

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

①1 N° de publication : **2 877 672**  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **04 12001**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : C 12 N 5/02 (2006.01), C 12 N 5/08, C 12 Q 1/02,  
A 01 N 1/02

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 10.11.04.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 12.05.06 Bulletin 06/19.

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) : REGNIER MARCELLE et TREM-  
BLAYE CLAIRE.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤4 UTILISATION DU PTU POUR FAVORISER LA CULTURE IN VITRO DE MELANOCYTES, EN PARTICULIER DE  
MELANOCYTES FORTEMENT PIGMENTES.

⑤7 L'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, pour favoriser la multiplication in vitro de mélanocytes humains et/ou leur congélation.

En particulier, l'invention concerne l'utilisation d'au moins un de ces composés pour favoriser la multiplication in vitro de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V, ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, et par là-même l'obtention de banques de mélanocytes, co-cultures et épidermes reconstruits et/ou peaux reconstruites fortement pigmentés.

Ces cultures de mélanocytes et/ou co-cultures et/ou épidermes reconstruits pigmentés seront notamment destinés à l'étude des désordres de la pigmentation, au criblage d'actifs cosmétiques ou dermatologiques, ou au traitement des lésions de la peau, notamment chez les sujets de phototype élevé.

FR 2 877 672 - A1



La présente invention a pour domaine technique l'ingénierie cellulaire et tissulaire des mélanocytes, en particulier des mélanocytes issus de sujets de phototypes IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires.

5

L'invention concerne notamment l'utilisation d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges pour favoriser la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains et/ou leur congélation, et par là-même l'utilisation desdits mélanocytes pour l'obtention de co-cultures (ex : mélanocytes-kératinocytes) ou d'épidermes et/ou de peaux reconstruites.

10

En particulier, l'invention porte sur l'utilisation du PTU pour favoriser la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V, ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, ainsi que sur des procédés d'obtention de banques de mélanocytes, de co-cultures et d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites, destinés notamment à l'étude des désordres de la pigmentation, au criblage d'actifs (ex : dépigmentants) ou au traitement des lésions de la peau, en particulier chez des sujets de phototype élevé dits 'fortement pigmentés'. L'invention porte encore sur les kits de production correspondants.

20

Les phototypes de peau sont définis par la classification de Fitzpatrick qui repose sur la réactivité de la peau aux effets du rayonnement solaire :

- I brûle toujours, ne bronze jamais
- II brûle toujours, bronze peu
- 25 III brûle modérément, bronze progressivement
- IV brûle faiblement, bronze très facilement
- V brûle rarement, bronze intensément
- VI ne brûle jamais, fortement pigmenté

30 L'invention s'intéresse particulièrement aux mélanocytes issus de sujets phototypes IV, V ou VI ou issus de lésions hyperpigmentaires, décrits selon l'invention comme 'mélanocytes fortement pigmentés'. On parlera également dans le reste de l'invention d'épidermes et/ou de peaux fortement pigmentés.

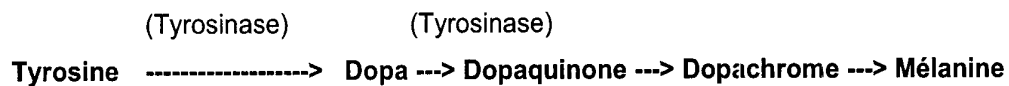
Ces phototypes IV, V et VI correspondent notamment aux phototypes des populations d'origine ethnique africaine, maghrébine, indienne, asiatique (ex : chinoise, coréenne, japonaise, indonésienne), et afro-américaine. Certains sujets d'origine caucasienne ont également un phototype élevé (IV).

35

Les lésions hyperpigmentaires qui se caractérisent par la présence de mélanocytes fortement pigmentés, peuvent par contre affecter des sujets de tout phototype.

5 La couleur de la peau humaine est fonction de différents facteurs et notamment des saisons de l'année, de l'origine ethnique et du sexe; elle est principalement déterminée par la nature et la concentration de mélanine produite par les mélanocytes.

10 Les mélanocytes sont les cellules spécialisées qui, par l'intermédiaire d'organelles particuliers, les mélanosomes, synthétisent la mélanine, selon le schéma suivant :



15 Les différences de couleur de peau entre les individus sont dues au nombre, à la taille, au type, à la distribution et à la dégradation des mélanosomes, ainsi qu'à l'activité de la tyrosinase. Le nombre des mélanosomes est approximativement le même entre tous les individus. Cependant, les phototypes clairs I à III (Caucasiens) synthétisent des eumélanosomes et des phéomélanosomes, alors que les individus Négroïdes synthétisent majoritairement des eumélanosomes. De plus, l'activité de la tyrosinase est  
20 plus importante dans la peau négroïde que dans la peau caucasienne.

Les facteurs environnementaux jouent également un rôle important dans la coloration de la peau. Ainsi, il est connu que le rayonnement solaire est susceptible d'induire une néomélanogénèse qui conduit au brunissement de la peau (bronzage) mais aussi des  
25 désordres pigmentaires (ex : tâches hyperpigmentées). Ce brunissement peut être une gêne esthétique, en particulier pour certaines populations asiatiques.

30 Les peaux dites 'fortement pigmentées' ou à phototype élevé selon l'invention correspondent notamment aux populations d'origine africaine, maghrébine, indienne, asiatique (ex : chinoise, coréenne, japonaise, indonésienne), et afro-américaine, qui suscitent un intérêt scientifique croissant pour l'acquisition de nouvelles connaissances et le développement de produits cosmétiques et dermatologiques adaptés à ces phototypes élevés.

35 Par ailleurs, les lésions hyperpigmentaires, qui peuvent affecter des sujets de tout phototype, constituent également un domaine de recherche important pour la compréhension des mécanismes en lien avec ces désordres hyperpigmentaires et le développement de traitements adaptés.

Il existe donc un besoin de développer de nouveaux modèles cellulaires et tissulaires contenant des mélanocytes, en particulier des mélanocytes 'fortement pigmentés' issus de sujet de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, utilisables comme  
5 modèles d'étude pour la recherche de nouveaux actifs cosmétiques et dermatologiques, pour l'étude des désordres hyperpigmentaires, ou destinés notamment à traiter des lésions de la peau (ex : brûlures, excision, nevus, tatouage, désordres de la pigmentation liés à une affection dermatologique...), en particulier chez les sujets de phototypes élevés.

10

Mais l'on connaît les difficultés de la culture *in vitro* des mélanocytes, type cellulaire, minoritaire (1/35<sup>e</sup> du nombre de kératinocytes, et répliation lente) et de viabilité faible, notamment pour les mélanocytes fortement pigmentés.

15 Or la Demanderesse vient de mettre en évidence, de façon inattendue, que l'utilisation du 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée PTU (ex : 10µM) sur des mélanocytes de phototype VI (africains) en culture permettait de :

- favoriser la multiplication *in vitro* des mélanocytes africains ; le PTU est même capable de stimuler la multiplication *in vitro* des mélanocytes africains d'un facteur  
20 2 à 10 par rapport à des mélanocytes non traités au PTU ; et
- favoriser la congélation, décongélation et remise en culture des mélanocytes africains en maintenant et/ou en augmentant leur pourcentage de viabilité (par exemple d'un facteur 10 à 20 par rapport à des mélanocytes non traités au PTU) et en maintenant leur fonctionnalité, c'est-à-dire leur capacité à proliférer, à  
25 produire de la mélanine et à s'intégrer dans un épiderme reconstruit.

On connaît de l'art antérieur l'utilisation des phénylthiourées, thiourées et dérivés mono ou dioxydés en tant que dépigmentants dans des compositions cosmétiques ou  
30 pharmaceutiques, comme décrit notamment dans les demandes WO2004/032912 et WO01/64206.

Mais à la connaissance de la Demanderesse, il n'a jamais été décrit ni suggéré l'utilisation d'un agent dépigmentant et en particulier celle du 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-  
35 thiourée (PTU) pour favoriser la multiplication *in vitro* des mélanocytes et/ou leur congélation, en particulier des mélanocytes fortement pigmentés.

L'invention concerne donc l'utilisation d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges pour favoriser la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains et/ou leur congélation.

