

(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
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/009854 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/34 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051681

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2007 (18.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0653027 19 juillet 2006 (19.07.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GAL-
DERMA RESEARCH & DEVELOPMENT [FR/FR];
2400 Route des Colles, Les Templiers, F-06410 Biot (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : LABRIE,
Fernand [CA/CA]; 2989, de la Promenade, Quebec,
G1W2J5 (CA).

(74) Mandataire : ANDRAL, Christophe; L'oreal, RIVER
PLAZA - DIPI, 25-29 Quai Aulagnier, F-92665 Asnieres-
sur-seine (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LY, MA, MD, ME, 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.

(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, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport
- avec la partie réservée au listage des séquences de la des-
cription publiée séparément sous forme électronique et in-
disponible sur demande auprès du Bureau international

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

(54) Title: MODULATORS OF THE ABCD3 TRANSPORTER IN THE TREATMENT OF ACNE OR OF HYPERSEBOR-
RHOEA

(54) Titre : MODULATEURS DU TRANSPORTEUR ABCD3 DANS LE TRAITEMENT DE L'ACNÉ OU DE
L'HYPERSEBORRHÉE

(57) Abstract: The invention relates to an *in vitro* method of screening for candidate compounds for the preventive or curative
treatment of acne, comprising the determination of the ability of a compound to modulate the expression or the activity of the per-
oxisomal membrane ATP-binding cassette transporter 1, subfamily D, type 3 (ABCD3), and also to the use of modulators of the
expression or of the activity of this transporter for the treatment of acne or of skin disorders associated with hyperseborrhoea. The
invention also relates to methods for the diagnosis or prognosis, *in vitro*, of these pathologies.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif
de l'acné, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du transporteur 1 membranaire
du péroxysome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D (ABCD3), ainsi que l'utilisation de modulateurs de
l'expression ou de l'activité de ce transporteur pour le traitement de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperseborrhée.
L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro* de ces pathologies.

WO 2008/009854 A2

Modulateurs du transporteur ABCD3 dans le traitement de l'acné ou de l'hyperséborrhée

L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs du transporteur ABCD 3 (à savoir le transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D), pour le traitement de l'acné, ainsi que des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. Elle concerne aussi des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro de ces pathologies.

10 Une peau grasse hyperséborrhéique est caractérisée par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Classiquement, un taux de sébum supérieur à 200µg/cm² mesuré au niveau du front est considéré comme caractéristique d'une peau grasse. Une peau grasse est souvent associée à un défaut de desquamation, un teint luisant, un grain de peau épais. En plus de ces désordres esthétiques, l'excès de sébum peut servir de support au développement anarchique de la flore bactérienne saprophyte (*P. acnes* en particulier), et provoquer l'apparition de comédons et/ou de lésions acnéiques.

Cette stimulation de la production de glandes sébacées est induite par les androgènes. L'acné est, de fait, une maladie chronique du follicule pilosébacé sous dépendance hormonale. Une thérapie hormonale contre l'acné est une possibilité de traitement pour les femmes, le but étant de s'opposer aux effets des androgènes sur la glande sébacée. Dans ce cadre on utilise généralement des oestrogènes, des anti-androgènes, ou des agents diminuant la production d'androgènes par les ovaires ou la glande surrénale. Les anti-androgènes utilisés pour le traitement de l'acné incluent notamment la spironolactone, l'acétate de cyprotérone, et le flutamide. Cependant, ces agents présentent des effets secondaires potentiellement sévères. Ainsi, toute grossesse doit être absolument empêchée, du fait notamment d'un risque de féminisation pour le fœtus mâle. Ces agents sont prohibés chez les patients masculins.

20 Il existe donc un besoin d'identifier des médiateurs en aval de l'action des hormones stéroïdiennes, et de les moduler, pour obtenir un profil thérapeutique similaire, mais avec des effets secondaires réduits.

30 La demanderesse a maintenant découvert que le gène codant pour le transporteur 1 membranaire du peroxisome (ABCD3) était exprimé dans les glandes sébacées humaines, et que son expression était régulée par les androgènes, *in vivo*, dans un modèle de glande préputiale de souris. Elle propose dès lors de cibler le gène ABCD3 ou

son produit d'expression pour prévenir et/ou améliorer l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, notamment l'aspect de peau grasse.

Par acné, on entend toutes les formes d'acné, à savoir notamment les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, les acnés nodulokystiques, conglobata, ou encore les
5 acnés secondaires telles que l'acné solaire, médicamenteuse ou professionnelle.

La demanderesse propose également des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro, basées sur la détection du niveau d'expression ou d'activité du transporteur 1 membranaire du péroxysome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D.

10

ABCD3

Le transporteur ABCD3 désigne la protéine possédant un site de liaison à l'ATP de type 3 de la famille D, ou encore appelée la protéine 1 membranaire du peroxysome (70kD).

