

(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
11 juin 2009 (11.06.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/071841 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/052131

(22) Date de dépôt international :
26 novembre 2008 (26.11.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0759323 26 novembre 2007 (26.11.2007) FR

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

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : RETHORE,
Sandrine [FR/FR]; Résidence Pythagore, 14, avenue de
Pythagore, F-06560 Valbonne (FR).

(74) Mandataire : ANDRAL, Christophe; L'oreal, RIVER
PLAZA - DIPI, 25-29 Quai Aulagnier, F-92665 Asnieres-
sur-seine (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,
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, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL,
NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, 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

(54) Title: EGR1 MODULATORS USED IN THE TREATMENT OF ALOPECIA

(54) Titre : MODULATEURS DE EGR1 DANS LE TRAITEMENT DE L'ALOPÉCIE

(57) Abstract: The invention relates to a method, according to one of Claims 1-6, in which the expression of the gene is determined by measuring the transcription ratio of said gene. The invention also relates to a method, according to one of Claims 1-6, in which the expression of the gene is determined by measuring the translation ratio of said gene. The invention also relates to the use of a modulator of the Early Growth Response 1 transcription factor that can be obtained according to one of Claims 1-8 in order to prepare a drug for the preventive and/or therapeutic treatment of alopecia. The invention also relates to a use according to Claim 9, characterised in that the modulator is an activator of the Early Growth Response 1 transcription factor. The invention also relates to the cosmetic use of a modulator of the Early Growth Response 1 transcription factor for the aesthetic treatment of the scalp. The invention also relates to an in vitro method for diagnosing or following the development of alopecia in a subject, that comprises comparing the expression or the activity of the Early Growth Response 1 protein, or the expression of the gene thereof or the activity of at least one of the promoters thereof in a biological sample from a subject, with a biological sample of a controlled subject. The invention further relates to a method according to Claim 12, in which the expression of the protein is determined by an assay of said protein using an immunoassay. The invention also relates to a method according to Claim 13, in which the immunoassay is an ELISA assay. The invention also relates to a method according to Claim 14, in which the expression of the gene is determined by measuring the amount of the corresponding mRNA.

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



WO 2009/071841 A2

Modulateurs de EGR1 dans le traitement de l'alopécie

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

EGR1

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

Dans le contexte de l'invention, le terme « gène EGR1 » ou « acide nucléique EGR1 » signifie le gène ou la séquence d'acide nucléique qui code pour la protéine EGR1. Si la cible visée est de préférence le gène humain ou son produit d'expression, l'invention peut également faire appel à des cellules exprimant le facteur de transcription Early Growth Response 1, par intégration génomique ou expression transitoire d'un acide nucléique exogène codant pour le facteur de transcription.

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

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

Applications diagnostiques

Un objet de l'invention concerne une méthode *in vitro* de diagnostic ou de suivi de l'évolution de l'alopécie chez un sujet, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1 (EGR1), de l'expression de son gène ou de l'activité d'au
15 moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un sujet contrôle.

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

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

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

Un autre aspect de la présente invention concerne une méthode *in vitro* de détermination d'une susceptibilité d'un sujet à développer une alopécie, comprenant la comparaison de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1 (EGR1), de l'expression de son gène
35 ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans un échantillon biologique d'un sujet par rapport à un sujet contrôle.

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

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

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

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

Méthodes de criblage

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

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

- a. préparation d'au moins deux échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- b. mise en contact d'un des échantillons ou mélanges réactionnels avec un ou plusieurs des composés à tester ;
- c. mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
- d. sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b), par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.

Par « modulation », on entend tout effet sur le niveau d'expression ou d'activité du facteur de transcription EGR1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses

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

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

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

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

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

Les composés testés peuvent être de tout type. Ils peuvent être d'origine naturelle ou avoir été produits par synthèse chimique. Il peut s'agir d'une banque de composés chimiques 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 du facteur de transcription EGR1.

Selon un premier mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène EGR1, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.

