression, soit par une altération de son activité biologique, se traduisant, par exemple, par une augmentation de son activité ou une diminution de son activité, et pouvant être le résultat soit d'une mutation (par exemple substitution, insertion ou délétion) dans la séquence de la protéine
10 PEA-15, soit résultant d'une altération des signaux cellulaires modulant l'activité biologique et/ou l'expression de la protéine PEA-15.

En relation avec un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15, le terme « traitement » vise à désigner la réduction de la sévérité d'une maladie, telle que par exemple la réduction des symptômes ou la prévention de ces symptômes.

15 Ainsi, et dans ce dernier cas, un composé conforme à l'invention peut être administré avant le développement de l'état pathologique.

Les états pathologiques visés par la présente invention peuvent être notamment ceux définis précédemment, tels que le cancer, et notamment les gliomes, les cancers du rein, les cancers du sein, les cancers de l'ovaire, les mélanomes, et également le diabète de
20 type II.

On entend désigner par « individu » au sens de la présente invention l'homme, des primates non humains, ainsi que des animaux de laboratoire tels que les rongeurs (par exemple souris, rat, cochon d'inde ou hamster), des animaux de ferme, en particulier des animaux économiquement intéressants tels que la volaille, les bovins, les ovins, les porcs,
25 les chèvres et les poissons, et particulièrement ceux produisant des produits convenant à la consommation humaine tels que la viande, les œufs et le lait. Ce terme vise également à désigner les animaux domestiques tels que les chats et les chiens.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique telle que définie précédemment.

30 Selon un mode de réalisation, la présente invention a également pour objet un complexe isolé comprenant au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D ou un marqueur de purification et au moins un composé de formule

conforme à l'invention, A et D étant tels qu'ils peuvent définir un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence.

Selon une variante de réalisation, un complexe selon l'invention peut
5 comprendre à titre de protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, une protéine de fusion GFP-PEA-15 et à titre de composé de formule conforme à l'invention, un composé de formule (IV), tel que défini précédemment.

De nombreuses modifications de l'invention telle qu'exposée ci-dessus peuvent
10 être envisagées par l'homme de l'art sans s'écarter de la portée de celle-ci.

De telles modifications sont couvertes par la présente demande.

L'invention est illustrée par les exemples suivants, qui ne doivent pas être interprétés comme limitant la portée de la présente invention.

15 **LEGENDE DES FIGURES**

Figure 1 : représente des images obtenues par imagerie confocale de la localisation du composé intracellulaire des protéines ERK et PEA-15 avant et après traitement avec 50 μ M 6D6-1. Le traitement des cellules avec le composé 6D6-1 se traduit par une relocalisation de la protéine ERK dans le noyau alors que la protéine PEA-15 reste
20 cytoplasmique.

La barre d'échelle correspond à 40 μ m.

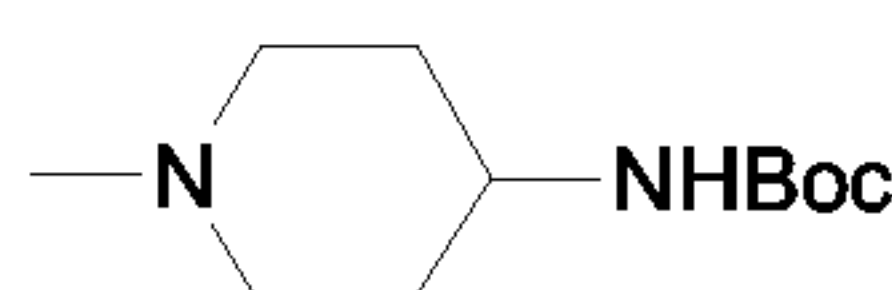
Figure 2 : représente l'intensité moyenne de la fluorescence de bille de Sépharose recouverte de glutathion, portant une protéine de fusion GST-PEA-15, incubées
25 en présence de 1 et 5 μ M de 6D6-1.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

Synthèse du composé 6D6-1

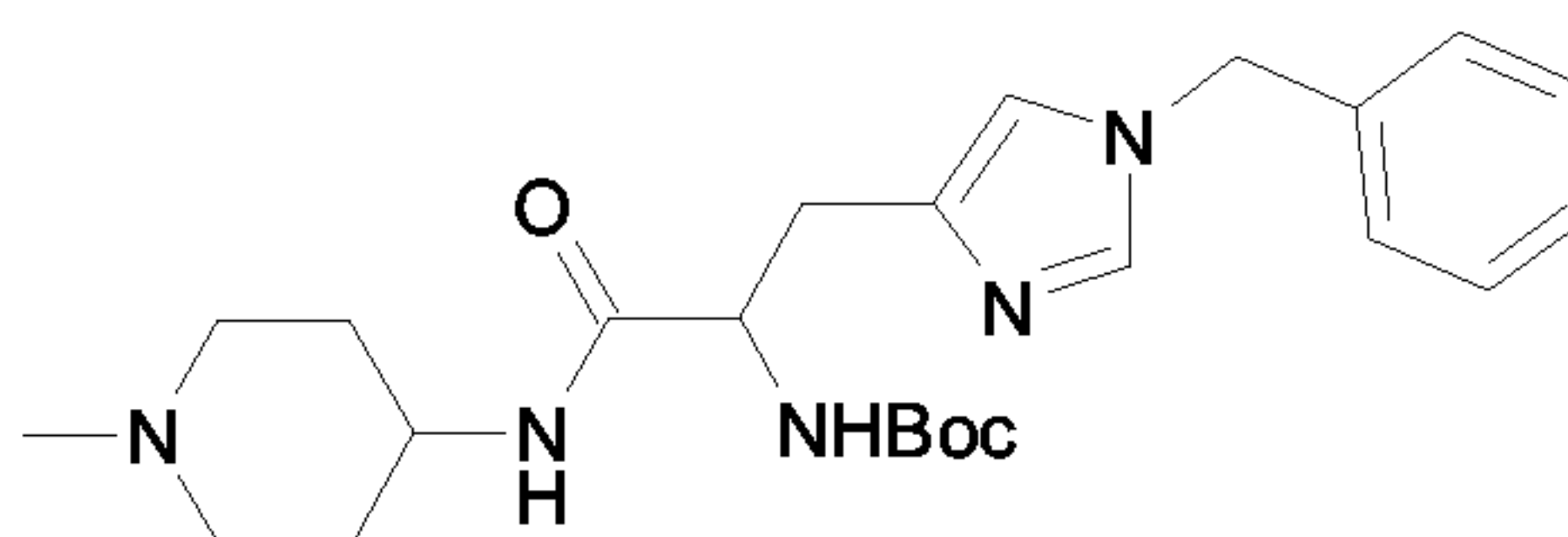
30 **Synthèse de (1-Méthyl-pipéridin-4-yl)-carbamic acid *tert*-butyl ester**



Dans un réacteur, la résine REM (REgenerated Michael, résine de polystyrène) (5 g, 4 mmol, 0,8 mmol.g.mol⁻¹ de charge théorique) est gonflée dans une qualité minimale de diméthyleformamide (DMF). Une solution de tertibutyloxycarbonylaminopipéridine (8 g, 40 mmol) dans le DMF (50 ml) est portée à 80 °C puis ajoutée à la résine en suspension. Le mélange est agité pendant 16 heures à 80 °C, puis filtré, et lavé trois fois selon la séquence DMF, CH₂Cl₂ MeOH. Dans une seringue Supelco, la résine (2.3g, 1.5 mmol) est expansée dans 20 mL de DMF et l'iodure de méthyle (3.81 mL, 61 mmol) est ajouté. Le mélange est agité par rotation pendant 24 h, la résine est filtrée, lavée avec 3 séquences de DMF/ DCM. Dans les mêmes conditions une deuxième étape d'alkylation par l'iodure de méthyle est répétée. Le clivage de la pipéridine sur la résine est réalisé dans un ballon avec 40 mL de DCM et en présence de la résine IRA-95 (3.16 g, 1.5 mmol). Après 24 h d'agitation par un barreau aimanté, la résine est filtrée, lavée DCM/MeOH. Le filtrat est collecté et amené à sec sous pression réduite. Une purification par flash chromatographie sur gel de silice (DCM/ MeOH : 9/1) conduit au (1-Methyl-piperidin-4-yl)-carbamic acid *tert*-butyl ester sous forme d'une poudre blanche.

Rdt = 100 % ; ¹H NMR (CDCl₃, 200 MHz): 4.43 (m, 1H), 2.77 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.13-1.87 (m, 4H), 1.53-1.46 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (CDCl₃, 50 MHz) 155.60, 110.00, 54.86, 46.47, 32.90, 28.80.

Synthèse de la 1-méthyl-pipéridin-4- His(Bzl)-NHBoc

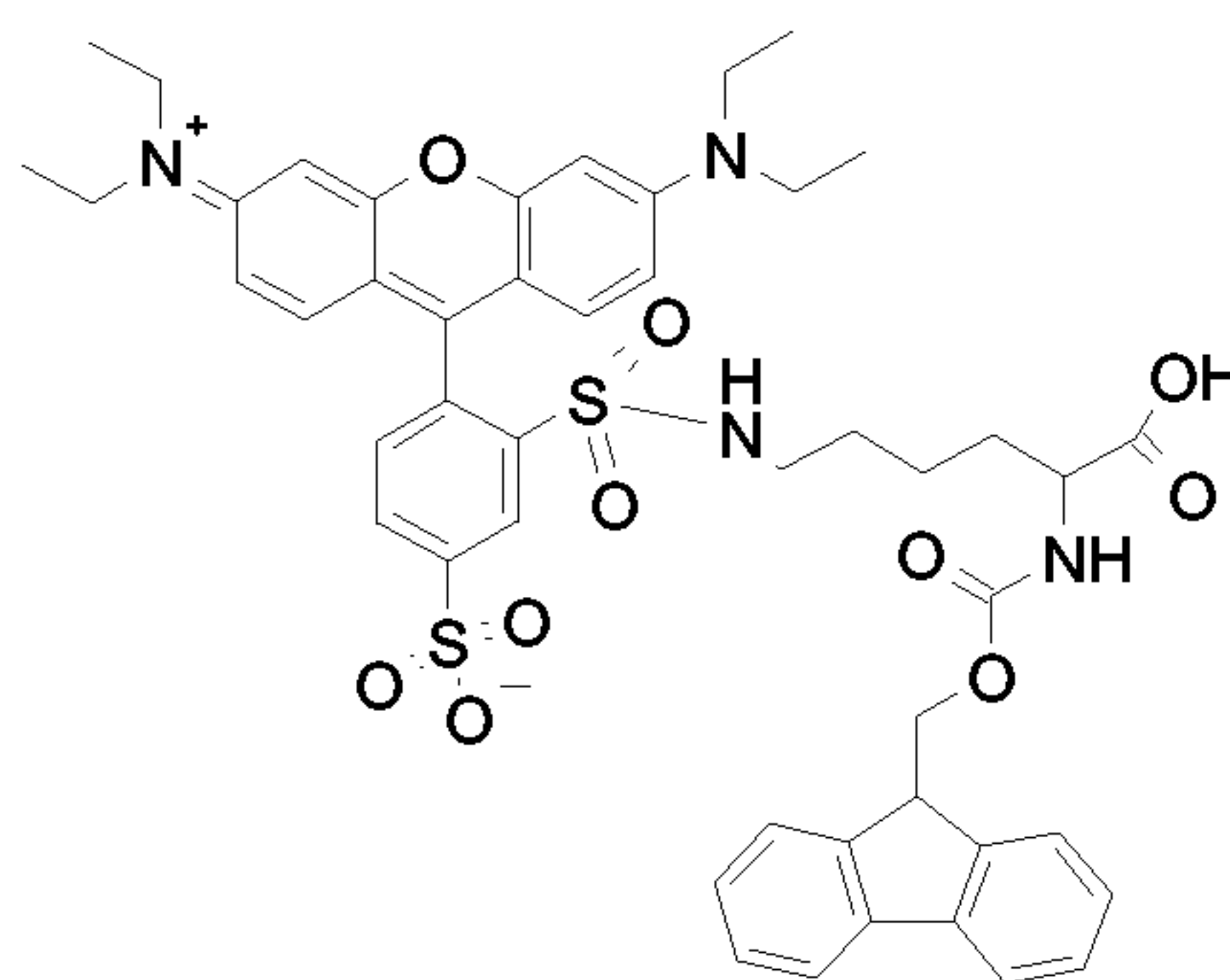


A température ambiante et sous agitation magnétique, la (1-Methyl-piperidin-4-yl)-carbamic acid *tert*-butyl ester (0.07 g, 0.34 mmol) est traitée par une solution de TFA/DCM (1mL /1mL) pendant 1h30. La solution est ensuite évaporée à sec sous pression réduite et le produit obtenu est séché sous vide pendant 18 h. La *N*-méthyl pipéridine déprotégée est dissout dans 1 mL de DMF et sont successivement additionnés la Boc-His(Bzl)-OH (0.12 g, 0.32 mmol), le benzotriazol-1-yl-oxytrispyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate [PyBop] (0.17 g, 0.32 mmol) et la

diisopropyléthylamine [DIEA] (0.27 mL, 1.6mmol). Après une agitation magnétique de 3h à température ambiante, la réaction est évaporée à sec puis purifiée par HPLC et conduit après lyophilisation à une huile translucide.

