

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 924 128**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **07 59323**

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 Q 1/68** (2006.01), G 01 N 33/53

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 26.11.07.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 29.05.09 Bulletin 09/22.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT Société en nom collectif — FR.

⑦② Inventeur(s) : RETHORE SANDRINE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤④ MODULATEURS DE EGR1 DANS LE TRAITEMENT DE L'ALOPECIE.

⑤⑦ L'invention concerne une méthode in vitro de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif de l'alopecie, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du facteur de transcription Early Growth Response 1 (EGR1), ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de ce facteur de transcription pour le traitement de l'alopecie.

L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic in vitro de cette pathologie.

FR 2 924 128 - A1



L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs du facteur de transcription Early Growth Response 1 (EGR1), pour le traitement de l'alopecie. Elle concerne aussi des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro de cette pathologie.

5 Chez l'être humain, la croissance des cheveux est cyclique et comporte trois phases successives : la phase anagène, la phase catagène et la phase télogène. Chaque follicule de la chevelure se renouvelle donc en permanence, de façon cyclique et indépendante aux follicules adjacents (Kligman 1959, Montagna et Parakkal, 1974). La phase anagène ou phase de croissance, au cours de laquelle les cheveux s'allongent, dure plusieurs années. Cette phase
10 récapitule la morphogenèse du cheveux et est divisée en 7 différents stades (anagène I à anagène VII) (Muller-Rover et col., 2001). Pour simplifier, la phase anagène est généralement réduite à trois étapes qui regroupent chacune plusieurs stades : précoce pour les étapes I-III, milieu d'anagène pour les étapes IV à V et anagène tardive pour les étapes VI et VII.

La phase catagène qui succède à la phase anagène est très courte et ne dure que quelques
15 semaines. Cette phase est divisée en 8 différents stades (catagène I à catagène VIII) (Muller-Rover et col., 2001) Au cours de cette phase, le cheveu subit une involution, le follicule s'atrophie et son implantation dermique apparaît de plus en plus haute. La phase télogène, qui dure quelques mois, correspond à une période de repos du follicule où le cheveu finit par tomber. Après cette phase de repos un nouveau follicule est régénéré, sur place, et un nouveau
20 cycle recommence. (Montagna et Parakkal, 1974).

A chaque instant, tous les cheveux ne sont pas dans la même phase au même moment. Ainsi, sur les 150 000 cheveux environ que comporte une chevelure, seuls 10% d'entre eux environ sont au repos et seront donc remplacés en quelques mois selon une horloge biologique propre à chaque cheveu (Montagna, 1974).

25 Chez la souris et les autres mammifères à fourrures, les follicules pileux possèdent également un cycle de renouvellement comportant les trois phases anagène, catagène et télogène, découpées en différents stades. Par contre, les cycles pilaires des jeunes animaux sont souvent « synchronisés », c'est-à-dire dans la même phase du cycle au même moment au sein d'une
30 même région anatomique (Muller-Rover et col., 2001).

La chute ou perte naturelle des cheveux est un phénomène physiologique qui se produit en permanence et peut être estimée, en moyenne, à quelques cent cheveux par jour pour un état physiologique normal. Cependant, il arrive que le cycle pilaire puisse se dérégler et que la chute
35 des cheveux s'accélère et conduise à une perte temporaire ou définitive des cheveux appelée alopecie. Différentes causes peuvent être à l'origine d'une alopecie.

Il existe différentes types d'alopecie, les formes principales sont :

- l'alopecie androgenetique hereditaire est la plus frequente : elle se manifeste par une diminution du volume des cheveux, voire une calvitie, et touche 70% des hommes ;
- l'alopecie aiguë : elle peut être liée à un traitement par chimiothérapie, un stress, des carences alimentaires importantes, une carence en fer, des troubles hormonaux, au sida, une irradiation aiguë ;
- l'alopecie Areata qui semble être d'origine auto-immune (mécanisme de médiation cellulaire) qui se caractérise par une atteinte en "patch" plus ou moins gros et à un ou plusieurs endroits. Cette forme de pelade peut atteindre toute la tête et on parle d'alopecie Totalis et parfois l'ensemble du corps c'est l'alopecie Universalis et dans ce cas il n'y a plus aucun poil ni cheveu sur l'ensemble du corps.

Dans tous ces trois cas, la chute des cheveux est en relation directe avec le cycle pileux, le follicule n'entrant plus dans la phase anagène, ou la phase anagène n'étant pas maintenue, ce qui implique que le follicule ne produit plus de tige pileuse donc plus de cheveux. Pour lutter contre l'alopecie, il est donc nécessaire de relancer le cycle pileux en activant la phase anagène.

On recherche ainsi depuis de nombreuses années, dans l'industrie cosmétique ou pharmaceutique, des compositions permettant de supprimer ou de réduire l'alopecie, et notamment d'induire ou de stimuler l'entrée en phase anagène ou la croissance des cheveux.

La demanderesse a maintenant trouvé que le gène codant pour Early Growth Response 1 était exprimé spécifiquement dans les kératinocytes du follicule pileux, et que son expression était induite au moment de l'entrée en anagène, in vivo, dans un modèle d'induction de l'entrée en anagène par gonadectomie. Elle propose dès lors de cibler ce gène ou son produit d'expression, pour prévenir ou améliorer les phénomènes d'alopecie.

Par alopecie, on entend toutes les formes d'alopecie, à savoir notamment les alopecies androgenetiques, aiguë ou areata.

EGR1

Le gène Early Growth Response 1 (ou "EGR1") code pour une protéine à doigt de zinc de type C2H2 membre de la famille EGR.

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène EGR1 » ou « acide nucléique EGR1 » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour la protéine EGR1. 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 le facteur de transcription Early Growth Response 1, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant pour le facteur de transcription.

La séquence nucléique humaine (SEQ ID No.1) et la séquence protéique humaine (SEQ ID No.2) du facteur de transcription EGR1 sont reproduites en annexe.

Il s'agit d'une protéine nucléaire qui fonctionne comme un facteur de transcription en modulant des gènes impliqués dans la différenciation et la mitogenèse. EGR1 est connu pour être exprimé et jouer un rôle important au cours de la morphogénèse de la dent (Karavanova, 1992). Un nombre importants de gènes et voies de signalisation, présents au cours de la morphogénèse des dents, sont impliqués dans le cycle pileux et en particulier au moment de l'entrée en anagène. Par exemple, la voie BMP contrôle la mise en place du développement des dents et l'entrée en phase de croissance du follicule pileux adulte (Botchkarev et Sharov, 2004). L'expression spécifique du facteur de transcription EGR1 dans les kératinocytes du poil et son induction au cours de l'entrée en anagène suggère qu'il joue un rôle important dans l'homéostasie du follicule pileux.