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

Selon un deuxième mode de réalisation, les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour le facteur de transcription EGR1, et l'étape c) décrite ci-dessus consiste à mesurer l'expression dudit gène.

La cellule utilisée ici peut être de tout type. Il peut s'agir d'une cellule exprimant le gène EGR1 de manière endogène, comme par exemple une cellule de foie, une cellule de prostate, ou encore mieux une cellule de la peau, des kératinocytes du follicule pileux ou des fibroblastes de papille dermique. On peut également utiliser des organes d'origine humaine ou animale, comme par exemple des cheveux, ou des follicules pileux de vibrisses.

Il peut également s'agir d'une cellule transformée par un acide nucléique hétérologue, codant pour le facteur de transcription EGR1, de préférence humaine ou de mammifère.

Une grande variété de systèmes de cellules hôtes peut être utilisée, telle que par exemples les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. L'acide nucléique peut être transfecté de manière
5 stable ou transitoire, par toute méthode connue de l'homme du métier, par exemple par phosphate de calcium, DEAE-dextran, liposome, virus, électroporation, ou microinjection.

Dans ces méthodes, l'expression du gène EGR1 peut être déterminée en mesurant le taux de transcription dudit gène, ou son taux de traduction.

10 Par taux de transcription d'un gène, on entend la quantité d'ARNm correspondant produite. Par taux de traduction d'un gène, on entend la quantité de protéine correspondante produite.

L'homme du métier est familier avec les techniques permettant la détection quantitative ou semi-quantitative de l'ARNm d'un gène d'intérêt. Les techniques basées sur l'hybridation de l'ARNm avec des sondes nucléotidiques spécifiques sont les plus usuelles (Northern Blot, RT-
15 PCR, protection à la Rnase). Il peut être avantageux d'utiliser des marqueurs de détection, tels que des agents fluorescents, radioactifs, enzymatiques ou autres ligands (par exemple, avidine/biotine).

En particulier, l'expression du gène peut être mesurée par PCR en temps réel ou par protection à la RNase. Par protection à la RNase, on entend la détection d'un ARNm connu parmi les
20 ARN-poly(A) d'un tissu qui peut se faire à l'aide d'une hybridation spécifique avec une sonde marquée. La sonde est un ARN complémentaire marqué (par exemple radioactif ou enzymatique) du messager à rechercher. Elle peut être construite à partir d'un ARNm connu dont l'ADNc, après RT-PCR, a été cloné dans un phage. De l'ARN-poly(A) du tissu où la séquence est à rechercher est incubé avec cette sonde dans des conditions d'hybridation lente en
25 milieu liquide. Il se forme des hybrides ARN:ARN entre l'ARNm recherché et la sonde antisens. Le milieu hybridé est alors incubé avec un mélange de ribonucléases spécifiques de l'ARN simple brin, de telle sorte que seuls les hybrides formés avec la sonde peuvent résister à cette digestion. Le produit de digestion est ensuite déprotéinisé et repurifié, avant d'être analysé par électrophorèse. Les ARN hybrides marqués sont détectés par exemple par autoradiographie
30 ou chimioluminescence.

Le taux de traduction du gène est évalué par exemple par dosage immunologique du produit dudit gène. Les anticorps utilisés à cet effet peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Leur production relève de techniques conventionnelles. Un anticorps polyclonal anti-Early
35 growth response 1 peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin ou une souris, à l'aide de la protéine entière. L'antisérum est prélevé puis épuisé selon des méthodes en soi connues par l'homme du métier. Un anticorps monoclonal peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256: 495- 497 (1975)). D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues.

On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique clone à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage ("phage display"), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour E.coli).

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

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

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

Le facteur de transcription EGR1 peut être produit selon des techniques usuelles en utilisant les cellules Cos-7, CHO, BHK, 3T3, HEK293. Il peut également être produit à l'aide de microorganismes tels que des bactéries (par exemple E. coli ou B. subtilis), des levures (par exemple Saccharomyces, Pichia) ou des cellules d'insecte, telles que Sf9 ou Sf21.

