

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 965 357**

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

②1 N° d'enregistrement national : **10 57690**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **G 01 N 33/68** (2006.01), C 12 Q 1/68, A 61 K 8/64, 8/  
73, 8/60, A 61 Q 19/08, C 12 N 5/02, 15/12, C 07 K 14/47

⑫

**DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

**A1**

②2 Date de dépôt : 24.09.10.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 30.03.12 Bulletin 12/13.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

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

⑦2 Inventeur(s) : DELATTRE CAROLINE, GUENICHE  
AUDREY, CASTIEL ISABELLE et BERNARD DOMINI-  
QUE.

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

⑦4 Mandataire(s) : CABINET NONY.

⑤4 UTILISATION COSMETIQUE DE LA DERMCIDINE, ANALOGUES OU FRAGMENTS DE CELLE-CI.

⑤7 La présente invention a, notamment, pour objet l'utili-  
sation d'une séquence d'acides aminés de la Dermcidine,  
d'un analogue ou d'un fragment de celle-ci, d'au moins une  
séquence d'acides nucléiques codant cette séquence, à ti-  
tre de biomarqueur de la peau âgée et/ou des signes cuta-  
nées du vieillissement.

**FR 2 965 357 - A1**



La présente invention se rapporte au domaine des biomarqueurs de la peau, et plus particulièrement de la peau âgée, ainsi qu'à leur mise en œuvre à titre de cibles ou d'agents actifs cosmétiques.

5 L'épiderme, partie superficielle de la peau, est un tissu dont les cellules sont jointives et solidaires les unes des autres et reposent sur une membrane basale. Il forme un revêtement externe comprenant des glandes sébacées ou sudoripares et les follicules pileux.

Plus précisément, l'épiderme est une structure dont l'homéostasie résulte de la mise en œuvre d'un ensemble finement régulé de signaux intracellulaires et extracellulaires agissant à toutes les étapes de la prolifération, de la migration, de la différenciation cellulaire, ainsi que de la synthèse des différents composants de la matrice extracellulaire. Ces signaux peuvent, notamment, résulter de l'action de facteurs produits par les kératinocytes.

L'épiderme est conventionnellement divisé en une couche basale de 15 kératinocytes contenant, notamment, des cellules souches cutanées et constituant la couche germinative de l'épiderme, une couche dite épineuse constituée de plusieurs couches de cellules polyédriques disposées sur la couche basale, une couche dite granuleuse comprenant une à trois couches dites de cellules aplaties contenant des inclusions cytoplasmiques distinctes, les grains de kératohyaline, et enfin, un ensemble de couches 20 supérieures, appelé couche cornée, ou *stratum corneum*, constituée de kératinocytes au stade terminal de leur différenciation, appelés cornéocytes.

Le *stratum corneum*, la partie la plus externe de la peau qui assure la fonction barrière entre l'organisme et l'environnement, et la tige pileuse, partie émergente du follicule pileux qui constitue la chevelure, représentent tous deux l'aboutissement du 25 processus de différenciation des kératinocytes. La différenciation épidermique suit un processus de maturation dans lequel des kératinocytes de la couche basale se différencient et migrent pour aboutir à la formation des cornéocytes, cellules mortes totalement kératinisées. Cette différenciation est la résultante de phénomènes parfaitement coordonnés qui vont conduire au maintien de l'homéostasie de l'épiderme, et conférer à la peau un 30 aspect sain, jeune, lumineux et lisse.

Lors du vieillissement, de nombreuses altérations physiologiques de la peau, résultant d'un dysfonctionnement de l'homéostasie de l'épiderme, et notamment d'un

dysfonctionnement de la différenciation épithéliale des kératinocytes et/ou de la synthèse des protéoglycanes, se produisent.

Les altérations de l'homéostasie de l'épiderme se produisant lors du vieillissement se traduisent principalement par une diminution de la différenciation des  
5 kératinocytes entraînant un déficit de la matrice protéique des cellules cornées, par une augmentation des métalloprotéases, et de leur activité de dégradation de la matrice extracellulaire, ainsi que par une diminution de la synthèse des différents glycosaminoglycannes.

Lors du vieillissement de la peau, ces altérations se traduisent, généralement,  
10 par l'apparition d'un microrelief de la peau plus marqué, voire de ridules, et au final la survenue de rides profondes, une perte de l'élasticité, un toucher rugueux, et une sècheresse cutanée. Sur le plan histologique, un aplatissement de la jonction dermo-épidermique et une diminution de l'épaisseur du derme et de l'épiderme sont observés.

Le contenu en collagène et en glycosaminoglycannes de la peau est également  
15 diminué et la fonction barrière de la peau âgée peut être altérée.

De nombreux facteurs épidermiques, dont l'expression, l'activité biologique ou la maturation sont altérées, diminuées ou augmentées, sont connus pour être impliqués, directement ou indirectement, dans la survenue et la manifestation de la peau âgée ou des différents signes du vieillissement cutané associés.

Ces facteurs peuvent être utilisés à titre de bio-marqueurs de la peau, comme  
20 cibles de criblage, voire comme actifs cosmétiques.

Toutefois, il demeure encore de nombreuses inconnues quant au mécanisme intime et quant à l'ensemble des facteurs impliqués dans le vieillissement de la peau.

Ainsi, il demeure un besoin d'identifier de nouveaux biomarqueurs de la peau,  
25 et en particulier de la peau âgée ou des signes du vieillissement cutané.

Il existe également un besoin de disposer de nouveaux biomarqueurs permettant de caractériser un état de la peau, et en particulier une peau âgée ou des signes du vieillissement cutané.

Il existe encore un besoin de disposer de nouveaux outils de criblage d'agents  
30 actifs ou de traitements physiques convenant au soin de la peau, et plus particulièrement utiles pour prévenir et/ou traiter la peau âgée ou les signes du vieillissement cutané.

Il existe encore un besoin de disposer de nouveaux actifs ou de nouveaux traitements pour la prévention et/ou le traitement de la peau âgée ou des signes du vieillissement cutané.

Il existe encore un besoin de disposer de nouvelles cibles cosmétiques pour le  
5 soin de la peau, et en particulier pour la prévention et/ou le traitement de la peau âgée ou des signes du vieillissement cutané.

La présente invention a pour objet de satisfaire à ces besoins.

Ainsi, la présente invention concerne, selon un de ses premiers objets, l'utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés codés par une séquence d'acides  
10 nucléiques représentés par SEQ ID NO: 1, d'un analogue ou d'un fragment de ladite séquence d'acides aminés, ou (ii) de ladite séquence d'acides nucléiques, à titre de biomarqueur d'un état de la peau.

De préférence, un biomarqueur de l'invention est un biomarqueur de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.

15 Au sens de l'invention, on entend par « biomarqueur », une molécule ou l'activité d'une molécule, dont la présence, la teneur ou le degré d'activité est caractéristique d'un processus biologique, physiologique ou pathologique, ou de l'impact ou de l'effet induit par l'administration d'un agent actif ou d'un traitement physique sur un tel processus.

20 Au sens de l'invention, on entend désigner par « peau » l'ensemble de l'épiderme du corps humain, y compris le cuir chevelu et les lèvres. Plus particulièrement, la peau considérée dans la présente invention est de préférence les lèvres, la peau du visage, du décolleté, des bras ou des jambes, et de manière préférée, la peau du visage et/ou du décolleté.

25 De manière inattendue, au cours d'une étude de protéomique différentielle par la technologie « iTRAQ », les inventeurs ont observé à partir de protéines extraites de strippings vernis de populations de classes d'âge différentes que la Dermcidine (ou DCD) se révélait être un biomarqueur sensible et spécifique de la peau âgée.

30 Plus précisément, les inventeurs ont observé que le taux d'expression de la Dermcidine, et plus particulièrement de peptides issus de la Dermcidine et identifiés par les séquences SEQ ID NO: 17 et SEQ ID NO: 18 étaient systématiquement diminués dans les peaux âgées par rapport aux peaux jeunes.

A la connaissance des inventeurs, cette protéine antimicrobienne de la surface cutanée n'a jamais été classée comme variant au cours du vieillissement de la peau et encore moins comme l'un des biomarqueurs les plus pertinents ressortant de ce type d'études.

5 Il est connu que la sudation diminue avec l'âge (Anderson and Kenney 1987 ; Kenney and Fowler 1988) et que la Dermcidine est une protéine sudoripare (Schitteck, Hipfel *et al.*, 2001). En revanche, les données expérimentales obtenues par les inventeurs montrent de façon inattendue qu'il existe un déficit spécifique d'expression et/ou de maturation de la DCD au cours du vieillissement cutané, car celle-ci est sous-représentée  
10 dans les échantillons cutanés, même par rapport à d'autres protéines d'origine sudoripare.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne l'utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou (ii) d'une séquence d'acides nucléiques de l'invention, pour cribler des agents actifs ou des traitements physiques susceptibles de moduler l'activité, l'expression ou la maturation de ladite  
15 séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques.

Les agents actifs ou les traitements physiques criblés peuvent être plus particulièrement destinés à prévenir et/ou traiter la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

Au sens de l'invention on entend par « expression » à l'égard d'une séquence  
20 d'acides aminés, par exemple une protéine ou un peptide, ou d'une séquence d'acides nucléiques, par exemple un ARNm, sa teneur ou la variation de sa teneur par rapport à une référence.

Au sens de l'invention on entend par « maturation » à l'égard d'une séquence d'acides aminés, par exemple une protéine ou un peptide, ou d'une séquence d'acides  
25 nucléiques, par exemple un ARNm, les modifications qui suivent leur synthèse dans un environnement cellulaire. Par exemple, dans le cas d'une séquence d'acides aminés, on entend par « maturation », les modifications post-traductionnelles, telle la glycosylation ou la farnésylation de certains acides aminés, ou les étapes protéolytiques conduisant à  
30 l'élimination de séquences dites « signal » ou « sécrétoire » ou à la libération de séquences présentant des propriétés biologiques particulières. Dans le cas d'une séquence d'acides nucléiques, on entend par « maturation », par exemple, l'épissage alternatif d'un ARNm.

Au sens de l'invention on entend par « activité », à l'égard d'une séquence d'acides aminés, par exemple une protéine ou un peptide, l'activité biologique de la séquence d'acides aminés, le cas échéant après maturation, telle qu'une activité enzymatique, une activité d'agoniste ou d'antagoniste vis-à-vis d'un récepteur, ou d'activateur ou d'inhibiteur d'une enzyme, une activité dite de « structure », ou une activité antimicrobienne.

Au sens de l'invention on entend par « activité », à l'égard d'une séquence d'acides nucléiques, par exemple un ARNm, sa traduction.

Selon un autre de ses objets, la présente invention concerne l'utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, pour caractériser l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau.

Selon un mode de réalisation préféré, un traitement cosmétique dont l'efficacité est caractérisée peut être un traitement de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne l'utilisation cosmétique d'une quantité efficace (i) d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou (iii) d'au moins un agent modulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, à titre d'agent actif pour prévenir et/ou traiter la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

Au sens de la présente invention, on entend par « quantité efficace » d'un composé de l'invention, une quantité suffisante et nécessaire de ce composé pour obtenir un effet recherché, et plus particulièrement un effet cosmétique ou de soin à l'égard de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.

Au sens de l'invention, on entend par « prévenir », le fait de réduire le risque de survenue ou de ralentir la survenue d'un phénomène donné, à savoir dans la présente invention, la peau âgée et/ou les signes du vieillissement cutané.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne l'utilisation d'une quantité efficace (i) d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou (iii) d'au moins un agent modulateur de l'invention, pour préparer un modèle cellulaire épithéliale pluristratifié.

De manière préférée, un modèle cellulaire épithéliale pluristratifié, préparé selon l'invention, peut être un modèle de peau reconstruite.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne un procédé pour caractériser un état de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement  
5 comprenant au moins les étapes consistant à :

a) effectuer, dans un échantillon isolé d'une peau, une mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, et

b) comparer ladite mesure effectuée à l'étape a) à une mesure de référence.

10 Selon un mode de réalisation préféré, un état de la peau considéré dans l'invention est une peau âgée choisie parmi des peaux ayant subi un vieillissement chronologique et/ou un vieillissement photo-induit.

