

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 30648 B1

(51) Cl. internationale :
**C07K 14/47; G01N 33/50;
G01N 33/68**

(43) Date de publication :
03.08.2009

(21) N° Dépôt :
31641

(22) Date de Dépôt :
13.02.2009

(30) Données de Priorité :
18.08.2006 FR 06/07385

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/FR2007/001372 16.08.2007

(71) Demandeur(s) :
**LES LABORATOIRES SERVIER, 12, PLACE DE LA DEFENSE F-92415 COURBEVOIE
CEDEX (FR)**

(72) Inventeur(s) :
WANG, Hoau-Yan ; MORAIN, Philippe ; THIBIERGE, Caryn

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY (TMP AGENTS)

(54) Titre : **METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES AUX PROPRIETES ANTI-AMYLOIDE.**

(57) Abrégé : METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES AUX PROPRIETES ANTI-AMYLOIDE L'invention concerne une méthode de criblage de composés aux propriétés anti-amyloïde. La méthode de criblage de composés ayant l'aptitude de dissocier ou prévenir des complexes de forte affinité entre les peptides (beta)-amyloïde et les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de tissus de cortex humains permet d'identifier rapidement des composés destinés au traitement curatif et/ou préventif des maladies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier.

ABREGE

**METHODE DE CRIBLAGE DE COMPOSES AUX PROPRIETES
ANTI-AMYLOIDE**

L'invention concerne une méthode de criblage de composés aux propriétés anti-amyloïde.

- 5 La méthode de criblage de composés ayant l'aptitude de dissocier ou prévenir des complexes de forte affinité entre les peptides β -amyloïde et les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine de tissus de cortex humains permet d'identifier rapidement des composés destinés au traitement curatif et/ou préventif des maladies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier.

La présente invention relève du domaine médical, et intéresse en particulier les unités de recherche pharmacologique. L'invention concerne en effet une méthode de criblage de composés aux propriétés anti-amyloïde.

5 A cette fin, l'invention met en œuvre des techniques de biochimie pour l'analyse *ex vivo* de prélèvements biologiques permettant d'identifier rapidement des composés destinés au traitement curatif et/ou préventif des maladies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier.

10 Ainsi, l'invention a pour objet une méthode de criblage de composés ayant l'aptitude de dissocier des complexes de forte affinité entre le peptide β -amyloïde et le récepteur nicotinique de l'acétylcholine de tissus de cortex humains.

15 La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive qui affecte une large proportion de la population âgée. Cette maladie se caractérise sur le plan clinique par une perte de la mémoire et un déclin des fonctions cognitives. Sur le plan neuropathologique, la maladie d'Alzheimer se traduit par la présence de deux types de lésions histopathologiques cérébrales : les plaques amyloïdes et la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Une troisième caractéristique de la maladie d'Alzheimer est l'atrophie corticale correspondant à une perte neuronale prononcée.

20 L'accumulation de peptides β -amyloïde ($A\beta$) sous forme de dépôts intraneuronaux et de plaques amyloïdes ou plaques séniles autour des neurones serait à l'origine de l'étiologie de la maladie d'Alzheimer. Conjointement avec les désordres cognitifs associés et la dégénérescence neurofibrillaire, l'accumulation de dépôts amyloïdes représente la caractéristique précoce et invariable de toutes les formes de la maladie d'Alzheimer, incluant les formes familiales.

25 La dégénérescence neurofibrillaire correspond à une accumulation intraneuronale de fibrilles formées de filaments appariées en hélice ou PHF (paired helical filaments). Les PHF sont constituées par l'assemblage de protéines microtubulaires tau. La caractérisation biochimique de ces protéines révèle la présence d'un triplet majeur de protéines tau anormalement phosphorylées (tau 60, 64 et 69) et agrégées. La protéine tau normale est

phosphorylée 2 à 3 fois contre 5 à 9 fois dans la maladie d'Alzheimer et joue un rôle dans la polymérisation-dépolymérisation des microtubules du cytosquelette neuronal ainsi que dans le transport axonal.

5 L'atrophie corticale se traduit par une perte de 8 à 10% du poids du cerveau tous les dix ans chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer alors que chez des sujets sains cette perte n'est que de 2%. L'atrophie corticale s'accompagne d'une dilatation des ventricules cérébraux et des sillons corticaux, d'une réduction du volume de l'hippocampe ainsi que d'une perte neuronale affectant particulièrement le système cholinergique.

10 Les plaques amyloïdes résultent de dépôts de substance amyloïde de forme sphérique. La substance amyloïde est constituée de filaments d'un polypeptide de 39 à 43 acides aminés nommé $A\beta$ (β -amyloïde). Le peptide β -amyloïde présente une conformation en feuillet β lui conférant son caractère insoluble et sa toxicité. Le peptide β -amyloïde est un produit catabolique normal d'une glycoprotéine membranaire de grande taille appelée APP (protéine précurseur de l'amyloïde). Les plaques amyloïdes sont entourées de
15 prolongements neuritiques et de cellules gliales. Les plaques amyloïdes imprègnent le parenchyme nerveux et diffusent dans la substance grise corticale de toutes les régions cérébrales. Le cortex occipital semble plus fréquemment affecté par ces dépôts amyloïdes. La neurotoxicité du peptide β -amyloïde constitue un problème majeur de la maladie d'Alzheimer.

20 Des travaux récents montrent que les plaques amyloïdes localisées dans l'espace extracellulaire sont issues de la lyse cellulaire de neurones présentant une accumulation très importante de dépôts amyloïdes dans le compartiment lysosomal. Cette accumulation intraneuronale entraîne une dégénérescence de la cellule neuronale puis la mort cellulaire et le relargage de ces dépôts dans l'espace extracellulaire, formant peu à peu les plaques
25 amyloïdes (Nagele et al. 2002). Les plaques amyloïdes sont entourées de prolongements neuritiques et de cellules gliales et contiennent des fragments de noyaux, preuve qu'elles proviennent de neurones morts. Le récepteur nicotinique de type $\alpha 7$ joue un rôle primordial dans l'entrée du peptide $A\beta$ dans les neurones (D'Andrea et Nagele 2006).

Wang et al. ont démontré que le peptide A β se lie de manière spécifique et avec une haute affinité aux récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine ($\alpha 7$ nAChR) présents à la surface extracellulaire du neurone (Wang et al. 2000). L'interaction du peptide A β , en particulier le peptide A β_{42} , avec le récepteur $\alpha 7$ nAChR semble être une étape essentielle et préalable à l'accumulation intraneuronale des complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR, lesdits complexes à la surface des neurones faisant l'objet d'une endocytose aboutissant à leur accumulation dans le compartiment lysosomal (Nagele et al. 2002).

En outre, l'accumulation intraneuronale de ces composés A β - $\alpha 7$ provoque une phosphorylation anormale de tau (Wang et al. 2003) et des dysfonctionnements synaptiques dont une défaillance de la neurotransmission cholinergique (Roselli et al. 2005 ; Almeida et al. 2005 ; Shemer et al. 2006).