Le transporteur ABCD3 est un transporteur permettant une translocation
15 transmembranaire d'une grande variété de substrats, comme des drogues antitumorales et certains types de lipides (Higgins, C.F.(1992) *Annu rev Cell Bio.* **8** 67-113). Il est composé de deux parties identiques, chacune contenant un domaine avec 6 segments transmembranaires et un domaine de liaison à l'ATP. La protéine ABCD3 est connue pour transporter les substrats de la β -oxydation dans le peroxysome. Une déficience dans le
20 gène ABCD3 chez les souris est responsable d'un défaut dans le métabolisme énergétique et la dégradation des acides gras (Tanaka AR, ATP binding/hydrolysis by and phosphorylation of peroxisomal ATP-binding cassette proteins PMP70 (ABCD3) and adrenoleukodystrophy protein (ABCD1). *J Biol Chem.* 2002 Oct 18;277(42):40142-7. Epub 2002 Aug 9.)

25 Dans le contexte de l'invention, le terme « gène ABCD3 » ou « acide nucléique ABCD3 » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour le transporteur ABCD3. Si la cible visée est de préférence le gène humain ou son produit d'expression, l'invention peut également faire appel à des cellules exprimant un transporteur ABCD3 hétérologue, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant
30 pour l'enzyme.

Une séquence d'ADNc humain de ABCD3 est reproduite en annexe (SEQ ID No.1). Il s'agit de la séquence NM002858 dont la partie codante se situe de l'acide nucléique 25 à 2004.

Applications diagnostiques

Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de lésions acnéiques ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité du transporteur

5 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

L'expression de la protéine ABCD3 peut être déterminée par un dosage de cette protéine

10 par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène ABCD3, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du ABCD3 peut être également envisagé.

Dans le cadre d'un diagnostic, le sujet « contrôle » est un sujet « sain ».

15 Dans le cadre d'un suivi de l'évolution des lésions acnéiques ou d'un désordre cutané lié à une hyperséborrhée, le « sujet contrôle » fait référence au même sujet à un temps différent, qui correspond de préférence au début du traitement (T₀). Cette mesure de la différence du niveau d'expression ou d'activité du ABCD3 ou d'expression de son gène ou d'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet notamment de suivre l'efficacité d'un

20 traitement, notamment un traitement par un modulateur du ABCD3, tel qu'envisagé plus haut ou par un autre traitement contre l'acné ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée. Un tel suivi peut conforter le patient quant au bien fondé, ou à la nécessité, de poursuivre ce traitement.

25 Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer des lésions acnéiques ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité du transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D (ABCD3), de l'expression de son gène ou de l'activité d'au

30 moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

Là encore, l'expression de la protéine ABCD3 peut être déterminée par un dosage de cette protéine par radioimmunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène ABCD3, est de mesurer la

35 quantité d'ARNm correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du ABCD3 peut être également envisagé.

Le sujet testé est ici un sujet asymptomatique, ne présentant aucun trouble cutané lié à une hyperséborrhée ou une acné. Le sujet « contrôle », dans cette méthode, signifie un sujet ou une population de référence « saine ». La détection de cette susceptibilité permet la mise en place d'un traitement préventif et/ou d'une surveillance accrue des signes liés à l'acné ou à un désordre cutané associé à une hyperséborrhée.

Dans ces méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro*, l'échantillon biologique testé peut être n'importe quel échantillon de liquide biologique ou un échantillon d'une biopsie. De préférence l'échantillon peut être néanmoins une préparation de cellules de la peau, obtenues par exemple par desquamation ou biopsie. Il peut également s'agir de sébum.

Méthodes de criblage

Un objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du transporteur ABCD3, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, ladite modulation de l'expression ou de l'activité du transporteur ABCD3 indiquant l'utilité du composé pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler l'expression ou l'activité du transporteur ABCD3, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

Plus particulièrement, l'invention se rapporte à une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- b. mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
- c. mesure de l'expression ou de l'activité du transporteur ABCD3, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs,
- d. sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité du transporteur ABCD3 ou une modulation de l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un

de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

Par « modulation », on entend tout effet sur l'expression ou l'activité de la protéine, sur l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, à savoir éventuellement une stimulation, mais de préférence une inhibition, partielle ou complète. Ainsi, les composés testés à l'étape d) ci-dessus inhibent de préférence l'expression ou l'activité de la protéine ABCD3, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs. La différence du niveau d'expression obtenue avec le composé testé par rapport à un contrôle réalisé en l'absence du composé est significative à partir de 25% ou plus.

Dans l'ensemble du présent texte, à moins qu'il ne soit spécifié autrement, par « expression d'une protéine », on entend la quantité de cette protéine ;

Par « activité d'une protéine », on entend son activité biologique ;

Par « activité d'un promoteur », on entend la capacité de ce promoteur à déclencher la transcription de la séquence d'ADN codée en aval de ce promoteur (et donc indirectement la synthèse de la protéine correspondante).

Les composés testés peuvent être de tout type. Ils peuvent être d'origine naturelle ou avoir été produits par synthèse chimique. Il peut s'agir d'une banque de composés chimiques structurellement définis, de composés ou de substances non caractérisés, ou d'un mélange de composés.

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour tester ces composés et identifier les composés d'intérêt thérapeutique, modulateurs de l'expression ou de l'activité du transporteur ABCD3.

