

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication :

**2 938 341**

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

②1 N° d'enregistrement national :

**08 57713**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **G 01 N 33/68** (2006.01), C 12 Q 1/68, G 01 N 33/543,  
33/58

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) : REINICHE PASCALE et RIVIER  
MICHEL.

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

⑦4 Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤4 **MODULATEURS DE LA MONOGLYCERIDE LIPASE 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 monoglycérade lipase (MGLL), ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de cette enzyme 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 2 938 341 - A1**



L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs de la monoglycérade lipase (MGLL) 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.

5

Une peau grasse hyperséborrhéique est caractérisée par une sécrétion et une excrétion exagérées de sébum. Classiquement, un taux de sébum supérieur à 200µg/cm<sup>2</sup> 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

10 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

15 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

20 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 dermite séborrhéique est une dermatose inflammatoire cutanée fréquente se

25 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,

30 mais avec des effets secondaires réduits.

La demanderesse a maintenant découvert que le gène codant pour la monoglycérade lipase (MGLL) était exprimé préférentiellement dans les glandes sébacées humaines en comparaison avec l'épiderme.

35

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

Plus particulièrement elle démontre que l'expression est modulée *in vivo* au niveau des glandes sébacées suite à un traitement topique par un ligand PPAR $\gamma$  (le 5-{4-[2-(Méthyl-pyridin-2-yl-amino)-ethoxy]-benzyl]-thiazolidine-2,4-dione, l'acide (S)-2-Ethoxy-3-{4-[6-(3-heptyl-1-méthyl-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

Elle propose dès lors de cibler le gène CROT 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).

Comme la cible proposé 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.

20

Ainsi le gène identifié, qui agit en aval du récepteur PPAR, 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 MGLL ou de la protéine MGLL 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. Plus précisément, on peut déterminer la capacité d'un modulateur PPAR à moduler l'expression ou l'activité de MGLL 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 MGLL.

35

### **MGLL**

Le terme "MGLL" désigne la monoglycérade lipase, encore appelée HU-K5, MGL, EC 3.1.1.23 ou protéine homologue à la lysophospholipase.

5 Dans les adipocytes et d'autres cellules, la monoglycérade lipase et la lipase sensible aux hormones (LIPE) hydrolysent les triglycérides intracellulaires stockés en acides gras et en glycérol. La MGLL pourrait aussi compléter l'action de la lipase lipoprotéique en hydrolysant les monoglycérides résultants de la dégradation des triglycérides des lipoprotéines (Karlsson et al, 2001, Gene, 272: 11-18). La MGLL est exprimée de manière  
10 ubiquitaire, bien que son profil d'expression en termes de taille et de quantité de protéine soit tissu-spécifique.

Dans le cerveau de rat, la MGLL participe à l'inactivation du 2-arachidonoylglycérol (2-AG) (Dinh et al, 2002, PNAS, 99: 10819-10824). Dans l'hippocampe, il semble que la MGLL ait une localisation présynaptique.

15

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène MGLL » ou « acide nucléique MGLL » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour la monoglycérade lipase. 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 monoglycérade lipase  
20 hétérologue, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant pour l'enzyme.

Il existe deux transcrits alternatifs du gène MGLL codant pour deux isoformes de MGLL différentes. Les séquences d'ADNc humain de la MGLL sont reproduites en annexe (SEQ ID No.1 et SEQ ID No.3). Il s'agit respectivement de la séquence NM\_007283 (Genbank)  
25 dont le cadre de lecture ouvert contient 4617 paires de bases et de la séquence NM\_001003794 (Genbank) dont le cadre de lecture ouvert contient 4192 paires de bases. Le terme "MGLL" 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 ou d'activité de la protéine monoglycérade lipase (MGLL), de l'expression de son gène ou  
35 de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.

L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de la protéine MGLL 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) ou  
5 l'ELISA ou toute autre méthode connue de l'homme du métier. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène MGLL, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant. Un dosage de l'activité de la MGLL peut être également envisagé.

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

10 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 MGLL, ou d'expression de son gène ou d'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet  
15 notamment de suivre l'efficacité d'un traitement, notamment un traitement par un modulateur de la MGLL, 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.

20

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 monoglycérade lipase (MGLL),  
25 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.

