

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :

2 974 372

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

②① N° d'enregistrement national :

11 53535

⑤① Int Cl⁸ : C 12 Q 1/68 (2012.01), C 12 Q 1/02, A 61 K 8/00, 31/00, 35/00, 36/00, 38/00, A 61 Q 19/00, A 61 P 17/00

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 22.04.11.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 26.10.12 Bulletin 12/43.

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

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : L'OREAL Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : BERNERD FRANCOISE, DUVAL
CHRISTINE, DE LACHARRIERE OLIVIER et NOU-
VEAU STEPHANIE.

⑦③ Titulaire(s) : L'OREAL Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : ERNEST GUTMANN YVES PLASSE-
RAUD SAS.

⑤④ SIGNATURE MOLECULAIRE DES TACHES PIGMENTAIRES CUTANÉES, ASSOCIÉE AU REMODELAGE DE
LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.

⑤⑦ La présente invention concerne une signature moléculaire des taches pigmentaires cutanées, comprenant les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1, et diverses applications de cette signature. L'invention concerne notamment une méthode de caractérisation d'une tache pigmentaire apparente ou soupçonnée chez un être humain, comprenant la comparaison des niveaux d'expression, dans des échantillons de peau issue de ladite tache et de peau adjacente non lésée, d'au moins un gène dermique lié au remodelage matriciel choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1. L'invention concerne également des méthodes d'évaluation de l'efficacité d'un traitement des taches pigmentaires, des méthodes cosmétiques et thérapeutiques de traitement des taches pigmentaires, ainsi que divers modulateurs desdits gènes et leur utilisation.

FR 2 974 372 - A1



- 5 La présente invention est dans le domaine cosmétique, elle est relative à la peau. Elle s'inscrit plus généralement dans le cadre de la caractérisation des taches pigmentaires de la peau et du traitement de ces taches.

La couleur de la peau est principalement due à la présence d'un pigment, la mélanine dans
 10 l'épiderme. La mélanine est synthétisée par des cellules dendritiques spécifiques localisées dans la couche basale de l'épiderme, les mélanocytes. La mélanogénèse prend place dans des organelles, les mélanosomes qui, chargés de mélanine, sont transférés aux cellules voisines épidermiques, les kératinocytes, via les dendrites. La couleur de la peau, ou pigmentation constitutive varie selon les individus en fonction de la quantité de mélanine produite ainsi que de
 15 la nature chimiques de mélanines. Les mélanines sont des macromolécules formées à partir de tyrosine (eumélanine) ou de tyrosine et de cystéine (pheomélanine). Les mécanismes de synthèse mettent en jeu des enzymes dont les principales sont la tyrosinase et la protéine associée à la tyrosinase (Tyrep-1). Naturellement, la pigmentation de la peau est stimulée par l'exposition au soleil, c'est le phénomène de bronzage.

- 20 Il existe cependant des situations où le processus de pigmentation est altéré, et qui peuvent aboutir à des défauts de pigmentation, hypopigmentations (vitiligo, albinisme) ou à l'inverse à un excès de pigmentation, hyperpigmentations. Parmi les désordres hyperpigmentaires bénins, caractérisés par une accumulation anormale (hors bronzage) de mélanine, on peut citer le lentigo actinique, le mélasma, les séquelles pigmentaires d'acné, la pigmentation post-
 25 inflammatoires, la dermite des prés, la pigmentation liée à la plante poison ivy ou encore les dychromies bénignes du visage.

Le lentigo actinique, également dénommé lentigo sénile ou solaire, tache sénile, tache de vieillesse, ou encore communément dénommé "crasse sénile", "marguerites de cimetière" ou "fleurs de cimetière", est de loin la plus fréquente des lésions pigmentaires. Ce type de lésions
 30 apparaît sur des zones de la peau qui ont été photoexposées, telles que le visage, le dos des mains, les membres supérieurs et notamment la face dorsale des avant-bras, le dos, et en particulier le haut du dos. Elles touchent en général les individus à partir de 40 ans.

Macroscopiquement, les lentigos actiniques sont représentés par des macules pigmentées bénignes de couleur brune plus ou moins foncée, dont les bords sont nets mais irréguliers. De
 35 taille très variable, ils peuvent s'étendre de quelques millimètres à plus de deux centimètres.

Malgré sa grande fréquence, peu d'études ont été publiées sur la physiologie et la pathogenèse des lentigos actiniques. Sur la base des rares études histologiques existantes, il est connu qu'il existe une augmentation de la charge mélanique épidermique globale et plus particulièrement

au niveau de la couche basale. Il existe également un allongement des crêtes épidermiques qui peuvent prendre un aspect en massue dans le derme papillaire [Montagna 1980, ber Rahman 1996, Andersen 1997, Cario-Andre 2004]. Enfin, il peut y avoir des anastomoses entre des crêtes adjacentes donnant un aspect en pont ou en réseau.

- 5 Une incontinence pigmentaire avec présence de mélanine et de mélanophages peut également exister dans le derme.

Les traitements actuels :

Les troubles pigmentaires cutanés bénins sont généralement considérés comme inesthétiques.

- 10 Du fait de l'association avérée entre l'apparition des lentigos actiniques et l'exposition chronique au soleil, la prévention de leur apparition passe en général par l'application topique de produits dits photoprotecteurs comme les écrans solaires. Dans le cas de traitements « curatifs », de nombreux procédés, principalement à visées cosmétiques, ont donc été développés afin de tenter de les éliminer ou de réduire leur présence. L'élimination ou la réduction de la présence de ces troubles repose, d'ordinaire, sur l'application de traitements dépigmentants, basés sur la
- 15 réduction de l'activité de synthèse de la mélanine dans les mélanocytes. Les molécules dépigmentantes interfèrent avec une ou des étapes de la mélanogénèse. L'une des voies des principaux produits utilisés à ce jour repose sur l'inhibition de la tyrosinase, une des enzymes clés du processus de mélanogénèse. Le but de ces traitements est de diminuer voire de stopper la synthèse de pigment.

- 20 Les principales substances dépigmentantes connues sont l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide kojique, l'arbutine, les iminophénols, l'acide ascorbique et ses dérivés, l'association de carnitine et de quinone, les dérivés d'amino-phénol, et les dérivés de benzothiazole, des extraits naturels, des corticoïdes, On trouve souvent aussi associés à ces actifs des exfoliants permettant d'augmenter la desquamation, et ainsi d'éliminer plus facilement la mélanine
- 25 présente dans le stratum cornéum.

Une autre méthode de traitement non cosmétique consiste à détruire les lésions par des moyens physiques ou chimiques en utilisant les lasers ou les peelings. Cependant, ce sont des procédures assez lourdes qui ne s'attaquent pas à l'étiologie du désordre. Dans la majorité des cas, les lentigos actiniques réapparaissent quelques temps après le traitement.

30

Par ailleurs, il existe des inconvénients majeurs aux traitements existants. Les substances dépigmentantes peuvent présenter notamment une certaine instabilité, une faible efficacité à faible concentration, une activité biologique touchant d'autres fonctions, des propriétés toxiques ou allergisantes.

- 35 De plus, du fait qu'ils ne ciblent pas la cause profonde ayant entraîné le dérèglement de la pigmentation, il existe une grande hétérogénéité de réponse aux différents traitements dépigmentants. Ainsi, pour un traitement donné, administré par exemple de façon topique, un trouble pigmentaire cutané bénin donné, comme un lentigo actinique ou un mélasma, peut

s'atténuer ou disparaître, alors qu'un autre n'évoluera pas. Cette variabilité peut être observée entre des lésions chez des individus différents mais aussi chez un même individu, entre différentes lésions. Il existe donc des troubles pigmentaires cutanés bénins pour lesquels aucun traitement topique n'est efficace à ce jour.

5

Il existe donc un besoin de trouver des traitements plus efficaces et plus inoffensifs pour ce type de lésion.

Pour cela, il est nécessaire d'identifier les dérégulations moléculaires et dysfonctionnements fonctionnels pouvant exister dans ce type de désordre pigmentaire afin de pouvoir identifier de

10 nouvelles cibles et de sélectionner des actifs corrigeant ces défauts.

Dans l'art antérieur, concernant le traitement des taches pigmentaires et plus particulièrement des lentigos actiniques, il est décrit la stimulation au niveau génomique ou protéinique de molécules qui sont étroitement associées aux mélanocytes et la mélanogénèse (enzymes de la
15 mélanogénèse, protéine du mélanosome, facteurs paracrine clé de la mélanogénèse). Elle est trouvée dans l'épiderme ou le derme pour les protéines suivantes : Tyrosinase, TRP1, DCT, Pmel-17 , POMC, ET1, ETBR, SCF, c-KIT , KGF , KGFR, Hepatocyte growth factor (HGF), MIA, TRPM1, Melan-A, Pink eye dilution, P53 et IL1 α .

Par ailleurs, d'autres études décrivent des modifications moléculaires ou cellulaires dans le
20 lentigo solaire ou sénile par des analyses de l'expression de gènes ou des protéines. Cependant, de ces différentes études, il ne ressort aucun mécanisme ou dysfonctionnement fonctionnel général sous-tendant l'apparition des taches pigmentaires.

Aucun document de l'art antérieur n'a permis de mettre en évidence de manière fiable des dérégulations moléculaires ou des dysfonctionnements fonctionnels pouvant exister dans ce
25 type de désordre pigmentaire, au-delà des molécules étroitement associées aux mélanocytes et la mélanogénèse.

Les présents inventeurs ont mis en évidence pour la première fois l'implication de gènes dermiques liés à la matrice extracellulaire et à la jonction dermo-épidermique dans les
30 dérèglements pigmentaires se traduisant par des taches pigmentaires de la peau, et plus particulièrement l'implication de gènes liés au remodelage de la matrice extracellulaire.

La matrice extracellulaire assure au niveau de la peau un rôle structural grâce à sa capacité à assurer le support et la cohésion des tissus et des cellules et grâce à ses propriétés mécaniques qui lui permettent de faire résistance à la traction (notamment du fait de la
35 présence de collagènes), à la compression (notamment du fait de la présence de protéoglycanes).

Elle joue un rôle biologique important car c'est aussi un acteur majeur de la régulation de l'homéostasie épidermique et dermique. Grâce, entre autres, à ses propriétés de réservoir de

facteurs de croissance et de cytokines, elle est impliquée dans la morphogénèse, la prolifération, la différenciation cellulaire et la réparation tissulaire

La jonction dermo-épidermique (JDE) quant à elle est réalisée par la membrane basale qui est constituée d'un feuillet de matrice extracellulaire et qui sépare l'épiderme du derme. Elle
 5 constitue une barrière de perméabilité et régule les échanges de molécules, en particulier de nutriments, entre les deux tissus. Elle assure une fonction d'attachement et d'ancrage de l'épiderme à la matrice sous-jacente et de cohésion structurale de l'épithélium. Elle joue aussi un rôle important dans la régulation de la différenciation, et de la migration des cellules épidermiques ainsi que les étapes de morphogénèse de l'épiderme.