Applications diagnostiques

Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de l'alopécie chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1 (EGR1), 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 sujet contrôle.

L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de cette protéine EGR1 par un test immunohistochimique ou immunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du facteur de transcription EGR1 peut être également envisagé.

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

Dans le cadre d'un suivi de l'évolution de l'alopécie, le « sujet contrôle » fait référence au même sujet à un temps différent, qui correspond de préférence au début du traitement (T_0). Cette mesure de la différence de l'expression ou d'activité de la protéine EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet notamment de suivre l'efficacité d'un traitement, notamment un traitement par un modulateur du facteur de transcription EGR1, tel qu'envisagé plus haut ou par un autre traitement contre l'alopécie. Un tel suivi peut conforter le patient quant au bien fondé, ou à la nécessité, de poursuivre ce traitement.

Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer une alopécie, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1 (EGR1), 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 sujet contrôle.

Là encore, l'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine EGR1, par un test immunohistochimique ou immunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm

correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du facteur de transcription EGR1 peut être également envisagé.

Le sujet testé est ici un sujet asymptomatique, ne présentant aucun trouble capillaire lié à une alopecie. Le sujet « contrôle », dans cette méthode, signifie un sujet ou une population de
5 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'alopecie.

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
10 l'échantillon peut être néanmoins une préparation de cellules de la peau, obtenues par exemple par épilation de cheveux ou biopsie.

Méthodes de criblage

Un autre objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour
15 le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité du facteur de transcription Early Growth Response 1 (EGR1) ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, ladite modulation indiquant l'utilité du composé pour le traitement préventif ou curatif de l'alopecie. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler
20 l'expression ou l'activité du facteur de transcription EGR1, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie, comprenant les étapes
25 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 ;
- 30 c. mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine EGR1, 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 de la protéine EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité
35 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 le niveau d'expression ou d'activité du facteur de transcription EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses

promoteurs, à savoir éventuellement une inhibition, mais de préférence une stimulation, partielle ou complète.

Ainsi, les composés testés à l'étape d) ci-dessus induisent de préférence l'expression ou l'activité de la protéine EGR1, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

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 facteur de transcription EGR1.

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 EGR1, 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 codé 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 codant pour le facteur de transcription EGR1, et l'étape c) décrite ci-dessus 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 EGR1 de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule de prostate, ou encore mieux une cellule de la peau, des kératinocytes du follicule pileux ou des fibroblastes de papille dermique. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale, comme par exemple des cheveux, ou des follicules pileux de vibrisses.

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour le facteur de transcription EGR1, de préférence humaine 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 EGR1 peut être déterminée en mesurant 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 avec les 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, l'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 (par exemple radioactif ou enzymatique) du messager 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. 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 exemple par autoradiographie ou chimioluminescence.

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-Early growth response 1 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 par 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).

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.

Des dosages ELISA, des immunoessais, 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 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'hydrolysats) est effectuée par séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leurs propriétés physico-chimique (phase inverse). La détermination de la masse des peptides ainsi séparés est 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).

Le facteur de transcription EGR1 peut être produit selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Il peut également être produit 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.

Modulateurs du facteur de transcription

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur du facteur de transcription EGR1 susceptible d'être obtenu selon l'une des méthodes décrites ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie.

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur du facteur de transcription EGR1, à un patient nécessitant un tel traitement.

De préférence, de tels modulateurs sont des activateurs (ou inducteurs) du facteur de transcription EGR1.

5 L'invention comprend l'utilisation de composés inducteurs du facteur de transcription EGR1, tels que ceux identifiés par la méthode de criblage décrite plus haut, pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie.

10 Les composés modulateurs sont formulés au sein de compositions pharmaceutiques, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions peuvent être administrées par exemple par voie 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, 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.

15 Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau, des muqueuses et du cuir chevelu 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 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.

20 La composition peut comprendre une teneur en modulateur du facteur de transcription Early Growth Response 1 allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

30 La composition pharmaceutique peut en outre contenir des additifs inertes ou des combinaisons de ces additifs, tels que :

- des agents mouillants;
- des agents d'amélioration de la saveur;
- 35 - des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;
- des agents stabilisants;
- 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 ;
- et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

5

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

Légende des figures :

10 **La Figure 1** illustre l'induction du passage en anagène par ovariectomie. Des souris femelles, dont les follicules pileux de la région dorsale étaient en télogène au Jour 0, ont été soumises à une ovariectomie ou non (contrôle) au jour 1 de l'étude. Un prélèvement de la peau de la région du dos des souris a été effectué aux jours 0, 6 et 8 de l'étude. La Figure 1A représente une coupe histologique de peau de la région dorsale d'une souris au jour 0 de l'étude. La Figure 1B
15 est la photographie d'une coupe histologique de peau de la région dorsale d'une souris ovariectomisée au jour 7 de l'étude. La Figure 1C représente une coupe histologique de peau de la région dorsale d'une souris ovariectomisée au jour 8 de l'étude. La Figure 1D représente une coupe histologique de peau de la région dorsale d'une souris contrôle au jour 8 de l'étude. L'analyse histologique montre clairement que l'ovariectomie a induit le passage en anagène
20 (Figure 1C).

La Figure 2 est un tableau 1 qui présente la modulation du niveau d'expression du facteur de transcription EGR1, exprimée par rapport au Jour 0 de l'étude, dans la peau de la région dorsale de souris ovariectomisées au jour 8 de l'étude et dans la peau de la région dorsale de souris
25 contrôle (peau en phase télogène) au jour 8 de l'étude par utilisation de la technologie des puces Affymetrix. Des souris femelles, dont les follicules pileux de la région dorsale étaient en télogène au Jour 0, ont été soumises à une ovariectomie au jour 1 de l'étude. Des souris non ovariectomisées ont été conservées pour servir de groupe contrôle. Un prélèvement de la peau de la région dorsale des souris a été effectué aux jours 0 et 8 de l'étude. Les ARN ont été isolés et l'expression des gènes a été analysée par la technologie des puces Affymetrix.
30

La Figure 3 est un histogramme représentant la modulation du facteur de transcription EGR1, dans la peau de la région dorsale de souris femelles exprimée par rapport au jour 0 de l'étude, au cours de l'entrée en anagène induite par l'ovariectomie. Des souris femelles, dont les
35 follicules pileux de la région dorsale étaient en télogène au Jour 0, ont été soumises à une ovariectomie ou non (contrôle) au jour 1 de l'étude. Un prélèvement de la peau de la région dorsale des souris a été effectué aux jours 0, 1, 2, 4, 6 et 8 de l'étude. Les ARN ont été isolés et l'expression des gènes a été analysée par la technique des puces Affymetrix. L'analyse de

l'expression génique montre clairement que le gène EGR1 est induit chez les animaux entrant en anagène.

