

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

11 N° de publication : 2 739 621
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

21 N° d'enregistrement national : 95 11714

51 Int Cl⁶ : C 07 K 7/08, A 61 K 47/42

12

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22 Date de dépôt : 05.10.95.

30 Priorité :

43 Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.04.97 Bulletin 97/15.

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) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACT SCIENT ET TECH — FR.

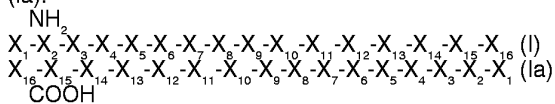
72 Inventeur(s) : CHASSAING GERARD et PROCHIAITZ ALAIN.

73 Titulaire(s) :

74 Mandataire : CABINET ORES.

54 PEPTIDES UTILISABLES COMME VECTEURS POUR L'ADRESSAGE INTRACELLULAIRE DE MOLECULES ACTIVES.

57 L'invention est relative à un peptide de séquence (I) ou (Ia):



où X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ représentent chacun un acide α-aminé, X₆ représentant le tryptophane. Ce peptide comprend entre 6 et 10 acides aminés hydrophobes.

L'invention est également relative à l'utilisation dudit peptide pour introduire dans des cellules vivantes une molécule active sur les fonctions cellulaires.

FR 2 739 621 - A1



**PEPTIDES UTILISABLES COMME VECTEURS POUR L'ADRESSAGE
INTRACELLULAIRE DE MOLECULES ACTIVES.**

La présente Invention est relative à une classe de peptides capables de traverser les membranes cellulaires et de parvenir aux divers compartiments de la cellule.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes de différentes substances dotées de propriétés pharmacologiques, et de leur accès aux divers compartiments intracellulaires, en particulier le compartiment cytoplasmique et le compartiment nucléaire, revêt une grande importance, tant pour la recherche que pour l'utilisation thérapeutique.

On connaît actuellement un nombre limité de moyens d'introduire des substances telles que les polypeptides et les oligonucléotides dans les compartiments intracellulaires. Parmi les différentes techniques actuellement proposées on peut citer :

1. La transfection de gènes, et les techniques dérivées permettant d'améliorer *in vivo* ou *in vitro* les taux de transfection, telles que la précipitation au phosphate de calcium, l'utilisation de lipides cationiques, l'électroporation, la trituration (scrape loading), l'utilisation de vecteurs viraux, etc...

2. La liaison à des récepteurs de la membrane cellulaire ; ces récepteurs sont par la suite endocytosés, et libèrent dans le compartiment cytoplasmique les molécules liées. Dans cette catégorie on peut citer le récepteur du folate, la toxine diphtérique, ou des facteurs de transcription comme la protéine TAT du rétrovirus HIV. Le mécanisme de transport impliquant ces récepteurs est encore mal connu, mais nécessite dans tous les cas une étape d'endocytose.

3. Les peptides de type homéodomaine. Des travaux antérieurs effectués par l'équipe des Inventeurs sur l'homéodomaine du facteur de transcription

Antennapedia (AntpHD) ont permis de montrer que les peptides homéodomaine traversent les membranes plasmiques par un processus énergie-indépendant, et donc distinct de l'endocytose. La 3ème hélice du peptide homéodomaine possède les mêmes propriétés [JOLIOT et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88, P. 1864-1868 (1991) ; DEROSI et al., J. Biol. Chem. 269, 14, p. 10444-10450, (1994)].

Ces propriétés ont été utilisées pour internaliser dans des cellules des polypeptides et des oligonucléotides liés à l'homéodomaine ou à l'hélice 3, [PEREZ et al., J. Cell. Science, 102, p. 712-722, (1992)] par fusion génétique ou liaison biochimique. Cette entrée est quantitative, et le vecteur et son chargement sont retrouvés dans 100% des cellules ; en outre, l'internalisation est indépendante du type cellulaire concerné.

Le plus petit fragment de l'homéodomaine capable de traverser les membranes et de servir de vecteur à d'autres peptides ou bien à des oligonucléotides est un peptide de 16 acides aminés, (comprenant les acides aminés 43 à 58 de l'homéodomaine, et dénommé peptide 43-58), dont la séquence est la suivante :

Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

L'équipe des Inventeurs a montré précédemment que certaines substitutions ou délétions dans la séquence peptidique interféraient avec l'activité du peptide. Par exemple, un peptide dans lequel les 2 Trp (48 et 56) sont remplacés par deux Phe, ou un peptide comprenant les acides aminés 41 à 55 de l'homéodomaine ne sont pas internalisés (DEROSI et al., 1994, publication précitée).

Les Inventeurs ont maintenant cherché à définir d'autres séquences d'acides aminés capables de servir de vecteur d'internalisation et d'adressage de polypeptides et d'oligonucléotides, et dans ce but ont synthétisé plusieurs peptides en modifiant spécifiquement certains résidus.

La présente Invention a pour objet un peptide répondant à l'une des séquences (I) ou (Ia) suivantes :

NH₂

X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (I)

5 X₁₆-X₁₅-X₁₄-X₁₃-X₁₂-X₁₁-X₁₀-X₉-X₈-X₇-X₆-X₅-X₄-X₃-X₂-X₁ (Ia)

COOH

où X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ représentent chacun un acide α-aminé, lequel peptide est caractérisé en ce qu'il comprend entre 6 et 10
10 acides aminés hydrophobes, et en ce que X₆ représente le tryptophane, à l'exception du peptide de séquence :

NH₂

Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

COOH

15 Les acides aminés hydrophobes sont l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, le tryptophane, et la méthionine.

