(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATIONEN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
26 novembre 2009 (26.11.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/141541 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/60 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/050737

(22) Date de dépôt international :
21 avril 2009 (21.04.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
08 52692 22 avril 2008 (22.04.2008) FR
08 52696 22 avril 2008 (22.04.2008) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75016 Paris (FR). **INSTITUT CURIE** [FR/FR]; 26 rue d'Ulm, F-75248 Paris cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **RAPOSO, Graça** [PT/FR]; 8 rue Saint Martin, F-75004 Paris (FR). **DELEVOYE, Cédric** [FR/FR]; 44 rue du Volga, F-75020 Paris (FR). **TENZA, Danièle** [FR/FR]; 31 Chemin des Essarts, F-95470 Survilliers (FR). **HURBAIN, Ilse** [FR/FR]; 17 rue du Dr Roux, F-91440 Bures (FR).

(74) Mandataires : **GALLOIS, Valérie** et al.; Becker & Associés, 25 rue Louis Le Grand, F-75 002 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))*

— *avec la partie de la description réservée au listage des séquences (règle 5.2.a))*

(54) **Title** : NOVEL COMPOSITIONS WHICH INHIBIT MELANOGENESIS AND USES THEREOF

(54) **Titre** : NOUVELLES COMPOSITIONS INHIBANT LA MELANOGENESE ET LEURS UTILISATIONS

(57) **Abstract** : The present invention relates to novel pharmaceutical or cosmetic compositions comprising at least one inhibitor of a subunit of the AP-1 adaptor complex, of a kinesin which interacts with AP-1, in particular Kif13A, or of the interaction between a subunit of the AP-1 adaptor complex and said kinesin, and also to the use thereof for the manufacture of a medicament for use in the treatment of pigmentary disorders and as a depigmenting agent.

(57) **Abrégé** : La présente invention concerne de nouvelles compositions pharmaceutiques ou cosmétiques comprenant au moins un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A, ou de l'interaction entre une sous- unité du complexe adaptateur AP-1 et ladite kinésine, ainsi que leur utilisation pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de troubles pigmentaire et comme agent dépigmentant.

WO 2009/141541 A2

Nouvelles compositions inhibant la mélanogenèse et leurs utilisations

La présente invention concerne des compositions permettant de réduire la synthèse de pigments mélaniques dans les mélanocytes et les utilisations de celles-ci.

Arrière-plan technologique de l'invention

Chez l'Homme, la pigmentation résulte de la synthèse et de la distribution des pigments mélaniques notamment dans la peau, les cheveux et poils et l'épithélium pigmentaire de l'iris. Ainsi, la couleur de la peau, des cheveux et des yeux dépendent principalement des types de pigments présents et de leurs concentrations. Cette pigmentation est régulée par de nombreux facteurs internes ou externes, comme par exemple, l'exposition aux ultra-violets.

Les mélanines sont des macromolécules produites par les mélanocytes par addition ou condensation de monomères formés à partir de tyrosine (eumélanine) ou de tyrosine et de cystéine (phéomélanine). Le mécanisme de synthèse des mélanines, ou mélanogenèse, est particulièrement complexe et met en jeu différentes enzymes dont les principales sont la tyrosinase et la protéine associée à la tyrosine (« tyrosinase-related-protein » ou Tyrp-1). Durant la mélanogenèse, ces enzymes catalysent notamment la conversion de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) puis en DOPAquinone. A partir de cette molécule, deux voies métaboliques vont permettre la synthèse soit d'eumélanine soit de phéomélanine.

La mélanogenèse a lieu dans des organites intracellulaires spécialisés contenues dans les mélanocytes : les mélanosomes. Bien que les mélanosomes soient parmi les premiers organites cellulaires à être décrits morphologiquement (Seiji et al., 1963), leur composition protéique et leur biogénèse demeurent relativement méconnues.

La maturation du mélanosome peut être segmentée en quatre stades sur la base de critères morphologiques. Le stade I correspond à un compartiment délimité par une membrane avec une quantité variable de membranes intraluminales. Le stade II est une structure de forme ellipsoïdale avec des striations caractéristiques de nature protéique. Ces striations joueraient un rôle important dans la concentration de mélanine, dans l'élimination d'intermédiaires de synthèse toxiques et en facilitant le transfert de la mélanine aux kératinocytes (Seiji et al., 1963). La mélanine est détectée à partir du stade III et sous la forme de dépôts denses aux électrons le long des striations. Le stade IV est une structure dense aux électrons dans laquelle les striations internes ne sont plus visibles.

Ce stade correspond au mélanosome mature prêt à être transféré aux kératinocytes (Van Den Bossche et al., 2006).

Lors du processus de biogenèse, le mélanosome mature "pigmenté" (stade III et IV) est obtenu par addition d'enzymes clefs de la synthèse de mélanine et d'effecteurs nécessaires à son transport vers la périphérie (Raposo et al., 2001). Les enzymes impliquées dans la mélanogenèse sont donc synthétisées dans l'appareil de Golgi puis transférées dans les pré-mélanosomes. Les mécanismes impliqués dans ce transfert sont encore relativement méconnus. Ce type de transfert nécessite notamment la participation de complexes protéiques adaptateurs (AP pour « adaptor protein ») qui sont des hétérotétramères ayant pour rôle de recruter les enzymes dans les vésicules de transport. Il existe quatre de ces complexes, nommés AP-1 à AP-4. Les inventeurs ont précédemment démontré que le complexe AP-3 était impliqué dans le transfert de la tyrosinase vers les mélanosomes. Cependant, la déficience en AP-3 n'abolit pas la pigmentation et n'affecte pas le trafic de la Tyrp-1. Ils ont également observé que le complexe adaptateur AP-1 était capable d'interagir avec des séquences d'acides aminés des domaines cytosoliques de la tyrosinase et de Tyrp-1 sans pour autant élucider la fonction exacte de ce complexe dans la mélanogenèse (Theos et al., 2005). Parallèlement à cela, il a également été démontré qu'une kinésine, nommée Kif13A, était capable d'interagir avec une sous-unité de AP-1 (Nakagawa et al., 2000). Cette interaction a été observée dans des lignées cellulaires ne possédant pas de mélanosome. L'existence d'une telle interaction dans les lignées mélanocytaires ainsi que son rôle dans la mélanogenèse ne sont donc pas déterminés.

Un dysfonctionnement des mélanocytes peut entraîner des anomalies de pigmentation. Une hypopigmentation peut être engendrée par des maladies dépigmentantes, en particulier l'albinisme et le vitiligo. A l'inverse, des hyperpigmentations locales peuvent résulter de certains troubles mélanocytaires tels que les mélasmas idiopathiques ou l'hyperactivité et la prolifération mélanocytaire bénigne provoquant, par exemple, des taches pigmentaires séniles (lentigo actiniques). Les hyperpigmentations peuvent également être d'origine accidentelle et causées par exemple par une photosensibilisation ou une cicatrisation post-lésionnelle.

Ces hyperpigmentations peuvent être traitées au moyen de substances dépigmentantes administrées par voie topique. Une molécule dépigmentante agit au niveau des mélanocytes de l'épiderme et interfère avec une ou des étapes de la mélanogenèse. Les substances dépigmentantes connues sont notamment l'hydroquinone et ses dérivés, l'acide ascorbique et ses dérivés, des extraits placentaires, l'acide kojique, l'arbutine, les

iminophénols (WO 99/22707), l'association de carnitine et de quinone (DE 19806947), les dérivés amides d'amino-phénol (FR 2 772 607), et les dérivés de benzothiazole (WO 99/24035).

Ces substances peuvent présenter différents inconvénients dus notamment à leur instabilité, la nécessité de les utiliser à des concentrations élevées, leur action non spécifique ou encore leurs propriétés toxiques, irritantes ou allergisantes. Ainsi, des substances dépigmentantes efficaces et inoffensives pour traiter ou prévenir l'hyperpigmentation par voie topique sont particulièrement recherchées en cosmétologie et en dermatologie.

Ces dernières années, de nouvelles approches pour traiter des maladies dues à un dysfonctionnement des mélanocytes sont apparues. L'utilisation d'oligonucléotides antisens a notamment été envisagée. En effet, le document WO 99/25819 décrit des oligonucléotides utilisés pour augmenter la pigmentation en régulant l'expression de la ténascine pour traiter le vitiligo et d'autres maladies dépigmentantes et le document FR 2 804 960 décrit des oligonucléotides antisens permettant de réguler l'expression de la tyrosinase ou de la Tyrp-1 pour traiter des hyperpigmentations.

Résumé de l'invention

L'objectif de la présente invention est de fournir de nouveaux agents dépigmentants non toxiques, non irritants, non allergisants, ayant une action spécifique sur la mélanogenèse et stable dans les formulations appropriées pour une administration par voie topique.

La présente invention concerne, tout d'abord, une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un inhibiteur d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif13A, un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, ou un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci. Dans un premier mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur de la kinésine Kif13A. Dans un deuxième mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1. Dans un troisième mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci, en particulier la kinésine Kif13A. De manière particulière, ledit inhibiteur est une petite molécule, un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

De préférence, ledit inhibiteur est un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

Dans un mode préféré, la présente invention concerne une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif13A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine. Dans un premier mode préféré de l'invention, ledit au moins un acide nucléique comprend ou consiste en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif13A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine. Dans un deuxième mode préféré de l'invention, ledit au moins un acide nucléique comprend ou consiste en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine. De préférence, ledit acide nucléique est un oligonucléotide anti-sens ou un ARNi, de préférence un ARNsi. Ledit acide nucléique peut présenter une séquence de 15 à 50 nucléotides, de préférence de 15 à 30 nucléotides. Dans un mode de réalisation préféré, ledit acide nucléique comprend une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID No. 1 à 6 et 11 à 24.

La composition peut comporter en outre une ou plusieurs autres substances actives, de préférence choisies parmi le groupe composé par l'acide ellagique ; l'arbutine ; le résorcinol ; la vitamine C ; le pantothénate ; l'acide kojique ; des extraits placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec la mélanotropine (MSH), son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; des polyols tels que la glycérine, le glycol ou le propylène glycol ; des vitamines ; des agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique ; des alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique; l'acide ascorbique ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol ; le palmitate, le propionate ou l'acétate ; des agents anti-glycation et/ou antioxydants tels que le tocophérol, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, le pyrophosphate de thiamine, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; des agents anti-inflammatoires; des agents apaisants et leurs mélanges ; des filtres solaires chimiques ou physiques et des acides désoxyribonucléiques

ou ribonucléiques, et les dérivés de ceux-ci. De manière préférée, cette composition est adaptée pour une utilisation topique.

Dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une composition pharmaceutique ou cosmétique selon la présente invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un trouble pigmentaire. De manière préférée, le trouble pigmentaire est une hyperpigmentation.

Dans un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une composition pharmaceutique ou cosmétique selon la présente invention comme agent cosmétique. De préférence, l'agent cosmétique est un agent dépigmentant.

Brève description des dessins

La figure 1A présente les résultats obtenus par des expériences de Western-blot sur des lysats cellulaires de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle, un ARNsi-AP-1 (μ1A), un ARNsi-AP-3 (β3A) ou un ARNsi-Kif13A. L'anticorps primaire utilisé est un anti-Kif13A.

La figure 1B présente les résultats des immunoprécipitations avec un anticorps anti-Kif13A ou avec un anticorps anti-γ-adaptine (AP-1) réalisées à partir de lysats cellulaires de mélanocytes. L'anticorps primaire utilisé pour la révélation du Western-blot est un anti-Kif13A.

La figure 1C présente les résultats obtenus par des expériences de Western-blot sur des extraits protéiques de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle ou un ARNsi-Kif13A. Les niveaux d'expression de la kinésine Kif13A et de la sous-unité μ1A du complexe AP-1 sont ici évalués quantitativement en utilisant l'expression de la β-tubuline comme référence.