5 **La Figure 4** montre l'expression, par hybridation *in situ*, du facteur de transcription EGR1 dans les follicules pileux en début d'anagène de la peau de la région dorsale de souris. La Figure 4A est la photographie de l'image en fond noir d'une coupe de peau d'une souris, dont les follicules pileux de la région dorsale sont en anagène précoce, soumise à une hybridation *in situ* utilisant une sonde sens du facteur de transcription EGR1 (contrôle négatif). La Figure 4B est la
10 photographie de la même coupe histologique contre-colorée à l'hématoxyline. Cette photographie (4B) sert à se repérer sur l'image en fond noir (4A).

La Figure 4C est la photographie de l'image en fond noir d'une coupe de peau d'une souris, dont les follicules pileux de la région dorsale sont en anagène précoce, soumise à une hybridation *in situ* utilisant une sonde anti-sens du facteur de transcription EGR1, les structures
15 histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées par l'accumulation de points lumineux (grains argentés). La Figure 4D est la photographie de la même coupe histologique contre-colorée à l'hématoxyline. Cette photographie (4D) sert à se repérer sur l'image en fond noir (4C). Les zones de marquage sont signalées par des flèches.

20 **La Figure 5** montre l'expression, par hybridation *in situ*, du facteur de transcription EGR1 dans les follicules pileux en anagène tardive de la peau de la région dorsale de souris.

La Figure 5A est la photographie de l'image en fond noir d'une coupe de peau d'une souris, dont les follicules pileux de la région dorsale sont en anagène tardive, soumise à une hybridation *in situ* utilisant une sonde sens du facteur de transcription EGR1 (contrôle négatif).
25 La Figure 5B est la photographie de la même coupe histologique contre-colorée à l'hématoxyline. Cette photographie (5B) sert à se repérer sur l'image en fond noir (5A).

La Figure 5C est la photographie de l'image en fond noir d'une coupe de peau d'une souris, dont les follicules pileux de la région dorsale sont en anagène tardive, soumise à une hybridation *in situ* utilisant une sonde anti-sens du facteur de transcription EGR1, les structures
30 histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées par l'accumulation de points lumineux (grains argentés). La Figure 5D est la photographie de la même coupe histologique contre-colorée à l'hématoxyline. Cette photographie (5D) sert à se repérer sur l'image en fond noir (5C). Les zones de marquage sont signalées par des flèches. L'analyse par hybridation *in situ* montre clairement que les transcrits sont exprimés de façon spécifique dans
35 les follicules pileux en anagène.

Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

Exemple 1 : Expression de EGR1 au cours de l'entrée en anagène induite par l'ovariectomie par la technologie des puces Affymetrix.

Méthodes :

- 5 Des souris C57BL/6 femelles de 42 jours dont les follicules pileux de la région dorsale étaient en télogène (Chase, 1954) ont été ovariectomisées ou non au jour 1 de l'étude. L'ovariectomie pratiquée pendant la phase télogène provoque sous une semaine une entrée massive des follicules pileux de la région dorsale en phase anagène (Chanda, 2000.) alors que les follicules pileux de la région dorsale des animaux contrôles sont toujours en télogène.
- 10 Des prélèvements de peau ont été réalisés dans la région dorsale au jour 0, 1, 2, 4, 6 et 8 de l'étude. Une partie du prélèvement a été utilisé pour confirmer le passage en anagène par analyse histologique. L'autre partie du prélèvement a été utilisé pour réaliser une analyse du transcriptome par la technologie des puces Affymetrix.

L'expression des gènes a été analysée sur une station Affymetrix (module microfluidique; four
15 à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les recommandations du fournisseur. En résumé, les ARN totaux isolés des tissus sont transcrits en ADNc. A partir d'ADNc double brin, les ARNc marqués à la biotine sont synthétisés en utilisant la polymérase T7 et un précurseur NTP conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de petites tailles. Toutes les étapes de biologie moléculaire sont contrôlées en utilisant le système « Lab on a chip »

20 d'Agilent pour confirmer la bonne efficacité 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 différents lavages, la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel MAS5 fourni par Affymetrix. On obtient une valeur d'expression pour chaque gène ainsi que l'indication de la présence ou l'absence de la

25 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 la région centrale de l'oligonucléotide.

30 **Résultats:**

Figure 1 :

En début d'étude au jour 0, l'analyse histologique montre que les follicules pileux de la région dorsale de la peau des souris sont en phase télogène (1A). Chez les souris soumises à une ovariectomie, les follicules pileux restent en phase télogène jusqu'au jour 6 de l'étude (1B). Au
35 jour 8 de l'étude, les follicules pileux de la région dorsale de peau de toutes les souris soumises à l'ovariectomie sont en début de phase anagène (1C). A l'inverse, les follicules pileux de la région dorsale de peau des souris contrôle (non ovariectomisées) sont restés en phase télogène. Ainsi, l'ovariectomie a induit la transition de la phase télogène à la phase anagène. La phase anagène a été initiée après le jour 6 de l'étude et est avérée par l'analyse histologique au jour 8

40 de l'étude.

Figure 2

Le facteur de transcription EGR1 est exprimé en phase télogène et en phase anagène du cycle pileux. L'analyse différentielle entre l'expression au stade télogène à (J0) et anagène (J8 ovariectomisé) montre que l'expression est plus forte (facteur 1.4) en anagène précoce par rapport au stade télogène. Chez les souris contrôles, l'expression du facteur de transcription EGR1 n'est pas induite mais réduite par rapport au début d'étude.

Figure 3

La cinétique d'expression du facteur de transcription EGR1 au cours de l'entrée phase anagène suite à l'ovariectomie indique que dans les premiers jours suivant l'ovariectomie l'expression du facteur EGR1 est réduite. De façon surprenante, lorsque la peau de la région du dos des souris ovariectomisées présente les premiers signes morphologiques de l'entrée en anagène (au jour 8 de l'étude), l'expression de facteur EGR1 est fortement induite par rapport aux jours précédents. Cette induction est bien corrélée à l'entrée en phase anagène, puisque chez les animaux contrôles dont les follicules pileux de la région dorsale sont restés en télogène, l'expression du gène EGR1 n'est pas induite.

Exemple 2 : Expression de EGR1 dans les follicules pileux de peau de la région dorsale de souris par « hybridation *in situ* »

Méthodes :

Des sondes sens et antisens ont été préparées à partir du facteur de transcription EGR1 par incubation du gène linéarisé (2µg) avec 63 µCi 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 dans un gradient d'alcool. Après séchage, les différentes sections ont été incubées dans un tampon de 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 ³⁵S marqué) à 53°C. L'excès de sonde a été éliminé et les coupes ont été inclinées dans une émulsion photographique LM1 (Amersham Biosciences, UK) et exposées dans le noir à 4°C pendant au moins un mois. Les coupes ont alors été développées et contre-colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Suite à l'incubation en présence d'une émulsion photographique, les structures histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées (accumulation de grains argentés). Un signal spécifique se manifeste par un marquage positif avec la sonde antisense (Figure 4B et Figure 5B) et l'absence de marquage avec la sonde sens (Figure 3A et Figure 4A) utilisé comme contrôle négatif.

