

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

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
23 juin 2016 (23.06.2016)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2016/097643 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C12N 5/071 (2010.01) A61N 1/00 (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2015/053611

(22) Date de dépôt international :
18 décembre 2015 (18.12.2015)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
1462836 18 décembre 2014 (18.12.2014) FR

(71) Déposants : GALDERMA RESEARCH & DEVELOPMENT [FR/FR]; 2400 Route des Colles, Les Templiers, 06410 Biot (FR). INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs : PASSERON, Thierry; U1065 INSERM - C3M, 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice (FR). AUBERT, Jérôme; 2400 route des Colles, 06410 Biot (FR). PERRIN, Agnès; Le Forum bat B1 56 avenue Reibaud, 06600 Antibes (FR). PIWNICA, David; 107 avenue Juliette Adam, Résidence Le Loup de Mer, 06220 Le Golfe Juan (FR). RIVAL, Yves; 594 chemin des Combes, Chemin Magnique, Jardin d'Isis, 06600 Antibes (FR).

(74) Mandataire : CABINET BECKER ET ASSOCIES; 25, rue Louis le Grand, 75002 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : HUMAN SKIN MODEL AN USE THEREOF FOR EVALUATING *EX VIVO* THE DERMATOLOGICAL, COSMETIC AND/OR NUTRACEUTICAL EFFECTS OF COMPOUNDS

(54) Titre : MODELE DE PEAU HUMAINE ET SON UTILISATION POUR EVALUER *EX VIVO* LES EFFETS DERMATOLOGIQUES, COSMETIQUES ET/OU NUTRACEUTIQUES DE COMPOSÉS

(57) Abstract : The invention relates to a human skin model which maintains, *ex vivo*, histological integrity and biological functionality of the skin, comprising in combination a sample of human skin between 5 and 10 mm in size and consisting of an epidermis (1) and a dermis (2) placed on a support (3) having, at the level of the porous base thereof (4), the same size as the skin sample, the dermis (2) of the skin sample and the base of the support (4) bathing in a container (6) comprising a culture medium (5) which is renewed every one to three days. The invention also relates to the use of the human skin model for evaluating *ex vivo* compounds or formulations of interest, to a method for modelling and analyzing a selected treatment of human skin and to the use of a sample of human skin *ex vivo* for analyzing a selected treatment of the skin.

(57) Abrégé : L'invention concerne un modèle de peau humaine maintenant *ex vivo* une intégrité histologique et une fonctionnalité biologique de la peau, comprenant en combinaison un échantillon de peau humaine de dimension comprise entre 5 et 10 mm et constitué d'un épiderme (1) et d'un derme (2) placé sur un support (3) présentant au niveau de sa base poreuse (4) la même dimension que l'échantillon de peau, le derme (2) de l'échantillon de peau et la base du support (4) baignant dans un contenant (6) comprenant un milieu de culture (5) renouvelé tous les un à trois jours. L'invention concerne également l'utilisation du modèle de peau humaine pour évaluer *ex vivo* des composés ou formulations d'intérêt, un procédé de modélisation et d'analyse d'un traitement sélectionné de la peau humaine et l'utilisation d'un échantillon de peau humaine *ex vivo* pour analyser un traitement sélectionné de la peau.



WO 2016/097643 A1

MODELE DE PEAU HUMAINE ET SON UTILISATION POUR EVALUER *EX VIVO* LES EFFETS DERMATOLOGIQUES, COSMETIQUES ET/OU NUTRACEUTIQUES DE COMPOSÉS

5 **Domaine de l'invention**

L'invention se situe dans le domaine des tests pratiqués *ex vivo* pour évaluer des composés d'intérêt en dermatologie, cosmétique et/ou nutraceutique.

La présente invention a pour objet un modèle de peau humaine maintenant *ex vivo* une intégrité histologique et une fonctionnalité biologique de la peau. Elle concerne également l'utilisation dudit modèle de peau humaine *ex vivo* pour évaluer les effets dermatologiques, cosmétiques et/ou nutraceutiques de composés. L'invention concerne aussi un procédé de modélisation et d'analyse d'un traitement sélectionné de la peau humaine. Enfin, l'invention concerne l'utilisation d'un échantillon de peau humaine *ex vivo* pour analyser un traitement sélectionné de la peau.

15

Arrière-plan de l'invention

Le modèle de peau humaine habituellement utilisé et bien connu pour évaluer des composés ou formulations d'intérêt est un modèle utilisant des anneaux en métal (dit « O-rings »). Il consiste à déposer un échantillon de peau humaine dégraissée, généralement issu de chirurgie esthétique réalisée en milieu hospitalier, dans une boîte de pétri contenant environ 3 ml d'un milieu de culture et à poser des anneaux en métal sur l'échantillon de peau. Des prélèvements sont alors réalisés à la fin du traitement topique ou systémique de la peau pour évaluer l'efficacité du traitement administré. Cependant, ce modèle de peau humain présente l'inconvénient majeur qu'il ne demeure intègre histologiquement *ex vivo* que trois jours au maximum. De ce fait, certaines fonctions biologiques qui nécessitent plus de trois jours de culture ne peuvent être étudiées et peuvent requérir des cinétiques de cinq, neuf, onze ou quinze jours.