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

5 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**

10 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 monoglycéride lipase ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs, ladite  
15 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 MGLL, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

20

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 :

- 25 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 monoglycéride  
30 lipase, 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 monoglycéride lipase , de l'expression de son  
35 gène ou 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.

5 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 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.

10

Par « modulation », on entend tout effet sur l'expression ou l'activité de l'enzyme, 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  
15 l'activité de la protéine monoglycéride lipase, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs. La différence d'expression obtenue avec le composé testé par rapport à un contrôle réalisé en l'absence du composé est significative à partir de 25% ou plus.

20 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 ;

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

25 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.

30

En particulier, l'invention vise l'utilisation du gène de la MGLL ou de la protéine MGLL 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 MGLL ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

- 5 De manière préférentielle, le modulateur est un modulateur PPAR $\gamma$ .

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

- 10 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 monoglycérade lipase.

- 15 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 monoglycérade lipase, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

- 20 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.

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

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

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour la monoglycérade lipase, de préférence humaine, ou de mammifère.

- 35 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.

- 5 Dans ces méthodes, l'expression du gène MGLL 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 l'ARNm correspondant produite. Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine produite. L'homme du métier est familier des techniques permettant la détection quantitative ou
- 10 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 détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands
- 15 (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
- 20 (radioactif) du messenger à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la sonde antisens. Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases
- 25 spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéinisé et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont détectés par autoradiographie.
- 30 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-monoglycéride lipase peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de l'enzyme entière. L'antisérum est
- 35 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'hydrolysat) est effectuée par séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leur 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, l'étape a) décrite ci-dessus consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une enzyme monoglycéride lipase et un substrat de l'enzyme, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'activité enzymatique.

L'enzyme monoglycéride lipase peut être produite selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Elle peut également être produite à

l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple E. coli ou B. subtilis), des levures (par exemple Saccharomyces, Pichia) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

- 5 La détermination de l'activité enzymatique comprend de préférence la détermination de l'activité lipase, par exemple par mesure de la quantité de produit apparu.

Des dosages de l'activité enzymatique de la MGLL sont décrits dans la littérature (voir par exemple Dinh et al, 2002, PNAS, 99: 10819-10824). On peut citer par exemple la  
10 méthode suivante:

Les protéines enzymatiques (50 µg) obtenues après extraction des peroxysomes et des membranes sont incubées dans un tampon salin (50 mM, pH8) avec du 2-oléoyl-<sup>3</sup>H]glycérol ou du 2-<sup>3</sup>H]-arachidonoylglycérol (AG) (10 µM, 5000 cpm) pendant 30 minutes à 37°C. La concentration de substrat est déterminée pour reproduire des  
15 conditions physiologiques. La réaction est stoppée et les produits sont séparés par extraction au solvant organique (chloroforme méthanol, 1:1). Lorsque le 2-oléoyl-<sup>3</sup>H] glycérol est utilisé, on mesure le relarguage de <sup>3</sup>H] glycérol dans la phase aqueuse par mesure de la quantité de scintillation. Lorsque le 2-<sup>3</sup>H]- AG est utilisé, on soumet la phase organique au fractionnement TLC et on analyse les produits tels que décrit plus  
20 haut.

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  
25 hyperséborrhée.

### **Modulateurs de l'enzyme**

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur de l'enzyme humaine monoglycéride lipase, susceptible d'être obtenu par l'une des méthodes ci-dessus, pour la  
30 préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite 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  
35 modulateur de l'enzyme humaine monoglycéride lipase, à un patient nécessitant un tel traitement.

L'invention vise enfin l'utilisation cosmétique d'un modulateur de l'enzyme humaine monoglycéride lipase, pour le traitement esthétique des peaux grasses.

De manière préférentielle, le modulateur est un inhibiteur de l'enzyme. Le terme « inhibiteur » se réfère à un composé ou une substance chimique qui élimine ou réduit substantiellement l'activité enzymatique de la monoglycéride lipase. 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%. Plus particulièrement, il peut s'agir d'un composé qui interagit avec, et bloque, le site catalytique de l'enzyme, comme des composés du type inhibiteur compétitif ou non compétitif.

Un inhibiteur préféré interagit avec l'enzyme en solution à des concentrations en inhibiteur de moins de  $1\mu\text{M}$ , de préférence moins de  $0,1\mu\text{M}$ , de préférence encore moins de  $0,01\mu\text{M}$ .