L'ensemble de ces données tendent à démontrer qu'une perturbation chronique des récepteurs $\alpha 7$ nAChR par les peptides A β , en particulier les A β_{42} , chez les individus âgés et les malades atteints de la maladie d'Alzheimer est un mécanisme central par lequel les peptides A β provoquent des dysfonctionnements neuronaux, la formation de plaques amyloïdes et la phosphorylation de protéines tau à l'origine de la neurodégénérescence fibrillaire.

En conséquence, les composés capables d'inhiber l'interaction A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR pourraient s'avérer être des agents particulièrement efficaces pour réduire la formation de plaques amyloïdes ainsi que les dysfonctionnements neuronaux.

Il apparaît donc intéressant, à la lumière de leur importance dans les pathologies neurodégénératives et liées au vieillissement, d'identifier des composés capables d'agir sur le complexe A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR à l'origine de la formation de plaques amyloïdes.

L'identification de ces composés peut être effectuée par différentes méthodes, lesquelles se révèlent plus ou moins adaptées et efficaces en fonction des cas. Elles sont parfois insuffisantes à elles seules, ne sont alors utiles que combinées, et présentent, en tout état de cause, un certain nombre d'avantages et d'inconvénients sommairement rappelés ci-après et qui seront discutés sur la base de deux critères de validité des modèles animaux : la validité de construction basée sur la similitude des conditions inductrices de la pathologie

et des mécanismes neurobiologiques sous-jacents, la validité descriptive basée sur la similitude des états comportementaux induits.

Une première méthode consiste en une injection de peptides β -amyloïdes dans des cerveaux de souris, réalisée à l'aide d'une canule en position intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v). Cette méthode (Yamada et al. 2005 ; Mazzola et al. 2003) permet d'obtenir des souris présentant un déficit de mémoire après 7 jours d'apport exogène de peptides β -amyloïdes. Ce modèle murin est obtenu rapidement et peut être utilisé pour tester de nouveaux produits pressentis dans le traitement des pathologies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier. Cette méthode est basée sur un modèle ne représentant pas exactement la pathophysiologie de la maladie d'Alzheimer. En effet, cette méthode d'identification de composés agissant sur le complexe $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR n'a pas de validité apparente puisque la pathologie tau du vieillissement cérébral ne se développe pas dans ce modèle murin. En outre, le présent modèle murin ne respecte pas une validité de construction compte-tenu que, d'une part les peptides β -amyloïdes sont d'origine exogènes et non produits de manière naturelle par l'animal et d'autre part le modèle est animal et non humain. Enfin, l'injection de peptides β -amyloïdes exogènes dans des cerveaux de souris exige de travailler *in vivo* ce qui écarte cette méthode d'un usage en routine pour le criblage et l'identification de composés anti-Alzheimer.

Plusieurs autres méthodes d'identification de composés utilisent des souris transgéniques comme modèle de maladie d'Alzheimer, portant des mutations présentes dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, sur les gènes APP et/ou PS1 (préséniline-1). Ces modèles présentent donc une validité de construction indéniable pour les formes familiales mais très discutable pour les formes sporadiques qui représentent plus de 97% des cas.

Un premier type de souris transgénique ne comporte qu'une mutation sur l'APP (Hsiao et al. 1996) ou une double mutation sur APP et PS1 (Holcomb et al. 1998). La validité descriptive des modèles transgéniques décrits supra n'est pas complète puisqu'ils ne reproduisent pas de manière fiable les caractéristiques physiopathologiques liées à la maladie d'Alzheimer. En effet, on observe d'une part une absence de dégénérescence neurofibrillaire, d'autre part peu ou pas de perte neuronale ainsi qu'une apparition tardive

des plaques séniles dans le cortex des souris simple ou double transgéniques. En conséquence, l'utilisation de modèles de souris simple ou double transgéniques n'est pas recommandée compte-tenu des différences physiologiques existant avec la maladie d'Alzheimer et du délai auquel apparaissent les lésions liées à cette pathologie.

5 L'utilisation d'un modèle transgénique de souris comprenant trois gènes mutés (APP, PS1 et tau) (LaFerla et al. 2003) présente également des désavantages. La validité de construction de ce modèle est discutable puisqu'une mutation dans le gène tau, non présente chez l'homme atteint de maladie d'Alzheimer, est ajoutée par rapport aux modèles précédents. Cependant, la validité descriptive de ce modèle est bonne puisqu'il
10 mime bien les lésions physiologiques de la maladie d'Alzheimer qui consistent en des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et de la perte neuronale. Cependant, cette méthode nécessite un délai de 6 mois à 12 mois avant d'obtenir des souris présentant les lésions typiques de la maladie d'Alzheimer. En conséquence, ce modèle de souris transgéniques peut valablement être utilisé dans une méthode de confirmation des
15 propriétés anti-amyloïde d'un composé testé mais ne peut raisonnablement pas être utilisé en première intention pour le criblage de composés compte-tenu de la durée et de la difficulté de mise en œuvre dudit modèle.

Une troisième méthode (Wang et al. 2000) consiste à tester la capacité de composés à empêcher la formation de complexes entre peptides A β apportés de manière exogène et α 7
20 présent dans des tissus de rat (synaptosomes d'hippocampe et de cortex de rat). Cette méthode *in vitro* est plus rapidement mise en œuvre que les méthodes décrites supra, toutefois elle a l'inconvénient de ne pas être représentative des complexes présents chez l'homme puisque ce sont des extraits de cerveaux de rat et que les peptides A β sont apportés manière exogène. En conséquence, ce modèle ne respecte ni les conditions de
25 validité de construction ni celles de validité descriptive requises pour l'utilisation de ce dernier dans une méthode de criblage de composés capables d'agir sur le complexe A β ₄₂- α 7 nAChR à l'origine de la formation de plaques amyloïdes.

La présente invention a donc pour but de proposer une stratégie alternative aux méthodes d'identification de composés susceptibles d'agir sur les complexes β -amyloïde- α 7 nAChR,

en vue de remédier au moins en partie, aux inconvénients déjà connus des méthodes de sélection desdits composés. L'invention propose donc à ce titre une méthode de criblage *ex vivo* recréant les conditions physiologiques présentes chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces conditions optimales sont obtenues en utilisant des cerveaux humains en particulier des cortex frontaux issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ce modèle remplit par définition les critères de validité de construction et de validité descriptive puisqu'il s'agit d'une utilisation directe du tissu humain malade.

Les conditions *ex vivo* de la méthode de criblage selon l'invention permettent de lever les contraintes liées à la réalisation et à la manipulation de modèles animaux.

De plus, l'utilisation de matériels biologiques humains permet de s'affranchir de tous les artéfacts et erreurs liés aux différences physiologiques existantes entre les espèces animales et humaine. L'utilisation de matériels biologiques humains dans le cadre de la méthode de criblage selon l'invention est particulièrement importante compte-tenu du fait que la maladie d'Alzheimer et les pathologies neurodégénératives en général n'existent pas de manière naturelle chez des espèces autre que l'espèce humaine.