Rdt= 100 % ; tr = 15.74 min ; λ = 220 nm ; gradient t = 0 min : 0 % solvant B à t = 5 min : 0 % solvant B à t = 35 min : 100 % solvant B. MS (ESI-TOF) m/z (M+H) calculé pour [C₂₄H₃₅N₅O₃ +H] 442 trouvé 442.

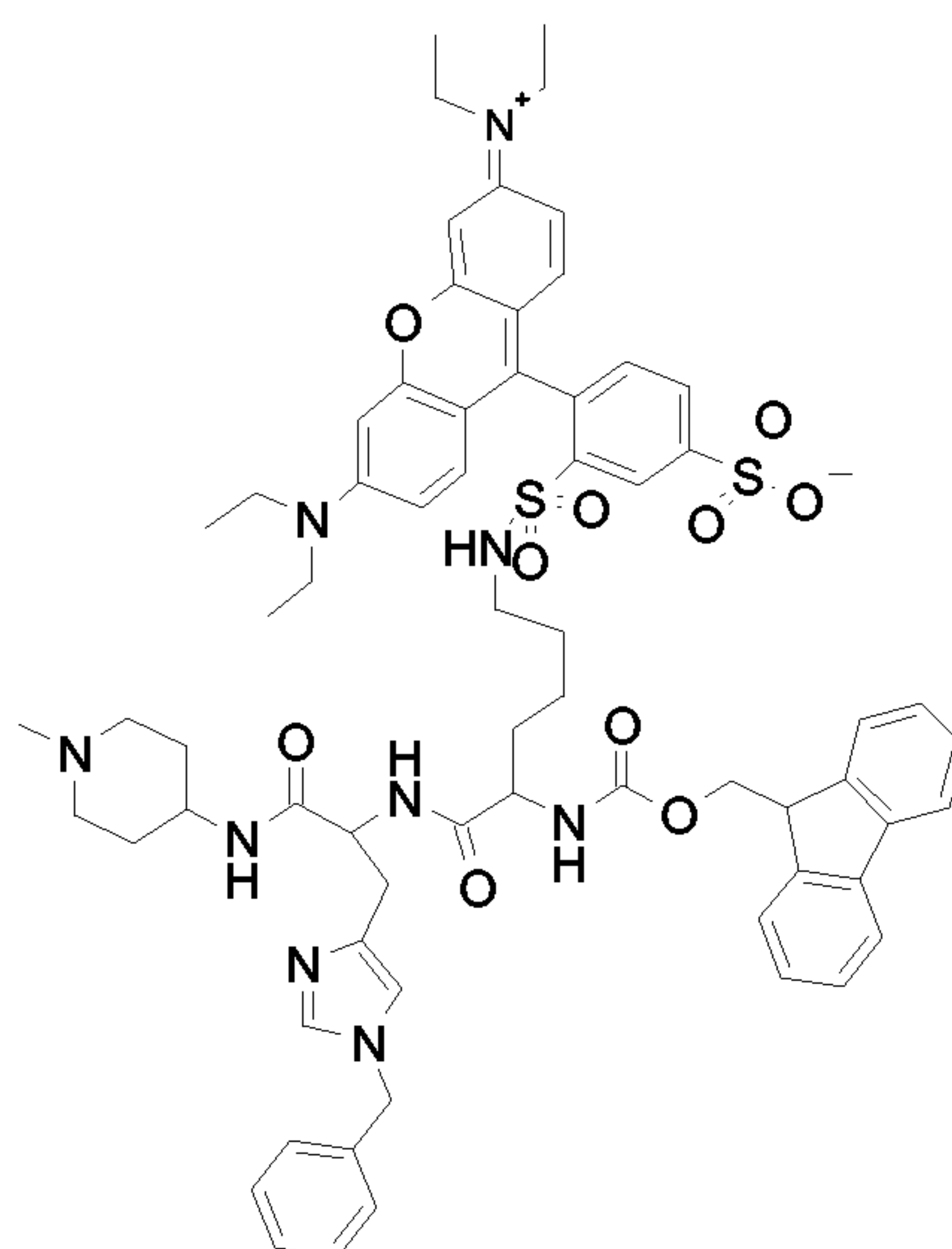
Synthèse de la Fmoc-Lys(o-Lissamine)-OH



A température ambiante et sous agitation magnétique, la Fmoc-lys(Boc)-OH (0.57 g, 1.23 mmol) est traitée par une solution de TFA/DCM (5mL /5mL) pendant 2H. La solution est ensuite évaporée à sec sous pression réduite et le produit obtenu est séché sous vide pendant 18 h. La Fmoc-lys-OH est ensuite mis en solution dans 17 mL de DCM puis de la triéthylamine [TEA] (1.38 mL, 9.84 mmol) est additionné pour ajusté le pH au
 15 environ de 8-9, on observe alors la formation d'un gel qui disparaît lors de l'addition en une demi-heure à 0°C de la lissamine (0.78 g, 1.35 mmol). Ramené à température ambiante, la réaction est laissée sous agitation magnétique pendant 5 H. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec 50 mL de DCM, lavé deux fois avec HCl 10% (10 mL), puis la phase organique est séchée sur sulfate de sodum, évaporée à sec. La purification et
 20 la séparation des deux isomères de position est obtenue sur gel de silice (dichlorométhane/méthanol/acide acétique : 94/5/1) et conduit à deux poudres violettes.

Rdt : isomère para 40 % et isomère ortho 5 %. MS (ESI-TOF) m/z (M+H) calculé pour [C₄₈H₅₂N₄O₁₀S₂+H] 909, trouvé 909.

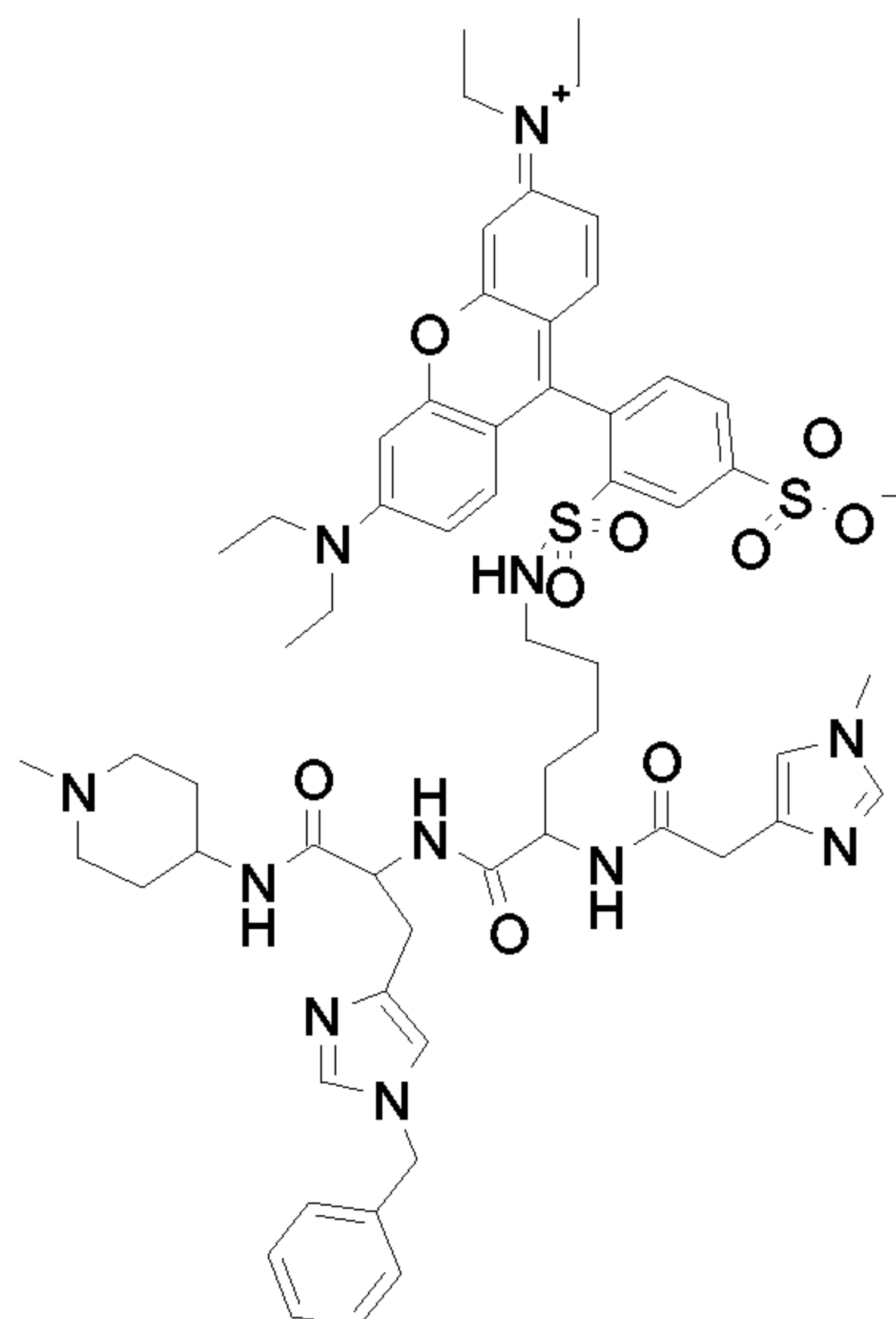
Synthèse de la 1-méthyl-pipéridin-4- His(Bzl)- Lys(*o*-Lissamine)-NHFmoc



A température ambiante et sous agitation magnétique, la 1-méthyl-pipéridin-4-His(Bzl)-NHBoc (0.03 g, 0.08 mmol) est traitée par une solution de TFA/DCM (1mL /1mL) pendant 1h30. La solution est ensuite évaporée à sec sous pression réduite et le produit est séché sous vide pendant 18 h. L'amine ainsi obtenue est dissout dans 0.5 mL de DMF et sont successivement additionnés la Fmoc-Lys(*o*-Lissamine)-OH (0.06 g, 0.07 mmol), le PyBop (0.03 g, 0.07 mmol) et la TEA (0.01 mL, 0.07 mmol). Après une agitation magnétique de 4h à température ambiante, la réaction est évaporée à sec puis purifié par HPLC et conduit après lyophilisation à une poudre violette.

Rdt = 15 %; tr = 18.97 min ; λ = 220 nm ; gradient t = 0 min : 5 % solvant B à t = 30 min : 100 % solvant B. MS (ESI-TOF) m/z (M+H) calculé pour [C₆₇H₇₇N₉O₁₀S₂+H] 1232, trouvé 1232.

Synthèse de la 1-méthyl-piperidin-4-His(Bzl)-Lys(*o*-Lissamine)- 1-méthyl-1H-imidazol-4-yl)-acétamide



Dans une première étape la 1-méthyl-piperidin-4- His(Bzl)-Lys(*o*-Lissamine)-
 5 NHFmoc (0.01mg, 0.01 mmol) est traitée par 0.12 mL de pipéridine dans 0.5 mL de DMF pendant 1 h à température ambiante. La solution est ensuite directement injectée sur HPLC semi-préparative et conduit au produit déprotégé sur l'amine terminale avec un rendement de 40 %. L'amine (0.004 g, 0.004 mmol) ainsi obtenue est engagée dans une dernière
 10 étape de couplage avec la 1-méthyl-4-imidazoleacetic acid hydrochloride (0.001 g, 0.007 mmol) en présence de PyBop (0.003 g, 0.007 mmol) et de DIEA (0.005 mL, 0.033 mmol) dans 0.3 mL de DMSO. Après 1h30 d'agitation à température ambiante, la solution est directement injectée sur HPLC semi-préparative et conduit après lyophilisation à une poudre violette.