Le composé modulateur peut être un anticorps inhibiteur anti-monoglycéride lipase, 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  $0.01\mu\text{g}$  par ml à environ  $100\mu\text{g/ml}$ , de préférence d'environ  $1\mu\text{g}$  par ml à environ  $5\mu\text{g/ml}$ .

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 séquence aléatoire 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 Jayasena, ,1999.

Certains composés sulfhydryles ont été mis en évidence comme inhibiteurs de l'enzyme MGLL (Chau et al, 1988, Biochim Biophys Acta, 963(3):436-444). L'invention comprend l'utilisation de tels composés inhibiteurs de la monoglycérade lipase pour le traitement préventif et/ou curatif de l'acné, d'une dermatite séborrhéique ou des désordres cutanés associés à une hyperséborrhée.

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

10 Les composés modulateurs sont formulés au sein de composition pharmaceutique, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions peuvent être administrées par exemple par voie orale, entérale, parentérale, ou topique. De préférence, la composition pharmaceutique est appliquée par voie topique. Par voie orale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, 15 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.

20 Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau et des muqueuses et peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques 25 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.

30 La composition peut comprendre une teneur en modulateur de la MGLL allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

La composition pharmaceutique peut en outre contenir des additifs inertes ou des 35 combinaisons de ces additifs, tels que

- des agents mouillants;

- des agents d'amélioration de la saveur;
- des agents conservateurs tels que les esters de l'acide parahydroxybenzoïque;
- des agents stabilisants;
- des agents régulateurs d'humidité;
- 5 - 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
- 10 butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

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

## 15 Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

### Exemple 1 : Expression de la monoglycérade lipase dans la glande sébacée humaine et dans l'épiderme humain

- 20 Des glandes sébacées humaines ont été séparées de l'épiderme humain par traitement à la dispase et dissection sous une loupe binoculaire. Des échantillons d'ARN totaux ont été préparés à partir des glandes sébacées et à partir de l'épiderme.
- L'expression des gènes a été analysée sur une station d'Affymetrix (module microfluidique; four à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les protocoles fournis
- 25 par la société. En bref, l'ARN total isolé des tissus est transcrit en ADNc. A partir de l'ADNc double brin, on synthétise un ARNc marqué à la biotine en utilisant la polymérase T7 et un NTP précurseur conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de 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
- 30 réactions enzymatiques. La puce Affymetrix est hybridée avec l'ARNc biotinylé, rincée et ensuite marquée par fluorescence en utilisant un fluorophore conjugué à la Streptavidine. Après des lavages, la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel 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
- 35 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 (voir tableau 1).

- 5 Tableau 1 : mesure de l'expression de la monoglycérade lipase 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
211026_s_at	monoglyceride lipase	182	158	1	1

\*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 la monoglycérade lipase 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 $\gamma$  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. Après incubation dans de la dispase, l'épiderme portant les glandes sébacée est détaché
- 20 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)
- 25 accompagné pour chaque donnée d'une valeur statistique de présence du transcrit (présence=1 ; absence=0).

Tableau 2 : Mesure de l'expression de la MGLL dans un feuillet épidermique après 8 jours de traitement topique de la femelle rat FUZZY par un agoniste PPAR $\gamma$  (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%
1388644_at	Mono-glyceride lipase	214	576	1	1

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

10 **Exemple 3 : Données d'expression dans la glande sébacée de rat après traitement par un agoniste du récepteur PPAR $\gamma$  :**

**Matériels et méthodes :**

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

Nombre par lot : 40 (8 animaux par groupe)

Traitement: Voie d'administration : topique

20 Composé/lot : agonistes de PPAR $\gamma$ :

- **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

- 5 Méthode d'évaluation : On réalise une pesée des animaux au début et à la fin de l'étude. 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
- 10 échantillons sont séparés en épiderme ou derme. Les échantillons épidermiques sont 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
- 15 feuillets épidermiques contenant des glandes sébacées de rats contrôle ou rats traités avec un agoniste du PPAR $\gamma$  : 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 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:**

<b>MGLL</b>	<b>Induction Relative – Cinétique (Heures)</b>				
<b>Traitement</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>24</b>	<b>48</b>	<b>96</b>
<b>A</b>	1	2.37	5.06	3.13	5.76
<b>B</b>	1	1.17	2.21	3.12	1.61
<b>C</b>	1	5.01	3.90	3.88	3.86