L'invention concerne donc une méthode de criblage de composés capables de dissocier ou de prévenir les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine issus de cerveaux humains.

De manière préférée, l'invention porte sur une méthode de criblage de composés capables de dissocier ou prévenir les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine issus de cerveaux humains.

La méthode de criblage selon l'invention permet donc d'identifier des composés aux propriétés curative ou préventive en fonction que ces composés sont respectivement capables de dissocier ou de prévenir les complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR.

Par propriété « anti-amyloïde » ou « anti-bêta amyloïde » on entend la capacité pour un composé à dissocier ou à s'opposer à la formation de dépôts intracellulaires ou extracellulaires de peptides β -amyloïde que ce soit par dissociation ou par inhibition de la formation des complexes que forment les peptides $A\beta$ avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine.

Dans le contexte de l'invention le récepteur nicotinique alpha 7 de l'acétylcholine ($\alpha 7$ nAChR) désigne un récepteur cellulaire de surface pentamérique, exprimé principalement dans le cortex et l'hippocampe, et possédant un rôle important dans l'apprentissage et la mémoire.

5 Dans le contexte de l'invention les expressions « β -amyloïde », « $A\beta$ » et « peptide β -amyloïde » concernent l'ensemble des peptides β -amyloïdes dont les peptides $A\beta_{1-39}$ ou $A\beta_{39}$, $A\beta_{1-40}$ ou $A\beta_{40}$, $A\beta_{1-41}$ ou $A\beta_{41}$, $A\beta_{1-42}$ ou $A\beta_{42}$, $A\beta_{1-43}$ ou $A\beta_{43}$ et leurs fragments (Glenner et al. 1984). Les fragments des peptides β -amyloïde supra ont une activité biologique et sont utilisables dans la méthode de criblage selon la présente invention.

10 Lesdits fragments sont par exemple des fragments $A\beta_{1-28}$ et $A\beta_{25-35}$.

Les peptides β -amyloïde utilisés dans le cadre de l'invention sont en particulier les peptides $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ et/ou $A\beta_{43}$. Le peptide $A\beta_{42}$ présente la plus forte affinité vis à vis des récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine et a le rôle le plus important dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

15 La présente méthode de criblage est réalisée à partir d'échantillons de cerveaux humains et de préférence à partir de cortex et d'hippocampe humains. Ces échantillons sont prélevés post-mortem sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

L'invention porte, de manière préférée, sur une méthode de criblage caractérisée en ce que la dissociation des complexes de peptides β -amyloïde et de récepteurs nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine est mise en évidence par immunohistochimie.

20 Dans le cadre de l'invention, le terme « immunohistochimie » concerne l'ensemble des techniques de révélations des antigènes par des anticorps pour détecter ou isoler des molécules définies.

25 De préférence, la méthode de criblage comprend les étapes suivantes d'incubation des complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine en présence ou en l'absence d'un composé à tester, puis de détermination de la quantité de complexes non dissociés en présence ou en l'absence de composé à tester et l'évaluation de

la différence de quantité de complexes non dissociés, ladite différence indiquant que le composé testé module la dissociation des complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine.

5 Préférentiellement, la méthode de criblage selon l'invention comprend également une étape d'isolement des complexes non dissociés de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine à l'aide d'anticorps anti-peptide β -amyloïde.

De façon préférée, les anticorps anti-peptide β -amyloïde utilisés dans la méthode de criblage sont dirigés contre les peptides β -amyloïde $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ et/ou $A\beta_{43}$. Ces anticorps peuvent être des anticorps monoclonaux de souris ou de chèvre.

10 De manière encore préférée, la présente méthode de criblage se caractérise par la révélation, en particulier par méthode Western-blot, des complexes non dissociés à l'aide d'anticorps anti-récepteurs à l'acétylcholine nicotiniques, en particulier d'anticorps anti-récepteurs nicotiniques $\alpha 7$ de l'acétylcholine.

15 Avantagement, la méthode de criblage selon l'invention a mis en évidence le composé S 24795, i.e. chlorure ou iodure de 1-(4-bromophényl)-2-(1-méthyl-2 pyridiniumyl)-1-éthanone, comme composé capable d'une part d'inhiber la formation de complexes β -amyloïde- $\alpha 7$ nAChR et d'autre part de dissocier lesdits complexes β -amyloïde- $\alpha 7$ nAChR accumulés en plaques amyloïdes autour du neurone et en dépôt à l'intérieur du neurone. Le composé S 24795, identifié par la méthode de criblage de la présente invention, est donc
20 un composé capable de dissocier les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine présents dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ainsi que d'inhiber la formation desdits complexes.

L'invention vise également chaque composé identifié à partir de la méthode de criblage selon l'invention.

L'invention porte également sur une composition pharmaceutique comprenant le composé obtenu à partir de la méthode de criblage selon l'invention en tant que principe actif en combinaison avec un ou plusieurs excipient(s) pharmaceutiquement acceptables.

5 Par « principe actif », on entend toute substance responsable des propriétés pharmacodynamiques ou thérapeutiques de la composition pharmaceutique. Dans le contexte de l'invention, on entend par « excipients » toute substance à laquelle on incorpore le principe actif d'un médicament afin d'en faciliter la préparation ainsi que l'administration et d'en conditionner la consistance, la forme ainsi que le volume.

10 Parmi les excipients, non toxiques, pharmaceutiquement acceptables on peut citer à titre indicatif et non limitatif les diluants, les solvants, les conservateurs, les agents mouillants, les émulsifiants, les agents dispersants, les liants, les agents gonflants, les agents désintégrants, les retardants, les lubrifiants, les absorbants, les agents de suspension, les colorants ou les aromatisants.

15 De plus, les compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et/ou au traitement des pathologies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier sont sous une forme convenant à l'administration orale, parentérale, nasale, per ou transcutanée, rectale, perlinguale, oculaire ou respiratoire et notamment les comprimés simples ou dragéifiés, les comprimés sublinguaux, les sachets, les paquets, les gélules, les glossettes, les tablettes, les suppositoires, les crèmes, les pommades, les gels dermiques, et les
20 ampoules buvables ou injectables.

La présente invention porte, en outre, sur l'utilisation de composés identifiés à partir de la méthode de criblage selon l'invention pour l'obtention de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et/ou au traitement de maladies neurodégénératives.