RESULTATS:

Figure 4

Les images (A à C) montrent des follicules pileux de peau de dos de souris en tout début d'anagène. Au niveau de la Figure 4A, il n'y a pas d'accumulation de grains argentés (pas de marquage) ce qui est en accord avec les attentes des inventeurs car elle correspond au contrôle négatif. La Figure 4C montre que le facteur de transcription EGR1 est exprimé en début d'anagène et de façon spécifique dans la partie épithéliale des follicules pileux. Plus particulièrement, la colonne de kératinocytes qui se forme en anagène II juste au dessus de la papille dermique est très fortement marquée (flèche pleine) et la gaine épithéliale interne qui apparaît au stade anagène III est marquée (flèche hachurée).

Figure 5

Les images (A à C) montrent des follicules pileux de peau de dos de souris en milieu d'anagène. On observe sur la Figure 5A qu'il n'y a pas d'accumulation de grains argentés (pas de marquage) ce qui est en accord avec les attentes des inventeurs car elle correspond au contrôle négatif. La Figure 5C montre que le facteur de transcription EGR1 est exprimé en milieu d'anagène et de façon spécifique dans la partie épithéliale des follicules pileux. De façon plus précise, les gaines épithéliales interne et externe du follicule pileux en milieu d'anagène tardive (IV-V) sont fortement marquées.

Conclusion

L'exemple 1 indique qu'EGR1 est exprimé dans la peau et, de façon surprenante, est induit au cours de la transition entre la phase télogène et la phase anagène. L'exemple 2 confirme l'expression d'EGR1 dans la peau dont les follicules pileux en anagène précoce et milieu d'anagène. Egalement, il indique que le gène EGR1 est de façon surprenante spécifiquement exprimé dans les kératinocytes des follicules pileux en anagène.

L'ensemble de ces travaux permet de soutenir l'utilisation de modulateurs de l'expression du facteur EGR1 chez l'Homme pour obtenir une stimulation de la croissance des follicules pileux en induisant l'entrée en phase anagène. Egalement, ils soutiennent l'intérêt de l'utilisation de EGR1 pour diagnostiquer ou pronostiquer cette pathologie.

REVENDEICATIONS

1. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de Early Growth Response 1 ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie selon la revendication 1, 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 de la protéine Early Growth Response 1, 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 de la protéine Early Growth Response 1, 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.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à l'étape d) activent l'expression ou l'activité de la protéine Early Growth Response 1, ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.
5. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont choisies parmi les kératinocytes et les fibroblastes de la papille dermique ou du derme.

7. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1.
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.
- ~~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.~~
- 9.
10. Méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de l'alopecie chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1, ou 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.
11. Méthode selon la revendication 10, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par un immunoessai.
12. Méthode selon la revendication 11, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA.
13. Méthode selon la revendication 10, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
14. Méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer une alopecie, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1, 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.

SEQ ID No.1

5 1 ggcgagaact tggggagccg ccgcccgcct ccgcccgcgc agccagcttc cgcgcgcgca
 61 ggaccggccc ctgcccagcc ctccgcagcc gcgggcgcgc cacgcccgcc cgcgcccagg
 121 gcgagtcggg gtcgccgcct gcacgcttct cagtggtccc cgcgcccgcg atgtaacccc
 181 gccaggcccc cgcaactgtg tcccctgcag ctccagcccc gggctgcacc ccccgcgcc
 10 241 gacaccagct ctccagcctg ctcgctcagg atggccgcgg ccaaggccga gatgcagctg
 301 atgtccccgc tgcagatctc tgaccgcgtc ggatccttcc ctactcgcc caccatggac
 361 aactacccta agctggagga gatgatgctg ctgagcaacg gggctcccc a gttcctcggc
 421 gccgcccggg ccccagaggg cagcggcagc aacagcagca gcagcagcag cggggcgggg
 481 ggaggcggcg ggggcggcag caacagcagc agcagcagca gcacctcaa ccctcaggcg
 541 gacacgggga agcagcccta cgagcacctg accgcagagt cttttcctga catctctctg
 15 601 aacaacgaga aggtgctggg ggagaccagt taccgcagcc aaaccactcg actgcccccc
 661 atcacctata ctggcgcgct ttccctggag cctgcaccca acagtggcaa caccttggg
 721 cccgagcccc tcttcagctt ggtcagtgcc ctagttagca tgaccaacc accgacctcc
 781 tcgtcctcag caccatctcc agcggcctcc tccgcctccg cctcccagag cccaccccctg
 841 agctcgcgag tgcctccaa cgacagcagt cccatttact cagcggcacc caccttccc
 20 901 acgcccgaaca ctgacatttt ccctgagcca caaagccagg ccttcccggg ctcgccaggg
 961 acagcgcctc agtaccgcct tccctgctac cctgcccga aggttggctt ccaggttccc
 1021 atgatccccg actacctgtt tccacagcag cagggggatc tgggctggg caccaccagac
 1081 cagaagccct tccagggcct ggagagccgc accagcagc cttcgctaac ccctctgtct
 1141 actattaagg cctttgccac tcagtcgggc tcccaggacc tgaaggccct caataccagc
 25 1201 taccagtcct agctcatcaa acccagccgc atgcccgaagt accccaaccg gccccagcaag
 1261 acgccccccc acgaacgcct ttacgcttgc ccagtggagt cctgtgatcg ccgctctctc
 1321 cgctccgagc agctcacccg ccacatccgc atccacacag gccagaagcc cttccagtg
 1381 cgcactctga tgcgcaactt cagccgcagc gaccacctca ccaccacat ccgcacccac
 1441 acagggcga aagccttcgc ctgcgacatc tgtggaagaa agtttgccag gagcgatgaa
 30 1501 cgcaagagc ataccaagat ccacttgcgg cagaaggaca agaaagcaga agaaagtgtt
 1561 gtggcctctt cggccacctc ctctctctct tectaccctg cccgggttgc taacctctac
 1621 ccgtcccccg ttaactacct ttatccatcc ccggccaaca cctcataacc atcccctgtg
 1681 cccacctcct tctcctctcc cggctcctcg acctaccctc ccctgtgca cagtggtctc
 1741 cctccccctt cgttgcccac ccagtactcc tctgttcccc ctgctttccc gggccaggtc
 35 1801 agcagcttcc cttcctcagc tgtcaccaac tcttccagcg cctcccagag gcttccggac
 1861 atgacagcaa ccttttctcc caggacaatt gaaatttgct aaagggaaag gggaaagaaa
 1921 gggaaaaggg agaaaaagaa acacaagaga cttaaaggac agggaggagg gatggccata
 1981 ggagagggag gttcctctta gggtcagatgg aggttctcag agccaagtcc tccctctcta
 40 2041 ctggagtgga aggtctattg gccacaacat ctttctgccc acttcccctt ccccaattac
 2101 tattcccttt gacttcagct gcctgaaaca gccatgtcca agttcttcac ctctatccaa
 2161 agaacttgat ttgcatggat tttggataaa tcatttcagt atcatctcca tcatactcct
 2221 gacccttgc tcccttcaat gctagaaaaat cgagttggca aaatgggggt tgggcccctc
 2281 agagccctgc cctgcaccct tgtacagtg ctgtgccatg gatttcggtt tctctggggg
 2341 actcctgatg tgaagataat ttgcatatcc tattgtatta ttggagttta ggtcctcact
 45 2401 tgggggaaaa aaaaaaaga aaagccaagc aaaccaatgg tgatcctcta tttgtgatg
 2461 atgctgtgac aataagtttg aacctttttt tttgaaacag cagtcccagt attctcagag
 2521 catgtgtcag agtgtgtgtc cgttaacctt tttgtaataa ctgcttgacc gtactctcac
 2581 atgtggcaaa atatgggtttg gtttttcttt tttttttttt ttgaaagtgt tttttctcgc
 2641 tctttttggt ttaaaaagtt tcacgtcttg gtgcctttg tgtgatgcgc cttgctgatg
 50 2701 gcttgacatg tgcaattgtg agggacatgc tcacctctag ccttaagggg ggcagggagt
 2761 gatgatattg gggaggcttt gggagcaaaa taaggaagag ggcgtgagct agctcgggt
 2821 ctccagaatg taagaaaaca aaatctaaaa caaaatctga actctcaaaa gtctatttt
 2881 ttaactgaaa atgtaaatat ataatatat tcaggagtgg gaatgttgta gttacctact
 2941 gagtaggcgg cgatttttgt atgttatgaa catgcagttc atatttttgt ggttctattt
 55 3001 tactttgtac ttgtgtttgc ttaacaaaag tgactgtttg gcttataaac acattgaatg
 3061 cgctttattg cccatgggat atgtggtgta tatccttcca aaaaattaa acgaaaaata
 3121 agtagctgcg attggg