25

Le document DE10317402 décrit une méthode pour produire un modèle de peau *ex vivo* humaine ou d'origine animale, notamment de porc. La méthode consiste à prélever un échantillon de peau de porc comprenant l'épiderme/derme et de le mettre en contact avec un androgène. Le document ne donne aucune indication de viabilité de l'échantillon de peau au-delà de sept jours.

30

Le document EP2019316 décrit l'utilisation d'un échantillon de peau humaine ou animale comprenant un épiderme, un derme, une couche sous-cutanée d'épaisseur 0,5-5 mm et des follicules pileux. L'échantillon de peau est placé sur un support stérile tel que du liège ou un morceau de coton et baigne dans un milieu de culture. Le support stérile est disposé à

35

l'intérieur de plaque de type conventionnel de six puits. La présence de la couche sous-cutanée et d'une certaine densité de follicules pileux augmentent, selon ce document, la viabilité de l'échantillon de peau. Le document ne donne cependant aucune preuve de viabilité de l'échantillon de peau humaine *ex vivo*.

5
Au vu de l'art antérieur qui ne décrit aucun modèle de peau humaine prouvé efficace *ex vivo* sur une durée supérieure à trois jours, le problème que se propose de résoudre la présente invention est donc de réaliser un modèle de peau humaine permettant de maintenir *ex vivo* une intégrité histologique et une fonctionnalité biologique effective jusqu'à onze jours et plus.

Exposé de l'invention

Il se trouve que la demanderesse a mis en évidence de manière surprenante un nouveau modèle de peau dont la combinaison des caractéristiques techniques permet de résoudre le problème posé.

Ainsi, un premier objet selon l'invention consiste en un modèle de peau humaine *ex vivo* maintenant une intégrité histologique et une fonctionnalité biologique de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend en combinaison :

- un échantillon de peau humaine de dimension comprise entre 5 et 10 mm et constitué d'un épiderme (1) et d'un derme (2) placé sur
 - un support de type insert (3) présentant au niveau de sa base poreuse (4) la même dimension que l'échantillon de peau,
- le derme (2) de l'échantillon de peau et la base poreuse (4) du support baignant dans un contenant (6) comprenant un milieu de culture (5) renouvelé tous les un à trois jours.

Dans la présente invention, le terme « *ex vivo* » signifie « hors du vivant » et s'applique à des tests biologiques effectués sur des échantillons de peau provenant d'un organisme vivant, lesdits tests étant mis en place en dehors de l'organisme.

Dans la présente invention, on désigne par :

- « dimension » ou « dimensions » les étendues mesurables de l'échantillon de peau humaine sur sa longueur et sa largeur. L'échantillon de peau, une fois préparé, peut présenter une forme variée comme un carré, un rectangle ou un cercle (ou rond). Dans le cas d'une forme ronde/circulaire, la dimension sera assimilée au diamètre du cercle. Sinon, il s'agit des longueurs et largeurs de la forme choisie.

- « maintenir une intégrité histologique » le fait que les cellules de l'échantillon de peau demeurent intègres ou normalement constituées au niveau de l'épiderme et du derme,

- « maintenir une fonctionnalité biologique » le fait que les mécanismes biologiques de la peau restent fonctionnels, notamment la transcription, la traduction, l'activité enzymatique, etc.

- « un échantillon de peau humaine » une partie de peau obtenue par prélèvement sur la peau humaine ou isolée d'un être humain. Il peut s'agir par exemple d'une biopsie de peau humaine ou d'un prélèvement effectué par acte de chirurgie plastique. Dans la présente invention « la peau » ou « l'échantillon de peau » comprend un épiderme et un derme dégraissé, lavé et découpé par un emporte-pièce à la dimension désirée.

- « support présentant au niveau de sa base poreuse » un support de type insert ou autre ayant une forme arrondie, circulaire, carrée ou rectangulaire et dont la base est percée de trous.

- « contenant » tout dispositif permettant de contenir le milieu de culture et le support. Il peut s'agir d'un dispositif communément appelé puits.

- « traitement topique » ou application topique, l'application sur la partie de l'épiderme de l'échantillon de peau d'un composé ou d'une formulation d'intérêt.

- « traitement systémique » l'ajout dans le milieu de culture, dans lequel baigne le derme de l'échantillon de peau, d'un composé ou d'une formulation d'intérêt.

- « traitement cosmétique » l'application d'un composé ou d'une formulation d'intérêt sur la partie de l'épiderme de l'échantillon de peau ou bien dans le milieu de culture, ledit composé ou ladite formulation présentant une activité autre que préventive et curative sur la peau, par exemple une activité d'hydratation, d'anti-âge, etc. Il s'agit d'un soin cosmétique à visée non thérapeutique.

- « traitement dermatologique » l'application d'un composé ou d'une formulation d'intérêt sur la partie de l'épiderme de l'échantillon de peau ou bien dans le milieu de culture, ledit composé ou ladite formulation présentant une activité préventive ou curative sur la peau, pour prévenir le développement d'une pathologie et/ou de ses symptômes ou pour diminuer, de préférence éviter, l'apparition de ses symptômes ,

- « traitement sélectionné » un traitement choisi comprenant un composé qui sera appliqué par voie topique et/ou systémique,

- « composé » et « composé ou formulation d'intérêt » tout composé actif seul ou en formulation adaptée à son administration topique ou systémique.