10

La matrice extracellulaire et le tissu conjonctif sont en continuel renouvellement, par un processus de synthèse et de dégradation enzymatique. Des protéines sont spécifiquement impliquées dans ce processus.

Parmi les protéases de dégradation de la matrice on peut citer la classe des métalloprotéinases
 15 (MMP) qui sont régulées par des inhibiteurs spécifiques (TIMP). Elles dégradent plus ou moins spécifiquement des molécules très variées comme le collagène, la gélatine, l'élastine, des proteoglycans, des glycoprotéines comme la fibronectine ou les laminines. Ce sont des enzymes lytiques c'est-à-dire qu'elles transforment les macromolécules en molécules de petite taille solubles. Des enzymes de type serine protéases sont aussi impliquées dans le
 20 remodelage matriciel. L'activateur du plasminogène (urokinase, PLAU) dont les substrats sont la fibronectine et le plasminogène fait partie de ce type de protéase.

D'autres protéases contrairement aux premières citées qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaires, sont des enzymes intracellulaires qui agissent après un processus d'internalisation du substrat à lyser, ou qui contenues dans des granules sont excrétées suite à
 25 un stimulus. Tel est le cas des cathepsines ou du lysozyme.

Pour la première fois, il a été montré par les présents inventeurs que certains gènes liés à la matrice extracellulaire et plus particulièrement au remodelage matriciel ont des niveaux de transcription différant significativement entre de la peau saine et de la peau issue d'une tache
 30 pigmentaire, mettant ainsi en évidence le lien entre dérégulation de la fonction de remodelage au sein de la matrice extracellulaire et modulation de la pigmentation induisant notamment l'apparition de taches pigmentaires.

On peut penser que l'augmentation ou la diminution de la quantité de certaines de ces protéines impliquées dans la synthèse ou la dégradation des molécules du stroma et de la jonction
 35 dermo-épidermique peut perturber l'homéostasie dermique, jonctionnelle et se répercuter globalement au niveau épidermique. De ce fait, sans pour autant être lié par une quelconque théorie, les modifications d'expression de différents gènes liés au remodelage matriciel au sein du derme ont conduit les inventeurs à penser que la dérégulation de ces gènes, signe d'une

- 5 -

modification de tout le compartiment dermique, perturbe l'homéostasie de l'épiderme et génère des modifications importantes en particulier de l'architecture histologique de l'épiderme dans les taches pigmentaires (élongation des crêtes épidermiques dans le derme par exemple).

En conséquence, la charge mélanique épidermique est augmentée et donne lieu à des taches
5 pigmentaires.

La présente invention est relative à une signature moléculaire représentative des différences d'expression génique existant entre la peau issue de tache pigmentaire et la peau saine adjacente, et aux différentes applications et méthodes faisant usage de la connaissance de
10 cette signature, notamment pour moduler la pigmentation de la peau, dans le traitement cosmétique des taches pigmentaires ou pour uniformiser le teint ou homogénéiser la couleur de la peau. Cette signature est constituée des 5 gènes suivants : MXRA5 (protéine associée au remodelage matriciel de type 5, « matrix-remodeling associated 5 »), LYZ (Lysozyme ; amyloïdose rénale), CTSL2 (cathepsine L2), PLAU (activateur du plasminogène, urokinase) et
15 TIMP1 (inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases-1).

Lesdits gènes s'entendent des gènes humains dénommés ainsi.

Les inventeurs ont en effet mis en évidence la modulation significative et reproductible du niveau d'expression de ces gènes entre de la peau issue de tache pigmentaire et de la peau saine correspondante.

20 La présente invention concerne notamment selon un premier aspect une méthode de caractérisation d'une tache pigmentaire cutanée. Une telle méthode permet entre autres de confirmer la nature de la tache pigmentaire dans le cas où cette dernière est déjà apparente, par exemple visuellement à l'œil nu. La méthode permet également de prédire l'apparition d'une tache, quand cette dernière n'est pas encore observée mais uniquement soupçonnée, ou bien
25 de conclure qu'une peau est encline à la formation de taches cutanées, ou sujette à des défauts de pigmentation, par exemple quand aucune tache n'est encore apparente.

Les taches pigmentaires cutanées concernées sont des taches hyperpigmentaires, ou encore dites hyperpigmentées, correspondant à un excès de pigment, ou bien des taches hypopigmentaires, ou encore hypo-pigmentées, correspondant à des défauts de pigmentation.

30 Des hypopigmentations envisageables dans le cadre de la présente invention sont notamment le vitiligo et l'albinisme. Des désordres hyperpigmentaires bénins envisageables dans le cadre de l'invention, caractérisés par une accumulation anormale (hors bronzage) de mélanine, sont par exemple le lentigo actinique, le mélasma, les séquelles pigmentaires d'acné, la pigmentation post-inflammatoires, la dermite des prés, la pigmentation liée à la plante poison ivy ou encore
35 les dyschromies bénignes du visage. Les taches pigmentaires selon la présente invention s'entendent également des défauts, imperfections ou irrégularités de pigmentation rendant le teint non uniforme, ou la couleur de la peau non homogène.

Les taches pigmentaires dont il est question sont préférentiellement des taches pigmentaires de la peau humaine. Toutefois, les désordres au niveau de la matrice extracellulaire et du processus de remodelage matriciel, dans le derme, mis en évidence par les présents inventeurs étant tout-à-fait généraux, des méthodes similaires peuvent être envisagées pour d'autres
 5 espèces animales touchées également par les taches pigmentaires. Dans ce cas, les différentes méthodes, utilisations ou compositions selon l'invention seront mises en œuvre avec les gènes de l'espèce considérée, orthologues aux gènes humains de l'invention.

La méthode comprend la comparaison des niveaux d'expression au sein de la peau issue de ladite tache et au sein de la peau non lésée, de préférence adjacente, du même individu, d'au
 10 moins un gène dermique lié au remodelage matriciel choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.

Les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1 sont les gènes de l'invention. Ils partagent un rôle dans le processus de remodelage matriciel.

Par ailleurs, lesdits gènes de l'invention sont dits gènes dermiques du fait qu'il s'agit de gènes
 15 exprimés majoritairement dans le derme et donnant lieu à des protéines caractéristiques du compartiment dermique ou bien de la jonction dermo-épidermique quant à sa face dermique ; et ce par opposition par exemple à des protéines kératinocytaires, à des protéines intracellulaires ou à des protéine épidermiques notamment.

Les niveaux d'expression de l'un au moins des gènes de l'invention sont mesurés au niveau de
 20 la peau issue de tache avérée ou supposée, et au niveau de la peau adjacente non lésée. De préférence, les niveaux sont mesurés sur des échantillons de peau prélevés au sein de la tache et au sein d'une zone adjacente non lésée. Les échantillons sont par exemple des biopsies de peau. Des biopsies de quelques millimètres de diamètres sont suffisantes, par exemple une biopsie de 2 mm, ou bien 3mm de diamètre. On peut envisager également l'excision totale
 25 d'une lésion.

La zone non lésée est de préférence une zone adjacente aussi proche que possible de la tache mais à une distance suffisante pour que l'échantillon prélevé ne contienne aucune cellule susceptible d'appartenir à la tache pigmentaire. De préférence, la zone adjacente non lésée est une zone ayant une exposition à la lumière et au soleil comparable à la zone de la tache
 30 pigmentaire. Alternativement, la zone non lésée peut provenir d'une zone symétrique sur l'autre partie du sujet, ayant un emplacement parfaitement identique ; par exemple dans le cas d'une tache sur la main gauche, la zone non lésée peut être la zone correspondante sur la main droite. Dans ce cas, la zone non lésée n'est pas à proprement parler une zone adjacente. Par non lésée, on entend une zone qui ne possède pas de tache pigmentaire, ni d'irrégularité
 35 pigmentaire, de préférence une zone homogène en terme de pigmentation.

Du fait que la zone non lésée sert de référence, elle doit dans tous les cas être aussi comparable que possible que la zone de la tache, mais dépourvue de défaut pigmentaire.

Par niveau d'expression d'un gène, on entend préférentiellement, dans la présente description, le niveau de transcription dudit gène. Cependant, son niveau d'expression peut également se traduire par son niveau de traduction, à supposer toutefois qu'il s'agisse d'un gène codant pour une protéine. Tel est le cas pour les gènes de l'invention.

- 5 Concernant l'évaluation du niveau de transcription du gène choisi, elle peut être réalisée par différentes manières bien connues de l'homme du métier, directement ou bien après transcription inverse. Le niveau de transcription peut notamment être évalué par l'utilisation de puces à ARN ou puces à ADN vendues dans le commerce à cet effet. Une méthode d'évaluation possible est décrite dans la partie expérimentale.
- 10 Il est important de noter également que la méthode selon l'invention implique la comparaison des niveaux d'expression d'au moins l'un des gènes de l'invention. De ce fait, il peut être suffisant d'évaluer quantitativement ou qualitativement la différence entre les deux niveaux d'expression, sans pour autant évaluer et quantifier individuellement chacun des niveaux d'expression.
- 15 Les niveaux d'expression d'au moins l'un des gènes de l'invention peuvent être évalués par référence ou après normalisation avec le niveau d'expression d'autres gènes, dont le niveau d'expression est supposé sensiblement identique au sein de la tache et dans la zone de peau non lésée choisie. De tels gènes pour la normalisation sont bien connus de l'homme du métier et peuvent dépendre de la zone du corps où se trouve la tache. A titre d'exemple, les gènes
- 20 suivants peuvent être cités comme susceptibles de servir à la normalisation des niveaux d'expression des gènes de l'invention, codant pour :
La protéine ribosomale L13a (RPL13A), la beta-2-microglobuline (B2M), la protéine ribosomale S9 (RPS9), la protéine ribosomale S28 (RPS28) et la Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase (GAPDH).
- 25 La méthode selon l'invention est de préférence pratiquée *in vitro* ou bien *ex vivo*.
Selon un mode de réalisation de la méthode de l'invention, la tache pigmentaire est une tache non pathologique, bénigne, notamment par opposition aux lésions pathologiques telles que les naevi ; il peut s'agir d'une irrégularité dans la pigmentation de la peau.
De préférence, une méthode selon l'invention comprend la comparaison des niveaux
- 30 d'expression d'au moins deux gènes distincts parmi les gènes de l'invention, de préférence d'au moins trois gènes distincts, voire quatre gènes distincts. Il est également envisageable de comparer les niveaux d'expression des 5 gènes de l'invention.
Quand deux gènes sont choisis, il peut s'agir des combinaisons suivantes : MXRA5 et LYZ ; MXRA5 et CTSL2 ; MXRA5 et PLAU ; MXRA5 et TIMP1 ; LYZ et CTSL2 ; LYZ et PLAU ; LYZ et
- 35 TIMP1 ; CTSL2 et PLAU ; CTSL2 et TIMP1 ou PLAU et TIMP1. Toutes les combinaisons deux à deux, parmi les 5 gènes de l'invention, sont des combinaisons préférentielles pour la mise en œuvre de l'invention.