Selon encore un autre de ses objets, la présente invention concerne un procédé de criblage d'agents actifs ou de traitements physiques susceptibles de moduler l'activité,  
15 l'expression ou la maturation d'une séquence d'acides aminés de l'invention ou d'une séquence d'acides nucléiques de l'invention, comprenant au moins les étapes consistant à :

a) disposer ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques dans des conditions propices à l'activité, l'expression ou la maturation desdites séquences,

20 b) mettre en contact ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques avec au moins un agent actif à tester, ou exposer ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques avec un traitement physique à tester,

c) effectuer une mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la  
25 maturation ou de l'activité de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, et

d) comparer ladite mesure à une mesure de référence.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, le ou les agents actifs ou le ou les traitements physiques criblés peuvent être plus particulièrement dédiés à prévenir  
30 et/ou traiter la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

Selon un mode préféré de réalisation, un procédé ou une utilisation conforme à l'invention peuvent être mis en œuvre *in vivo*, *in vitro*, ou *ex vivo*, et de manière plus préférée encore *in vitro* ou *ex vivo*.

5 Selon encore un autre mode de réalisation, la présente invention concerne un peptide isolé représenté par une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci.

La présente invention a pour avantage de proposer un nouveau biomarqueur sensible et spécifique de la peau, et en particulier de la peau âgée ou des signes du vieillissement cutané.

10 L'observation de la présence de la Dermcidine dans le *stratum corneum*, et plus particulièrement de peptides issus spécifiquement de cette protéine, rend avantageusement possible une détermination quantitative ou qualitative de l'expression ou de l'activité de cette protéine, ou des peptides correspondant, par simple prélèvement topique.

15 La méthode de prélèvement peut par exemple être une technique de type stripping consistant à appliquer sur l'épiderme considéré une portion de ruban adhésif. En décollant ce ruban adhésif, une fraction de la surface de la peau est prélevée. Après extraction protéique, celle-ci peut être ensuite analysée par des méthodes conventionnelles, telles que le dosage immuno-enzymatique ELISA ou une analyse Western-Blot, ou plus  
20 particulièrement par la méthode de protéomique différentielle iTRAQ telle que définie ci-après.

Egalement, la présente invention a pour avantage de pouvoir mettre à disposition un nouveau biomarqueur convenant au criblage de nouveaux agents actifs ou de nouveaux traitements physiques convenant à la prévention et/ou au traitement de la  
25 peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.

Egalement, selon un autre avantage, la présente invention permet de proposer de nouveaux agents actifs convenant à la prévention et/ou au traitement des peaux âgées et/ou des signes cutanés du vieillissement.

### 30 Séquences d'acides aminés et d'acides nucléiques

La Dermcidine ou Preproteolysin (DCD) est une protéine de 110 acides aminés (SEQ ID NO: 11) comportant un peptide signal de 19 acides aminés (SEQ ID NO: 14) dont

le gène est localisé sur le chromosome 12, locus 12q13.1. Deux isoformes de cette protéine sont recensées, l'une plus courte, isoforme 1 (SEQ ID NO: 12), l'autre plus longue, isoforme 2 (SEQ ID NO: 13). Elle est sécrétée dans la sueur (Schitteck, Hipfel *et al.* 2001).

Après clivage du peptide signal, la Dermcidine (DCD) est une protéine de 90 acides aminés selon la séquence SEQ ID NO : 16.

Après une maturation post-traductionnelle protéolytique, essentiellement par la Cathepsine D, qui a lieu dans la sueur (Baechle, Flad *et al.*, 2006), ce précurseur protéique donne naissance à la DCD-1 (SEQ ID NO: 19) et à la DCD-1L (SEQ ID NO :20) ainsi qu'à de nombreux peptides dont la longueur varie de 25 à 48 aa (Flad, Bogumil *et al.*, 2002).

Sauf indication contraire, le terme « Dermcidine » vise à désigner dans la présente demande les séquences d'acides aminés représentées par SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19 et SEQ ID NO: 20, ayant ou non subi une maturation post-traductionnelle.

Selon un mode de réalisation préféré, on entend désigner par Dermcidine plus particulièrement la séquence d'acides aminés représentée par SEQ ID NO: 16.

Parmi les peptides issus de la maturation de la Dermcidine, comme décrit dans US 2008/020976, certains montrent des activités antimicrobiennes contre différents microorganismes, tel que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, ou *Candida albicans*. Les peptides antimicrobiens sont dérivés de la partie C-terminale de la protéine.

La partie N-terminale de la protéine (SEQ ID NO: 15) est constituée d'un facteur biologiquement actif favorisant la survie cellulaire (Cunningham, Hodge *et al.* 1998).

Cette protéine est exprimée de façon constitutive dans la glande sudoripare (Rieg, Garb *et al.* 2004), et est impliquée dans les voies de signalisation de type PI3K/AKT/mTOR particulièrement importante dans les phénomènes de prolifération et de survie cellulaire (Moreira, Strauss *et al.* 2008). La diminution de la DCD observée dans la sueur des individus souffrant d'atopie pourrait expliquer en partie leur susceptibilité microbienne (Rieg, Steffen *et al.* 2005).

Certains des fragments antimicrobiens ainsi que de la partie N-terminale sont capables de stimuler la production de cytokines/chemokines par des kératinocytes ou

d'autres types cellulaires l'impliquant dans la régulation de l'immunité cutanée (Watchorn, Dowidar *et al.* 2005 ; Niyonsaba, Suzuki *et al.* 2009). Il a récemment été proposé l'utilisation de la DCD comme un marqueur spécifique particulièrement sensible de la présence de traces de sueur par RT-PCR ou par ELISA utilisable dans le domaine médico-  
5 légal (Sakurada, Akutsu *et al.* 2009).

Selon un mode de réalisation, une séquence d'acides aminés convenant à l'invention peut être codée par une séquence d'acides nucléiques représentées par SEQ ID NO: 1, ou être un analogue ou un fragment de cette séquence d'acides aminés.

10 Par « analogue d'une séquence d'acides aminés » conforme à l'invention, on entend désigner toute séquence d'acides aminés ayant une identité de séquence d'au moins 85 %, de préférence d'au moins 90 %, et plus préférentiellement d'au moins 95 % avec ladite séquence, et une activité biologique de même nature.

Par « activité biologique de même nature » à l'égard d'une séquence d'acides  
15 aminés selon l'invention, on entend les propriétés antimicrobiennes ou de stimulation de la survie et/ou de la prolifération cellulaire habituellement attribuées à la Dermcidine.

L'identité de séquence peut être déterminée par comparaison visuelle ou au moyen de tout outil informatique généralement utilisé dans le domaine, tel que les programmes BLAST disponibles sur [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) et utilisés avec les paramètres  
20 configurés par défaut.

Un analogue conforme à l'invention peut être un agent peptidomimétique.

Un analogue d'une séquence d'acides aminés de l'invention peut résulter de modifications issues de mutation ou de variation dans les séquences des peptides selon l'invention provenant soit de la délétion ou de l'insertion d'un ou plusieurs acides aminés,  
25 soit de la substitution d'un ou plusieurs acides aminés, soit encore d'un épissage alternatif. Plusieurs de ces modifications peuvent être combinées.

Avantageusement, un analogue d'une séquence d'acides aminés de l'invention peut comprendre des substitutions conservatrices par rapport à cette séquence d'acides aminés.

30 A titre d'exemple de mutations que l'on peut considérer dans la présente invention, il peut être mentionné, de manière non exhaustive, le remplacement d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés par des résidus d'acides aminés ayant un indice

hydropathique similaire sans pour autant affecter de manière sensible les propriétés biologiques du polypeptide. L'indice hydropathique est un indice attribué aux acides aminés en fonction de leur hydrophobicité et de leur charge (Kyte *et al.* (1982), *J. Mol. Biol.*, 157 : 105).

5 Une séquence d'acides aminés ou un analogue de celle-ci visé par la présente invention peut être une séquence d'acides aminés ayant subi une ou plusieurs maturation(s) post-traductionnelle(s).

Par « maturation(s) post-traductionnelle(s) », on entend englober l'ensemble des modifications qu'une séquence d'acides aminés est susceptible de subir à l'issue de sa  
10 synthèse dans une cellule, telle que par exemple une ou des phosphorylation(s), une ou des thiolation(s), une ou des acétylation(s), une ou des glycosylation(s), une ou des lipidation(s), telles qu'une farnésylation ou une palmitoylation, un réarrangement structural de type formation de ponts disulfures et/ou de type clivage à l'intérieur de la séquence peptidique.

15 Un analogue d'une séquence d'acides aminés présente, par ailleurs, sensiblement la même activité biologique que cette séquence d'acides aminés.

Il est par ailleurs connu qu'une séquence primaire d'acides aminés, peut comprendre des sites spécifiquement reconnus par des enzymes de type protéase, telles que la trypsine, qui, une fois la reconnaissance de ces sites effective vont induire le clivage de  
20 la séquence par protéolyse. Cette protéolyse résulte en la génération de divers peptides, ou fragments de séquences d'acides aminés de l'invention.

En conséquence, l'invention s'étend également aux fragments de la Dermcidine, issus le cas échéant de sa protéolyse.

Au sens de l'invention, on entend par « fragment d'une séquence d'acides  
25 aminés » toute portion de la séquence d'acides aminés conforme à l'invention comprenant de 3 à 48 acides aminés consécutifs de ladite séquence, de préférence de 6 à 36, de préférence 8 à 32, et plus préférentiellement de 10 à 30 acides aminés consécutifs de ladite séquence, et a une activité biologique de même nature.

Selon un mode de réalisation, une séquence d'acides aminés convenant à  
30 l'invention peut être une séquence d'acides aminés représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 11 à 20, notamment parmi SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, un analogue, ou un fragment de celle-ci.

Selon un mode de réalisation préférée, une séquence d'acides aminés convenant à l'invention peut être une séquence d'acides aminés représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO : 19, SEQ ID NO : 20, un analogue, ou un  
5 fragment de celle-ci.

De manière préférée encore, une séquence d'acides aminés convenant à l'invention peut être une séquence d'acides aminés représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, ou SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO : 19 ou SEQ ID NO : 20, un analogue ou un fragment de celle-ci.

10 De préférence, une séquence d'acides aminés convenant à l'invention peut être une séquence d'acides aminés représentés par une séquence choisie parmi SEQ ID NO : 17, SEQ ID NO : 18, SEQ ID NO : 19 ou SEQ ID NO : 20, un analogue ou un fragment de celle-ci.

De manière encore plus préférée, une séquence d'acides aminés convenant à  
15 l'invention peut être une séquence d'acides aminés représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci.

Selon un autre mode de réalisation, un polypeptide convenant à l'invention peut également être une séquence d'acides aminés naturelle ou synthétique, le cas échéant susceptible d'être obtenue après lyse enzymatique ou chimique de la Dermcidine ou par  
20 synthèse chimique ou biologique ou par extraction à partir d'un tissu biologique, comme par exemple la peau, exprimant naturellement cette séquence d'acides aminés ou après transfection de celui-ci, ainsi que les différentes formes post-traductionnelles de celui-ci, ou encore toute séquence d'acides aminés naturelle ou synthétique dont la séquence comprend totalement ou partiellement une séquence d'acides aminés précitée, par exemple  
25 les variants et les analogues.

L'homme de l'art peut obtenir une séquence d'acides aminés conforme à l'invention au moyen de procédés à base d'ADN recombinant, comme par exemple, ceux décrits dans le manuel « Molecular Cloning - A Laboratory Manual » (2ème édition), Sambrook *et al.*, 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press,  
30 NY, (Sambrook).

Selon un objet, la présente invention concerne en tant que tel un peptide isolé représenté par une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci.

5 Selon un autre mode de réalisation, une séquence d'acides aminés convenant à l'invention peut également être une séquence d'acides aminés telle que définie précédemment, fusionnée avec une autre séquence d'acides aminés, un agent de ciblage hydrophile ou hydrophobe, un précurseur de bio-conversion, un agent de marquage luminescent, radioactif ou colorimétrique.

10 De manière non limitative, on peut citer comme exemple de composés susceptibles d'être couplés à une séquence d'acides aminés conforme à l'invention des protéines fluorescentes comme la « Green Fluorescent Protein », des composés chimiques fluorescents, tels que la rhodamine, la fluorescéine, ou le Texas Red<sup>®</sup>, des composés phosphorescents, des éléments radioactifs, tels que <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>35</sup>S, <sup>121</sup>I ou <sup>125</sup>I, ou des agents de marquage colorimétrique comme les substrats chromogènes sensibles à l'action de la  
15 galactosidase, de la peroxydase, de la chloramphénicol acétyltransférase, de la luciférase ou de la phosphatase alcaline.

Selon la nature des composés susceptibles d'être couplés avec une séquence d'acides aminés de l'invention, le couplage peut être opéré par des procédés chimiques, notamment au moyen de fonctions chimiques réactives ou par des procédés de biologie  
20 moléculaire connus de l'homme de l'art.

Avantageusement, une séquence d'acides aminés de l'invention peut être codée par une séquence d'acides nucléiques choisie parmi une séquence représentée par SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, un analogue ou un  
25 fragment de celle-ci.