Selon un premier mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène ABCD3, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

Le gène rapporteur peut notamment coder pour une enzyme qui, en présence d'un substrat donné, conduit à la formation de produits colorés, telle que CAT (chloramphenicol acétyltransférase), GAL (beta galactosidase), ou GUS (beta glucuronidase). Il peut également s'agir du gène de la luciférase ou de la GFP (Green Fluorescent Protein). Le dosage de la protéine codée par le gène rapporteur, ou de son

activité, est réalisé classiquement, par des techniques colorimétriques, fluorométriques, ou de chimioluminescence, entre autres.

Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène ABCD3 codant pour le transporteur ABCD3, et l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.

La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène ABCD3 de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule ovarienne, ou encore mieux un sébocyte. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale, comme par exemple la glande préputiale, clitoridienne, ou encore la glande sébacée de la peau.

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour un transporteur ABCD3, de préférence humain, ou de mammifère.

Une grande variété de systèmes de cellules hôtes peut être utilisée, telle que par exemples les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293

L'acide nucléique peut être transfecté de manière stable ou transitoire, par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par phosphate de calcium, DEAE-dextran, liposome, virus, électroporation, ou microinjection.

Dans ces méthodes, l'expression du gène ABCD3 peut être déterminée en évaluant le taux de transcription dudit gène, ou son taux de traduction.

Par taux de transcription d'un gène, on entend la quantité d'ARNm correspondant produite. Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine correspondante produite.

L'homme du métier est familier des techniques permettant la détection quantitative ou semi-quantitative de l'ARNm d'un gène d'intérêt. Les techniques basées sur l'hybridation de l'ARNm avec des sondes nucléotidiques spécifiques sont les plus usuelles (Northern Blot, RT-PCR, protection à la RNase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands (par exemple, avidine/biotine).

En particulier, le niveau d'expression du gène peut être mesurée par PCR en temps réel ou par protection à la RNase. Par protection à la RNase, on entend la détection d'un ARNm connu parmi les ARN-poly(A) d'un tissu qui peut se faire à l'aide d'une hybridation spécifique avec une sonde marquée. La sonde est un ARN complémentaire marqué (radioactif) du messenger à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la

séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la sonde antisens.

5 Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéinisé et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont détectés par autoradiographie.

10

Le taux de traduction du gène est évalué par exemple par dosage immunologique du produit dudit gène. Les anticorps utilisés à cet effet peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Leur production relève de techniques conventionnelles. Un anticorps polyclonal anti-transporteur ABCD3 peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de la protéine entière. L'antisérum est prélevé puis épuisé selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256: 495- 497 (1975)). D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique clone à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage ("phage display"), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E.coli).

25 Le dosage immunologique peut être réalisé en phase solide ou en phase homogène; en un temps ou en deux temps; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs. Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, ou des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques.

30 Des dosages ELISA, radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en oeuvre pour révéler la présence des complexes antigènes-anticorps formés.

La caractérisation des complexes antigène/anticorps, et plus généralement des protéines isolées ou purifiées mais également recombinantes (obtenues in vitro et in vivo) peut être
35 réalisée par analyse en spectrométrie de masse. Cette identification est rendue possible grâce à l'analyse (détermination de la masse) des peptides générée par l'hydrolyse

enzymatique des protéines (trypsine en générale). De façon générale, les protéines sont isolées selon les méthodes connues de l'homme du métier, préalablement à la digestion enzymatique. L'analyse des peptides (sous forme d'hydrolysat) est effectuée par séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leurs propriétés physico-chimiques (phase inverse). La détermination de la masse des peptides ainsi séparés est
5 réalisée par ionisation des peptides et soit par couplage direct au spectromètre de masse (mode electrospray ESI) soit après dépôt et cristallisation en présence d'une matrice connue de l'homme de l'art (analyse en mode MALDI). Les protéines sont ensuite identifiées grâce à l'utilisation d'un logiciel approprié (par exemple Mascot).

10

Selon un troisième mode de réalisation, l'étape a) décrite ci-dessus consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une protéine transporteur ABCD3 et un substrat de la protéine, et l'étape c) ci-dessus consiste à mesurer l'activité de transport.

Des dosages de l'activité de transport de ABCD3 sont décrits dans la littérature
15 (J.Biol.Chem. 1999 ;274 (17) :11968-11976).

La protéine ABCD3 peut être produite selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Elle peut également être produite à l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple E. coli ou B. subtilis), des levures (par exemple Saccharomyces, Pichia) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

20 Ainsi l'activité du transporteur ABCD3 peut être évaluée de la manière suivante :

L'activité du transporteur est évaluée en mesurant dans les peroxisomes la β -oxydation des acides gras, directement dépendante du transport dans les peroxisomes par ABCD3.

A partir d'une lignée CHO, transfectant de façon stable ABCD3, les peroxisomes sont séparés en déposant une fraction cellulaire sur un gradient de sucrose (1.1 à 1.2 g/ml) de
25 10ml. Après centrifugation 90 minutes à 50000g, des fractions de 1 ml sont récoltées et la densité de chaque fraction est mesurée par refractométrie.