Modulateurs du facteur de transcription

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

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

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

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

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

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

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

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;

- des agents émulsionnants;
- des filtres UV-A et UV-B ;
- et des antioxydants, tels que l'alpha-tocophérol, le butylhydroxyanisole ou le butylhydroxytoluène, la Super Oxyde Dismutase, l'Ubiquinol ou certains chélatants de métaux.

5

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

Légende des figures :

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemples : DONNEES EXPERIMENTALES

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

Méthodes :

5 Des souris C57BL/6 femelles de 42 jours dont les follicules pileux de la région dorsale étaient en télogène (Chase, 1954) ont été ovariectomisées ou non au jour 1 de l'étude. L'ovariectomie pratiquée pendant la phase télogène provoque sous une semaine une entrée massive des follicules pileux de la région dorsale en phase anagène (Chanda, 2000.) alors que les follicules pileux de la région dorsale des animaux contrôles sont toujours en télogène.

10 Des prélèvements de peau ont été réalisés dans la région dorsale au jour 0, 1, 2, 4, 6 et 8 de l'étude. Une partie du prélèvement a été utilisé pour confirmer le passage en anagène par analyse histologique. L'autre partie du prélèvement a été utilisé pour réaliser une analyse du transcriptome par la technologie des puces Affymetrix.

L'expression des gènes a été analysée sur une station Affymetrix (module microfluidique; four
15 à hybridation; scanner; ordinateur) en suivant les recommandations du fournisseur. En résumé, les ARN totaux isolés des tissus sont transcrits en ADNc. A partir d'ADNc double brin, les ARNc marqués à la biotine sont synthétisés en utilisant la polymérase T7 et un précurseur NTP conjugué à la biotine. Les ARNc sont ensuite fragmentés en fragments de petites tailles. Toutes les étapes de biologie moléculaire sont contrôlées en utilisant le système « Lab on a chip »
20 d'Agilent pour confirmer la bonne efficacité des réactions enzymatiques. La puce Affymetrix est hybridée avec l'ARNc biotinylé, rincée et ensuite marquée par fluorescence en utilisant un fluorophore conjugué à la Streptavidine. Après différents lavages, la puce est scannée et les résultats sont calculés en utilisant le logiciel MAS5 fourni par Affymetrix. On obtient une valeur d'expression pour chaque gène ainsi que l'indication de la présence ou l'absence de la
25 valeur obtenue. Le calcul de la significativité de l'expression est basé sur l'analyse des signaux qui sont obtenus suite à l'hybridation de l'ARNc d'un gène donné avec un oligonucléotide hybridant parfaitement (« perfect match ») versus un oligonucléotide qui contient une mutation, (« single mismatch ») dans la région centrale de l'oligonucléotide.

30 Résultats:

Figure 1 :

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

Figure 2

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

Figure 3

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

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

Méthodes :

Des sondes sens et antisens ont été préparées à partir du facteur de transcription EGR1 par incubation du gène linéarisé (2µg) avec 63 µCi de [³⁵S]UTP (1250 Ci/mmol ; NEN, Massachusetts, USA) en présence de l'ARN polymérase T7 ou T3. L'hybridation *in situ* a été réalisée sur un tissu de souris fixé au formaldéhyde et enveloppé dans de la paraffine. Des sections (4µm de large) ont ensuite été déparaffinées dans du toluène et réhydratées dans un gradient d'alcool. Après séchage, les différentes sections ont été incubées dans un tampon de préhybridation pendant deux heures. L'hybridation s'est déroulée sur la nuit dans un tampon d'hybridation (tampon de préhybridation avec 10mM DTT et 2X10⁶ cpm ARN/µl ³⁵S marqué) à 53°C. L'excès de sonde a été éliminé et les coupes ont été inclinées dans une émulsion photographique LM1 (Amersham Biosciences, UK) et exposées dans le noir à 4°C pendant au moins un mois. Les coupes ont alors été développées et contre-colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Suite à l'incubation en présence d'une émulsion photographique, les structures histologiques marquées de façon radioactive par la sonde sont révélées (accumulation de grains argentés). Un signal spécifique se manifeste par un marquage positif avec la sonde antisense (Figure 4B et Figure 5B) et l'absence de marquage avec la sonde sens (Figure 3A et Figure 4A) utilisé comme contrôle négatif.