SEQ ID No.2

60 MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGG
 GGGGGSNSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTRLPPITYTGRFSLEPAPNS
 GNLWPEPLFSLVSLVSMINPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEP
 65 QSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLFPPQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTI
 KAFATQSGSODLKALNTSYSQLIKPSMRKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSRDELTRHIRIHTGQ
 KPFQCRICMRNFRSDHLTTHIRTHTEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATS
 SLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYSPVHSGFPPSPVATTYSSVPPAFPAQVSSF
 PSSAVTNSFASSTGLSDMTATFSPRTIEIC

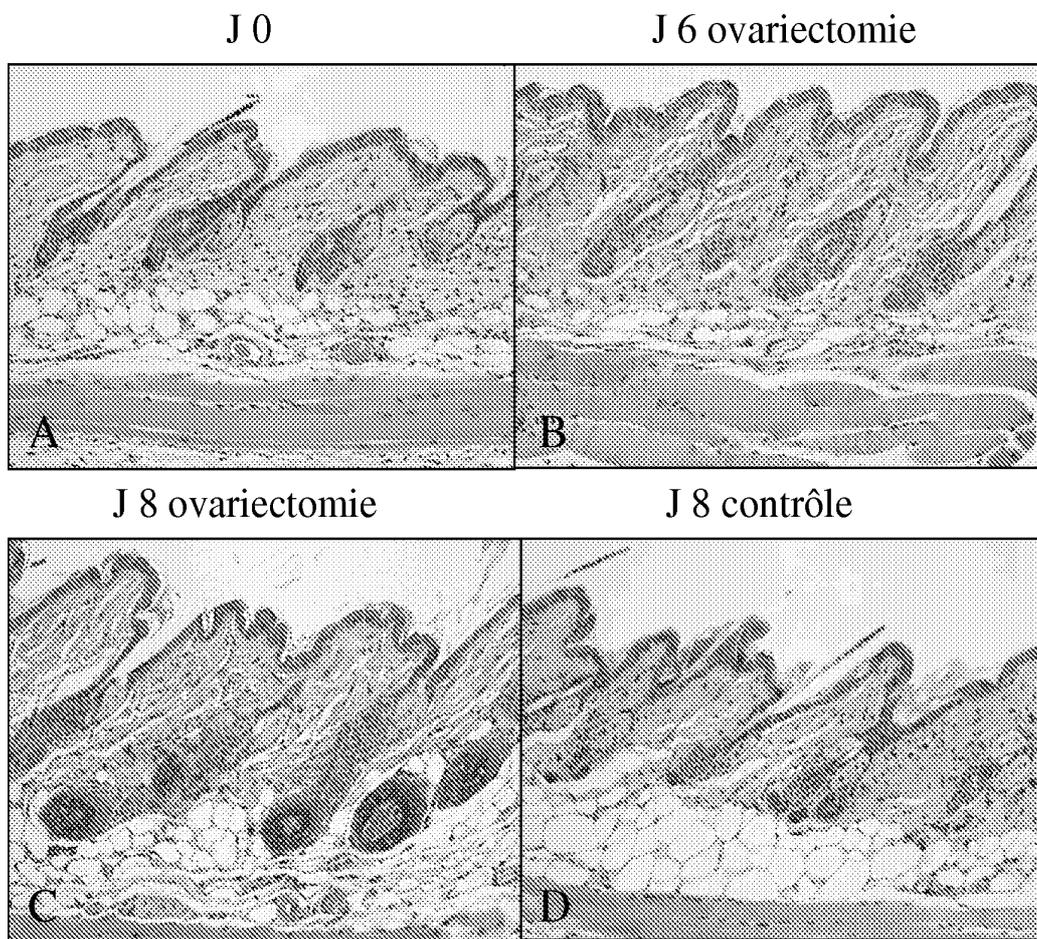
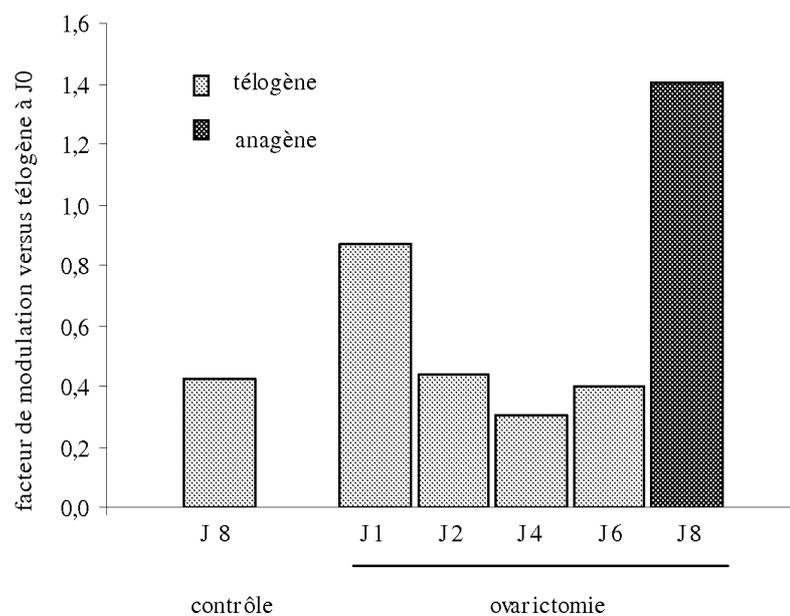