5

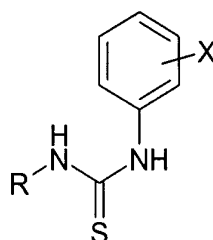
En particulier le composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges est destiné à favoriser la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires.

10 Les mélanocytes humains utilisés selon l'invention, pourront être, pour un phototype donné, issus de prélèvements à partir d'un ou plusieurs sujets. De préférence, lesdits sujets seront de même origine ethnique mais ils peuvent également être d'origine ethniques différentes et avoir le même phototype.

Les prélèvements seront généralement effectués à partir d'un même site anatomique, 15 mais ils peuvent également être effectués à partir de sites anatomiques différents. Et selon une alternative, on pourra choisir des sujets de même âge ou des sujets d'âges différents.

Pour le cas des sujets atteints de lésions hyperpigmentaires, les mélanocytes pourront 20 être prélevés à partir des zones saines du sujet en vue du traitement desdites lésions, ou directement à partir des zones lésées en vue d'approfondir les connaissances sur les désordres hyperpigmentaires.

25 Par 'analogue de PTU' selon l'invention, on entend notamment un composé choisi parmi les thiourées, leurs dérivés phényl-, mono- ou dioxydés et les composés de formule générale (I)



avec

30 - X représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 linéaire ou ramifié ou un halogène ou un radical cyano ou un radical -OR' ou C:OOR' dans lesquels R' représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4, et

- R représente un atome d'hydrogène ou un groupe aromatique substitué ou non par des groupes équivalents à X.

En particulier, on utilisera un composé de formule (I) avec X représente un atome d'hydrogène et R représente un groupe 2-thiazolyle, c'est-à-dire le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU).

Comme exemples de dérivés mono- ou dioxydés de thiourée, on peut citer ceux décrits dans la demande WO2004/032912 et comme exemples de dérivés phénylthiourées, on peut citer ceux décrits dans la demande WO01/64206.

Par 'mimétique de PTU' selon l'invention, on entend notamment un composé choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol, tout autre inhibiteur de tyrosinase ou tout agent capable d'inhiber la production de mélanine, quel que soit le mécanisme impliqué (ex : action au niveau des enzymes de la production de mélanine et/ou au niveau du transfert des mélanosomes).

20

Le composé PTU, analogue ou mimétique du PTU sera utilisé en culture *in vitro* selon l'invention à une quantité efficace et non cytotoxique, c'est-à-dire à une quantité capable de favoriser la multiplication *in vitro* des mélanocytes sans affecter leur viabilité.

25 En particulier, cette quantité efficace et non cytotoxique de PTU, analogue ou mimétique de PTU pourra être déterminée selon le procédé suivant :

- a) on applique sur des mélanocytes en culture un composé (ex : PTU) à différentes quantités ; les mélanocytes sont de préférence des mélanocytes de phototype IV, V ou VI ;
- 30 b) on évalue la cytotoxicité des différentes quantités de PTU sur les mélanocytes en culture en déterminant le pourcentage de cellules adhérentes au support de culture par rapport à un témoin (en absence de PTU) et on sélectionne les quantités de PTU pour lesquelles le pourcentage de cellules adhérentes au support de culture n'est pas ou peu diminué par rapport au témoin, voire même  
35 augmenté par rapport à un témoin; en particulier le pourcentage de cellules adhérentes au support de culture sera supérieur ou égal à 60%,

préférentiellement supérieur ou égal à 70% et encore plus préférentiellement supérieur ou égal à 80% ;

- 5 c) on évalue l'efficacité des quantités non cytotoxiques de PTU sélectionnées en b) sur la prolifération des mélanocytes en culture en quantifiant le nombre de cellules obtenues après chaque passage par rapport à un témoin (en absence de PTU) et on sélectionne les quantités de PTU pour lesquelles on obtient une augmentation de la multiplication desdits mélanocytes à chaque passage par rapport au témoin ; en particulier on sélectionne les quantités de PTU capables de stimuler la multiplication des mélanocytes en culture d'un facteur 2 à 10 par rapport au
- 10 témoin.

De préférence, une telle quantité efficace et non cytotoxique d'un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, est inférieure à la concentration dudit composé nécessaire à l'inhibition de 50% de la synthèse de mélanine (IC50), de préférence la quantité efficace sera comprise entre IC50/1,5 et IC50/10.

15

En particulier, la quantité efficace et non cytotoxique de PTU selon l'invention pourra aller de 2µM à 40µM, de préférence de 2µM à 20µM. On pourra par exemple utiliser une concentration de PTU égale à 2µM, 5µM, 10µM, 15µM ou 20µM.

20

Le composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, est présent dans la culture *in vitro* selon l'invention à une quantité efficace et non cytotoxique capable de stimuler la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains, en particulier de phototype IV, V ou VI, d'un facteur 2 à 10 par rapport à des mélanocytes humains non traités.

25

La Demanderesse a en effet pu montrer que l'ajout d'une concentration de 5µM ou 10µM de PTU au passage 2/3 de mélanocytes humains africains en culture, est capable de stimuler d'un facteur 5 au passage 8 et d'un facteur 15 au passage 9 la multiplication des mélanocytes humains africains par rapport à des mélanocytes humains africains non traités, qui eux se multiplient de façon constante d'un facteur 2 à chaque passage. Ces passages correspondent à une étape de trypsinisation et de remise en culture des mélanocytes arrivés à confluence.

30

Cette quantité de PTU pourra être ajoutée lors d'un passage de culture (ex : étape de trypsinisation et remise en culture), mais également à tout moment lors de la culture des mélanocytes.

35

L'utilisation *in vitro* d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges est également destinée à maintenir et/ou augmenter le pourcentage de viabilité des mélanocytes humains, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, après congélation, décongélation et remise en culture.

En particulier, le composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, mis en contact en une quantité efficace avec les mélanocytes humains avant congélation, est capable d'augmenter le pourcentage de viabilité des mélanocytes humains, notamment fortement pigmentés, après décongélation et remise en culture, d'un facteur 10 à 100, en particulier d'un facteur 10 à 20, par rapport au pourcentage de viabilité des mélanocytes humains non traités.

En particulier, la viabilité des mélanocytes fortement pigmentés (ex : africains) traités par une quantité efficace et non cytotoxique de PTU, par exemple une concentration de 5µM ou 10µM, sera d'au moins 50% et préférentiellement d'au moins 70%. En particulier, elle est de 80% avec PTU 10µM, comparativement à la viabilité de mélanocytes africains non traités qui n'est que de 5% après décongélation et remise en culture.

L'utilisation *in vitro* d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges en une quantité efficace et non cytotoxique capable de (i) stimuler la multiplication *in vitro* des mélanocytes humains, en particulier des mélanocytes fortement pigmentés et (ii) de maintenir et/ou augmenter leur pourcentage de viabilité après congélation, décongélation et remise en culture, pourra avantageusement être utilisée dans des procédés d'obtention de cultures de cellules ou banques de cellules, de co-cultures (ex : mélanocytes-kératinocytes) et/ou des procédés d'obtention de modèles organotypiques de peau, en particulier fortement pigmentés.

L'invention porte donc également sur l'utilisation d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, dans un procédé destiné à l'obtention de cultures de mélanocytes ou de

banques de mélanocytes humains, en particulier de cultures de mélanocytes ou de banques de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires.

5 Ces banques de mélanocytes pourront être des banques primaires ou des banques secondaires de mélanocytes.

Par 'culture de mélanocytes' selon l'invention, on entend notamment une préparation de mélanocytes issus d'un tissu natif, cultivés *in vitro* et maintenus vivants dans des conditions artificielles (*ex vivo, in vitro*), en présence de PTU.

10

Par 'banque de mélanocytes' selon l'invention, on entend notamment une préparation de mélanocytes conservée en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules pourront par exemple être congelées et conservées sous la forme d'aliquots. Les cellules peuvent provenir de tissus natifs de tout phototype et être soit directement stockées en présence de PTU, par exemple sous forme congelée, soit multipliées *in vitro* en présence de PTU avant d'être stockées, soit être stockées en l'absence de PTU et mises en présence de PTU après décongélation.

15

Avantageusement, les mélanocytes issus de sujets de phototype élevé IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires seront mis en présence de PTU avant et/ou pendant la congélation.