RESULTATS:

Figure 4

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

Figure 5

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

Conclusion

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

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

REVENDICATIONS

1. Méthode in vitro de criblage de composés candidats pour le traitement préventif et/ou curatif de l'alopecie, comprenant les étapes suivantes :
 - 5 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 ;
 - 10 c. Mesure de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1, de l'expression de son gène ou de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, dans les échantillons biologiques ou mélanges réactionnels ;
 - 15 d. Sélection des composés pour lesquels une modulation de l'expression ou de l'activité de la protéine Early Growth Response 1, ou une modulation de l'expression de son gène ou une modulation de l'activité d'au moins un de ses promoteurs, est mesurée dans l'échantillon ou le mélange traité en b) par rapport à l'échantillon ou au mélange non traité.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que les composés sélectionnés à l'étape d) activent l'expression ou l'activité de la protéine Early Growth Response 1, ou l'expression de son gène ou l'activité d'au moins un de ses promoteurs.
- 20 3. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules transfectées avec un gène rapporteur lié de manière opérante à tout ou partie du promoteur du gène codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène rapporteur.
- 25 4. Méthode selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les échantillons biologiques sont des cellules exprimant le gène codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1, et en ce que l'étape c) consiste à mesurer l'expression dudit gène.
- 30 5. Méthode selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle les cellules sont choisies parmi les kératinocytes et les fibroblastes de la papille dermique ou du derme.
- 35 6. Méthode selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle les cellules sont des cellules transformées par un acide nucléique hétérologue codant pour le facteur de transcription Early Growth Response 1.