La figure 2 montre un diagramme présentant le pourcentage de mélanine dans les mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle ou un ARNsi-Kif13A. La quantité de mélanine dans les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-contrôle est considérée comme étant égale à 100%. La quantité de mélanine a été déterminée par mesure de la densité optique du lysat cellulaire à une longueur d'onde de 492 nm.

La figure 3 montre des photos en microscopie électronique de coupes de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle ou avec un ARNsi-Kif13A.

La figure 4 présente les résultats obtenus par des expériences de Western-blot sur des extraits protéiques de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle ou un ARNsi-μ1A.

L'expression des sous-unités μ1 et γ-adaptine du complexe AP-1 est ici évaluée quantitativement en utilisant le niveau d'expression de la β-tubuline comme référence.

Les figures 5A et 5B montrent des diagrammes présentant les pourcentages de cellules blanches, c'est-à-dire des mélanocytes ne contenant pas de mélanosome mature pigmenté, parmi les mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle, un ARNsi-μ1A ou un ARNsi-γ-adaptine (Figure 5A) ou avec la combinaison d'un ARNsi-γ-adaptine et d'un ARNsi-μ1A (Figure 5B). Ces mesures ont été effectuées par comptage direct en microscopie optique (contraste de phase).

La figure 6 montre un diagramme présentant le pourcentage de mélanine dans les mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle, un ARNsi-μ1A ou la combinaison d'un ARNsi-γ-adaptine et d'un ARNsi-μ1A. La quantité de mélanine dans les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-contrôle est considérée comme étant égale à 100%. La quantité de mélanine a été déterminée par mesure de la densité optique du lysat cellulaire à une longueur d'onde de 492 nm.

La figure 7 montre des photos en microscopie électronique de coupes de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle et avec un ARNsi-μ1A. Les chiffres romains sur les photos correspondent aux stades de maturation des mélanosomes présents dans la cellule.

Description détaillée de l'invention

Les inventeurs ont démontré, de manière surprenante, que la synthèse de pigments mélaniques pouvait être diminuée au moyen d'un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou d'un inhibiteur d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier au moyen d'un acide nucléique bloquant l'expression d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec AP-1 dans les mélanocytes. Ils ont en effet observé qu'un tel acide nucléique était non seulement capable de perturber le transport des enzymes de la mélanogenèse de l'appareil de Golgi vers les pré-mélanosomes, bloquant ainsi la maturation de ces organites, mais également de diminuer l'expression des enzymes de la mélanogenèse. Les inventeurs ont ainsi révélé que ce type d'acide nucléique permettait de diminuer ou d'inhiber la synthèse de mélanine dans les mélanocytes en agissant sur différentes étapes de la mélanogenèse et constituait donc de nouveaux agents de dépigmentation particulièrement efficaces.

La présente invention concerne, tout d'abord, une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un inhibiteur d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif13A, un inhibiteur d'une sous-unité du

complexe adaptateur AP-1, ou un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine intergissant avec celui-ci.

Le terme « AP-1 » utilisé dans le présent document se réfère au complexe adaptateur AP-1 qui intervient dans le réseau trans-Golgi. Il ne doit pas être confondu avec le facteur de transcription du même nom qui est constitué de protéines codées par des gènes membres des familles jun et fos. Le complexe adaptateur AP-1 est composé de 4 sous-unités : γ, β1, σ1 et μ1 et l'inactivation d'une seule quelconque de ces sous-unités est suffisante pour déstabiliser le complexe et le rendre inopérant (Braun, 2007).

Dans un premier mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier de la kinésine Kif13A.

La présente invention concerne tout type d'inhibiteur d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier de Kif 13A. L'inhibiteur peut être toute molécule capable de diminuer l'activité ou l'expression de la kinésine. L'inhibiteur peut être, sans y être limité, une petite molécule, un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

Le terme « petite molécule » fait référence à une molécule de moins de 1 000 daltons, notamment des composés organiques ou inorganiques. Les petites molécules inhibitrices de kinésine comprennent, sans y être limité, l'acepromazine, la chlorfenethazine, la chlorpromazine, la N-methyl chlorpromazine, la cyamemazine, la fluphenazine, la mepazine, la methotrimeprazine, la methoxypromazine, la norchlorpromazine, la perazine, la perphenazine, la phenothiazine, la prochlorperazine, la promethazine, la propiomazine, la putaperazine, la thiethylperazine, le thiopropazate, la thioridazine, la trifluoperazine, la triflupromazine ainsi que les molécules inhibitrices décrites dans les demandes de brevet et brevets WO 01/98278, WO 02/057244, WO 02/079169, WO 02/057244, WO 02/056880, WO 03/050122, WO 03/050064, WO 03/049679, WO 03/049678, WO 03/049527, WO 03/079973, US 6,890,933, WO 2008/070739, WO 2006/060737, WO 2006/119146 et US 6,777,200.

Selon un mode de réalisation, l'inhibiteur est un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif. Tel qu'utilisé ici, le terme « peptide dominant négatif » se réfère à un peptide comprenant au moins une partie d'une kinésine interagissant avec AP-1 et capable de supprimer ou de diminuer son activité. De manière préférée, le peptide dominant négatif est constitué uniquement de la partie de la kinésine interagissant avec AP-1, c'est-à-dire la partie correspondant à la queue de la kinésine. Ce peptide est donc capable d'interagir avec le complexe AP-1 mais, en absence de la partie

correspondant à la tête de la kinésine, est incapable de se déplacer le long des microtubules et ainsi de remplir sa fonction.

Plusieurs peptides dominants négatifs pour la kinésine Kif13A ont déjà été décrits. Notamment, un peptide dominant négatif de Kif13A a été obtenu en exprimant uniquement la partie de la protéine Kif13A correspondant à la queue de la kinésine (Nakagawa et al., 2000).

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'inhibiteur de la kinésine est un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine. De tels acides nucléiques sont plus amplement détaillés ci-dessous.

Dans un deuxième mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1. La présente invention concerne tout type d'inhibiteur d'une des sous-unités du complexe adaptateur AP-1. Par inhibiteur d'une des sous-unités du complexe adaptateur AP-1 est entendu toute molécule capable de diminuer l'activité ou l'expression d'une des sous-unités du complexe adaptateur AP-1. L'inhibiteur peut être, sans y être limité, une petite molécule, un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif. De préférence, l'inhibiteur est un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif. Notamment, les inhibiteurs des sous-unités γ et $\mu 1$ sont préférés.

Le terme « petite molécule » fait référence à une molécule de moins de 1 000 daltons, notamment des composés organiques ou inorganiques.

Plusieurs peptides dominants négatifs pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ont déjà été décrits. Notamment, un mutant dominant négatif de la sous-unité $\mu 1$ a été obtenu en introduisant une mutation dans la poche liant la tyrosine et est décrit dans Wonderlich et al (2008, J. Biol. Chem., Vol. 283, 3011-3022).

L'inhibiteur peut être un anticorps spécifique d'une des sous-unités de AP-1. Plusieurs de ces anticorps sont disponibles commercialement, par exemple des anticorps spécifiques de la sous-unité γ ou de la sous-unité $\beta 1$ (Sigma-Aldrich).

Par inhibiteur, il est également entendu dans la présente demande toute molécule capable de diminuer ou d'empêcher la fixation d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 sur les autres sous-unités du complexe, c'est-à-dire toute molécule capable de diminuer ou empêcher la formation du complexe AP-1. Par exemple, la molécule inhibitrice peut être capable de se fixer sur une des sous-unités de AP-1 et de provoquer un

changement de conformation empêchant la fixation de ladite sous-unité avec l'une ou plusieurs des autres sous-unités de AP-1 et ainsi bloquer la formation du complexe AP-1. Elle peut également masquer des domaines d'interaction entre les sous-unités.

Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, l'inhibiteur du complexe adaptateur AP-1 est un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine. De tels acides nucléiques sont plus amplement détaillés ci-dessous.

Dans un troisième mode préféré de l'invention, ledit inhibiteur est un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci, en particulier la kinésine Kif13A. La présente invention concerne tout type d'inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci. De préférence, la kinésine est Kif 13A. De préférence, la sous-unité de AP-1 est la sous-unité β1. La queue de la kinésine Kif13A interagit avec la sous-unité β1 du complexe AP-1 (Nakagawa et al., 2000). L'inhibiteur peut être toute molécule capable de diminuer ou de supprimer l'interaction entre la kinésine et le complexe AP-1. L'inhibiteur peut être, sans y être limité, une petite molécule, un aptamère ou un anticorps. De préférence, l'inhibiteur est un anticorps dirigé contre le domaine de la sous-unité β1 interagissant avec Kif13A ou contre le domaine de la queue de la kinésine Kif13A interagissant avec la sous-unité β1. L'anticorps se fixe sur l'une ou l'autre des molécules et bloque ainsi l'interaction entre Kif13A et le complexe AP-1. Par ailleurs, l'inhibiteur pourrait également être un leurre reproduisant le domaine de la sous-unité β1 interagissant avec Kif13A ou le domaine de la queue de la kinésine Kif13A interagissant avec la sous-unité β1, ce leurre entrant en compétition avec Kif13A ou AP-1 pour l'interaction entre ces deux éléments.

Le terme « anticorps », tel qu'utilisé dans la présente invention, inclut les anticorps monoclonaux, les anticorps chimères, les anticorps humanisés, les anticorps recombinants et les fragments desdits anticorps. Par fragment d'anticorps, on entend par exemple les fragments F(ab)2, Fab, Fab' ou sFv. Selon un mode de réalisation particulier, l'anticorps peut être un IgG, IgM, IgA, IgD ou IgE, de préférence un IgG ou un IgM. Les méthodes de production d'anticorps sont bien connues de l'homme du métier.

Le terme « aptamère » tel qu'utilisé ici désigne une molécule d'acide nucléique ou un peptide capable de se lier de manière spécifique à une sous-unité du complexe AP-1 ou à une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A. De manière préférée, les

aptamères sont des acides nucléiques, de préférence des ARN, comprenant généralement entre 5 et 120 nucléotides (Osborne et al., 1997). Ils peuvent être sélectionnés *in vitro* selon un procédé connu sous le nom de SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).

Dans la présente description, les termes « acide nucléique », « séquence nucléique», « polynucléotide », « oligonucléotide », « séquence nucléotidique », sont employés indifféremment et se réfèrent à un enchaînement de désoxyribonucléotides et/ou de ribonucléotides.

Le terme « ARNi » ou « ARN interférent » utilisé dans le présent document se réfère à tout ARN, simple ou double brin, qui interfère avec un ARN messager spécifique conduisant ainsi à sa dégradation et à la diminution de sa traduction en protéine. Ce terme englobe les petits ARN interférents (ARNsi), les ARN bicaténaires (ARNdb), les ARN monocaténaires (ARNsb), les ARN courts à épingle à cheveux (ARNsh), les ARNi ADN-dirigés (ddARNi) et les microARN (ARNmi).

Le terme « s'hybrider » signifie dans le présent document que des liaisons hydrogène de type Watson-Crick peuvent s'établir entre les bases complémentaires de deux brins d'acide nucléique pour former un duplexe. Le terme « capable de s'hybrider spécifiquement » signifie dans le présent document que l'acide nucléique utilisé selon l'invention est capable de s'hybrider sur un gène ou un transcrit codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1 dans des conditions d'hybridation de forte stringence. Les conditions de forte stringence sont largement décrites dans la littérature, par exemple dans Sambrook et al., (1989), Maniatis et al., (1982 ou l'une de ses récentes rééditions) et dans Ausubel et al., (1995), et ces conditions peuvent être adaptées par l'homme du métier en fonction de la taille des fragments nucléotidiques, selon les enseignements appropriés connus. A titre illustratif, des conditions de forte stringence sont avantageusement les suivantes. L'hybridation entre les deux brins (notamment ADN-ADN, ARN-ARN ou ADN-ARN) est réalisée en deux étapes : (a) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl / 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x solution de Denhardt, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (b) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendante de la taille de la sonde (par exemple, 42°C pour une sonde de taille supérieure à 100 nucléotides) suivie de deux lavages de 20 minutes à 20°C avec une solution 2 x SSC / 2 % SDS, un lavage de 20 minutes à 20°C avec une solution 0,1 x SSC /

0,1 % SDS. Le dernier lavage est effectué avec une solution 0,1 x SSC / 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille supérieure à 100 nucléotides.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « gène codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence génomique codant pour l'une des sous-unités γ, β1, σ1 et μ1 de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A. Ce terme englobe la région 5' non codante, la région contenant le codon d'initiation, la région codante et la région 3' non codante du gène. Le terme « gène codant pour une sous-unité de AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence génomique codant pour l'une des sous-unités γ, β1, σ1 et μ1 de AP-1. Ce terme englobe la région 5' non codante, la région contenant le codon d'initiation, la région codante et la région 3' non codante du gène. Le terme « gène codant pour une kinésine interagissant avec AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence génomique codant pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A. Ce terme englobe la région 5' non codante, la région contenant le codon d'initiation, la région codante et la région 3' non codante du gène.