25 Les composés identifiés par la méthode de criblage selon l'invention sont utilisés dans le traitement des « pathologies neurodégénératives » telles que par exemple la maladie d'Alzheimer, la maladie de Pick, la démence à corps de Lewy, le syndrome de Steel-Ridchardson, le syndrome de Down, le syndrome de Shy-Drager, la sclérose latérale amyotrophique, l'ataxie neurodégénérative, la maladie de Huntigton, la maladie de Parkinson, l'aphasie primaire progressive, la maladie de Machado-Joseph, la maladie de

Gilles de La Tourette, le dusarthrie paralytique, la maladie de Kennedy, la paralysie spasmodique familiale, la maladie de Werdnig-Hoffmann, la maladie de Kugelberg-Welander, la maladie de Tay-Sach, la maladie de Sandhoff, la maladie de Wohlfart-Kugelberg-Welander, la paraparésie spastique, la leucoencéphalite multifocale progressive et les maladies liées au prion dont Creutzfeldt-Jakob ou la maladie de Gerstmann-Sträussler Scheinker.

Le terme « préventif » selon l'invention correspond à un traitement à visée préventive ayant pour objectif de diminuer le risque de développer la maladie d'Alzheimer en inhibant la fixation des peptides β -amyloïde sur les récepteurs cellulaires nicotiques $\alpha 7$ de l'acétylcholine. Cette inhibition limite la formation de complexes β -amyloïde- $\alpha 7$ nAChR à l'origine des plaques amyloïdes, lésion présente dans la maladie d'Alzheimer. En outre, le terme « préventif » peut s'entendre comme la prévention secondaire qui est destinée à diminuer la prévalence en réduisant l'évolution et la durée de la maladie.

On entend par « traitement », un traitement à visée curative prescrit aux fins de soigner les patients atteints de la maladie d'Alzheimer en dissociant les complexes β -amyloïde- $\alpha 7$ nAChR présents dans les cerveaux humains et constituant les plaques séniles.

Plus particulièrement, l'utilisation de composés issus de la méthode de criblage selon l'invention pour l'obtention de compositions pharmaceutiques est destinée à la prévention et/ou au traitement de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

On entend par « maladie d'Alzheimer » une maladie neurodégénérative fatale affectant la mémoire et le fonctionnement mental avec notamment l'altération du langage, la perturbation des gestes élaborés, des troubles d'orientation dans le temps et dans l'espace. Ces troubles cognitifs sont liés à deux lésions neuropathologiques caractéristiques les plaques séniles et la dégénérescence neurofibrillaire qui permettent son diagnostic définitif post-mortem.

La présente invention est illustrée par, sans pour autant se limiter aux figures suivantes :

- Figure 1 : Western-blot illustrant l'inhibition par le S 24795 des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR provenant de synaptosomes de cortex frontal de patients atteints de la

maladie d'Alzheimer ou de sujets témoins post-mortem. Les complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR sont incubés en milieu seul (Kreb's-Ringer) ou en présence de S 24795 (30 μ M) pendant 10 minutes suivie d'une incubation en présence de peptide $A\beta_{42}$ pendant 30 minutes.

- 5 - Figure 2 : Quantification de l'inhibition de la formation de complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR dans des synaptosomes de cortex frontal humains provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets contrôles post-mortem, incubés ou non avec S 24795 (30 μ M) puis avec des peptides $A\beta_{42}$ (100nM). * : $p < 0.01$ pour contrôles et patients atteints de la maladie d'Alzheimer, test de Newman-Keuls pour les comparaisons multiples.
- 10 - Figure 3 : Western-blot illustrant la dissociation par le S 24795 des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR provenant de synaptosomes de cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de sujets témoins post-mortem. Les complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR sont incubés en milieu seul (Kreb's-Ringer) ou en présence de S 24795 (1, 10, 30 ou 100 μ M) pendant 10 minutes puis en présence ou en l'absence d' $A\beta_{42}$ (100nM).
- 15 - Figure 4 : Quantification de la dissociation de l'interaction des récepteurs $\alpha 7$ nAChR associés à $A\beta_{42}$ dans des synaptosomes de cortex frontal humains provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets témoins post-mortem, incubés avec du S 24795 (de 1 à 100 μ M) puis en présence ou en l'absence d' $A\beta_{42}$ (100nM). * : $p < 0.01$ pour contrôles et patients atteints de la maladie d'Alzheimer, test de Newman-Keuls pour comparaisons multiples.
- 20 - Figure 5 : Quantification de l'entrée de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ dans des synaptosomes de cortex frontal humain provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets témoins post-mortem traités par S 24795. Les tranches de cerveaux contrôles sont incubées ou non en présence d' $A\beta_{42}$ (1 μ M) préalablement au traitement au S 24795 (10 μ M). Les entrées de calcium sont induites soit par l'agoniste $\alpha 7$ (PNU282987) soit par du NMDA ajouté à de la glycine.
- 25

I. Matériels et Méthodes

I.1) Patients

Des cortex frontaux humains post mortem issus de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets sains témoins sont issus de banques de cerveaux (Harvard Brain Tissue Resource Center et Analytical Biological Services).

Les patients et témoins inclus dans l'étude étaient des personnes âgées entre 50 et 90 ans. Les témoins sont des personnes n'ayant pas présentés au cours de leur vie de troubles cognitifs ni de signes manifestes de perte de mémoire.

En outre, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer ont été divisés en deux sous-groupes présentant ou non des pathologies vasculaires associées. Seuls les cerveaux de patients sans pathologie associée ont été utilisés dans le cadre de la présente étude.

Notons que le diagnostic de la maladie d'Alzheimer a été confirmé par la méthode immunohistochimique du National Institute on Aging et du Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neurological Assessment chez les patients qui présentaient les symptômes cliniques de la maladie d'Alzheimer.

I.2) Préparation des cortex

Afin d'éviter tout artefact post-mortem, les cortex prélevés dans le cadre de l'étude proviennent de personnes décédées dans les 15 heures précédant ledit prélèvement.

Les cortex prélevés sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation dans la méthode de criblage selon l'invention.

I.3) Conservation des cortex

Après prélèvement, les cortex sont cryoprotégés pendant 2 semaines, dans du tampon phosphate de sodium 0.2M (NaH_2PO_4 , $2\text{H}_2\text{O}/\text{NaH}_2\text{PO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$, pH 7.4) contenant du saccharose à 20% (P/V). Ils sont ensuite congelés pendant 1 minute dans de l'isopentane maintenu à une température de -30°C dans de la carboglace. Des coupes de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur, réalisées dans un cryostat thermostaté à -30°C (Super Frost Plus Fisher) sont finalement placées dans un tampon PBS 0.02M puis conservées à 4°C .

I.4) Préparation de synaptosomes

100mg de cortex frontal post-mortem broyé dans la glace est homogénéisé dans 10 volumes de HEPES à 10mM et pH 7.4 maintenu dans la glace et oxygéné en présence de 0.32mM de sucrose et 0.1mM d'EDTA puis est mélangé dans un broyeur à tissu
5 Teflon/verre à 4°C dans une solution d'homogénéisation contenant 25mM de HEPES à pH 7.5, 1mM de EDTA, 50µg/ml de leupeptine, 10µg/ml d'aprotinine, 2µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, 0.04mM de PMSF, un mélange de protéines inhibitrices de la phosphatase et 0.2% de 2-mercaptométhanol.