Les peroxisomes ainsi isolés sont incubés dans 100 μ l en présence de 10 μ M [1-¹⁴C]palmitoyl-CoA, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM CoenzymeA, 2mM NAD⁺, 2 mM KCN, 2 mM dithiothreitol, 0.1 % BSA, 0.25 mM sucrose, 10 mM Tris HCl pH 7.4. La réaction est
30 réalisée avec ou sans ATP 2 mM, la réaction sans ATP étant le témoin négatif de la réaction. Après incubation 10 minutes à 37°C, la réaction est arrêtée par addition de 70 μ L D'H₂O glacée, 0.15 ml de BSA 10 % et 0.2 ml d'acide perchlorique 2M. Après incubation 30 minutes sur la glace le mélange est centrifugé et le surnageant est extrait 3 fois avec 3 ml d'hexane pour enlever les acides gras n'ayant pas réagit. La radioactivité
35 acide soluble est ensuite mesurée en scintillation liquide.

Modulateurs du transporteur

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur du transporteur humain ABCD3 susceptible d'être obtenu selon l'une des méthodes ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'acné ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

5

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur du transporteur humain ABCD3, à un patient nécessitant un tel traitement.

10 L'invention vise enfin l'utilisation cosmétique d'un modulateur de la protéine humaine transporteur ABCD3, pour le traitement esthétique des peaux grasses.

De manière préférentielle, le modulateur est un inhibiteur de la protéine transporteur ABCD3. Le terme « inhibiteur » se réfère à un composé ou une substance chimique qui élimine ou réduit substantiellement l'activité du transporteur ABCD3. Le terme « substantiellement » signifie une réduction d'au moins 25%, de préférence d'au moins 35%, de préférence encore d'au moins 50%, et de manière plus préférée d'au moins 70% ou 90%.

15

Un inhibiteur préféré interagit avec la protéine en solution à des concentrations en inhibiteur de moins de 1 μ M, de préférence moins de 0,1 μ M, de préférence encore moins de 0,01 μ M.

20

Le composé modulateur peut être un anticorps inhibiteur anti-transporteur ABCD3, de préférence un anticorps monoclonal. De manière avantageuse, un tel anticorps inhibiteur est administré en une quantité suffisante pour obtenir une concentration plasmatique d'environ 0.01 μ g par ml à environ 100 μ g/ml, de préférence d'environ 1 μ g par ml à environ 5 μ g/ml.

25

Le composé modulateur peut également être un polypeptide, un polynucleotide antisens d'ADN OU d'ARN, un si-ARN, ou un PNA ("Peptide nucleic acid", chaîne polypeptidique substituée par des bases puriques et pyrimidiques, dont la structure spatiale mime celle de l'ADN et permet l'hybridation à celui-ci).

30

Les composés modulateurs sont formulés au sein de composition pharmaceutique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions peuvent être administrées par exemple par voie orale, entérale, parentérale, ou topique. De préférence, la composition pharmaceutique est appliquée par voie topique. Par voie orale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granules,

35

d'émulsions, de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

- 5 Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau et des muqueuses et peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques
- 10 ou de patchs polymériques ou d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition pour application topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion. Dans une variante préférée, la composition pharmaceutique se présente sous la forme d'un gel, d'une crème ou d'une lotion.
- 15 La composition peut comprendre une teneur en modulateur de la protéine transporteur ABCD3 allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

La composition pharmaceutique peut en outre contenir des additifs inertes ou des

20 combinaisons de ces additifs, tels que :

- des agents mouillants;
- des agents d'amélioration de la saveur;
- des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;
- des agents stabilisants;

25

- des agents régulateurs d'humidité;
- des agents régulateurs de pH;
- des agents modificateurs de pression osmotique;
- des agents émulsionnants;
- des filtres UV-A et UV-B

30

- et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

Légendes des Figures

Les Figures 1A, 1B et 1C montrent l'expression du transporteur ABCD3 dans la glande sébacée de la peau de souris et dans la glande préputiale de souris par hybridation in situ. La Figure 1A est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ utilisant la sonde sens de ABCD3 (contrôle négatif; animal 43, gonadectomisé). La Figure 1B est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal intact (animal 43). La Figure 1C est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de peau de souris soumise à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal gonadectomisé (animal 52).

Les Figures 2A, 2B et 2C montrent l'expression de ABCD3 dans la glande préputiale de souris par hybridation in situ. La Figure 2A est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde sens de ABCD3 (contrôle négatif; animal 43). La Figure 2B est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal intact (animal 43). La Figure 2C est une photographie en éclairage classique et en éclairage à fond noir d'une coupe de prépuce de souris soumis à une hybridation in situ avec une sonde antisens, dans un animal gonadectomisé (animal 52).

La Figure 3 est un graphe qui montre la mesure de l'expression du gène ABCD3 chez des souris mâles gonadectomisées. Des souris mâles ont été gonadectomisées et traitées avec le véhicule, le DHT, la DHEA ou la combinaison de DHEA-Flutamide pendant une période de 7 jours une fois par jour (traitement long terme). A la fin de l'expérience les glandes préputiales ont été enlevées, l'ARN a été isolé et l'expression des gènes a été analysée par la technique Affymetrix.