Rdt 30 % tr = 17.70 min ; λ = 220 nm ; gradient t = 0 min : 5 % solvant B à t =
 15 35 min : 100 % solvant B. MS (ESI-TOF) m/z (M+H) calculé pour [C₅₈H₇₃N₁₁O₉S+H] 1132, trouvé 1132.

EXEMPLE 2

Détection par FRET de l'interaction du composé 6D6-1 avec la PEA-15-GFP

20 La lignée cellulaire 3T3 exprimant la GFP-PEA-15 (cellule 3T3-GFP-PEA-15) a été obtenue comme décrit par FORMSTECHE *et al.* (Dev. Cell., 2001, 1: 239) par transfection des cellules NIH3T3 avec un plasmide pEGFP-PEA-15 obtenu comme décrit par KITSBERG *et al.* (J. Neurosci., 1999, 19:8244).

Des clones résistants à la néomycine (G418) ont été sélectionnés et cultivés dans un milieu DMEM (Roche) complété avec 10 % de sérum de veau foetal, 2mM de glutamine, de la pénicilline (5 IU/ml) et de la streptomycine (5 g/ml).

5 L'expression de la protéine GFP-PEA-15 a été vérifiée par mesure de la fluorescence des cellules vivantes et une analyse par transfert WESTERN avec un anticorps anti-GFP (Roche, cat n° 1 814 460 mélange de deux anticorps monoclonaux faits chez la souris (clone 7.1 et clone 13.1)) et un anti-PEA-15 (anticorps polyclonal de lapin, Sharif *et al.*, Neuroscience, 126 :263, 2004).

10 Les cellules 3T3-GFP-PEA-15 sont ensuite cultivées jusqu'à confluence dans un milieu HAM-F12 comprenant de la pénicilline (10 000 U/ml)/streptomycine (10 000 µg/ml), 7 % de sérum de veau foetal (BIOWHITTAKER) avant les expériences de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET).

15 Une solution stock du composé 6D6-1, dissous dans du DMSO à une concentration d'environ 20 mM est diluée avant utilisation dans du PBS à une concentration de 10 fois la concentration finale.

Le composé 6D6-1 est testé à 10^{-4} M et 10^{-5} M.

Après addition du composé 6D6-1, les cellules sont agitées doucement (100 rpm) pendant 60 minutes avant la lecture de la fluorescence afin de permettre aux composés de diffuser et de rentrer dans les cellules.

20 Les cellules sont irradiées à une longueur d'excitation à 465 nm.

La protéine GFP excitée à 465 nm émet un signal de fluorescence à 535 nm.

La liaison du composé 6D6-1 à la protéine GFP-PEA-15, permet un transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET) se traduisant par l'émission d'un signal de fluorescence à 590 nm.

25

EXEMPLE 3

Effet du composé 6D6-1 sur la localisation de ERK

Des cultures primaires d'astrocytes ont été préparées à partir de cortex et de striatum d'embryons de souris (jour 16) comme décrit par ARAUJO *et al.* (J. Biol. Chem., 30 1993, 268:5911).

Les cultures primaires d'astrocytes ont été maintenues pendant 24 heures en absence de sérum, une condition connue pour induire une localisation principalement cytoplasmique d'ERK.

5 Les cellules ont ensuite été traitées ou non par 50 μ M du composé 6D6-1 pendant 2 heures 15.

La localisation sub-cellulaire d'ERK et de PEA-15 a été observée par microscopie confocale après marquage des cellules par des anticorps fluorescents.

10 Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (tampon salin phosphate de Dulbecco, sans CaCl_2 ni MgCl_2 , Sigma), et fixées avec du paraformaldéhyde à 4 % dans du PBS (pH 7,5), pendant 15 minutes, puis lavées deux fois avec du PBS comprenant 0,1 M de glycine, à température ambiante.

Ensuite, les cellules ont été incubées pendant 5 minutes dans du PBS contenant 0,2 % de triton X-100.

15 Les sites non spécifiques ont été bloqués avec du PBS contenant 10 % de sérum de chèvre normal (NGS) pendant une heure à température ambiante.

Puis les cellules ont été incubées sur la nuit à 4 °C avec des anticorps spécifiques de PEA-15 (anticorps polyclonal de lapin, Sharif et al, Neuroscience, 2004) ou de ERK (anticorps polyclonal de lapin, Santa Cruz K-23 (ref sc-94)), dilués dans du PBS contenant 1,5 % de NGS.

20 Après trois lavages dans du PBS, les cellules sont incubées pendant une heure à température ambiante avec un anticorps anti-lapin marqué par Alexa-488 (Molecular Probes).

Les noyaux cellulaires ont été marqués avec de l'iodure de TOPRO² selon les spécifications du fabricant (HOECHST).

25 Les lamelles ont été montées sur des lames de verre dans un milieu FLUOROMOUNT (Southern Biotechnology) et examinées par microscopie confocale (TCS SP2, LEICA) avec les filtres appropriés.

Pour l'analyse confocale, les longueurs d'ondes d'excitation étaient 488 nm pour Alexa 488 et 633 nm pour TOPRO, les longueurs d'ondes d'émission étaient 510-525 nm pour Alexa-488 et 647 nm pour TOPRO.

30 Le traitement des astrocytes par 50 μ M du composé 6D6-1 conduit à la relocalisation d'ERK dans le noyau, alors que PEA-15 reste cytoplasmique (Figure 1).

EXEMPLE 4*Interaction 6D6-1/protéine PEA-15*

La protéine de fusion GST-PEA-15 a été obtenue selon le protocole décrit par Kitsberg *et al.* (J. Neurosci, 1999, 19 : 8244).

5 Les protéines de fusion GST-PEA-15 ont été récupérées après lyse des bactéries et incubées en présence de bille de Sépharose recouverte de glutathion.

Les billes ainsi obtenues sont incubées en présence de 1 ou 5 μ M de 6D6-1, dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH7,4 ; NaCl 100 mM ; MgCl₂ 1 mM ; Triton X-100 1 %).

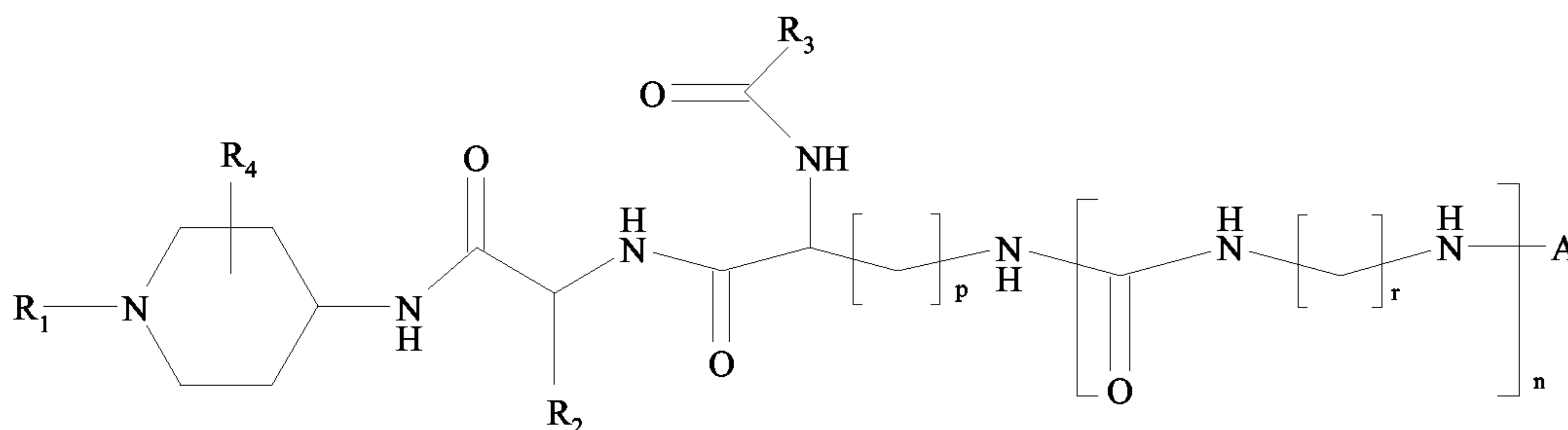
10 Après une série de trois lavages, les billes sont séchées sur une membrane de cellulose et la fluorescence est quantifiée au moyen d'un phosphoImager (Biorad), en mesurant la fluorescence de la lissamine par excitation à 543 nm et mesure de l'émission à 590 nm.

Les résultats sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

15 Les résultats indiquent que l'intensité moyenne de fluorescence dépend de la concentration du composé et suggèrent ainsi une interaction spécifique entre le composé 6D6-1 et la protéine PEA-15.

REVENDICATIONS

1. Composé de formule générale (I) suivante :



5 dans laquelle :

- n est égal à 0 ou 1,
- p représente un nombre entier variant de 1 à 6, et en particulier variant de 2 à 4,
- r représente un nombre entier variant de 1 à 12, et en particulier variant de

10 2 à 6, et en particulier est égal à 4,

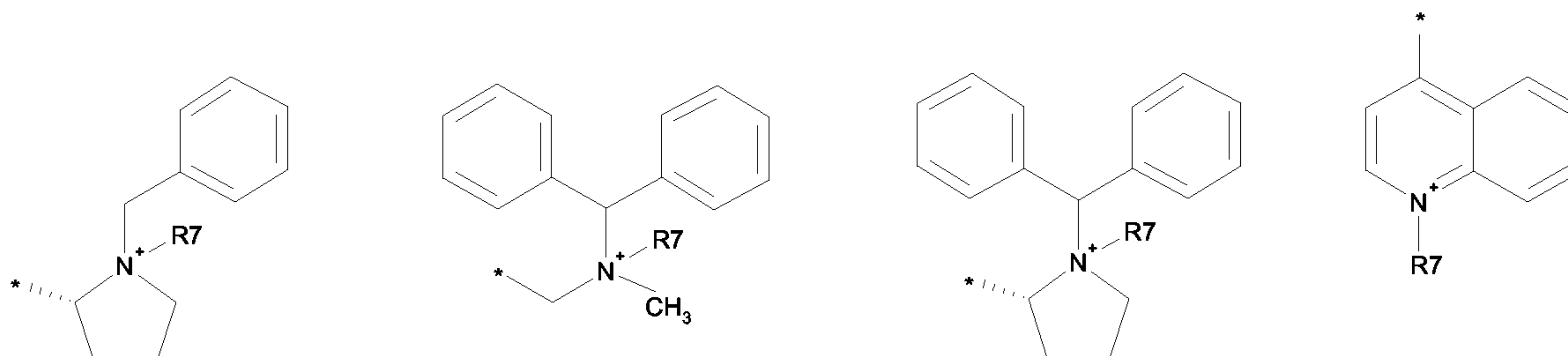
- R₁ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₂₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radical(aux) alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radical(aux) alkyle en

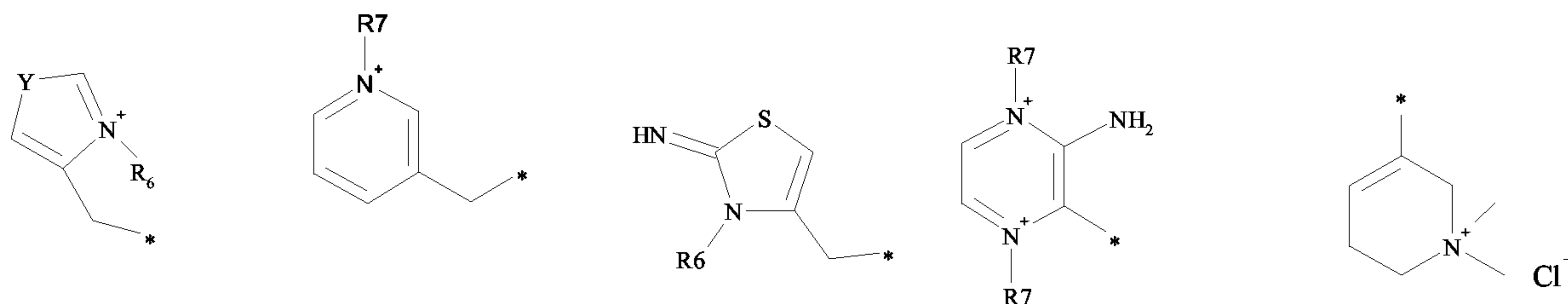
15 C₁ à C₁₀,

- R₂ représente une chaîne latérale d'acide aminé ou d'un dérivé d'acide aminé,

- -COR₃ représente un radical acyle porteur d'une entité basique R₃ notamment choisie parmi les radicaux de formules suivantes :

20





- dans lesquelles * symbolise une liaison covalente avec le radical acyle, Y représente N ou N⁺ R₇, et R₆ et R₇ représentent indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₂₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radicaux alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radicaux alkyle en C₁ à C₁₀.