Figure 1 : Analyse histologique illustrant le passage en anagène induit par l'ovariectomie.

Identifiant Affymetrix	Nom du gène	facteur de modulation de l'expression dans la peau totale à J0 (télogène) <i>(J0 versus J0)</i> présent (1) absent (0)	facteur de modulation de l'expression au cours de l'entrée en anagène <i>(J8 ovx versus J0)</i> présent (1) absent (0)	facteur de modulation de l'expression chez les animaux témoins <i>(J8 contrôle versus J0)</i> présent (1) absent (0)
1417065_at	Egr1	1(1)	1,40 (1)	0,43 (1)

- 5 **Figure 2** : Analyse de l'expression génique montrant clairement que le gène EGR1 est induit chez les animaux en anagène (*J8 ovx*) versus les animaux contrôles (*Jo contrôles*).



10

- Figure 3** : Analyse de l'expression génique illustrant que le gène EGR1 est induit chez les animaux entrant en anagène.

15

4/4

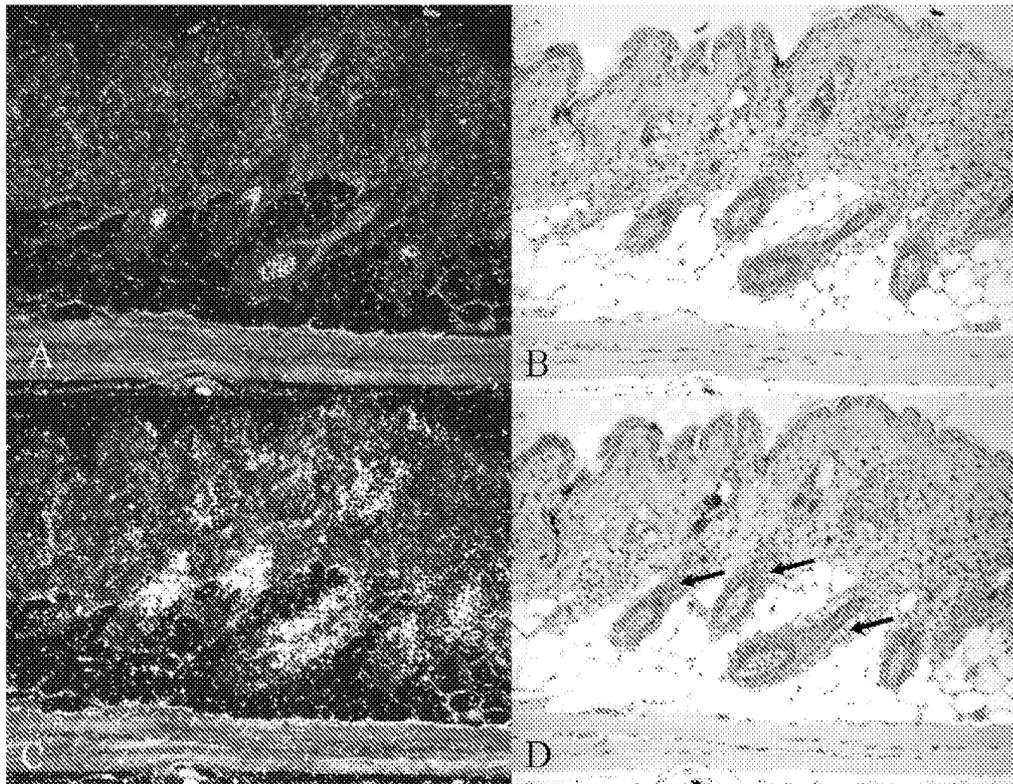


Figure 4 : Analyse par hybridation *in situ* illustrant que le gène EGR1 est exprimé dans les follicules pileux en anagène précoce.

5

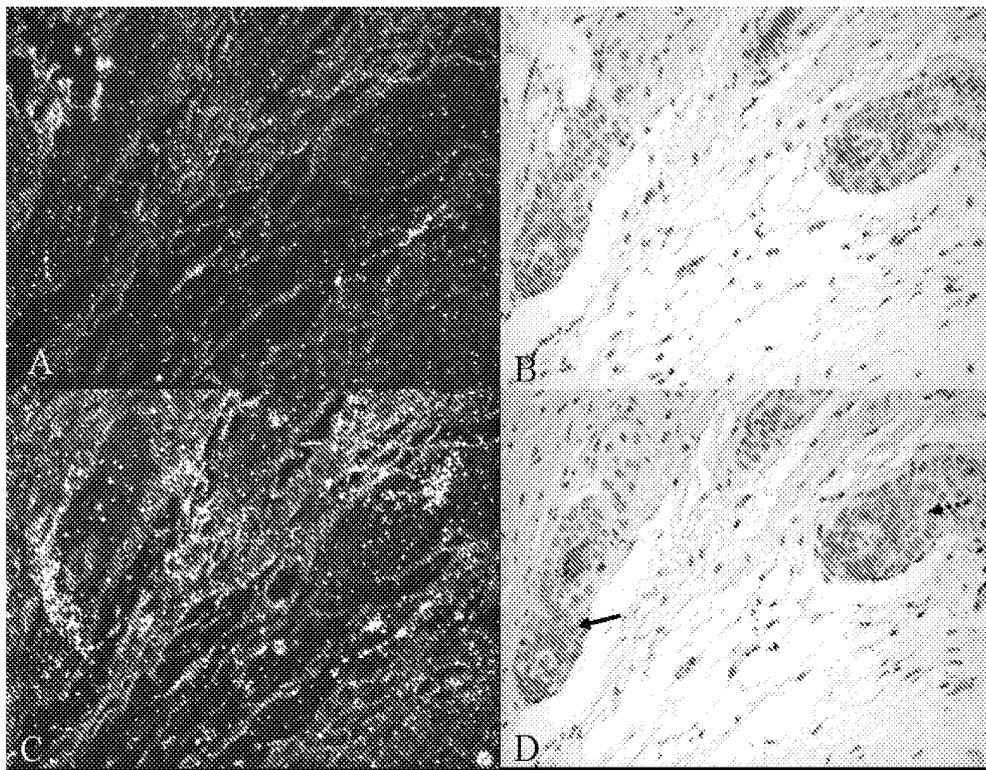


Figure 5 : Analyse par hybridation *in situ* illustrant que le gène EGR1 est exprimé dans les follicules pileux en anagène tardive.