20

Les mélanocytes de phototype clair pourront être directement stockés en absence de PTU et multipliés en présence de PTU après décongélation.

Par 'banque primaire de mélanocytes', on entend une banque de mélanocytes obtenue après un cycle comprenant une étape de multiplication et une étape de congélation.

25

Par 'banque secondaire de mélanocytes', on entend une banque de mélanocytes obtenue après au moins 2 cycles successifs de multiplication-congélation.

30 La préparation d'une culture ou d'une banque de mélanocytes humains, en particulier fortement pigmentés, pourra par exemple consister en:

a) une étape de préparation des mélanocytes humains issus de sujets de tout phototype, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires;

35 b) une étape de multiplication des mélanocytes dans un milieu de culture adapté à la culture de mélanocytes, en présence ou en absence d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un

mimétique de PTU et leurs mélanges (obtention d'une culture primaire de mélanocytes);

- 5 c) éventuellement une étape de congélation desdits mélanocytes (obtention d'une banque primaire de mélanocytes), en présence ou en absence d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, en vue d'une utilisation ultérieure ;
- 10 d) éventuellement une étape de multiplication secondaire, en présence d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, suivie d'une étape de congélation (obtention d'une banque secondaire de mélanocytes).

15 Dans le cas de mélanocytes issus de sujets de phototype élevé IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, l'étape de multiplication b) sera avantageusement réalisée en présence d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges.

20 Selon un mode particulier, le PTU, un analogue et/ou un mimétique de PTU pourra être ajouté dès l'étape a) de préparation desdits mélanocytes humains.

L'étape a) de préparation des mélanocytes humains pourra comprendre les étapes suivantes:

- 25 - prélèvement d'un tissu de peau à partir de sujets de même phototype, choisi parmi les phototypes I à VI, en particulier IV à VI ; ou prélèvement d'un tissu de peau à partir de lésions hyperpigmentaires;
- séparation de l'épiderme du derme, par exemple par trypsination ;
- centrifugation et reprise des cellules (mélanocytes et kératinocytes) par exemple dans du sérum de veau fœtal ;
- 30 - ensemencement à une densité de  $12 \text{ à } 15 \times 10^6$  cellules par flasque de  $75 \text{ cm}^2$ , dans du milieu adapté à la culture de mélanocytes (ex : M2, Promocell), en présence ou en absence de PTU  $10 \mu\text{M}$  par exemple ;
- purification des mélanocytes par détachement du support, par exemple en présence de trypsine-EDTA, et reprise dans un volume équivalent de milieu de culture pour mélanocytes (ex : M2, Promocell), en présence ou en absence de
- 35 PTU  $10 \mu\text{M}$  par exemple;

- ensemencement desdits mélanocytes à une densité de  $10^6$  cellules par flasque de  $75\text{cm}^2$ , dans du milieu de culture pour mélanocytes (ex : M2, Promocell), en présence de ou en absence de PTU  $10\mu\text{M}$  par exemple.

On obtient ainsi une culture primaire de mélanocytes humains par exemple de phototype VI (africain), où les mélanocytes sont viables à 80%, c'est-à-dire que 80% des mélanocytes adhèrent au flasque ou support de culture.

Pour un phototype donné, les mélanocytes pourront être issus de prélèvements à partir d'un ou plusieurs sujets. De préférence, lesdits sujets seront de même origine ethnique mais ils peuvent également être d'origine ethniques différentes et avoir le même phototype. Les prélèvements seront généralement effectués à partir d'un même site anatomique, mais ils peuvent également être effectués à partir de sites anatomiques différents. Et selon une alternative, on pourra choisir des sujets de même âge ou des sujets d'âges différents.

L'étape **b)** de multiplication des mélanocytes pourra être réalisée dans un milieu de culture pour mélanocytes, en présence ou en absence de PTU, d'un analogue ou d'un mimétique de PTU.

Dans le cas de mélanocytes issus de sujets de phototype élevé IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, l'étape de multiplication **b)** sera avantageusement réalisée en présence d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges.

On pourra par exemple ajouter du PTU à une concentration allant de 2 à  $40\mu\text{M}$ , de préférence allant de 2 à  $20\mu\text{M}$  et en particulier une concentration de  $2\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  ou  $15\mu\text{M}$ , ce traitement étant poursuivi pendant toute la durée de l'étape de multiplication desdits mélanocytes.

Ledit milieu adapté à la culture de mélanocytes pourra notamment contenir du FGF humain, de l'hydrocortisone, de l'insuline bovine et des antibiotiques ou tout autre facteur de croissance et de différenciation compatible avec la survie des mélanocytes. De préférence, on utilisera le milieu M2 de Promocell (référence C24300).

Enfin, l'étape **c)** de congélation peut consister par exemple à :

- centrifuger les mélanocytes préalablement multipliés en présence ou non de PTU et resuspendre le culot, par exemple dans du sérum de veau fœtal + DMSO 10% pour obtenir une concentration de  $10^6$  cellules/ml ;
- congeler lesdits mélanocytes dans des cryotubes à  $-1^\circ\text{C}$  par min jusqu'à  $-80^\circ\text{C}$  ;
- après 24h, mettre ces tubes à  $-196^\circ\text{C}$  dans l'azote liquide ;

Ces mélanocytes pourront être ainsi conservés sous une forme congelée (ex : banque congelée) en vue d'une utilisation ultérieure.

Dans le cas de mélanocytes issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, l'étape de congélation c) sera avantageusement réalisée en présence  
5 d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges.

Lors de l'utilisation ultérieure, les tubes congelés pourront être mis au bain marie à 37°C pendant un temps très court (décongélation) et leur contenu remis en culture dans un  
10 milieu adapté à la culture de mélanocytes humains, tel que défini précédemment.

L'invention couvre encore un kit de production d'une banque de mélanocytes humains, en particulier d'une banque de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V  
15 ou VI ou de lésions hyperpigmentaires comprenant (i) une préparation de mélanocytes humains, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires et (ii) un milieu de culture pour mélanocytes additionné d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges.

20 En particulier, le milieu de culture pour mélanocytes contiendra au moins des facteurs de croissance (ex : FGF), des antibiotiques ou antifongiques (amphotéricin B, gentamycin), de l'insuline, de l'hydrocortisone, pourra contenir ou non du sérum, et être additionné selon l'invention de PTU à une concentration pouvant aller de 2 à 40µM, de préférence de 2 à 20µM, et en particulier une concentration de PTU égale à 5µM, 10µM ou 15µM.

25 Fait également partie de l'invention une banque congelée de mélanocytes humains issus de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires obtenue selon le procédé décrit ci-dessus.

En particulier, ladite banque est caractérisée en ce que lesdits mélanocytes de phototype  
30 IV, V ou VI présentent après décongélation et remise en culture un pourcentage de viabilité augmenté d'un facteur 10 à 100, en particulier d'un facteur entre 10 et 20 par rapport au pourcentage de viabilité de mélanocytes non traités.

Le pourcentage de viabilité de mélanocytes fortement pigmentés (ex : africains) traités  
35 par une quantité efficace et non cytotoxique de PTU de 5µM ou 10µM, pourra être par exemple d'au moins 50% et préférentiellement d'au moins 70%. En particulier, le pourcentage de viabilité des mélanocytes pigmentés (ex : africains) traités au PTU 10µM

sera de 80%, comparativement au pourcentage de viabilité des mélanocytes non traités qui n'est que de 5% après décongélation et remise en culture.

5 Ce pourcentage de viabilité est déterminé par le pourcentage de cellules adhérentes au support de culture, ou par toute autre technique connue, telle que par exemple la coloration au bleu trypan, qui colore les cellules non adhérentes.

10 Ces cultures de mélanocytes humains, ou ces banques de mélanocytes humains, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires, peuvent être utilisées dans le cadre d'études destinées à compléter les connaissances sur la biologie et la physiologie des mélanocytes fortement pigmentés en condition normale, de stress (UV...) ou pathologique (ex : désordres hyperpigmentaires de type lentigines, melasma, nevi...).

15 De telles cultures de mélanocytes humains ou banques de mélanocytes humains, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI, peuvent également être utilisées dans des tests d'évaluation et/ou de criblage d'actifs cosmétiques (ex : dépigmentants) ou pharmaceutiques.