- R₄ peut représenter un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁ à C₁₀, saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C₃ à C₁₀, saturé ou insaturé, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitué par un ou plusieurs atomes d'halogène, un ou plusieurs radicaux alkoxy en C₁ à C₆, ou un ou plusieurs radicaux alkyle en C₁ à C₁₀,

- A représente un radical dérivé d'un reste xanthène, d'un reste acridine ou d'un reste 4-bora-3a,4a-diaza indacène,

- et ses dérivés.

2. Composé selon la revendication 1, dans lequel A représente un marqueur fluorescent.

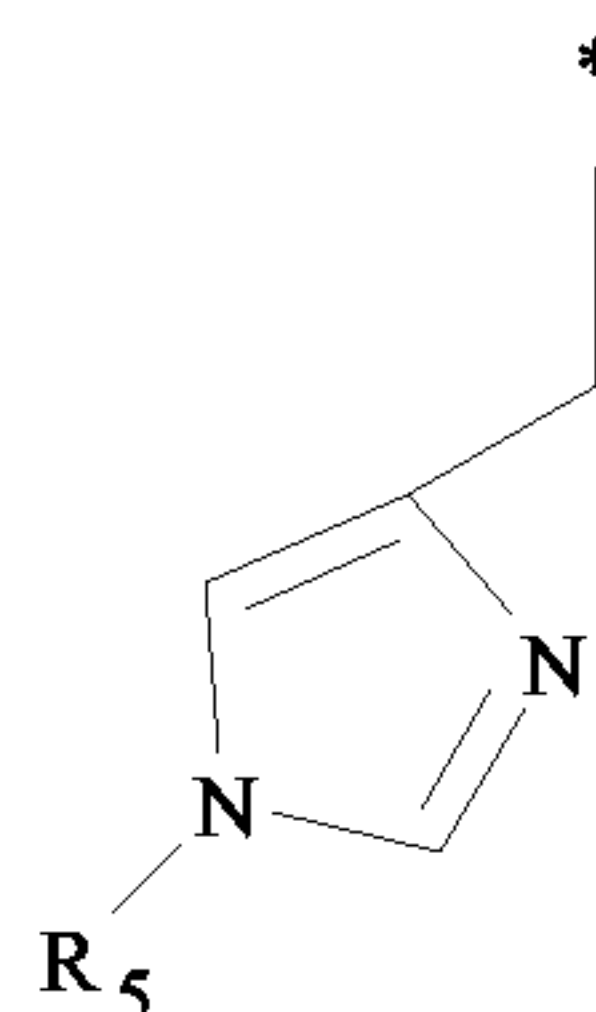
3. Composé selon la revendication 1 ou 2, dans lequel R₁ représente un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C₁-C₁₈, un radical alkyle en C₂-C₁₆, un radical aryle en C₆ à C₁₀, optionnellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène.

4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, dans lequel R₁ représente un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phénytyle ou un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10.

5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel R₂ représente une chaîne latérale d'un acide aminé ou dérivé d'acide aminé choisi parmi l'alanine, la glutamine, la leucine, la glycine, le tryptophane, la β-alanine, la phénylalanine,

la 4-chloro-phénylalanine, l'acide isonipécotinique, l'acide 4-aminométhylbenzoïque, l'acide 3-tétrahydroisoquinoléinique et l'histidine libre ou benzylée.

6. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, dans lequel R_2 est de formule (VI) suivante :



5

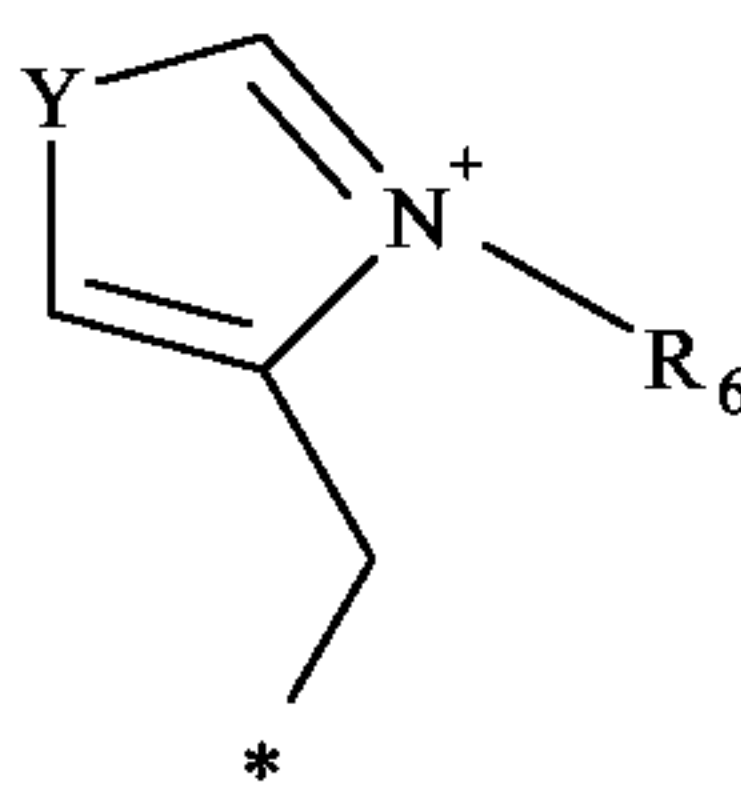
dans laquelle

- * symbolise une liaison covalente avec le reste d'un composé de formule générale (I), et

- R_5 représente un radical alkyle en C_1 - C_{20} saturé ou insaturé, linéaire ou ramifié, un radical cycloalkyle en C_3 - C_{10} , saturé ou insaturé, un radical aryle en C_6 à C_{10} , optionnellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène.

7. Composé selon la revendication précédente, dans lequel R_5 représente un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phénétyle, un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 10.

8. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel $-COR_3$ est un radical acyle substitué par une entité basique R_3 de formule (VII) suivante :



20

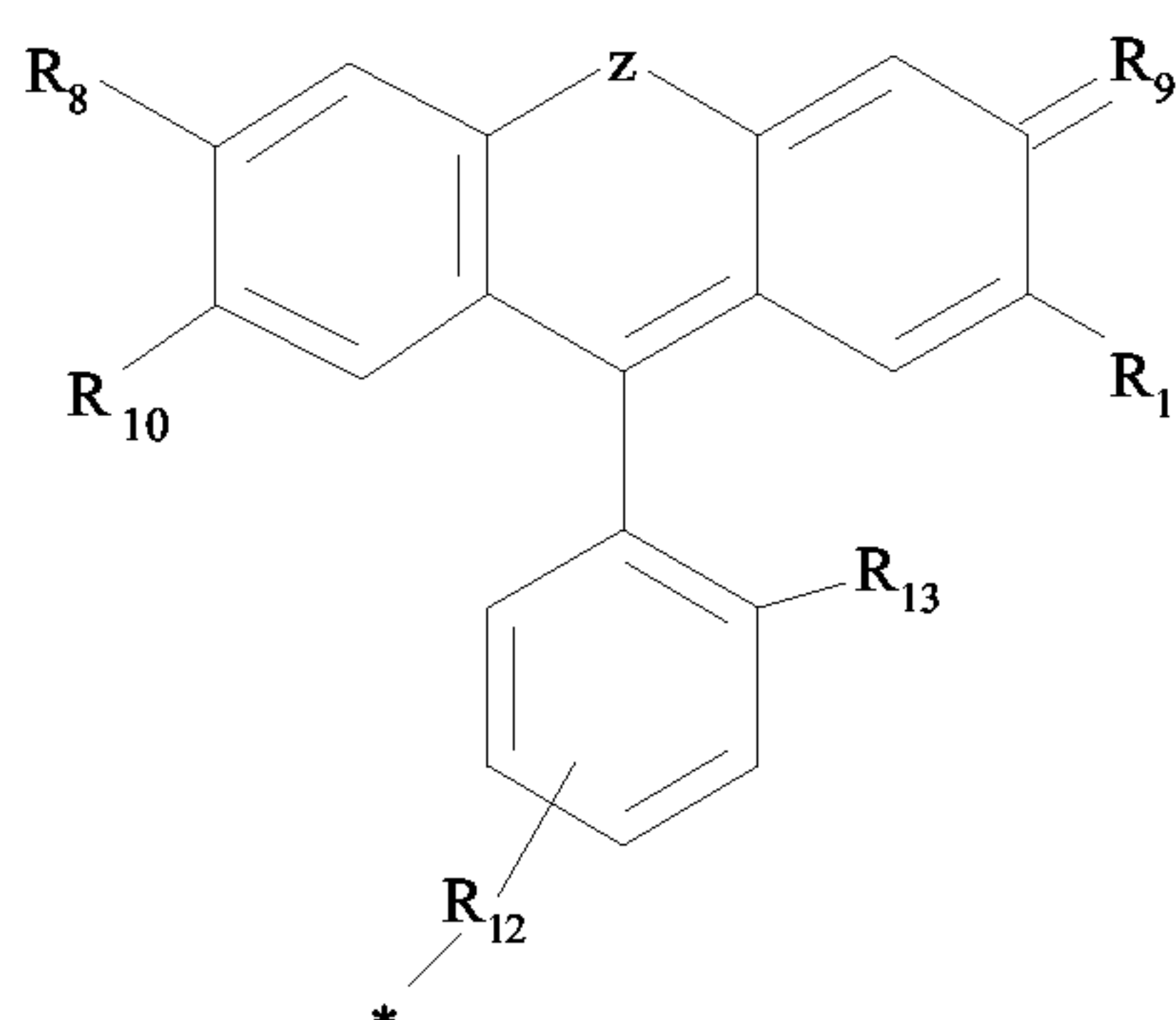
dans laquelle :

- * symbolise une liaison avec le radical acyle,
 - Y peut représenter N ou N^+R_7 , et
 - R_6 et R_7 représentent, indépendamment l'un de l'autre un atome d'hydrogène, un radical alkyle en C_1 - C_{18} , un radical alkyle en C_2 - C_{16} , un radical aryle en C_6 à C_{10} , optionnellement substitués par un ou plusieurs atomes d'halogène.

25

9. Composé selon la revendication précédente, dans lequel R_6 et R_7 représentent, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène, un radical méthyle, un radical éthyle, un radical isopropyle, un radical n-propyle, un radical benzyle, un radical phénéthyle, un radical perfluoroalkyle de formule C_nF_{2n+1} dans laquelle n peut varier de 1 à 5 10.