Dans le cadre de la présente invention, le terme « ARNm codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence ribonucléotidique issue de la transcription du gène codant pour la protéine correspondante. Ce terme englobe les régions en 3' et en 5' non traduites (3'-UTR et 5'-UTR), les exons et, éventuellement, les introns non épissés. Le terme « ARNm codant pour une sous-unité de AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence ribonucléotidique issue de la transcription du gène codant pour la protéine correspondante. Le terme « ARNm codant pour une kinésine interagissant avec AP-1 » est utilisé pour désigner la séquence ribonucléotidique issue de la transcription du gène codant pour la protéine correspondante. Plus particulièrement, le terme « ARNm codant pour la kinésine Kif13A » est utilisé pour désigner la séquence ribonucléotidique issue de la transcription du gène codant pour la kinésine Kif13A.

Les séquences génomiques et les protéines peuvent être identifiées par leur numéro dans la base de données GeneID (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html). Ainsi les numéros d'entrée GeneID pour les sous-unités γ, β1, σ1 et μ1 de AP-1 sont respectivement GeneID164, GeneID162, GeneID1174, GeneID8907 et le numéro d'entrée GeneID pour la kinésine Kif13A de l'être humain est GeneID63971.

Les termes « mélanine », « mélanines » et « pigments mélaniques » sont ici utilisés indifféremment. Ils englobent les différents pigments susceptibles d'être synthétisés dans les mélanosomes, dont l'eumélanine ou la phéomélanine.

Le terme « composition pharmaceutique » se réfère, dans ce document, à une composition selon l'invention comprenant un support et/ou excipient pharmaceutiquement acceptable.

Le terme « composition cosmétique » se réfère, dans ce document, à une composition selon l'invention comprenant un support et/ou excipient cosmétiquement acceptable.

Le terme « agent dépigmentant » se réfère dans cette description à un agent actif capable d'inhiber ou de diminuer la synthèse de mélanine dans les mélanocytes et ainsi de blanchir la peau.

Les inhibiteurs utilisés selon l'invention sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans un mélanocyte, d'induire une diminution ou une suppression de l'expression ou de l'activité d'une ou plusieurs sous-unités d'AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A, ou d'induire une diminution ou suppression de l'interaction d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou du complexe AP-1 avec une kinésine interagissant avec celui-ci, en particulier la kinésine Kif13A, avec pour conséquence une baisse significative de la synthèse des pigments mélaniques.

Selon un mode préféré, les acides nucléiques utilisés selon l'invention sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans un mélanocyte, d'induire une diminution ou une suppression de l'expression d'une ou plusieurs sous-unités d'AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A, avec pour conséquence une baisse significative de la synthèse des pigments mélaniques. Selon un mode de réalisation particulier, les acides nucléiques utilisés selon l'invention sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans un mélanocyte, d'induire une diminution ou une suppression de l'expression d'une ou plusieurs sous-unités d'AP-1, avec pour conséquence une baisse significative de la synthèse des pigments mélaniques. Selon un autre mode de réalisation particulier, les acides nucléiques utilisés selon l'invention sont capables, lorsqu'ils sont introduits dans un mélanocyte, d'induire une diminution ou une suppression de l'expression d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif13A, avec pour conséquence une baisse significative de la synthèse des pigments mélaniques Ces acides nucléiques peuvent agir au niveau transcriptionnel ou traductionnel.

Par « diminution » de l'expression est entendue, par exemple, une diminution de 30, 50, 70, 80, 90 ou 95% du produit de l'expression du gène.

Les acides nucléiques utilisés selon l'invention peuvent être de l'ADN, de l'ARN ou des molécules chimèriques ADN/ARN. Ils peuvent être sous forme simple brin ou en duplexe ou en un mélange des deux. Ils peuvent comprendre éventuellement au moins un nucléotide modifié ou non naturel tel que, par exemple, un nucléotide comportant une base modifiée, telle que l'inosine, la méihyl-5-désoxycytidine, la diméihylarnino-5-désoxyuridine, la désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine ou toute autre base modifiée permettant l'hybridation. Les acides nucléiques utilisés selon l'invention peuvent également être modifiés au niveau de la liaison internucléotidique comme par exemple les phosphorothioates, les H-phosphonates ou les alkyl-phosphonates, ou au niveau du squelette comme par exemple les alpha- oligonucléotides, les 2'-O-alkyl ribose ou les PNA (Peptid Nucleic Acid) (M. Egholm et al., 1992). Ces acides nucléiques peuvent être préparés par toutes méthodes connues de l'homme du métier telles que, par exemple, la synthèse chimique, le criblage de banques, la transcription *in vivo* ou des techniques d'ADN recombinant ou d'amplification.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, l'acide nucléique peut être un ADN qui, lorsqu'il est introduit dans une cellule induit la production d'un ARN interférent (ddRNAi) permettant l'inhibition de l'expression d'un gène cible dans la cellule. Cette technologie est connue de l'homme du métier sous le nom d'interférence ARN ADN-dirigé.

Dans un autre mode de réalisation préféré, l'acide nucléique est un ARN, de préférence un ARN interférent (ARNi). Ces ARN peuvent être des ARN naturels, synthétiques ou produits par des techniques de recombinaison. Ils peuvent également contenir des nucléotides modifiés ou des modifications chimiques leur permettant, par exemple, d'augmenter leur résistance aux nucléases et ainsi d'augmenter leur durée de vie dans la cellule. L'interférence par l'ARN est un phénomène bien connu de l'homme du métier qui permet d'inhiber de manière spécifique l'expression du gène cible au niveau post-transcriptionnel. De nombreux brevets et demandes de brevet ont décrit l'utilisation de molécules d'ARNi pour inhiber l'expression génique, par exemple, dans les documents WO 99/32619, US 20040053876, US 20040102408 et WO 2004/007718. De manière préférée, la molécule d'ARNi est une molécule d'ARNsi sous forme double brin d'environ 15 à 50 nucléotides de longueur, de préférence d'environ 15 à 30 nucléotides.

Dans un mode de réalisation alternatif de la présente invention, l'acide nucléique utilisé pour diminuer ou supprimer l'expression d'une sous-unité d'AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif113A, est un acide nucléique antisens. De

manière particulière, l'acide nucléique utilisé pour diminuer ou supprimer l'expression d'une sous-unité d'AP-1 est un acide nucléique antisens. D'une autre manière particulière, l'acide nucléique utilisé pour diminuer ou supprimer l'expression d'une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kifl13A, est un acide nucléique antisens. Cet acide nucléique antisens peut être complémentaire de tout ou partie d'un acide nucléique sens codant pour une sous-unité d'AP-1 ou une kinésine interagissant avec AP-1. De manière particulière, l'acide nucléique antisens peut être complémentaire de tout ou partie d'un acide nucléique sens codant pour une sous-unité d'AP-1. D'une autre manière particulière, l'acide nucléique antisens peut être complémentaire de tout ou partie d'un acide nucléique sens codant pour une kinésine interagissant avec AP-1. Il peut, par exemple être complémentaire d'un ARNm. L'acide nucléique antisens comprend généralement une séquence nucléotidique complémentaire d'au moins une partie du transcrit d'une sous-unité d'AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec AP-1, et s'hybride de manière sélective à ces transcrits par des interactions de type Watson-Crick classiques. De manière particulière, l'acide nucléique antisens comprend généralement une séquence nucléotidique complémentaire d'au moins une partie du transcrit d'une sous-unité d'AP-1. D'une autre manière particulière, l'acide nucléique antisens comprend généralement une séquence nucléotidique complémentaire d'au moins une partie du transcrit d'une kinésine interagissant avec AP-1. Le ou les acides nucléiques inhibiteurs de type antisens peuvent donc se fixer aux transcrits d'un gène codant pour les sous-unités γ, $\beta 1$, $\sigma 1$ et $\mu 1$ de AP-1 ou codant pour une kinésine interagissant avec AP-1 et, par exemple, bloquer l'accès à la machinerie cellulaire de traduction à l'extrémité 5' du transcrit d'intérêt lorsque ce dernier est un ARNm, gêner sa traduction en protéine, et permettre la suppression de l'expression du transcrit d'intérêt *in vivo* (Kumar et al, 1993). De manière particulière, le ou les acides nucléiques inhibiteurs de type antisens peuvent se fixer aux transcrits d'un gène codant pour les sous-unités γ, $\beta 1$, $\sigma 1$ et $\mu 1$ de AP-1. D'une autre manière particulière, le ou les acides nucléiques inhibiteurs de type antisens peuvent se fixer aux transcrits d'un gène codant pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kifl13A. De tels polynucléotides ont été par exemple décrits dans le brevet EP 0 092 574. De manière préférée, l'acide nucléique antisens est complémentaire d'un ARNm codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kifl13A. De manière particulière, l'acide nucléique antisens est complémentaire d'un ARNm codant pour une sous-unité de AP-1. D'une autre manière particulière, l'acide nucléique antisens est complémentaire d'un ARNm codant pour une kinésine interagissant avec AP-1, en

particulier Kif113A. Lorsque l'acide nucléique inhibiteur est de type antisens, il peut couvrir toute ou partie de la séquence codante du transcrit d'intérêt, ou toute ou partie de la séquence non codante en 3' ou en 5'. De préférence, l'acide nucléique inhibiteur antisens est complémentaire de la séquence de fixation du ribosome et d'initiation de la traduction. L'acide nucléique inhibiteur a généralement une longueur d'au moins 10 ribonucléotides, par exemple, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 ribonucléotides de long, de préférence de 15 à 30 ribonucléotides de long.

Un acide nucléique antisens utilisé selon l'invention peut être synthétisé par des méthodes de synthèse chimique ou par des techniques d'ADN recombinant connues de l'homme du métier. L'ADN ou l'ARN antisens peut notamment être synthétisé chimiquement, produit par transcription *in vitro* de matrices linéaires (par exemple, par PCR) ou circulaires (par exemple, à partir de vecteurs viraux ou non), ou produit par transcription *in vivo* à partir de vecteurs viraux ou non. Les acides nucléiques antisens peuvent être modifiés pour augmenter leur stabilité, leur résistance aux nucléases, leur spécificité ou encore leurs propriétés pharmacologiques. Par exemple, un acide nucléique antisens peut comporter des nucléotides modifiés utilisés pour augmenter la stabilité des duplexes formés entre les acides nucléiques sens et antisens.

Selon un autre mode de réalisation, l'acide nucléique inhibiteur est de type ribozyme. Les ribozymes sont des molécules d'ARN catalytiques qui possèdent une activité ribonucléase et sont ainsi capables de cliver des acides nucléiques simple-brin, tels que des ARNm dont ils sont complémentaires. Des ribozymes spécifiques des transcrits codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1 peuvent être conçus, synthétisés et produits selon des méthodes bien connues de l'homme du métier (voir, par exemple, Fanning and Symonds, 2006). Le ribozyme présente généralement deux régions distinctes. Une première région qui présente une certaine spécificité pour le transcrit d'intérêt, celui d'un gène codant pour une sous-unité de AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1, et est donc capable de se lier à ce dernier, alors que la deuxième région confère au ribozyme son activité catalytique de clivage, ligation et épissage du transcrit d'intérêt. De manière particulière, la première région présente une certaine spécificité pour le transcrit d'intérêt, celui d'un gène codant pour une sous-unité de AP-1. D'une autre manière particulière, la première région présente une certaine spécificité pour le transcrit d'intérêt, celui d'un gène codant pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif113A. Divers types de ribozymes peuvent être utilisés comme par

exemples les ribozymes à tête de marteau ou ribozymes circulaires, les ribozymes en épingles à cheveux ou les ribozymes en lasso.