Pour les combinaisons de 3 gènes, sont notamment envisagées les combinaisons suivantes : MXRA5, LYZ et CTSL2; MXRA5, LYZ et PLAU; MXRA5, LYZ et TIMP1; LYZ, CTSL2 et PLAU ; LYZ, CTSL2 et TIMP1; et CTSL2, PLAU et TIMP1.

Des combinaisons de 4 gènes envisageables selon la présente invention sont notamment les
 5 combinaisons suivantes : MXRA5, LYZ, CTSL2 et PLAU; MXRA5, LYZ, CTSL2 et TIMP1; MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1 et LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.

Une combinaison particulière est celle comprenant les gènes MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, qui ont pour point commun d'être modulés de la même manière, notamment d'être surexprimés au sein de taches hyperpigmentaires.

10 D'autres combinaisons sont également envisageables au sens de la présente invention, notamment des combinaisons comprenant au moins un gène parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1; et le gène CTSL2.

Les 5 gènes de l'invention ont pour point commun d'être impliqués dans le processus de remodelage matriciel.

15 Toutes les combinaisons ou sous-groupes de gènes spécifiques préférés en rapport avec cet aspect de l'invention sont également préférés pour les autres aspects de l'invention.

La mise en œuvre de la méthode selon l'invention conduit à la conclusion que la tache supposée ou observée est une tache hyperpigmentaire si le niveau d'expression est

- supérieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache,
 20 par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et
- inférieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène choisi est CTSL2.

25 En effet, les présents inventeurs ont mise en évidence la surexpression des gènes MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1 dans la peau issue de tache hyperpigmentaire, notamment de lentigo actinique, par rapport au niveau d'expression dans la peau adjacente non lésée. Ils ont également mis en évidence la sous-expression du gène CTSL2 dans la peau issue de tache hyperpigmentaire, notamment de lentigo actinique, par rapport au niveau d'expression dans la
 30 peau adjacente non lésée.

A l'inverse, la mise en œuvre de la méthode selon l'invention conduit à la conclusion que la tache supposée ou observée est une tache hypo-pigmentaire si le niveau d'expression est :

- inférieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache,
 par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau
 35 adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et
- supérieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène choisi est CTSL2.

Par supérieur ou inférieur, on entend une différence de niveaux d'expression qui est statistiquement significative, supérieure au bruit et reproductible. Par exemple, la différence de niveau d'expression est d'au moins 10 %, c'est-à-dire que si le niveau d'expression d'un gène de l'invention dans la peau non lésée est fixé à 1, le taux de modulation est d'au moins 1,1 pour un gène surexprimé dans la peau lésionnelle et d'au plus 0,9 pour un gène sous-exprimé dans la peau lésionnelle.

De préférence, la méthode selon l'invention est mise en œuvre avec au moins deux gènes, l'un appartenant à la catégorie des gènes surexprimés dans les taches hyperpigmentaires, et sous-exprimés dans les tache hypo-pigmentaires, et l'autre étant le gène CTSL2 modulé à l'inverse du premier dans les taches pigmentaires. De préférence, la méthode est mise en œuvre avec au moins trois gènes : deux gènes choisis parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1 et le gène CTSL2, modulé à l'inverse des deux premiers dans les taches pigmentaires.

De préférence, dans le cadre de cette méthode de caractérisation, le niveau d'expression d'un des gènes de l'invention est comparé au sein de la peau d'un individu de type caucasien. De préférence, ledit individu est âgé d'au moins quarante ans, de préférence d'au moins cinquante ans, voire de soixante ans. L'individu considéré, dans le cadre de la présente invention, est de préférence de sexe féminin. Comme précédemment détaillé, le niveau d'expression d'un ou de plusieurs gènes de l'invention peut être comparé au sein d'échantillon de peau dudit individu.

Par ailleurs, les présents inventeurs ont également mis en évidence la modulation différentielle d'autres gènes dermiques entre de la peau issue d'une tache pigmentaire et de la peau non lésée, de préférence adjacente. Les inventeurs ont notamment mis en évidence la modulation des gènes dermiques suivants liés à la matrice extracellulaire :

- Gènes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1, codant pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation TGF- β – SMAD ;
- Gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2 codant pour des protéines de la famille des protéoglycanes et glycoprotéines extracellulaires,
- Gènes LEPREL1, PLOD2, COL6A3 et CRTAP codant pour des collagènes, composants de la matrice extracellulaire, et plus particulièrement des collagènes filamenteux du stroma et pour des molécules associées à la biosynthèse et à l'assemblage des collagènes ;
- Gènes LAMC1, LAMB3 et LAMA3 codant pour des laminines, protéines adhésives de la matrice extracellulaire;
- Gènes FRAS1, MATN2 et DST codant pour des protéines matricielles associées à la zone de la membrane basale ;
- Gènes ITGA2, ITGAV et ITGB1 codant pour des intégrines, impliquées dans la liaison des cellules à la matrice extracellulaire ;
- Gène ACTN1 codant pour une actine, composant de la matrice extracellulaire.

Par conséquent, la méthode de caractérisation selon la présente invention comprend également la comparaison des niveaux d'expression au sein de la peau issue de ladite tache et au sein de la peau non lésée, de préférence adjacente, d'au moins un premier gène dermique lié au remodelage matriciel choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1 et d'au moins un second gène choisi parmi la liste des gènes suivants : TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1 ; par exemple le second gène est choisi parmi la liste des gènes suivants TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1, ou bien parmi la liste des gènes suivants : EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2, ou bien encore parmi la liste des gènes suivants : FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Des gènes préférés au sein de TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1 sont les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 et TGFBR3. Des gènes préférés au sein de EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 sont les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN et CHSY1.

Des gènes préférés au sein de FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1 sont les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 et ITGA2.

De préférence, le second gène est choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1 ; et préférentiellement parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 et TGFBR3. Alternativement, le second gène est choisi parmi les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2, et préférentiellement parmi les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN et CHSY1. Selon une autre mise en œuvre encore, le second gène est choisi parmi les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et préférentiellement parmi les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 et ITGA2. Alternativement, le second gène peut être choisi parmi LEPREL1, PLOD2, COL6A3 et CRTAP, ou bien parmi LAMC1, LAMB3 et LAMA3, ou bien parmi FRAS1, MATN2 et DST, ou bien encore parmi ITGA2, ITGAV et ITGB1, ou bien être ACTN1.

Selon une mise en œuvre particulière, la méthode comprend la comparaison des niveaux d'expression d'au moins 3 gènes distincts, l'un choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1, un second choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1 et un troisième choisi parmi les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2. Selon une autre mise en œuvre encore, la méthode comprend la comparaison d'au moins 4 gènes distincts, les trois premiers étant choisis

comme décrit précédemment et le 4^{ème} dans la liste constituée de FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Toutes les associations de gènes décrites ci-dessus sont également des associations préférées dans le cadre des autres aspects de l'invention.

- 5 Si un gène supplémentaire, ou plusieurs, est choisi parmi les gènes THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFB2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, alors la méthode de caractérisation conduit à confirmer un tache hyperpigmentaire si le niveau d'expression est
 - 10 - supérieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFB2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et
 - 15 - inférieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi SOSTDC1, HS3ST6, FLRT2, PLOD2 et ECM1.
- 20 A l'inverse, la méthode d'évaluation conduit à confirmer une tache hypo-pigmentaire si le niveau d'expression est :
 - inférieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi THBS2, TGFBI, BMP2, SMAD3, TGFB2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et
 - 25 - supérieur dans la peau issue de la tache, ou dans l'échantillon de peau issue de la tache, par rapport au niveau dans la peau adjacente non lésée, ou dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi SOSTDC1, HS3ST6, FLRT2, PLOD2 et ECM1.
 - 30

La méthode décrite est également une méthode de test pour la prédiction de la formation de taches cutanées chez un sujet. Selon cette mise en œuvre, le niveau d'expression d'au moins un, et de préférence plusieurs, gène de l'invention est comparé dans un échantillon de peau, à son niveau d'expression dans la peau normale. Une modulation significative du niveau d'expression par rapport à la peau normale permet de conclure que la peau du sujet testé est encline à la formation de taches cutanées.

Par peau normale, il peut s'agir ou bien de la peau du même sujet, dans une zone corporelle notoirement dépourvue de taches, par exemple des zones non exposées au rayonnement solaire, ou bien des zones peu enclines à la formation de taches pigmentaires. Il peut également s'agir du niveau d'expression moyen desdits gènes, dans la peau de personnes
 5 dépourvues de taches et ayant de préférence le même type de peau que le sujet testé. Les gènes de normalisation décrits plus haut pourront être utilisés pour normaliser les taux d'expression des gènes de l'invention.

La présente invention concerne également, selon un second aspect, une méthode d'évaluation
 10 de l'efficacité d'un traitement des taches ou irrégularités pigmentaires, utilisant la signature mise en évidence par les inventeurs. Le traitement évalué peut être un traitement visant l'atténuation de tache pigmentaire ou toute autre modulation de la pigmentation, pour notamment uniformiser le teint, homogénéiser la couleur de la peau ou lutter contre les dyschromies. Selon une première mise en œuvre, cette méthode d'évaluation comprend une étape de comparaison des
 15 niveaux d'expression dans la peau issue d'une tache pigmentaire, avant et après traitement, d'au moins un gène dermique choisi parmi les gènes de l'invention, à savoir MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.

Selon cette méthode d'évaluation, la comparaison des niveaux d'expression du ou des gènes choisis est réalisée au sein de la peau issue d'une tache pigmentaire, ou bien au sein d'un
 20 échantillon correspondant, avant et après traitement. Il n'y a donc pas de comparaison à un niveau d'expression au sein de peau saine non lésée.

Comme pour la méthode de caractérisation selon le premier aspect de l'invention, les niveaux d'expression sont avantageusement normalisés à l'aide des niveaux d'expression des gènes codant pour la protéine ribosomale L13a (RPL13A), la beta-2-microglobuline (B2M), la protéine
 25 ribosomale S9 (RPS9), la protéine ribosomale S28 (RPS28) et la Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogénase (GAPDH).