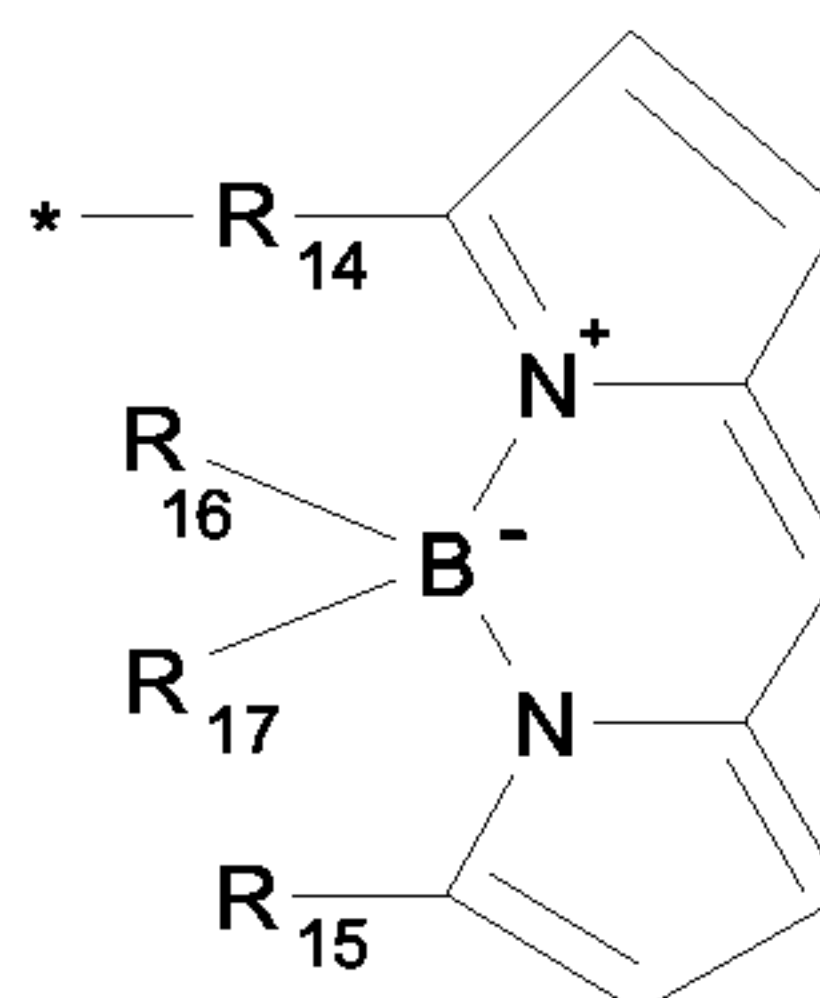
10. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel A représente un radical de formule générale (Va) :



dans laquelle :

- 10 - * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I),
- $Z = O$ ou NH ,
- $R_8 = R_9 = N(R')_2$ avec R' représentant un radical alkyle en C_1 à C_6 , en particulier C_2 à C_4 ou $R_8 = OH$ et $R_9 = O$,
- $R_{10} = R_{11} = H$ ou X , avec $X = F, Cl, Br$,
- 15 - ou, d'une part R_8 et R_{10} et/ou d'autre part R_9 et R_{11} forment respectivement un hétérocycle à 5 ou 6 chaînons, condensé avec le reste acridine ou xanthène, le cas échéant substitué par un, deux, trois groupements méthyle et dont l'hétéroatome est placé en α du reste acridine ou xanthène et est choisi parmi N ou O ,
- $R_{12} = *-NHSO_2-$ ou $*-NHCO-$, avec * symbolisant une liaison covalente
- 20 avec le reste du composé de formule (I)
- $R_{13} = H, HSO_3^-$ ou $COOH$,

ou un radical de formule générale (Vb) :



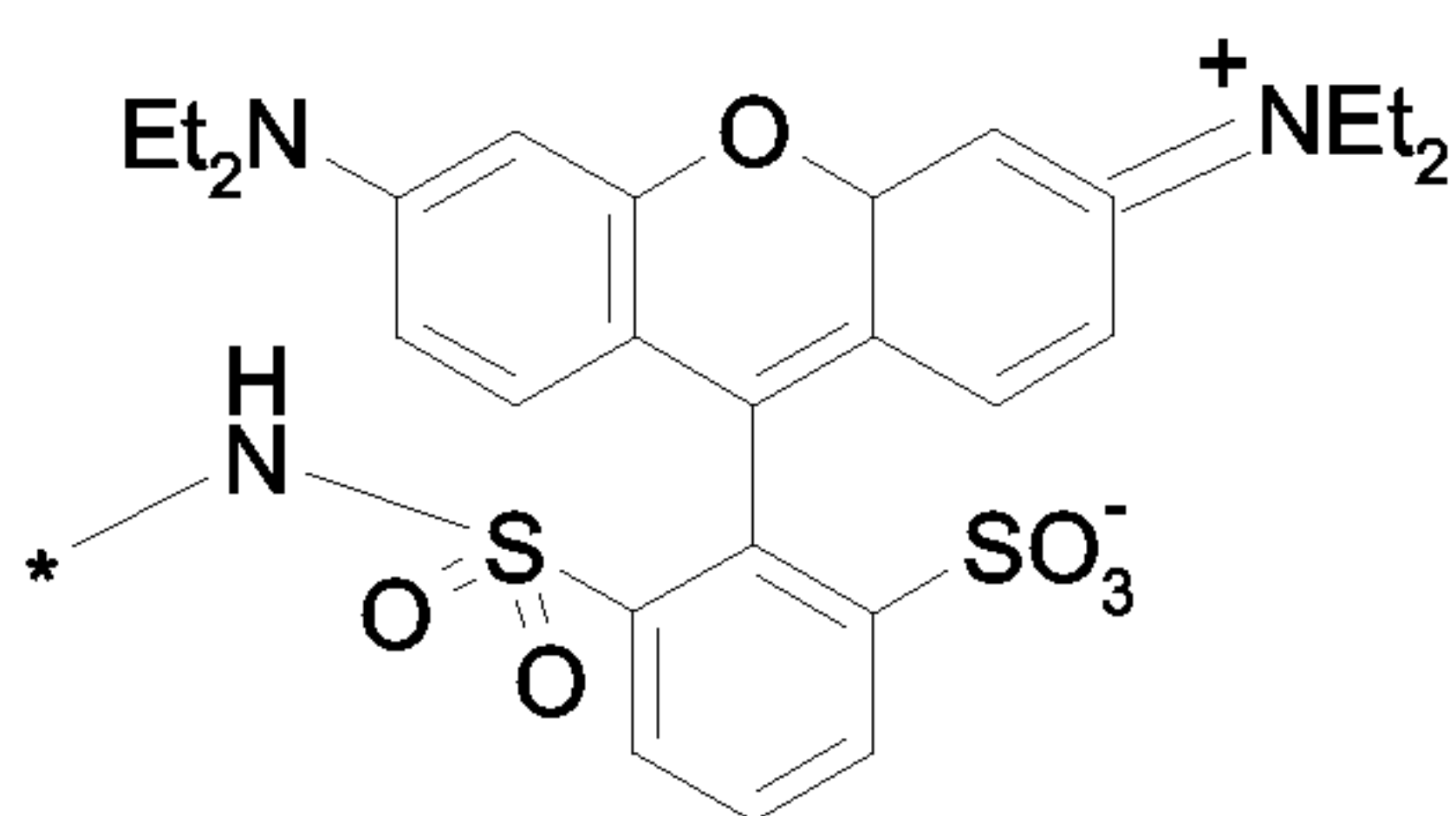
dans laquelle :

- * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule (I),
- R_{14} représente un reste acyle en C_2 à C_4 ,
- R_{15} représente un radical hétérocyclique en C_5 à C_7 , et
- $R_{16} = R_{17} = X$, avec $X = F, Cl$ ou Br .

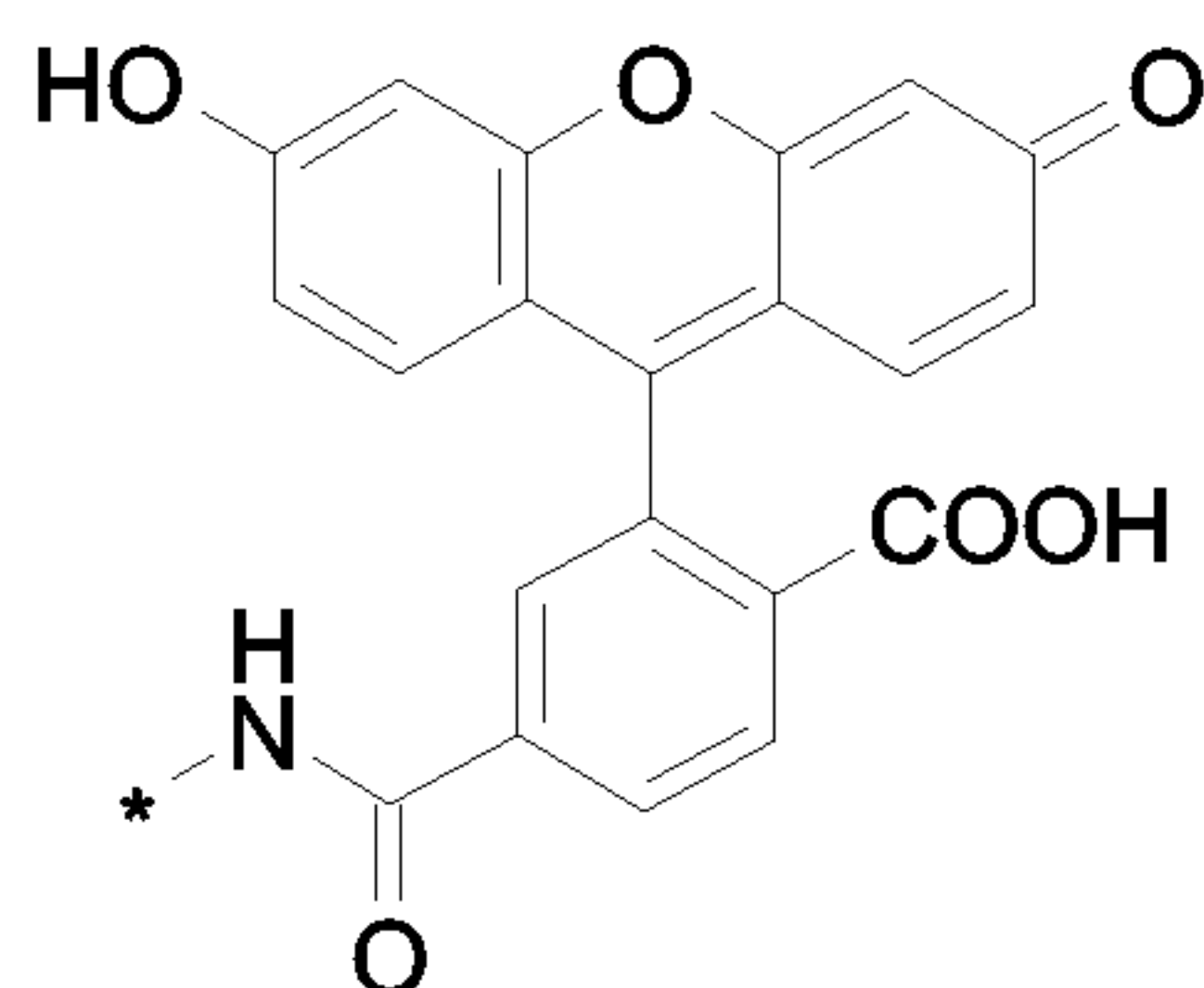
11. Composé selon la revendication précédente, dans lequel R_{12} est en position ortho.

10 12. Composé selon l'une quelconque des revendications 2 à 11, dans lequel le radical A représente un marqueur fluorescent choisi parmi le Bodipy et ses dérivés, la rhodamine et ses dérivés, le Texas Red[®] et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés, l'Alexa[®] et ses dérivés et l'Oregon Green[®] et ses dérivés.