30

GDx: souris gonadectomisées et traitées avec le véhicule

DHT: souris gonadectomisées et traitées avec le Dihydrotestosterone (agoniste du récepteur aux androgènes)

DHEA: souris gonadectomisées et traitées avec le Dihydroepiandrosterone (précurseur des hormones stéroïdiennes; dans les glandes préputiales il est métabolisé en androgène actif)

35

DHEA-Flu: souris gonadectomisées et traitées avec une combinaison de Dihydroepiandrosterone et Flutamide (antagonistes du récepteur aux Androgènes; qui bloquent les effets des agonistes DHT et DHEA).

Niveau d'expression: niveau d'expression de l'ARNm

5

Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

10 Exemple 1 : Expression du transporteur ABCD3 dans la glande sébacée humaine et dans l'épiderme humain.

Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à la dispase et dissection sous une loupe binoculaire. Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés à partir des glandes sébacées et à partir de l'épiderme.

15 L'expression des gènes a été analysée sur une station d'Affymetrix (module microfluidic; four à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les protocoles fournis par la société. En bref, l'ARN total isolé des tissus est transcrit en ADNc. A partir de l'ADNc double brin, on synthétise un ARNc marqué à la biotine en utilisant la polymérase T7 et un NTP précurseur conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de
20 petites tailles. Toutes les étapes de biologie moléculaire sont contrôlées en utilisant le système « Lab on a chip » d'Agilent pour confirmer les bonnes efficacités des réactions enzymatiques. La puce Affymetrix est hybridée avec l'ARNc biotinylé, rincée et ensuite marquée par fluorescence en utilisant un fluorophore conjugué à la Streptavidine. Après des lavages, la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel
25 MAS5 fourni par Affymetrix. On obtient une valeur d'expression pour chaque gène ainsi que l'indication de la significativité de la valeur obtenue. Le calcul de la significativité de l'expression est basé sur l'analyse des signaux qui sont obtenus suite à l'hybridation de l'ARNc d'un gène donné avec un oligonucléotide hybridant parfaitement (« perfect match ») versus un oligonucléotide qui contient une mutation (« single mismatch ») dans
30 la région centrale de l'oligonucléotide (voir tableau 1).

Tableau 1 : mesure de l'expression de ABCD3 dans l'épiderme et dans la glande sébacée humaine via l'utilisation de la technologie des puces affymetrix.

Identifiant Affymetrix	Nom du gène	Expression dans la glande	Expression dans l'épiderme	Significativité de l'expression	Significativité de l'expression

		sébacée humaine	humain	dans la glande sébacée humaine	dans l'épiderme humain
202850_at	ABCD3	675	362	1	1

Indicateur de la significativité de l'expression du gène analysé dans l'échantillon indiqué : présence (=1) ou absence (=0).

Résultats:

- 5 Le transporteur ABCD3 est bien exprimé dans les deux tissus (glande sébacée, épiderme). L'analyse différentielle entre l'expression dans la glande sébacée humaine et l'épiderme humain montre que l'expression est significativement plus forte dans la glande sébacée par rapport à la valeur observée dans l'épiderme (tableau 1).
- 10 **Exemple 2 : Mise en évidence de la protéine ABCD3 dans la glande sébacée humaine par spectrométrie de masse**

Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à la dispase et microdissection sous une loupe binoculaire. Des extraits
15 protéiques ont été préparés à partir des glandes sébacées et à partir de l'épiderme. Ces extraits protéiques ont été soumis à l'hydrolyse enzymatique par la trypsine de porc afin de générer des peptides qui ont été séparées par nanobore HPLC puis analysé par spectrométrie de masse electrospray tandem MS (Q star XL Applied Biosystem). La recherche et l'identification des peptides puis des protéines sont
20 réalisées à partir de la fraction subcellulaire « enrichie en membrane plasmique », et sont faites grâce à l'utilisation de moteur de recherche comme Mascot et SpectrumMill à partir de banque de données protéiques publiques (SwissProt version 08/02/2005). La fraction subcellulaire est obtenue selon le procédé suivant. Les glandes sébacées disséquées ou l'épiderme sont rincés avec du mannitol, et de l'Hépes. Les tissus
25 isolés sont ensuite broyés en présence de CaCl₂ (2M) puis subissent une centrifugation à 4°C pendant 1 min à 13 000 rpm puis une ultracentrifugation à 100 000 rpm pendant 10 min. On récupère le culot qui contient la fraction nucléaire et le cytosquelette.

30 Le peptide appartenant à la protéine ATP-binding cassette, sub-family D, member 3 (ABCD3) (70 kDa peroxisomal membrane protein) (PMP70) a été retrouvée dans la glande sébacée humaine. Cette étude confirme la présence de cette protéine dans la

glande sébacée comme cela est suggéré par le suivi de son expression (taux d'ARNm).