Dans un premier temps, l'homogénat est centrifugé à 1000g et 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant issu de cette première centrifugation est dans un deuxième temps centrifugé à
10 15000g pendant 30 minutes afin d'obtenir un culot de synaptosomes.

Le culot de synaptosomes est lavé deux fois par suspension dans 10ml d'une solution de Krebs-Ringer maintenue dans la glace comprenant 25mM HEPES à pH 7.4, 118mM de NaCl, 4.8mM de KCl, 25mM de NaHCO₃, 1.3mM de CaCl₂, 1.2mM de MgSO₄, 1.2mM
15 KH₂PO₄, 10mM de glucose, 100µM d'acide ascorbique, 50µg/ml de leupeptine, 10µg/ml d'aprotinine, 2µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, 0.04mM PMSF et un mélange de protéines inhibitrices de la phosphatase, aéré pendant 10 minutes avec 95% O₂/5% CO₂ puis centrifugé de nouveau à 15000g pendant 10 minutes à 4°C. Les synaptosomes lavés sont ensuite suspendus dans 1ml de solution de Krebs-Ringer oxygénée et la concentration
20 en protéines de ladite suspension de synaptosomes est déterminée par la méthode de Bradford.

I.5) Immunoprécipitation

Les synaptosomes de cortex humains sont incubés dans une solution oxygénée de Krebs-Ringer en présence du composé S 24795 à 37°C pendant 30 minutes dans un volume total
25 d'incubation de 500µl. Le composé S 24795 est présent dans le milieu de réaction aux concentrations de 1µM, 10µM, 30µM ou 100µM. Selon les expériences réalisées, les synaptosomes sont également incubés en présence de 100nM d'Aβ₄₂ ou en présence de véhicule. La réaction est stoppée en diluant dans 1.5ml d'une solution d'EDTA à 1mM maintenue dans la glace - ion calcium Ca²⁺ - sans solution de Krebs-Ringer puis en
30 centrifugeant pendant 10 minutes à 15000g et 4°C. Après prélèvement du surnageant, le culot de synaptosomes obtenu est solubilisé dans 250µl de tampon d'immunoprécipitation

(25mM de HEPES à pH 7.5, 200mM de NaCl, 1mM d'EDTA, 50µg/ml de leupeptine, 10µg/ml d'aprotinine, 2µg/ml d'inhibiteur de trypsine de soja, 0.04mM PMSF et un mélange d'inhibiteurs de protéines phosphatase) contenant 0.5% de digitonine, 0.2% de sodium chélaté et 0.5% de NP-40. Après dilution des synaptosomes dans 750µl de tampon
5 d'immunoprécipitation maintenu dans la glace et centrifugation à 4°C de manière à éliminer les résidus insolubles, les complexes Aβ₄₂-α7 nAChR sont isolés par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps anti-Aβ₄₂ incubés en leur présence pendant 16 heures à 4°C et concentrés par incubation pendant 2 heures en présence de 25µl de billes d'agarose conjugué A/G (Cai et al. 1999, Wang et al. 2000, Jin et al. 2001).

10 I.6) Electrophorèse et Western Blot

Après trois lavages avec 1ml d'une solution saline de tampon phosphate à pH 7.2 suivis d'une centrifugation, les complexes Aβ₄₂-α7 nAChR isolés sont solubilisés dans 100µl de tampon SDS-PAGE (62.5mM Tris-HCl à pH 6.8, 10% de glycérol, 2% de SDS, 5% de 2-mercaptoéthanol, 0.1% de bleu de bromophénol) à chaud pendant 5 minutes. Les
15 complexes sont ensuite déposés sur un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide 8-16%. Des anticorps monoclonaux anti-α7 nAChR sont utilisés dans l'analyse par Western Blot puis révélés par chimioluminescence. L'intensité des bandes obtenues est analysée par densitométrie afin de quantifier les effets des composés en fonction de leur dose sur la quantité de complexes Aβ₄₂-α7 nAChR présents.

20 I.7) Composé anti-amyloïde

Le composé S 24795 est utilisé en tant qu'agent anti-amyloïde dans le protocole de méthode de criblage *ex vivo* selon l'invention.

Le composé S 24795 est un composé pyridinique utilisé comme facilitateur mnémocognitif capable d'améliorer les processus cognitifs et/ou de s'opposer aux troubles cognitifs liés au
25 vieillissement. Contrairement aux facilitateurs mnémocognitifs agissant directement sur les systèmes cholinergiques centraux, le composé S 24795 est dépourvu d'activité hypothermisante pouvant être gênante dans le traitement des patients atteints de maladie neurodégénérative.

I.8) Méthode de récupération fonctionnelle

Les expériences de récupération fonctionnelle sont effectuées à partir de cerveaux selon I.2 provenant de patients selon I.1.

La récupération fonctionnelle induite par le traitement au S 24795 (10 μ M) est évaluée sur le flux entrant de calcium par les récepteurs $\alpha 7$ et NMDA. Elle a été testée après 1h de traitement par S 24795 sur des cerveaux contrôles exposés à A β_{42} (30 minutes) et sur des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer. Les traitements par A β_{42} (1 μ M) et S 24795 (10 μ M) sont effectués sur des tranches de cortex provenant de ces cerveaux. Des synaptosomes sont ensuite préparés comme décrit en I.4. Afin d'évaluer les flux entrants de Ca²⁺ par les récepteurs $\alpha 7$ et NMDA, les synaptosomes sont incubés en présence de ⁴⁵Ca²⁺ (5 μ M) pendant 5 minutes à 37°C dans du milieu Kreb's-Ringer. Les flux de Ca²⁺ sont induits pour $\alpha 7$ agoniste sélectif des récepteurs $\alpha 7$ nAChR, PNU282987 (0.1, 1 et 10 μ M), et pour les récepteurs NMDAR par l'addition de NMDA (0.1, 1 , 10 μ M) et de glycine (1 μ M). La réaction est stoppée par l'ajout de Kreb's Ringer (4°C) contenant de l'EGTA mais dépourvu de calcium. Après deux lavages, les synaptosomes sont lysés par sonication dans l'éthanol (95%) et la radioactivité est comptée par spectrométrie à scintillation liquide. La spécificité des flux entrants de calcium est vérifiée grâce à l'addition d'inhibiteurs sélectifs du récepteur $\alpha 7$ (α -bungarotoxine) et NMDA (AP-5).

II. Résultats

Les résultats mettent en évidence deux types d'effets du composé S 24795.

Premièrement, la méthode de criblage permet, lorsque les peptides A β sont ajoutés aux extraits de cerveau, d'identifier une propriété préventive de S 24795, ajouté avant les peptides A β , sur la formation des complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR. En effet, comme on peut le voir sur la figure 1, l'ajout de peptides A β aux synaptosomes de cortex humains non malades induit une forte augmentation de la quantité de complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR.

Lorsque S 24795 est ajouté aux synaptosomes avant les peptides A β , la quantité de complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR formés est diminuée de 92%, ce qui montre que S 24795 (à 30 μ M) prévient la formation de ces complexes induite par les peptides A β .

