

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : 2 938 339

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : 08 57711

⑤1 Int Cl⁸ : G 01 N 33/68 (2006.01), C 12 Q 1/68, G 01 N 33/58,
33/543

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 13.11.08.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.05.10 Bulletin 10/19.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

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

⑦2 Inventeur(s) : DERET SOPHIE, CARLAVAN
ISABELLE, RIVIER MICHEL et AUBERT JEROME.

⑦3 Titulaire(s) : GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT
Société en nom collectif.

⑦4 Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤4 MODULATEURS DE LA PCTP DANS LE TRAITEMENT DE L'ACNE, D'UNE DERMATITE SEBORRHEIQUE OU
DE L'HYPERSEBORRHEE.

⑤7 L'invention concerne une méthode in vitro ou in vivo de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (PCTP), ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de cette protéine pour le traitement de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic in vitro de ces pathologies.

FR 2 938 339 - A1



L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (PCTP) pour le traitement de l'acné, d'une dermatite séborrhéique 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.

Une peau grasse hyperséborrhéique est caractérisée par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Classiquement, un taux de sébum supérieur à 200 μ g/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.

La dermatite séborrhéique est une dermatose inflammatoire cutanée fréquente se présentant sous la forme de plaques rouges, recouvertes de squames grasses et jaunâtres, plus ou moins prurigineuses, prédominantes dans les zones séborrhéiques.

Il existe pour ces maladies 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.

La demanderesse a maintenant découvert que le gène codant pour la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (PCTP) était exprimé préférentiellement dans les glandes sébacées humaines en comparaison avec l'épiderme.

La demanderesse démontre également que cette cible est présente dans un modèle de pharmacologie animale (rat Fuzzy), modèle pertinent pour la pathologie acné et les hyperseborrhée (Ye et al, 1997, Skin Pharmacol, 10(5-6) :288-97).

5 Plus particulièrement, son expression est modulée *in vivo* au niveau des glandes sébacées suite à un traitement topique par un ligand PPAR γ (le 5-[4-[2-(Methyl-pyridin-2-yl-amino)-ethoxy]-benzyl]-thiazolidine-2,4-dione, l'acide (S)-2-Ethoxy-3-[4-[6-(3-heptyl-1-methyl-ureido)-pyridin-2-yl]-phenyl]-propionique ou la Rosiglitazone, qui est l'acide 6-(2-Methoxy-ethoxymethoxy)-naphthalene-2-carboxylique [4'-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylmethyl)-biphenyl-3-ylmethyl]-methyl-amide, à 1%).

10

La demanderesse propose dès lors de cibler le gène PCTP ou son produit d'expression, pour prévenir et/ou améliorer l'acné, la dermatite séborrhéique ainsi que les désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, notamment l'aspect de peau grasse.

15 Il est par ailleurs connu que le traitement par un agoniste PPAR induit une forte diminution de la taille des glandes sébacées, et une réduction de l'hyperseborrhée induite par un androgène (WO2007/093747).

20 Comme la cible proposée est en aval du récepteur, c'est elle qui est responsable des effets observés au niveau des glandes sébacées et de l'excrétion en sébum.

Ainsi le gène identifié peut servir pour identifier les composés les plus actifs en tant que modulateurs PPAR, les classer, et les sélectionner. Sur cette base, il est donc également proposé une utilisation du gène PCTP ou de la protéine PCTP comme marqueur pour
25 cribler des modulateurs PPAR candidats pour le traitement de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée. Plus précisément, on peut déterminer la capacité d'un modulateur PPAR à moduler l'expression ou l'activité de PCTP ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

30 Par acné, on entend toutes les formes d'acné, à savoir notamment les acnés vulgaires, comédoniennes, polymorphes, les acnés nodulokystiques, conglobata, ou encore les acnés secondaires telles que l'acné solaire, médicamenteuse ou professionnelle. La demanderesse propose également des méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro*, *in vivo* et clinique basées sur la détection du niveau d'expression ou d'activité de la PCTP.

35

PCTP

Le terme "PCTP" désigne la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, encore appelée protéine 2 de transfert de lipides liée à la StAR, STARD2 ou protéine 2 contenant un domaine START.