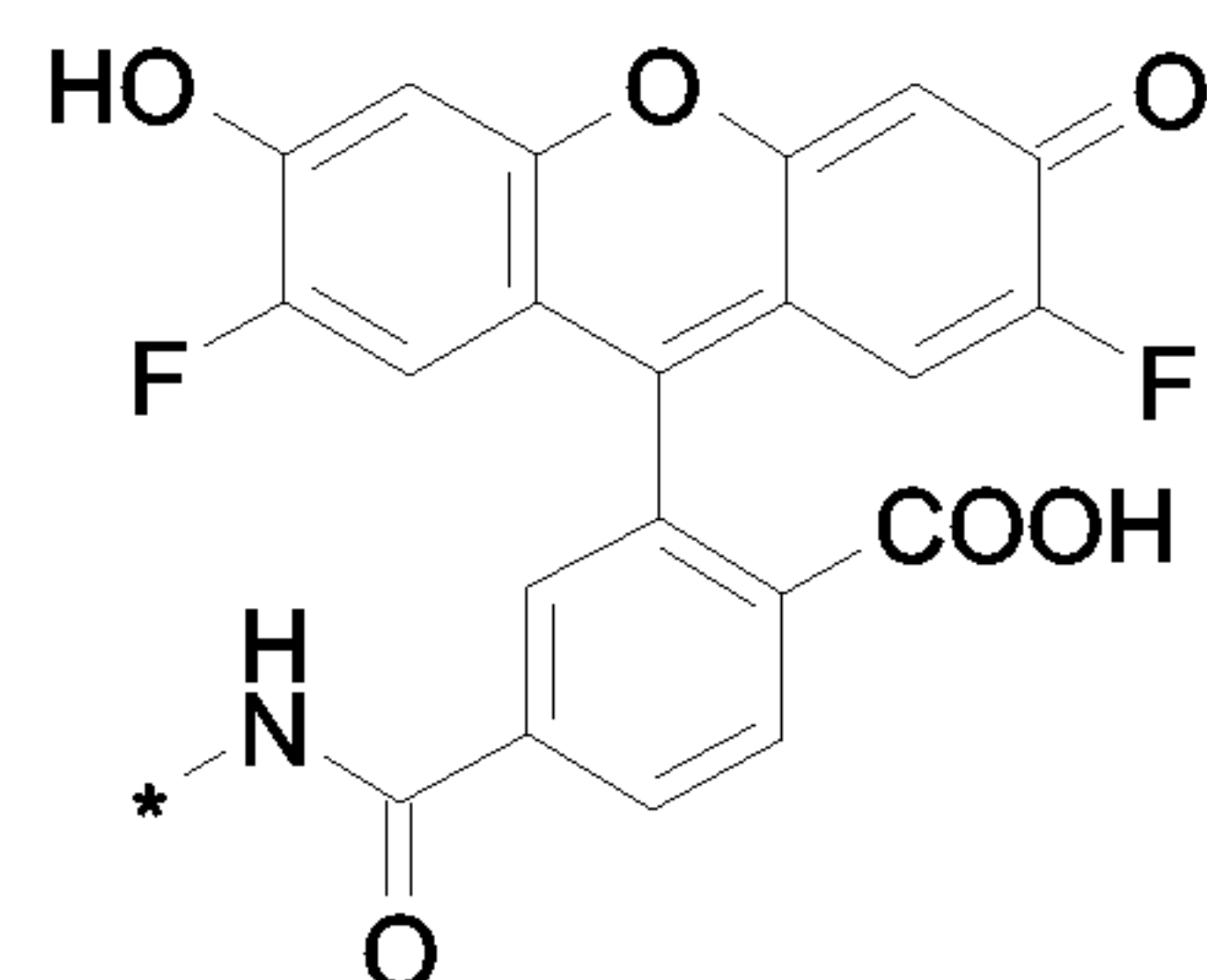
13. Composé selon la revendication précédente, dans lequel le marqueur fluorescent A est choisi parmi les marqueurs fluorescents de formules suivantes :



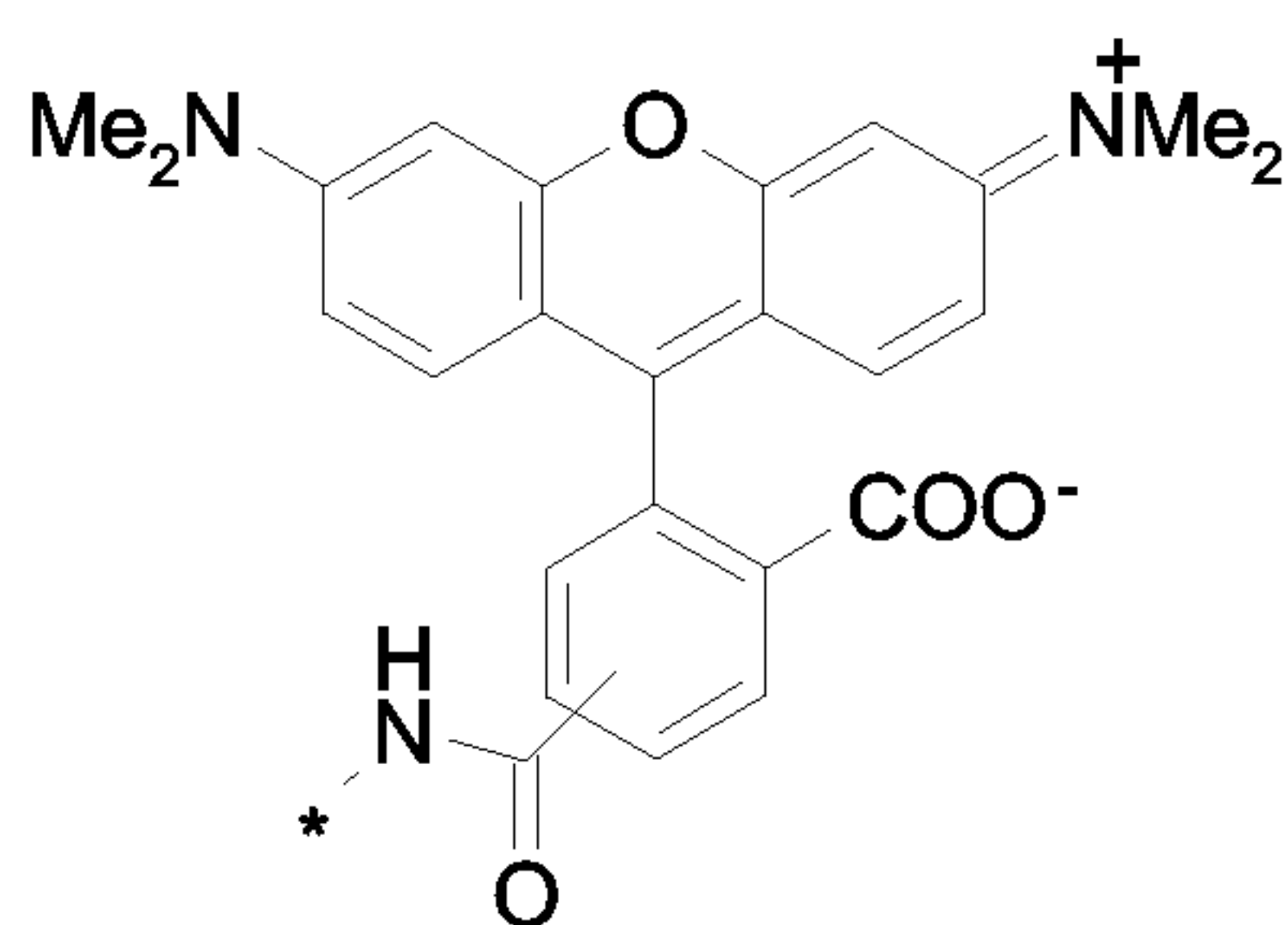
Sulfonylrhodamine (lissamine)