Selon un mode de réalisation, la présente invention concerne également des séquences d'acides nucléiques codant pour une séquence d'acides aminés de l'invention et leur mise en œuvre dans les différentes utilisations et procédés conformes à l'invention.

30 Ainsi, la présente invention se rapporte également à une séquence d'acides nucléiques, notamment d'acides désoxyribonucléiques, ou d'acides ribonucléiques, représentée par SEQ ID NO: 1, un analogue ou un fragment de celle-ci.

Au sens de la présente invention, on entend par « fragment de séquence d'acides nucléiques », une séquence d'acides nucléiques comprenant de 9 à 144 paires de bases consécutives de ladite séquence, de préférence de 18 à 108, de préférence 24 à 96, et plus préférentiellement de 30 à 90 paires de bases consécutives de ladite séquence, et  
5 codant pour une séquence d'acides aminés ayant une activité biologique de même nature que la séquence d'acides aminés codée par ladite séquence.

Au sens de la présente invention, on entend par « analogue d'une séquence d'acides nucléiques » une séquence d'acides nucléiques ayant une identité de séquence d'au moins 85 %, de préférence d'au moins 90 %, et plus préférentiellement d'au moins  
10 95 % avec ladite séquence, et codant pour une séquence d'acides aminés ayant une activité biologique de même nature que la séquence d'acides aminés codée par ladite séquence.

Par « analogue d'une séquence d'acides nucléiques », on entend désigner une séquence d'acides nucléiques, éventuellement résultant de la dégénérescence du code des acides nucléiques, et codant pour une séquence d'acides aminés conforme à l'invention,  
15 notamment tel que défini précédemment.

Selon un mode de réalisation préféré, une séquence d'acides nucléiques de l'invention peut être représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO : 9 et SEQ ID NO : 10, un analogue ou un fragment de  
20 celle-ci.

Une séquence d'acides nucléiques de l'invention peut être de toutes origines possibles, à savoir soit animale, en particulier de mammifères et encore plus particulièrement humaine, soit végétale, soit de micro-organismes, tels que par exemple virus, phages, ou bactéries entre autres, ou encore de champignons, sans préjuger du fait  
25 qu'elles soient présentes de manière naturelle ou non dans ledit organisme d'origine.

Selon un mode de réalisation, l'invention se rapporte également aux séquences d'acides nucléiques isolées et purifiées codant pour une séquence d'acides aminés considérés selon l'invention, ainsi qu'à leurs analogues et fragments.

Une séquence d'acides nucléiques conforme à l'invention peut comprendre une  
30 séquence sens, anti-sens ou interférentielle correspondant à une séquence codant pour un polypeptide conforme à l'invention.

L'invention a également pour objet des séquences d'acides nucléiques, notamment d'acides ribonucléiques ou désoxyribonucléiques, comprenant une séquence sens ou anti-sens, notamment « small interferent RNA » (siRNA), correspondant au moins à une séquence codant pour un polypeptide de l'invention ou une séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 10, un analogue ou un fragment de celle-ci.

#### Peau âgée et signes cutanés du vieillissement

10 Par « peau âgée », on entend un état général de la peau résultant du vieillissement chronologique et/ou du vieillissement photoinduit.

Par « signes cutanés du vieillissement », on entend toutes les modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement qu'il soit d'origine chronologique et/ou photo-induit.

15 A titre d'exemple de ces modifications considérées dans l'invention, on peut citer les rides et ridules, la peau flétrie, le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau, l'amincissement du derme et/ou la dégradation des fibres de collagène, ce qui entraîne l'apparence de peau molle et ridée.

On entend également toutes les modifications internes de la peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié, comme par exemple toutes les dégradations internes de la peau, et plus particulièrement la dégradation des fibres d'élastine, ou fibres élastiques, consécutives à une exposition aux rayonnements ultra-violets.

25 En particulier, les signes cutanés du vieillissement visés par l'invention sont choisis parmi un amincissement de la peau, une perte de fermeté, une perte d'élasticité, une perte de densité, ou une perte de tonicité de la peau, une sécheresse de la peau, l'apparition d'un microrelief de la peau marqué, la formation et/ou la présence de ridules et/ou de rides, une altération de l'éclat du teint de la peau, un aspect papyracé de la peau, une altération de l'odeur de la peau, un affaissement de la peau, et un flétrissement de la peau.

30 De manière préférée, les signes cutanés du vieillissement visés par l'invention sont choisis parmi un amincissement de la peau, l'apparition d'un microrelief de la peau

marqué, la formation et/ou la présence de ridules et/ou de rides, un affaissement de la peau, et un flétrissement de la peau.

De manière préférée encore, les signes cutanés du vieillissement visés par l'invention sont choisis parmi l'apparition d'un microrelief de la peau marqué, la formation et/ou la présence de ridules et/ou de rides, un affaissement de la peau, et un flétrissement de la peau.

#### Biomarqueur

La présente invention concerne l'utilisation d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, à titre de biomarqueur d'un état de la peau.

De manière préférée, une utilisation conforme à l'invention permet de caractériser un état de la peau tel que la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

Selon un mode de réalisation, une diminution de l'activité, de l'expression ou de la maturation dudit biomarqueur peut être indicative d'une peau âgée et/ou de signes cutanés du vieillissement.

La présente invention concerne, selon un autre de ses aspects, l'utilisation d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, pour caractériser l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau, et de préférence de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.

Selon un mode de réalisation, une augmentation de l'activité, de l'expression ou de la maturation dudit biomarqueur peut être indicative d'un traitement cosmétique efficace pour exercer un effet bénéfique sur la peau et plus préférentiellement un effet à l'égard de la peau âgée et/ou de signes cutanés du vieillissement.

Dans une utilisation conforme à l'invention, une diminution ou une augmentation de l'activité, de l'expression ou de la maturation dudit biomarqueur peut être déterminée par comparaison à une mesure de référence obtenue selon toute méthode connue de l'homme de l'art.

Une « mesure de référence » au regard d'un paramètre donné, est une mesure qualitative ou quantitative de ce paramètre effectuée dans des conditions dites « contrôles »

ou « normales », par exemple déterminée dans un échantillon de référence, ou déterminée dans un échantillon en l'absence d'un traitement présumé avoir un effet sur le paramètre.

Par exemple, une mesure de référence pour une séquence d'acides aminés ou une séquence d'acides nucléiques conforme à l'invention peut être une valeur quantitative ou qualitative relative à l'expression, la maturation ou l'activité desdites séquences  
5 déterminée dans un échantillon de peau jeune et physiologiquement saine, ou déterminée dans un échantillon de peau, notamment de peau âgée, avant un traitement cosmétique.

De préférence, une mesure de référence est une mesure statistique, c'est à dire ayant été répétée sur différents échantillons de sorte à obtenir une moyenne.

10 La mesure de référence peut être effectuée parallèlement ou séquentiellement à la mesure test.

Elle peut également être une mesure « historique », c'est-à-dire effectuée antérieurement à la mesure test, et stockée, par exemple dans une base de données, en vue d'une utilisation ultérieure.

15 Une comparaison de la mesure test à une mesure de référence, et une observation d'une déviation ou d'une absence de déviation entre les deux mesures, permet de tirer une information quant au paramètre mesuré, par exemple la diminution ou l'augmentation l'expression, de la maturation ou de l'activité d'une séquence d'acides aminés ou d'une séquence d'acides nucléiques conformes à l'invention.

20 Une telle information peut être ultérieurement mise en œuvre pour déterminer le caractère jeune ou âgée d'une peau.

Un procédé selon l'invention peut également être effectué sur un échantillon de peau, prélevé à partir d'un modèle cellulaire épidermique, ou d'une peau isolée reconstruite afin d'en qualifier l'état.

25 Selon un mode de réalisation, l'invention concerne un procédé, en particulier *in vitro* ou *ex vivo*, pour caractériser un état de la peau.

Un procédé de l'invention permet avantageusement de caractériser un état âgé de la peau et/ou des signes du vieillissement cutané, et plus particulièrement de caractériser  
30 un état âgé de la peau d'origine chronologique et/ou photo-induit.

Selon un autre mode de réalisation, l'invention concerne un procédé cosmétique, ou non thérapeutique, en particulier *in vitro* ou *ex vivo*, pour caractériser

l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau, et de préférence de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement, chez un individu en ayant besoin, comprenant au moins les étapes consistant à :

5 a) effectuer, avant la mise en œuvre du traitement cosmétique, dans un premier échantillon de peau isolé prélevé chez ledit individu, au moins une première mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention,

10 b) effectuer, après la mise en œuvre du traitement cosmétique, dans un second échantillon de peau isolé prélevé chez ledit individu, au moins une seconde mesure, qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité de ladite séquence d'acides aminés de l'invention ou de ladite séquence d'acides nucléiques de l'invention, et

15 c) comparer les première et deuxième mesures, notamment afin d'en déduire une information relative à un effet au moins de la mise en œuvre du traitement cosmétique.

Il va de soit que les mesures effectuées aux étapes a) et b) doivent être comparables l'une à l'autre, et donc être relatives au même paramètre.

20 De manière préférée, un procédé de l'invention permet de mettre en évidence un effet d'un traitement cosmétique susceptible de faire régresser la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

La mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité d'une séquence d'acides nucléiques de l'invention peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme de l'art.

25 A titre d'exemple de méthodes convenant à l'invention, il peut être fait mention de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), quantitative (Q-PCR) ou non, en présence ou non de transcriptase inverse (RT-PCR ou Q-RT-PCR), du Northern-blot, de la méthode « ribonuclease protection assay », des méthodes avec des puces à ADN, des méthodes avec des puces transcriptomiques, des méthodes avec des puces à oligonucléotides, des méthodes d'hybridation *in situ*.

30 A titre d'exemple d'agents convenant à la détection d'une séquence d'acides nucléiques de l'invention, et en particulier d'une séquence d'ARNm, il peut être fait

mention de sondes d'acides nucléiques marquées pouvant s'hybrider à une séquence d'acides nucléiques de l'invention.

Une telle sonde d'acide nucléique peut être aisément obtenue par toute méthode connue de l'homme de l'art.

5           Ainsi, les séquences d'acides nucléiques conformes à l'invention peuvent être utilisées pour réaliser des amorces oligonucléotidiques sens et/ou anti-sens, qui s'hybrident dans des conditions de forte stringence à au moins une des séquences SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO : 9, SEQ ID NO : 10, un analogue ou un  
10 fragment celle-ci.

L'expression d'une séquence d'acide nucléique peut également être déterminée, de manière indirecte, par la détermination de l'expression de la séquence d'acides aminés codée par ladite séquence, au moyen de toute technique connue dans le domaine, telle que le Western-Blot, l'ELISA, la méthode de BRADFORD ou de LOWRY,  
15 ou comme indiqué ci-après.

La mesure qualitative ou quantitative, de l'expression, de la maturation, ou de l'activité d'une séquence d'acides aminés de l'invention peut être effectuée au moyen de toute méthode connue de l'homme de l'art.

A titre de méthodes de détection de l'expression, de la maturation, ou de  
20 l'activité d'une séquence d'acides aminés, il peut être fait mention du Western-blot, du Slot-blot, du Dot-blot, des méthodes ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) de type singleplex ou multiplex, des méthodes de protéomique ou de glycomique, de coloration de polypeptides dans un gel de polyacrylamide par un colorant à base d'Argent, par le bleu de Coomassie ou par le SYPRO, de l'immunofluorescence, de l'absorption UV,  
25 de méthodes immunohistochimiques en microscopie classique, électronique ou confocale, de FRET (fluorescence resonance energy transfer/transfert d'énergie par résonance de fluorescence), des méthodes de TR-FRET (time resolved FRET/FRET en résolution de temps), des méthodes de FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy/imagerie par microscopie en temps de fluorescence), des méthodes de FSPIM (fluorescence spectral  
30 imaging microscopy/imagerie par microscopie en spectre de fluorescence), des méthodes de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching/recouvrement de fluorescence après photoblanchiment), des méthodes par gène rapporteur, des méthodes d'AFM (atomic force

microscopy/microscopie par force atomique), des méthodes de résonance plasmonique de surface, des méthodes de microcalorimétrie, des méthodes de cytométrie en flux, des méthodes de biosenseurs, des méthodes de radioimmuno-essais (RIA), des méthodes de focalisation isoélectrique, et des tests enzymatiques, des méthodes mettant en œuvre des puces à peptides, des puces à sucre, des puces d'anticorps, des méthodes de spectrométrie de masse, des méthodes de spectrométrie de type SELDI-TOF (Ciphergen).