Le reste des acides aminés qui entrent dans la constitution des peptides conformes à l'invention sont
20 des acides aminés non-hydrophobes qui peuvent être des acides aminés polaires (glycine, sérine, thréonine, cystéine, tyrosine, asparagine, glutamine), acides (acide aspartique ou glutamique) ou basiques (lysine, arginine ou histidine), ou une association d'acides aminés de ces
25 trois catégories.

Selon un mode de réalisation préféré d'un peptide conforme à l'invention, il comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

L'enchaînement d'acides aminés non-hydrophobes
30 polaires ou chargés, et d'acides aminés hydrophobes confère aux peptides conformes à l'invention un caractère amphiphile, qui d'après les expérimentations effectuées par les Inventeurs, apparaît essentiel pour leurs propriétés. Ces expérimentations ont en outre permis de
35 mettre en lumière d'autres caractéristiques essentielles

pour la translocation intracellulaire, et de montrer que :

- 5 - la translocation ne nécessite pas de récepteur spécifique, et peut donc concerner tous les types cellulaires ;
- la structure en alpha-hélice n'intervient pas dans la translocation, mais joue sans doute un rôle dans l'adressage nucléaire ;
- 10 - les propriétés amphiphiles du peptide, ainsi que la présence d'un résidu Trp apparaissent en revanche importantes pour la translocation.

De préférence, un peptide conforme à l'Invention est constitué de séquences comprenant de 1 à 6 acides aminés non-hydrophobes et de 1 à 6 acides aminés hydrophobes, réparties en alternance le long de la chaîne peptidique.

Selon un autre mode de réalisation d'un peptide conforme à l'invention, X_1 , X_2 , X_4 , X_9 , X_{15} , X_{16} , sont des acides aminés non-hydrophobes et X_3 , X_7 , et X_{14} , sont des acides aminés hydrophobes. Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, X_{14} représente le tryptophane ou l'isoleucine.

Les propriétés de pénétration intracellulaire des peptides conformes à l'invention, sont comparables à celles de l'hélice 3 d'un peptide homéodomaine, et permettent leur utilisation comme vecteur d'internalisation et d'adressage intra-cellulaire, pour introduire dans des cellules vivantes des molécules actives sur les fonctions cellulaires, en particulier d'autres peptides, ou des séquences nucléotidiques.

Pour obtenir un adressage plus spécifiquement cytoplasmique de la molécule active que l'on souhaite introduire, on utilisera de préférence un peptide conforme à l'invention dans lequel au moins l'un des acides aminés en position X_3 , X_7 , et X_{14} est une proline.

Pour la mise en oeuvre de la présente Invention, le polypeptide ou l'oligonucléotide à transporter est lié à un peptide conforme à l'invention.

Les produits de fusion d'un peptide conforme à l'invention avec une autre séquence peptidique, ou avec une séquence oligonucléotidique peuvent être obtenus par différents moyens connus en eux-mêmes. Dans le cas d'un polypeptide on pourra utiliser par exemple par les techniques classiques du génie génétique, ou de la synthèse peptidique. Dans le cas d'un oligonucléotide on utilisera par exemple la technique décrite par LEMAITRE et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 648-652, (1987)], ou celle de MATSUEDA et al. [Chemistry Letters, p. 951-952, (1978) and Int. J. of Peptide and Protein Research, p. 107-112 (1986)].

La présente Invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à un exemple montrant les propriétés de différents peptides conformes à l'Invention.

Il doit être bien entendu toutefois que cet exemple est donné uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont il ne constitue en aucune manière une limitation.

EXEMPLE

9 peptides, dont les séquences sont représentées sur les Tableaux I et II ci-après, ont été synthétisés.

Tableau I

43-58
 Biot - Apa - Arg - Gln - Ile - Lys - Ile - Trp - Phe - Gln - Asn - Arg - Arg - Met - Lys - Trp - Lys - Lys

41-55
 Biot - Apa - Thr - Glu - Arg - Gln - Ile - Lys - Ile - Trp - Phe - Gln - Asn - Arg - Arg - Met - Lys

58-43
 Biot - Apa - Lys - Lys - Trp - Lys - Met - Arg - Arg - Asn - Gln - Phe - Trp - Ile - Lys - Ile - Gln - Arg

43-58 D
 Biot - Apa - Arg - Gln - Ile - Lys - Ile - Trp - Phe - Gln - Asn - Arg - Arg - Met - Lys - Trp - Lys - Lys

PRO50
 Biot - Apa - Arg - Gln - Ile - Lys - Ile - Trp - Phe - PRO - Asn - Arg - Arg - Met - Lys - Trp - Lys - Lys

3PRO
 Biot - Apa - Arg - Gln - PRO - Lys - Ile - Trp - Phe - PRO - Asn - Arg - Arg - Lys - PRO - Trp - Lys - Lys

Tableau II

Met-Arg

Biot - Apa - Arg - Gln - Ile - Trp - Ile - Trp - Phe - Gln - Asn - **Met** - Arg - **Arg** - Lys - Trp - Lys - Lys