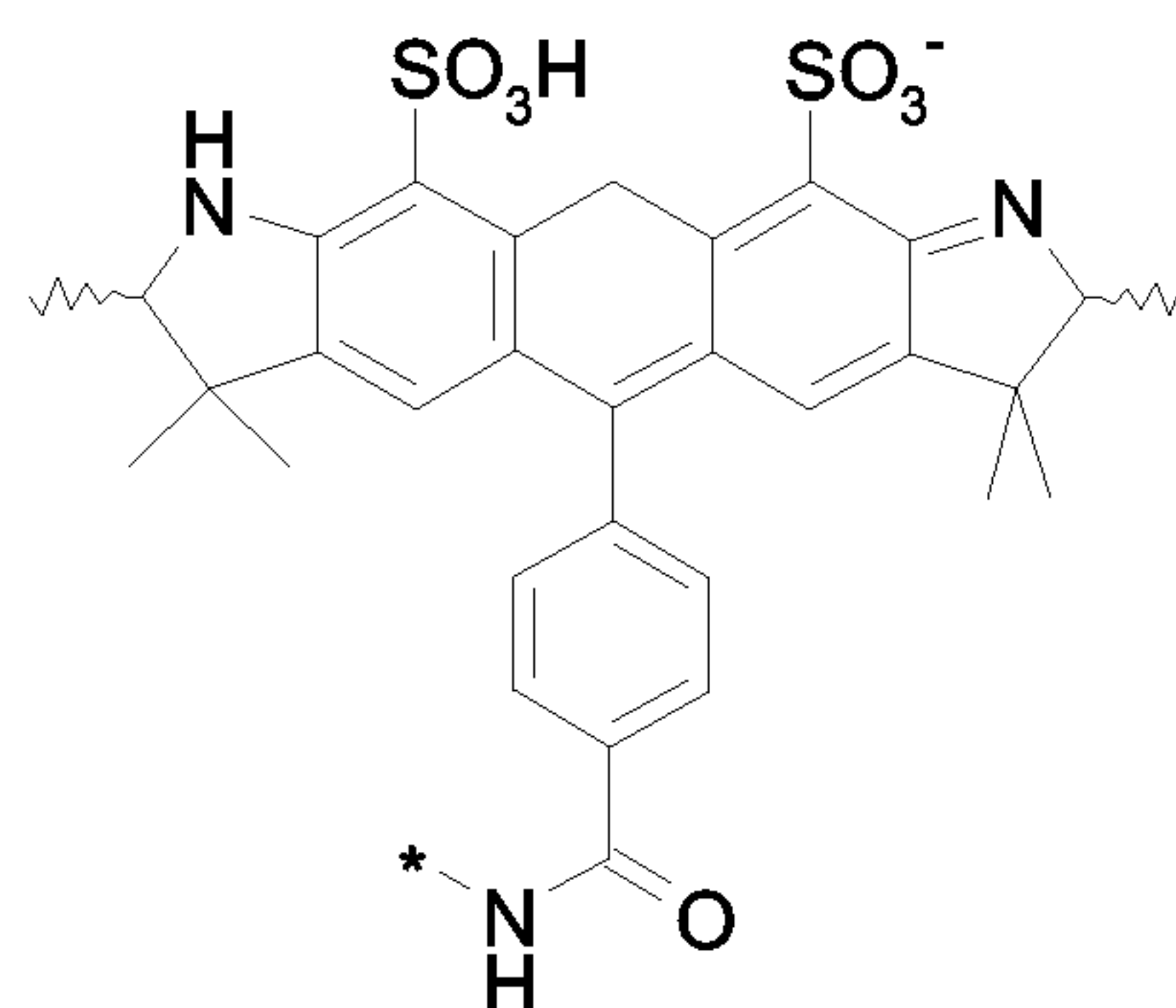
Fluoresceine



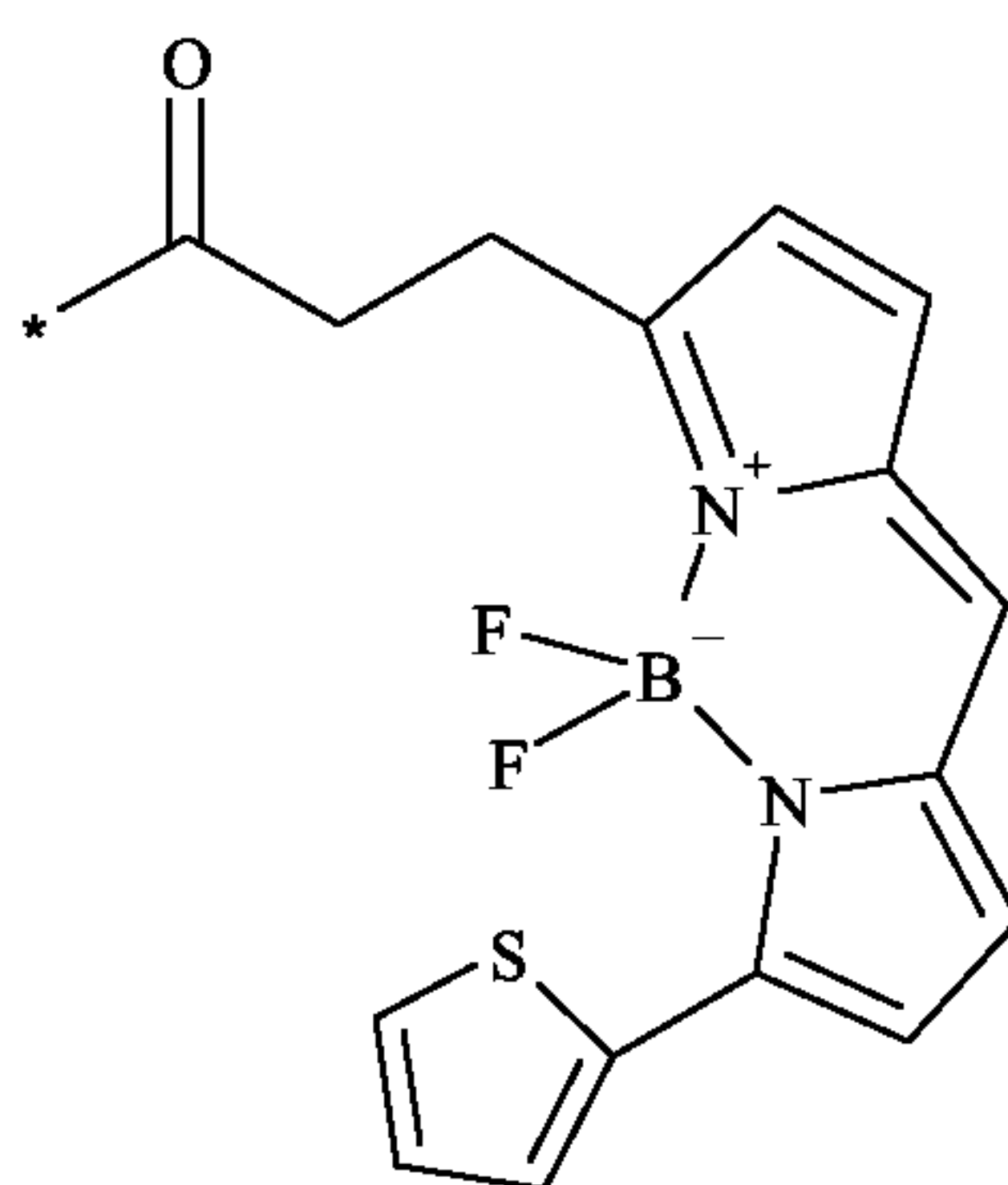
Oregon Green®



Tetraméthylrhodamine



Alexa 532®

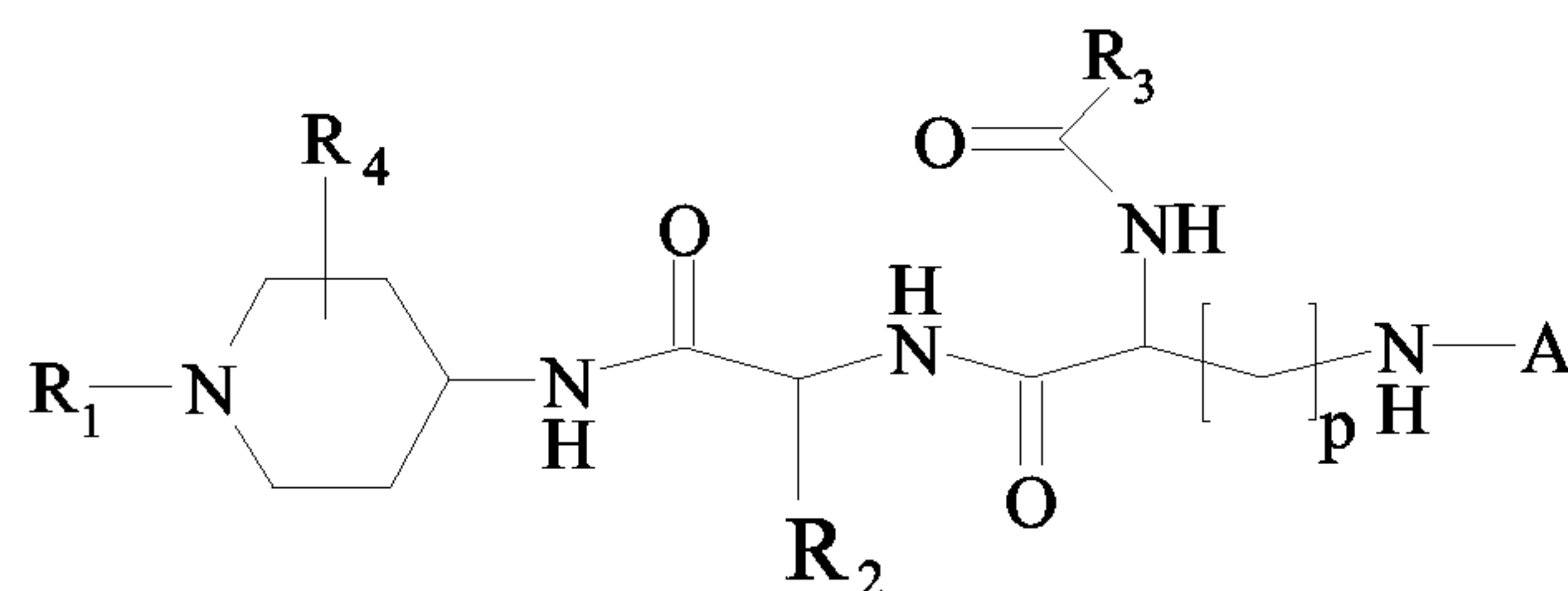


Bodipy

5 dans lesquelles * symbolise une liaison covalente avec le reste du composé de formule générale (I).

14. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel n est égal à 0.

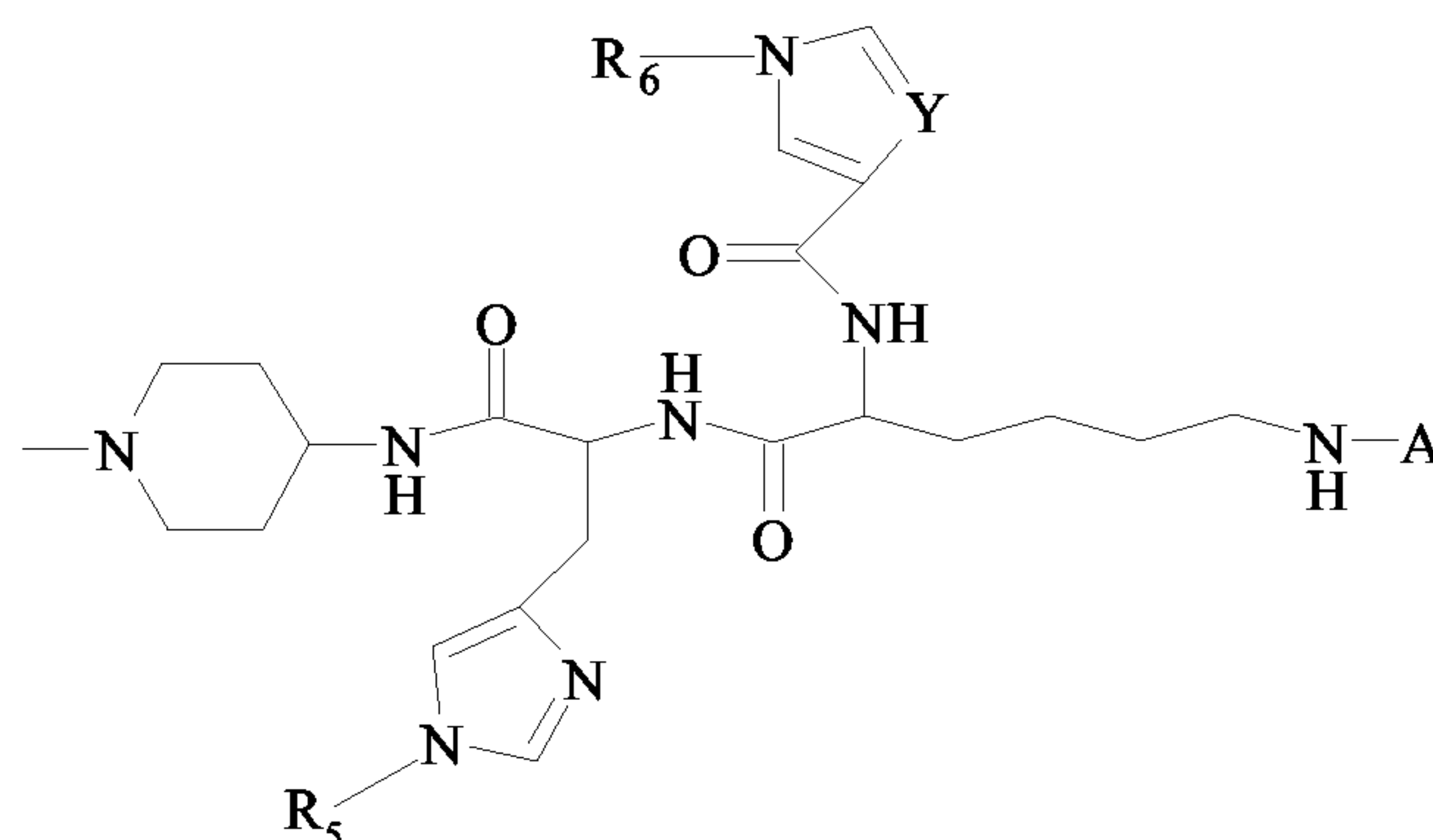
15. Composé selon la revendication précédente, représenté par la formule générale (II) suivante :



dans laquelle :

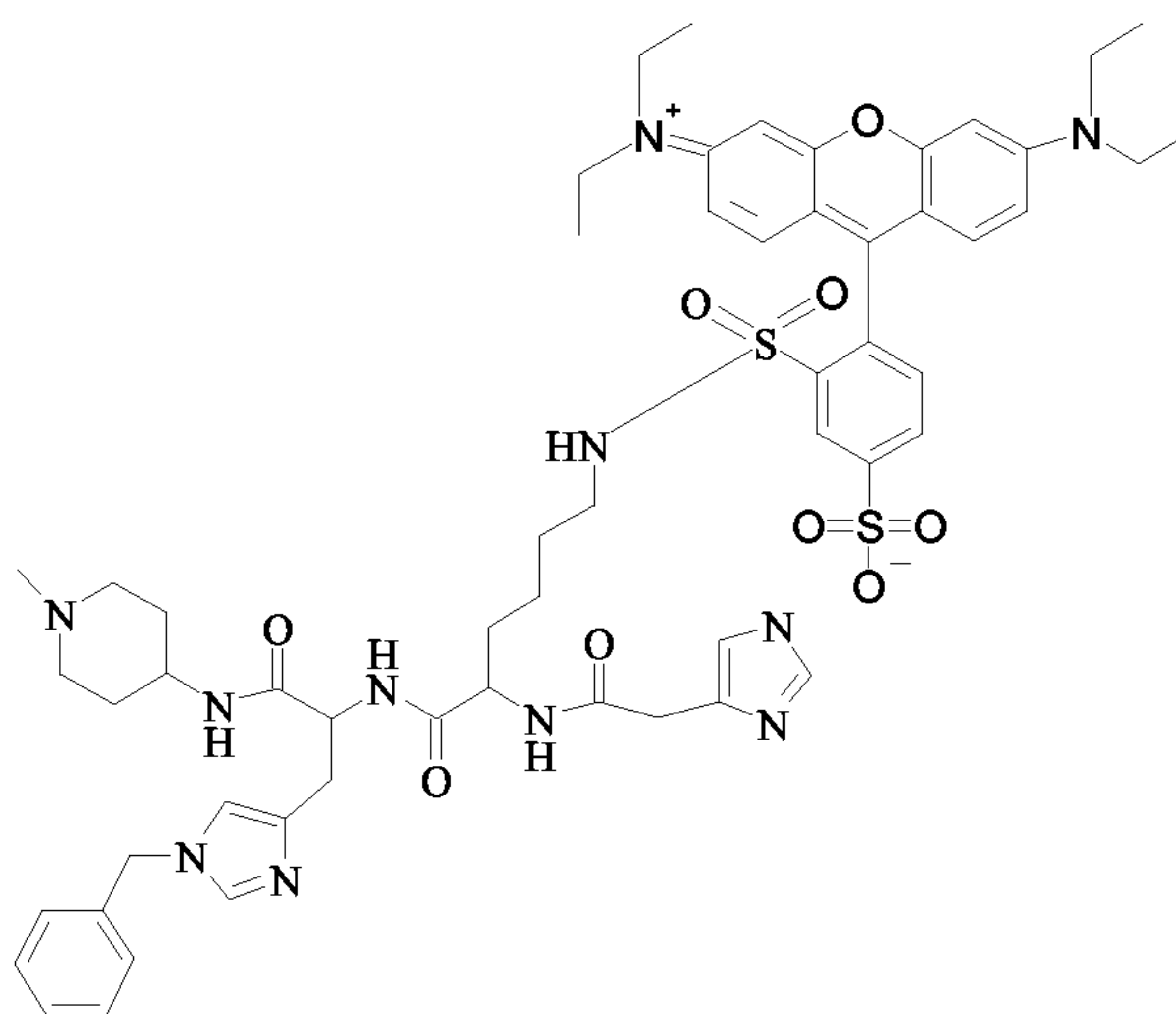
- R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , A et p sont tels que définis selon l'une des revendications 1 à 13.