De façon plus générale, des méthodes de dosage immunoenzymatiques à partir de solutions de protéines, plus quantitatives et sensibles peuvent en particulier être utilisées. Ces méthodes de type ELISA associent des couples d'anticorps de capture et de détection spécifique de l'antigène ciblé. Des anticorps commerciaux ou des anticorps polyclonaux, monoclonaux ou recombinants développés spécifiquement peuvent être utilisés. Des techniques ELISA multiplexes de grande capacité peuvent également être mises en œuvre. On peut ainsi citer l'approche multiplexe de type anticorps sur billes Luminex (par exemple Bioplex de Bio-Rad), de type anticorps sur surface plane (« antibodies-arrays ») (par exemple approche proposée par la société MesoScale Discovery).

En particulier, il peut être avantageux de détecter l'expression d'une séquence d'acides aminés de l'invention au moyen d'un anticorps, le cas échéant sous une forme marquée. Un tel anticorps peut être marqué au moyen d'une substance détectable directement ou détectable par réaction avec un autre réactif.

Par « anticorps », on entend désigner de manière générale des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, ainsi que des fragments d'immunoglobuline susceptibles de lier un antigène et qui peuvent être produits par toute technique de génie génétique connue de l'homme de l'art ou par coupure enzymatique ou chimique d'anticorps intact.

Un anticorps susceptible d'être utilisé à titre d'outil d'évaluation d'un état d'un épiderme peut être obtenu par tout procédé connu de l'homme de l'art, tel que décrit dans « Antibodies: A Laboratory Manual », Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990).

Selon un mode de réalisation préféré, il peut être avantageux de détecter l'expression d'une séquence d'acides aminés de l'invention au moyen d'une méthode protéomique différentiel « iTRAQ ».

Une telle méthode est connue de l'homme de l'art et peut avantageusement être mise en œuvre comme décrit dans les exemples ci-après.

De manière particulière, par « activité » à l'égard d'une séquence d'acides aminés de l'invention on entend une activité antimicrobienne, une activité de stimulation de la survie cellulaire, une activité de stimulation de la prolifération cellulaire, ou une activité de réduction ou de prévention de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement, comme indiqué ci-dessus.

Une telle activité peut être déterminée par toute méthode connue de l'homme de l'art, comme par exemple, par évaluation de la prolifération ou de la survie de cellules épidermiques en cultures, telles que des kératinocytes, ou par évaluation de l'activité antimicrobienne sur des bactéries en culture, telles que *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli*.

De manière préférée, la détermination d'un état de la peau ou la caractérisation de l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau peuvent être effectuées par mesure de la variation de l'expression d'une séquence d'acides aminés de l'invention, et de préférence représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO : 19 ou SEQ ID NO : 20, un analogue ou un fragment de celle-ci.

Les procédés de l'invention sont particulièrement avantageux dans la mesure où leur mise en œuvre ne nécessite pas de recourir à une technique invasive. Un échantillon d'épiderme peut ainsi être obtenu par des techniques dites de « stripping » et directement analysé par une technique d'analyse conventionnelle connue de l'homme de l'art.

Ces strippings sont des surfaces collantes appliquées à la surface de l'épiderme comme le Blenderm<sup>®</sup> de 3M, le D'squam (adhésif commercial de CuDERM), la colle cyanoacrylate ou la méthode du « stripping » vernis. Grâce à ces « strippings », les cornéocytes adhérents et le contenu de leurs espaces intercellulaires peuvent être prélevés et soumis par la suite à une extraction permettant d'avoir accès au contenu protéique.

Le prélèvement d'un échantillon convenant à un procédé de l'invention peut aussi être effectué de façon plus directe par « lavages » de la surface cutanée, au moyen par exemple d'accessoires de type turbine à ailette, de type cellule à spirale telle que décrit

dans le brevet FR 2 667 778 associée à un circuit fluïdique, ou simplement par ajout/prélèvement d'une goutte de tampon à la surface de la peau.

A titre indicatif, d'autres méthodes de prélèvement adaptées à la mise en œuvre de l'invention peuvent être mentionnées, telles que des méthodes par grattage de la partie supérieure du *stratum corneum* au moyen d'un système bilames. Cette technique permet de  
5 recueillir des squames qui peuvent ensuite être directement analysés par différentes techniques pour déterminer les taux en minéraux, aminoacides ou lipides.

Avantageusement, un des marqueurs de l'invention peut être mise en œuvre à des fins de sélection préclinique, plus efficace et plus rigoureuse, d'individus, en vue  
10 d'évaluer l'efficacité de traitement ou d'actif cosmétique pour le soin de la peau.

Egalement, un biomarqueur de l'invention peut avantageusement être mis en œuvre comme indiqué précédemment pour évaluer l'efficacité d'un agent actif, *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo*.

Egalement, un biomarqueur de l'invention peut être mis en œuvre pour établir  
15 un conseil personnalisé d'un traitement cosmétique pour un individu en fonction de son profil d'expression de biomarqueurs cutanés.

### Criblage

Selon un de ses aspects, la présente invention concerne l'utilisation d'une  
20 séquence d'acides aminés, d'acides nucléiques de l'invention, pour cribler ou dans un procédé de criblage, en particulier *in vitro* ou *ex vivo*, d'agents actifs ou de traitements physiques, convenant particulièrement au soin de la peau.

Les agents actifs ou les traitements physiques criblés peuvent notamment convenir au soin de la peau âgée, et/ou à la prévention et/ou au traitement des signes  
25 cutanés du vieillissement.

Une utilisation ou un procédé de l'invention peuvent comprendre la comparaison d'une mesure de l'activité, de l'expression ou de la maturation d'une séquence d'acide aminés ou d'une séquence d'acides nucléiques conforme à l'invention à une mesure de référence.

30 Une mesure de référence peut être telle que définie précédemment.

En particulier une mesure de référence peut être une valeur quantitative ou qualitative relative à l'expression, la maturation ou l'activité desdites séquences déterminée dans un échantillon en l'absence d'agent actif ou de traitement physique testé.

5 Ainsi, une mesure de référence peut être obtenue en réitérant les étapes d'un procédé de l'invention, et notamment les étapes a), b) et c) d'un procédé de l'invention tel que défini précédemment, en l'absence de composés biologiques ou chimiques, ou de traitements physiques à tester.

Une comparaison de la mesure test à une mesure de référence, et une observation d'une déviation ou d'une absence de déviation entre les deux mesures, permet  
10 de tirer une information quant à l'effet de l'agent actif ou du traitement physique testé.

La détermination quantitative ou qualitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité d'une séquence d'acides aminés ou d'une séquence d'acides nucléiques de l'invention peut être effectuée par toute méthode connue de l'homme de l'art, et notamment comme décrit précédemment.

15

Selon un mode de réalisation, le criblage d'un agent actif ou d'un traitement physique susceptible de moduler l'activité d'une séquence d'acides aminées de l'invention peut se faire par mesure de l'activité ou de l'expression d'une molécule cible appartenant aux voies de signalisation ou de métabolisme dans lesquelles peut être impliqué ladite  
20 d'une séquence d'acides aminées, tel que par exemple un système de gène reporteur.

Selon un mode de réalisation, un procédé de l'invention peut être mis en œuvre dans un système acellulaire, i.e. dans un système ne comprenant pas de cellules mais reproduisant des fonctions cellulaires, ou dans un échantillon cellulaire isolé.

Un procédé conforme à l'invention peut être effectué sur un échantillon  
25 cellulaire isolé, un échantillon acellulaire, sur une séquence d'acides aminés isolée ou sur une séquence d'acides nucléiques isolée de l'invention, obtenus par biopsie cutanée, à partir de cellules en culture, notamment à partir d'un modèle épidermique, ou d'un prélèvement de surface cutané non-invasif, notamment par adhésif (« tape-stripping ») de *stratum corneum* ou par simple lavage, comme décrit précédemment.

30

Avantageusement, à titre d'échantillon cellulaire convenant à l'invention, on peut mentionner un échantillon de kératinocytes ou tout autre type cellulaire de la peau exprimant une séquence d'acides aminés de l'invention.

De manière préférée, le criblage d'un agent actif ou d'un traitement physique peut être effectuée par mesure de la variation de l'expression, en présence et en absence de l'agent actif ou du traitement physique criblé, d'une séquence d'acides aminés de l'invention, et de préférence représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 16, 5 SEQ ID NO: 17, ou SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci.

#### Agent modulateur

Au sens de la présente invention, on entend par « agent modulateur » ou « agent actif ou un traitement physique susceptible de moduler l'expression, la maturation 10 ou l'activité d'une séquence d'acides aminés ou d'une séquence d'acides nucléiques conformes à l'invention », tout composé ou phénomène physique susceptible d'agir, directement ou indirectement, sur au moins une séquence d'acides aminés ou une séquence d'acides nucléiques conformes à l'invention, ou sur un élément d'une voie de signalisation intra ou extra-cellulaire, ou d'une voie métabolique, ou de régulation de la 15 transcription et/ou de la traduction impliquant ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques.

Au sens de l'invention, on entend par « moduler », au regard d'un effet donné, l'action de stimuler ou d'inhiber cet effet.

Les agents actifs ou les traitements physiques issus d'un criblage selon 20 l'invention peuvent être avantageusement utilisés à des fins cosmétiques, notamment au regard de la peau âgée ou des signes cutanés du vieillissement.

Selon un mode de réalisation, un agent actif de à l'invention peut être un agent stimulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation d'une séquence d'acides 25 aminés de l'invention.

En particulier, un agent stimulateur peut être choisi parmi un lysat de *Bifidobacterium sp.* et un mélange composé d'un lysat de *Bifidobacterium sp.* et de phytosphingosine-salicylate.

De manière préféré un lysat de *Bifidobacterium sp.* peut être un lysat de 30 *Bifidobacterium longum*. Un lysat de *Bifidobacterium longum* convenant à l'invention peut être le lysat enregistré sous le nom INCI : Bifidat ferment Lysate, sous le nom EINECS : *Bifidobacterium longum*, sous le N° EINECS : N° 306-168-4, et sous le N° CAS :

N° 96507-89-0. Un tel lysat est notamment commercialisé sous la dénomination Repair Complex CLR<sup>®</sup> par la société K. RICHTER GmbH.

Un mélange composé d'un lysat de *Bifidobacterium sp.* et de phytosphingosine-salicylate selon l'invention peut comprendre un lysat de *Bifidobacterium longum* tel que défini précédemment et un dérivé de phytosphingosine-salicylate.

Un dérivé de phytosphingosine-salicylate convenant à l'invention peut être le dérivé commercialisé par la société EVONICK GOLDSCHMIDT sous la dénomination Phytosphingosine SLC<sup>®</sup>.

Un mélange selon l'invention peut comprendre un lysat de *Bifidobacterium sp.* à raison de 10 % et un dérivé de phytosphingosine-salicylate à raison de 0,002 %.

A titre d'agent modulateur susceptible d'être criblé selon une utilisation ou un procédé conforme à l'invention, on peut également mentionner les anticorps, ou les ARN interférents.

#### 15 Compositions

La présente invention concerne également des compositions, notamment cosmétiques, comprenant dans un milieu physiologiquement ou cosmétiquement acceptable une quantité efficace d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou d'au moins un agent actif apte à moduler l'activité, l'expression ou la maturation de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques.

Plus particulièrement, l'invention concerne une composition cosmétique comprenant un peptide représenté par une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci ou une séquence d'acides nucléiques codant pour un tel peptide.

Au sens de la présente invention, on entend désigner par « milieu physiologiquement acceptable », un milieu convenant à l'administration d'une composition par voie topique sur la peau, le cuir chevelu, ou les lèvres, ou par voie orale ou par voie parentérale telle que la voie intradermique ou sous-cutanée.

Une composition de l'invention peut contenir des adjuvants habituels dans le domaine considéré, tels que des gélifiants hydrophiles ou lipophiles, des additifs

hydrophiles ou lipophiles, des conservateurs, des antioxydants, des solvants, des parfums, des charges, des filtres, des absorbeurs d'odeurs et des matières colorantes.

Les quantités des différents constituants des compositions selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

5 La quantité de séquence d'acides aminés, ou de séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou d'agent actif conformes à l'invention contenue dans une composition de l'invention, encore dite « quantité efficace » est, bien entendu, fonction de la nature de l'actif et de l'effet recherché et peut donc varier dans une large mesure.

10 Pour donner un ordre de grandeur, une composition peut contenir une séquence d'acides aminés, ou une séquence d'acides nucléiques, ou un agent actif conformes à l'invention en une quantité représentant de 0,00001 % à 50 % du poids total de la composition, en particulier en une quantité représentant de 0,001 % à 10 % du poids total de la composition, et plus particulièrement en une quantité représentant de 0,1 % à 1 % du poids total de la composition.

