

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 décembre 2011 (15.12.2011)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2011/154639 A2

(51) Classification internationale des brevets :
G01N 33/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2011/051217

(22) Date de dépôt international :
27 mai 2011 (27.05.2011)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
61/344,215 11 juin 2010 (11.06.2010) US

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

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : SUZUKI,
Itaru [FR/FR]; 11, Avenue des Cades, Domaine Clair-
Bois, F-83440 Fayence (FR).

(74) Mandataire : ANDRAL, Christophe; L'OREAL,
D.I.P.I., 25-29 Quai Aulagnier, F-92665 ASNIERES-
SUR-SEINE Cedex (FR).

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

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

— avec la partie de la description réservée au listage des
séquences (règle 5.2.a))

(54) Title : EDN3 AND/OR EDNRB MODULATORS IN THE TREATMENT OF MELASMA

(54) Titre : MODULATEURS DE EDN3 ET/OU EDNRB DANS LE TRAITEMENT DU MELASMA

(57) Abstract : The invention relates to an *in vitro* method of screening for candidate compounds for the preventive or curative treatment of melasma, which comprises determining the capacity of a compound to modulate EDN3 and/or EDNRB expression or activity, and also to the use of modulators of EDN3 and/or EDNRB expression or activity for the treatment of melasma. The invention also relates to methods for *in vitro* diagnosis or prognosis of this pathological condition.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif ou curatif du melasma, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de EDN3 et/ou EDNRB, ainsi que l'utilisation de modulateurs de l'expression ou de l'activité de EDN3 et/ou EDNRB pour le traitement du melasma. L'invention concerne aussi des méthodes de diagnostic ou pronostic *in vitro* de cette pathologie.



WO 2011/154639 A2

Modulateurs de EDN3 et/ou EDNRB dans le traitement du melasma

L'invention concerne l'identification et l'utilisation de composés modulateurs de EDN3 et/ou
5 EDNRB, pour le traitement du melasma. Elle concerne aussi des méthodes de diagnostic in vitro ou pronostic in vitro de cette pathologie.

Art antérieur et description de la situation

10 Chez l'homme, la pigmentation résulte de la synthèse et de la distribution des pigments mélaniques dans la peau, les follicules pileux ou les yeux.

La pigmentation est génétiquement prédéfinie mais elle est régulée par de nombreux facteurs internes ou externes.

Les mélanines produites par les mélanocytes ainsi que le nombre de mélanocytes, leur activité
15 tyrosinase et leur capacité à exporter les mélanines vers les kératinocytes, la taille des mélanosomes qui contiennent des grains de mélanine, vont conditionner la couleur de la peau humaine. Parmi les pathologies liées à une pigmentation excessive, on peut citer le melasma.

Le melasma est une hyperpigmentation acquise généralement symétrique des zones photo-
20 exposées de la face (front, joues, tempes) et parfois du cou. Les lésions élémentaires sont de petites macules au contour irrégulier, dont la couleur va du brun clair au noir et s'accroît après exposition solaire.

Le melasma touche principalement les femmes (90 p. 100 des cas), surtout durant la grossesse. Certains le considèrent d'ailleurs comme une modification physiologique chez la femme
25 enceinte au même titre que l'hyperpigmentation des aréoles, des muqueuses génitales et de la ligne blanche abdominale, ou linea fusca, dont le traitement est similaire à celui du melasma. Les caractéristiques cliniques et anatomopathologiques sont identiques dans les deux sexes. On distingue trois présentations cliniques différentes : le melasma centrofacial le plus fréquent, le melasma malaire et le mandibulaire.

30 À l'examen anatomopathologique, on retrouve une hyperpigmentation d'origine mélanique pouvant se situer au niveau épidermique et/ou dermique. Le nombre de mélanocytes n'est pas modifié, mais la production de mélanine par les mélanocytes des assises basales est augmentée.

L'examen en lumière de Wood est très utile, il permet de distinguer trois types de melasma en fonction de la distribution pigmentaire :

- le type épidermique (70 p. 100 des cas) où l'hyperpigmentation est accentuée ;
- le type dermique (10 p. 100 des cas) où l'hyperpigmentation est estompée ;
- le type mixte (20 p. 100 des cas) où l'on retrouve un mélange des deux images.

Chez les patients de phototype VI, cet examen est non contributif. Cette distinction a toute son importance dans la décision thérapeutique car le pigment dermique résiste à tous les traitements dépigmentants classiques.

L'hydroquinone, la trétinoïne et l'acide azélaïque sont les trois agents ayant une activité scientifiquement reconnue dans le mélasma.

Cet arsenal thérapeutique est limité, par conséquent on recherche ainsi depuis de nombreuses années, dans l'industrie cosmétique ou pharmaceutique, des compositions permettant traiter le mélasma, et notamment de moduler la quantité de mélanine dans la peau.