5

Le gène de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine a été initialement cloné par Cohen et al en 1999 (Biochem Biophys Acta, 1447(2-3):265-70). Bien que la PCTP soit connue depuis une trentaine d'année, sa fonction biologique n'est pas encore complètement élucidée. Il est cependant acquis que la PCTP accélère *in vitro* le transfert intermembranaire des phospholipides (Wirtz et al, 1968, J Biol Chem, 243(13):3596-602) et possède une haute spécificité pour la phosphatidylcholine (Kamp et al, 1077, Biochem, 16 : 1310-1316). Sur la base de sa spécificité de liaison et de sa distribution tissulaire, certaines études suggèrent que la PCTP délivre la phosphatidylcholine au translocateur Pgp (ou P-glycoprotéine) dans la membrane canaliculaire de la bile (Smit et al, Cell, 1993, 75(3):451-62 ; Lamorte et al, 1998, Hepatol, 28 : 631-637).

10

Chez la souris, une déficience pour le gène de la PCTP n'affecte pas la sécrétion de phosphatidylcholine au niveau de la bile ou des poumons (Van Helvoort et al, 1999, PNAS, 96 : 11501-11506).

20

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène PCTP » ou « acide nucléique PCTP » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour la protéine de transfert de la phosphatidylcholine. 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 une protéine de transfert de la phosphatidylcholine hétérologue, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant pour la protéine.

25

Il existe deux transcrits alternatifs du gène PCTP codant pour deux isoformes de PCTP différentes. Les séquences d'ADNc humain de la PCTP sont reproduites en annexe (SEQ ID No.1 et SEQ ID No.3). Il s'agit respectivement de la séquence NM_021213 (Genbank) dont le cadre de lecture ouvert contient 2041 paires de bases et de la séquence NM_001102402 (Genbank) dont le cadre de lecture ouvert contient 2282 paires de bases. Le terme "PCTP" inclut ces deux isoformes.

30

Applications diagnostiques

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

35

ou d'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (PCTP), 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.

- 5 L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine PCTP selon une des méthodes telles que le Western-Blot, l'immunohistochimie, l'analyse par spectrométrie de masse (Maldi-TOF et analyse LC/MS), le radioimmunoessai (RIA) et l'ELISA ou toute autre méthode connue de l'homme du métier. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène PCTP, est de mesurer la quantité d'ARNm
10 correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité de la PCTP 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, d'une dermatite séborrhéique 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 (To). Cette mesure de la différence d'expression ou d'activité de la PCTP, ou d'expression de son gène ou d'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet
20 notamment de suivre l'efficacité d'un traitement, notamment un traitement par un modulateur de la PCTP, tel qu'envisagé plus haut, ou un autre traitement contre l'acné, une dermatite séborrhéique 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, une dermatite séborrhéique ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine PCTP, de l'expression de son
30 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.

- Là encore, l'expression de la protéine PCTP peut être déterminée par un dosage de cette protéine par immunoessai, par exemple par dosage ELISA ou par toute autre méthode citée plus haut. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène
35 PCTP, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité de la PCTP peut être également envisagé.

Le sujet testé est ici un sujet asymptomatique, ne présentant aucun trouble cutané lié à une hyperséborrhée, une dermatite séborrhéique 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, une dermatite séborrhéique 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 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* ou *in vivo* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou tout désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine 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'acné, d'une dermatite séborrhéique ou tout désordre cutané associé à une hyperséborrhée. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler l'expression ou l'activité de la PCTP, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

Plus particulièrement, l'objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique 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 de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, 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 de transfert de la phosphatidylcholine, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b),
5 par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

Une méthode de criblage *in vivo* peut être réalisée chez tout animal de laboratoire, par exemple un rongeur. Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de criblage comprend l'administration à l'animal, de préférence par application topique, du composé à
10 tester, puis éventuellement l'euthanasie de l'animal, et le prélèvement d'un feuillet épidermique, avant évaluation de l'expression du gène dans le feuillet épidermique, par toute méthode décrite ici.