Dans les synaptosomes provenant de cortex de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, la quantité de complexes présents est vingt fois plus importante que chez les contrôles non malades. L'addition de peptides A β n'induit pas d'augmentation du nombre de complexes présents dans les tissus malades, l'ensemble des récepteurs nicotiques étant déjà saturés par les peptides A β endogènes. Dans ce cas, la méthode de criblage permet d'identifier un
5 propriété curative de S 24795 puisque dissociant des complexes formés avant le décès du patient. S 24795 induit une diminution majeure de la quantité de complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR présente dans les cerveaux malades.

Les résultats illustrés sur la figure 3 confirment la capacité de la méthode de criblage à
10 identifier un composé à propriété curative en ce que, sans ajout de peptides A β ce composé peut induire une dissociation des complexes déjà présents dans les tissus humains malades. En effet, l'absence de peptides A β exogènes le composé S 24795 induit, dès la concentration de 1 μ M, une diminution d'environ 22% des complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR déjà présents dans les extraits de cerveaux malades. Cette diminution devient significative
15 aux concentrations de 10, 30 et 100 μ M de S 24795 avec des complexes non dissociés diminués de manière dose dépendante de l'ordre de 63% à la plus forte concentration (p<0.01 ANOVA 2 facteurs suivie d'un test de Newman-Keuls pour comparaisons multiples).

Cette méthode de criblage permet donc de sélectionner de manière spécifique des
20 composés capables d'une part de prévenir la formation de complexes, ce qui est applicable à des stades précoces de la maladie où les composés ont une action préventive, et d'autre part de dissocier les complexes déjà présents, ce qui est applicable à des stades avancés voire sévères de la maladie, où les composés ont une action curative.

En effet, la dissociation des complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR va empêcher l'accumulation
25 intraneuronale excessive de complexes A β_{42} - $\alpha 7$ nAChR et par conséquence s'opposer à la mort neuronale due à ces dépôts.

La réalisation de la méthode de criblage selon l'invention à partir de synaptosomes de
30 cerveaux humains évite les artéfacts et faux-positifs liés aux différences entre les espèces animales et humaine. En outre, la mise en œuvre *ex vivo* de cette méthode de criblage permet d'obtenir une rapidité et une répétitivité pour l'identification de composés capables

de dissocier les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine. Enfin, cette méthode de criblage étant mise en œuvre sur du matériel biologique représentant un stade sévère et figé de la maladie d'Alzheimer, elle permet donc de sélectionner et identifier des composés agissant à un stade ultime de la maladie. La méthode de criblage selon l'invention assure l'identification de composés utilisables dans le traitement curatif des maladies neurodégénératives et de la maladie d'Alzheimer en particulier.

De plus, une expérience spécifique a été menée afin d'évaluer une éventuelle récupération fonctionnelle après dissociation des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR. Cette expérience montre que la dissociation par S 24795 des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR permet une récupération de certaines fonctionnalités des récepteurs $\alpha 7$ nAChR et des récepteurs au glutamate de type NMDAR. En effet l'entrée de calcium via $\alpha 7$ nAChR et NMDAR dans les synaptosomes de patients atteints de maladie d'Alzheimer est fortement diminuée, 35% des valeurs contrôles, par rapport aux synaptosomes de sujets contrôles (figure 5). Cette diminution de l'entrée de calcium est bien due à la formation des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR puisque l'ajout d' $A\beta$ sur des tranches de cerveaux de sujets contrôles provoque une diminution de l'entrée de calcium, jusqu'à un niveau comparable à celui des patients. Le traitement par S 24795, en s'opposant à l'action de l' $A\beta$ dans les cerveaux contrôles montre un rétablissement important de cette entrée de Ca^{2+} .

De façon plus remarquable, le traitement par S 24795 sur les complexes déjà formés chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer provoque une augmentation importante de l'entrée de Ca^{2+} de l'ordre de 75% par rapport aux cerveaux de patients non traités atteints de maladie d'Alzheimer. La figure 5 montre que, après traitement au S 24795 des cerveaux de patients atteints de maladie d'Alzheimer et de contrôles prétraités à l' $A\beta$, l'entrée de Ca^{2+} atteint des niveaux comparables correspondants à environ 65% des valeurs contrôles sans $A\beta$.

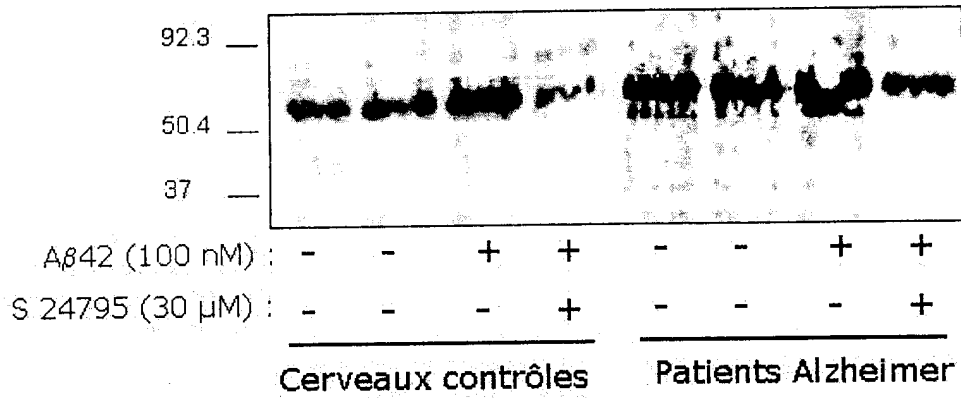
Il est donc montré par cette expérience que la dissociation par S 24795 des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR, sur du tissu malade provenant de patients atteints de maladie d'Alzheimer, permet la restauration post-mortem de certaines fonctionnalités cellulaires, en l'espèce l'entrée de calcium.

Cette expérience souligne donc l'intérêt thérapeutique de cette méthode de criblage.