Les ARN interférents ou les acides nucléiques antisens utilisés selon l'invention peuvent être administrés sous la forme de précurseurs ou de molécules d'ADN codant pour ceux-ci.

L'acide nucléique utilisé selon l'invention a généralement une longueur de 15 à 50 nucléotides de long, de préférence de 15 à 30 nucléotides de long.

Dans la présente invention, l'acide nucléique est capable de s'hybrider spécifiquement à un gène ou transcrit codant pour une sous-unité du complexe AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif113A. Selon un mode de réalisation, l'acide nucléique est capable de s'hybrider spécifiquement à un gène ou transcrit codant pour une sous-unité du complexe AP-1. Selon un autre mode de réalisation, l'acide nucléique est capable de s'hybrider spécifiquement à un gène ou transcrit codant pour une kinésine interagissant avec AP-1, en particulier Kif113A. Il est néanmoins entendu que l'acide nucléique selon l'invention n'a pas besoin de présenter une complémentarité de 100% avec la séquence cible pour s'hybrider spécifiquement. En particulier, un acide nucléique présentant un degré de complémentarité au moins égal à 90 % environ est capable de s'hybrider spécifiquement. De préférence, le degré de complémentarité entre l'acide nucléique de l'invention et la séquence cible est égal à 95, 96, 97, 98, 99 ou 100%.

Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences capables de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour la kinésine Kif13A. De préférence, l'acide nucléique comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences choisies parmi les séquences SEQ ID No. 1 à 6 et 11 à 24. Dans un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences capables de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1. De préférence, l'acide nucléique comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences choisies parmi les séquences SEQ ID No. 5, 6 et 11 à 24. De manière tout particulièrement préférée, l'acide nucléique comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences capables de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour la sous-unité μ1A ou γ-adaptine de AP-1. Dans un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une ou plusieurs

séquences capables de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour la kinésine Kif13A. De préférence, l'acide nucléique comprend ou consiste en une ou plusieurs séquences choisies parmi les séquences SEQ ID No. 1 à 4.

Dans un mode de réalisation tout particulièrement préféré, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une molécule d'ARN interférent double brin formée par l'un des couples suivants : SEQ ID Nos. 1 et 2, SEQ ID Nos. 3 et 4, SEQ ID Nos. 5 et 6, SEQ ID Nos. 11 et 12, SEQ ID Nos. 13 et 14, SEQ ID Nos. 15 et 16, SEQ ID Nos. 17 et 18, SEQ ID Nos. 19 et 20, SEQ ID Nos. 21 et 22 et SEQ ID Nos. 23 et 24. Dans un mode de réalisation particulier, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une molécule d'ARN interférent double brin formée par l'un des couples suivants : SEQ ID Nos. 1 et 2 et SEQ ID Nos. 3 et 4. Dans un autre mode de réalisation particulier, l'acide nucléique utilisé selon l'invention comprend ou consiste en une molécule d'ARN interférent double brin formée par l'un des couples suivants : SEQ ID Nos. 5 et 6, SEQ ID Nos. 11 et 12, SEQ ID Nos. 13 et 14, SEQ ID Nos. 15 et 16, SEQ ID Nos. 17 et 18, SEQ ID Nos. 19 et 20, SEQ ID Nos. 21 et 22 et SEQ ID Nos. 23 et 24.

La présente invention concerne une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, un inhibiteur d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, ou un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci, en particulier un quelconque inhibiteur tel que défini dans la présente demande.

Selon un mode préféré, la présente invention concerne une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, tel que décrit dans la présente demande. Dans un mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique ou cosmétique comprend au moins un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, tel que décrit dans la présente demande. Dans un autre mode de réalisation particulier, la composition pharmaceutique ou cosmétique comprend au moins un acide nucléique comprenant ou consistant en une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un

gène ou un ARNm codant pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, tel que décrit dans la présente demande. De manière préférée, la kinésine est la kinésine Kif13A.

De manière préférée, la composition est une composition pharmaceutique ou cosmétique dont la formulation est adaptée à une administration topique. L'inhibiteur utilisé dans la composition est présent en une quantité efficace. Selon le type d'inhibiteur utilisé, une quantité efficace est une quantité permettant d'obtenir une diminution ou une suppression de l'expression ou de l'activité d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, ou une diminution ou une suppression de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci.

Selon le mode préféré où l'inhibiteur est un acide nucléique, l'acide nucléique utilisé dans la composition est présent en une quantité efficace, par exemple, allant de 0,00001% à 10% et de préférence de 0,0003% à 3% (p/p) du poids total de la composition.

Le terme « quantité efficace » tel qu'utilisé dans la présente demande est une quantité d'inhibiteur utilisé selon l'invention permettant d'obtenir une diminution significative de la synthèse de mélanine. Selon un mode préféré, le terme « quantité efficace » tel qu'utilisé dans la présente demande est une quantité d'acide nucléique utilisé selon l'invention permettant d'obtenir une diminution significative de la synthèse de mélanine. Cette diminution peut, notamment, se traduire par un changement visible de la couleur de la peau. Cette diminution peut, par exemple, être de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 % de la quantité de mélanine présente dans des cellules non traitées. Elle peut être mesurée par l'une des méthodes décrites dans les exemples ou connues de l'homme du métier.

La composition selon l'invention peut comprendre plusieurs inhibiteurs dont le type et la cible peuvent être identiques ou différentes. Elle peut comprendre des inhibiteurs soit d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, soit d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, soit de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci. Elle peut comprendre des inhibiteurs de nature similaire (par exemple uniquement des acides nucléiques) ou différentes (par exemple des aptamères, des anticorps et/ou des acides nucléiques). Selon un mode préféré, cette composition peut comprendre plusieurs acides nucléiques comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour une

kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, et de diminuer ou supprimer l'expression cette protéine, tels que décrits dans la présente demande. Elle peut également comprendre une combinaison de plusieurs acides nucléiques inhibiteurs ciblant soit une même sous-unité d'AP-1, soit des sous-unités d'AP-1 différentes, soit une même kinésine interagissant avec AP-1, soit différentes kinésines interagissant avec AP-1. Dans un mode de réalisation particulier, la composition peut comprendre plusieurs acides nucléiques comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression cette protéine, tels que décrits dans la présente demande. Elle peut également comprendre une combinaison de plusieurs acides nucléiques inhibiteurs ciblant soit une même sous-unité d'AP-1, soit des sous-unités d'AP-1 différentes. Dans un autre mode de réalisation particulier, la composition peut comprendre plusieurs acides nucléiques comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, et de diminuer ou supprimer l'expression cette protéine, tels que décrits dans la présente demande. Elle peut également comprendre une combinaison de plusieurs acides nucléiques inhibiteurs ciblant soit une même kinésine interagissant avec AP-1, soit différentes kinésines interagissant avec AP-1.

La composition selon l'invention peut également comprendre en outre une ou plusieurs substances actives additionnelles visant à renforcer les effets recherchés, par exemple, l'acide ellagique ; l'arbutine ; le résorcinol ; la vitamine C ; le pantothénate ; l'acide kojique ; des extraits placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec la mélanotropine (MSH), son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; des polyols tels que la glycérine, le glycol ou le propylène glycol ; des vitamines ; des agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique ; des alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique; l'acide ascorbique ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol ; le palmitate, le propionate ou l'acétate ; des agents anti-glycation et/ou antioxydants tels que le tocophérol, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, le pyrophosphate de thiamine, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; des agents anti-inflammatoires; des agents apaisants et leurs mélanges ; des filtres solaires chimiques ou physiques et des acides désoxyribonucléiques ou ribonucléiques, et les dérivés de ceux-ci.

La composition selon l'invention peut se présenter sous toute forme galénique normalement utilisée pour une application topique notamment sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion d'huile dans une phase polymérique telle que les nanosphères et les nanocapsules ou mieux des vésicules lipidiques de type ionique et/ou non-ionique tels que décrit dans le brevet français FR 2534487.

En particulier, la composition selon l'invention peut comprendre au moins un inhibiteur, de préférence un acide nucléique inhibiteur, décrit dans la présente demande, encapsulé dans un liposome.

Par « liposome », on entend désigner selon la présente invention des petites vésicules fabriquées artificiellement et constituées de lamelles de phospholipides, séparées les unes des autres par des compartiments aqueux. Ils ont une structure très proche de celle des membranes cellulaires, ce qui leur permet de fusionner avec elles en libérant le ou les principes actifs qu'ils contiennent. Les liposomes utilisables selon l'invention peuvent être des liposomes multilamellaires ou MLV (MultiLamellar Vesicle), des petits liposomes unilamellaires ou SUV (Small Unilamellar Vesicle), ou des gros liposomes unilamellaires ou LUV (Large Unilamellar Vesicle). Le liposome peut également être un liposome non ionique dont la paroi n'est plus constituée de phospholipides mais de lipides non ioniques.

La composition selon l'invention peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème blanche ou colorée, d'une pommade, d'un lait, d'une lotion, d'un sérum, d'une pâte ou d'une mousse. Elle peut éventuellement être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide pulvérulent ou non, par exemple sous forme stick. Elle peut encore se présenter sous la forme de patchs, de crayons, de pinceaux et d'applicateurs autorisant une application localisée sur les taches du visage ou des mains. Elle peut être utilisée comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage.

De façon connue, la composition selon l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans les domaines cosmétique et dermatologique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les pigments, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés. Ces adjuvants, selon leur nature,

peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, dans les vésicules lipidiques et/ou dans les nanoparticules.

Lorsque la composition cosmétique ou dermatologique de l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5 à 80% en poids, et de préférence de 5 à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5% à 20% en poids par rapport au poids total de la composition.

Comme huiles utilisables en association avec les inhibiteurs selon l'invention, en particulier avec les acide nucléiques selon l'invention, on peut citer les huiles minérales telles que l'huile de vaseline ; les huiles d'origine végétale telles que l'huile d'avocat ou l'huile de soja ; les huiles d'origine animale telles que la lanoline ; les huiles de synthèse telles que la perhydrosqualène ; les huiles siliconées telles que le cyclométhicone et les huiles fluorées telles que les perfluoropolyéthers. On peut aussi utiliser comme matière grasses des alcools gras comme l'alcool cétylique, des acides gras ou encore des cires telles que la cire de Carnauba ou l'ozokérite.

Comme émulsionnants et coémulsionnants utilisables en association avec les acides nucléiques selon l'invention, on peut citer par exemple des esters d'acide gras et de polyéthylène glycol tels que le stéarate de PEG- 20 et les esters d'acide gras et de glycérine tels que le stéarate de glycéryle.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables en association avec les inhibiteurs, en particulier les acides nucléiques, selon l'invention, on peut utiliser, par exemple, les polymères carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides, les gommes naturelles et les argiles. Comme gélifiants lipophiles, on peut utiliser, par exemple, les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras, la silice hydrophobe ou les polyéthylènes.

La présente invention concerne aussi l'utilisation d'une composition selon l'invention, comme agent cosmétique. Selon un mode de réalisation préférée, l'agent cosmétique est un agent dépigmentant.