Par « modulation », on entend tout effet sur l'expression ou l'activité de la protéine,
15 l'expression du 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 de transfert de la phosphatidylcholine, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs. La différence d'expression obtenue avec le
20 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'un gène » on entend la quantité d'ARNm exprimé ;

Par « expression d'une protéine », on entend la quantité de cette protéine ;

25 Par « activité de la protéine PCTP », on entend la capacité de la protéine à délivrer la phosphatidylcholine au translocateur Pgp.

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).

30

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.

5 En particulier, l'invention vise l'utilisation du gène de la PCTP ou de la protéine PCTP comme marqueur pour cribler des modulateurs PPAR candidats pour le traitement de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée. Plus précisément, on détermine la capacité d'un modulateur PPAR à moduler l'expression ou l'activité de la PCTP ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

10 De manière préférentielle, le modulateur est un modulateur PPAR γ .

Le modulateur PPAR est un agoniste ou un antagoniste PPAR, de préférence un agoniste.

15 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 de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine.

20 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 codant pour la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

25 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.

30 Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène.

35 La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène PCTP de manière endogène, comme par exemple un hépatocyte, une cellule rénale 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 la protéine PCTP, de préférence humaine, ou de mammifère.

- 5 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.

10

Dans ces méthodes, l'expression du gène PCTP ou du gène rapporteur 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 produite.

- 15 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 (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), RT-PCR quantitative (qRT-PCR), protection à la RNase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de
20 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

- 25 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
30 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
35 détectés par autoradiographie.

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-PCTP 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 Kôhler 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 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 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).

Selon un troisième mode de réalisation, la méthode de criblage comprend la mise en contact d'un composé avec une protéine PCTP et la détermination de la capacité du composé à moduler l'activité de PCTP, une différence d'activité, par rapport à un contrôle
5 réalisé en l'absence du composé, indiquant l'utilité du composé pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

De préférence, on évalue également la capacité du composé à se lier à la PCTP.

10

La détermination de la capacité du composé à moduler l'activité de la PCTP peut être réalisée de différentes manières, par exemple par mesure de l'activité de transfert de la phosphatidylcholine induite par la PCTP en présence ou en absence du composé.

15 Une méthode de mesure de l'activité de transfert de la phosphatidylcholine (PC) induite par la PCTP a été décrite dans la littérature (Helvoort et al, 1999, PNAS, 96 : 11501-11506, Van Paridon et al, 1988, Biochem, 27 : 6208-6214). Les fractions cytosoliques provenant de biopsies de foie sont centrifugées et ajustées à pH 5,5. L'activité de PCTP est déterminée en mesurant l'apparition de fluorescence après le transfert de 2-phenyl-
20 decanoyl-PC d'une vésicule donneuse contenant de la trinitrophenyl-phosphatidyléthanolamine (PE) à une vésicule acceptrice. La vésicule donneuse est constituée de 2-pyrenyl-decanoyl-PC, de PC d'œuf, d'acide phosphatidique, de trinitrophenol-PE (10 :70 :10 :10 en % de mole) et la vésicule acceptrice est constituée de PC d'œuf et de d'acide phosphatidique (95 :5 en % de mole).

25

Les composés sélectionnés par les méthodes de criblage définies ici peuvent ensuite être testés sur d'autres modèles *in vitro* et/ou *in vivo* (chez l'animal ou l'homme) pour leurs effets sur l'acné, la dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

30

Modulateurs de la protéine

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur de la protéine humaine PCTP, susceptible d'être obtenu par l'une des méthodes ci-dessus, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite
35 séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, à un patient nécessitant
5 un tel traitement.

L'invention vise enfin l'utilisation cosmétique d'un modulateur de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, pour le traitement esthétique des peaux grasses.

De manière préférentielle, le modulateur est un inhibiteur de PCTP. Le terme « inhibiteur » se réfère à un composé ou une substance chimique qui élimine ou réduit
10 substantiellement l'activité biologique de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine. 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%.

Un inhibiteur préféré interagit avec PCTP en solution à des concentrations en inhibiteur
15 de moins de 20 μ M, moins de 10 μ M, moins de 5 μ M, moins de 1 μ M, de préférence moins de 0,1 μ M, de préférence encore moins de 0,01 μ M.