20 Ces cultures de mélanocytes humains ou banques de mélanocytes humains pourront encore être avantageusement utilisées pour la préparation de co-cultures comprenant au moins des mélanocytes et des kératinocytes, ou pour la préparation d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites en particulier fortement pigmentés, destinés eux-mêmes au criblage d'actifs ou encore au traitement de lésions de la peau, notamment chez les sujets de phototypes élevés.

25 L'invention porte également sur l'utilisation (i) d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges, ou (ii) de mélanocytes humains préalablement multipliés en présence de PTU, dans un procédé destiné à l'obtention de co-cultures (ex : co-culture kératinocytes-mélanocytes), ou à l'obtention d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites, en particulier de phototype IV, V ou VI.

30 De préférence, on utilisera directement les mélanocytes humains préalablement multipliés en présence de PTU dans un procédé destiné à l'obtention de co-cultures de mélanocytes et de kératinocytes, ou à l'obtention d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites, en particulier de phototype IV, V ou VI.

35

En particulier, l'invention concerne l'utilisation de mélanocytes humains fortement pigmentés issus de sujets de phototype IV, V ou VI multipliés en présence de PTU, dans un procédé destiné à l'obtention de co-cultures de mélanocytes et kératinocytes, ou d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites fortement pigmentés.

5

Les co-cultures de mélanocytes et de kératinocytes sont obtenues selon les méthodes classiques. En particulier, la co-culture contiendra des kératinocytes et des mélanocytes dans une proportion de 10 pour 1, plus particulièrement de 3 pour 1.

- 10 Ces co-cultures kératinocytes-mélanocytes pourront être utiles pour approfondir les connaissances sur le mélanocyte, en particulier le mélanocyte fortement pigmenté, et notamment pour ce qui concerne la formation de l'unité épidermique de mélanisation (contact kératinocytes- mélanocytes) et le transfert des mélanosomes aux kératinocytes, dans des conditions normales, de stress (UV...) ou pathologique (ex : désordres
- 15 hyperpigmentaires de type lentigines, melasma, nevi...).

En particulier, l'obtention selon l'invention de cultures, banques ou de co-cultures mélanocytes-kératinocytes, à partir de mélanocytes issus des lésions hyperpigmentaires, pourra être utile à la compréhension des mécanismes liés à ce désordre

20 hyperpigmentaire et au développement de traitements adaptés.

Un procédé de préparation d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites, en particulier d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites de phototype IV, V ou VI

25 pourra comprendre :

- a) une étape de préparation d'un support ou d'un équivalent de derme ; et
- b) une étape d'ensemencement sur ledit support, d'au moins (i) une préparation de kératinocytes et (ii) une préparation de mélanocytes humains, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI, lesdits
- 30 mélanocytes ayant été préalablement multipliés en présence d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU et leurs mélanges.

Les épidermes et/ou peaux reconstruites pourront également intégrer d'autres types

35 cellulaires, tels que des cellules dermiques (ex : fibroblastes), épidermiques (ex : cellules de Langerhans, cellules de Merkel), ou encore des cellules du cheveu (ex : papille

dermique), des cellules endothéliales, des cellules nerveuses, des sébocytes et/ou des adipocytes.

- 5 L'étape **a**) de préparation d'un support ou d'un équivalent de derme pourra être réalisée selon les protocoles décrits dans les demandes de brevets (EP-A-285471, EP-A-285474, EP-A-789074, EP-A-502172, EP-A-418035, WO-A-9116010, EP-A-197090, EP-A-20753, FR-A-2665175, FR-A-2689904).

10 En particulier, ledit support ou équivalent de derme sera choisi parmi des lattices de collagène/ fibroblastes, un derme préalablement désépidermisé (DED) préparé comme décrit dans Régnier et al (Front Matrix Biol 9, 4-35, 1981) et Régnier et al (J Invest Dermatol 109, 510-512, 1997), un flacon plastique couvert ou non de macromolécules dermiques (collagène, fibronectine, lamine...) ou des membranes artificielles de type bio-pansement pour épiderme reconstruit (BPER).

- 15 De préférence, on utilisera le support EPISKIN® de type BPER ou tout autre membrane synthétique, couverte ou non d'un film de macromolécules dermiques, ce support pouvant intégrer ou non des cellules dermiques, par exemple des fibroblastes, des cellules du cheveu, papille dermique par exemple, des cellules endothéliales, des cellules nerveuses, des sébocytes et / ou des adipocytes.

20

De manière très générale, les modèles d'épidermes et/ou de peaux reconstruites sont constitués de kératinocytes humains déposés sur un support, souvent un équivalent de derme, et cultivés dans des conditions telles qu'ils entrent dans un programme de différenciation aboutissant à la formation d'un équivalent d'épiderme. On peut également intégrer d'autres types cellulaires tels que les cellules de Langherans (EP0789074), pour reconstituer un épiderme et/ou une peau proches des tissus natifs.

25

L'étape **b**) d'ensemencement et de culture de l'épiderme reconstruit sera réalisée dans un milieu de culture adapté à la culture des kératinocytes et des mélanocytes, pouvant notamment contenir au moins un facteur de croissance mitogénique pour les kératinocytes [ex : epidermal growth factor (EGF) et/ou keratinocyte growth factor (KGF)], de l'insuline, de l'hydrocortisone et un antibiotique (ex : gentamycine, amphotericine B). Avantagement, ledit milieu pourra comprendre en outre un extrait pituitaire, par exemple d'origine bovine, de l'épinephrine, de la transferrine, de

35

l'hydrocortisone ou tout autre facteur de croissance et/ou des acides aminés non essentiels.

Ledit milieu pourra contenir ou non du sérum et éventuellement être additionné du facteur de croissance TGF- $\beta$ .

5

La préparation de kératinocytes (i) pourra être obtenue par exemple à partir d'un explant cutané prélevé sur un sujet, selon le protocole suivant :

- on élimine le tissu sous-cutané à l'aide d'un scalpel ;
- 10 - on décontamine le prélèvement cutané par un traitement antibiotique (ex : gentamycine) ;
- on sépare le derme de l'épiderme par traitement protéolytique (ex : trypsine et dispase) puis dissection ;
- on favorise ensuite la dissociation des cellules en présence d'une solution de  
15 trypsine 0,05% et EDTA 0,02% ; et on neutralise l'effet de la trypsine par l'ajout d'un milieu de culture DMEM contenant 10% de sérum;
- on homogénéise la suspension cellulaire, que l'on lave ensuite dans du milieu de culture pour kératinocytes (KGM, Bullet kit, Clonetics Corp), ou milieu avec sérum et facteurs de croissance. Les kératinocytes pourront ou non être cultivés en  
20 présence de feeder layers (cellules nourricières).

Et la préparation de mélanocytes, en particulier issus de sujets de phototype IV, V ou VI (ii) pourra être obtenue comme précédemment décrit selon l'invention, en absence ou en présence d'une quantité efficace et non cytotoxique de PTU.

25

Selon une alternative, le PTU pourra en outre être ajouté lors de l'étape b) d'ensemencement des kératinocytes et des mélanocytes, et maintenu pendant une durée déterminée en fonction du degré de pigmentation souhaité.

- 30 En effet, il pourra être avantageux de maintenir le traitement au PTU pendant la reconstruction de l'équivalent d'épiderme pour obtenir des équivalents d'épiderme et/ou de peaux moins pigmentés que les équivalents d'épiderme et/ou de peaux de phototypes IV, V ou VI natifs. Ces équivalents moins pigmentés seront notamment plus adaptés au criblage d'actifs pro-pigmentants, difficilement détectables sur les équivalents d'épiderme  
35 de phototypes IV, V ou VI natifs, ainsi qu'aux études de la pigmentation UV induite et

l'évaluation de l'effet protecteur des écrans solaires sur des équivalents d'épiderme de tels phototypes.

- 5 L'invention porte encore sur un kit de production d'un épiderme et/ou d'une peau reconstruite, en particulier un épiderme et/ou une peau reconstruite, en particulier de phototype IV, V ou VI comprenant (i) un support de derme, (ii) une préparation de kératinocytes et (iii) une préparation de mélanocytes humains, en particulier issus de  
10 sujets de phototype IV, V ou VI, préalablement amplifiés en présence d'une quantité efficace et non cytotoxique de PTU allant de 2 à 20 $\mu$ M et en particulier égale à 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M et 15 $\mu$ M.