La présente invention concerne une composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, un

inhibiteur d'une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, ou un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et une kinésine interagissant avec celui-ci, pour une utilisation dans le traitement de troubles pigmentaires. Selon un mode particulier, l'inhibiteur peut être, sans y être limité, une petite molécule, un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

Selon un mode préféré, la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant au moins un acide nucléique comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, pour le traitement de troubles pigmentaires. De manière particulière, la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprend au moins un acide nucléique comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, pour le traitement de troubles pigmentaires. D'une autre manière particulière, la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprend au moins un acide nucléique comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une kinésine interagissant avec le complexe adaptateur AP-1, en particulier Kif113A, et de diminuer ou supprimer l'expression de cette protéine, pour le traitement de troubles pigmentaires.

La présente invention concerne également l'utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un trouble pigmentaire.

La présente invention a également pour objet un procédé cosmétique ou pharmaceutique de dépigmentation et/ou de blanchiment de la peau humaine ou de traitement ou prévention d'un trouble pigmentaire consistant à appliquer sur la peau à dépigmenter une composition cosmétique ou pharmaceutique selon l'invention.

Les troubles pigmentaires à traiter peuvent être des hyperpigmentations ou des hypopigmentations. Dans le cas des hyperpigmentations locales, celles-ci peuvent résulter de certains troubles mélanocytaires et se caractérisent par une accumulation de mélanine. Le trouble pigmentaire à traiter peut être une hyperpigmentation telle que par exemple un mélasma idiopathique (non associé à une grossesse ou à la prise de contraceptifs oraux), un mélasma (aussi appelé chloasma ou masque de grossesse), un lentigo actinique (aussi

appelé lentigo sénile, tâche sénile, tâche de vieillesse ou lentigo solaire), des séquelles pigmentaires d'acné, des pigmentations post-inflammatoires dues à une abrasion, une brûlure, une cicatrice, une dermatose et/ou une allergie de contact, des pigmentations dues à la dermite des prés, des pigmentations dues au lierre vénéneux (aussi appelé plante Poison Ivy), des éphélides (aussi appelés tâches de rousseur), des naevus tels que le naevus géant congénital, le naevus de Becker ou le naevus de Spitz. Les hyperpigmentations peuvent être des hyperpigmentations à déterminisme génétique ou des hyperpigmentations d'origine métabolique ou médicamenteuse. Elles peuvent être d'origine accidentelle et causées par exemple par une photosensibilisation ou une cicatrisation post-lésionnelle. Le trouble pigmentaire peut également se traduire par une hypopigmentation, tels que le vitiligo. Dans un mode de réalisation préférée, le trouble pigmentaire à traiter est une hyperpigmentation. De préférence, l'hyperpigmentation est un mélasma, un mélasma idiopathique ou un lentigo actinique.

Dans le cas d'une hyperpigmentation, le traitement a pour but de dépigmenter les zones hyperpigmentées et ainsi de diminuer ou de supprimer les symptômes visibles associés à ces troubles pigmentaires spécifiques.

Dans le cas d'une hypopigmentation, le traitement peut avoir pour but d'uniformiser la couleur de la peau en dépigmentant les zones pigmentées résiduelles.

La prévention a pour but, dans le cas d'une hyperpigmentation, d'éviter l'apparition de zones hyperpigmentées et, dans le cas d'une hypopigmentation, d'éviter l'apparition de disparités de couleur de peau.

Les exemples qui suivent sont présentés dans un but illustratif et non limitatif.

Exemples

Matériels et Méthodes

Cellules, Anticorps et Réactifs

La lignée mélanocytaire humaine MNT-1 est maintenue en culture comme décrit précédemment (Raposo et al., 2001).

Les anticorps utilisés dans cet exemple sont listés ci-dessous :

- Anticorps polyclonal de lapin anti β-tubuline (ab6046, Abcam®) ;
- Anticorps polyclonal de lapin anti-μ1A (sous-unité de AP-1) (Dr. Linton Traub, Université de Pittsburg) ;
- Anticorps monoclonal de souris anti-γ-adaptine (clone 100/3 ; SIGMA®) ;

- Anticorps monoclonal de souris anti-Tyrp1 (Tyrosinase related protein-1) issu du surnageant de culture TA99 (Mel-5) (American Type Culture Collection, Manassas, VA) ;
- Anticorps polyclonal anti-tyrosinase (ab15175, Abcam®) ;
- Anticorps monoclonal anti-Pmel 17 (HMB50, Labvision®) ;
- Anticorps polyclonal de lapin anti-Kif13A (Bethyl Laboratories, Montgomery, US) ;
- Anticorps polyclonal de lapin et monoclonal de souris Anti-Peroxidase de raifort (HRP) (Jackson Immunoreserach®); et
- Anticorps de lapin Anti-souris couplé au Texas Red (Invitrogen®).

Les réactifs autres que les anticorps utilisés dans cet exemple sont listés ci-dessous :

- Protéine-A couplée à des particules d'or colloïdal (Centre de microscopie cellulaire de l'université d'Utrecht, Pays-Bas) ;
- Protéine G Agarose (Invitrogen®, référence catalogue 15920-010)
- Kit pour western blot contenant des gels NuPAGE Bis-Tris 4-12%, des gels NuPAGE 3-8% Tris-Acétate, du tampon MES-SDS de migration et de transfert (Invitrogen®) ;
- Kit ECL « western blotting detection reagents » (Amersham®) pour la révélation de l'activité de la HRP sur membranes PVDF (Millipore®) ;
- Paraformaldéhyde (PFA) et sérum albumine bovine (BSA) (Sigma®) ;
- Saponine (Carlo Erba Réactifs®) ; et
- Milieu de montage des lamelles de microscopie de fluorescence « ProLong® Gold Antifade Reagent » avec DAPI (Invitrogen®).

Séquences des ARN interférents

SEQ ID N°1	ARNsi Kif13A sens	GGCGGGUAGCGAAAGAGUA dTdT
SEQ ID N°2	ARNsi Kif13A anti-sens	UACUCUUUCGCUACCCGCC dAdG
SEQ ID N°5	ARNsi AP-1 µ1A sens	GGCAUCAAGUAUCGGAAGA dTdT
SEQ ID N°6	ARNsi AP-1 µ1A anti-sens	UCUUCCGAUACUUGAUGCC dTdT
SEQ ID N°7	ARNsi AP-3 (β3A) sens	GGCUGAUCUUGAAGGUUUA dTdT
SEQ ID N°8	ARNsi AP-3 (β3A) anti-sens	UAAACCUUCAAGAUCAGCC dTdT
SEQ ID N°9	ARNsi contrôle sens	UUCUCCGAACGUGUCACGU dTdT
SEQ ID N°10	ARNsi contrôle anti-sens	ACGUGACACGUUCGGAGAA dTdT

SEQ ID N°19	ARNsi γ-adaptine sens	ACCGAAUUAAGAAAGUGGU dTdT
SEQ ID N°20	ARNsi γ-adaptine anti-sens	ACCACUUUCUUAAUUCGGU dTdT

Interférence par l'ARN

$1x10^6$ cellules ont été ensemencées dans une boîte de culture de 10 cm pendant deux jours, puis lavées deux fois avec du PBS préchauffé avant d'être mises en culture dans 4 mL de milieu OptiMem (Invitrogen®) dans une étuve pendant 40 min.

Une solution A a été obtenue en mélangeant 10 µL d'ARNsi à 20 µM avec 840 µL de milieu OptiMem et en incubant ce mélange durant 20 min à température ambiante. Une solution B a été obtenue en mélangeant 50 µL d'Oligofectamine™ (Invitrogen®) avec 150 µL de milieu OptiMem et en incubant ce mélange durant 20 min à température ambiante. Les solutions A et B ont ensuite été mélangées et laissées 20 min à température ambiante. Puis, ce mélange a été déposé sur les cellules qui ont été conservées à l'étuve durant 4 heures. 5 mL de milieu complet à 40 % de sérum de veau fœtal (SVF) ont ensuite été ajoutés sur les cellules. 24 heures plus tard, les cellules ont été récupérées et ensemencées dans des plaques de 6 puits avec une concentration de $1,5x10^5$ cellules/puits. Ce même protocole a été répété le lendemain en adaptant les volumes.

Western-Blot

Suite à l'interférence par l'ARN, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS, puis incubées avec 200 µL de tampon de lyse (50 Mm Tris, 150 mM NaCl, 10 Mm EDTA, 1 % de Triton, 1 % d'inhibiteur de protéases, pH 8) par puits sur la glace pendant 15 min. Les cellules ont été ensuite grattées, centrifugées (15000 rpm, 4°C) et les surnageants ont été collectés. La quantité de protéines totales a été mesurée par le kit « BCA Protein Assay » (Pierce®). 10 µg de chaque surnageant ont été déposés sur un gel et la migration a eu lieu pendant 35 min à 200 V. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF (Millipore®) pendant 1 heure à 30 V. Puis, la membrane a été saturée en tampon PBS / 0,1% Tween / 5 % BSA durant 1 heure à température ambiante, incubée 45 min avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon WB (PBS / 0,1 % Tween), rincée 3 fois 10 min avec du tampon WB, incubée 45 min avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la HRP dilué dans du tampon WB et rincée 3 fois 10 min dans du tampon WB. L'activité HRP a ensuite été révélée à l'aide du kit ECL « western blotting detection reagents » (Amersham®).

Microscopie de fluorescence

Les cellules préalablement ensemencées sur lamelles de verre ($0,5x10^5$ cellules/lamelle) ont été lavées deux fois avec du PBS préchauffé puis fixées durant 10 minutes dans une solution de PBS / 4% PFA. Après deux lavages à température ambiante avec du PBS, l'excès de PFA n'ayant pas réagi a été neutralisé par un traitement avec 50 mM Glycine / PBS pendant 10 minutes. Les sites de fixation non spécifiques ont ensuite été saturés par deux lavages de 3 minutes avec du PBS additionné de 2 mg/mL de BSA et les cellules ont été perméabilisées avec un tampon de perméabilisation (PBS / 2% BSA / 0,05% Saponine). Les lamelles ont alors été mises en contact avec 25 µL d'anticorps primaire dilué dans du tampon de perméabilisation pendant 45 minutes à température ambiante et l'excès d'anticorps a été éliminé par deux lavages de 3 minutes avec le tampon de perméabilisation. Les lamelles ont ensuite été incubées 45 minutes à température ambiante avec 25 µl d'anticorps secondaire dilué dans du tampon de perméabilisation. Après deux lavages de 3 minutes avec le tampon de perméabilisation suivis d'un lavage avec du PBS, les lamelles ont été montées sur des lames de microscope avec 15 µL de milieu de montage (ProLong® Gold Antifade Reagent avec DAPI, Invitrogen®) permettant d'atténuer la perte de fluorescence lors de l'observation.

Immunoprécipitation

Les cellules mélanocytaires ont été cultivées en flacons de $75cm^2$ jusqu'à confluence, puis lysées en tampon de lyse (50 Mm Tris, 150 mM NaCl, 10 Mm EDTA, 1 % de Triton, 1 % d'inhibiteur de protéases, pH 7,3) pendant 20 min à 4°c. Les cellules ont été ensuite grattées et centrifugées (15000 rpm, 4°C) et les surnageants ont été collectés. Les billes couplées à la protéine G agarose ont été lavées dans le tampon de lyse et 20 µL de ces billes ont été incubées avec les lysats pendant 1 h à 4°c sous rotation. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 4000 rpm et les surnageants ont été collectés puis incubés avec des billes lavées qui avaient été préalablement incubées pendant 1 h avec 1 µg d'anticorps de lapin (contrôle Kif13A) ou de souris anti-CD9 (contrôle γ-adaptine d'AP-1). L'immunoprécipitation est ensuite réalisée en centrifugeant les lysats à 4000 rpm et en mettant en contact les surnageants avec 20 µL de billes lavées préalablement incubées pendant 2 h à 4°c sous rotation avec 1 µg d'anticorps de lapin (contrôle Kif13a), anticorps anti-Kif13a (Kif13a), anticorps de souris anti-CD9 (contrôle γ-adaptine d'AP-1) ou

d'anticorps de souris anti-γ-adaptine (γ-adaptine d'AP-1). Les lysats ont ensuite été centrifugés à 4000 rpm, les surnageants collectés et déposés sur gel pour une analyse par Western-Blot.