7 Arg

Biot - Apa - **Arg** - Gln - Ile - Trp - Phe - Gln - Asn - **Arg** - Arg - Met - **Arg** - Trp - **Arg** - **Arg**

W/R

Biot - Apa - Arg - Arg - Trp - Arg - Arg - Trp - Trp - Arg - Arg - Trp - Arg - Arg - Trp - Arg - Arg

LR/

Biot - Apa - Arg - Leu - Arg - Arg - Leu - Leu - Arg - Arg - Leu - Arg - Arg - Leu - Arg - Arg

Légende du Tableau I

43-58 : Peptide 3° hélice

41-55 : Peptide non-intériorisé (voir DEROSI
et al., 1994)

5 58-43 : Séquence inverse

43-58 D : Peptide 3° hélice (43-58) avec
acides aminés de la série D

Pro50 : Peptide 43-58 avec une Proline en 50
(au lieu de Gln)

10 3Pro : Peptide 43-58 avec 3 Prolines en posi-
tions 45, 50 et 55, à la place respectivement des résidus
Ile, Gln et Lys.

Légende du Tableau II

15 Met-Arg : Peptide 43-58 avec Met en 52 (au
lieu de Arg) et Arg en 54 (au lieu de Met)

7Arg : Toutes les Lysines du 43-58, sauf celle
en 45 sont remplacées par des Arg

W/R : Peptide 43-58 très modifié, consiste
essentiellement en une succession de Trp et Arg

20 L/R : Peptide W/R avec des Leu en place des
Trp.

Tous ces peptides sont pourvus en N-terminal
d'un bras aminopentanoïque et d'une biotine permettant de
suivre leur internalisation.

25 L'entrée de ces différents peptides dans des
cellules en culture a été étudiée, dans les mêmes condi-
tions et en utilisant les mêmes protocoles que ceux
décrits par DEROSI et al. (1994, publication précitée).

30 L'entrée des peptides dans les cellules
nerveuses ou des fibroblastes en culture a été examinée à
4 et 37°C.

L'entrée des peptides du Tableau I a été
testée par microscopie confocale, gel d'électrophorèse et
ELISA.

35 L'entrée des peptides du Tableau II a été
testée uniquement par microscopie confocale ; en effet,

l'absence de lysine dans ces peptides rend les fixations très difficiles et demande donc une observation rapide incompatible avec des transferts sur filtres ou des tests ELISA (multiples lavages).

5 **1) Internalisation à 37°C et à 4°C des peptides 43-58, 58-43, D43-58, Pro50 et 3Pro**

Des cellules de cortex embryonnaire E15 ont été incubées ($1,1.10^6$ cellules/ml) pendant 2h à 37°C ou à 4°C, avec les peptides 43-58, 58-43, D43-58, Pro50 et
10 3Pro, à la concentration de 44 μ M pour une quantité 1X, ou sans peptide (puits C).

La présence des peptides dans le milieu d'incubation et dans les cellules après lavage de celles-ci à la trypsine a été analysée sur gel d'électrophorèse
15 SDS-PAGE 12-22% et par électrotransfert.

Les résultats sont illustrés sur les figures 1A, 1B (37°C) et 2 (4°C).

Légende de la figure 1 :

A : autoradiogramme des extraits cellulaires
20 après révélation par bioluminescence (LUMINOL[®], AMERSHAM).

B : autoradiogramme des milieux d'incubation après révélation par bioluminescence.

Légende de la figure 2 :

25 Le puits SP correspond au dépôt sur le gel de 1 μ l de substance P.

Tous les peptides du tableau 1, à l'exception de 41-55 sont internalisés à 4 et 37°C et récupérés dans les cellules. Le peptide 43-58 est dégradé (50% environ)
30 à 37°C mais pas à 4°C.

2) Localisation cellulaire des peptides 43-58, 51-55, 58-43, D43-58, Pro50 et 3Pro à 37°C et 4°C.

Les cellules de cortex et striatum E15 sont mises en culture sur des lamelles de verre à une densité
35 de 25000 cellules/cm² pendant 2 jours. Les peptides sont tous ajoutés à une concentration de 20 μ M finale. Après

2h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées, fixées et la présence de biotine est révélée par streptavidine fluorescente. Les sections observées en microscopie confocale sont présentées sur les figures 3 (37°C) et 4 (4°C). Les cellules ayant intégré le peptide apparaissent fluorescentes, sur fond noir.

Légende de la figure 3 :

1 : peptide 43-58, 2 : peptide 58-43,
 3 : peptide D43-58, 4 : peptide Pro50
 5 : peptide 3Pro, 6 : peptide 41-55.

Légende de la figure 4 :

1 : peptide 43-58, 2 : peptide 58-43,
 3 : peptide D43-58, 4 : peptide Pro50
 5 : peptide 3Pro, 6 : peptide 41-55.

La présence de prolines (Pro 50 ou 3Pro) n'empêche pas l'internalisation mais semble interférer avec l'adressage nucléaire. L'entrée des peptides testés est également observée dans les fibroblastes (non montré).

3) Dosage colorimétrique des internalisations des peptides 43-58, 51-55, 58-43, D43-58, Pro50, et 3Pro à 37°C et 4°C.