Le support de derme (i) pourra être choisi parmi un derme préalablement dé-épidermisé (DED) ou un Bio-pansement pour épiderme reconstruit (BPER) EPISKIN<sup>®</sup>,  
15 comme décrit précédemment.

Une préparation de kératinocytes (ii) pourra être obtenue comme décrit précédemment.

La préparation de mélanocytes issus de sujets de phototype IV, V ou VI (iii) pourra être  
20 obtenue comme précédemment décrit, en présence d'une quantité efficace et non cytotoxique de PTU.

Selon une alternative, le kit pourra contenir en outre (iv) une quantité de PTU destinée à être ajoutée au moment de l'ensemencement desdits kératinocytes et mélanocytes  
25 sur le support, à une concentration allant de 2 à 40 $\mu$ M, de sorte à obtenir des épidermes reconstruits moins pigmentés.

Les épidermes reconstruits et/ou peaux reconstruites, en particulier fortement pigmentés  
30 obtenus selon l'invention, peuvent notamment être utilisés dans des procédés d'évaluation et/ou de criblage d'actifs cosmétiques ou pharmaceutiques, en particulier d'actifs dépigmentants ou pro-pigmentants, selon les méthodes classiques. Ils pourront également être utilisés pour toute étude relative à la pigmentation UV induite, et à  
35 l'évaluation de l'efficacité protectrice des filtres solaires, et de l'effet de molécules anti-pigmentantes.

L'effet du PTU étant réversible, les mélanocytes ou épidermes reconstruits et/ou peaux reconstruites pourront également être destinés à traiter des lésions de la peau, d'origine accidentelle (ex : grands brûlés), chirurgicale (ex : nevus, tatouage) ou pathologique (ex : désordres dépigmentaires de type vitiligo, ou désordres hyperpigmentaires de type lentigine, melasma, nevi...).

5

Les sujets traités pourront être de tout phototype ; en particulier, ils seront de phototype IV, V ou VI.

Le traitement pourra consister en :

- 10 - la préparation de mélanocytes à partir d'un explant cutané de sujet sain (cellules homologues) ou de zones saines du sujet présentant une peau lésée (cellules autologues) ;
- la multiplication desdits mélanocytes en présence de PTU, tel que décrit précédemment;
- 15 - la ré-implantation desdits mélanocytes au niveau des zones de peau lésée, soit sous la forme de mélanocytes, soit sous la forme d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites contenant lesdits mélanocytes.

Dans le cas particulier d'une lésion de type dépigmentaire (ex : vitiligo) ou hyperpigmentaire (ex : lentigine, melasma, nevi...), la ré-implantation des mélanocytes au niveau des zones de peau dépigmentées pourra se faire après abrasion de l'épiderme au niveau desdites zones dépigmentées.

20

L'invention concerne également un procédé de criblage et/ou d'évaluation d'actifs susceptibles de moduler la pigmentation de la peau comprenant au moins une étape dans laquelle ledit actif est appliqué sur des cultures de mélanocytes humains, ou sur des épidermes reconstruits et/ou des peaux reconstruites tels qu'obtenus selon l'invention.

25

En particulier, ce procédé vise à cribler et/ou évaluer l'activité dépigmentante ou propigmentante de composés.

30

Selon un mode particulier, le procédé de criblage et/ou d'évaluation de l'activité dépigmentante d'un produit sur des mélanocytes ou des épidermes reconstruits tels qu'obtenus selon l'invention pourra comprendre les étapes suivantes : on applique le produit à tester sur ledit modèle cellulaire ou on l'introduit dans le milieu de culture, on mesure la luminance  $L^*$  ou clarté dudit modèle, et l'on compare cette mesure à un témoin

35

(sans produit à tester). Pour un actif dépigmentant, on obtiendra une luminance plus grande par rapport au témoin.

- 5 L'invention sera illustrée par les exemples non limitatifs suivants.

### FIGURES

La **figure 1** est une représentation graphique de la mesure de la luminance au colorimètre sur des mélanocytes africains en culture avant congélation.

- 10 La **figure 2** est une représentation graphique de l'effet d'une concentration efficace non cytotoxique de PTU 10 $\mu$ M sur la multiplication *in vitro* des mélanocytes africains.

La **figure 3** est une représentation graphique de l'activité dépigmentante de l'arbutine et de la vitamine C phosphate évaluée sur un épiderme reconstruit africain préparé à partir de mélanocytes africains cultivés en présence de PTU.

15

### EXEMPLES

#### Exemple 1 : Effet du PTU sur la culture de mélanocytes de phototype VI (africains)

20

##### a) Préparation d'une culture primaire de mélanocytes africains

Les mélanocytes sont obtenus à partir d'un prépuce d'enfant africain selon le protocole suivant : la peau est coupée en fragments de 6 mm et incubée une nuit à +4°C en présence de 0.25% de trypsine. L'épiderme est ensuite séparé du derme dans du sérum de veau fœtal. Les morceaux de derme sont grattés afin de récupérer les cellules basales et les mélanocytes. Les fragments d'épiderme sont ensuite vortexés puis les cellules sont centrifugées 5min à 190G. Les cellules (mélange de mélanocytes et kératinocytes) sont comptées etensemencées à une densité de 8 à 15x10<sup>6</sup> cellules par flasque de 75cm<sup>2</sup>, dans 18 à 20ml de milieu M2 (Promocell).

30

Les mélanocytes sont ensuite purifiés selon le protocole suivant : le milieu de culture est changé 3 fois par semaine et lorsque les cellules sont confluentes : les flasques sont vidées et rincées 1 fois avec du PBS - Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>. On ajoute ensuite 3ml par flasque de trypsine-EDTA et on incube 3-4min à température ambiante: les mélanocytes se détachent alors que les kératinocytes restent attachés au flasque. On ajoute un volume équivalent de milieu M2 et on compte les cellules détachées que l'on ensemence à une

35

densité de  $10^6$  cellules par flasque de  $75\text{cm}^2$ , dans 18 à 20ml de milieu M2 (Promocell). On obtient ainsi une culture primaire de mélanocytes humains africains.

La trypsinisation est répétée quand les mélanocytes arrivent à confluence (passage 1 et suivants).

- 5 Les mélanocytes de la culture primaire sont viables à 80%, c'est-à-dire que 80% des mélanocytes adhèrent à la flasque.

b) Détermination de la concentration non cytotoxique du PTU : effet réversible

10

Une partie de la culture primaire de mélanocytes est traitée au PTU (Sigma) aux concentrations  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$  et  $50\mu\text{M}$  au passage 2/3 ou de préférence dès le premier passage.

- 15 La cytotoxicité de l'effet du PTU est évaluée par l'observation des cellules au microscope.

Les résultats montrent que le PTU est cytotoxique à la concentration de  $50\mu\text{M}$  sur les mélanocytes de sujets africains : la plupart des cellules se détachent.

- 20 Aux concentrations de  $5\mu\text{M}$  et  $10\mu\text{M}$  au contraire, les cellules restent adhérentes à 95% (viabilité 95%), donc une concentration de  $5\mu\text{M}$  ou  $10\mu\text{M}$  de PTU, non seulement n'affecte pas la viabilité des mélanocytes (ne diminue pas ou peu leur viabilité), mais est même capable d'augmenter leur viabilité (95% contre 80% pour la culture primaire).

- 25 La pigmentation des mélanocytes de phototype VI (africains), traités au PTU  $10\mu\text{M}$  et non traités, est mesurée par la valeur  $L^*$  (luminance) des cultures données par le spectrophotomètre (**Figure 1**). Les résultats montrent que le traitement des cellules avec le PTU à une concentration de  $10\mu\text{M}$  diminue la quantité de pigment dans les mélanocytes et que cet effet est réversible à l'arrêt du traitement. Des résultats similaires ont été obtenus avec une concentration de  $5\mu\text{M}$ .

- 30 La quantité de pigment excrétée par les mélanocytes dans le milieu est également moins importante après traitement. La synthèse de la mélanine est diminuée en cours de traitement et redevient normale en absence de traitement.