SEQ ID No.1

```

5      1  ggcgcagaact  tggggagcgcc  ccgcgcgcct  ccgcgcgcgc  agccagcttc  cgccgcgcga
      61  ggaccggcccc  ctgccccagc  ctccgcagcc  ggggcgcgtc  caccgccgcc  cgcgcccagg
     121  gcgagtcggg  gtcgcgcgct  gcaagcttct  cagtggtccc  cgcgccccgc  atgtaacccg
     181  gccaggcccc  cgcaactgtg  tccccctgcag  ctccagcccc  gggctgcacc  cccccgcccc
     241  gacaccagct  ctccagcctg  ctcgctccagg  atggccgcgg  ccaaggccga  gatgcagctg
    10  301  atgtccccgc  tgcatatctc  tgaccgcgtt  ggatcctttc  ctcactcgcc  caccatggac
      361  aactacccta  agctggagga  gatgatgctg  ctgagcaacg  gggctcccca  gttcctcggc
     421  gccgcggggg  ccccagaggg  cagcggcagc  aacagcagca  gcagcagcag  cgggggcggt
     481  ggaggcgggc  gggggcggcg  caacagcagc  agcagcagca  gcaccttcaa  cctcaggcgc
     541  gacacggcg  agcagcccta  cgagcacctg  accgcagagt  cttttcctga  catctctctg
    15  601  aacaacgaga  aggtgctggt  ggagaccagt  taccacagcc  aaaccactcg  actgcccccc
     661  atcacctata  ctggcgctt  ttccctggag  cctgcaccca  acagtggcaa  caccttgtgg
     721  cccgagcccc  tcttcagctt  ggtcagtggt  ctagtgcagc  tgaccaaccc  accggcctcc
     781  tcgtccccag  caccatctcc  agcggcttgc  tcgcctccg  cctcccagag  cccacccctg
     841  agctgcgcag  tgccatccaa  cgacagcagt  cccatttact  cagcggcacc  caccttcccc
    20  901  accccgaaca  ctgacatttt  ccttgagcca  caaagccagg  ccttcccggg  ctcggcaggg
     961  acagcgctcc  agtaccgcgc  tcttgcttac  cctgcgcgca  aggggtggtt  ccagggtccc
    1021  atgaccccc  actacctgtt  tcacacagc  cagggggatc  tgggcctggg  caccaccagc
    1081  cagaagccct  tccagggcct  ggagagccgc  acccagcagc  cttcgtaaac  cctctgtctt
    1141  actattaagg  cttttgccc  tcagtgggg  tcccaggacc  tgaaggccct  caataccagc
    25  1201  taccagtccc  agctcatcaa  acccagcgc  atgcgcaagt  accccaaccc  gccagcaag
     1261  acgccccccc  acgaacgccc  ccacatccgc  ttacgttggt  ccagtggagt  cctgtgatcg
     1321  cgctccgacg  agctcaccgc  ccacatccgc  atccacacag  gccagaagcc  cttccagtgc
     1381  cgcactcgca  tgcgcaactt  cagcgcgcgc  gaccacctca  ccacccacat  ccgcacccac
     1441  acaggcgaaa  agcccttcgc  ctgcgacatc  tgtggaagaa  agtttgccag  gagcgatgaa
    30  1501  cgaagaggc  ataccaagat  ccacttgccg  cagaaggaca  agaaagcaga  caaaagtgtt
     1561  gtggcctctt  cggccacctc  ctctctctct  tcctaccctg  ccccggttgc  tacctcttac
     1621  ccgtcccccg  ttactacctc  ttatccatcc  ccggccacca  cctcataccc  atccctgtg
     1681  cccacctcct  tctcctctcc  cggtcctctg  cactgactcc  acctacccat  cccctgtgca  cagtggcttc
     1741  gcccccctgt  cggtggccac  cactgactcc  tctgttcccc  ctgcttcccc  ctgcttcccc  ggcccaggtc
    35  1801  agcagcttcc  cttcctcagc  tgtcaccaac  tccttcagcg  cctccacagg  gctttcggac
     1861  atgacagcaa  ccttttctcc  caggacaatt  gaaatttgct  aaagggaaa  gggaaagaaa
     1921  gggaaaaggg  agaaaaagaa  acacaagaga  cttaaaggac  aggaggagga  gatggccata
     1981  ggagaggagg  gttcctctta  ggtcagatgg  aggttctcag  agccaagtcc  tccctctcta
    40  2041  ctggagtgga  aggtctattg  gccacaatc  ctttctgccc  acttcccctt  ccccaattac
     2101  tattcccttt  gacttcagct  gcctgaaaca  gccatgtcca  agttcttcac  ctctatccaa
     2161  agaacttgat  ttgcatggat  tttggataaa  tcatttcagt  atcatctcca  tcatatgcct
     2221  gaccccttgc  tccttccaat  gctagaaaat  cgagttggca  aaatggggtt  tgggcccctc
     2281  agagccctgc  cctgcaccct  tgtacagtgt  ctgtgccatg  gatttcgttt  ttcttggggg
     2341  actcttgatg  tgaagataat  ttgcatattc  tattgtatta  tttggagtta  ggtcctcact
    45  2401  tgggggaaaa  aaaaaaaaga  aaagccaagc  aaaccaatgg  tgatcctcta  ttttgtgatg
     2461  atgctgtgac  aataagtttg  aacctttttt  tttgaaacag  cagtccaggt  attctcagag
     2521  catgtgtcag  agtgttggtc  cgttaacctt  tttgtaaata  ctgcttgacc  gtactctcac
     2581  atgtggcaaa  atatgggttg  gtttttcttt  tttttttttt  ttgaaagtgt  tttttcttcg
     2641  tccttttggg  ttaaaaagtt  tcacgtcttg  gtgccttttg  tgtgatgcgc  cttgctgatg
    50  2701  gcttgacatg  tgcaatttgt  agggacatgc  tcacctctag  ccttaagggg  ggcagggagt
     2761  gatgatttgg  gggaggcttt  gggagcaaaa  taaggaagag  ggctgagctg  agcttcgggt
     2821  ctccagaatg  taagaaaaca  aaatctaaaa  caaaatctga  actctcaaaa  gtctattttt
     2881  ttaactgaaa  atgtaaatat  ataaatatat  tcaggagtgt  gaatgttgta  gttacctact
     2941  gagtaggcgg  cgatttttgt  atgttatgaa  catgcagttc  attattttgt  ggttctattt
    55  3001  tactttgtac  ttgtgtttgc  ttaaacaaag  tgactgtttg  gcttataaac  acattgaatg
     3061  cgctttattg  cccatgggat  atgtggtgta  tatccttcca  aaaaattaaa  acgaaaataa
     3121  agtagctgcg  attggg