La demanderesse a maintenant trouvé que le gène EDN3 et/ou EDNRB était exprimé dans YYY (cellules où est exprimé EDN3 et/ou EDNRB de manière préférentielle) et que son expression était induite EDN3 et/ou EDNRB, Elle propose dès lors de cibler ce gène ou son produit d'expression, pour traiter le mélasma.

Descriptif du gène EDN3

20

La protéine codée par ce gène est un membre de la famille de l'endothéline. Les endothélines sont dérivé de l'endothélium peptides vasoactifs impliqués dans une variété de fonctions biologiques. La forme active de cette protéine est un peptide 21 acides aminés transformés à base de la protéine précurseur. Le peptide actif est un ligand du récepteur de l'endothéline de type B (EDNRB). L'interaction de ce endothéline avec EDNRB est essentiel pour le développement de lignées cellulaires de neurones crête dérivés, tels que les mélanocytes et les neurones entériques. Des mutations dans ce gène et EDNRB ont été associés à la maladie de Hirschsprung (HSCR) et le syndrome de Waardenburg (WS), qui sont des affections congénitales impliquant cellules de la crête neurale. Quatre variantes codant pour trois isoformes distincts ont été observées.

30

Les séquences ADN humain et protéiques de EDN3 sont reproduites en annexe, respectivement SEQ ID No.2 (séquence NM_000114 (Genbank)), et SEQ ID No.1.

Descriptif du gène EDNRB

La protéine codée par ce gène est un récepteur couplé aux protéines G qui actionne un système messenger secondaire phosphatidylinositol-calcium. Son ligand, l'endothéline, se compose d'une
5 famille de trois puissants peptides vasoactifs: ET1, ET2, ET3 et. Des études suggèrent que la maladie multigénique, Hirschsprung type 2 maladies, est due à des mutations dans le gène récepteur de l'endothéline de type B. Trois variantes transcription codant pour deux isoformes différentes ont été trouvées pour ce gène. Bien que les deux isoformes se lient à ET1, ils
10 présentent des réponses différentes lors de la liaison, ce qui suggère qu'ils peuvent être fonctionnellement distinctes.

Les séquences ADN humain et protéiques de EDNRB sont reproduites en annexe (respectivement SEQ ID No.4 (séquence NM_000115 (Genbank)) et SEQ ID No.3.

Applications diagnostiques

15 Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution du melasma chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine EDN3 et/ou EDNRB, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un sujet contrôle.
20 L'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage de cette protéine EDN3 et/ou EDNRB par un test immunohistochimique, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant, par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité de EDN3 et/ou EDNRB peut être également envisagé.

25 Dans le cadre d'un diagnostic, le sujet « contrôle » est un sujet « sain ».
Dans le cadre d'un suivi de l'évolution du melasma, 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 de l'expression ou d'activité de EDN3 et/ou EDNRB, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, permet notamment de suivre
30 l'efficacité d'un traitement, notamment un traitement par un modulateur de EDN3 et/ou EDNRB, tel qu'envisagé plus haut ou par un autre traitement du melasma. Un tel suivi peut conforter le patient quant au bien fondé, ou à la nécessité, de poursuivre ce traitement.

Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une
35 susceptibilité d'un sujet à développer le melasma, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de EDN3 et/ou EDNRB, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un sujet contrôle.

Là encore, l'expression de la protéine peut être déterminée par un dosage EDN3 et/ou EDNRB, par un test immunohistochimique ou immunoessai, par exemple par dosage ELISA. Une autre méthode, notamment pour mesurer l'expression du gène, est de mesurer la quantité d'ARNm correspondant par toute méthode telle que décrit plus haut. Un dosage de l'activité du facteur de
5 EDN3 et/ou EDNRB peut être également envisagé.

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

10

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

15

Méthodes de criblage

Un autre objet de l'invention est une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif du melasma, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de EDN3 et/ou EDNRB ou l'expression de
20 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 du melasma. La méthode permet donc de sélectionner les composés capables de moduler l'expression ou l'activité de EDN3 et/ou EDNRB, ou l'expression de son gène, ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

25 Plus particulièrement, l'invention concerne une méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif du melasma, comprenant les étapes suivantes :

- a. préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- 30 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 EDN3 et/ou EDNRB, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- 35 d. sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de EDN3 ET EDNRB, 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), par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

Par « modulation », on entend tout effet sur le niveau d'expression ou d'activité de EDN3 et/ou EDNRB, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, à savoir éventuellement une inhibition, mais de préférence une stimulation, partielle ou complète.

Ainsi, les composés testés à l'étape d) ci-dessus induisent de préférence l'expression ou l'activité de EDN3 et/ou EDNRB, l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.