- Code d'accèsion Uniprot: P28288, ABCD3_HUMAN

- peptide trouvé: EYLDNVQLGHILER

5 (Total score Mascot : 26 ; total score SpetrumMill : 14.16 les score se situant dans la zone de significativité)

- masse moléculaire de la protéine : 75941

- point isoélectrique : 9.41

10 **Exemple 3 : Expression d'ABCD3 dans la glande sébacée de la peau de souris par « hybridation *in situ* »**

Méthodes :

Des sondes sens et antisens ont été préparées à partir du gène ABCD3 par incubation du
15 gène linéarisé (2µg) avec 63µCi de [³⁵S]UTP (1250 Ci/mmol ; NEN, Massachusetts, USA) en présence de l'ARN polymérase T7 ou T3. L'hybridation *in situ* a été réalisée sur un tissu de souris fixé au formaldéhyde et enveloppé dans de la paraffine. Des sections (4µm de large) ont ensuite été déparaffinées dans du toluène et réhydratées par un gradient d'alcool. Après séchage, les différentes sections ont été incubées dans un tampon de
20 préhybridation pendant deux heures. L'hybridation s'est déroulée sur la nuit dans un tampon d'hybridation (tampon de préhybridation avec 10mM DTT et 2X10⁶ cpm ARN/µl ³⁵Smarqué) à 53°C. L'excès de sonde a été éliminé et les coupes ont été inclinées dans une émulsion LM1 (Amersham Biosciences, UK) et exposées dans le noir à 4°C pour au moins un mois. Les coupes ont alors été développées et contre colorées avec de
25 l'hématoxyline et de l'éosine. L'hybridation avec la sonde sens a été utilisée comme témoin négatif et on a uniquement détecté le bruit de fond. Ces sondes ont été incubées avec des coupes histologiques de la peau de souris ou de la glande préputiale de souris. Suite à l'incubation en présence d'une émulsion photographique, les structures histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées (accumulation de
30 grains argentés). Un signal spécifique se manifeste par un marquage positif avec la sonde antisens (Figure 1B et Figure 1C) et l'absence de marquage avec la sonde sens (Figure 1A) utilisé comme contrôle négatif.

Résultat :

35 Abcd3 est exprimé dans les glandes sébacées de la peau de souris. Une analyse fine basée sur l'observation de coupes histologiques obtenues pour 4 animaux intacts et 4

animaux gonadéctomisés n'a pas permis de distinguer une expression différentielle entre les animaux intacts et gonadéctomisés.

5 **Exemple 4 : Expression de ABCD3 dans la glande préputiale de souris par hybridation in situ**

Méthodes :

Les méthodes utilisées dans cet exemple sont identiques à celles de l'exemple 3.

10

Les glandes préputiales de souris montrent une différenciation du type sébocyttaire et sont utilisées comme modèle expérimental de glande sébacée.

Résultats :

15 La Figure 2A ne montre pas de marquage au niveau de la glande préputiale ce qui est en accord avec les attentes des chercheurs car elle correspond au contrôle négatif. La Figure 2B montre un très fort marquage de la glande préputiale de souris dans un animal normal. La Figure 2C montre un marquage fort des acini de la glande préputiale dans un animal gonadéctomisé.

20 ABCD3 est fortement exprimée dans la glande préputiale de souris. Une analyse de plusieurs coupes histologiques provenant de 4 animaux contrôles et 4 animaux gonadéctomisés indique une expression très forte dans les glandes préputiales des animaux intacts et une expression forte dans les glandes préputiales des animaux gonadéctomisés.

25

En résumé, ces résultats d'hybridation in situ indiquent que l'expression du transporteur Abcd3 diminue dans des conditions caractérisées par un manque de stimulation androgénique (animaux gonadéctomisés).

30

Exemple 5 : Expression d'ABCD3 dans la glande préputiale de souris suite à une stimulation androgénique

35 Les glandes préputiales de souris montrent une différenciation du type sébocyttaire et sont utilisées comme modèle expérimental de glande sébacée. Elles ont une taille suffisante pour permettre l'isolement d'ARN sans avoir recours à des technologies de microdissection.

Les inventeurs ont analysé l'expression du transporteur ABCD3 dans les glandes préputiales de souris dans des conditions de déficience en hormones stéroïdiennes (notamment d'hormones androgéniques) suite à une gonadectomie. Les animaux gonadectomisés ont ensuite été traités avec des quantités physiologiques de Dihydrotestosterone (DHT) ou de Dihydroepiandrosterone (DHEA) pour restituer un niveau physiologique des hormones androgéniques, ou bien comme expérience de contrôle avec une combinaison de DHEA-Flutamide dans laquelle le Flutamide, un antagoniste du récepteur aux Androgènes, bloque l'effet de la DHEA. La comparaison de l'expression génique dans ces conditions expérimentales permet d'identifier de façon non ambiguë la modulation ou non de l'expression génique d'un gène en question par les hormones androgéniques.

L'expression génique a été analysée en utilisant la technologie Affymetrix décrit ci-dessus (Figure 3).

Résultat :

L'ARNm du transporteur ABCD3 est induit par un traitement chronique pendant 7 jours aux androgènes dans la glande préputiale de souris.