Le composé modulateur peut être un anticorps inhibiteur anti-PCTP, 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
20 par ml à environ 100 μ g/ml, de préférence d'environ 1 μ g par ml à environ 5 μ g/ml.

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).

Le composé modulateur peut également être un aptamère. L'aptamère est une classe de molécules représentant en termes de reconnaissance moléculaire une alternative aux anticorps. Ce sont des séquences d'oligonucléotides ayant la capacité de reconnaître pratiquement toutes les classes de molécules cibles avec haute affinité et spécificité. De tels ligands peuvent être isolés par évolution systématique de ligand par enrichissement exponentiel (SELEX) d'une banque de séquence aléatoire comme décrit par Tuerk et Gold, 1990. La banque de séquences aléatoires peut être obtenue par synthèse chimique combinatoire d'ADN. Dans cette banque, chaque membre est un oligomère linéaire, éventuellement chimiquement modifié, d'une séquence unique. De possibles modifications, utilisations et avantages de cette classe de molécules ont été revus dans
30 Jayasena, ,1999, Clinical Chemistry 45(9):1628-1650.
35

L'invention comprend l'utilisation de tels composés inhibiteurs de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée. A titre non limitatif, on peut citer comme inhibiteurs de la protéine PCTP humaine un anticorps
5 anti-PCTP.

D'autres composés modulateurs identifiés par la méthode de criblage décrite plus haut sont également utiles.

Les composés modulateurs sont formulés au sein de composition pharmaceutique, en
10 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,
15 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.

Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au
20 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 ou de patchs polymériques ou d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette
25 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.

La composition peut comprendre une teneur en modulateur de la PCTP allant de 0,001 à
30 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 combinaisons de ces additifs, tels que

- 35
- des agents mouillants;
 - des agents d'amélioration de la saveur;

- des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;
- des agents stabilisants;
- des agents régulateurs d'humidité;
- des agents régulateurs de pH;
- 5 - 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
- 10 métaux.

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

Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

15

Exemple 1 : Expression de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine dans la glande sébacée humaine et dans l'épiderme humain

Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à
 20 la dissection 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.

L'expression des gènes a été analysée sur une station d'Affymetrix (module microfluidique; 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
 25 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 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
 30 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 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
 35 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 (voir tableau 1).

5 Tableau 1 : mesure de l'expression de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (ADRP) 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 sébacée humaine	Expression dans l'épiderme humain	Significativité de l'expression* dans la glande sébacée humaine	Significativité de l'expression* dans l'épiderme humain
218676_s_at	Phosphatidylcholine transfer protein	34	4	1	0

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

10

Exemple 2 : Expression de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine dans l'épiderme de rat

Données d'expression sur feuillet (« split ») épidermique de rat Fuzzy

15

Les études sont conduites chez le rat Fuzzy femelle (Hsd : FUZZY-fz) âgé de 10 semaines en début d'étude. Les animaux sont traités à la dose de 1% (agoniste PPAR γ Rosiglitazone en solution dans l'acétone) une fois par jour pendant 8 jours. 2 heures après le dernier traitement, les animaux sont euthanasiés et la peau du dos est prélevée.

20

Après incubation dans de la dispase, l'épiderme portant les glandes sébacée est détaché du derme (feuillet épidermique). Après broyage des échantillons, l'ARNm est préparé à l'aide de colonnes Qiagen, en accord avec les instructions du fournisseur. Le matériel ainsi préparé est soumis à une analyse du transcriptome à large échelle sur une plateforme Affymetrix. Les données sont ensuite normalisées et après analyse statistique les résultats rendus sont exprimés en unité arbitraire d'expression (voir ci-dessous) accompagné pour chaque donnée d'une valeur statistique de présence du transcrit (présence=1 ; absence=0).

25

Tableau 2 : Mesure de l'expression de PCTP dans un feuillet épidermique après 8 jours de traitement topique de la femelle rat FUZZY par un agoniste PPAR γ (Rosiglitazone) à 1 %.