- 35 L'IC50 du PTU, c'est-à-dire la concentration du PTU pour laquelle on observe 50% d'inhibition de la mélanogénèse par rapport au témoin sur des cultures de mélanocytes de phototype VI (africains), est évaluée entre  $50\mu\text{M}$  et  $100\mu\text{M}$ .

La concentration non cytotoxique de PTU définie selon l'invention doit donc être inférieure à l'IC50 et permettre une inhibition transitoire et réversible de la production de mélanine. En particulier, cette concentration non cytotoxique sera inférieure à l'IC50 d'un facteur 1,5 à 10, autrement dit à une concentration comprise entre IC50/1,5 et IC50/10.

5

c) Effet d'une concentration non cytotoxique du PTU sur la prolifération des mélanocytes de phototype VI (africains)

L'effet du PTU 10µM sur la prolifération des mélanocytes est estimé par la quantité de cellules obtenue, tel que représenté à la **Figure 2**.

10

Les résultats montrent que les mélanocytes de phototype VI (africains) en culture, en absence de PTU (courbe témoin), sont multipliés de façon constante par un facteur 2 à chaque passage. Et leur pourcentage de viabilité est estimé à 80%.

15

La multiplication des mélanocytes de phototype VI (africains) traités au PTU 10µM au passage 4/5 est augmentée par rapport à la multiplication des mélanocytes témoins, dès le passage 6/7.

Aux passages 8 et 9, les cellules traitées sont respectivement multipliées d'un facteur 5 et d'un facteur 15, par rapport au facteur 2 témoin non traité. Leur pourcentage de viabilité est estimé à 95%.

20

Donc la multiplication des mélanocytes de phototype VI (africains) en présence de PTU est augmentée d'un facteur 2 à 10 par rapport à la multiplication des mélanocytes humains en absence de PTU (témoin). Cet effet est réversible : après arrêt du traitement au passage 7 (courbe réversibilité, Figure 2), la prolifération est inhibée et similaire à celle des cultures non traitées (courbe PTU 10µM).

25

Les mêmes expériences reproduites avec une concentration de 5µM au lieu de 10µM ont donné des résultats de même grandeur lorsque les mélanocytes sont traités dès le premier passage.

30

d) Effet d'une concentration non cytotoxique de PTU sur la viabilité des mélanocytes de phototype VI (africains) après congélation

35

Les mélanocytes africains non traités (viabilité 80%) et les mélanocytes traités au PTU 10 $\mu$ M (viabilité 95%) sont congelés selon le protocole suivant : les cellules sont trypsinisées et comptées. Elles sont ensuite centrifugées et le culot est resuspendu dans du sérum de veau foetal + 10% DMSO à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml.

- 5 Les cellules sont congelées dans des cryo-tubes à -80°C.  
Après 24h, les tubes sont transférés dans l'azote liquide à -196°C.

Pour la décongélation, les tubes sont placés au bain-marie à 37°C et après une décongélation rapide, on ajoute 5ml de milieu M2. Les cellules sont centrifugées 5min à  
10 190G, le culot est resuspendu dans du milieu M2 et les cellules sontensemencées dans un flasque et remises en culture dans les conditions décrites en a).

A l'issue de ces étapes de congélation, décongélation et remise en culture, seulement  
15 5% des mélanocytes africains non traités sont viables, alors que 80% des mélanocytes humains traités au PTU 10 $\mu$ M sont viables.

Des résultats similaires ont été obtenus avec un traitement au PTU 5 $\mu$ M.

Le pourcentage de viabilité des mélanocytes de phototype VI (africains) après  
20 décongélation et remise en culture est donc augmenté d'un facteur 10 à 20 pour les mélanocytes africains traités au PTU 5 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M par rapport au pourcentage de viabilité des mélanocytes humains non traités.

D'autres expériences ont montré que ce facteur pouvait même être supérieur (10 à 100).

25 L'ensemble de ces résultats montre donc qu'une concentration non cytotoxique de PTU (ex : 5 ou 10 $\mu$ M) permet (1) de favoriser et/ou stimuler la multiplication de mélanocytes de phototype VI (africains) et (2) maintenir et/ou augmenter leur viabilité après  
30 congélation, décongélation et remise en culture (ex : 80%, soit un pourcentage de viabilité très supérieur à celui obtenu pour des mélanocytes africains non traités, estimé à 5%).

### **Exemple 2 : Préparation d'un épiderme reconstruit fortement pigmenté**

Les mélanocytes multipliés en présence de PTU peuvent également être utilisés dans un  
35 procédé d'obtention d'épiderme reconstruit comme décrit ci-dessous.

Sauf indication contraire, l'ensemble des milieux et tampons utilisés sont décrits dans Régnier et al Cell. mol. Biol ; 45, 969-980,1999 ; Duval et al Pigment cell Res 15,440-446, 2002 ; Duval et al Pigment cell Res 14, 348-355, 2001.

- 5 Les supports ou équivalents de derme sont préparés comme décrits dans Régnier et al Front Matrix Biol 9, 4-35, 1981 ; Régnier et al J Invest Dermatol 109, 510-512, 1997 ; Tinois et al Exp Cell Res 193,310-319,1991 ; de préférence, on utilisera le support Biopansement pour épiderme reconstruit (BPER) EPISKIN® ou tout autre membrane synthétique, couverte ou non d'un film de macromolécules dermiques, ces membranes  
10 pouvant être des éponges de collagène, des équivalent dermiques contenant des cellules viables , fibroblastes, cellules endothéliales, cellules nerveuses, adipocytes et/ou sébocytes.

Le support est rincé dans le milieu de culture puis recouvert ou non de collagène type IV, fibronectine ou lamine par exemple. Après une nuit de contact à +4°C, les kératinocytes  
15 et les mélanocytes de phototype VI (africains) préalablement multipliés en présence de PTU 5µM ou 10µM, comme décrit à l'exemple 1, sont ensuiteensemencés sur ledit support.

La culture peut ensuite être maintenue immergée dans un milieu pour kératinocytes en  
20 présence de facteur de croissance.

Après un temps d'incubation de 3 à 5 jours, l'équivalent de peau de phototype VI (africaine) en formation est maintenu à l'interface air/liquide par exemple par dépôt sur une grille métallique ou élimination du milieu de culture présent à la surface d'un insert. Le liquide est alors préférentiellement constitué du même milieu nutritif que le précédent,  
25 mais dont les facteurs de croissance ont été réduits.

L'incubation se poursuit ensuite jusqu'à obtention d'un équivalent de peau de phototype VI (africaine).

Ainsi, l'incubation se poursuit pendant une durée comprise entre 5 et 30 jours, préférentiellement entre 7 et 10 jours.

30

Le modèle de peau reconstruite de phototype VI (africaine) ainsi réalisé comprend deux entités, le support, équivalent derme et l'équivalent d'épiderme, qu'il est possible de séparer physiquement l'un de l'autre.

- 35 L'activité des mélanocytes de phototype VI (africains), après arrêt du traitement PTU, est mise en évidence par la réaction DOPA, qui consiste à révéler l'action de la tyrosinase.

Cette enzyme est responsable de l'oxydation de la tyrosinase en dihydrophénylalanine (DOPA) puis de l'oxydation de la DOPA en DOPA-quinone. L'activité DOPA-oxydase de la tyrosinase est mise en évidence par la formation d'un précipité noir qui est d'autant plus intense que les mélanocytes sont actifs.

5

L'aspect des mélanocytes africains, leur localisation et le transfert du pigment sont observés sur coupes histologiques après coloration Fontana-Masson.

On observe que, les mélanocytes traités, comme les mélanocytes non traités s'intègrent dans l'épiderme reconstruit. Ils sont notamment localisés dans la couche basale de l'épiderme, transfèrent la mélanine aux kératinocytes voisins. En particulier, ils sont réactifs au test DOPA.

Selon une alternative, le traitement au PTU peut en outre être maintenu dans le milieu de culture de l'épiderme reconstruit afin d'obtenir des épidermes reconstruits moins pigmentés, plus adaptés au criblage d'actifs pro-pigmentants et à l'évaluation de la pigmentation UV induite et de l'effet protecteur des écrans solaires et de l'effet anti-pigmentant de certaines molécules.