REVENDEICATIONS

- 5 1. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D (ABCD3), ou l'expression de son gène, ou l'activité d'un ou plusieurs de ses promoteurs.
- 10
2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné et/ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
- 15 a. Préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- b. Mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
- c. Mesure de l'expression ou de l'activité du transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-
- 20 famille D, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- d. Sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité du transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D, ou une modulation de
- 25 l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un promoteur, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés
- 30 sélectionnés à l'étape d) inhibent l'expression ou l'activité du transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D, ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un promoteur.
4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons
- 35 biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant pour le transporteur 1

membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

- 5 5. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour le transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
- 10 6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des sébocytes.
7. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue, codant pour le transporteur 1
- 15 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D.
8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène.
- 20 9. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de traduction dudit gène.
10. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que l'étape a) consiste
- 25 à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une protéine transporteur 1 membranaire du péroxisome contenant un site de liaison à l'ATP du type 3 de la sous-famille D et un substrat de cette protéine, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'activité de transport.

30

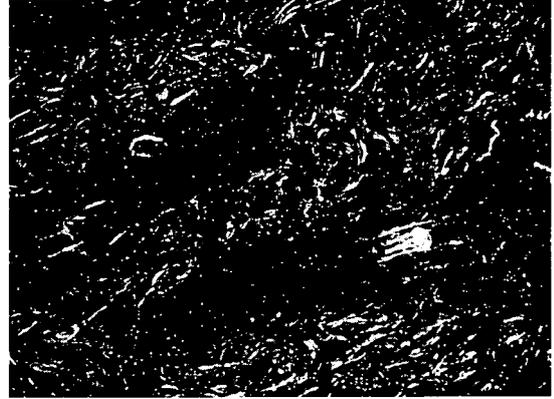
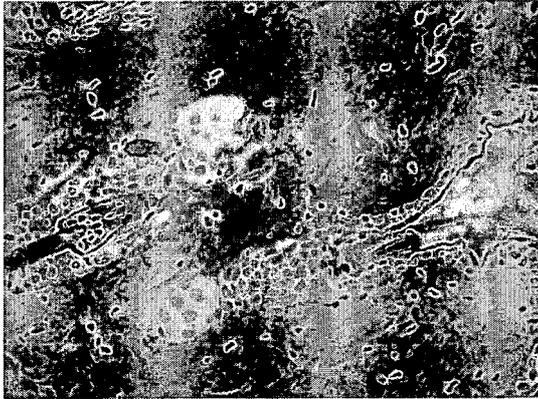


Figure 1A

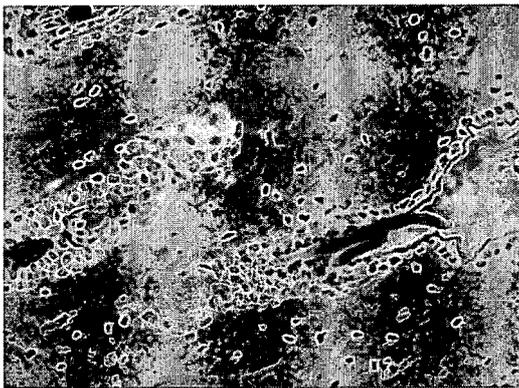


Figure 1B

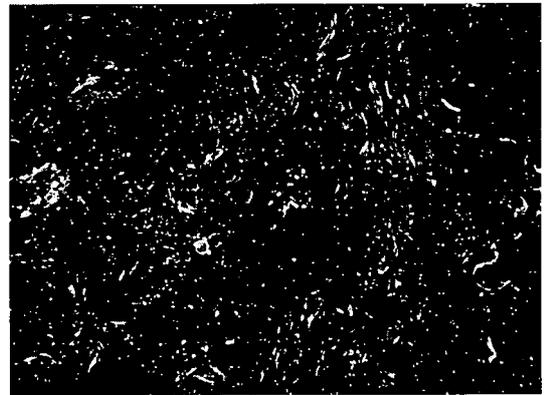
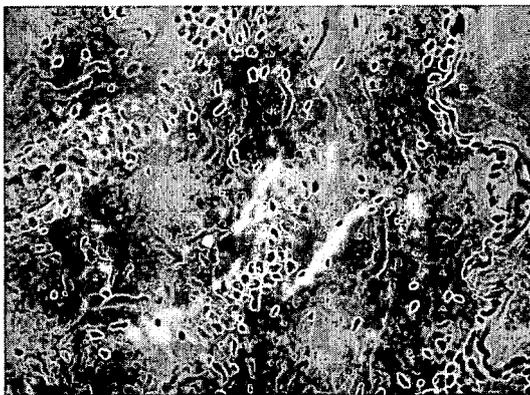