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

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

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

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

Différentes techniques peuvent être mises en œuvre pour tester ces composés et identifier les composés d'intérêt thérapeutique, modulateurs de l'expression ou de l'activité de EDN3 et/ou EDNRB.

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 DE EDN3 et/ou EDNRB, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

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

Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour le facteur de transcription DE EDN3 et/ou EDNRB, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène.

La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène EDN3 et/ou EDNRB de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule de

prostate, ou encore mieux une cellule de la peau,. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale.

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour le gène EDN3 et/ou EDNRB, 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 EDN3 et/ou EDNRB peut être déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène, ou son taux de traduction.
- Par taux de transcription d'un gène, on entend la quantité d'ARNm correspondant produite. Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine correspondante produite.
- L'homme du métier est familier avec les techniques permettant la détection quantitative ou
- 15 semi-quantitative de l'ARNm d'un gène d'intérêt. Les techniques basées sur l'hybridation de l'ARNm avec des sondes nucléotidiques spécifiques sont les plus usuelles (Northern Blot, RT-PCR, protection à la RNase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands (par exemple, avidine/biotine).
- 20 En particulier, l'expression du gène peut être mesurée par PCR en temps réel ou par protection à la RNase. Par protection à la RNase, on entend la détection d'un ARNm connu parmi les ARN-poly(A) d'un tissu qui peut se faire à l'aide d'une hybridation spécifique avec une sonde marquée. La sonde est un ARN complémentaire marqué (par exemple radioactif ou enzymatique) du messager à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu
- 25 dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la sonde antisens. Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à
- 30 cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéïnisé et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont détectés par exemple par autoradiographie ou chimioluminescence.

- Le taux de traduction du gène est évalué par exemple par dosage immunologique du produit
- 35 dudit gène. Les anticorps utilisés à cet effet peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Leur production relève de techniques conventionnelles. Un anticorps polyclonal anti-Early growth response 1 peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de la protéine entière. L'antisérum est prélevé puis épuisé selon des méthodes en soi connues par l'homme du métier. Un anticorps monoclonal peut, entre autres,

être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256: 495- 497 (1975)). D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique clone à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage ("phage display"), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E.coli).

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

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

La caractérisation des complexes antigène/anticorps, et plus généralement des protéines isolées ou purifiées mais également recombinantes (obtenues in vitro et in vivo) peut être réalisée par analyse en spectrométrie de masse. Cette identification est rendue possible grâce à l'analyse (détermination de la masse) des peptides générée par l'hydrolyse enzymatique des protéines (trypsine en générale). De façon générale, les protéines sont isolées selon les méthodes connues de l'homme du métier, préalablement à la digestion enzymatique. L'analyse des peptides (sous forme d'hydrolysat) est effectuée par séparation des peptides par HPLC (nano-HPLC) basé sur leurs propriétés physico-chimique (phase inverse). La détermination de la masse des peptides ainsi séparés est réalisée par ionisation des peptides et soit par couplage direct au spectromètre de masse (mode electrospray ESI) soit après dépôt et cristallisation en présence d'une matrice connue de l'homme de l'art (analyse en mode MALDI). Les protéines sont ensuite identifiées grâce à l'utilisation d'un logiciel approprié (par exemple Mascot).

Le gene EDN3 et/ou EDNRB peut être produit selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Il peut également être produit à l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple E. coli ou B. subtilis), des levures (par exemple Saccharomyces, Pichia) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

Modulateurs du facteur de transcription

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un modulateur de EDN3 et/ou EDNRB susceptible d'être obtenu selon l'une des méthodes décrites ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif du melasma.

Il est ainsi décrit ici une méthode de traitement préventif et/ou curatif du melasma, méthode comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un modulateur de EDN3 et/ou EDNRB, à un patient nécessitant un tel traitement.

- 5 De préférence, de tels modulateurs sont des activateurs (ou inducteurs) de EDN3 et/ou EDNRB.

L'invention comprend l'utilisation de composés inducteurs de EDN3 ET EDNRB, tels que ceux identifiés par la méthode de criblage décrite plus haut, pour le traitement préventif et/ou
10 curatif du melasma.

Les composés modulateurs sont formulés au sein de compositions pharmaceutiques, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable. Ces compositions peuvent être administrées par exemple par voie entérale, parentérale, ou topique. De préférence, la
15 composition pharmaceutique est appliquée par voie topique. Par voie orale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granules, d'émulsions, de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée. Par voie parentérale, la composition pharmaceutique peut se présenter sous
20 forme de solutions ou suspensions pour perfusion ou pour injection.