Par la méthode d'évaluation telle que décrite, un traitement donné est considéré comme efficace pour le traitement d'une tache hyperpigmentaire si le niveau d'expression est :

- inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène
 30 est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et
- supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène choisi est CTSL2.

A l'inverse, par la méthode d'évaluation de l'invention, un traitement donné est considéré comme efficace pour le traitement de taches hypo-pigmentaires quand le niveau d'expression
 35 est :

- supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et

- inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène choisi est CTSL2.

Un traitement sera considéré comme sans effet si les niveaux d'expression du gène choisi, avant et après traitement, sont sensiblement identiques, ou bien si les différences observées ne

5 sont pas significatives.

Quand il est comparé les niveaux d'expression de plus d'un gène, le traitement est considéré comme efficace pour le traitement d'une tache ou d'une irrégularité pigmentaire si, pour la majorité des gènes testés, et de préférence pour l'ensemble des gènes testés, pris individuellement, le traitement est considéré comme efficace. Pour les autres gènes choisis, le

10 traitement doit de préférence être sans effet, mais non avoir l'effet inverse.

Selon une autre mise en œuvre, la méthode d'évaluation de l'efficacité d'un traitement des taches pigmentaires cutanées comprend la caractérisation d'une tache ou irrégularité pigmentaire selon la méthode de l'invention, avant et après traitement, et la comparaison des différences de niveaux d'expression observées entre la peau lésée de la tache ou irrégularité

15 pigmentaire et la peau saine.

Selon cette mise en œuvre de l'évaluation de l'efficacité d'un traitement, le traitement est considéré comme efficace si la différence entre les niveaux d'expression du ou des gènes choisis dans la peau lésée issue de la tache par rapport à la peau saine, de préférence adjacente, est moindre après traitement par rapport à ce qu'elle était avant le traitement.

20 Quand il est comparé les niveaux d'expression de plus d'un gène, il est de préférence conclu à l'efficacité du traitement quand pour la majorité des gènes choisis, et de préférence pour l'ensemble des gènes choisis, pris individuellement, on peut conclure à un traitement efficace.

De préférence, la comparaison des niveaux d'expression du ou des gènes choisis est réalisée sur des échantillons de peau prélevés à partie de la tache pigmentaire.

25 Le traitement considéré, évalué par la méthode de l'invention, n'est pas limité à un type particulier de traitement. Il peut s'agir d'un traitement par une molécule chimique, un actif, un extrait naturel, notamment une huile essentielle, un acide nucléique, notamment un ARNi, un complexe protéique ou tout autre molécule ou combinaison de molécules. Il peut également s'agir d'un traitement par un moyen physique ou des ondes, notamment électromagnétiques. Il

30 s'agit de préférence d'un traitement topique, mais il est également envisagé d'évaluer l'efficacité de traitements administrés par voie orale, par injection, ou par tout autre moyen d'administration.

Le traitement testé peut viser à atténuer ou faire disparaître une tache cutanée, à moduler la pigmentation de la peau, à uniformiser le teint, à homogénéiser la couleur de la peau ou à

35 atténuer les dyschromies.

Des traitements particulièrement préférés dans le cadre de cette invention sont des traitements cosmétiques, plus particulièrement des traitements topiques cosmétiques. Dans ce cas, la tache

pigmentaire considérée est une tache ou irrégularité pigmentaire non pathologique, par exemple il s'agit d'un lentigo actinique, solaire ou sénile.

Par les méthodes de l'invention, il est également possible d'évaluer l'efficacité de la combinaison de plusieurs traitements. Il est en effet possible d'évaluer des combinaisons
5 permettant au mieux de restaurer les niveaux d'expression d'un, de plusieurs ou de tous les gènes de l'invention, tels qu'ils sont exprimés au sein de peau non lésée.

Par les méthodes d'évaluation décrites ci-dessus, il est possible d'évaluer l'efficacité d'un nouveau traitement envisagé, ou bien également de quantifier ou qualifier l'efficacité de traitements déjà existants contre les taches pigmentaires, qu'elles soient hyperpigmentaires ou
10 bien hypo-pigmentaires. Par ce biais, il peut aussi être envisagé des combinaisons de traitements susceptibles d'être particulièrement efficaces, synergiques ou complémentaires.

Comme explicité pour les méthodes de caractérisation selon le premier aspect de l'invention, il est de préférence comparé les niveaux d'expression de plus d'un gène, de préférence d'au moins deux, trois, quatre ou bien des 5 gènes de l'invention.

15 Des gènes ou des combinaisons de gènes tout particulièrement préférés ont déjà été explicités en regard du premier aspect de l'invention ; les mêmes gènes ou combinaisons sont préférés dans cet aspect. Notamment, toutes les combinaisons deux à deux ou trois à trois des gènes de l'invention sont particulièrement préférées.

Par ailleurs, du fait des résultats complémentaires obtenus par les inventeurs concernant
20 d'autres gènes dermiques dont le niveau d'expression est modulé au sein de tache pigmentaire, les méthodes d'évaluation telles que décrites sont de préférence mises en œuvre avec au moins un premier gène choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUR et TIMP1, et au moins un second gène choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1,
25 FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1. Alternativement, le second gène peut être choisi parmi les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 ou bien parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1, ou bien encore parmi les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP,
30 LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Des gènes préférés au sein des gènes dermiques EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2 sont les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN et CHSY1.

Des gènes préférés au sein des gènes dermiques TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1, sont les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3,
35 THBS2 et TGFBR3.

Des gènes préférés au sein des gènes dermiques FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1 sont les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 et ITGA2.

Si un gène supplémentaire, ou plusieurs, est choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, alors la méthode d'évaluation conduit à

5 considérer un traitement efficace pour le traitement de taches hyperpigmentaires si le niveau d'expression est

- inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3,
- 10 CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et
- supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi SOSTDC1, HS3ST6, FLRT2, PLOD2 et ECM1.

A l'inverse, la méthode d'évaluation conduit à considérer un traitement efficace pour le traitement de taches hypo-pigmentaires si le niveau d'expression est :

- 15 - supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et
- inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène
- 20 est choisi parmi SOSTDC1, HS3ST6, FLRT2, PLOD2 et ECM1.

L'échantillon de peau provient de préférence d'un être humain de type caucasien, de préférence âgé d'au moins quarante ans, de préférence d'au moins cinquante ans, voire au moins soixante ans.

De préférence, dans le cadre de la présente invention et notamment pour la méthode

25 d'évaluation décrite, il s'agit de traitement de taches hyperpigmentaires, et tout préférentiellement de lentigos actiniques, solaires ou séniles.

La méthode d'évaluation de l'efficacité d'un traitement selon la présente invention est de préférence mise en œuvre *in vitro* ou *ex vivo*. Elle peut également être mise en œuvre *in vivo*.

Il est souhaitable que l'échantillon de peau avant traitement et après traitement soit prélevé à

30 partir de la même tache pigmentaire, ou bien d'une tache pigmentaire très proche si la taille de la tache ne permet pas d'obtenir aisément des échantillons avant et après traitement.

La présente invention concerne également une méthode *in vitro* d'évaluation de l'efficacité d'un traitement des taches pigmentaires ; une telle méthode comprend la comparaison, avant et après traitement, du niveau d'expression dans un modèle cellulaire représentatif de la peau,

35 d'au moins un gène dermique lié au remodelage matriciel choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1, ou bien du niveau d'expression ou d'activité du produit d'expression dudit gène choisi.

Le modèle cellulaire peut être de tout type considéré comme approprié par l'homme du métier. Il peut s'agir notamment de modèles cellulaires mono ou co-cultures, ou bien de modèles tridimensionnels de peau reconstruite, ou bien de peau cultivée *ex-vivo*. Il existe également des modèles cellulaires représentatifs de taches pigmentaires, plus particulièrement de lentigos actiniques, qui peuvent être utilisés dans le cadre de cette méthode. De tels modèles cellulaires n'ont pas besoin de mimer les taches pigmentaires (ou le lentigo) dans leur globalité mais doivent mimer des événements biologiques, des caractéristiques morphologiques ou pigmentaires observés dans les taches pigmentaires, notamment le lentigo. De tels modèles *in vitro* sont bien connus de l'homme du métier.

- 5 Selon une mise en œuvre préférée de la méthode *in vitro* décrite ci-dessus, elle comprend la comparaison des niveaux d'expression d'au moins deux gènes, de préférence d'au moins trois, quatre ou cinq gènes de l'invention, comme explicité pour les autres méthodes d'évaluation selon l'invention.

De même, comme explicité pour les autres méthodes d'évaluation, elles sont de préférence mises en œuvre avec au moins deux gènes, l'un étant choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLA2 et TIMP1, et le second étant choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, de préférence parmi les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2 ou bien parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1, ou bien encore parmi les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Des gènes préférés au sein de la liste TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1 sont TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 et TGFBR3.

Des gènes préférés au sein de la liste EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2 sont les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN et CHSY1.

Des gènes préférés au sein de la liste FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1 sont les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 et ITGA2.

Toutes les combinaisons de gènes spécifiques décrites en regard des autres aspects de l'invention sont également préférées dans le cadre de cet aspect.

Par ailleurs, au moyen de ces méthodes d'évaluation, il est possible de promouvoir un traitement auprès de consommateurs, en mettant en avant les résultats obtenus avec ce traitement dans les méthodes d'évaluation de l'efficacité décrites dans la présente invention. La présente invention fournit donc également une méthode permettant de recommander un produit en signalant son effet dans un protocole de test constitué par une méthode d'évaluation de l'efficacité telle que décrite précédemment. L'invention a donc également pour objet une

méthode pour la promotion d'un produit cosmétique ou traitement cosmétique consistant à faire état d'une efficacité, action ou propriété dudit produit ou traitement, démontrée par au moins une méthode opérée telle que décrite précédemment.

Une telle promotion du produit pourra se faire par n'importe quel canal de communication. Elle
5 pourra être faite notamment par la vendeuse, directement sur le point de vente, par la radio et la télévision, notamment dans le cadre de spots publicitaires. Elle pourra être faite également par le canal de la presse écrite, ou par le biais de tout autre document, en particulier à des fins publicitaires (prospectus). Elle pourra se faire également par Internet, ou par tout autre réseau informatique adéquat. Elle pourra être faite également directement sur le produit, notamment
10 sur son packaging ou sur toute notice explicative qui peut lui être associée.

La présente invention concerne également une méthode de criblage de molécules pour le traitement de taches pigmentaires cutanées comprenant la mise en œuvre d'une des méthodes d'évaluation décrites précédemment pour déterminer l'efficacité d'un traitement à base de cette molécule.