- « nutraceutique » produit fabriqué à partir de substances alimentaires, mais rendu disponible sous forme de comprimé, de poudre, de potion ou d'autre formes médicinales habituellement non associées à des aliments, et qui s'est avéré avoir un effet physiologique bénéfique ou protecteur sur la peau.

Le modèle de peau humaine selon l'invention comprend des caractéristiques techniques qui permettent de maintenir une intégrité histologique et une fonctionnalité biologique de l'échantillon de peau jusqu'à onze jours et plus. Les caractéristiques techniques d'intérêt sont plus précisément :

- que l'échantillon de peau humaine présente au moins une dimension comprise entre 5 et 10 mm, par exemple entre 6 et 10 mm ou entre 6 et 8 mm, et comprend un épiderme et un derme. Ledit échantillon a été dégraissé afin d'éliminer la couche sous-cutanée et lavé. De préférence, l'échantillon de peau ne comprend pas de follicules pileux. Il est placé de façon à ce que l'épiderme soit positionné en partie supérieure et le derme en partie inférieure sur un support, de manière à pouvoir appliquer les traitements topiques et/ou systémiques souhaités.

- que le support soit poreux en sa base (partie inférieure) et soit de forme quelconque, la base poreuse du support présentant la/les même(s) dimension(s) que l'échantillon de peau. De cette façon, l'échantillon de peau reste solidaire de la base poreuse du support.

- que le derme de l'échantillon de peau et la base poreuse du support baignent dans un contenant comprenant un milieu de culture approprié pour le maintien en vie des cellules de la peau, principalement des kératinocytes. Le support est maintenu par exemple par des ailettes sur le contenant afin que le milieu de culture affleure l'épiderme sans le recouvrir. Le milieu de culture sera avantageusement renouvelé tous les un à trois jours. Ces trois caractéristiques sont de préférence combinées au sein du modèle de peau selon l'invention.

La figure 1 (A) illustre le modèle anneau dit «O-rings».

La figure 1 (B) décrit un exemple de modèle de peau humaine *ex vivo* selon l'invention. Dans la figure 1 (B), l'épiderme (1) et le derme (2) de l'échantillon de peau humaine sont placés sur la base poreuse (4) d'un support (3), ledit support et l'échantillon de peau humaine baignant dans un milieu de culture (5) disposé dans le contenant (6).

La figure 2 représente les graphes des réponses pharmacologiques de l'exemple 3.4 obtenues dans le modèle selon l'invention (A) *versus* le modèle anneau dit «O-rings» (B).

La figure 3 montre les coupes histologiques de l'échantillon de peau qui a été utilisé dans l'exemple 3.5. Les coupes démontrent le maintien histologique de la peau jusqu'à 9 jours sans traitement.

La figure 4 (A) présente les coupes histologiques de l'échantillon de peau qui a été traitée avec la forskoline (agent pro-pigmentant). Les coupes démontrent le maintien histologique de la peau jusqu'à 15 jours sans traitement. La figure 4 (B) démontre l'induction par la forskoline au niveau transcriptionnel de marqueurs de la mélanogénèse (qPCR). La

figure 4 (C) démontre l'induction par la forskoline au niveau protéique de ces mêmes marqueurs (ICH).

La figure 5 montre l'activation *ex vivo* de la voie Wnt (A) et une induction de l'expression des marqueurs mélanoblastiques [(B), (C), (D) et (E)] sur un modèle de peau de patient atteint de vitiligo (A) sous l'effet d'activateurs pharmacologiques de la voie Wnt (CHIR99021, SKL2001 et LiCl).

La figure 6 montre que le traitement *ex vivo* de peaux dépigmentées provenant de patients atteints de vitiligo à l'aide d'activateurs pharmacologiques de la voie Wnt [contrôle (A), SKL2001 (B), CHIR99021 (C) et LiCl (D)] induit la différenciation de cellules souches résidentes en pré-mélanocytes

Tout support ayant une base poreuse permettant de recevoir l'échantillon de peau et tout contenant permettant d'immerger *ex vivo* le derme de l'échantillon de peau dans le milieu de culture, quel que soit leur forme et dimensions, seront appropriés pour réaliser le modèle de peau humaine selon l'invention.

Comme exemple d'un support et contenant du modèle de peau humaine *ex vivo* selon l'invention, on peut citer le dispositif d'insert dit « Transwell® » commercialisé par la société Corning Life Sciences. Ce dispositif permet de mettre en application l'invention en combinant les caractéristiques mentionnées ci-dessus, notamment les particularités de l'échantillon de peau humaine, la porosité de la base du support, la dimension de la base du support en relation avec l'échantillon de peau et enfin le renouvellement du milieu de culture dont le niveau supérieur affleure la couche basale de l'épiderme. Il est bien entendu possible de combiner toute sorte de forme(s) et dimension(s) afin d'obtenir un support et un contenant adéquat à la réalisation de l'invention.