Des cellules de cortex et striatum E15 (B) ou E16 (A) ont été incubées ($1,1 \cdot 10^6$ cellules/ml) avec les peptides à la concentration de 17 μ M (A) ou 44 μ M (B) pour les quantités 1X, ou sans peptides (9). Les cellules ont été lavées au NaCl 0,5 M (A) ou à la trypsine (B). Elles sont mises en culture sur plaque ELISA, fixées et une révélation des peptides biotinylés est faite en utilisant un substrat coloré de l'alcaline phosphatase couplée à la streptavidine (PNPP).

Les résultats sont illustrés par les figures 5A et 5B.

Légende des figures 5A et 5B :

A : expérience à 37°C ;
 B : expérience à 4°C

11

- 1 : peptide 43-58 1X
 2 : peptide 43-58 4X
 3 : peptide 58-43 1X
 4 : peptide D43-58
 5 : peptide Pro50
 6 : peptide 3Pro
 7 : peptide 41-55 1X
 8 : peptide 41-55 4X, échantillon non présent
 en A
 9 : pas de peptide.

4) Internalisation à 37°C des peptides Met-Arg, W/R et L/R

Des cellules de cortex et striatum E15 sont mises en culture sur lamelles de verre à une densité de 25000 cellules/cm² pendant 2 jours. Les peptides sont ajoutés à une concentration de 20 µM finale pour le peptide 43-58 et de 2 µM pour les autres et les cellules sont incubées 2h à 37°C. Les cellules sont lavées, fixées et la biotine des peptides est révélée par streptavidine-FITC. Les résultats sont illustrés par la Figure 6.

Légende de la figure 6 :

- 1 : peptide 7 Arg
 2 : peptide Met-Arg
 3 : peptide W/R
 4 : peptide L/R.

On observe une internalisation et un adressage cytoplasmique et nucléaire du Met-Arg, du 7Arg et du W/R. Le peptide L/R est retrouvé dans une fraction apparemment de type vésiculaire, probablement de caractère endocytaire.

CONCLUSION

Les résultats obtenus avec les peptides du Tableau I permettent de conclure que :

- 5 - l'entrée ne nécessite pas de récepteur puisque les peptides 58-43 et 43-58D sont internalisés. Or le premier a une séquence différente de celle du peptide initial (même si sa structure générale d'hélice amphiphile est conservée) et le peptide ayant des acides aminés de la série D ne doit pas
10 interagir avec un récepteur naturel composé d'acides aminés de la série L ;
- la structure en hélice alpha n'est pas nécessaire puisque l'introduction d'une proline et a
15 *fiortiori* de 3 détruit l'hélicité. Cependant on note que l'addition des prolines peut interférer avec l'adressage nucléaire.

En ce qui concerne les peptides du Tableau II, on peut conclure des résultats obtenus que :

- 20 - l'amphiphilicité est nécessaire pour l'internalisation, mais elle n'est pas suffisante, dans la mesure où le L/R n'a pas les propriétés du W/R
- la présence et la position des résidus Trp ont leur importance.
- 25 Les inventeurs ont également démontré l'internalisation de l'homéodomaine de l'homéoprotéine Engrailed, qui n'a pas le résidu Trp en 56 (qui est remplacé par un résidu Ile) mais a conservé celui en 48. On peut en conclure que seul le
30 Trp 48 est important pour la translocation.

REVENDICATIONS

1) Peptide répondant à l'une des séquences (I) ou (Ia) suivantes :

NH₂

5 X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆ (I)

X₁₆-X₁₅-X₁₄-X₁₃-X₁₂-X₁₁-X₁₀-X₉-X₈-X₇-X₆-X₅-X₄-X₃-X₂-X₁ (Ia)

COOH

où X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂, X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆ représentent chacun un acide α-aminé, lequel peptide est caractérisé en ce qu'il comprend entre 6 et 10 acides aminés hydrophobes, et en ce que X₆ représente le tryptophane, à l'exception du peptide de séquence :

NH₂

Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys

15

COOH

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend 6 acides aminés hydrophobes et 10 acides aminés non-hydrophobes.

3) Peptide selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il est constitué de séquences comprenant de 1 à 6 acides aminés non-hydrophobes et de 1 à 6 acides aminés hydrophobes, réparties en alternance le long de la chaîne peptidique.

4) Peptide selon une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que X₁, X₂, X₄, X₉, X₁₅, X₁₆, sont des acides aminés non-hydrophobes et X₃, X₇, et X₁₄, sont des acides aminés hydrophobes.

5) Peptide selon la revendication 4, caractérisé en ce que X₁₄ représente le tryptophane ou l'isoleucine.

6) Utilisation d'un peptide selon une quelconque des revendications 1 à 5, pour introduire dans des cellules vivantes une molécule active sur les fonctions cellulaires.

7) Utilisation selon la revendiction 6, caractérisée en ce que la molécule active sur les fonctions cellulaires est un peptide

8) Utilisation selon la revendiction 6, caractérisée en ce que la molécule active sur les fonctions cellulaires est une séquence nucléotidique.

9) Utilisation selon une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'on utilise un peptide de formule I dans lequel au moins l'un des acides aminés en position X_3 , X_7 , et X_{14} est une proline.