15 Selon un autre aspect, la présente invention concerne également une méthode cosmétique de traitement ou de prévention de tache ou irrégularité pigmentaire cutanée non pathologique de la peau humaine, comprenant la modulation du niveau d'expression ou de l'activité d'un gène dermique lié au remodelage matriciel, où ledit gène est choisi parmi la liste constituée des
20 gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1.

Les taches pigmentaires cutanées non pathologiques s'entendent de taches bénignes, dont l'élimination n'est souhaitable que pour des raisons esthétiques et nullement pour des raisons thérapeutiques. Les irrégularités de pigmentation incluent les imperfections au niveau pigmentaire rendant le teint non uniforme ou la couleur de la peau non homogène.

25 Les présents inventeurs ont montré le rôle important des gènes de l'invention au sein du derme au niveau des taches pigmentaires, et notamment le lien entre dérégulation du niveau d'expression de ces gènes et apparition de taches pigmentaires. De ce fait, suspendre ou diminuer la modulation de ces gènes peut permettre de diminuer ou abolir les dérégulations observées et ainsi permettre de restaurer une situation au niveau de la matrice extracellulaire
30 compatible avec l'absence de tache pigmentaire, avec donc un teint uniforme et une couleur de peau homogène.

Pour les mêmes raisons qu'explicitées en regard des autres aspects de l'invention, il est de préférence choisi plus d'un gène au sein des gènes de l'invention, par exemple au moins deux gènes, au moins trois ou quatre. Selon une mise en œuvre, la méthode cosmétique a pour but
35 de moduler le niveau d'expression de l'intégralité des gènes de l'invention. La méthode cosmétique selon l'invention a pour but de restaurer des niveaux d'expression proches de ceux qui sont observés au sein de la peau saine, adjacente par exemple d'une tache pigmentaire. Des gènes particulièrement préférés sont les gènes MXRA5, LYZ, PLAUI et TIMP1.

Selon une mise en œuvre préférée, ladite tache pigmentaire est une tache hyperpigmentaire, par exemple un lentigo actinique, sénile ou solaire. Dans un tel cas, la modulation recherchée dans les méthodes cosmétiques selon l'invention est une inhibition, totale, partielle ou temporaire, de l'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, PLAUI et
 5 TIMP1 ou bien une augmentation, éventuellement temporaire de l'expression du gène CTSL2. De préférence, l'inhibition n'est pas une inhibition totale, mais partielle, tendant à diminuer le niveau d'expression du gène choisi sans pour autant inhiber entièrement son expression.

Selon une autre mise en œuvre, ladite tache pigmentaire est une tache hypopigmentaire. Dans un tel cas, la modulation recherchée est inverse par rapport à la situation précédente,
 10 notamment une telle méthode vise à augmenter l'expression d'au moins un gène choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, PLAUI et TIMP1, ou bien à inhiber ou diminuer le niveau d'expression du gène CTSL2.

Par augmentation ou diminution du niveau d'expression, il est inclus l'augmentation ou la diminution du niveau de transcription desdits gènes, et l'augmentation ou la diminution du
 15 niveau de traduction desdits gènes, ainsi que l'augmentation ou la diminution de l'activité des protéines codées par ces gènes.

De préférence, concomitamment à la modulation du niveau d'expression recherché pour l'un des gènes de l'invention, une méthode cosmétique selon l'invention comprend de préférence également la modulation d'au moins un autre gène dermique, choisi parmi les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, SOSTDC1, EFEMP1, ECM1,
 20 ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1, FLRT2, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1. Des gènes préférés au sein de cette seconde liste de gènes dermiques sont les gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN et CHSY1 ; les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2 et TGFBR3 ;
 25 et les gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2 et ITGA2.

Les modulations appliquées, s'il s'agit du traitement d'une tache hyperpigmentaire sont la diminution du niveau d'expression pour les gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1, et
 30 l'augmentation du niveau d'expression pour les gènes SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, PLOD2 et FLRT2. Dans le cas de traitement de tache hypo-pigmentaire, les modulations appliquées sont inverses.

Une méthode cosmétique selon la présente invention comprend donc l'application d'un produit, notamment molécule chimique, extrait naturel, actif, acides nucléiques, peptides, ou d'un
 35 traitement modulant le niveau d'expression ou l'activité du produit d'expression d'au moins un des gènes dermiques de l'invention.

S'il s'agit d'un produit, il est de préférence appliqué de façon topique.

De préférence, la modulation est effectuée grâce à l'utilisation d'un modulateur d'un des gènes de l'invention. De tels modulateurs sont décrits dans l'exemple 3 et le tableau 3. Par exemple, une méthode cosmétique selon l'invention comprendra avantageusement l'application d'un composé choisi parmi un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10, le polypeptide activant
 5 l'adenylate cyclase pituitaire, le Valsartan, la poudre osseuse déminéralisée ou « Demineralized bone powder (DBP) », le phenylacetate de sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le Notoginsenoside R1, ou bien une association d'au moins deux de ces modulateurs.

Par ailleurs, une méthode cosmétique selon l'invention est avantageusement mise en œuvre
 10 après la caractérisation de la tache pigmentaire que l'on souhaite traiter par une méthode selon le premier aspect. En effet, cette première étape permet de caractériser la tache et donc de détecter les gènes dont le niveau d'expression est fortement modulé entre la zone de la tache et une zone non lésée, de préférence adjacente. Il est ensuite possible d'adapter un traitement qui permette d'agir sur le ou les gènes de l'invention qui sont modulés différenciellement au sein de
 15 cette tache, en appliquant spécifiquement des modulateurs pour lesdits gènes.

Quel que soit le traitement considéré, la méthode cosmétique selon l'invention peut également comprendre l'application d'un ou plusieurs composés actifs additionnels visant à renforcer les effets recherchés par exemple, toute substance décrite comme dépigmentante, des agents
 kératolytiques et/ou desquamants, des antioxydants, des filtres solaires chimiques ou physiques
 20 UV, des agents anti-inflammatoires et/ou apaisants, des acides désoxyribonucléiques et leurs dérivés.

La méthode cosmétique selon la présente invention est également applicable dans le cas de la prévention de l'apparition de taches pigmentaires ou d'autres irrégularités du teint ou de la couleur de la peau, et notamment de taches hyperpigmentées telles que le lentigo actinique.
 25 En effet, les différentes données obtenues par les inventeurs et détaillées dans la partie expérimentale révèlent que les atteintes à la matrice extracellulaire et au remodelage matriciel, à travers les gènes mis en évidence par les inventeurs sont susceptibles de survenir en amont, avant l'apparition des taches. On peut penser que la séquence des événements biologiques dans les taches hyperpigmentaires puisse être la suivante : 1) altération du derme (du fait de la
 30 modulation de l'expression des gènes identifiés dans cette demande) qui conduit à 2) modification de l'épiderme avec formation de crête épidermique dans le derme qui amène à 3) une augmentation de la longueur de la jonction dermo-épidermique et la formation de réseaux complexes conduisant à 4) une augmentation de la charge mélanique

35 La présente invention concerne également l'utilisation d'un modulateur du niveau d'expression ou de l'activité du produit d'expression d'au moins un gène dermique choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1, pour une application cosmétique

dans le traitement de taches pigmentaires cutanées non-pathologiques, ou plus généralement dans la modulation de la pigmentation de la peau.

Pour le traitement de taches hyperpigmentaires, le modulateur dont il est fait usage est un inhibiteur d'au moins un gène choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, ou bien un activateur du gène CTSL2. De préférence, l'inhibiteur est un inhibiteur partiel conduisant à la diminution du niveau d'expression ou à la diminution de l'activité du produit d'expression dudit gène, sans pour autant abolir entièrement l'expression ou l'activité de ce gène.

A l'inverse, pour le traitement de taches hypopigmentaires, le modulateur dont il est fait usage est un activateur d'au moins un gène choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, ou bien un inhibiteur du gène CTSL2.

Des exemples d'inhibiteurs ou d'activateurs déjà connus et caractérisés sont divulgués dans l'exemple 3 de la partie expérimentale. Un tel modulateur peut notamment être un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10 pour un usage dans le traitement cosmétique de taches hyperpigmentaires.

Des modulateurs bien connus sont également des molécules antisens, des siRNAs, et des microARNs.

Des modulateurs préférés dans le cadre de la présente invention sont notamment un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10, le polypeptide activant l'adenylate cyclase pituitaire, le Valsartan, la poudre osseuse déminéralisée ou « Demineralized bone powder (DBP) », le phenylacetate de sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4- substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le Notoginsenoside R1. Il est également envisageable d'utiliser une association d'au moins deux de ces modulateurs.

Des modulateurs tels que décrits peuvent être utilisés dans les méthodes cosmétiques selon l'invention en association avec des modulateurs des gènes TGFB2, TGFB1, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFB3, SEMA5A, SMAD7 et SOSTDC1 ou bien des modulateurs des gènes EFEMP1, ECM1, ASPN, HS3ST6, PAPLN, CHSY1 et FLRT2, ou bien encore des modulateurs des gènes FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, PLOD2, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Des combinaisons de gènes préférées ont déjà été décrites.

Les modulateurs peuvent être utilisés en association avec d'autres produits, actifs ou excipients. De préférence, ils sont conditionnés sous une forme adaptée à une application topique, par exemple sous forme de pommade, de crème ou d'onguent.

Les diverses mises en œuvre détaillées dans la section relative aux méthodes cosmétiques selon l'invention sont applicables aux utilisations pour les applications cosmétiques décrites ci-dessus.

Les modulateurs selon l'invention peuvent être utilisés notamment dans des applications cosmétiques en vue d'uniformiser le teint, d'homogénéiser la couleur de la peau ou de lutter contre les dyschromies.

Par ailleurs, la présente invention concerne selon un autre aspect des modulateurs du niveau d'expression ou de l'activité du produit d'expression d'au moins un gène dermique choisi parmi les gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAUI et TIMP1, pour une application dans le traitement de taches pigmentaires cutanées, par exemple dans le cadre de traitements thérapeutiques.

- 5 Lesdites taches peuvent être des taches hyperpigmentaires, ou bien des taches hypopigmentaires.

Des modulateurs préférés ont déjà été décrits pour les autres aspects de l'invention.

- Ils peuvent être associés à d'autres produits, actifs ou excipients. De préférence, ils sont conditionnés sous une forme adaptée à une application topique, par exemple sous forme de pommade, de crème ou d'onguent.

- Dans les différentes méthodes et applications selon la présente invention, les taches pigmentaires considérées sont de préférence des taches hyperpigmentaires et tout préférentiellement des lentigos actiniques, solaires ou séniles. Les méthodes et applications selon l'invention sont basées sur la mise en évidence par les inventeurs d'une signature de telles taches pigmentaires.