Dans le modèle de peau humaine selon l'invention, l'intégrité histologique et la fonctionnalité biologique de l'échantillon de peau humaine peuvent être maintenues *ex vivo* jusqu'à onze jours et préférentiellement jusqu'à au moins quinze jours. Les tests inclus dans la présente invention ont été menés *ex vivo* jusqu'à quinze jours sur le modèle de peau. Les résultats obtenus permettent de confirmer le maintien de l'intégrité histologique et la fonctionnalité biologique de la peau jusqu'à au moins quinze jours.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, l'échantillon de peau est de forme ronde/circulaire et son diamètre est compris entre 6 et 8 mm. Il est de préférence de 6 mm, 7 mm ou 8 mm. Dans la mesure où la dimension du prélèvement ou de la biopsie de la peau d'un patient peut s'avérer limitant lorsqu'il ne s'agit pas de déchet de plastie chirurgicale, il sera encore plus préféré d'utiliser un échantillon présentant un diamètre de 6 mm.

Dans un autre mode de réalisation préféré selon l'invention, la porosité de la base du support est supérieure ou égale à 0,4 μm . Cette porosité est définie afin que le derme puisse être placé en contact avec le milieu de culture et que les échanges nécessaires au traitement par voie systémique soient suffisants et efficaces.

Le milieu de culture est un milieu de culture complexe tel que les cellules présentes dans la peau, principalement les kératinocytes, puissent se maintenir en vie. L'homme du métier saura adapter le milieu de culture en fonction du traitement à administrer ou des études à réaliser sur l'échantillon de peau humaine.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, le milieu de culture est le milieu Skin Long Term Medium (SLTM) ou « Long Term Skin Culture Medium » de la société Biopredic® (référence MIL305 sur le site internet de la société biopredic.com).

Cette culture en interface air/liquide facilite le renouvellement du milieu de culture tous les un à trois jours. Pour ce faire, le milieu est éliminé ou conservé si on veut doser des médiateurs produits par la peau suite aux traitements systémiques. Le milieu est ensuite remplacé par une quantité identique et suffisante de milieu pour affleurer la couche basale de l'épiderme. La quantité ou volume de milieu de culture dépendra de la taille du contenant utilisé et du type de support suspendu dans le contenant afin que le milieu de culture affleure cette couche basale.

Une pipette sera de préférence utilisée pour une application topique d'un composé, formulé ou non, la dose nécessaire sera déposée à la surface de l'épiderme et étalée à l'aide soit de la pipette, soit d'un instrument jugé pertinent comme notamment un disque en matière inerte (référence 03/150-38, fournisseur SEFAR NITEX) permettant d'étaler plus facilement la formulation. Après application, les échantillons seront avantageusement disposés dans un incubateur à atmosphère régulée (37°C, 5% CO₂ et hygrométrie saturante).

Pour un traitement systémique, le composé sera de préférence introduit directement dans le milieu : soit directement dans le contenant une fois le milieu de culture changé soit dans le milieu de culture puis distribué dans le contenant, suivant le besoin.

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, le changement de milieu de culture est effectué tous les deux à trois jours, de préférence tous les deux jours.

L'échantillon de peau humaine peut provenir de toutes parties du corps humain, par exemple de l'abdomen, de la cuisse, des bras ou des seins. Dans un mode de réalisation

préférée selon l'invention l'échantillon de peau humaine est un échantillon provenant de l'abdomen.

L'échantillon de peau comprend, dans le modèle de peau humaine selon l'invention, un épiderme et un derme. La peau provient par exemple d'intervention chirurgicale, le plus souvent à visée esthétique. Elle est prélevée par le chirurgien et acheminée sous quelques heures pour la préparation du modèle de peau (destiné à être utilisé *ex vivo*). Une fois réceptionnée, la peau est dégraissée et nettoyée afin d'éliminer le sang et la graisse résiduels. La peau ainsi préparée est découpée à l'aide d'un emporte-pièce ayant la forme souhaitée, de préférence circulaire/ronde. Les découpes ainsi obtenues sont placées dans les inserts stériles, en présence de milieu lui aussi stérile.

Un second objet selon l'invention est l'utilisation du modèle de peau humaine *ex vivo* tel que décrit précédemment pour évaluer les effets dermatologiques, cosmétiques et/ou nutraceutiques de composés ou formulations d'intérêt.

Comme composés ou formulations d'intérêt utiles en cosmétique on peut citer par exemple les composés ou formulations destinés à évaluer :

- les effets anti-âges,
- le potentiel allergène et/ou l'irritation,
- la protection contre les UV,
- les effets induits par la lumière visible ou la lumière infrarouge,
- les effets causés par une contrainte mécanique, par exemple une abrasion ou une pression,
- la modulation des propriétés des tissus conjonctifs, en particulier pour évaluer les propriétés anti-rides de composés,
- l'efficacité filmogène sur la peau,
- la modulation de l'épaisseur épiderme-derme,
- l'hydratation,
- les propriétés de pénétration, et/ou
- les propriétés de libération des compositions.

Comme composés ou formulations d'intérêt utiles en nutraceutique on peut citer par exemple les composés ou formulations destinés à évaluer :

- les effets anti-âges,
- le potentiel allergène et/ou l'irritation,
- la modulation des propriétés des tissus conjonctifs, en particulier pour évaluer les propriétés anti-rides de composés, et/ou
- l'hydratation.