FIGURE 1

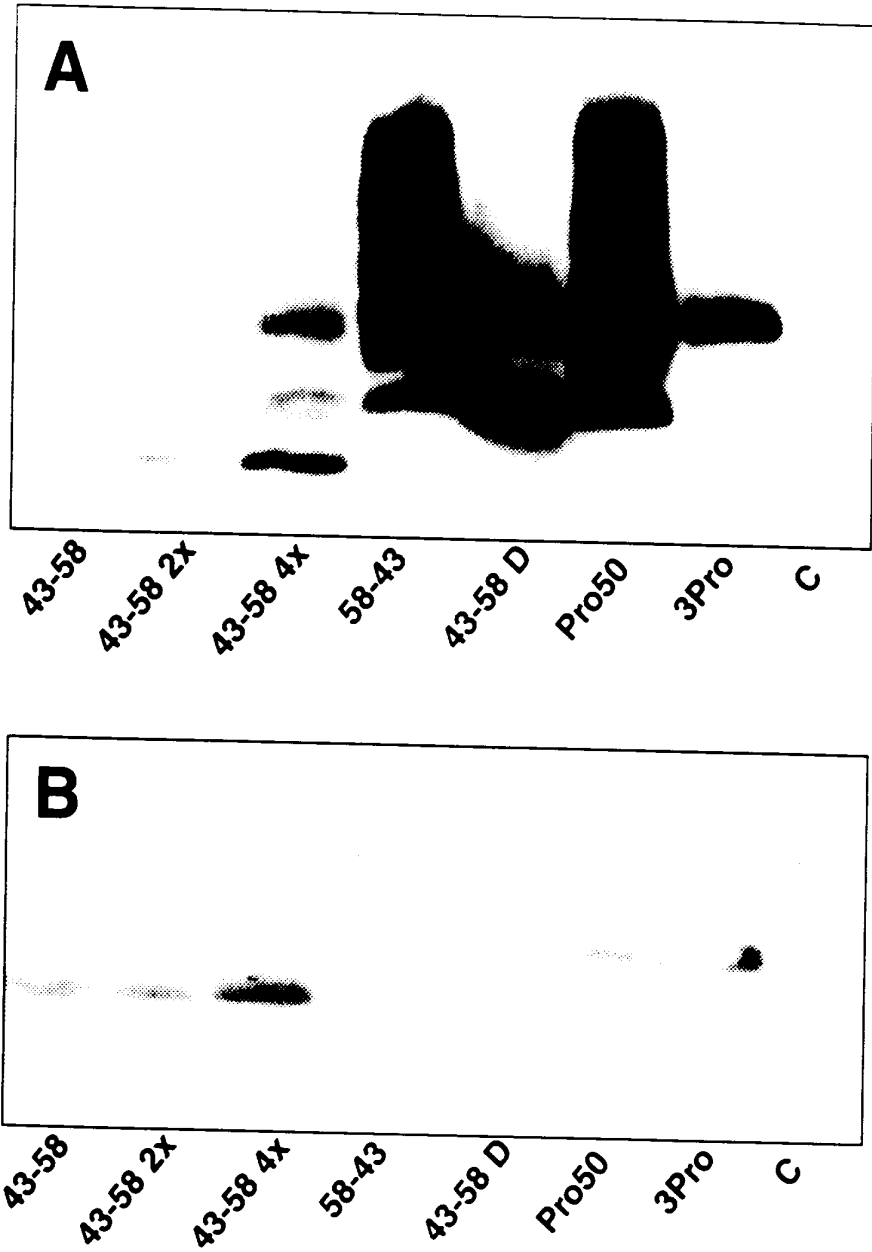
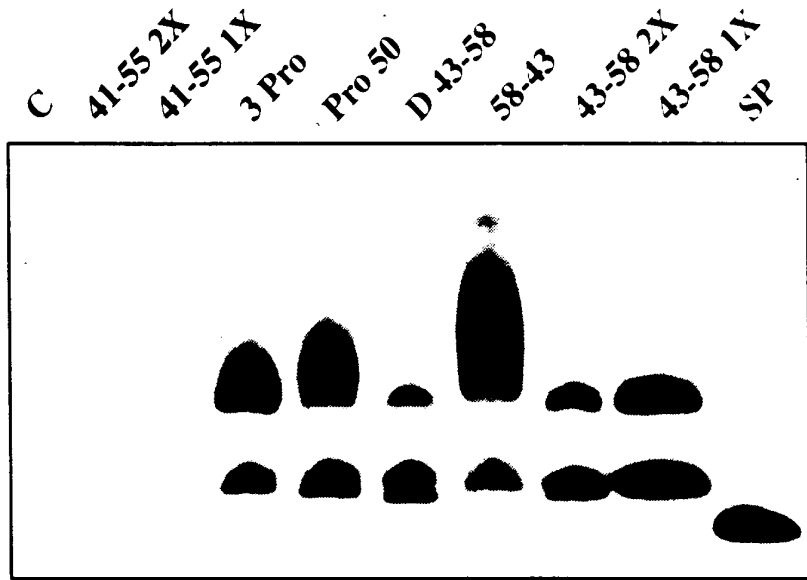