5 16. Composé selon la revendication 9, représenté par la formule générale (III) suivante :



dans laquelle A , R_5 , Y et R_6 , sont tels que définis selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 6 à 13.

10 17. Composé selon la revendication précédente, représenté par la formule (IV) suivante :



18. Procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15 ou un de ses analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 liée à un support avec un composé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

5 b) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a),

c) mettre en présence l'ensemble obtenu à l'étape a) avec un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

d) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c),

10 e) comparer S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

19. Procédé de criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15 ou un de ses analogues, comprenant au moins les étapes consistant à :

15 a) mettre en présence, au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 2 à 17, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

20 b) A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

c) mesurer un premier signal S_1 caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

25 d) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un milieu présumé contenir au moins un agent à cribler dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

e) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

30 f) comparer les premier et second signaux S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle interaction de ladite protéine PEA-15 avec l'agent à cribler.

20. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel le marqueur fluorescent D est choisi parmi une protéine, telle qu'une protéine fluorescente, un marqueur fluorescent choisi parmi un dérivé de la fluorescéine, un dérivé de la rhodamine, un dérivé de l'Alexa 532[®], un dérivé du Bodipy ou un dérivé de l'Oregon Green[®].

5 21. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel la protéine fluorescente est choisie parmi la Green Fluorescent Protein, ou un de ses variants fluorescents tels que la Yellow Fluorescent Protein (YFP), la Cyan Fluorescent Protein (GFP) ou la Red Fluorescent Protein (RFP) ou le DS Red ou un de ses variants.

10 22. Procédé selon la revendication 20 ou 21, dans lequel la protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D est une protéine de fusion GFP-PEA-15.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 19 à 22, caractérisée en ce qu'il est effectué *in cellulo*.

24. Procédé selon la revendication précédente, caractérisé en ce qu'il est effectué dans des cellules exprimant une protéine de fusion GFP-PEA-15.

15 25. Procédé de diagnostic et/ou de pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15 par détection et, éventuellement, quantification de la protéine PEA-15 dans au moins un échantillon biologique présumé comprendre ladite protéine comprenant au moins les étapes consistant à :

20 a) mettre en présence au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D, ou un de ses analogues, et au moins un composé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 2 à 17, dans des conditions propices à une interaction avec ladite protéine,

25 b) A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence,

c) mesurer un premier signal S₁ caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape a) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

30 d) mettre l'ensemble obtenu à l'étape a) en présence d'un échantillon biologique présumé comprendre au moins une protéine PEA-15 dans des conditions propices à l'interaction de ladite protéine PEA-15 de l'échantillon biologique avec ledit composé selon l'invention,

e) mesurer un second signal S_2 , de même nature que S_1 , caractéristique de l'ensemble obtenu à l'étape c) par irradiation à une longueur d'onde permettant d'exciter le donneur d'énergie de fluorescence,

f) comparer S_1 et S_2 afin d'en tirer une conclusion relative à une éventuelle présence de la protéine PEA-15 dans ledit échantillon biologique, et éventuellement une conclusion relative à la quantité de ladite protéine.

26. Procédé selon la revendication précédente, dans lequel la protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D est telle que définie selon l'une quelconque des revendications 20 à 22.

27. Complexe isolé comprenant au moins une protéine PEA-15 et au moins un composé de formule telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

28. Trousse pour criblage d'un agent susceptible d'interagir avec une protéine PEA-15, ou d'un de ses analogues, ou pour le diagnostic et/ou pronostic d'un état pathologique susceptible d'impliquer PEA-15, comprenant :

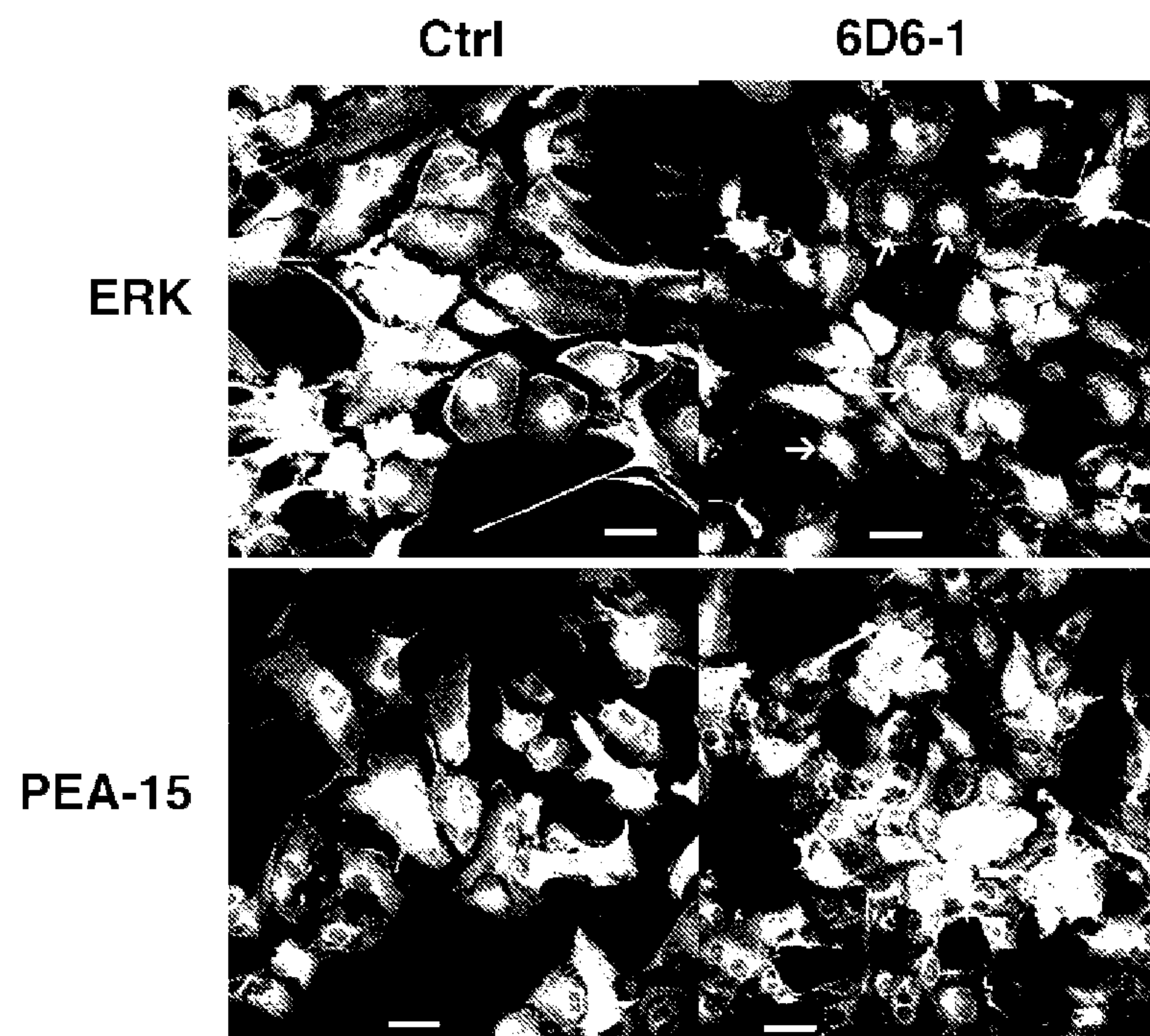
- au moins une protéine PEA-15 portant un marqueur fluorescent D ou un marqueur de purification, et
- au moins un composé de formule telle que définie selon l'une quelconque des revendications 1 à 17,

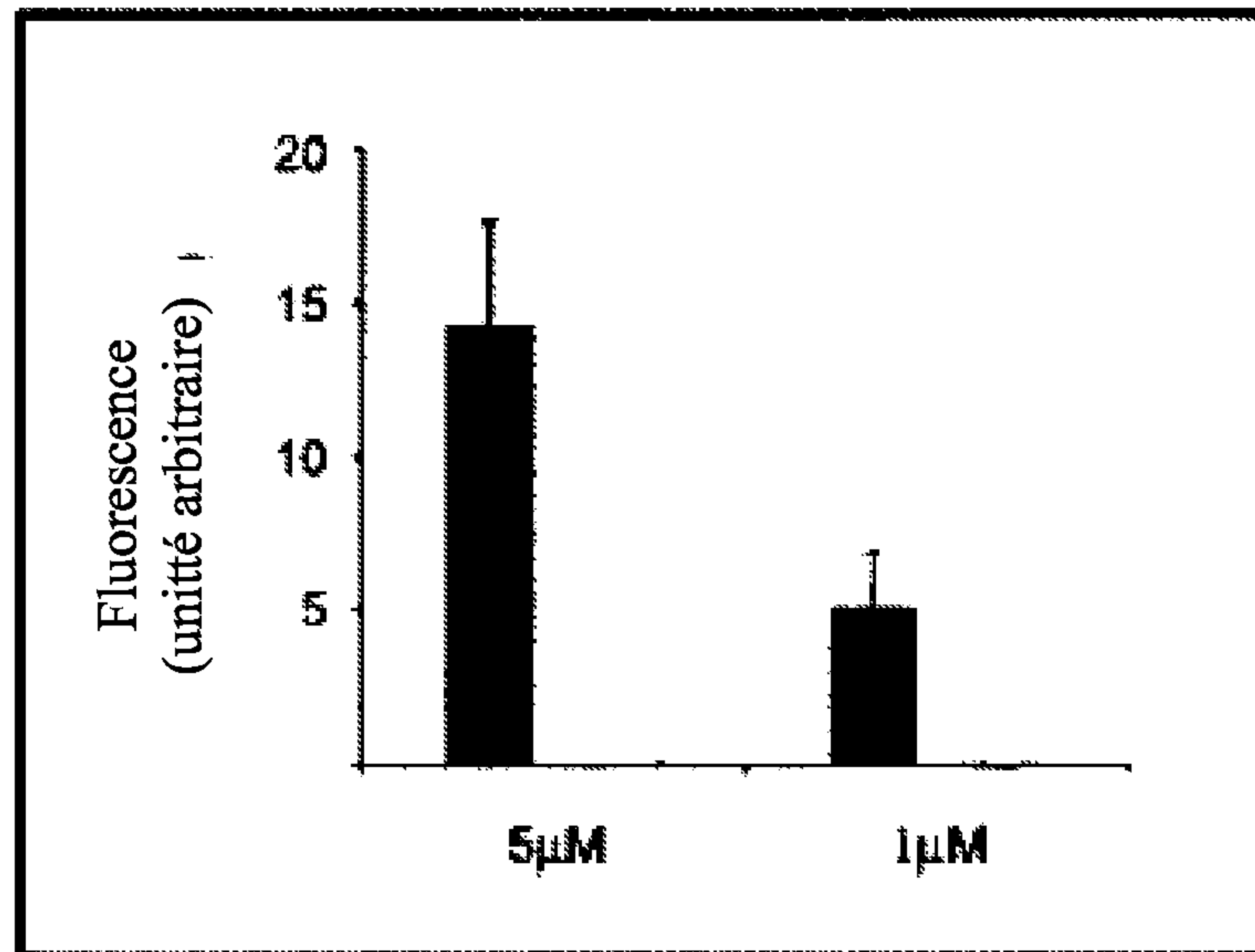
le cas échéant, A et D étant tels qu'ils définissent un couple accepteur-donneur d'énergie de fluorescence, convenant à la mise en œuvre d'un transfert d'énergie par résonance de fluorescence.

29. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 pour une utilisation à titre d'agent actif dans une composition pharmaceutique.

30. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 17.

31. Utilisation d'un composé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée au traitement d'un état pathologique impliquant PEA-15.

**FIGURE 1**

2/2**FIGURE 2**