15 Selon un autre mode de réalisation, une composition cosmétique de l'invention peut comprendre, en outre, au moins un agent actif cosmétique et/ou thérapeutique additionnel.

#### Actifs additionnels

20 Comme exemples d'agents actifs additionnels utilisables dans le cadre de la présente invention, il peut être fait mention d'huiles cosmétiques, telles que les huiles de silicone, les huiles végétales de type triglycérides, les huiles hydrocarbonées telles que l'huile de PARLEAM et les esters d'acides gras et d'alcool gras.

25 Il peut également être possible d'utiliser d'autres agents actifs permettant d'améliorer l'état de la peau et/ou de ses annexes, tels que des actifs hydratants ou humidifiants ou des agents actifs permettant d'améliorer la barrière lipidique naturelle, tels que des céramides, des sulfates de cholestérol et/ou des acides gras, et leurs mélanges.

30 Il peut également être possible d'utiliser des enzymes ayant une activité sur la peau et/ou de ses annexes, telles que des protéases, des lipases, des glucosidases, des amidases, des cérébrosidases et/ou des mélanases, et leurs mélanges.

Comme autres exemples d'agents actifs convenant à la mise en œuvre de la présente invention figurent : des actifs analgésiques, des actifs anti-levures, des actifs

antibactériens, des actifs antiparasitaires, des actifs antifongiques, des actifs antiviraux, des actifs anti-inflammatoires stéroïdiens, des actifs anesthésiques, des actifs antiprurigineux, des actifs kératolytiques, des actifs anti-radicaux libres, des actifs anti-séborrhéiques, des actifs antipelliculaires, des actifs anti-acnéiques, des actifs visant à prévenir le  
5 vieillissement de la peau et/ou à améliorer son état, des actifs anti-dermatites, des actifs anti-irritants, des actifs immuno-modulateurs, des actifs pour le traitement de la peau sèche, des actifs anti-transpirants, des actifs anti-psoriatiques, des actifs protecteurs contre les UV, des actifs antihistaminiques, des actifs cicatrisants, des actifs auto-bronzants, des antioxydants tels que le thé vert ou des fractions actives de celui-ci, la glycérine, la  
10 laponite, la caféine, des huiles essentielles aromatiques, des colorants, des actifs dépigmentants, des lipo-régulateurs, des actifs adoucissants, rafraîchissants, déodorants, insensibilisants, blanchissants, nourrissants, des actifs diminuant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation cutanée, et leurs mélanges.

A titre d'actifs additionnels susceptibles de convenir plus particulièrement à  
15 l'invention, on peut mentionner également des microorganismes probiotiques, autres que ceux considérés dans le lysat précédemment décrit, des actifs prébiotiques, des actifs favorisant la synthèse de facteur de défense de la peau, des actifs permettant de rétablir l'équilibre différenciation/prolifération des cellules de l'épiderme, en particulier tels que des actifs de type retinol ou retinol-like, des actifs hydratants ou des actifs stimulant  
20 l'activité de protéase cutanée, notamment de la Cathépsine D.

#### Utilisation cosmétique

La présente invention concerne l'utilisation cosmétique d'une quantité efficace d'au moins une séquence d'acides aminés ou d'acides nucléiques de l'invention ou d'au  
25 moins un agent modulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, et notamment un agent modulateur tel que défini précédemment, à titre d'agent actif pour prévenir et/ou traiter la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé cosmétique,  
30 ou non thérapeutique, pour prévenir et/ou traiter une peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement chez un individu en ayant besoin, le procédé comprenant au moins une étape consistant à administrer audit individu, au moins une composition comprenant à titre

d'agent actif (i) au moins une séquence d'acides aminés de l'invention ou (ii) au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou (iii) au moins un agent modulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation desdites séquences de l'invention, notamment tels que définis ci-avant.

5 Un procédé ou une utilisation de l'invention permettent de prévenir et/ou traiter le vieillissement cutané, notamment chronologique et/ou photo-induit.

Un procédé ou une utilisation de l'invention permettent de conférer et/ou de restaurer un aspect jeune à la peau, se manifestant par une peau lisse, élastique, tonique, ou ferme, ou un teint lumineux.

10 Un procédé ou une utilisation de l'invention permettent de prévenir et/ou réduire la présence d'un microrelief marqué de la peau, en particulier au niveau de la commissure des lèvres et des pattes d'oies.

Un procédé ou une utilisation de l'invention permettent de renforcer les propriétés barrières de la peau.

15 De manière préférée, un procédé de l'invention peut comprendre l'application par voie topique sur au moins une partie de la peau d'un individu en ayant besoin, en particulier sur la peau du visage et/ou du décolleté, d'au moins une couche d'une composition topique de l'invention.

20 Avantageusement, un procédé de l'invention par voie topique peut comprendre l'application sur la peau, et notamment sur la peau du visage, d'une composition de l'invention sous forme d'un masque.

25 Un procédé cosmétique par voie topique selon l'invention peut avantageusement comprendre l'application d'une composition de l'invention, en association de manière simultanée, successive ou séparée dans le temps avec une composition cosmétique ou dermatologique additionnelle distincte de la composition de l'invention et destinée au soin et/ou au maquillage de la peau.

Selon un autre mode de réalisation préféré, un procédé cosmétique de l'invention peut être mis en œuvre par voie orale, notamment par administration d'au moins une composition alimentaire ou diététique à visée cosmétique.

30

Selon un autre mode de réalisation préféré, un procédé cosmétique de l'invention peut être mis en œuvre par voie parentérale. La mise en œuvre par voie

parentérale d'un procédé cosmétique de l'invention est effectuée à l'exclusion de toute intervention chirurgicale et ne vise qu'à exercer un traitement de surface de la peau à des fins esthétiques.

5 Ainsi, un procédé cosmétique de l'invention par voie parentérale est mis en œuvre par toute technique d'injection ou dispositif convenant à une injection intra-épidermique et/ou intradermique et/ou sous-cutanée.

Une telle administration peut être effectuée, par exemple, par mésothérapie.

Un procédé cosmétique par voie parentérale ne se traduit donc que par une effraction superficielle de la peau et sort donc de tout cadre médical ou thérapeutique.

10 Pour la voie parentérale, on pourra alternativement privilégier l'administration par patch à visée systémique.

Un procédé cosmétique selon l'invention peut être mis en œuvre de façon journalière, par exemple à raison d'une administration unique par jour, ou d'une administration fractionnée en deux ou trois fois par jour, par exemple une fois le matin et  
15 une fois le soir.

Un procédé cosmétique selon l'invention peut être mis en œuvre sur une période de temps variant d'une semaine à plusieurs semaines, voire plusieurs mois, cette période pouvant par ailleurs être répétée après des périodes de non traitement pendant plusieurs mois, voire plusieurs années.

20 A titre d'exemple, de procédé cosmétique selon l'invention on peut prévoir une administration d'une composition de l'invention, par exemple, à raison de 1, 2 ou 3 fois par jour, ou plus, et généralement sur une durée prolongée d'au moins 4 semaines, voire 4 à 15 semaines, avec le cas échéant une ou plusieurs périodes d'interruption.

### 25 Peau reconstruite

Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une quantité efficace d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou d'au moins un agent modulateur de l'invention pour préparer un modèle cellulaire épithélial pluristratifié, de préférence un  
30 modèle de peau reconstruite.

L'intérêt de développer des modèles organotypiques les plus proches de conditions *in-vivo* est grand pour l'évaluation sécurité et efficacité des actifs et formules à applications cosmétiques et dermatologiques.

5 L'utilisation d'au moins une séquence d'acides aminés de l'invention, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques de l'invention, ou d'au moins un agent modulateur de l'invention dans un milieu de culture est susceptible d'améliorer la qualité des modèles développés.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un modèle cellulaire épithélial pluristratifié isolé, et de préférence une peau reconstruite isolée comprenant, au moins l'étape de mettre en contact au moins une quantité efficace  
10 d'au moins une séquence d'acides aminés, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques, ou d'au moins un agent modulateur conformes à l'invention avec des cellules susceptibles de générer une peau reconstruite isolée, et notamment des kératinocytes.

Un modèle de peau reconstruite peut comprendre différents types cellulaires, tels des kératinocytes, des fibroblastes, des cellules de Langerhans et des mélanocytes. Les  
15 cellules de type fibroblastes peuvent être irradiées ou non.

De tels modèles et leur préparation sont connus de l'homme de l'art.

Selon encore un autre aspect, la présente invention concerne également un  
20 procédé de préparation d'un modèle cellulaire épithélial pluristratifié, de préférence un modèle de peau reconstruite, comprenant au moins une étape de mise en culture de cellules d'au moins un type cellulaire dudit modèle, lesdites cellules ayant été génétiquement modifiées pour supprimer l'expression d'une séquence d'acides aminés ou d'une séquence d'acide nucléiques de l'invention.

25 L'obtention de cellules génétiquement modifiées pour supprimer l'expression d'une séquence d'acides aminés ou d'une séquence d'acide nucléiques de l'invention, cellules dites « knock-out », peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme de l'art.

A titre d'exemple, de telles cellules peuvent être obtenues par transfection et  
30 recombinaison homologue d'un fragment d'acide nucléique venant s'insérer dans ou prendre la place du gène exprimant la séquence d'acides aminés dont l'expression est à supprimer.

Egalement, il peut être possible de supprimer l'expression d'un gène donné par transfection dans la cellule d'une séquence d'acide nucléique codant pour un ARN interférant spécifique de l'ARNm issu du gène dont l'expression est à supprimer.

5            Au sens de la présente invention, « un » doit se comprendre, sauf indication contraire, au sens de « au moins un ».

Les exemples et figures ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'invention.

## 10            **EXEMPLES**

### **Exemple 1**

#### *Expression de la Dermcidine dans la peau*

15            1- Matériels et méthodes

a- Protocole iTRAQ

La détection de l'expression de la Dermcidine (DCD) a été réalisée au moyen de la méthode iTRAQ (Isobaric Tagging Reagents for Quantitative Proteomic Analysis) développée par la société Applied Biosystems. Cette méthode permet la quantification de peptides préalablement marqués par un Tag isobarique. Il existe 4 tags différents et on peut  
20            comparer jusqu'à 4 types d'échantillons distincts dans une même analyse LC/MS-MS.

Le principe de cette méthode est le suivant :

- Digestion d'extraits protéiques et marquage :

25            Dans un premier temps, chaque extrait protéique est digéré par une enzyme protéolytique : la trypsine.

Dans un second temps, chaque mélange peptidique obtenu est marqué avec un Tag isobarique d'une masse totale 145, comprenant un groupe « reporter » de masse 114, 115, 116 ou 117, et un groupe « balance » de masse 31, 30, 29 ou 28, liés entre eux par un  
30            site de fragmentation MS.

Le marquage est obtenu par réaction du Peptide Reactive Group de chaque tag avec les amines primaires des peptides (extrémité N-terminale des peptides ou la chaîne latérale des lysines ou des tyrosines).

- Analyse LC/MS-MS et quantification :

Après l'étape de marquage, les échantillons sont mis en commun et analysés par spectrométrie de masse. Un peptide donné, présent dans plusieurs échantillons, aura une masse parente identique mais son spectre de fragmentation MS/MS va générer la  
5 masse du groupe rapporteur caractéristique de chacun des réactifs iTRAQ. La comparaison de l'intensité de chaque ion rapporteur (114, 115, 116 ou 117) permet alors la quantification du peptide.

La méthode iTRAQ est plus précisément décrite par Zieske (J. Exp. Bot., 2006, 57 :1501) ou Wiese *et al.* (Proteomics, 2007, 7 :340).

10

b- Prélèvement et traitement des échantillons cutanés

Des prélèvements de type stripping-vernis de stratum corneum d'une surface de 90 cm<sup>2</sup>, sont obtenus selon le protocole décrit par Mehul *et al.*, J. Biol. Chem., 2000, 275(17):12841-7, au niveau de la face externe de la jambe. Deux groupes de sujets sont  
15 prélevés :

- 1) Groupe « Peau Jeune » : 18-40 ans, 27 sujets masculins ;
- 2) Groupe « Peau Agée » : supérieur à 60 ans, 35 sujets masculins.

Ces prélèvements de peau sont ensuite analysés par protéomique au moyen de la technique dite de « marquage isobarique », précédemment décrite, en utilisant le kit  
20 iTRAQ Reagents Multiplex kit (4352135), d'Applied Biosystems, conformément aux instructions du fabricant.

2- Résultats

Parmi les protéines identifiées, les peptides représentés par les séquences  
25 SEQ ID NO: 17 et SEQ ID NO: 18 issus de la Dermcidine (N° accession P81605 – Réf.: Swissprot/Uniprot) sont détectés et quantifiés dans quatre expériences.