Microscopie électronique

Les cellules mélanocytaires préalablement ensemencées dans des boîtes à 6 puits et traitées avec des ARNsi « contrôle » et ARNsi-Kif13A ou ARNsi-μ1A ont été fixées soit avec un mélange de PFA 2% et de glutaraldéhyde 2% (microscopie conventionelle) soit un mélange de PFA 2% et de glutaraldéhyde 0,5% (immunomarquages) dans un tampon phosphate 0.2 M pH 7,4 pendant 4 heures à température ambiante.

Microscopie conventionnelle : Après plusieurs lavages dans un tampon cacodylate de sodium 0,2M, les cellules ont été fixées avec une solution d'acide osmique 2% (OsO_4) pendant 45 min. Après rinçage avec de l'eau distillée, les cellules ont été déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol puis enrobées dans de la résine Epon 812. Après polymérisation pendant 48 heures à 60°C, des coupes ultrafines ont été réalisées, contrastées avec de l'acétate d'uranyl 4% pendant 5 min et observées au microscope électronique (Phillips CM120, FEI Company®). La prise d'images a été effectuée avec une caméra KeenView (SIS®, Allemagne).

Immunomarquages : Après plusieurs lavages dans un tampon phosphate 0,2 M contenant de la glycine 0.1 M, les cellules ont été préparées pour l'ultracryomicrotomie comme décrit précédemment dans le document Raposo et al. (1997).

En bref, les culots de cellules ont, tout d'abord, été enrobés dans de la gélatine à 10%.

Après solidification à 4°C, des blocs de 1 mm^3 ont été découpés et infusés dans du sucrose 2,3M durant 2h. Les blocs de cellules ont été congelés sur leur support et des coupes congelées ultrafines ont été réalisées avec un ultracryomicrotome (Leica®, Autriche). Les coupes récupérées sur des grilles de microscopie électronique, ont été immunomarquées avec des anticorps anti-Tyrp1 et anti-Pmel17. Ces anticorps ont été visualisés avec de la protéine A couplée à des particules d'or colloïdal. Les coupes ont été contrastées et enrobées dans un mélange d'acétate d'uranyl et de méthylcellulose avant observation au microscope électronique (Phillips CM120, FEI Company®). La prise d'images a été effectuée avec une caméra KeenView (SIS®, Allemagne).

Quantification de la Mélanine

Après l'interférence par l'ARN, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et incubées avec 150 µL de tampon Mélanine (50 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 Mm NaCl, 1% d'inhibiteur de protéases, pH 7,4). Elles ont ensuite été grattées et regroupées en une seule fraction avant d'être soniquées pendant 20 s à intensité maximale. 10µL ont ensuite été prélevés pour quantifier les protéines (avec le kit BCA Protein Assay, Pierce) et 200 µg de protéines ont été prélevés et centrifugés à 15000 rpm durant 15 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot lavé avec 500 µL d'une solution éthanol / éther (1:1). Enfin, le culot a été solubilisé avec 230 µL d'une solution 2 M NaOH / 20% DMSO à 55°C. Une fois solubilisé, 200µL ont été prélevés afin de mesurer la densité optique à 492 nm.

Quantification des cellules blanches

La quantification a été réalisée sur cellules préparées pour l'immunofluorescence grâce à un microscope à épifluorescence. Les cellules ont été observées en contraste de phase et la présence (noir) ou l'absence (blanc) de mélanosomes matures pigmentés a été quantifiée.

Exemple 1

Des expériences de Western-blot sur des lysats cellulaires de mélanocytes transfectés avec un ARNsi-AP-1 (µ1A), un ARNsi-Kif13A et un ARNsi-AP-3 (β3A) ont permis de démontrer que l'expression de Kif13A n'est pas perturbée par l'inactivation de AP-1 ou AP-3 (Figure 1A). En revanche, dans les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-Kif13A, l'expression de Kif13A a été totalement supprimée (figures 1A et 1C) alors que l'expression de la sous-unité µ1A d'AP-1 n'a pas été perturbée. Ces résultats montrent donc l'efficacité et la spécificité des ARNsi pour l'inactivation de cette protéine dans les mélanocytes.

De plus, des expériences d'immunoprécipitations menées sur des mélanocytes ont permis de démontrer que la protéine Kif13A co-précipite avec la sous-unité γ-adaptine d'AP-1 et donc que l'interaction entre Kif13A et AP-1 observée précédemment dans des lignées cellulaires non mélanocytaires (Nakagawa et al., 2000) existe également dans les lignées mélanocytaires (Figure 1B).

La quantité relative de mélanine dans les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-Kif13A par rapport à la quantité présente dans les cellules transfectées avec l'ARNsi-contrôle a été déterminé par mesure de la densité optique du lysat cellulaire à une longueur d'onde de 492 nm (Figure 2). Les résultats présentés sur la figure 2 montrent que

l'utilisation d'ARNsi-Kif13A a permis d'obtenir une diminution de la quantité de mélanine synthétisée de l'ordre de 40% par rapport aux cellules transfectées avec l'ARNsi-contrôle.

Des observations en microcopie électronique ont été effectuées sur des mélanocytes transfectées avec de l'ARNsi-Kif13A ou de l'ARNsi-contrôle soit en microscopie électronique conventionnelle (Figure 3) soit avec un immunomarquage avec des anticorps anti-Tyrp1 (données non montrées).

Les expériences de microscopie électronique conventionnelle ont permis de démontrer que les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-contrôle contenaient de nombreux mélanosomes présentant d'importantes quantités de mélanine (en noir sur la figure 3). En revanche, les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-Kif13A ne contenaient pas ou peu de pigments.

Dans les cellules transfectées avec l'ARNsi-contrôle, l'immunomarquage a révèlé de nombreux mélanosomes matures de stade III ou IV concentrant des protéines Tyrp1. En revanche, les cellules transfectées avec l'ARNsi-Kif13A, aucun mélanosome mature n'a été visible et l'enzyme Tyrp1 était dispersée dans structures vésiculaires aux caractéristiques d'endosomes.

Ainsi, l'inactivation de la kinésine Kif13A perturbe le transfert des enzymes de la mélanogenèse dans les pré-mélanosomes et bloque ainsi la maturation de ces organites qui sont, dès lors, incapables d'assurer la synthèse de mélanine

Conclusion

Les résultats obtenus par ces expériences ont permis tout d'abord d'observer que l'utilisation d'ARNsi spécifique permet d'inactiver la kinésine Kif13A dans les mélanocytes.

Les résultats obtenus démontrent également que l'utilisation d'un ARNsi spécifique de la kinésine Kif13A permet de diminuer de manière significative :

- la quantité de mélanine produite dans les mélanocytes,
- la quantité de mélanocytes contenant des mélanosomes matures pigmentés et
- la proportion de mélanosomes matures (stade III ou IV) dans les mélanocytes.

Par ces expériences, les inventeurs ont donc démontré que les ARNsi spécifiques d'une kinésine interagissant avec AP-1, et en particulier de la kinésine Kif13A, ont un effet significatif sur la production de pigments mélaniques et peuvent donc être efficacement utilisés comme agents dépigmentants.

Exemple 2

Les expériences de Western blot sur des mélanocytes transfectés (Figure 4) ont permis de démontrer que l'expression de la sous-unité μ1A de AP-1 est fortement diminuée dans les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-μ1A en comparaison de ceux transfectés avec l'ARNsi-contrôle. Cette baisse d'expression a entraîné également une diminution de l'expression d'une autre sous unité de AP-1, la γ-adaptine, avec pour conséquence de déstabiliser le complexe adaptateur AP-1. Ces résultats confirment donc que l'inactivation d'une seule sous-unité de AP-1 suffit pour déstabiliser complètement ce complexe. Il a, de plus, été observé de manière surprenant que dans les cellules transfectés avec l'ARNsi-μ1A et donc déficientes en AP-1, l'expression de la tyrosinase, enzyme clef de la mélanogenèse a été fortement diminuée, de même que l'expression de l'enzyme Tyrp-1 bien que de façon moins importante.

Ces résultats démontrent donc que l'inactivation d'une seule sous-unité de AP-1 suffit pour déstabiliser et inactiver le complexe adaptateur mais perturbe également l'expression des principales enzymes de la mélanogenèse.

La quantification des cellules blanches, c'est-à-dire des cellules ne contenant pas de mélanosome mature pigmenté, parmi les mélanocytes transfectés, a été effectuée par comptage direct en microscopie optique (contraste de phase) (figures 5A et 5B) et le pourcentage de mélanine dans ces cellules par rapport à la quantité présente dans les cellules transfectées avec l'ARNsi-contrôle a été déterminé par mesure de la densité optique du lysat cellulaire à une longueur d'onde de 492 nm (Figure 6). Les figures 5A, 5B et 6 présentent les résultats obtenus sur les mélanocytes transfectés avec un ARNsi-contrôle, un ARNsi-1μA, un ARNsi-γ-adaptine ou une combinaison ARNsi-1μA et ARNsi-γ-adaptine. Les résultats présentés sur les figures 5A et 5B montrent que l'utilisation d'ARNsi-1μA, d'ARNsi-γ-adaptine (Figure 5A) ou des deux simultanément (Figure 5B) a permis d'augmenter de manière significative la proportion de cellules blanches parmi les mélanocytes transfectés, par comparaison avec ceux transfectés avec l'ARNsi-contrôle. Cette augmentation a atteint même 24% pour les cellules transfectées avec l'ARNsi-1μA seul. Ces résultats ont été confirmés par ceux présentés sur la figure 6 où il apparaît que la transfection d'ARNsi-1μA, d'ARNsi-γ-adaptine ou des deux simultanément a permis de diminuer notablement la quantité de mélanine synthétisée dans les cellules par comparaison avec celles tranfectées avec l'ARNsi-contrôle. Cette diminution a pu atteindre plus de 40% dans les cellules tranfectées avec l'ARNsi-1μA.

Ces résultats démontrent donc que l'inactivation d'une ou plusieurs sous-unités du complexe AP-1 par un ou plusieurs ARNsi permet de diminuer de manière significative la synthèse de mélanine dans les mélanocytes.

Des observations en microcopie électronique ont été effectuées sur des mélanocytes transfectés avec de l'ARNsi-µ1A ou de l'ARNsi-contrôle soit en microscopie conventionnelle (Figure 7) soit avec un immunomarquage avec des anticorps anti-Tyrp1 (données non montrées).

Les expériences de microscopie électronique conventionnelle ont permis de démontrer que les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-contrôle contenaient de nombreux mélanosomes présentant d'importantes quantités de mélanine (en noir sur la figure 7). En revanche, les mélanocytes transfectés avec l'ARNsi-µ1A ne contenaient pas ou peu de pigments.

Dans les cellules transfectées avec l'ARNsi-contrôle, l'immunomarquage a révèlé de nombreux mélanosomes matures de stade III ou IV concentrant des protéines Tyrp1. En revanche, les cellules transfectées avec l'ARNsi-µ1A, dans lesquelles le complexe adaptateur AP-1 a donc été inactivé, ne contenaient que des mélanosomes immatures de stade I ou II. Aucun mélanosome mature n'a été visible dans ces cellules. L'enzyme Tyrp1 était toujours détectée par l'anticorps mais n'a été présente que dans des structures vésiculaires avec des caractéristiques d'endosomes et dépourvues de pigment.

Ces observations indiquent donc que l'inactivation du complexe AP-1 perturbe le transfert des enzymes de la mélanogenèse dans les pré-mélanosomes et bloque ainsi la maturation de ces organites qui sont, dès lors, incapables d'assurer la synthèse de mélanine.

Conclusion

Les résultats obtenus par ces expériences ont permis tout d'abord d'observer que l'utilisation d'ARNsi spécifique permet d'inactiver le complexe AP-1 dans les mélanocytes. Il a de plus été démontré que l'inactivation d'une seule sous-unité du complexe adaptateur AP-1 suffit pour déstabiliser et donc inactiver ledit complexe.