Comme composés ou formulation d'intérêt utile en dermatologie on peut citer par exemple les composés ou formulations destinés à évaluer :

- 5 - la modulation de la pigmentation de la peau, notamment pour le traitement du vitiligo,
- la modulation de la viabilité et/ou de la prolifération de la peau,
- la réparation d'un stress provoqué par les UV,
- les effets anti-oxydants,
- la cicatrisation,
- 10 - la modulation de la fonction barrière cutanée,
- l'immunostimulation,
- l'efficacité anti-microbienne, en particulier l'efficacité anti-acné
- l'efficacité anti-psoriatique,
- la phototoxicité, et/ou
- 15 - le métabolisme cutané.

Un troisième objet selon l'invention est un procédé de modélisation et d'analyse d'un traitement sélectionné de la peau humaine, comprenant les étapes ci-dessous :

- 20 a) exposition de l'échantillon de peau d'un modèle de peau humaine selon l'invention au traitement sélectionné,
- b) renouvellement du milieu de culture tous les un à trois jours, et
- c) observation de l'effet exercé par le traitement sur l'échantillon de peau.

Le traitement sélectionné est, comme indiqué précédemment, à visée dermatologique, cosmétique et/ou nutraceutique. Les composés ou formulations d'intérêt choisis seront typiquement appliqués de manière topique sur la surface de l'épiderme pour les traitements à visée dermatologique et cosmétique. Ils seront de préférence appliqués de manière systémique par dilution dans le milieu de culture compris dans le contenant pour les traitements à visée dermatologique et/ou nutraceutique.

30

Dans un mode de réalisation préféré selon l'invention, l'échantillon est traité tous les deux jours. Lorsque le traitement est topique, il est préférable de nettoyer la peau avant toute autre application de composés ou formulations d'intérêt. Lorsque le traitement est systémique, le milieu de culture est de préférence changé tous les un à trois jours, avantagement tous les deux jours. Il peut être nécessaire de garder le milieu de culture à renouveler pour étudier les effets des traitements systémiques sur l'échantillon de peau humaine.

35

Lorsque dans l'étape a) le traitement sélectionné est topique, la peau est nettoyée avant toute nouvelle exposition de l'échantillon de peau au traitement sélectionné.

Enfin, un quatrième objet selon l'invention concerne l'utilisation d'un échantillon de peau humaine pour analyser *ex vivo* un traitement sélectionné de la peau caractérisé en ce que l'échantillon de peau humaine i) présente une dimension comprise entre 5 et 10 mm, ii) est constitué d'un épiderme (1) et d'un derme (2), et iii) est placé sur un support de type insert (3) présentant au niveau de sa base poreuse (4) la même dimension que ledit échantillon de peau, le derme (2) de l'échantillon de peau et la base du support (4) baignant dans un contenant (6) comprenant un milieu de culture (5) renouvelé tous les un à trois jours.

L'utilisation *ex vivo* du modèle de peau selon l'invention réalisé à partir de peaux excisées de patients atteints de Vitiligo a permis de montrer que des traitements avec des inhibiteurs de GSK3 β induisent une augmentation significative de marqueurs de mélanocytes. L'utilisation du modèle de peau *ex vivo* selon l'invention a ainsi permis de montrer que ces traitements induisent la différenciation des cellules souches des mélanocytes résidant dans les pré-mélanocytes qui expriment PAX3 et DCT. De plus, la présence de ces pré-mélanocytes ayant été observée dans le follicule pileux et dans le derme, l'utilité de ce nouveau modèle de peaux *ex vivo* apparaît clairement en ce qui concerne l'étude des mécanismes impliqués dans la différenciation des mélanocytes dans le cas du Vitiligo, mais d'une façon générale, pour l'étude de la différenciation de cellules souches dans le cas de n'importe quelle autre pathologie dermatologique. L'utilisation du modèle de peau *ex vivo* selon l'invention apparaît donc utile pour tester tout nouveau traitement dermatologique.

Divers exemples de réalisation selon l'invention sont fournis ci-dessous à titre d'illustration et sans aucun caractère limitatif.

Exemples

Exemple 1 : Préparation de l'échantillon de peau humaine

La peau d'origine humaine provient d'intervention chirurgicale, le plus souvent à visée esthétique. Elle est prélevée par le chirurgien et acheminée sous 2-4 h à sec au laboratoire. Une fois réceptionnée, la peau est dégraissée, avec un scalpel ou des ciseaux, puis nettoyée dans des bains de milieu stérile isotonique afin d'éliminer le sang et la graisse résiduels. La peau ainsi préparée est découpée à l'aide d'un emporte-pièce type biopunches® stériles de dimension désirée, de préférence de diamètre 8 mm. Toutes les opérations sont réalisées en conditions stériles, à toutes les étapes dès la réception de la peau.

Exemple 2 : Préparation du modèle de peau humaine ex vivo

Les échantillons de peau préparés dans l'exemple 1 sont placés à l'aide de pinces dans des inserts stériles, un par insert. Chaque insert est alors placé dans un puits de la taille adéquate. Pour un insert dont la base présente un diamètre de 8 mm et des pores de 0,4 µm, on utilise une plaque 24 puits. Le milieu est ajouté dans le puits qui affleure la couche basale de l'épiderme.