FIGURE 2



57

FIGURE 3

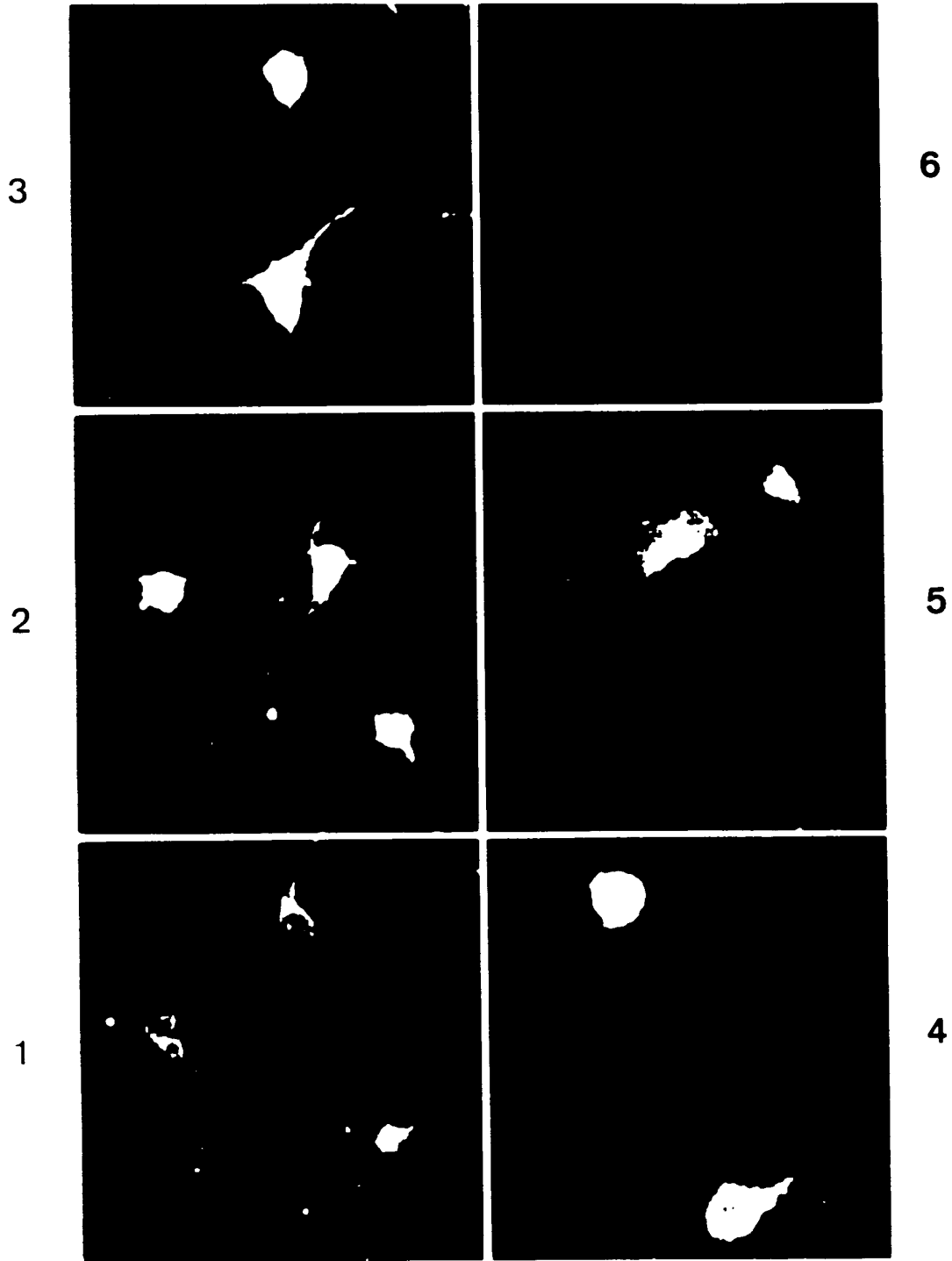
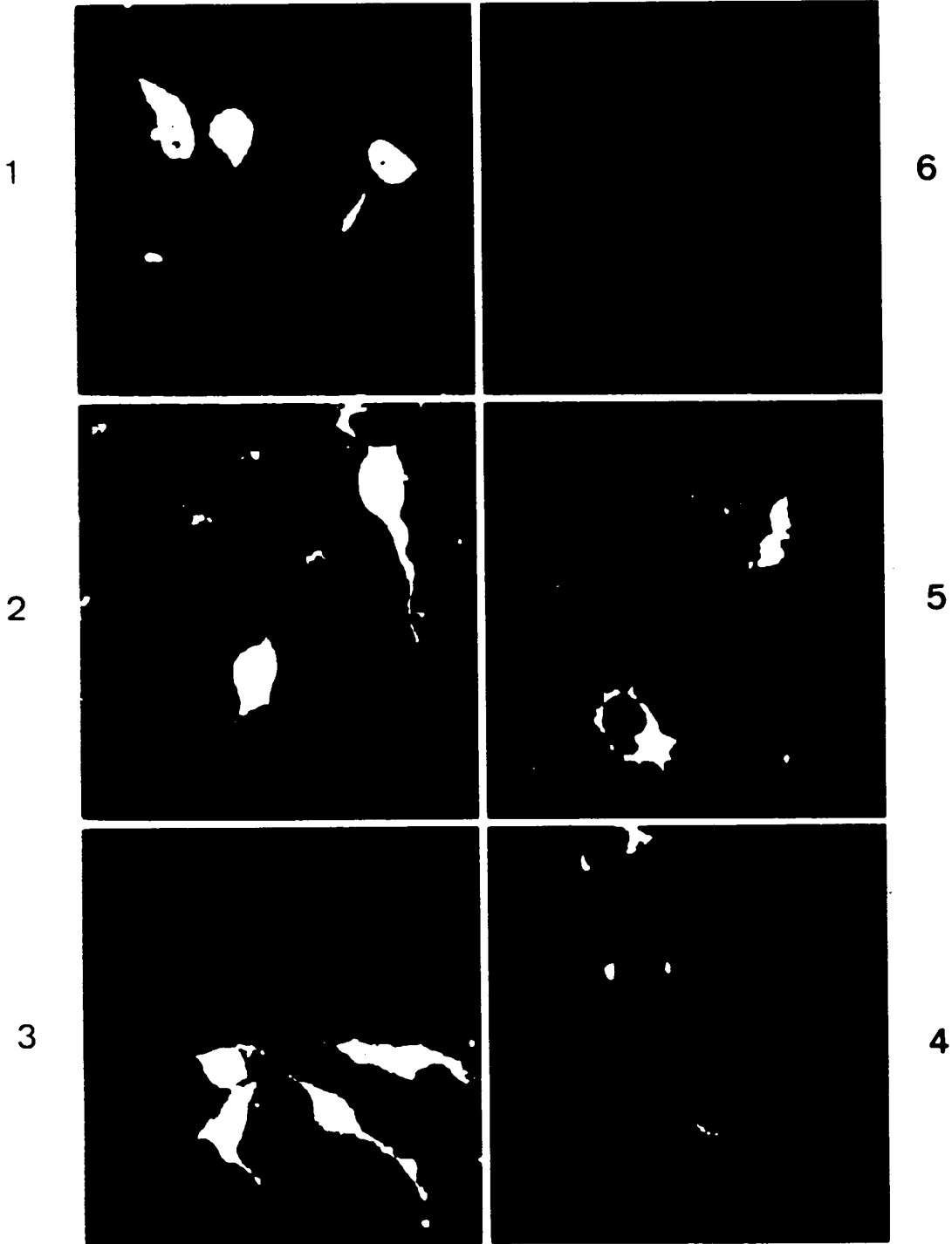