fr0759323
SEQUENCE LISTING

<110> GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT

<120> Modulateurs de EGR1 dans le traitement de l'alopecie

<130> OA07455/GG

<140> FR0759323

<141> 2007-11-26

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3136

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

gcgcagaact tggggagccg ccgcccgc cgcgcccgc agccagcttc cgccgccgca      60
ggaccggccc ctgccccagc ctccgcagcc gcggcgcgtc cacgcccgcc cgcgcccagg    120
gcgagtcggg gtcgcccctt gcacgcttct cagtgttccc cgcgccccgc atgtaacccg    180
gccaggcccc cgcaactgtg tcccctgcag ctccagcccc gggctgcacc cccccgcccc    240
gacaccagct ctccagcctg ctctgcccag atggcccgcg ccaaggccga gatgcagctg    300
atgtccccgc tgcagatctc tgaccggttc ggatcctttc ctactcgc caccatggac     360
aactacccta agctggagga gatgatgctg ctgagcaacg gggctcccca gttcctcggc     420
gccgcccggg ccccagaggg cagcggcagc aacagcagca gcagcagcag cggggggcgg     480
ggaggcggcg ggggcggcag caacagcagc agcagcagca gcacctcaa ccctcaggcg     540
gacacggggc agcagcccta cgagcacctg accgcagagt cttttcctga catctctctg    600
aacaacgaga aggtgctggt ggagaccagt taccagcacc aaaccactcg actgcccccc    660
atcacctata ctggccgctt ttcctggag cctgcacca acagtggcaa caccttgtgg     720
cccagcccc tcttcagctt ggtcagtggc ctagtgcagc tgaccaacc accggcctcc     780
tcgtcctcag caccatctcc agcggcctcc tccgctccg cctcccagag cccaccctg     840
agctgcgcag tgccatcaa cgacagcagt cccatttact cagcggcacc caccttcccc     900
acgccgaaca ctgacathtt ccctgagcca caaagccagg cttcccggg ctcggcaggg     960
acagcgtcc agtaccgcc tctgcctac cctgcccca aggggtggctt ccaggttccc    1020
atgatccccg actacctgtt tccacagcag cagggggatc tgggcctggg caccagac     1080
cagaagccct tccagggcct ggagagccgc acccagcagc cttcgtaac ccctctgtct    1140
actattaagg ctttgccac tcagtcgggc tcccaggacc tgaaggccct caataccagc    1200
taccagtccc agctcatcaa acccagccgc atgcgcaagt accccaaccg gccagcaag     1260
acgccccccc acgaacgcc ttacgcttgc ccagtggagt cctgtgatcg ccgcttctcc    1320
cgctccgacg agctcaccg ccacatccgc atccacacag gccagaagcc cttccagtgc    1380
cgcatctgca tgcgcaactt cagccgcagc gaccacctca ccaccacat ccgcaccac     1440

```

fr0759323

acaggcgaaa agcccttcgc ctgcgacatc tgtggaagaa agtttgccag gagcgatgaa	1500
cgcaagaggc ataccaagat ccacttgcg cagaaggaca agaaagcaga caaaagtgtt	1560
gtggcctctt cggccacctc ctctctctct tcctaccctg ccccggttgc tacctcttac	1620
ccgtccccgg ttactacctc ttatccatcc cgggccacca cctcataccc atcccctgtg	1680
cccacctcct tctcctctcc cggctcctcg acctaccat ccctgtgca cagtggcttc	1740
ccctccccgt cggtgggcac cacgtactcc tctgttcccc ctgctttccc ggcccaggtc	1800
agcagcttcc cttcctcagc tgtcaccaac tccttcagcg cctccacagg gctttcggac	1860
atgacagcaa ctttttctcc caggacaatt gaaatttgct aaagggaaag gggaaagaaa	1920
gggaaaaggg agaaaaagaa acacaagaga cttaaaggac aggaggagga gatggccata	1980
ggagaggagg gttcctctta ggtcagatgg aggttctcag agccaagtcc tccctctcta	2040
ctggagtgga aggtctattg gccaacaatc ctttctgccc acttccccctt cccaattac	2100
tattccccctt gacttcagct gcctgaaaca gccatgtcca agttcttcac ctctatccaa	2160
agaacttgat ttgcatggat tttggataaa tcatttcagt atcatctcca tcatatgcct	2220
gacccttgc tcccttcaat gctagaaaat cgagttggca aaatgggggt tgggccctc	2280
agagccctgc cctgcaccct tgtacagtgt ctgtgccatg gatttcgttt ttcttggggt	2340
actcttgatg tgaagataat ttgcatattc tattgtatta tttggagtta ggtcctcact	2400
tgggggaaaa aaaaaaaga aaagccaagc aaaccaatgg tgatcctcta ttttgtgatg	2460
atgctgtgac aataagtttg aacctttttt tttgaaacag cagtcccagt attctcagag	2520
catgtgtcag agtgttgttc cgttaacctt tttgtaaata ctgcttgacc gtactctcac	2580
atgtggcaaa atatggtttg gtttttcttt tttttttttt ttgaaagtgt tttttcttcg	2640
tccttttggg ttaaaaagtt tcacgtcttg gtgccttttg tgtgatgctg cttgctgatg	2700
gcttgacatg tgcaattgtg agggacatgc tcacctctag ccttaagggg ggcagggagt	2760
gatgatttgg gggaggcttt gggagcaaaa taaggaagag ggctgagctg agcttcggtt	2820
ctccagaatg taagaaaaca aatctaaaa caaatctga actctcaaaa gtctattttt	2880
ttaactgaaa atgtaaattt ataaatata tcaggagtgt gaatgttgta gttacctact	2940
gagtaggcgg cgatttttgt atgttatgaa catgcagttc attattttgt ggttctattt	3000
tactttgtac ttgtgtttgc ttaacaaaag tgactgtttg gcttataaac acattgaatg	3060
cgctttattg cccatgggat atgtggtgta tacccttcca aaaaattaa acgaaaataa	3120
agtagctgcg attggg	3136

<210> 2
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

fr0759323

<400> 2

Met Ala Ala Ala Lys Ala Glu Met Gln Leu Met Ser Pro Leu Gln Ile
 1 5 10 15
 Ser Asp Pro Phe Gly Ser Phe Pro His Ser Pro Thr Met Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Pro Lys Leu Glu Glu Met Met Leu Leu Ser Asn Gly Ala Pro Gln Phe
 35 40 45
 Leu Gly Ala Ala Gly Ala Pro Glu Gly Ser Gly Ser Asn Ser Ser Ser
 50 55 60
 Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Ser Ser Ser Thr Phe Asn Pro Gln Ala Asp Thr Gly Glu Gln Pro
 85 90 95
 Tyr Glu His Leu Thr Ala Glu Ser Phe Pro Asp Ile Ser Leu Asn Asn