Identifiant Affymetrix	Nom du gène	Expression dans la condition contrôle (DMSO)	Expression après traitement par Rosiglitazone 1%	Significativité de l'expression* dans la condition contrôle	Significativité de l'expression* après traitement par Rosiglitazone 1%
1387058_at	Phosphatidylcholine transfer protein	143	445	1	1

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

Exemple 3 : Données d'expression dans la glande sébacée de rat après traitement par un agoniste du récepteur PPAR γ :

10

Matériels et méthodes :

Animaux: Espèces: rat
 Souche: lco : Hsd: FUZZY-fz
 Sexe: femelle
 15 Age: 10 semaines

Nombre par lot : 40 (8 animaux par groupe)

Traitement: Voie d'administration : topique

Composé/lot : agonistes de PPAR γ :

20

- **A:** 5-[4-[2-(Methyl-pyridin-2-yl-amino)-ethoxy]-benzyl]-thiazolidine-2,4-dione

- **B:** acide 2-Methoxy-ethoxymethoxy)-naphthalene-2-carboxylique [4'-(2,4-dioxo-thiazolidin-5-ylmethyl)-biphenyl-3-ylmethyl]-methyl-amide ou rosiglitazone

- **C:** acide (S)-2-Ethoxy-3-[4-[6-(3-heptyl-1-methyl-ureido)-pyridin-2-yl]-phenyl]-propionique

25

Doses : 1%

Véhicule : acétone (001)

Durée 96 heures

Méthode d'évaluation : On réalise une pesée des animaux au début et à la fin de l'étude.

- 5 Des biopsies de peau sont effectuées (6 échantillons de peau excisées par rat) pour analyser l'expression des gènes (extraction d'ARN, transcriptase inverse et PCR en temps réel). Les échantillons sont conservés la nuit à 4°C avant incubation dans du bromure de sodium (NaBr) 1M pendant 2 heures à 37°C. Après incubation, les échantillons sont séparés en épiderme ou derme. Les échantillons épidermiques sont
- 10 conservés à 20°C. Dans ces conditions, les glandes sébacées se trouvent dans le feuillet épidermique. Des PCR sont réalisées en commençant par les ADNc provenant des feuillets épidermiques contenant des glandes sébacées de rats contrôle ou rats traités avec un agoniste du PPAR γ : l'ARNm est extrait en utilisant une colonne et quantifié. La qualité des ARNm est mesurée et est représenté par le rapport 18S/28S. Les résultats
- 15 sont normalisés au 18S exprimés en induction relative versus animaux non traités (groupe véhicule). L'analyse statistique est obtenue en utilisant un logiciel interne basé sur une analyse statistique Monte-Carlo modifiée.

20 **Résultats:**

PCTP	Induction Relative – Cinétique (Heures)				
	0	8	24	48	96
A	1	7.06	8.54	6.70	3.38
B	1	2.57	2.79	3.37	1.15
C	1	1.54	3.69	3.11	1.38

REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* ou *in vivo* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine (PCTP) ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
5
- 10 2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique 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 de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
20
 - d. Sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine PCTP, 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.
25
- 30 3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à l'étape d) inhibent l'expression ou l'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
- 35 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 la protéine de

transfert de la phosphatidylcholine, 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 la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, 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.
- 15 7. Méthode selon la revendication 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue, codant pour la protéine de transfert de la phosphatidylcholine.
- 20 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.
- 25 10. Méthode selon la revendication 1 comprenant la mise en contact d'un composé avec une protéine PCTP et la détermination de la capacité du composé à moduler PCTP, une différence d'activité, par rapport à un contrôle réalisé en l'absence du composé, indiquant l'utilité du composé pour le traitement préventif ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.
- 30 11. Méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution d'une acné, d'une dermatite séborrhéique ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine de transfert de la phosphatidylcholine, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un
- 35 sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