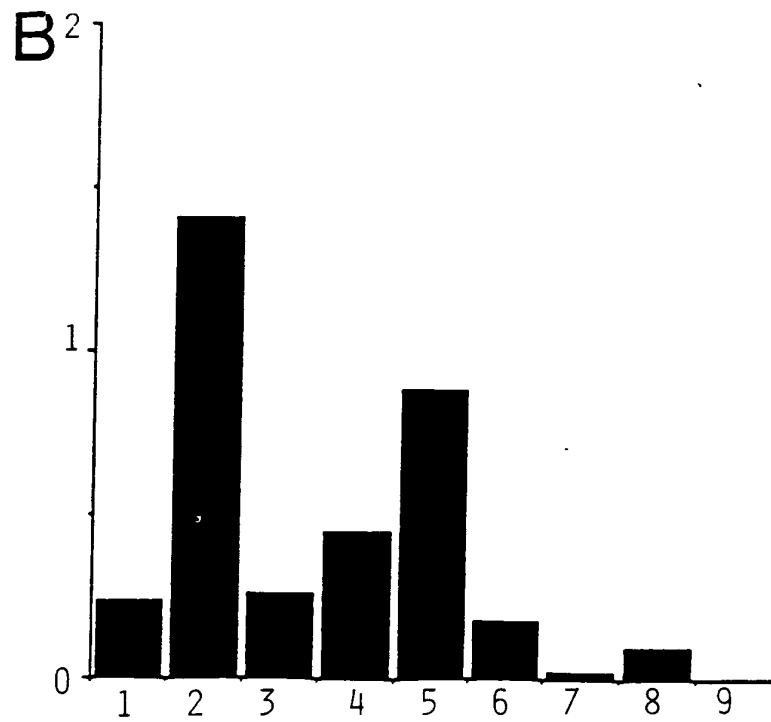
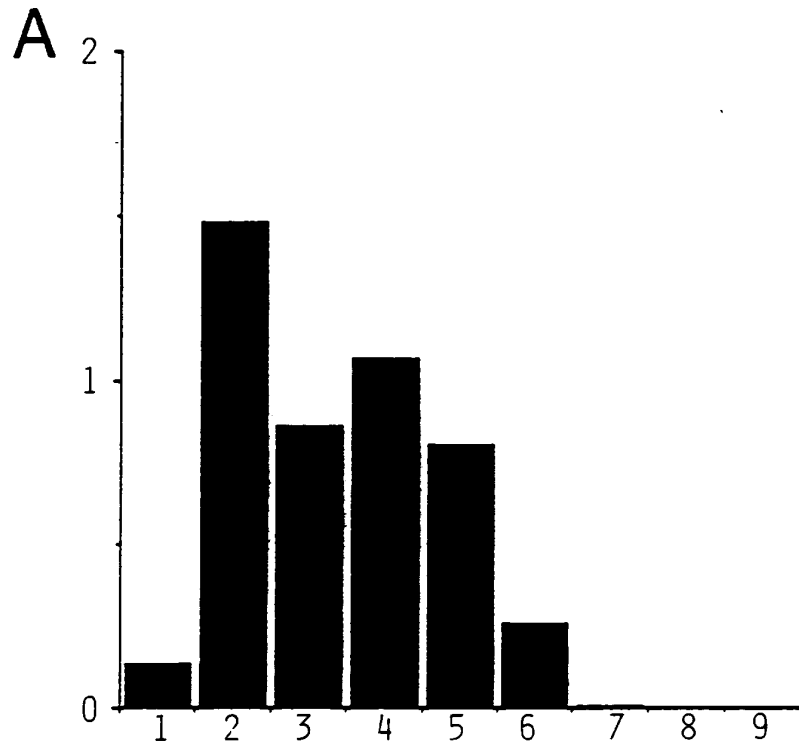