 100 105 110
 Glu Lys Val Leu Val Glu Thr Ser Tyr Pro Ser Gln Thr Thr Arg Leu
 115 120 125
 Pro Pro Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Phe Ser Leu Glu Pro Ala Pro Asn
 130 135 140
 Ser Gly Asn Thr Leu Trp Pro Glu Pro Leu Phe Ser Leu Val Ser Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ser Met Thr Asn Pro Pro Ala Ser Ser Ser Ser Ala Pro Ser
 165 170 175
 Pro Ala Ala Ser Ser Ala Ser Ala Ser Gln Ser Pro Pro Leu Ser Cys
 180 185 190
 Ala Val Pro Ser Asn Asp Ser Ser Pro Ile Tyr Ser Ala Ala Pro Thr
 195 200 205
 Phe Pro Thr Pro Asn Thr Asp Ile Phe Pro Glu Pro Gln Ser Gln Ala
 210 215 220
 Phe Pro Gly Ser Ala Gly Thr Ala Leu Gln Tyr Pro Pro Pro Ala Tyr
 225 230 235 240
 Pro Ala Ala Lys Gly Gly Phe Gln Val Pro Met Ile Pro Asp Tyr Leu
 245 250 255
 Phe Pro Gln Gln Gln Gly Asp Leu Gly Leu Gly Thr Pro Asp Gln Lys
 260 265 270

fr0759323

Pro Phe Gln Gly Leu Glu Ser Arg Thr Gln Gln Pro Ser Leu Thr Pro
 275 280 285

Leu Ser Thr Ile Lys Ala Phe Ala Thr Gln Ser Gly Ser Gln Asp Leu
 290 295 300

Lys Ala Leu Asn Thr Ser Tyr Gln Ser Gln Leu Ile Lys Pro Ser Arg
 305 310 315 320

Met Arg Lys Tyr Pro Asn Arg Pro Ser Lys Thr Pro Pro His Glu Arg
 325 330 335

Pro Tyr Ala Cys Pro Val Glu Ser Cys Asp Arg Arg Phe Ser Arg Ser
 340 345 350

Asp Glu Leu Thr Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Gln Lys Pro Phe
 355 360 365

Gln Cys Arg Ile Cys Met Arg Asn Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Thr
 370 375 380

Thr His Ile Arg Thr His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ala Cys Asp Ile
 385 390 400

Cys Gly Arg Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Arg Lys Arg His Thr Lys
 405 410 415

Ile His Leu Arg Gln Lys Asp Lys Lys Ala Asp Lys Ser Val Val Ala
 420 425 430

Ser Ser Ala Thr Ser Ser Leu Ser Ser Tyr Pro Ser Pro Val Ala Thr
 435 440 445

Ser Tyr Pro Ser Pro Val Thr Thr Ser Tyr Pro Ser Pro Ala Thr Thr
 450 455 460

Ser Tyr Pro Ser Pro Val Pro Thr Ser Phe Ser Ser Pro Gly Ser Ser
 465 470 475 480

Thr Tyr Pro Ser Pro Val His Ser Gly Phe Pro Ser Pro Ser Val Ala
 485 490 495

Thr Thr Tyr Ser Ser Val Pro Pro Ala Phe Pro Ala Gln Val Ser Ser
 500 505 510

Phe Pro Ser Ser Ala Val Thr Asn Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly Leu
 515 520 525

Ser Asp Met Thr Ala Thr Phe Ser Pro Arg Thr Ile Glu Ile Cys
 530 535 540

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 705777
FR 0759323

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	US 2003/124554 A1 (BRADDOCK MARTIN [GB] ET AL) 3 juillet 2003 (2003-07-03) page 2, [0012] - page 3, [0027], [0036 et dernière ligne; page 12, [0258]; revendications -----	1-14	C12Q1/68 G01N33/53
X	WO 99/62561 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; BRADDOCK MARTIN [GB]; CAMPBELL CALLUM JEFFREY [G] 9 décembre 1999 (1999-12-09) page 6, lignes 9-19; revendications -----	10-14	
A	MARTINEZ-MIR A ET AL: "Genetic linkage studies in alopecia areata" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY SYMPOSIUM PROCEEDINGS 200310 US, vol. 8, no. 2, octobre 2003 (2003-10), pages 199-203, XP002490295 ISSN: 1087-0024 pages 200-201 -----	1-14	
A	MARTINEZ-MIR AMALIA ET AL: "Genomewide scan for linkage reveals evidence of several susceptibility loci for alopecia areata" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 80, no. 2, février 2007 (2007-02), pages 316-328, XP002490296 ISSN: 0002-9297 page 319, "Material and methods" -----	1-14	
A	HILLMER AXEL M ET AL: "Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia" AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 77, no. 1, juillet 2005 (2005-07), pages 140-148, XP002490297 ISSN: 0002-9297 * le document en entier * -----	1-14	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
30 juillet 2008		Hennard, Christophe	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0759323 FA 705777**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 30-07-2008

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2003124554 A1	03-07-2003	AUCUN	

WO 9962561 A	09-12-1999	AT 246518 T	15-08-2003
		AU 770497 B2	26-02-2004
		AU 4156099 A	20-12-1999
		BR 9910877 A	22-01-2002
		CA 2334171 A1	09-12-1999
		CN 1311822 A	05-09-2001
		DE 69910202 D1	11-09-2003
		DE 69910202 T2	17-06-2004
		DK 1083934 T3	01-12-2003
		EE 200000790 A	15-04-2002
		EP 1083934 A2	21-03-2001
		ES 2205830 T3	01-05-2004
		HK 1034465 A1	30-01-2004
		HR 20000832 A2	30-04-2001
		HU 0103252 A2	28-12-2001
		ID 27483 A	12-04-2001
		IS 5742 A	28-11-2000
		JP 2002516676 T	11-06-2002
		NO 20006047 A	01-02-2001
		NZ 508505 A	29-04-2003
		PL 345207 A1	03-12-2001
		PT 1083934 T	31-12-2003
		SK 18322000 A3	06-11-2001
		TR 200100348 T2	23-07-2001
		TR 200102985 T2	21-06-2002
		US 6689758 B1	10-02-2004