Les résultats obtenus démontrent également que l'utilisation d'un ARNsi spécifique d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 permet de diminuer de manière significative :

- la quantité de mélanine produite dans les mélanocytes,
- la quantité de mélanocytes contenant des mélanosomes matures pigmentés et
- la proportion de mélanosomes matures (stade III ou IV) dans les mélanocytes.

Par ces expériences, les inventeurs ont donc démontré que les ARNsi spécifiques d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ont un effet significatif sur la production de pigments mélaniques et peuvent donc être efficacement utilisés comme agents dépigmentants.

Références bibliographiques

Ausubel et al., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley- Interscience.

Braun et al., 2007, Mol. Biol. Cell, 18, 4921-4931.

M. Egholm et al., 1992, J. Am. Chem. Soc, 114, 1895- 1897.

Fanning and Symonds, 2006, RNA Towards Medicine, Handbook of Experimental Pharmacology, ed. Springer.

Kumar et al, 1993, Microbiol. Mol. Biol. Rev, 62, 1415-1434.

Maniatis et al., 1982, Molecular cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor.

Nakagawa et al., 2000, Cell, 103, 569-581.

Osborne et al. Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects. Curr Opin Chem Biol. 1997 Jun;1(1):5-9

Raposo et al., 1997, Immunogold labeling of ultrathin cryosections: application in immunology. In: Handbook of Exp. Immunol., vol. 4, eds. L.A. Herzenberg, D. Weir, L.A. Herzenberg, and C. Blackwell, Cambridge, MA: Blackwell Science, Inc., 1-11

Raposo et al., 2001, J. Cell Biol. 152, 809-824.

Sambrook et al., 1989, Molecular cloning, A laboratory Manual, Cold Spring Harbor.

Seiji et al., 1963, Nature, Mar 16;197:1082-4.

Theos et al., 2005, Mol. Biol. Cell, 16, 5356-5372.

Van Den Bossche et al., 2006, Traffic, 7, 769-778.

Revendications

1. Composition pharmaceutique ou cosmétique comprenant au moins un inhibiteur de la kinésine Kif13A, un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1, et/ou un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et la kinésine Kif13A.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est un inhibiteur de la kinésine Kif13A.

3. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est un inhibiteur d'une sous-unité du complexe adaptateur AP-1.

4. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est un inhibiteur de l'interaction entre une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou le complexe AP-1 et la kinésine Kif13A.

5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est une petite molécule, un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est un aptamère, un anticorps, un acide nucléique ou un peptide dominant négatif.

7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit inhibiteur est un acide nucléique comprenant une séquence capable de s'hybrider spécifiquement avec un gène ou un ARNm codant pour une sous-unité du complexe adaptateur AP-1 ou pour la kinésine Kif13A et de diminuer ou supprimer l'expression de ladite protéine.

8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit acide nucléique est un oligonucléotide anti-sens ou un ARNi, de préférence un ARNsi.

9. Composition selon la revendication 5 à 8, caractérisée en ce que ledit acide nucléique présente une séquence de 15 à 50 nucléotides, de préférence de 15 à 30 nucléotides.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, caractérisée en ce que ledit acide nucléique comprend une séquence choisie parmi les séquences SEQ ID No. 1 à 6 et 11 à 24.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une ou plusieurs autres substances actives, de préférence choisies parmi le groupe composé par l'acide ellagique ; l'arbutine ; le résorcinol ; la vitamine C ; le pantothénate ; l'acide kojique ; des extraits placentaires ; des molécules interférant directement ou indirectement avec la mélanotropine (MSH), son récepteur ou l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) ; des polyols tels que la glycérine, le glycol ou le propylène glycol ; des vitamines ; des agents kératolytiques et/ou desquamants tels que l'acide salicylique ; des alpha-hydroxyacides tels que l'acide lactique ou l'acide malique; l'acide ascorbique ; l'acide rétinoïque ; le rétinaldéhyde ; le rétinol ; le palmitate, le propionate ou l'acétate ; des agents anti-glycation et/ou antioxydants tels que le tocophérol, la thiotaurine, l'hypotaurine, l'aminoguanidine, le pyrophosphate de thiamine, la pyridoxamine, la lysine, l'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la pyridoxine, l'adénosine triphosphate ; des agents anti-inflammatoires; des agents apaisants et leurs mélanges ; des filtres solaires chimiques ou physiques et des acides désoxyribonucléiques ou ribonucléiques, et les dérivés de ceux-ci.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle est adaptée pour une administration par voie topique.

13. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement ou à la prévention d'un trouble pigmentaire.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que le trouble pigmentaire est une hyperpigmentation.

15. Utilisation d'une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, comme agent cosmétique.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit agent cosmétique est un agent dépigmentant.

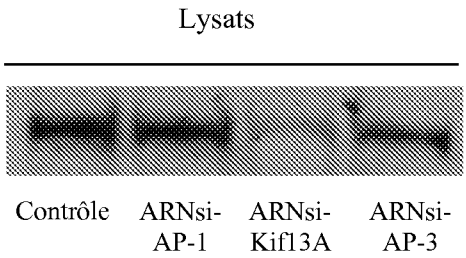


Figure 1A

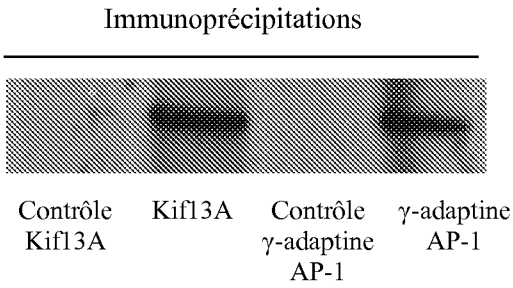


Figure 1B

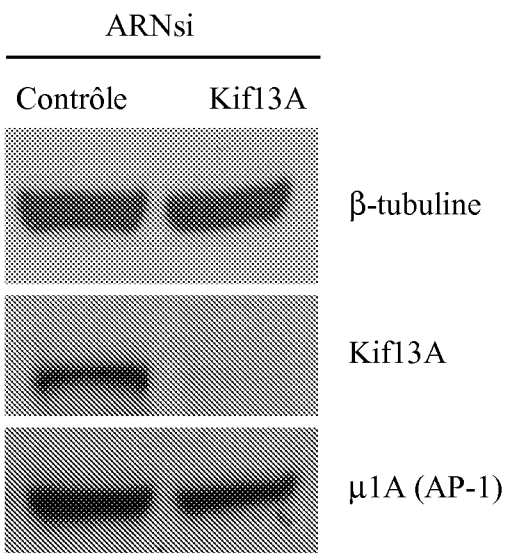


Figure 1C

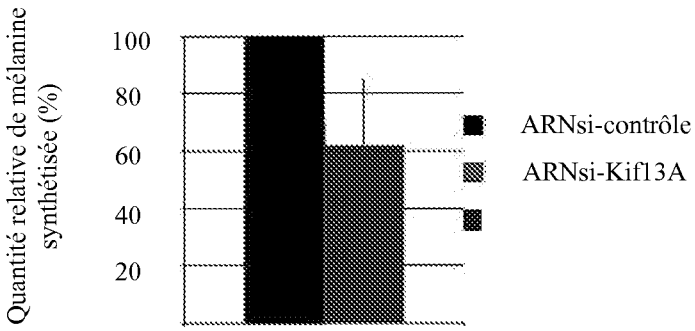

Quantité relative de mélanine synthétisée (%)
100
80
60
40
20
ARNsi-contrôle
ARNsi-Kif13A

Figure 2

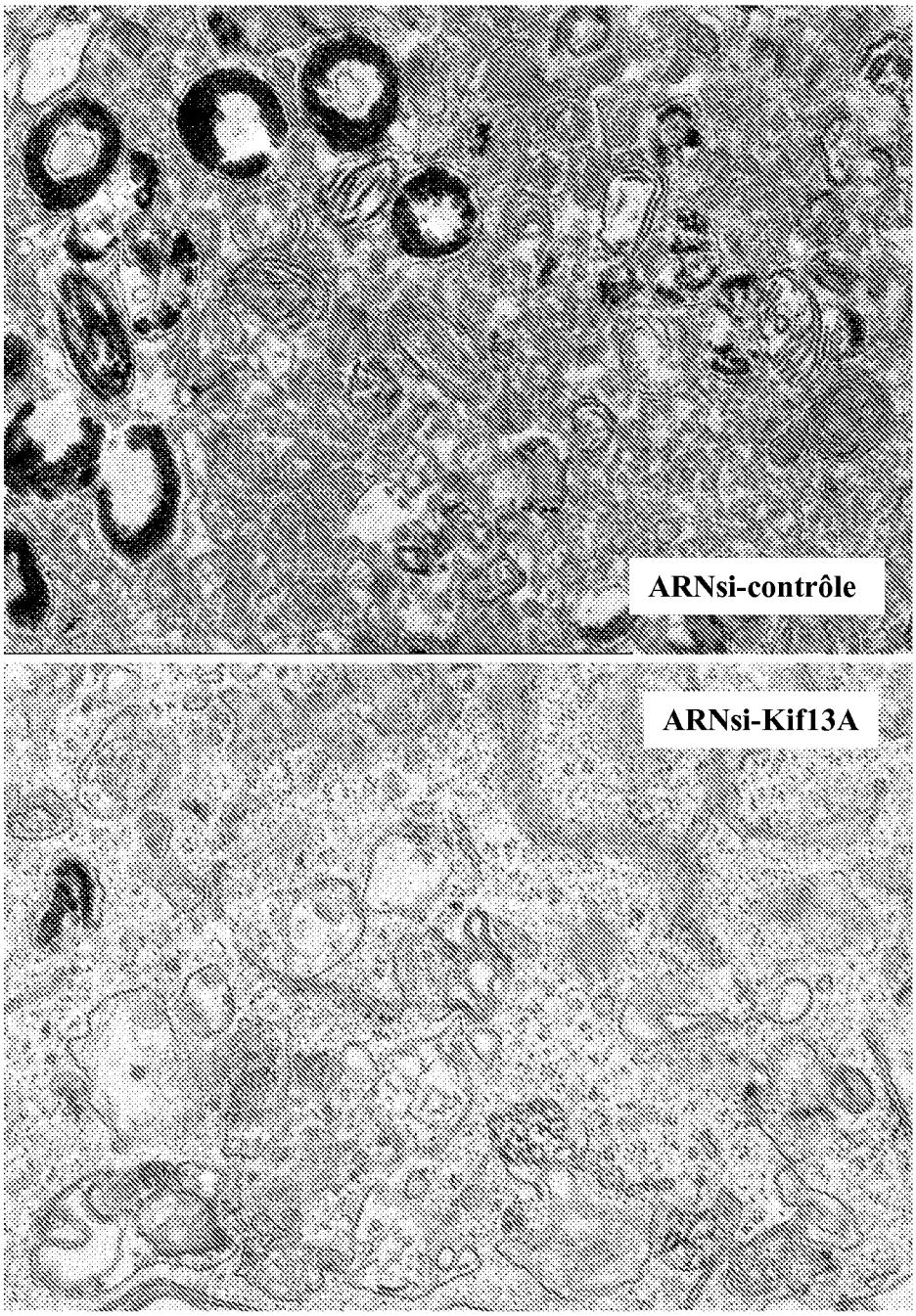


Figure 3

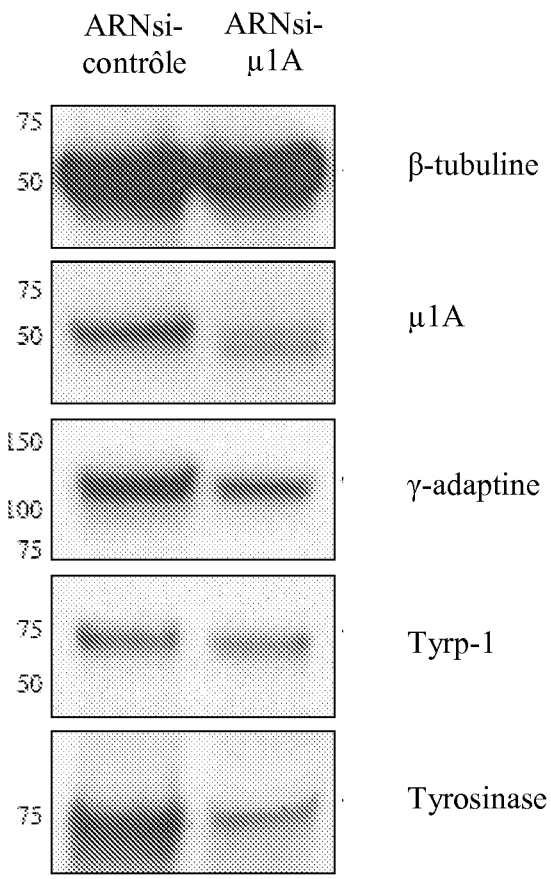

ARNsi-contrôle
ARNsi-µ1A
75
50
β-tubuline
75
50
µ1A
150
100
75
γ-adaptine
75
50
Tyrp-1
75
Tyrosinase