20

**Exemple 3 :Utilisation des épidermes reconstruits pigmentés obtenus avec PTU, comme modèles de criblage d'actifs dépigmentants**

L'épiderme reconstruit à partir de mélanocytes de phototype VI (africains) préparé dans les conditions de l'exemple 2 est utilisé pour cribler l'activité dépigmentante d'actifs.

25 Les produits à tester- arbutine à 100µM et vitamine C phosphate à 280µM- sont appliqués par voie topique sur ledit épiderme reconstruit : 3 applications (3µl/ échantillon) pendant 5 jours à partir du 5<sup>ème</sup> jour d'émersion.

La vitamine C phosphate à 280µM est également appliquée par voie systémique, c'est-à-dire dans le milieu de culture, pendant toute la durée de la reconstruction épidermique.

30 Le témoin est la mesure de luminance de l'épiderme reconstruit en absence de produit à tester.

Sur épiderme reconstruit sur BPER (Episkin®), le support dermique étant translucide, elle ne peut être évaluée directement sur les échantillons. Ceux-ci sont alors dé-épidermisés puis digérés par une solution de protéinase K. Les lysats obtenus sont filtrés sur DEAE

35 cellulose qui retient la mélanine. La luminance est ensuite mesurée sur le filtre.

La luminance  $L^*$ , ou clarté de l'échantillon, est mesurée à l'aide d'un colorimètre. Plus un échantillon est foncé, plus sa luminance est faible.

En présence d'arbutine ou de vitamine C phosphate, on observe une augmentation de la luminance (**Figure 3**). Le meilleur résultat est observé avec l'arbutine (augmentation de 5 1.8 points de  $L^*$ ).

Ces résultats confirment donc la fonctionnalité des épidermes reconstruits pigmentés obtenus à partir de mélanocytes et en présence de PTU, en tant que modèles de criblage d'actifs dépigmentants.

## REVENDEICATIONS

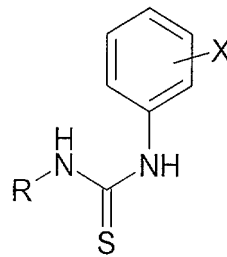
- 1 Utilisation d'au moins un composé choisi parmi le 1-phenyl-3-(2-thiazolyl)-2-  
5 thiourée (PTU), un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la  
vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou  
esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le  
niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges, pour  
favoriser la multiplication *in vitro* de mélanocytes humains et/ou leur congélation.
- 10 2 Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les mélanocytes  
humains sont issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions  
hyperpigmentaires.
- 15 3 Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que les  
mélanocytes, pour un phototype donné, sont prélevés à partir d'un ou plusieurs  
sujets de même origine ethnique ou d'origines ethniques différentes.
- 20 4 Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que le prélèvement desdits  
mélanocytes est effectué à partir d'un même site anatomique.
- 25 5 Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce  
que la quantité de PTU, d'un analogue de PTU, d'un mimétique de PTU choisi  
parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés  
acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et  
dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs  
mélanges, présente dans la culture *in vitro* est définie selon les étapes suivantes :
- 30 a. on applique sur les mélanocytes en culture le PTU, l'analogue ou le  
mimétique PTU à différentes quantités ;
- b. on évalue la cytotoxicité desdites quantités de PTU en déterminant le  
pourcentage de cellules adhérentes au support de culture par rapport aux  
mélanocytes non traités et on sélectionne les quantités pour lesquelles le  
pourcentage de cellules adhérentes est supérieur ou égal à 60% ;
- 35 c. on évalue l'efficacité des quantités non cytotoxiques de PTU sélectionnées  
et b) sur la prolifération des mélanocytes en culture en quantifiant le  
nombre de cellules obtenues après chaque passage par rapport à des  
mélanocytes non traités et on sélectionne les quantités pour lesquelles on

obtient une augmentation de la multiplication desdits mélanocytes d'un facteur 2 à 10 par rapport à des mélanocytes humains non traités.

- 5 6 Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite quantité de PTU, d'un analogue de PTU, d'un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges, mise en contact avec les mélanocytes humains avant congélation, augmente le pourcentage de viabilité desdits mélanocytes après décongélation et remise en culture, d'un facteur 10 à 20 par rapport au pourcentage de viabilité des mélanocytes humains non traités.
- 10
- 15 7 Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que ladite quantité de PTU, d'un analogue de PTU, d'un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges est comprise entre IC50/1,5 et IC50/10.
- 20
- 8 Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le PTU est présent dans la culture *in vitro* en une quantité efficace allant de 2µM à 40µM, de préférence de 2 à 20µM.
- 25
- 9 Utilisation d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans un procédé destiné à l'obtention de cultures de mélanocytes humains ou de banques de mélanocytes humains.
- 30
- 10 Utilisation selon la revendication 9 pour l'obtention de cultures ou banques primaires de mélanocytes, ou de cultures ou banques secondaires de mélanocytes.
- 35
- 11 Utilisation de mélanocytes humains multipliés en présence d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi

- 5 parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans un procédé destiné à l'obtention de co-cultures comprenant au moins lesdits mélanocytes et des kératinocytes.
- 10 12 Utilisation de mélanocytes humains multipliés en présence d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans un procédé destiné à l'obtention d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites.
- 15 13 Utilisation d'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 12 pour la préparation de mélanocytes ou d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites destinés à traiter des lésions de la peau.
- 20 14 Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que les lésions de la peau sont choisies parmi les brûlures, les excisions cutanées, et les dépigmentations ou hyperpigmentations de la peau associées à une affection dermatologique.
- 25 15 Utilisation selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisée en ce que les mélanocytes sont issus de sujets sains ou de zones saines de sujets présentant lesdites lésions.
- 30 16 Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que l'analogue de PTU est choisi parmi les thiourées et les dérivés phényl-, mono- ou dioxydés, ou les composés de formule (I)

28



avec

X représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4 linéaire ou ramifié ou un halogène ou un radical cyano ou un radical -OR' ou COOR' dans lesquels R' représente un atome d'hydrogène ou un radical alkyle en C1-C4, et R représente un atome d'hydrogène ou un groupe aromatique substitué ou non par des groupes équivalents à X.

- 17 Procédé d'obtention d'une culture de mélanocytes humains ou d'une banque de mélanocytes humains, comprenant au moins une étape de multiplication desdits mélanocytes en présence de PTU, d'un analogue ou d'un mimétique du PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, et éventuellement une étape de congélation.
- 18 Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il comprend un deuxième cycle de multiplication et de congélation desdits mélanocytes.
- 19 Kit de production d'une culture ou d'une banque de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires comprenant (i) une préparation de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V ou VI ou de lésions hyperpigmentaires et (ii) un milieu de culture pour mélanocytes additionné d'une quantité de PTU allant de 2 à 40µM, de préférence de 2 à 20µM.
- 20 Procédé de préparation d'épidermes reconstruits et/ou de peaux reconstruites de phototype IV, V ou VI, comprenant :
- une étape de préparation d'un support ou d'un équivalent de derme ; et
  - une étape d'ensemencement sur ledit support, d'au moins (i) une préparation de kératinocytes et (ii) une préparation de mélanocytes humains issus de sujets de phototype IV, V ou VI, lesdits mélanocytes

5 étant préalablement amplifiés en présence de PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.

10 21 Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'au moins un composé choisi parmi le PTU, un analogue de PTU, un mimétique de PTU choisi parmi la vitamine C, l'arbutine, l'hydroquinone, l'acide kojique ou ses dérivés acides ou esters, l'acide ellagique, les dérivés d'aminophénol, la procystéine et dérivés, le niacinamide, l'isothiocyanate et thiocyanate, le lucinol et leurs mélanges est en outre ajouté lors de l'étape b) d'ensemencement.

15 22 Kit de production d'un épiderme et/ou d'une peau reconstruite de phototype IV, V ou VI comprenant (i) un support de derme ou équivalent, (ii) une préparation de kératinocytes et (iii) une préparation de mélanocytes humains issus de sujets de phototype VI, V ou VI, lesdits mélanocytes étant préalablement amplifiés en présence d'une quantité de PTU allant de 2 à 40 $\mu$ M, de préférence allant de 2 à 20 $\mu$ M.