## REVENDEICATIONS

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 monoglycérade lipase (MGLL) 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 monoglycérade lipase, 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 monoglycérade lipase, 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 monoglycérade lipase, 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 monoglycérade lipase, 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 la monoglycérade lipase, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
- 5 6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des sébocytes.
7. Méthode selon la revendication 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue, codant pour la monoglycérade lipase.
- 10 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.
- 15 9. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de traduction dudit gène.
- 10 10. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que l'étape a) consiste à préparer des mélanges réactionnels comprenant chacun une enzyme monoglycérade lipase et un substrat de l'enzyme, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'activité enzymatique.
- 20 11. Méthode selon la revendication 10, dans laquelle la détermination de l'activité enzymatique comprend la détermination de l'activité lipase.
- 25 12. 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 monoglycérade lipase, 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.
- 30 13. Méthode selon la revendication 12, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par immunoessai.
- 35

14. Méthode selon la revendication 13, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA.
- 5 15. Méthode selon la revendication 12, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
- 10 16. 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 monoglycérade lipase, 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.
- 15 17. Méthode selon la revendication 16, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par un immunoessai.
18. Méthode selon la revendication 17, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA ou un radioimmunoessai.
- 20 19. Méthode selon la revendication 16, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
- 25 20. Utilisation du gène de la monoglycérade lipase ou de la protéine monoglycérade lipase 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 21. Utilisation selon la revendication 20, comprenant la détermination de la capacité d'un modulateur PPAR à moduler l'expression ou l'activité de la monoglycérade lipase ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
22. Utilisation selon la revendication 20 ou 21, dans laquelle le modulateur PPAR est un modulateur PPAR $\gamma$ .
- 35 23. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, 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 719855  
FR 0857713

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 2004/026405 A (MEDIGENE AG [DE]; NIELAND JOHN [NL]; GANDER-MEISTERERNST IRENE [DE]; R) 1 avril 2004 (2004-04-01) * page 1, ligne 6-9; revendications 13-16 * * page 5, ligne 6-15 *	1-23	G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/543 G01N33/58
X	WO 2008/009855 A (GALDERMA RES & DEV [FR]; LABRIE FERNAND [CA] GALDERMA RES & DEV [FR];) 24 janvier 2008 (2008-01-24) * page 1, ligne 3-6 * * page 2, ligne 26 - page 3, ligne 36 * * page 3, ligne 15-30 *	1-23	
X,D	WO 2007/093747 A (GALDERMA RES & DEV [FR]; BOITEAU JEAN-GUY [FR]; CLARY LAURENCE [FR]; R) 23 août 2007 (2007-08-23) * page 6 - page 8 *	1-23	
A	FESTUCCIA W T ET AL: "PPAR[gamma] agonism increases rat adipose tissue lipolysis, expression of glyceride lipases, and the response of lipolysis to hormonal control" DIABETOLOGIA ; CLINICAL AND EXPERIMENTAL DIABETES AND METABOLISM, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 49, no. 10, 14 août 2006 (2006-08-14), pages 2427-2436, XP019417900 ISSN: 1432-0428 * page 2428, colonne 1, alinéa 2 * * page 2432, colonne 1, alinéas 1,2 * ----- -/--	1-23	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)  G01N C12N C07K C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 juillet 2009		Vadot-Van Geldre, E	
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			

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 719855  
FR 0857713

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	<p>LENMAN A ET AL: "Interaction of ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor c with the endocannabinoid system" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 151, no. 8, août 2007 (2007-08), pages 1343-1351, XP002535852 ISSN: 0007-1188 * page 1344, colonne 1, alinéas 2,3 * * page 1349, colonne 2, ligne 1,2 * * page 1348, colonne 1, alinéas BRIDGING,COL,2 *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-23	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 juillet 2009		Vadot-Van Geldre, E	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>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</p>		<p>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 ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0857713 FA 719855**

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 **15-07-2009**

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 2004026405 A	01-04-2004	AU 2003262515 A1	08-04-2004
		CA 2499484 A1	01-04-2004
		EP 1549398 A1	06-07-2005
----- WO 2008009855 A	24-01-2008	CA 2656839 A1	24-01-2008
		EP 2046974 A2	15-04-2009
		FR 2903999 A1	25-01-2008
----- WO 2007093747 A	23-08-2007	FR 2897534 A1	24-08-2007
-----			