Une fois les échantillons placés dans les inserts avec le milieu de culture, les plaques sont placées dans un incubateur à atmosphère régulée (37°C, 5% CO₂, hygrométrie saturante).

Exemple 3 : Validation du Milieu de culture - Comparaison du modèle anneaux et du modèle selon l'invention/ Etude du maintien de l'activité pharmacologique d'un rétinoïde en traitement répété sur une période de quinze jours.

3.1 Les modèles

Modèle anneaux de métal :

La peau dégraissée telle que préparée dans l'exemple 1 est posée dans une boîte de pétri contenant 3 ml de milieu de culture, les anneaux de métal sont posés dessus. Des prélèvements sont réalisés à la fin du traitement pour l'analyse de la modulation de l'expression des gènes d'intérêt et pour la validation histologique de l'intégrité de la peau.

Modèle de l'exemple 2 selon l'invention :

La peau dégraissée telle que préparée dans l'exemple 1 est placée dans les inserts Transwell® avec 0,5 ml de milieu (changement tous les jours de traitement, sauf le week-end), le traitement s'effectue puits par puits. A des fins de reproductibilité, des triplicatas par condition de traitement sont réalisés.

Chacun des 2 modèles est testé avec 2 milieux différents :

- Milieu commercial Biopredic® Skin Long Term (SLTM)
- Milieu KBM (Keratinocyte Basal Medium) + 1,4 mM CaCl₂ + antibiotiques (0.25 µg/ml amphotericine B, 10 µg/ml gentamycine)

3.2 Sélection des gènes d'intérêt :

Des gènes d'intérêts de 2 voies de signalisation impliquées dans la réponse à un rétinoïde décrit ci-après (différenciation et métabolisme/transport) sont sélectionnés.

Résultats exprimés en facteurs de modulations (moyennes absolues).

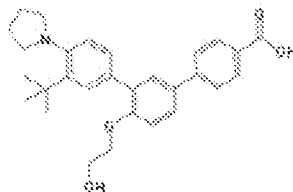
Différenciation	Métabolisme / Transport
DST	CYP26A1
KRT15	CRABP2
KRT19	DHRS3
KRT4	
DSC1	
KRT10	
KRT2	
KRT13	
LOR	
TGM3	
CDSN	
KLK6	
KLK13	

5

3.3 Comparaison entre les modèles et les milieux à 48 h : modulation de gènes d'intérêt décrit ci-dessus en qRT-PCR.

10

Le rétinoïde acide 3"-tert-Butyl-4'-(3-hydroxy-propoxy)-4"-pyrrolidin-1-yl-[1,1';3',1'']terphenyl-4-carboxylique ou Trifarotène de formule suivante :



15

est utilisé dans les tests qui suivent. Il est nommé Trifarotène dans la suite des exemples. Le terme EtOH signifie éthanol.

La concentration de rétinoïde utilisée est de 50 ppm ou de 100 ppm.

20

Quelle que soit le milieu et la méthode utilisée, une réponse pharmacologique caractéristique d'un traitement topique aux rétinoïdes est obtenue : normalisation de la kératinisation via la modulation des KRTs, propriétés exfoliantes via la régulation des KLKs et également catabolisme des rétinoïdes via l'induction de la CYP26A1. Le milieu de culture de Biopredic® (référence MIL305 sur le site internet de la société biopredic.com) permet d'obtenir une réponse aux stimuli, tout en préservant l'état histologique de la peau.

Le modèle selon l'invention, dans lequel des échantillons de peau de 8 mm de diamètre sont placés dans des inserts avec le milieu SLTM de Biopredic®, permet d'obtenir une signature pharmacologique identique à celle obtenue avec le modèle anneaux /KBM sur un temps de 48 heures.

5
3.4 : Réponse pharmacologique sur un temps supérieur à 7 jours - Comparaison du modèle anneaux et du modèle selon l'invention

La figure 2 présente les réponses pharmacologiques :

- 10 Graphe figure 2 (A) : modèle des anneaux de métal – milieu Skin Long Term de Biopredic®.
 Graphe figure 2 (B) : modèle selon l'invention – milieu Skin Long Term de Biopredic®

15 A 7 jours et avec le modèle des anneaux, on n'obtient plus de modulation génique, due principalement à une nécrose des tissus décelable en histologie. Le temps 9 jours ne peut donc pas être réalisé avec ce modèle. Le modèle des anneaux en métal (méthode utilisée sur 48 h) ne permet pas de maintenir la réponse pharmacologique aux rétinoïdes sur 7 jours (voir graphe figure 2 (A)). Par contre, le modèle de peau selon l'invention permet de maintenir la réponse pharmacologique aux rétinoïdes sur 9 jours (voir graphe figure 2 (B)).

20 Cet exemple montre que seul le modèle de peau selon invention permet de conserver l'activité pharmacologique du rétinoïde (trifarotène) jusqu'à au moins 9 jours.

Seul le modèle de peau selon l'invention permet le maintien de la peau en culture sur 9 jours dans des conditions histologiques et de réponse au stimulus du Trifarotène.