Figure 1C

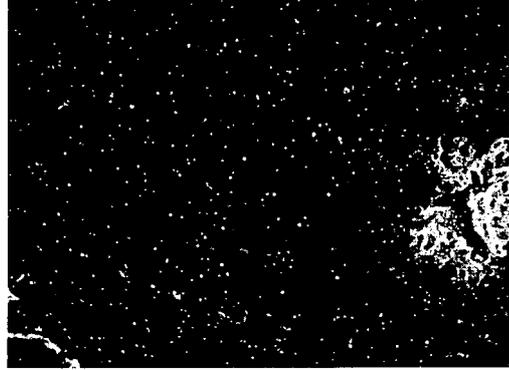
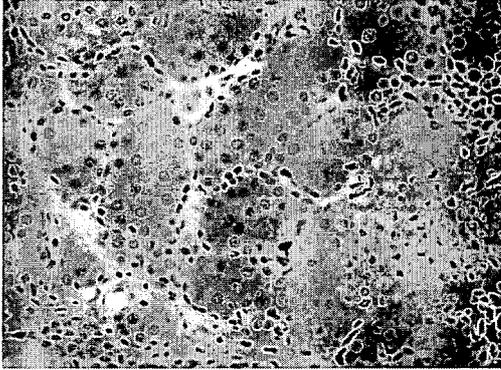


Figure 2A

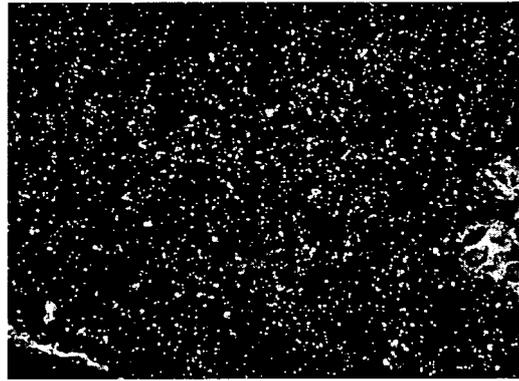
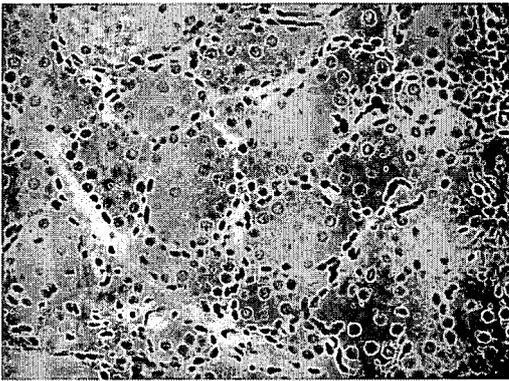


Figure 2B

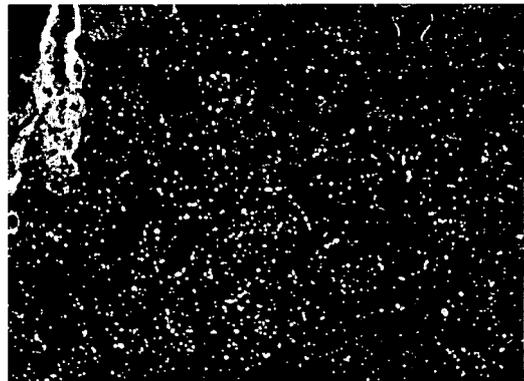
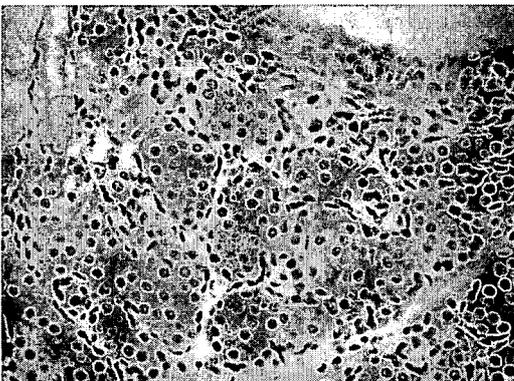


Figure 2C

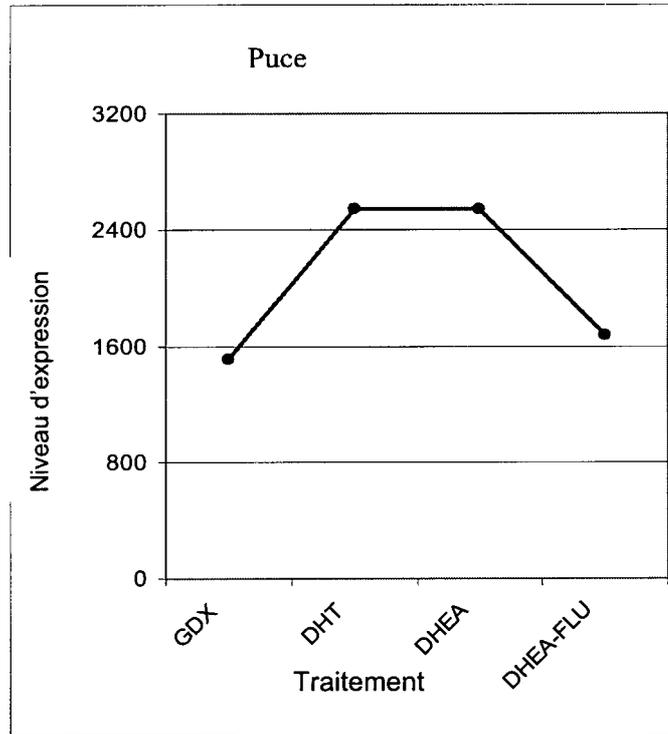


Figure 3