Les résultats de quantification de la Dermcidine sont donnés dans le tableau suivant :

| Protéine   | Expérience N°<br>Ratio 116/114 âgé / jeune |        |        |        | Moyenne     | Ecart-type  |
|------------|--|--------|--------|--------|-------------|-------------|
|            | 1  | 2      | 3      | 4      |             |             |
| Dermcidine | 0,3937                                     | 0,2465 | 0,4356 | 0,4209 | <b>0,37</b> | <b>0,09</b> |

Ces résultats montrent que le ratio iTRAQ moyen âgé/jeune est égal à  $0,37 \pm 0,09$ . Cette mesure traduit une forte expression de la Dermcidine dans les peaux du groupe « Peau jeune », et une forte diminution de son expression dans les peaux du groupe « Peau âgée ».

La Dermcidine se révèle donc être un biomarqueur intéressant et spécifique de la peau, et plus particulièrement d'un état âgé de la peau.

10 L'expression de l'Apolipoprotéine D et de la chaîne lourde de la Cathepsine D a été mesurée à titre de données comparatives.

Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau suivant.

| Protéine                         | Expérience N°<br>Ratio 116/114 âgé / jeune |        |        |        | Moyenne     | Ecart-type  |
|----------------------------------|--|--------|--------|--------|-------------|-------------|
|                                  | 1  | 2      | 3      | 4      |             |             |
| Apolipoprotéine D                | 0,7975                                     | 0,7455 | 0,8205 | 0,9062 | <b>0,82</b> | <b>0,07</b> |
| Chaîne lourde de la Cathepsine D | 0,9580                                     | 1,1068 | 0,9595 | 0,9537 | <b>0,99</b> | <b>0,07</b> |

15 En comparaison de la Dermcidine, l'Apolipoprotéine D et la chaîne lourde de la Cathépsine D ne sont que très légèrement sous-exprimées dans le groupe « Peau âgée » par rapport au groupe « Peau jeune ».

Cette étude valide ainsi l'utilisation de la Dermcidine à titre de biomarqueur d'exception de la peau, et plus particulièrement de la peau âgée.

**Exemple 2**

*Effet d'un lysat de Bifidobacterium sp. sur l'expression de la Dermcidine*

1- Matériels et méthodes

5 Les prélèvements d'échantillons de peaux, et les mesures de l'expression de la Dermcidine sont réalisés comme indiqué à l'exemple 1.

Les volontaires sont des sujets féminins âgés de 30 à 65 ans. Ils ont été combinés et répartis en deux sous-groupes selon le traitement administré, un groupe « Placebo », et un groupe « Traité ».

10 Le groupe « Traité » reçoit par voie topique, sur la jambe, à raison de 2 fois par jour, matin et soir, pendant 56 jours, soit 2 mois, une composition comprenant 10 % de Repair Complex<sup>®</sup> dans une formule support correspondant à une émulsion huile dans eau déminéralisée Arlacel/Myrj contenant 5 % de Parleam, 15 % de cyclopentasiloxane, 3 % de glycérine et 2 % de vaseline.

15 Le Repair Complex<sup>®</sup> comprend un lysat de *Bifidobacterium longum* enregistré sous le nom INCI : Bifida ferment Lysate, sous le nom EINECS : *Bifidobacterium longum*, sous le N° EINECS : N° 306-168-4, et sous le N° CAS : N° 96507-89-0. Ce lysat est commercialisé sous la dénomination Repair Complex CLR<sup>®</sup> par la société K. RICHTER GmbH.

20 Le groupe « Placebo » reçoit en revanche uniquement la formule support.

Pour chaque condition sujets « Traité » et « Placebo », une moyenne des ratios J56/J0 est obtenue, permettant ainsi d'évaluer l'effet du traitement.

Les ratios J56/J0 sont calculés selon la formule suivante :

25

$$\% \text{ effet du traitement} = 100 * \frac{\text{Ratio J56/J0 « Traité »} - \text{Ratio J56/J0 « Placebo »}}{\text{ratio J56/J0 « Placebo »}}$$

## 2- Résultats

Les données brutes obtenues à l'issue de l'analyse sont les suivantes :

| Expérience 1            |                        |
|-------------------------|------------------------|
| Ratio J56/J0<br>Placebo | Ratio J56/J0 Traité    |
| 2,70                    | 3,10                   |
| Expérience 2            |                        |
| Ratio J56/J0<br>Placebo | Ratio<br>J56/J0 Traité |
| 1,00                    | 1,62                   |

La valeur moyenne du ratio J56/J0 « Placebo » est de 1,85, alors que la valeur  
5 moyenne du ratio J56/J0 « Traité » est de 2,36.

Le traitement par le Repair Complex® se traduit par une augmentation du  
signal de 27 % par rapport au placebo.

Ainsi l'administration, par voie topique, d'un lysat de *Bifidobacterium longum*  
accroît l'expression de la Dermcidine d'environ 30 % après 2 mois de traitement.

10 L'administration, par voie topique, d'un lysat de *Bifidobacterium sp.* permet  
donc de restaurer un niveau d'expression de la Dermcidine au niveau de la peau, et  
notamment de la peau âgée, propice à renforcer son action de protection de la peau, à  
renforcer les propriétés barrières de la peau, et à réduire les signes cutanés du  
vieillessement.

15 Cette étude valide en outre l'utilisation de la Dermcidine à titre de biomarqueur  
pour évaluer l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau âgée, ainsi qu'à titre d'outil  
de criblage de nouveaux agents actifs destinés au traitement de la peau âgée.

### **Exemple 3**

20 *Effet d'un mélange lysat de Bifidobacterium longum et de phytosphingosine  
salicylate sur l'expression de la Dermcidine*

#### 1- Matériels et méthodes

25 Les prélèvements d'échantillons de peaux, et les mesures de l'expression de la  
Dermcidine sont réalisés comme indiqué à l'exemple 1.

Les volontaires sont des sujets féminins âgés de 40 à 45 ans. Chaque sujet est son propre témoin, les deux bras sont prélevés mais un seul est traité avec le produit testé et le second bras reçoit un placebo.

Le bras « Traité » reçoit par voie topique, à raison de 2 fois par jour, matin et soir, pendant 56 jours, soit 2 mois, une composition comprenant 10 % de Repair Complex<sup>®</sup> et 0,002 % de Phytosphingosine-SLC dans une formule support correspondant à une émulsion huile dans eau déminéralisée Arlacel/Myrj contenant 5 % de Parleam, 15 % de cyclopentasiloxane, 3 % de glycérine et 2 % de vaseline.

Le Repair Complex<sup>®</sup> comprend un *Bifidobacterium longum* enregistré sous le nom INCI : Bifida ferment Lysate, sous le nom EINECS : Bifidobacterium longum, sous le N° EINECS : N° 306-168-4, et sous le N° CAS : N° 96507-89-0. Ce lysat est commercialisé sous la dénomination Repair Complex CLR<sup>®</sup> par la société K. RICHTER GmbH.

Le dérivé phytosphingosine-salicylate est celui commercialisé par la société EVONICK GOLDSCHMIDT sous la dénomination Phytosphingosine SLC<sup>®</sup>.

Le bras « Placebo » reçoit uniquement la formule support.

Pour chaque condition « Traité » et « Placebo », une moyenne des ratios J56/J0 est obtenue comme indiqué précédemment, permettant ainsi d'évaluer l'effet du traitement.

## 20 2- Résultats

Les données brutes obtenues à l'issue de l'expérience sont les suivantes :

| Expérience n 1          |                        |
|-------------------------|------------------------|
| Ratio J56/J0<br>Placebo | Ratio J56/J0<br>Traité |
| 0.75                    | 1.66                   |
| Expérience n°2          |                        |
| Ratio J56/J0<br>Placebo | Ratio J56/J0<br>Traité |
| 0.45                    | 0.81                   |

La valeur moyenne du ratio J56/J0 « Placebo » est de 0,6, alors que la valeur moyenne du ratio J56/J0 « Traité » est de 1,235.

25 L'effet traitement est égal à 105%, et traduit un doublement de l'expression de la Dermcidine par rapport au « Placebo ».

Ainsi l'administration, par voie topique, d'un mélange comprenant un lysat de *Bifidobacterium longum* et de la phytosphingosine-salicylate accroît l'expression de la Dermcidine de plus de 100 %.

5 L'administration, par voie topique, d'un mélange comprenant un lysat de *Bifidobacterium longum* et de la phytosphingosine-salicylate permet donc de restaurer un niveau d'expression de la Dermcidine au niveau de la peau, et notamment de la peau âgée, propice à renforcer son action de protection de la peau, à renforcer les propriétés barrières de la peau, et à réduire les signes cutanés du vieillissement.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Anderson, R. K. and W. L. Kenney (1987). « Effect of age on heat-activated sweat gland density and flow during exercise in dry heat » J. Appl. Physiol. 63(3): 1089-1094.
- Baechle, D., T. Flad, *et al.* (2006). « Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L » J. Biol. Chem. 281(9):5406-5415.
- Cunningham, T. J., L. Hodge *et al.* (1998) « Identification of a survival-promoting peptide in medium conditioned by oxidatively stressed cell lines of nervous system origin » J. Neurosci 18(18):7047-7060.
- Flad, T., R. Bogumil *et al.* (2002) « Detection of dermcidin-derived peptides in sweat by ProteinChip Technology. » J. Immunol. Methods 270(1): 53-62.
- Kenney, W. L. and S. R. Fowler (1988) « Methylcholine-activated eccrine sweat gland density and output as a function of age » J. Appl. Physiol. 65(3):1082-1086.
- Kyte *et al.*, (1982), J. Mol. Biol., 157: 105.
- Mehul B. *et al.*, (2000) « Identification and Cloning of a New Calmodulin-like Protein from Human Epidermis » J. Biol. Chem. 275(17):12841-12847
- Moreira, D. F, B. E. Strauss *et al.* (2008) « Genes up- and down-regulated by dermcidin in breast cancer: a microarray analysis » Genet. Mol. Res. 7(3): 925-932.
- Niyonsaba, F. A. Suzuki *et al.* (2009) « The human antimicrobial peptide dermcidin activates normal human keratinocytes » Br. J. Dermatol. 160(2): 243-249.
- Rieg, S.C., Garbe *et al.* (2004) « Dermcidin is constitutively produced by eccrine sweat gland and is not induced in epidermal cells under inflammatory skin conditions » Br. J. Dermatol. 151(3): 534-539.
- Rieg S., II Steffen *et al.* (2005) « Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo » J. Immunol. 174(12):8003-8010.
- Sakurada K., T. Akutsu, *et al.*, (2009) « Detection of dermcidin for sweat identification by real-time RT-PCR and ELISA » Forensic. Sci. Int. 2010 Jan. 30;194(1-3):80-4. Epub 2009 Nov. 13.

Sambrook *et al.*, 1989, Vol. I-III, Coldspring Harbor Laboratory, Coldspring Harbor Press, NY.

Schittek, B, R. Hipfel *et al.* (2001) : « Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands » Nat. Immunol. 2(12): 1133-11137.

5 Watchorn, T. M. N. Dowidar *et al.* (2005) « The cachectic mediator proteolysis inducing factor activates NF-kappaB and STAT3 in human Kupffer cells and monocytes » Int. J. Oncol. 27(4): 1105-1111.

Wiese *et al.*, (2007) « Protein labeling by iTRAQ: A new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research » Proteomics 7(3):340-350

10 Zieske *et al.* (2006) « A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies » J. Exp. Bot. 57(7):1051-1058.

## REVENDICATIONS

1. Utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés codée par une séquence d'acides nucléiques représentée par SEQ ID NO: 1, d'un analogue ou d'un fragment de ladite séquence d'acides aminés, ou (ii) de ladite séquence d'acides nucléiques, à titre de biomarqueur d'un état de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.  
5
2. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle ladite séquence d'acides nucléiques est représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 10, un analogue ou un fragment de celle-ci.  
10
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle ladite séquence d'acides aminés est représentée par une séquence choisie parmi SEQ ID NO: 11 à SEQ ID NO: 20, un analogue ou un fragment de celles-ci, et de préférence est choisie parmi SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, un analogue ou un fragment de celle-ci.  
15
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle une diminution de l'activité, de l'expression ou de la maturation dudit biomarqueur est indicative d'une peau âgée et/ou de signes cutanés du vieillissement.
5. Utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, pour cribler des agents actifs ou des traitements physiques susceptibles de moduler l'activité, l'expression ou la maturation de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques.  
20
6. Utilisation (i) d'au moins une séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, pour caractériser l'efficacité d'un traitement cosmétique de la peau.  
25
7. Utilisation selon la revendication précédente, dans laquelle le traitement cosmétique est un traitement cosmétique de la peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement.  
30
8. Utilisation cosmétique d'une quantité efficace (i) d'au moins une séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou (ii) d'au moins une séquence

d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, ou (iii) d'au moins un agent modulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, à titre d'agent actif pour prévenir et/ou traiter la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement.