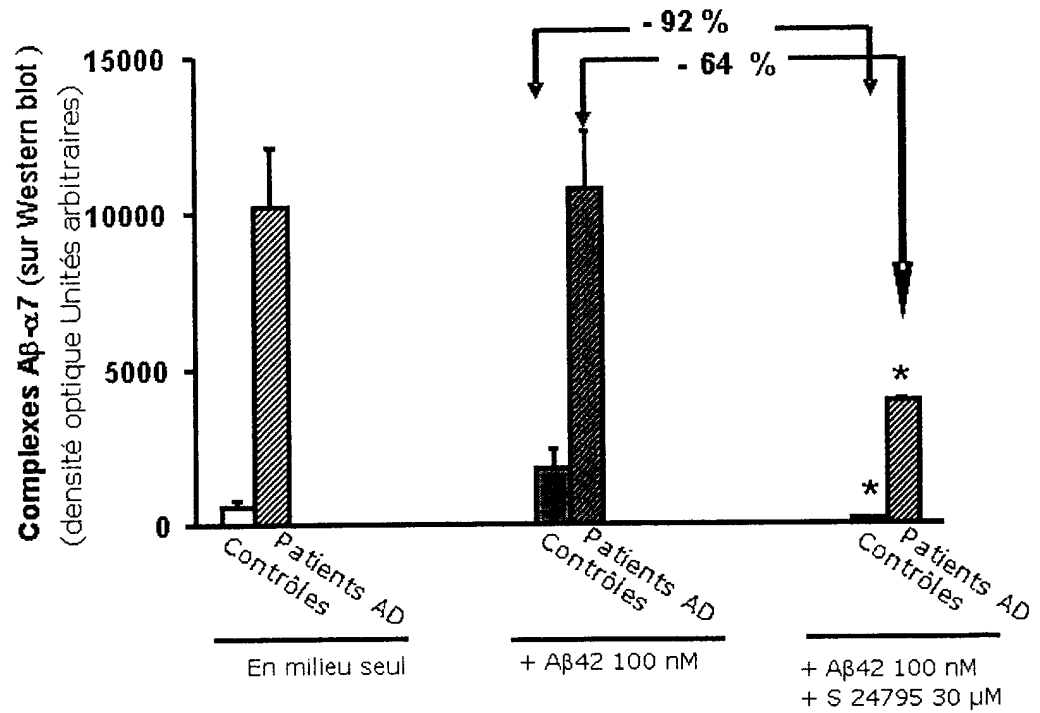
REVENDICATIONS

1. Méthode de criblage de composés capables de dissocier ou de prévenir les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine issus de cerveaux humains.
- 5 2. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce que les composés identifiés ont des propriétés curative ou préventive.
3. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce que les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont de type $\alpha 7$.
- 10 4. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce que les peptides β -amyloïde sont $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ et/ou $A\beta_{43}$.
5. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce que les complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine sont issus de cortex ou d'hippocampes humains.
- 15 6. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce que la dissociation des complexes de peptides β -amyloïde et de récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine est mise en évidence par immunohistochimie.
7. Méthode de criblage selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :
 - 20 - l'incubation de complexes de peptides β -amyloïde avec les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine en présence ou en l'absence d'un composé à tester ;
 - la détermination de la quantité de complexes non dissociés en présence ou en l'absence de composé à tester et l'évaluation de la différence de quantité de complexes non dissociés.

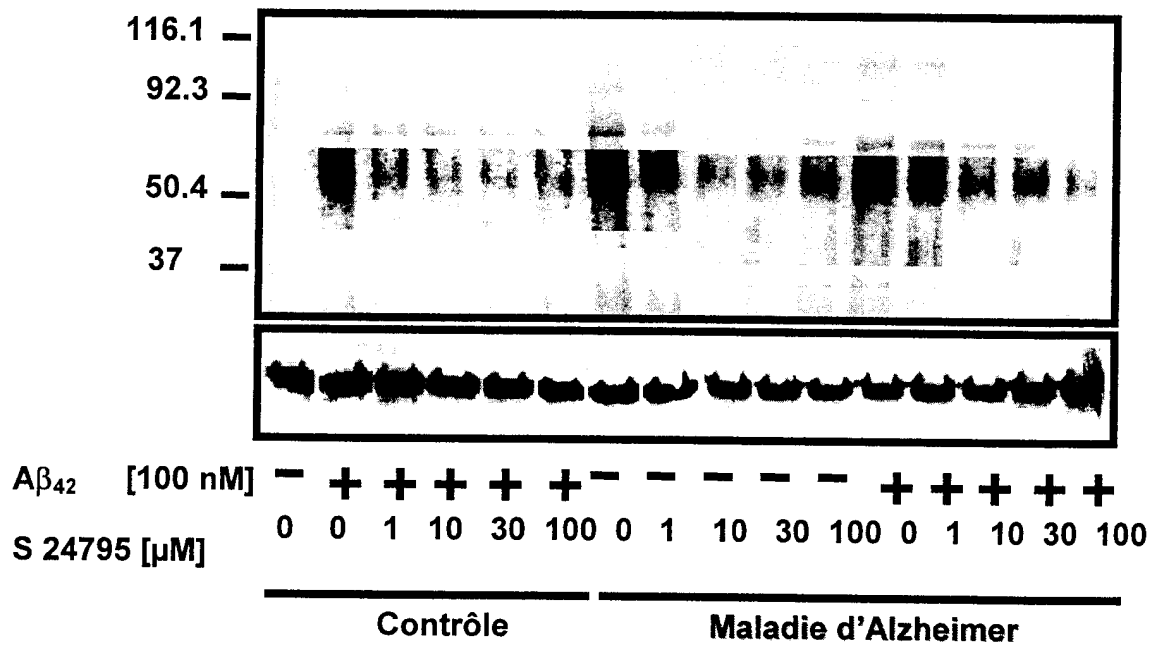
8. Méthode de criblage selon la revendication 7, caractérisée en ce que les complexes non dissociés sont isolés avec des anticorps anti-peptides β -amyloïde.
9. Méthode de criblage selon la revendication 8, caractérisée en ce que les anticorps sont dirigés contre les peptides β -amyloïde $A\beta_{39}$, $A\beta_{40}$, $A\beta_{41}$, $A\beta_{42}$ et/ou $A\beta_{43}$.
- 5 10. Méthode de criblage selon la revendication 7, caractérisée en ce que les complexes non dissociés sont mis en évidence à l'aide d'anticorps dirigés contre les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine.
11. Méthode de criblage selon la revendication 10, caractérisée en ce que les complexes non dissociés sont mis en évidence à l'aide d'anticorps anti-récepteurs
10 nicotiniques $\alpha 7$ de l'acétylcholine.
12. Composé identifié par la méthode de criblage selon la revendication 1.
13. Composé selon la revendication 12, caractérisé en ce que ce composé est le 1-(4-bromophényl)-2-(1-méthyl-2pyridiniumyl)-1-éthanone.
14. Composition pharmaceutique caractérisée en qu'elle comprend un ou plusieurs
15 excipient(s) pharmaceutiquement acceptable(s) et un ou plusieurs composé(s) selon la revendication 12.
15. Utilisation de composés selon la revendication 12 pour l'obtention de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et/ou au traitement de maladies neurodégénératives.
- 20 16. Utilisation de composés selon la revendication 12 pour l'obtention de compositions pharmaceutiques destinées à la prévention et/ou au traitement de la maladie d'Alzheimer.



5 **Figure 1 :** Inhibition par S24795 des complexes Aβ₄₂-α7 nAChR provenant de synaptosomes de cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de sujets témoins post-mortem. Incubation en milieu seul (Kreb's-Ringer) ou en présence de S24795 (30 μM) pendant 10 minutes suivie d'une incubation en présence de peptide Aβ₄₂ pendant 30 minutes. Immunoprécipitation avec anticorps anti-Aβ₄₂ suivie par Western blot avec anticorps anti-α7. Ces données proviennent de cinq paires de sujets contrôles ou patients atteints de la maladie d'Alzheimer appariés en fonction de l'âge.