20 23 Procédé de criblage et/ou d'évaluation d'actifs susceptibles de moduler la pigmentation de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape dans laquelle ledit actif est appliqué sur des cultures de mélanocytes humains tels qu'obtenus selon le procédé de l'une des revendications 17 ou 18, ou sur des épidermes reconstruits et/ou des peaux reconstruites tels qu'obtenus selon le procédé de l'une des revendications 20 ou 21.

1

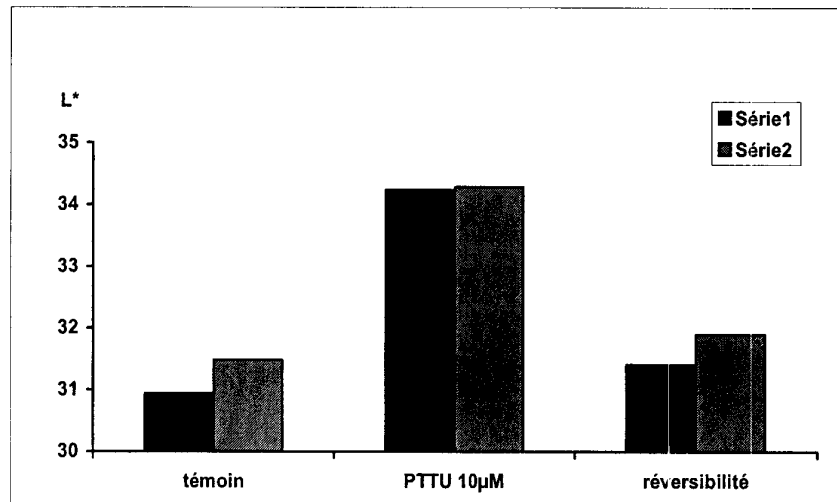


Figure 1

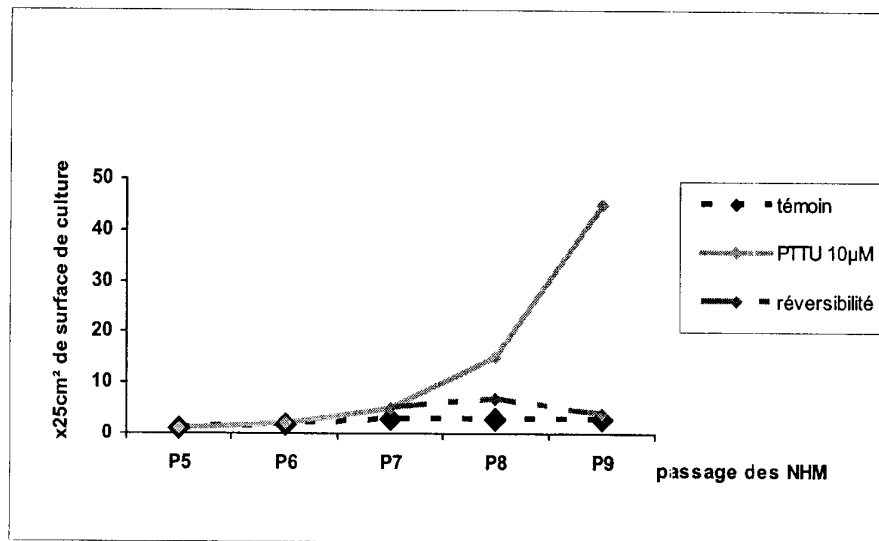


Figure 2

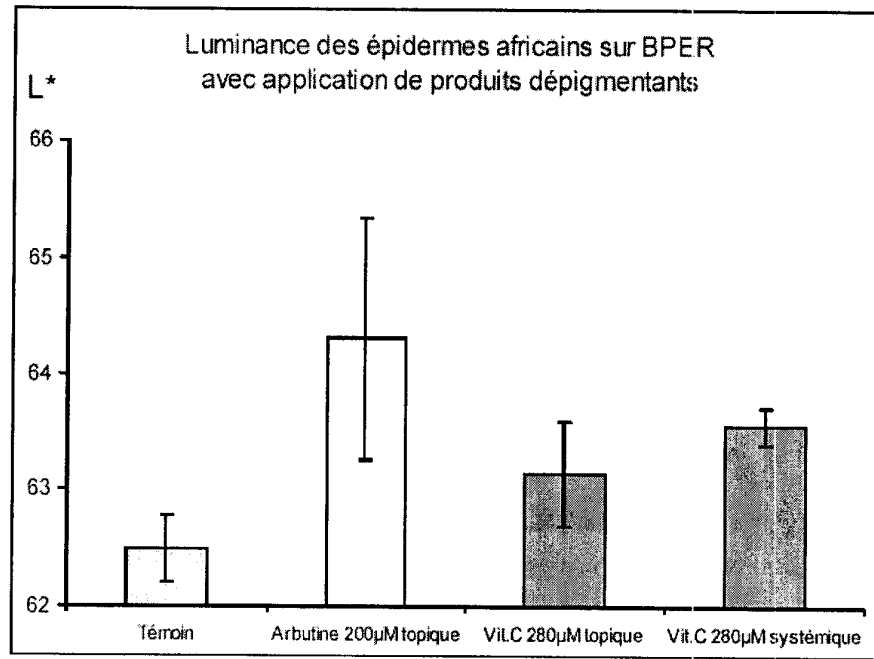


Figure 3



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**  
établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 660081  
FR 0412001

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	WO 01/64206 A (INTEGRIDERM, INC; DOOLEY, THOMAS, P; CURTO, ERNEST, V) 7 septembre 2001 (2001-09-07) * pages 6,48; revendication 1 *	1-12, 16-23	C12N5/02 C12N5/08 C12Q1/02 A01N1/02
Y	* page 3, alinéa 2 *	13-15	
A	HIGASHI Y ET AL: "INHIBITION OF TYROSINASE REDUCES CELL VIABILITY IN CATECHOLAMINERGIC NEURONAL CELLS" JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY, NEW YORK, NY, US, vol. 75, no. 4, octobre 2000 (2000-10), pages 1771-1774, XP000952995 ISSN: 0022-3042 * le document en entier *	1-23	
A	PETIT L ET AL: "Skin-lightening products revisited" INTERNATIONAL JOURNAL OF COSMETIC SCIENCE, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, NL, vol. 25, 2003, pages 169-181, XP002262230 ISSN: 0142-5463 * pages 176-178 *	1-23	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12N
A	HAKOZAKI T ET AL: "The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer" BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, vol. 147, no. 1, juillet 2002 (2002-07), pages 20-31, XP002333293 ISSN: 0007-0963 * le document en entier *	1-23	
		-/--	
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		24 juin 2005	Domingues, H
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

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

N° d'enregistrement  
national

FA 660081  
FR 0412001

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	VANCOILLIE G ET AL: "Melanocyte biology and its implications for the clinician." EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOLOGY : EJD. 1999 APR-MAY, vol. 9, no. 3, avril 1999 (1999-04), pages 241-251, XP001206640 ISSN: 1167-1122 * le document en entier *	1-23	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	RÉGNIER M ET AL: "Keratinocyte-melanocyte co-cultures and pigmented reconstructed human epidermis: models to study modulation of melanogenesis." CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY (NOISY-LE-GRAND, FRANCE) NOV 1999, vol. 45, no. 7, novembre 1999 (1999-11), pages 969-980, XP009049587 ISSN: 0145-5680 * le document en entier *	1-23	
A	DE 101 62 960 A1 (BIOTISSUE TECHNOLOGIES AG; BIOTISSUE TECHNOLOGIES AG I.INS) 10 juillet 2003 (2003-07-10) * le document en entier *	1-23	
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2003, no. 01, 14 janvier 2003 (2003-01-14) -& JP 2002 275030 A (NONOGAWA SHOJI KK), 25 septembre 2002 (2002-09-25) * abrégé *	13-15	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
24 juin 2005		Domingues, H	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0412001 FA 660081**

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 24-06-2005

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0164206	A	07-09-2001	AU 4333401	A 12-09-2001
			CA 2401336	A1 07-09-2001
			EP 1267868	A2 02-01-2003
			WO 0164206	A2 07-09-2001
			US 2003219393	A1 27-11-2003
			US 2002044914	A1 18-04-2002
-----				
DE 10162960	A1	10-07-2003	AUCUN	
-----				
JP 2002275030	A	25-09-2002	AUCUN	
-----				