Par voie topique, la composition pharmaceutique est plus particulièrement destinée au traitement de la peau, des muqueuses et du cuir chevelu et peut se présenter sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de solutions, de gels, de sprays, de lotions ou de suspensions. Elle peut également se présenter sous forme de
25 suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques ou de patchs polymériques ou d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition pour application topique peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion. Dans une variante préférée, la composition pharmaceutique se présente sous la forme d'un gel, d'une crème ou d'une lotion.

30

La composition peut comprendre une teneur en modulateur de EDN3 et/ou EDNRB allant de 0,001 à 10 % en poids, notamment de 0,01 à 5 % en poids par rapport au poids total de la composition.

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

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

- des agents stabilisants;
 - des agents régulateurs d'humidité;
 - des agents régulateurs de pH;
 - des agents modificateurs de pression osmotique;
- 5
- des agents émulsionnants;
 - des filtres UV-A et UV-B ;
 - et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

10

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

15

<u>Données expérimentales</u>

ProbeSet	208399_s_at	204271_s_at
GENE_SYMBOL	EDN3	EDNRB
UNIGENE	<u>Hs.1408</u>	<u>Hs.82002</u>
patient 1 (fold induction)	0,907636293	0,89932481
patient 3 (fold induction)	1,625863288	1,350419408
patient 4 (fold induction)	1,312722518	1,204278623
patient 5 (fold induction)	2,230254991	2,002457573
patient 10 (fold induction)	1,2416189	1,08014464
patient 12 (fold induction)	1,442050763	2,142297017
geometric mean of 6 patients (fold induction)	1,406313134	1,375644419

REVENDICATIONS

1. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou
5 curatif du melasma, comprenant la détermination de la capacité d'un composé à moduler l'expression ou l'activité de EDN3 et/ou EDNRB ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
2. Méthode *in vitro* de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou
10 curatif du melasma selon la revendication 1, comprenant les étapes suivantes :
 - a. Préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
 - b. Mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
 - 15 c. Mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine EDN3 et/ou EDNRB, 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 EDN3 et/ou EDNRB, ou une modulation de
20 l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.
3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à
25 l'étape d) activent l'expression ou l'activité de la protéine EDN3 et/ou EDNRB, ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
4. Méthode selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière
30 opérante à tout ou partie du promoteur du gène EDN3 et/ou EDNRB, 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 EDN3 et/ou EDNRB, et en ce que
35 l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
6. Méthode selon la revendication 4 ou 5, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue codant pour EDN3 et/ou EDNRB.

7. 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.
- 5 8. Méthode selon l'une des revendications 2 à 7, dans laquelle l'expression du gène est déterminée en mesurant le taux de traduction dudit gène.
9. Utilisation d'un modulateur de EDN3 et/ou EDNRB susceptible d'être obtenu selon l'une des revendications 1 à 9 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement préventif et/ou curatif du melasma.
- 10 10. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le modulateur est un activateur du gène EDN3 et/ou EDNRB.
- 15 11. Méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution du melasma chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine EDN3 et/ou EDNRB, ou de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un échantillon biologique d'un sujet contrôle.
- 20 12. Méthode selon la revendication 13, dans laquelle l'expression de la protéine est déterminée par un dosage de cette protéine par un immunoessai.
13. Méthode selon la revendication 14, dans laquelle l'immunoessai est un dosage ELISA.
- 25 14. Méthode selon la revendication 13, dans laquelle l'expression du gène est déterminée par mesure de la quantité d'ARNm correspondant.
15. Méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer une alopécie, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine EDN3 et/ou EDNRB, 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

ProbeSet	GENE_SYMBOL	UNIGENE	patient 1 (fold induction)	patient 3 (fold induction)	patient 4 (fold induction)	patient 5 (fold induction)	patient 10 (fold induction)	patient 12 (fold induction)	geometric mean of 6 patients (fold induction)
208389 s at	EDN3	Hs.1408	0.807836283	1.625863288	1.31272518	2.230254891	1.2418189	1.442050763	1.406313134
204271 s at	EDNRB	Hs.82002	0.89832481	1.350419408	1.204278623	2.002457573	1.08014464	2.142287017	1.375644419

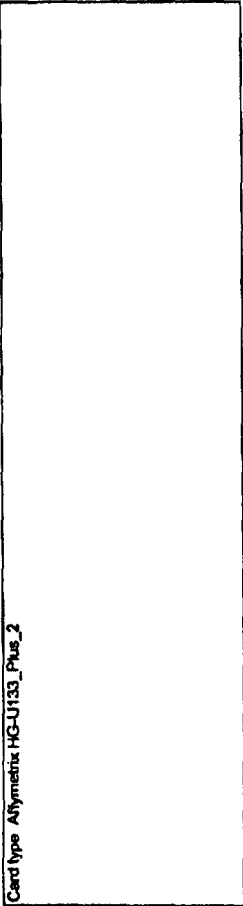


Fig. 1