5           9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 7 et 8, dans laquelle les signes cutanés du vieillissement sont choisis parmi un amincissement de la peau, une perte de fermeté, une perte d'élasticité, une perte de densité, ou une perte de tonicité de la peau, une sécheresse de la peau, l'apparition d'un microrelief de la peau marqué, la formation et/ou la présence de ridules et/ou de rides, une altération de l'éclat du  
10 teint de la peau, un aspect papyracé de la peau, une altération de l'odeur de la peau, un affaissement de la peau, et un flétrissement de la peau.

          10. Utilisation d'une quantité efficace (i) d'au moins une séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou (ii) d'au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, ou d'au moins un agent modulateur  
15 tel que défini en revendication 8 pour préparer un modèle cellulaire épithélial pluristratifié, de préférence un modèle de peau reconstruite.

          11. Procédé *in vitro* ou *ex vivo* pour caractériser un état de la peau âgée et/ou les signes cutanés du vieillissement comprenant au moins les étapes consistant à :

a) effectuer, dans un échantillon isolé d'une peau, une mesure qualitative ou  
20 quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité de ladite séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3 ou de ladite séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, et

b) comparer ladite mesure effectuée à l'étape a) à une mesure de référence.

          12. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 7 à 9, ou  
25 procédé selon la revendication 11, dans laquelle ou lequel la peau âgée est choisie parmi des peaux ayant subi un vieillissement chronologique et/ou un vieillissement photo-induit.

          13. Procédé de criblage *in vitro* ou *ex vivo* d'agents actifs ou de traitements physiques susceptibles de moduler l'activité, l'expression ou la maturation d'une séquence  
d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou d'une séquence d'acides  
30 nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, comprenant au moins les étapes consistant à :

a) disposer ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques dans des conditions propices à l'activité, l'expression ou la maturation desdites séquences,

5 b) mettre en contact ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques avec au moins un agent actif à tester, ou exposer ladite séquence d'acides aminés ou ladite séquence d'acides nucléiques avec un traitement physique à tester,

c) effectuer une mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité de ladite séquence d'acides aminés ou de ladite séquence  
10 d'acides nucléiques, et

d) comparer ladite mesure à une mesure de référence.

14. Procédé cosmétique pour prévenir et/ou traiter une peau âgée et/ou des signes cutanés du vieillissement chez un individu en ayant besoin, comprenant au moins une étape consistant à administrer audit individu, au moins une composition comprenant à  
15 titre d'agent actif (i) au moins une séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou (ii) au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2, ou (iii) au moins un agent modulateur de l'activité, de l'expression ou de la maturation desdites séquences.

15. Procédé cosmétique, *in vitro* ou *ex vivo*, pour caractériser l'efficacité d'un  
20 traitement cosmétique de la peau chez un individu en ayant besoin, comprenant au moins les étapes consistant à :

a) effectuer, avant la mise en œuvre du traitement cosmétique, dans un premier échantillon de peau isolé prélevé chez ledit individu, au moins une première mesure qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité d'au moins une  
25 séquence d'acides aminés telle que définie en revendications 1 à 3, ou d'au moins une séquence d'acides nucléiques telle que définie en revendications 1 ou 2,

b) effectuer, après la mise en œuvre du traitement cosmétique, dans un second échantillon de peau isolé prélevé chez ledit individu, au moins une seconde mesure, qualitative ou quantitative de l'expression, de la maturation ou de l'activité de ladite  
30 séquence d'acides aminés ou de ladite séquence d'acides nucléiques, et

c) comparer les première et deuxième mesures, notamment afin d'en déduire une information relative à un effet au moins de la mise en œuvre du traitement cosmétique.

16. Peptide isolé représenté par une séquence d'acides aminés choisie parmi SEQ ID NO: 17 ou SEQ ID NO: 18, un analogue ou un fragment de celle-ci.

17. Composition cosmétique comprenant un peptide tel que défini en revendication 16 ou une séquence d'acides nucléiques codant pour un tel peptide.

**Listage de Séquences****SEQ ID NO: 1** (P81605)

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atgaggttca | tgactctcct | cttctgaca  | gctctggcag | gagccctggt | ctgtgcctat | 60  |
| gatccagagg | ccgcctctgc | cccaggatcg | gggaaccctt | gccatgaagc | atcagcagct | 120 |
| caaaaggaaa | atgcaggtga | agaccaggg  | ttagccagac | aggcaccaa  | gccaaggaag | 180 |
| cagagatcca | gccttctgga | aaaaggccta | gacggagcaa | aaaaagctgt | ggggggactc | 240 |
| ggaaaactag | gaaaagatgc | agtcgaagat | ctagaaagcg | tgggtaaagg | agccgtccat | 300 |
| gacgttaaag | acgtccttga | ctcagtacta | tag        |            |            | 333 |

**SEQ ID NO: 2** (A5JHP2)

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atgaggttca | tgactctcct | cttctgaca  | gctctggcag | gagccctggt | ctgtgcctat | 60  |
| gatccagagg | ccgcctctgc | cccaggatcg | gggaaccata | aacaaatgga | ttgtttacag | 120 |
| ctacagaagc | ccccttcaga | gactgccaaa | tttctgtct  | catccaccaa | cctgcctaga | 180 |
| agagagaagc | tagtgcctc  | tgcaaaacct | ccccacacta | gggggctggt | ataa       | 234 |

**SEQ ID NO: 3** (A5JHP3)

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| atgaggttca | tgactctcct | cttctgaca  | gctctggcag | gagccctggt | ctgtgcctat | 60  |
| gatccagagg | ccgcctctgc | cccaggatcg | gggaaccctt | gccatgaagc | atcagcagct | 120 |
| caaaaggaaa | atgcaggtga | agaccaggg  | ttagccagac | aggcaccaa  | gccaaggaag | 180 |
| cagagatcca | gccttctgga | aaaaggccta | gacggagcaa | aaaaagctgt | ggggggactc | 240 |
| ggaaaactag | gaaaagatgc | agtcgaagat | ctagaaagcg | tgggtaaagg | tggggaagag | 300 |
| aggttggtct | ttggggctcc | tgtgaatcta | acctccatcc | ctctgacttc | tgtgagccgt | 360 |
| ccatga     |            |            |            |            |            | 366 |

**SEQ ID NO: 4** (signal peptide P81605)

|            |            |           |            |            |         |    |
|------------|------------|-----------|------------|------------|---------|----|
| atgaggttca | tgactctcct | cttctgaca | gctctggcag | gagccctggt | ctgtgcc | 57 |
|------------|------------|-----------|------------|------------|---------|----|

**SEQ ID NO: 5** (survival peptide P81605)

|            |            |            |            |            |            |    |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| tatgatccag | aggccgcctc | tgccccagga | tcggggaacc | cttgccatga | agcatcagca | 60 |
| gctcaaaagg | aaaatgcagg | tgaagacca  |            |            |            | 90 |

**SEQ ID NO: 6** (Dermcidine)

|            |            |            |            |            |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| tatgatccag | aggccgcctc | tgccccagga | tcggggaacc | cttgccatga | agcatcagca | 60  |
| gctcaaaagg | aaaatgcagg | tgaagacca  | gggttagcca | gacaggcacc | aaagccaagg | 120 |

aagcagagat ccagccttct ggaaaaaggc ctagacggag caaaaaaagc tgtgggggga 180  
 ctcgaaaaac taggaaaaga tgcagtcgaa gatctagaaa gcgtgggtaa aggagccgtc 240  
 catgacgtta aagacgctct tgactcagta ctatag 276

**SEQ ID NO: 7** (peptide 1)

gaaaatgcag gtgaagacc agggttagcc aga 33

**SEQ ID NO: 8** (peptide 2)

aaagctgtgg ggggactcgg aaaactagga aaagatgcag tcgaagatct agaaagcgtg 60  
 ggtaaaggag ccgctccatga cgtaaa 87

**SEQ ID NO: 9**

agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60  
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaa 120  
 gacgtccttg actcagta 137

**SEQ ID NO: 10**

agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60  
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaa 120  
 gacgtccttg actcagtact a 141

**SEQ ID NO: 11**(P81605)

10 20 30 40 50 60  
 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK  
 70 80 90 100 110  
 QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGAHV DVKDVLDVSL

**SEQ ID NO: 12** (A5JHP2)

10 20 30 40 50 60  
 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNHKQMDCLQ LQKPPSETAK FLSSSTNLPR  
 70  
 REKLVPSAKP PHTRGLV

**SEQ ID NO: 13** (A5JHP3)

10            20            30            40            50            60  
 MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK  
 70            80            90            100           110           120  
 QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGEE RLVFGAPVNL TSIPLTSVSR P

**SEQ ID NO: 14** (signal)

10  
 MRFMTLLFLT ALAGALVCA

**SEQ ID NO: 15** (survival peptide)

10            20            30  
 YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP

**SEQ ID NO: 16** (Dermcidine)

10            20            30            40            50            60  
 YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP GLARQAPKPRKQ RSSLLEKGLD GAKKAVGGLG  
 70            80            90  
 KLGKDAVEDL ESVGKGAVHD VKDVLDSVL

**SEQ ID NO: 17** (peptide 1)

10  
 ENAGEDPGLA R

**SEQ ID NO: 18** (peptide 2)

10            20  
 KAVGGLGKLG KDAVEDLESV GKGAVHDVK

**SEQ ID NO: 19** (Dermcidine) DCD-1

10            20            30            40  
 SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSV

**SEQ ID NO: 20** (Dermcidine) DCD-1L

10 20 30 40  
SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAHDV KDVLDLVL

PR 91371 .ST25.txt

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; L'OREAL

&lt;120&gt; Utilisation cosmétique de la Dermcidine, analogues ou fragments de celle-ci

&lt;130&gt; BR91371/KLP/HG/cf

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 333

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 1

```

atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat      60
gatccagagg cgcctctgc cccaggatcg ggaaccctt gccatgaagc atcagcagct      120
caaaaggaaa atgcaggtga agaccagggg ttagccagac aggcacaaa gccaaggaag      180
cagagatcca gccttctgga aaaaggccta gacggagcaa aaaaagctgt ggggggactc      240
ggaaaactag gaaaagatgc agtcgaagat ctagaaagcg tgggtaaagg agccgtccat      300
gacgttaaag acgtccttga ctcagtacta tag                                     333

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

```

atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat      60
gatccagagg cgcctctgc cccaggatcg ggaaccata aacaaatgga ttgtttacag      120
ctacagaagc ccccttcaga gactgcaaaa tttctgtcct catccaccaa cctgcctaga      180
agagagaagc tagtgcctc tgcaaacct cccacacta gggggctggt ataa           234

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 3

```

atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcctat      60
gatccagagg cgcctctgc cccaggatcg ggaaccctt gccatgaagc atcagcagct      120
caaaaggaaa atgcaggtga agaccagggg ttagccagac aggcacaaa gccaaggaag      180
cagagatcca gccttctgga aaaaggccta gacggagcaa aaaaagctgt ggggggactc      240
ggaaaactag gaaaagatgc agtcgaagat ctagaaagcg tgggtaaagg tggggaagag      300
aggttggtct ttggggctcc tgtgaatcta acctccatcc ctctgacttc tgtgagccgt      360
ccatga                                           366

```

PR 91371 .ST25.txt

<210> 4  
 <211> 57  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 4  
 atgaggttca tgactctcct cttcctgaca gctctggcag gagccctggt ctgtgcc 57  
  
 <210> 5  
 <211> 90  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 5  
 tatgatccag aggccgcctc tgccccagga tcggggaacc cttgcatga agcatcagca 60  
 gctcaaaagg aaaatgcagg tgaagacca 90  
  
 <210> 6  
 <211> 276  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 6  
 tatgatccag aggccgcctc tgccccagga tcggggaacc cttgcatga agcatcagca 60  
 gctcaaaagg aaaatgcagg tgaagacca gggttagcca gacaggcacc aaagccaagg 120  
 aagcagagat ccagccttct ggaaaaaggc ctagacggag caaaaaaagc tgtgggggga 180  
 ctcggaaaac taggaaaaga tgcagtcgaa gatctagaaa gcgtgggtaa aggagccgtc 240  
 catgacgtta aagacgtcct tgactcagta ctatag 276  
  