```

SEQ ID No.2

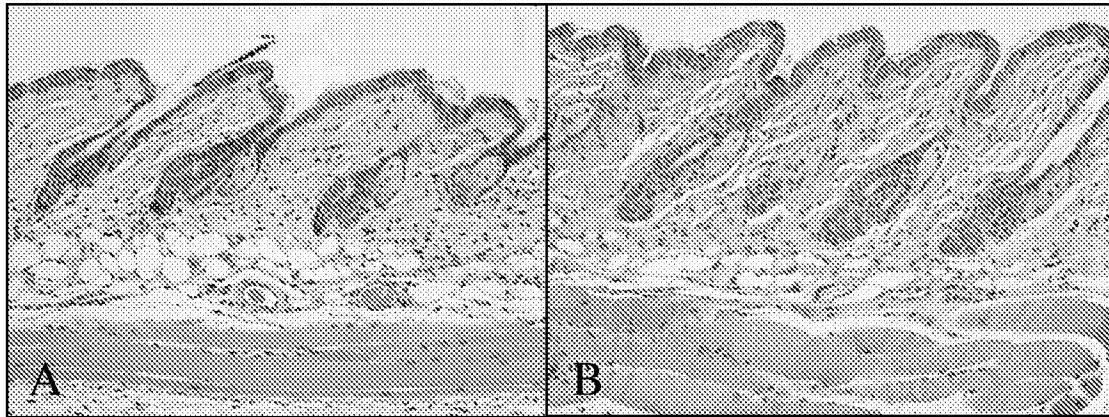
```

60  MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGG
GGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS
GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEP
65  QSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAKGGFQVPMIPDYLFPPQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTI
KAFATQSGSQDLKALNTSYQSLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACPVECDRRFSRSDLTRHIRHTGQ
KPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRHTTGKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHRLRQDKKADKSVVASSATS
SLSSYPSPVATSYSPSVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFSPSPVATTYSSVPPAFPAQVSSF
PSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC

```

J 0

J 6 ovariectomie



J 8 ovariectomie

J 8 contrôle

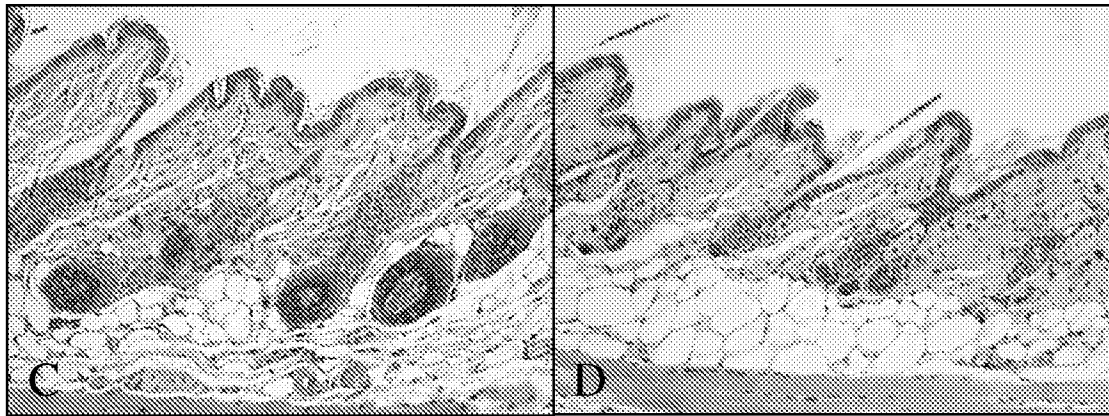
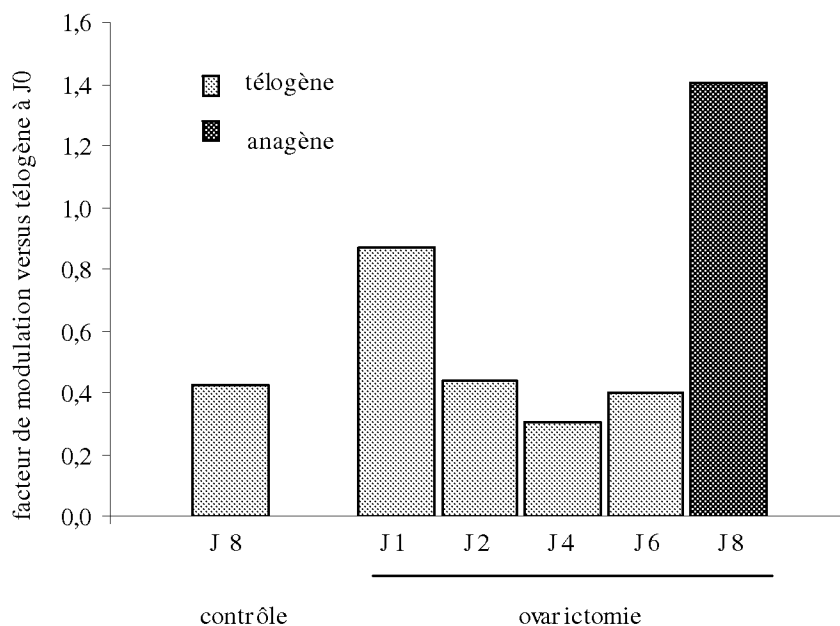


Figure 1 : Analyse histologique illustrant le passage en anagène induit par l’ovariectomie.