5 Figure 2 : Quantification des récepteurs $\alpha 7$ nAChR associés à $A\beta_{42}$ dans des synaptosomes de cortex frontal humains provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets témoins post-mortem, incubés ou non avec du S 24795 ($30\mu M$) puis avec le peptide $A\beta_{42}$ ($100nM$). * : $p < 0.01$ pour contrôles et patients atteints de la maladie d'Alzheimer, test de Newman-Keuls pour comparaisons multiples.



5 Figure 3 : Western-blot illustrant la dissociation par le S 24795 des complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR provenant de synaptosomes de cortex frontal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de sujets témoins post-mortem. Les complexes $A\beta_{42}$ - $\alpha 7$ nAChR sont incubés en milieu seul (Kreb's-Ringer) ou en présence de S24795 (1, 10, 30 et 100 μ M) pendant 10 minutes puis avec ou non le peptide $A\beta_{42}$ (100nM).

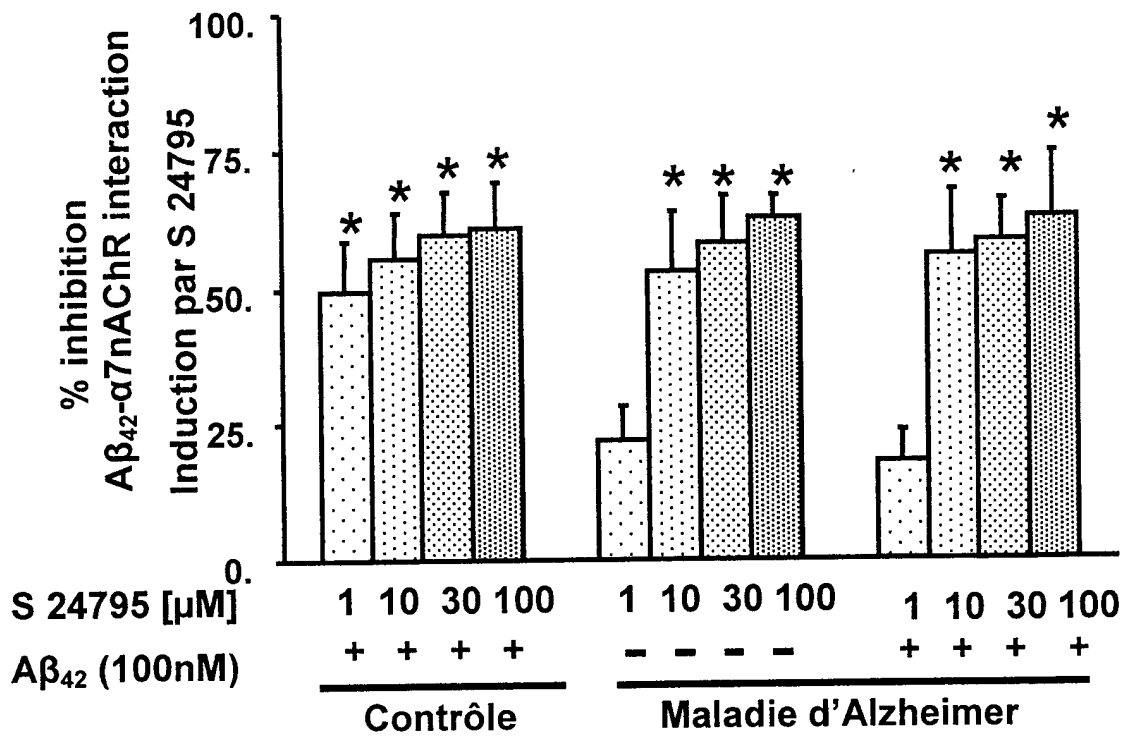


Figure 4 : Quantification des récepteurs $\alpha 7$ nAChR associés à $A\beta_{42}$ dans des synaptosomes de cortex frontal humains provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets témoins post-mortem, incubés avec du S24795 (de 1 à 100 μ M) puis avec ou non des peptides $A\beta_{42}$ (100nM). * : $p < 0.01$ pour contrôles et patients atteints de la maladie d'Alzheimer, ANOVA deux facteurs suivi d'un test de Newman-Keuls pour comparaisons multiples. Ces données proviennent de six sujets témoins et six patients atteints de la maladie d'Alzheimer appariés en fonction de l'âge.

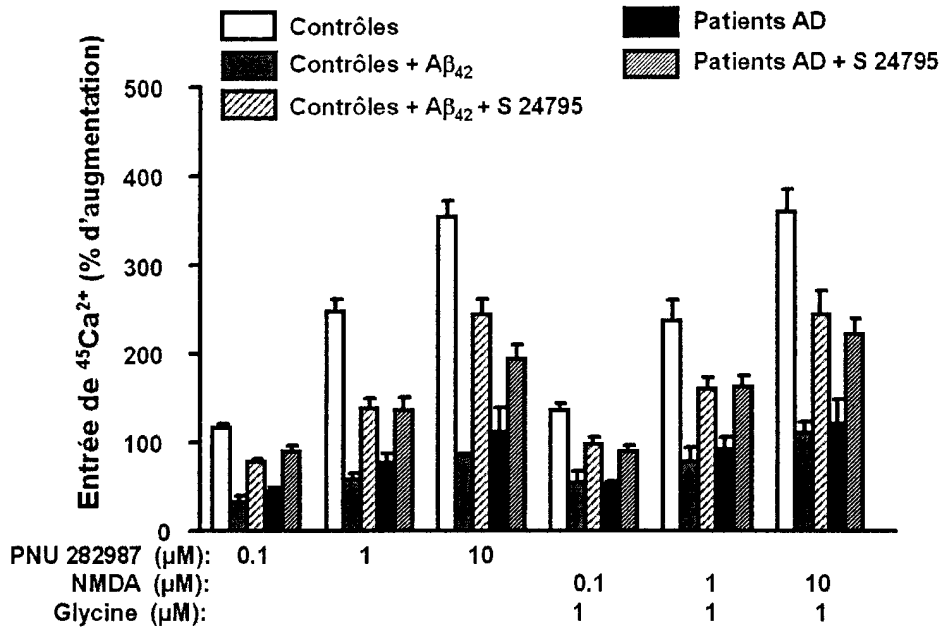


Figure 5 : Quantification de l'entrée de ⁴⁵Ca²⁺ dans des synaptosomes de cortex frontal humain provenant de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de sujets témoins postmortem traités par S 24795. Les tranches de cerveaux contrôles sont incubées ou non en présence d'Aβ₄₂ (1μM) préalablement au traitement au S 24795 (10μM). Les entrées de calcium sont induites soit par l'agoniste α7 (PNU282987) soit par du NMDA ajouté à de la glycine. Ces données proviennent de cinq patients atteints de la maladie d'Alzheimer et de cinq sujets témoins appariés en fonction de l'âge.

5