Figure 1

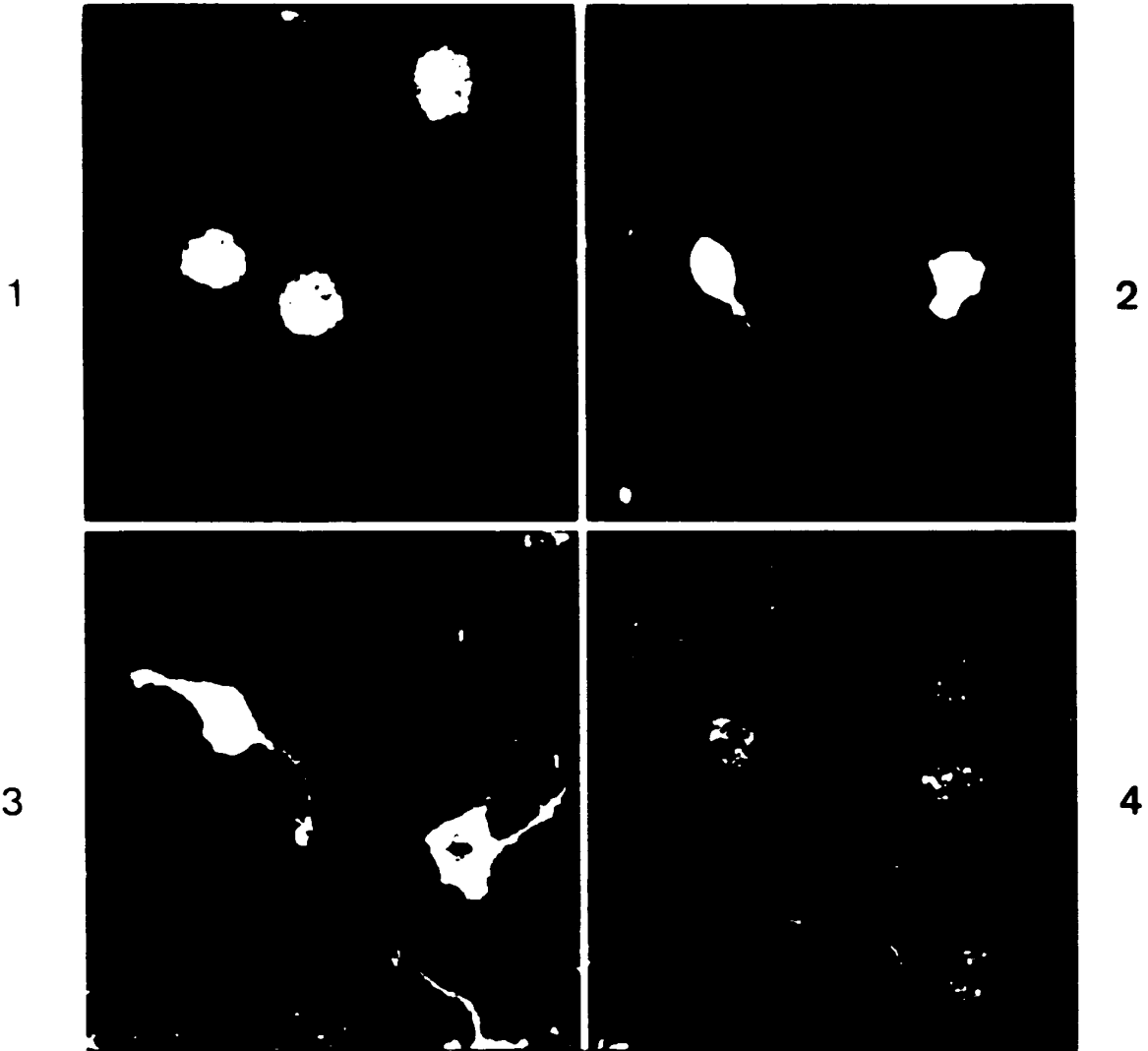


5/6

FIGURE 5



K/R
FIGURE 4



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A,D	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (MICROFILMS), vol. 269, no. 14, 8 Avril 1994, MD US, pages 10444-10450, XP002006023 D DEROSI ET AL.: "The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes" * le document en entier * ---	1-10
A,D	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 90, no. 19, 1 Octobre 1993, WASHINGTON US, pages 9120-9124, XP002006024 I LE ROUX ET AL.: "Neurotrophic activity of the Antennapedia homeodomain depends on its specific DNA-binding properties" * le document en entier * -----	1-10
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
18 Juin 1996		Masturzo, P
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire 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		

1