Cette signature est caractérisée par le fait qu'elle peut être constituée par l'ensemble de la liste ou une partie des gènes cités.

- La présente invention est aussi relative à l'utilisation de cette signature comme nouveau procédé de sélection et de prédiction du lentigo actinique au travers des déficiences de ses fonctions biologiques. Ce nouveau procédé est basé sur l'étude du niveau d'expression de tout ou partie des gènes décrits dans la présente invention dans une lésion hyperpigmentée versus une peau non lésée adjacente.

- Cette invention s'inscrit également dans le cadre du traitement du lentigo actinique, grâce à l'utilisation de ces gènes comme signature moléculaire des différences d'expression génique existant entre une lésion et la peau saine adjacente. Cette signature constitue également un avantage évident pour déterminer le choix du traitement approprié et mesurer l'effet d'un produit (actif, molécule, extrait naturel), mais aussi d'un procédé (lumière, injection, voie orale) qui soit bénéfique sur la peau. La présente invention permet en effet l'évaluation de l'efficacité d'un produit ou procédé destiné à traiter le lentigo actinique en modulant au niveau de la lésion l'expression de tout ou partie des gènes décrits de sorte à ce que leur profil d'expression se rapproche de celui de la peau saine.

- L'invention consiste aussi en une méthode de criblage de facteurs d'inhibition ou de prévention des lentigos actiniques. Elle consiste à évaluer des composés sur leur pouvoir d'inhibition ou d'augmentation de l'expression des gènes cités et/ou de l'expression ou l'activité des produits protéiques desdits gènes et à sélectionner en tant que facteurs permettant de prévenir, ou traiter le lentigo actinique. La vérification de l'efficacité des composés peut être réalisés sur des modèles cellulaires mono ou co cultures, ou des modèles tri dimensionnels de peau reconstruite, ou de la peau ex vivo, ou in vivo.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de composés modulant l'expression des gènes identifiés parmi les biomarqueurs du lentigo actinique, pour prévenir ou corriger la lésion afin de retrouver un état normal de la peau, c'est-à-dire retrouver une expression se rapprochant de l'expression de la peau saine non lésée. En particulier, il n'a jamais été proposé des composés agissant sur les protéines identifiées pour prévenir ou traiter des dyschromies pigmentaires (hyperpigmentation ou hypopigmentation). De tels composés existent et sont reportés dans le tableau 3 de l'exemple 3.

Les agents choisis sont notamment des modulateurs négatifs des protéines surexprimées liées au processus de remodelage matriciel ou des modulateurs positifs des protéines sous-exprimées.

Parmi les modulateurs négatifs des protéines liées au remodelage matriciel, on pourra citer notamment des inhibiteurs de synthèse, et/ou de la sécrétion et/ou activateur de la dégradation des protéines retrouvés surexprimés dans le lentigo.

A l'inverse parmi les modulateurs positifs, on pourra citer des stimulants de synthèse, des inducteurs de sécrétion ou des inhibiteurs de la dégradation des protéines sous exprimés dans le lentigo.

Partie expérimentale :

Exemple 1 : Etude transcriptionnelle

Une étude comparative du profil d'expression génique de la peau issue d'une lésion de lentigo actinique (PL) et de peau adjacente non lésée (PN) a été réalisée.

Le but de cette étude est d'identifier des marqueurs pertinents, reproductibles et significatifs reflétant les altérations associées à la formation du lentigo actinique, afin de les utiliser comme cibles pour des traitements efficaces, ou comme biomarqueurs pour analyser l'efficacité d'un traitement donné.

Brièvement, 15 volontaires féminins sains ont été recrutés afin de participer à une étude transcriptomique « full génome » (puces Affymétrie). Pour chaque volontaire, une lésion de type lentigo actinique a été diagnostiquée sur le dos de la main et le diagnostic de lentigo actinique a été vérifié par épiluminescence. Cet examen permet

1°) de vérifier le diagnostic clinique de la lésion (lentigo actinique exclusivement) selon les critères de pattern de la jonction dermo-épidermique (structure pigmentée en réseau, « fingerprint-like structure ») à différencier des éphélides (absence de structure pigmentée en réseau, pigmentation homogène et zones de « moth-eaten edges ») et des kératoses séborrhéiques planes (multiple milia-like cysts or pseudocysts, zones de « moth-eaten edges », pseudofollicular openings et fingerprint-like pattern) [Menzies et al ; Stolz et al ; Marghoob et al]
2°) de délimiter des zones homogènes en terme de structure/pattern à l'intérieur de ces lésions où seront faites les biopsies cutanées,

3°) d'établir un score phénotypique basé sur une analyse d'image quantitative avec le logiciel spécifique qui a été développé sur Matlab® (logiciel SQA, CMLA, ENS Cachan, UMR CNRS 8536).

Une biopsie de 3mm centrée sur la lésion a été réalisée ainsi qu'une biopsie de taille identique sur une zone de peau adjacente non lésée. Les ARN totaux de ces prélèvements ont été extraits et amplifiés. Des sondes ont été générées pour hybridation sur les puces Affymetrix. Des profils d'expression de gènes ont été générés pour chacune des 30 biopsies (2 biopsies par volontaires), et une analyse comparative a été réalisée entre PN et PL par volontaire et sur l'ensemble des volontaires. Les gènes statistiquement exprimés de façon différentielle (moyenne géométrique des patients) ont été compilés dans des listes et regroupés par familles fonctionnelles.

De façon surprenante et inattendue, les inventeurs ont trouvé une expression différentielle pour plusieurs centaines de gènes entre la PN et la PL. Une liste de 437 gènes a été constituée et représente une signature moléculaire large de la lésion lentigo actinique. Parmi les 437 gènes identifiés, 169 gènes se sont révélés régulés de façon positive (« uprégulés ») dans la lésion 'lentigo actinique' comparée à la peau saine alors que 269 gènes étaient régulés de façon négative dans le lentigo actinique (« down régulés »).

L'ensemble de ces gènes a été subdivisé en plusieurs familles fonctionnelles.

Parmi les familles fonctionnelles ou les processus biologiques identifiés, les inventeurs ont de façon surprenante trouvé une famille de gènes reflétant au niveau moléculaire un dysfonctionnement de la matrice extracellulaire et de la jonction dermo-épidermique dans le lentigo actinique. Ces gènes, regroupés dans cette famille fonctionnelle nommée « Matrice extracellulaire » n'ont jamais été décrits auparavant comme associés au lentigo actinique et sont listés ci-dessous et dans les tableaux 1 et 2 :

Gènes sur-exprimés dans le lentigo actinique par rapport à la peau saine TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAUI, TIMP1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1.

Gènes sous-exprimés dans le lentigo actinique par rapport à la peau saine SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, FLRT2, CTSL2 et PLOD2.

Ces gènes codent pour des composants du derme ou des protéines impliquées dans la synthèse des composants de la matrice extracellulaire, liés au renouvellement ou au remodelage de cette matrice conjonctive, ainsi que des gènes codant pour des protéines matricielles associées à la jonction dermo-épidermique et la zone de la membrane basale. Cette famille contient aussi des gènes liés à la voie du TGFbeta, impliquée dans la synthèse des

composants de la matrice extracellulaire. Les gènes de cette famille sont majoritairement surexprimés dans le lentigo actinique. Cette famille de gènes est tout à fait originale dans un désordre pigmentaire et sous entend un rôle prépondérant du stroma dans le lentigo actinique.

5 **Tableau 1** : liste des gènes de la famille « matrice extracellulaire » retrouvés surexprimés dans le lentigo actinique

Sous famille Voie / fonction	Dénomi- nation	Numéro accession	Nom complet	Taux de modulation
TGFb / SMAD	THBS2	NM_003247	thrombospondin 2	3,41
	TGFB1	NM_000358	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	2,22
	BMP2	NM_001200	bone morphogenetic protein 2	2,03
	SMAD3	NM_005902	SMAD family member 3	1,76
	TGFBR3	NM_003243	Transforming growth factor, beta receptor III	1,68
	TGFBR2	D50683 NM_001024847 NM_003242	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)	1,61
	SEMA5A	NM_003966	sema domain, seven thrombospondin repeats (sémaphorine) (semaphorin 5A, semaphorin F)	1,56
	SMAD7	NM_005904	SMAD family member 7	1,52
Collagènes	LEPREL1	NM_018192	leprecan-like 1	2,64
	COL6A3	NM_004369	collagen, type VI, alpha 3	1,90
	CRTAP	NM_006371	cartilage associated protein (LEPREL3)	1,60
laminines	LAMC1	NM_002293	laminin, gamma 1 (anciennement LAMB2)	1,96
	LAMB3	L25541 NM_000228 NM_001017402 NM_001127641	laminin, beta 3	1,94
	LAMA3	NM_000227	laminin, alpha 3	1,64

Sous famille Voie / fonction	Déno- mination	Numéro accession	Nom complet	Taux de modulation
Intégrines	ITGA2	NM_002203	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	1,62
	ITGAV	NM_001145000 NM_001144999 NM_002210	integrin, alpha V (vitronectin receptor,)	1,62
	ITGB1	NM_133376	integrin, beta 1	1,55
Remodelage matriciel	MXRA5	NM_015419	matrix-remodelling associated 5	2,40
	LYZ	NM_000239	lysozyme (renal amyloidosis)	2,33
	TIMP1	NM_003254	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	2,26
	PLAU	NM_002658	plasminogen activator, urokinase	1,81
Protéoglycanes Et glycoprotéine extracellulaire	EFEMP1	NM_001039348 NM_001039349 NM_004105	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (FIBULINE 3)	3,86
	ASPN	NM_017680	Asporin	2,77
	PAPLN	NM_173462	papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein	2,51
	CHSY1	NM_014918	carbohydrate (chondroitin) synthase 1	1,50
Membrane basale	FRAS1	NM_025074	Fraser syndrome 1	4,59
	MATN2	NM_002380	matrilin 2	2,61
	DST	NM_001723 NM_015548	Dystonin = BPAG1	2,24
Actine	ACTN1	NM_001130005 NM_001130004 NM_001102	actinin, alpha 1	1,58

Tableau 2 : liste des gènes de la famille « matrice extracellulaire » retrouvés sous-exprimés dans le lentigo actinique

Sous famille Voie / fonction	Déno- mination	Numéro d' accession	Nom complet	Taux de modulation
Protéoglycanes	HS3ST6	NM_001009606	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 6	0,44

Collagènes	PLOD2	NM_000935 NM_182943	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	0,45
Protéoglycanes	FLRT2	NM_013231	fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0,47
Remodelage matriciel	CTSL2	NM_001333	cathepsin L2 (<i>peptidase MEC Degradation</i>)	0,54
Protéoglycanes	ECM1	U65932 NM_004425 NM_022664	extracellular matrix protein 1	0,54
TGFb / SMAD	SOSTDC 1	NM_015464	sclerostin domain containing 1 (ectodin, <i>BMP antagonist</i>)	0,62

Exemple 2 : matériel et méthodes

15 volontaires, femmes, phototypes II à IV, âgées de 50 à 70 ans ont été sélectionnées.