25 Seul le modèle selon l'invention permet un traitement répété (chronique) de la peau tout en conservant une réponse pharmacologique typique des rétinoïdes.

3.5: Intégrité histologique de la peau - Comparaison du modèle anneaux et du modèle selon l'invention

30 La qualité de l'échantillon de peau a été contrôlée en coupes histologiques, coloration Hématoxyline/Eosine.

Les coupes, après analyse, permettent de valider une intégrité de l'épiderme du modèle selon l'invention jusqu'à 9 jours de survie en culture, en condition non traitée.

35 Les coupes sont montrées sur la figure 3.

De plus, la réponse pharmacologique au traitement répété du rétinoïde est maintenue durant tout le temps de maintien en survie.

Le modèle de peau selon l'invention permet d'obtenir sur une période d'au moins 9 jours une réponse pharmacologique de la peau *ex vivo* tout en maintenant une intégrité histologique de la peau en conditions non traitées (figures 2 et 3).

5 Exemple 4 : Modèle de peau utilisable dans l'étude *ex vivo* des mécanismes impliqués dans la repigmentation de peaux de patients atteints de vitiligo

Des déchets opératoires provenant d'abdominoplastie ont été utilisés. La culture s'effectue en milieu liquide en posant la peau (derme vers le bas) sur un support poreux 0,4 µm.

10 Le milieu de culture utilisé est le "Skin Long Term Medium" de Biopredic® qui est changé tous les 2 ou 3 jours.

4.1. Détermination de la dimension des échantillons de peau à utiliser

15 Une expérience a été réalisée en comparatif avec des échantillons de peau de diamètre 4 mm et 8 mm, 4 mm étant la dimension habituellement utilisée lors d'études cliniques. Une cinétique de culture *ex vivo* de 2 à 15 jours a été réalisée. Après analyse histologique par un marquage Hématoxiline/Eosine, il apparaît que la peau reste morphologiquement intacte jusqu'à 15 jours sur les échantillons de 8 mm, alors qu'elle commence à être dégradée dès le 9^{ème} jour sur les
20 échantillons de 4 mm.

La culture de peau *ex vivo* est possible jusqu'à 15 jours. Dans le cadre d'étude clinique, des biopsies de 6 mm sur patients sont acceptables.

25 4.2. Viabilité et fonctionnalité de la peau en culture *ex vivo* sur des échantillons de 6 mm.

4.2.1. Viabilité :

30 • L'architecture cellulaire de la peau est maintenue après 15 jours de culture
Une cinétique de culture de peau *ex vivo* a été réalisée avec des échantillons de diamètre 6 mm. La qualité de la peau est déterminée par marquage Hématoxiline/Eosine sur des coupes histologiques. La structure de l'épiderme est maintenue jusqu'à 15 jours de culture avec la présence d'une couche basale de kératinocytes à la jonction dermo-épidermique, d'une couche
35 granuleuse et d'une couche cornée (figure 4, A).

- Les peaux ne montrent pas de signe d'apoptose ou d'hypoxie après 15 jours de culture *ex vivo* (données d'expression génique).

La peau étant toujours morphologiquement intacte après 15 jours de culture *ex vivo*, il a été vérifié si elle ne montrait pas de signes de souffrance dus notamment à des processus apoptotiques et hypoxiques. L'expression de gènes marqueurs d'apoptose (Bad, Bcl2) et d'hypoxie HIF1 α a été analysée par qRT-PCR. L'expression de gènes tels que Bad et Bcl2 reste stable au cours du temps suggérant que les cellules de la peau ne subissent pas d'apoptose. N'ayant plus d'apport en oxygène par la vascularisation, l'expression de HIF1 α dans la peau en culture a été analysée. Son expression n'est pas induite au cours du temps ce qui démontre que la peau reste suffisamment oxygénée. Après 15 jours de culture *ex vivo* la peau apparaît donc toujours viable.

En conclusion, la qualité de l'échantillon de peau de diamètre 6 mm en culture *ex vivo* est satisfaisante dans les conditions indiquées jusqu'à au moins 15 jours de culture.

4.2.2 Fonctionnalité de la peau en culture *ex vivo* : réponse à des agents propigmentants

Afin de tester la fonctionnalité de la mélanogénèse dans le modèle de peau *ex vivo* selon l'invention, les échantillons de peau de 6 mm de diamètre ont été stimulés tous les 2/3 jours avec la forskoline, agent pro-pigmentant agissant sur la synthèse de l'AMP cyclique. La forskoline est administrée par voie topique ou systémique à : 20 μ M, 200 μ M et 1 mM.

La forskoline induit les gènes de la mélanogénèse après 11 à 15 jours de culture.

La réponse à la forskoline est analysée par l'induction de certains gènes caractéristiques de la mélanogénèse: MITF (microphthalmia-associated transcription factor), tyrosinase et DCT (dopachrome tautomerase) (figure 4 B). Après 5 jours de stimulation, il n'y a pas d'effet de la forskoline sur l'expression génique de MITF, tyrosinase ou DCT. Sur les peaux traitées par la forskoline, de façon systémique, après 11 jours de stimulation, une nette augmentation des niveaux d'expression d'ARNm de MITF est observée d'environ 3 fois le témoin (quelle que soit la concentration de forskoline testée) ainsi qu'une légère augmentation de l'expression de tyrosinase et DCT. Après 15 jours de stimulation, les niveaux d'expression des ARNm de MITF, tyrosinase et DCT sont fortement augmentés *versus* 5 jours.