Figure 4

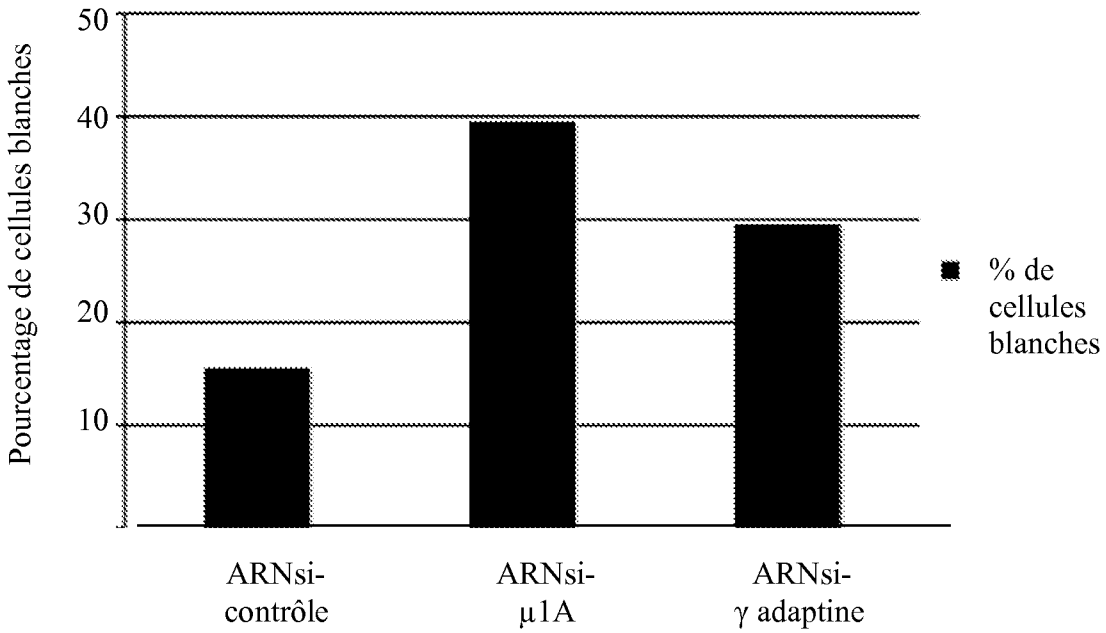


Figure 5A

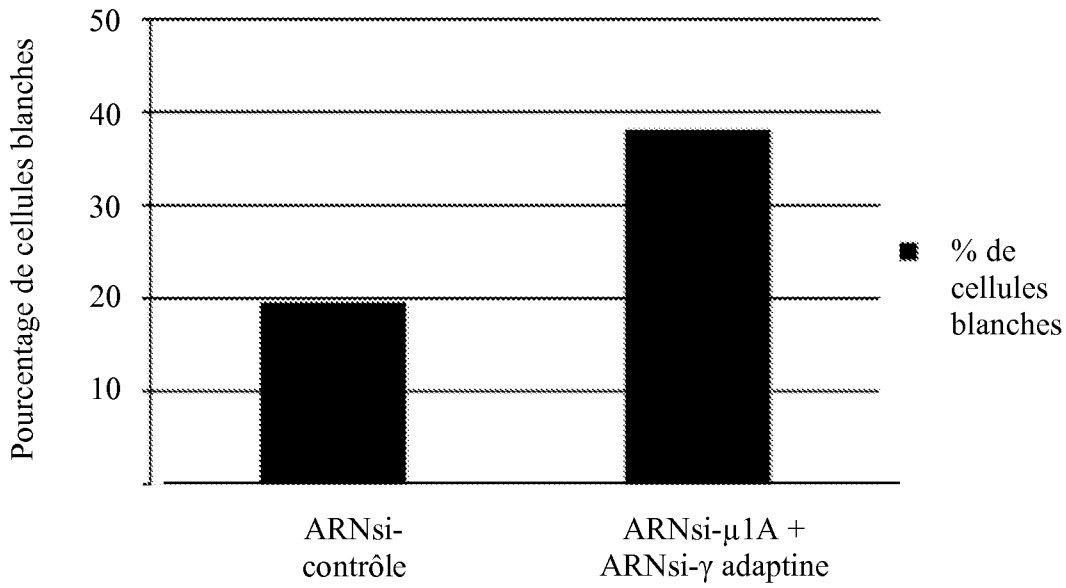


Figure 5B

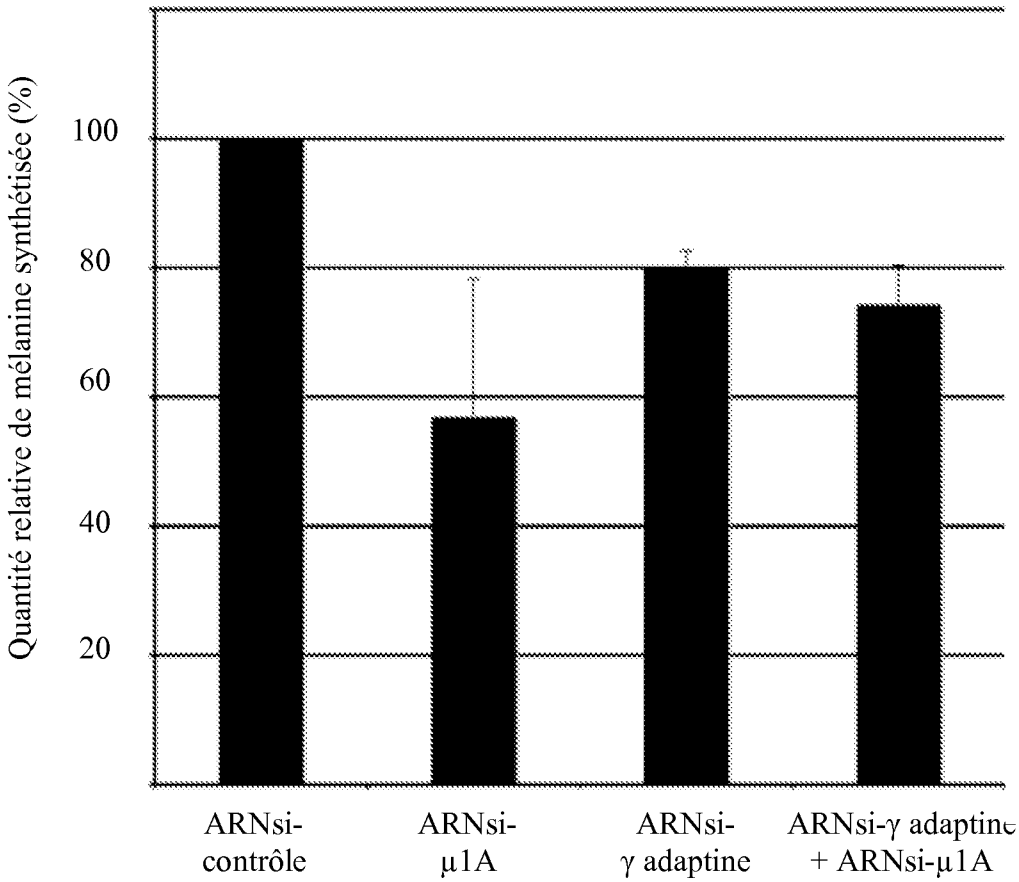

Quantité relative de mélanine synthétisée (%)
100
80
60
40
20
ARNsi-contrôle
ARNsi-µ1A
ARNsi-γ adaptine
ARNsi-γ adaptine + ARNsi-µ1A

Figure 6

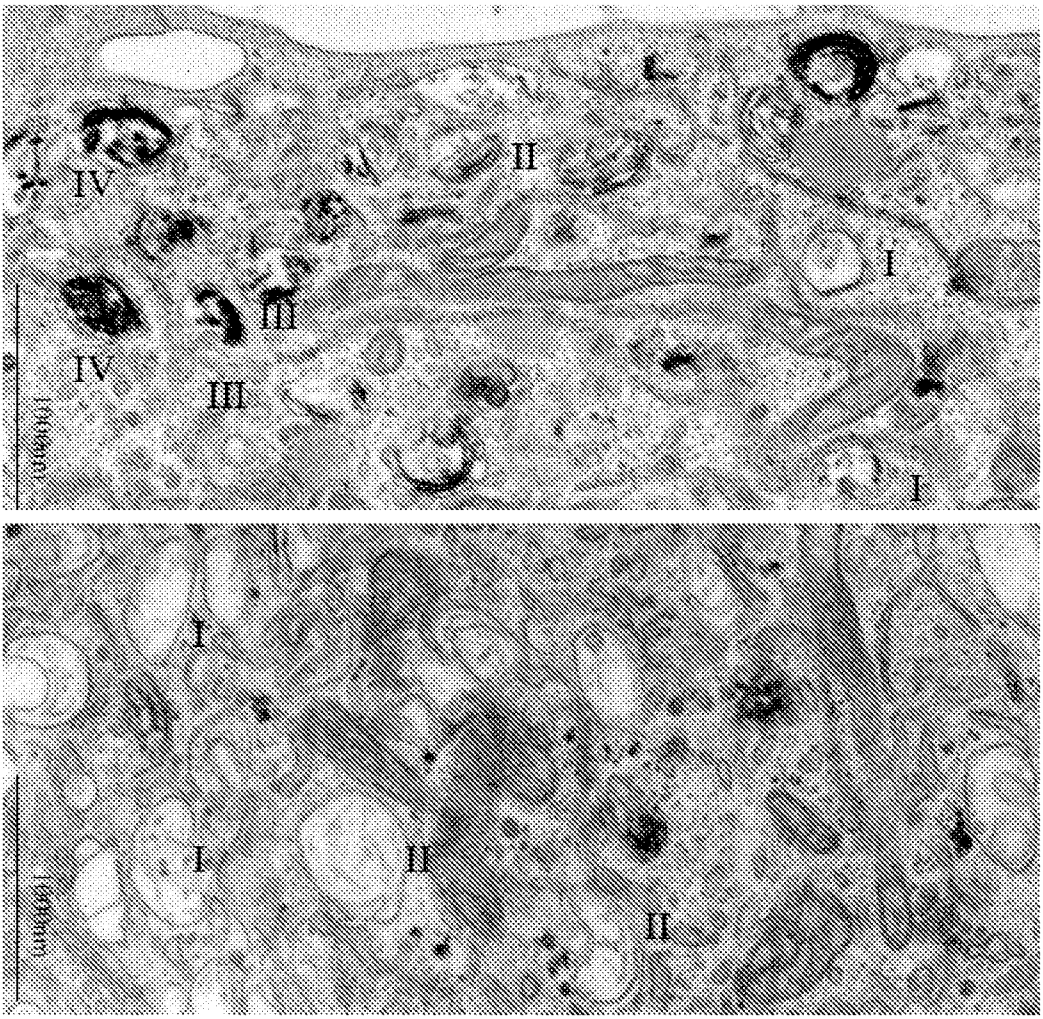


Figure 7