- 5 Les lentigos actiniques sont choisis sur le dos de la main, de taille minimum 3mm. Ils sont caractérisés par Epiluminescence. Les différents avantages de la caractérisation par épiluminescence sont présentés dans l'exemple 1.

Deux biopsies de 3mm de diamètres sont réalisées sur une des mains de chaque patient. Pour chaque volontaire, une des biopsies correspond à la lésion de lentigo actinique (PL) et l'autre à

- 10 une zone adjacente de peau non lésionnelle (PN) (vérifiée également en épiluminescence).

Les biopsies de 3mm sont placées, dès le prélèvement, dans du RNA later (Qiagen référence 76106) de 16 à 24h à 4°C. Le lendemain les échantillons sont placés à -20°C jusqu'aux étapes d'homogénéisation et d'extraction. A la décongélation, les échantillons sont découpés au scalpel pour faciliter l'homogénéisation, avant le transfert dans le tampon de lyse.

- 15 L'homogénéisation est réalisée avec un potter (Fisher Labosi ref A6391000) avec des pistons en polypropylène RNase free (Fisher Labosi ref A1419753) permettant l'homogénéisation directe dans les tubes Eppendorf 1,5ml.

L'ARN a été extrait avec les kits RNeasy micro (Qiagen ref : 74004) en suivant les instructions du fournisseur. La quantification des ARNs est réalisée par un dosage ribogreen (Molecular

- 20 Probes réf R11490). La qualité est validée avec un bio analyseur Agilent 2100 qui donne le ratio des intensités des ARNs ribosomaux 28S sur 18S ainsi qu'un RNA Integrity Number (RIN) qui tient compte de la dégradation des ARNs. Un ARN de bonne qualité a un ratio >1,5 et un RIN > 7.

Une réaction de reverse transcriptase (RT) est réalisée pour obtenir les ADNc correspondants.

- 25 Deux sondes par échantillons ont été synthétisées à partir de 50 ng d'ARNs avec une étape d'amplification. Les ADNc sont marqués par fluorochromes et hybridés sur puces à ADN Affymétrie® permettant de révéler le niveau d'expression de l'ensemble des gènes du génome humain. (bio-puces à ADN de type Affymetrix U133A 2.0 U133A 2.0 contenant 54 000 sondes,

permettant ainsi l'étude de l'expression de 47000 transcripts, incluant 38500 gènes caractérisés). Affymetrix Microarray suite (Mas 5.0) permet d'obtenir pour chaque transcrit, un signal de détection. Après révélation des hybridations spécifiques et traitement des données brutes (extraction, soustraction du bruit de fond, normalisation), l'expression des gènes est comparée entre la peau saine et la peau lésée.

2 puces Affymetrix HG_U133 Plus 2 ont été hybridées par échantillons.

La qualité de l'hybridation a été effectuée par la méthode AffyPLM (Bolstad *et coll.*, 2005) et par la méthode ACP (Analyses en Composantes Principales).

Les patients ne sont retenus pour la suite de l'analyse que si les 2 puces Affymetrix ont une qualité d'hybridation correcte. Pour la présente étude, 13 patients sur les 15 initiaux ont pu être analysés.

La réalisation d'un profil transcriptomique de la peau saine et de la peau correspondant au lentigo actinique a permis de générer des listes de gènes différenciellement exprimés dans les deux situations, et d'identifier des biomarqueurs du lentigo actinique. Les listes sont générées sous forme de ratio d'expression entre PL (peau lésée) versus PN (peau normale). Le ratio représentant la moyenne géométrique des 13 patients est retenu.

Génération des listes de gènes différenciellement exprimées entre peau lésée et peau saine

Etapas :

- Filtre des identifiants Affymetrix (ProbeSets) : seuls les ProbeSets qui sont présents dans les deux répliquats d'au moins une biopsie sont retenus. Après ce filtre 23 968 ProbeSets sont retenus .
- Suppression de l'effet patient : Afin de supprimer l'effet patient observé dans les résultats des analyses différentielles, l'expression de chaque ProbeSet a été divisée par la moyenne géométrique des 4 valeurs des ProbeSets correspondant aux 4 puces.
- Analyse différentielle : elle a été générée en regroupant les listes obtenues par 2 méthodes, l'analyse cNMF (consensus Non Negative Matrix Factorisation (Lee et Seung (1999), Brunet *et coll.* (2004), Fogel *et coll.* (2007), Fogel *et coll.* (2008)).) qui a identifié **2638 ProbeSets** (dont 1521 induits et 1117 réprimés) et la méthode PLS (Partial Least Squares Regression) qui a identifier **610 ProbeSets** modulés. L'union des 2 listes a permis d'obtenir une liste de **3248 ProbeSets**.
- Filtre sur la modulation : pour les gènes induits, sélection des ProbeSets ayant une moyenne géométrique des 13 folds corrigés (FC) ≥ 1.5 : liste de **562 ProbeSets induits**. Pour les gènes réprimés, sélection des ProbeSets ayant une moyenne géométrique des 13 folds corrigés $FC \leq 0.67$: liste de **807 ProbeSets réprimés**. Au total : $562 + 807 = 1369$ ProbeSets modulés, soient **1007 ProbeSets** après élimination des doublons (1002 approche cNMF + 5 approche PLS)

- Filtre sur les 13 patients : visualisation des modulations des 1007 ProbeSets sous forme d'histogrammes et sélection des ProbeSets modulés dans le même sens chez les 13 patients. Liste finale de **132 ProbeSets** qui différencient les biopsies lésionnelles des biopsies non lésionnelles et qui sont modulés dans le même sens chez les 13 patients de l'étude.
- Analyse de la liste des 1007 Probe sets
 - o Filtre sur la P value (≤ 0.00001)
Afin de ne retenir que les gènes les plus discriminants, nous avons appliqué à la liste des 1002 ProbeSets un filtre sur la P-value, $P \leq 0.00001$. Après ce nouveau filtre 827 ProbeSets auxquels sont ajoutés les 5 ProbeSets issus de l'approche PLS $\Rightarrow$ liste de **832 ProbeSets**

Après recherche d'annotations, élimination des gènes non annotés et élimination des doublons, une liste de 437 **gènes** différentiellement exprimés entre PL et PN a été établie. 169 gènes sont sur-exprimés dans le LA et 269 sont sous exprimés.

A l'aide des outils, Gene ontology, PubMed, Scopus les fonctions des gènes sont recherchées et les gènes sont classés par familles fonctionnelles.

Exemple 3 : modulateurs :

- Il existe des composés connus pour moduler dans le sens recherché les protéines dérégulées dans le lentigo. Pour la famille des gènes/protéines de la matrice extracellulaire, on pourra citer :
- des fibrates dont par exemple le fenofibrate qui diminue l'expression de SMAD3,
 - des alcaloïdes dont l'oxymatrine qui diminue SMAD3, ou des polyphénols comme par exemple l'acide salvianolique B qui diminue SMAD3 et TGFBR2,
 - des extraits naturels notamment des herbes médicinales comme le Wen-pi-tang-hab-wu-ling-san qui diminue SMAD3,
 - des composés de la famille des imidazoles antagonistes de TGF- β R1 comme le SB-431542 qui diminue SMAD3,
 - certains miRNA, notamment les miR183 et miR29b qui diminuent ITGB1,
 - des inhibiteurs de urokinase-type plasminogen activator (uPA) comme le p-aminobenzamidine ou le B428 4- substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine qui diminuent l'activité de PLAU,
 - des composés de la famille des phenylacetates comme le NaPA qui diminue expression de PLAU,
 - des composés de la famille chimique des thiazolidinediones dont par exemple le pioglitazone qui diminue BMP2 et COL6A3,
 - des composés de la famille chimique des thiazoles dont par exemple le GW-0742 qui diminue l'expression de BMP2,

- 29 -

- des composés de la famille des tétrazoles comme le Valsartan qui diminue TIMP1.

Concernant la protéine enzymatique PLOD2 de la famille extracellulaire sous exprimée dans le lentigo, on pourra employer les composés suivants pour restaurer son taux :

- 5 - des composés de la famille des quinazolines comme le Vandetanib (ZD64745 5) qui augmentent PLOD2.

D'autres types de modulateurs peuvent également être employés pour permettre la correction de l'expression/ quantité ou activité des protéines dérégulées. On peut citer :

- 10 - des acides nucléiques (de préférence ARN antisens ou ARNi), anticorps neutralisant,
- des moyens électrique, lumineux, mécanique ou thermique. A titre d'exemple, les ultrasons pulsés à faible intensité (LIPUS) pourront être utilisés pour augmenter la quantité ou l'activité de PLOD2.

- A l'inverse, en cas de tache hypopigmentaire, des modulateurs préférés seront ceux
- 15 augmentant le taux d'expression ou d'activité des protéines issues des gènes TGFBR2, TGFBI, BMP2, SMAD3, THBS2, TGFBR3, SEMA5A, SMAD7, EFEMP1, ASPN, PAPLN, CHSY1, MXRA5, LYZ, PLAU, TIMP1, FRAS1, LEPREL1, MATN2, DST, ITGA2, COL6A3, CRTAP, LAMC1, LAMB3, LAMA3, ITGAV, ITGB1 et ACTN1 et ceux diminuant le taux d'expression ou d'activité des protéines issues des gènes SOSTDC1, ECM1, HS3ST6, FLRT2, CTSL2 et
 - 20 PLOD2.

Des exemples de tels modulateurs sont également répertoriés dans le tableau 3.