12. Méthode selon la revendication 11, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par immunoessai.
- 5 13. Méthode selon la revendication 12, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA.
14. Méthode selon la revendication 11, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
- 10 15. Méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer une acné, une dermatite séborrhéique ou un désordre cutané associé à une hyperséborrhée, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine PCTP, 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
15 biologique d'un sujet contrôle.
16. Méthode selon la revendication 15, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par un immunoessai.
- 20 17. Méthode selon la revendication 16, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA ou un radioimmunoessai.
18. Méthode selon la revendication 15, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
- 25 19. Utilisation du gène de la PCTP ou de la protéine PCTP comme marqueur pour cribler des modulateurs PPAR candidats pour le traitement de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou d'un désordre cutané associé à une hyperséborrhée.
- 30 20. Utilisation selon la revendication 19, comprenant la détermination de la capacité d'un modulateur PPAR à moduler l'expression ou l'activité de la PCTP ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
- 35 21. Utilisation selon la revendication 19 ou 20, dans laquelle le modulateur PPAR est un modulateur PPAR γ .

22. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 19 à 21, dans laquelle le modulateur est un agoniste du récepteur PPAR.



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 719854
FR 0857711

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	WO 2007/077257 A (GALDERMA RES & DEV [FR]; THIBOUTOT DIANE [US]) 12 juillet 2007 (2007-07-12) * page 4, ligne 31 - page 5, ligne 34 * * page 5, ligne 23-27 * * page 7, ligne 33 - page 8, ligne 21; revendications 5,6,9; figure 1 * * page 8, ligne 23 - page 9, ligne 9 * -----	1-18	G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/58 G01N33/543
X	FR 2 862 870 A (GALDERMA RES & DEV [FR]) 3 juin 2005 (2005-06-03) * revendications 2-5,8; exemple 2 * -----	19-22	
A	FRIEDMANN PETER S ET AL: "Peroxisome proliferator-activated receptors and their relevance to dermatology." ACTA DERMATO-VENEREOLOGICA 2005, vol. 85, no. 3, 2005, pages 194-202, XP002537032 ISSN: 0001-5555 * page 200, colonne 1, alinéa 3; figure 3 * -----	1-22	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	CHRISTOS C ZOUBOULIS ET AL: "The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in sebostasis, seborrhoea and acne" ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH ; FOUNDED IN 1869 AS ARCHIV FÜR DERMATOLOGIE UND SYPHILIS, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 300, no. 8, 9 août 2008 (2008-08-09), pages 397-413, XP019628977 ISSN: 1432-069X * tableau 2 * ----- -/--	1-22	G01N C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 juillet 2009		Vadot-Van Geldre, E	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 719854
FR 0857711

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		
A	HERZINGER THOMAS ET AL: "Sphingosine-1-phosphate signaling and the skin" AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL DERMATOLOGY, ADIS, US, vol. 8, no. 6, 1 janvier 2007 (2007-01-01), pages 329-336, XP008102278 ISSN: 1175-0561 * page 334, colonne 1, alinéas BRIDGING,COL,2 *	1-22	
A	RAKSHANDEHROO MARYAM ET AL: "Comprehensive Analysis of PPARalpha-Dependent Regulation of Hepatic Lipid Metabolism by Expression Profiling." PPAR RESEARCH 2007, vol. 2007, 2007, page 26839, XP002537034 ISSN: 1687-4757 * abrégé; figures 2,3 *	1-22	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		16 juillet 2009	Vadot-Van Geldre, E
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		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.	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie		D : cité dans la demande	
A : arrière-plan technologique		L : cité pour d'autres raisons	
O : divulgation non-écrite		
P : document intercalaire		& : membre de la même famille, document correspondant	

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0857711 FA 719854**

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 **16-07-2009**

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
WO 2007077257 A	12-07-2007	CA 2635650 A1	12-07-2007
		EP 1971868 A2	24-09-2008
		US 2009042204 A1	12-02-2009

FR 2862870 A	03-06-2005	AU 2004294760 A1	16-06-2005
		BR PI0415801 A	26-12-2006
		CA 2545140 A1	16-06-2005
		CN 1889919 A	03-01-2007
		EP 1722753 A2	22-11-2006
		WO 2005053632 A2	16-06-2005
		JP 2007512386 T	17-05-2007
		KR 20060121140 A	28-11-2006
		US 2007065471 A1	22-03-2007
		ZA 200605337 A	31-10-2007