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

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



10

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

15

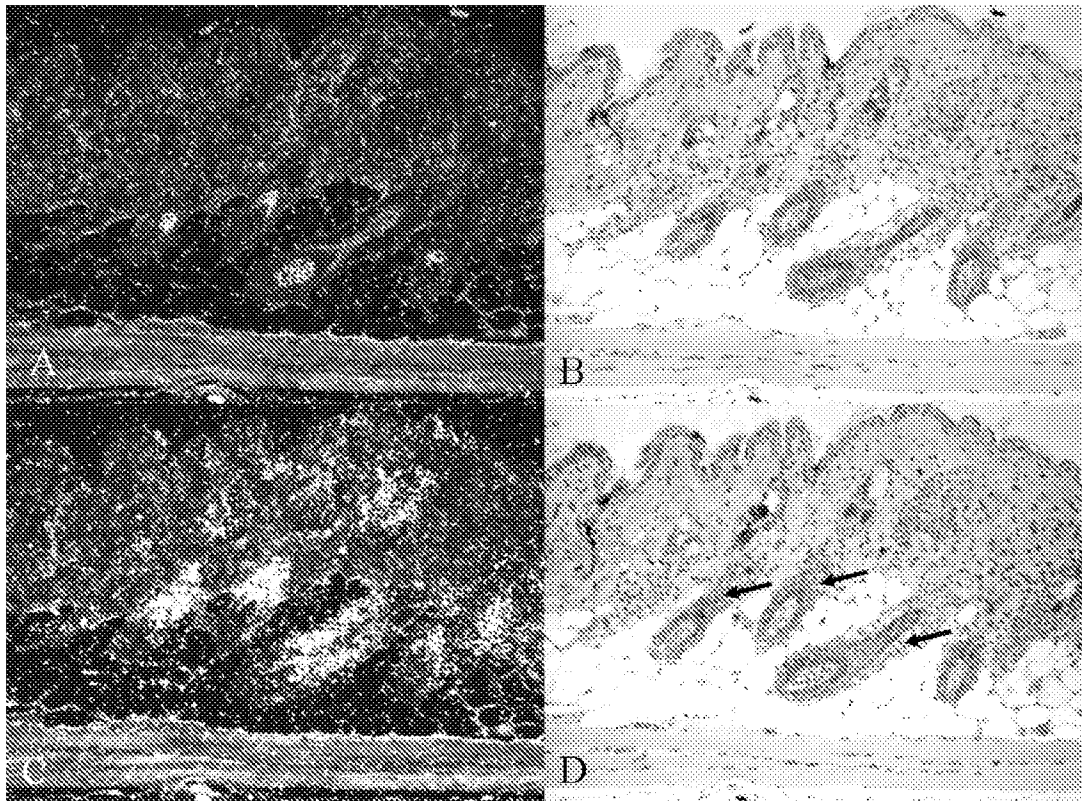


Figure 4 : Analyse par hybridation *in situ* illustrant que le gène EGR1 est exprimé dans les follicules pileux en anagène précoce.

5

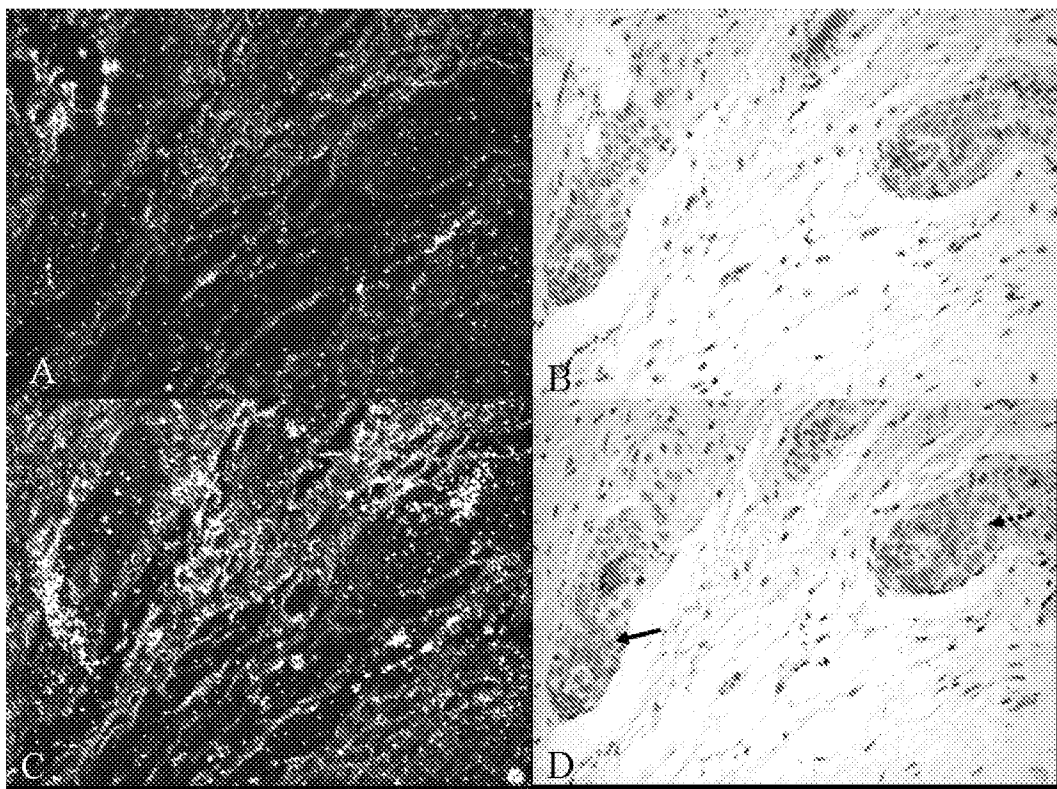


Figure 5 : Analyse par hybridation *in situ* illustrant que le gène EGR1 est exprimé dans les follicules pileux en anagène tardive.