Tableau 3. LISTE DES MODULATEURS DE GENES IMPLIQUES DANS LE LENTIGO ACTINIQUE

Sous famille / fonction	Nom	Modulateur gène/protéine	Sens de la modulation
TGFB/ SMAD	TGFB1, transforming growth factor β -induced, 68kDa	Poudre osseuse déminéralisée (Demineralized bone powder, DBP)	Augmente expression
TGFB/ SMAD	BMP2, bone morphogenetic protein2	Pioglitazone	Diminue expr.
		GW0742	Diminue expr.
		Cristata L flavonoid	augmente expr.
TGFB/ SMAD	SMAD3, SMAD family member3	Fenofibrate	Diminue expression
		Oxymatrine	
		Salvianolic Acid B (Sal B), composant de Danshen (une herbe traditionnelle chinoise utilisée pour les maladies chroniques rénales) antioxydant et protection cellulaire.	Diminue phosphorylation
		SB-431542 (un inhibiteur spécifique T β R-I kinase)	
		Wen-pi-tang-Hab-Wu-ling-san (W/HW) extrait	
TGFB/ SMAD	TGFB2, transforming growth factor, β receptor II (70/80kDa)	Salvianolic acid B (SA-B)	Diminue expression
TGFB/ SMAD	SMAD7, SMAD family member 7	Oxymatrine	augmente expression
		3-deoxyglucosone (Advanced glycation endproduct precursor)	
		Tetrandrine	
		N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline(Ac-SDKP)	
Collagène	COL6A3, collagen, type VI, alpha 3	Pioglitazone	Diminue expression
Intégrine	ITGB1, integrin, beta	miR-183 , miR-29b	Diminue expression

Sous famille / fonction	Nom	Modulateur gène/protéine	Sens de la modulation
Remodelage matriciel	LYZ, lysozyme (renal amyloidosis)	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) PACAP38	Augmente expression
Remodelage matriciel	TIMP-1, metalloproteinase inhibitor 1	Valsartan , (angiotensin II type 1 receptor blocker ARB) Extrait vegetal de Lupinus albus LU10	Diminue expression
		Poudre osseuse déminéralisée (Demineralized bone powder, DBP)	Augmente express.
		Sodium phenylacetate (NaPA)	Diminue expression
Remodelage matriciel	PLAU , plasminogen activator, urokinase	P-aminobenzamidine (Urokinase-type plasminogen activator(uPA) inhibitor);B428 4, B392 -substituted benzof[b]thiophene-2-carboxamides (Urokinase-type plasminogen activator(uPA) inhibitor	Diminue activité
		Thienopyridine SR 25989 (Angiogenesis inhibitor) esterified derivative of ticlopidine, Notoginsenoside R1 (issu de PANAX notoginseng)	Augmente expression
Assimilé Protéoglycane	ASP, Asporin	letrozole, anastrozole	Augmente expression
Membrane basale	MATN2, matrilin 2	vitamine K2 menaquinone	Augmente expression
Collagène	PLD2 , procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	beta-aminopropionitrile (bAPN)	Diminue expression
		Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) ultrasons pulsés de faible intensité	Augmente expr. /activité
		Vandetanib (ZD6474 5)	
Remodelage matriciel	CTSL2 ,cathepsin L2	Dérivés phenylalanine	Diminue activité

Revendications amendées :

1. Méthode de caractérisation d'une tache pigmentaire cutanée apparente ou soupçonnée chez un être humain, comprenant la comparaison des niveaux d'expression, dans des échantillons de peau issue de ladite tache et de peau adjacente non lésée, d'au moins un gène dermique impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.
2. Méthode selon la revendication 1, comprenant la comparaison des niveaux d'expression d'au moins deux gènes distincts, de préférence d'au moins trois gènes distincts choisis parmi ladite liste.
3. Méthode selon la revendication 1, où ladite tache est confirmée comme tache hyperpigmentaire quand le niveau d'expression est
 - a. supérieur dans l'échantillon de peau issue de la tache par rapport au niveau dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et
 - b. inférieur dans l'échantillon de peau issue de la tache par rapport au niveau dans l'échantillon de peau adjacente non lésée, si le gène choisi est CTSL2.
4. Méthode selon la revendication 1, où ladite tache pigmentaire est un lentigo actinique, sénile ou solaire.
5. Méthode d'évaluation de l'efficacité d'un traitement des taches pigmentaires cutanées, comprenant la comparaison des niveaux d'expression dans un échantillon de peau issue d'une telle tache, avant et après traitement, d'au moins un gène dermique impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.
6. Méthode selon la revendication 5, où ledit traitement est considéré comme efficace pour le traitement de taches hyperpigmentaires quand le niveau d'expression est :
 - inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et
 - supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène choisi est CTSL2 ; etest considéré comme efficace pour le traitement de taches hypo-pigmentaires quand le niveau d'expression est :
 - supérieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1, et

- inférieur après traitement par rapport au niveau d'expression avant traitement, si le gène choisi est CTSL2.
7. Méthode *in vitro* d'évaluation de l'efficacité d'un traitement des taches pigmentaires cutanées, comprenant la comparaison, avant et après traitement, du niveau d'expression dans un modèle cellulaire représentatif de la peau, d'au moins un gène dermique impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1, ou bien du niveau d'expression ou d'activité du produit d'expression dudit gène choisi.
8. Méthode cosmétique de traitement ou de prévention de tache pigmentaire cutanée non pathologique de la peau humaine, comprenant la modulation du niveau d'expression ou de l'activité d'un gène dermique impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire, où ledit gène est choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1 et où ladite modulation est effectuée grâce à l'utilisation d'une molécule antisens, d'un siRNA, d'un microRNA, ou d'un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10.
9. Méthode selon la revendication 8, où ladite méthode comprend la modulation d'au moins deux gènes, de préférence d'au moins quatre gènes distincts, choisis parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1.
10. Méthode selon la revendication 8, où ladite tache pigmentaire est une tache hyperpigmentaire, de préférence un lentigo actinique, solaire ou sénile, et où ladite modulation est une inhibition si le gène est choisi parmi MXRA5, LYZ, PLAU et TIMP1; et une augmentation du niveau d'expression ou de l'activité si le gène choisi est CTSL2.
11. Utilisation d'un modulateur du niveau d'expression ou de l'activité du produit d'expression d'au moins un gène dermique choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et TIMP1, pour une application cosmétique dans le traitement de taches pigmentaires cutanées non-pathologiques, où ledit modulateur est choisi parmi une molécule antisens, un siRNA, un microRNA, un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10, le polypeptide activant l'adenylate cyclase pituitaire, le Valsartan, la poudre osseuse déminéralisée (Demineralized bone powder ; DBP), le phenylacetate de sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4-substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le Notoginsenoside R1 .
12. Utilisation selon la revendication 11 où ledit modulateur est une association d'au moins deux modulateurs choisis parmi un extrait végétal de *Lupinus albus* LU10, le polypeptide activant l'adenylate cyclase pituitaire, le Valsartan, la poudre osseuse déminéralisée

(Demineralized bone powder ; DBP), le phenylacetate de sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4- -substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le Notoginsenoside R1.

- 5 13. Modulateur du niveau d'expression ou de l'activité du produit d'expression d'au moins un
gène dermique choisi parmi la liste constituée des gènes MXRA5, LYZ, CTSL2, PLAU et
TIMP1, pour une application dans le traitement de taches pigmentaires cutanées, où
ledit modulateur est choisi parmi une molécule antisens, un siRNA, un microRNA, un
10 extrait végétal de *Lupinus albus* LU10, le polypeptide activant l'adenylate cyclase
pituitaire, le Valsartan, la poudre osseuse déminéralisée (Demineralized bone powder ;
DBP), le phenylacetate de sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4-
substituted benzo[b]thiophene-2-carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le
Notoginsenoside R1.
- 15 14. Modulateur selon la revendication 13, choisi parmi un extrait végétal de *Lupinus albus*
LU10, le polypeptide activant l'adenylate cyclase pituitaire, le Valsartan, la poudre
osseuse déminéralisée (Demineralized bone powder ; DBP), le phenylacetate de
sodium (NaPA), le P-aminobenzamidine, le B428 4- -substituted benzo[b]thiophene-2-
carboxamidine, le Thienopyridine SR 25989 et le Notoginsenoside R1.

20



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 752898
FR 1153535

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 2009/140550 A2 (DERMTECH INTERNAT [US]; CHANG SHERMAN H [US]) 19 novembre 2009 (2009-11-19) * abstract, [009], [0011], [0013] et [0052] *	1-14	C12Q1/68 C12Q1/02 A61K8/00 A61Q19/00 A61K31/00 A61K35/00
X	US 2008/274908 A1 (CHANG SHERMAN [US]) 6 novembre 2008 (2008-11-06) * abrégé *	1-14	A61K36/00 A61K38/00 A61P17/00
A	RODNINGEN ET AL: "Radiation-induced gene expression in human subcutaneous fibroblasts is predictive of radiation-induced fibrosis", RADIO THERAPY AND ONCOLOGY, ELSEVIER, IRELAND, vol. 86, no. 3, 25 octobre 2007 (2007-10-25), pages 314-320, XP022519071, ISSN: 0167-8140, DOI: 10.1016/J.RADONC.2007.09.013 * abrégé *	1-14	
A	HAGEMANN S ET AL: "The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles", EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, WISSENSCHAFTLICHE VERLAGSGESELLSCHAFT, STUTTGART, DE, vol. 83, no. 11-12, 1 janvier 2004 (2004-01-01), pages 775-780, XP004954728, ISSN: 0171-9335, DOI: 10.1078/0171-9335-00404 * abrégé *	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 décembre 2011		Berillon-Lapopin, L	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		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	



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 752898
FR 1153535

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	CHOU ET AL: "Association between urokinase-plasminogen activator gene T4065C polymorphism and risk of mitral valve prolapse", INTERNATIONAL JOURNAL OF CARDIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 96, no. 2, 1 août 2004 (2004-08-01), pages 165-170, XP005101863, ISSN: 0167-5273, DOI: 10.1016/J.IJCARD.2003.05.034 * abrégé *	1-14	
A	----- KR 2007 0065665 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD [KR]) 25 juin 2007 (2007-06-25) * abrégé *	1-14	
A	----- LIU H W ET AL: "Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars", LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 79, no. 5, 27 juin 2006 (2006-06-27), pages 475-483, XP025191481, ISSN: 0024-3205, DOI: 10.1016/J.LFS.2006.01.031 [extrait le 2006-06-27] * abrégé *	1-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 décembre 2011		Berillon-Lapopin, L	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1153535 FA 752898**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **16-12-2011**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009140550 A2	19-11-2009	AU 2009246180 A1	19-11-2009
		CA 2724322 A1	19-11-2009
		CN 102089444 A	08-06-2011
		EP 2294216 A2	16-03-2011
		JP 2011520451 A	21-07-2011
		US 2011160080 A1	30-06-2011
		WO 2009140550 A2	19-11-2009

US 2008274908 A1	06-11-2008	AU 2008247502 A1	13-11-2008
		CA 2686212 A1	13-11-2008
		EP 2152911 A1	17-02-2010
		EP 2363505 A2	07-09-2011
		US 2008274908 A1	06-11-2008
		WO 2008137772 A1	13-11-2008

KR 20070065665 A	25-06-2007	AUCUN	