 <210> 7  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 7  
 gaaaatgcag gtgaagaccc agggttagcc aga 33  
  
 <210> 8  
 <211> 87  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 8  
 aaagctgtgg ggggactcgg aaaactagga aaagatgcag tcgaagatct agaaagcgtg 60  
 ggtaaaggag ccgtccatga cgtaaa 87  
  
 <210> 9  
 <211> 138  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 9  
 agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60  
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120  
 gacgtccttg actcagta 138

PR 91371 .ST25.txt

<210> 10  
 <211> 141  
 <212> DNA  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 10  
 agccttctgg aaaaaggcct agacggagca aaaaaagctg tggggggact cggaaaacta 60  
 ggaaaagatg cagtcgaaga tctagaaagc gtgggtaaag gagccgtcca tgacgttaaa 120  
 gacgtccttg actcagtact a 141

<210> 11  
 <211> 110  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 11  
 Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn  
 20 25 30  
 Pro Cys His Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp  
 35 40 45  
 Pro Gly Leu Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser  
 50 55 60  
 Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys  
 85 90 95  
 Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu  
 100 105 110

<210> 12  
 <211> 77  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
  
 <400> 12  
 Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu  
 1 5 10 15  
 Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn  
 20 25 30  
 His Lys Gln Met Asp Cys Leu Gln Leu Gln Lys Pro Pro Ser Glu Thr  
 35 40 45  
 Ala Lys Phe Leu Ser Ser Ser Thr Asn Leu Pro Arg Arg Glu Lys Leu

50 PR 91371 .ST25.txt  
55 60

Val Pro Ser Ala Lys Pro Pro His Thr Arg Gly Leu Val  
65 70 75

<210> 13  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 13

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu  
1 5 10 15

Val Cys Ala Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn  
20 25 30

Pro Cys His Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp  
35 40 45

Pro Gly Leu Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser  
50 55 60

Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu  
65 70 75 80

Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys  
85 90 95

Gly Gly Glu Glu Arg Leu Val Phe Gly Ala Pro Val Asn Leu Thr Ser  
100 105 110

Ile Pro Leu Thr Ser Val Ser Arg Pro  
115 120

<210> 14  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 14

Met Arg Phe Met Thr Leu Leu Phe Leu Thr Ala Leu Ala Gly Ala Leu  
1 5 10 15

Val Cys Ala

<210> 15  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 15

Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn Pro Cys His  
Page 4

1 5 PR 91371 .ST25.txt 15  
10

Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro  
20 25 30

<210> 16  
<211> 91  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 16

Tyr Asp Pro Glu Ala Ala Ser Ala Pro Gly Ser Gly Asn Pro Cys His  
1 5 10 15

Glu Ala Ser Ala Ala Gln Lys Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro Gly Leu  
20 25 30

Ala Arg Gln Ala Pro Lys Pro Arg Lys Gln Arg Ser Ser Leu Leu Glu  
35 40 45

Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly Gly Leu Gly Lys Leu  
50 55 60

Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val Gly Lys Gly Ala Val  
65 70 75 80

His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu  
85 90

<210> 17  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 17

Glu Asn Ala Gly Glu Asp Pro Gly Leu Ala Arg  
1 5 10

<210> 18  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

<400> 18

Lys Ala Val Gly Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp  
1 5 10 15

Leu Glu Ser Val Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys  
20 25

<210> 19  
<211> 47  
<212> PRT  
<213> Homo Sapiens

PR 91371 .ST25.txt

&lt;400&gt; 19

Ser Ser Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val  
 20 25 30

Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val  
 35 40 45

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 48

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 20

Ser Ser Leu Leu Glu Lys Gly Leu Asp Gly Ala Lys Lys Ala Val Gly  
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Lys Leu Gly Lys Asp Ala Val Glu Asp Leu Glu Ser Val  
 20 25 30

Gly Lys Gly Ala Val His Asp Val Lys Asp Val Leu Asp Ser Val Leu  
 35 40 45



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

FA 743940  
FR 1057690

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                 |   | Revendication(s)<br>concernée(s)                         | Classement attribué<br>à l'invention par l'INPI  |
|---|---|--|--|
| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes  |  |  |
| X   | FR 2 924 946 A1 (OREAL [FR])<br>19 juin 2009 (2009-06-19)<br>* page 1, ligne 1 - ligne 10 *<br>* page 3, ligne 13 - page 4, ligne 8 *<br>* page 5, ligne 1 - page 6, ligne 6 *<br>* page 13, ligne 12 - ligne 19 *<br>* page 14, ligne 14 - ligne 28 *<br>* page 15, ligne 19 - ligne 23 *<br>* page 18, ligne 16 - ligne 21 *<br>* page 19, ligne 3 - page 20, ligne 23 *<br>* page 21, ligne 11 - page 22, ligne 11 *<br>* revendications 1-3,8,10-16 *<br>* séquence 2 * | 1-15   | G01N33/68<br>C12Q1/68<br>A61K8/64<br>A61K8/73<br>A61K8/60<br>A61Q19/08<br>C12N5/02<br>C07K14/47<br>C12N15/12 |
| X   | US 5 834 192 A (AKERBLOM INGRID ERIKA [US]<br>ET AL) 10 novembre 1998 (1998-11-10)<br>* colonne 1, ligne 60 - ligne 65 *<br>* colonne 3, ligne 13 - ligne 18 *<br>* colonne 16, ligne 13 - ligne 41 *<br>* exemple XI *<br>* séquence 2 *   | 5,13   | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHÉS (IPC)  |
| X   | EP 2 206 493 A1 (OREAL [FR])<br>14 juillet 2010 (2010-07-14)<br>* alinéas [0001], [0012], [0015],<br>[0023] - [0027], [0043] - [0045], [0053]<br>*<br>* exemples 1,2 *<br>* revendications 1,3,7,11-15 *  | 8,9,12,<br>14  | A61K<br>A61Q<br>C07K<br>G01N   |
| -----<br>-/--   |   |  |  |
| Date d'achèvement de la recherche                     |   | Examineur  |  |
| 23 mars 2011  |   | Adida, Anne  |  |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS                         |   | T : théorie ou principe à la base de l'invention         |  |
| X : particulièrement pertinent à lui seul             |   | E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure |  |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un |   | à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date |  |
| autre document de la même catégorie                   |   | de dépôt ou qu'à une date postérieure.                   |  |
| A : arrière-plan technologique                        |   | D : cité dans la demande                                 |  |
| O : divulgation non-écrite                            |   | L : cité pour d'autres raisons                           |  |
| P : document intercalaire                             |   | .....  |  |
|   |   | & : membre de la même famille, document correspondant    |  |

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement national

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

FA 743940  
FR 1057690

| 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   | <p>GUENICHE A ET AL: "Probiotic lysate applied to skin: in vitro evidences of beneficial effects of Bifidobacterium longum sp on sensitive skin and aging", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 129, no. Suppl. 2, septembre 2009 (2009-09), page S64, XP002628492,<br/>&amp; 39TH ANNUAL MEETING OF THE EUROPEAN-SOCIETY-FOR-DERMATOLOGICAL-RESEARCH; BUDAPEST, HUNGARY; SEPTEMBER 09 -12, 2009<br/>ISSN: 0022-202X<br/>* abrégé *</p> | 8,14   | <p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</p>  |
| X   | <p>GUÉNICHE AUDREY ET AL: "Bifidobacterium longum lysate, a new ingredient for reactive skin.", EXPERIMENTAL DERMATOLOGY AUG 2010 LNKD-PUBMED:19624730, vol. 19, no. 8, août 2010 (2010-08), pages E1-E8, XP002628493,<br/>ISSN: 1600-0625<br/>* abrégé *<br/>* alinéa [Discussion] *</p>  | 8,14   |  |
| X   | <p>US 6 927 031 B2 (LU HENRY [US] ET AL) 9 août 2005 (2005-08-09)<br/>* colonne 3, ligne 38 - ligne 40 *<br/>* colonne 16, ligne 22 - ligne 29 *<br/>* tableau 1 *<br/>* séquence 7 *</p> <p style="text-align: center;">-----<br/>-/--</p>  | 16,17  |  |
| Date d'achèvement de la recherche   |  | Examineur  |  |
| 23 mars 2011  |  | Adida, Anne  |  |
| <p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul<br/>Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie<br/>A : arrière-plan technologique<br/>O : divulgation non-écrite<br/>P : document intercalaire</p> |  | <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention<br/>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.<br/>D : cité dans la demande<br/>L : cité pour d'autres raisons<br/>.....<br/>&amp; : membre de la même famille, document correspondant</p> |  |

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

FA 743940  
FR 1057690

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS                 |   | Revendication(s)<br>concernée(s)                         | Classement attribué<br>à l'invention par l'INPI |
|---|---|--|---|
| Catégorie   | Citation du document avec indication, en cas de besoin,<br>des parties pertinentes  |  |   |
| A   | GUENICHE A ET AL: "Reactive Skin:<br>Clinical efficacy of a probiotic lysate is<br>associated with specific changes in<br>stratum corneum protein pattern",<br>JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY,<br>vol. 129, no. Suppl. 2,<br>septembre 2009 (2009-09), page S29,<br>XP002628494,<br>& 39TH ANNUAL MEETING OF THE<br>EUROPEAN-SOCIETY-FOR-DERMATOLOGICAL-RESEA<br>RCH; BUDAPEST, HUNGARY; SEPTEMBER 09 -12,<br>2009<br>ISSN: 0022-202X<br>* abrégé * | 1-16   |   |
| A,D   | US 2008/020976 A1 (GARBE CLAUS [DE] ET AL)<br>24 janvier 2008 (2008-01-24)<br>* le document en entier *<br>-----  | 1-16   |   |
|   |   |  | DOMAINES TECHNIQUES<br>RECHERCHÉS (IPC)         |
|   |   |  |   |
| Date d'achèvement de la recherche                     |   | Examineur  |   |
| 23 mars 2011  |   | Adida, Anne  |   |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS                         |   | T : théorie ou principe à la base de l'invention         |   |
| X : particulièrement pertinent à lui seul             |   | E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure |   |
| Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un |   | à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date |   |
| autre document de la même catégorie                   |   | de dépôt ou qu'à une date postérieure.                   |   |
| A : arrière-plan technologique                        |   | D : cité dans la demande                                 |   |
| O : divulgation non-écrite                            |   | L : cité pour d'autres raisons                           |   |
| P : document intercalaire                             |   | .....  |   |
|   |   | & : membre de la même famille, document correspondant    |   |

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 2

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1057690 FA 743940**

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 **23-03-2011**

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<br>au rapport de recherche |    | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) |               | Date de<br>publication |
|---|----|------------------------|---|---------------|------------------------|
| FR 2924946                                      | A1 | 19-06-2009             | EP                                      | 2224902 A1    | 08-09-2010             |
|   |    |                        | WO                                      | 2009077995 A1 | 25-06-2009             |
| -----   |    |                        |   |               |                        |
| US 5834192                                      | A  | 10-11-1998             | AU                                      | 2557997 A     | 29-10-1997             |
|   |    |                        | CA                                      | 2250868 A1    | 16-10-1997             |
|   |    |                        | EP                                      | 0891424 A1    | 20-01-1999             |
|   |    |                        | JP                                      | 2000509970 T  | 08-08-2000             |
|   |    |                        | WO                                      | 9738100 A1    | 16-10-1997             |
| -----   |    |                        |   |               |                        |
| EP 2206493                                      | A1 | 14-07-2010             | CN                                      | 101810558 A   | 25-08-2010             |
|   |    |                        | FR                                      | 2940908 A1    | 16-07-2010             |
|   |    |                        | JP                                      | 2010168379 A  | 05-08-2010             |
|   |    |                        | KR                                      | 20100083100 A | 21-07-2010             |
|   |    |                        | US                                      | 2010203094 A1 | 12-08-2010             |
| -----   |    |                        |   |               |                        |
| US 6927031                                      | B2 | 09-08-2005             | AU                                      | 2003220322 A1 | 27-10-2003             |
|   |    |                        | WO                                      | 03087138 A2   | 23-10-2003             |
|   |    |                        | US                                      | 2003194712 A1 | 16-10-2003             |
| -----   |    |                        |   |               |                        |
| US 2008020976                                   | A1 | 24-01-2008             | AT                                      | 323722 T      | 15-05-2006             |
|   |    |                        | AU                                      | 2002345804 A1 | 23-12-2002             |
|   |    |                        | DE                                      | 10129983 A1   | 30-01-2003             |
|   |    |                        | WO                                      | 02100895 A2   | 19-12-2002             |
|   |    |                        | EP                                      | 1397384 A2    | 17-03-2004             |
| -----   |    |                        |   |               |                        |