Le même schéma de réponse est obtenu avec une stimulation par voie topique mais dans des proportions plus faibles

En conclusion, les peaux sont encore fonctionnelles et capables de répondre à un agent pro-pigmentant après 15 jours de culture.

Puisque la forskoline augmente le niveau de l'ARNm de MITF, tyrosinase et DCT, il a été vérifié si le modèle de peau selon l'invention permettait de voir *ex vivo* l'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la pigmentation.

5 Par immunohistochimie (IHC) les expressions de MITF après 11 jours de stimulation et de tyrosinase/DCT après 15 jours de stimulation par la forskoline à 200 μ M ont été analysées (figure 4 C). La forskoline induit l'augmentation de la protéine MITF après 11 jours et de la tyrosinase et DCT après 15 jours de culture *ex vivo* (IHC).

10 Comme pour les niveaux d'ARNm, la forskoline induit l'augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la mélanogénèse : MITF, tyrosinase et DCT dans le modèle de peau *ex vivo* selon l'invention après au moins 15 jours de culture.

4.3. Conclusion

15 Un échantillon de peau de 6 mm de diamètre cultivé *ex vivo* pendant 15 jours dans les conditions précédemment décrites selon l'invention présente une morphologie intacte et répond à des inducteurs de pigmentation comme la forskoline. La réponse arrive tardivement puisque les ARNm des gènes de la pigmentation ne sont induits qu'après 11 jours pour MITF et 15 jours
20 pour tyrosinase et DCT. L'expression de ces marqueurs au niveau protéique suit une cinétique similaire à celle des taux d'ARNm.

Exemple 5 : des activateurs pharmacologiques de la voie Wnt stimulent cette voie *ex vivo* sur de la peau de patients vitiligo et induisent l'expression de marqueurs mélanoblastiques.

25 Des patients vitiligo (n=9) ont été biopsiés au niveau de zones lésionnelles. Les biopsies ont été stimulées *ex vivo* durant 14 jours chaque jour avec un inhibiteur de GSK3 β : CHIR99021 (3 μ M), du LiCl (20 μ M) ou un agoniste Wnt : SKL2001 (40 μ M). L'ARNm a été extrait et des RT-qPCR réalisées pour quantifier l'expression relative des isoformes de Wnt/LEF (figure 5A) et
30 des marqueurs pré-mélanocytaires MITF (figure 5B), DCT (figure 5C), PAX3 (figure 5D) et Brn2 (figure 5E).

Les 3 traitements activateurs de la voie Wnt (CHIR99021, SKL2001, LiCl) augmentent l'expression transcriptionnelle des isoformes de Wnt et de LEF (figure 5A). L'ARNm de MITF est
35 seulement induit par SKL2001 tandis que l'ARNm des autres marqueurs pré-mélanocytaires DCT (figure 5C), PAX3 (figure 5D) et Brn2 (figure 5E) sont induits par les 3 activateurs.

Exemple 6 : le traitement *ex vivo* de peaux vitiligo par des activateurs de la voie Wnt induit la différenciation de cellules souches résidentes en pré-mélanocytes.

- La peau dépigmentée issue de patient vitiligo a été stimulée chaque jour *ex vivo* avec un agoniste de la voie Wnt : SKL2001 (40 μ M) (figure 6B), un inhibiteur de GSK3 β : CHIR99021 (3 μ M) (figure 6C) ou LiCl 20 μ M (figure 6D). Après 14 jours, la réponse de la peau a été analysée en immunohistochimie (analyses des marqueurs pré-mélanocytaires). La co-localisation permet de visualiser la différenciation de mélanoblastes dans le derme (voir figure 6).
- 10 Les 3 traitements activateurs de la voie Wnt (CHIR99021, SKL2001, LiCl) induisent la différenciation des mélanoblastes en pré-mélanocytes, identifiables par l'expression des marqueurs DCT et PAX3 (IHC).

REVENDICATIONS

1. Modèle de peau humaine maintenant *ex vivo* une intégrité histologique et une
fonctionnalité biologique de la peau humaine jusqu'à 11 jours et plus, caractérisé en ce qu'il
comprend en combinaison :

- un échantillon de peau humaine de dimension(s) comprise(s) entre 5 et 10 mm et
constitué d'un épiderme et d'un derme placé sur

- un support de type insert présentant au niveau de sa base poreuse la/les même(s)
dimension(s) que l'échantillon de peau, la porosité de la base du support étant supérieure ou
égale à 0,4 μm ,

le derme de l'échantillon de peau et la base du support baignant dans un contenant comprenant
le milieu de culture Skin Long Term Medium (SLTM) de la société Biopredic®, ledit milieu de
culture étant renouvelé tous les un à trois jours.

2. Modèle de peau selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'échantillon de
peau humaine est un échantillon abdominal.

3. Modèle de peau selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la dimension
de l'échantillon de peau est un diamètre compris entre 6 et 8 mm.

4. Utilisation du modèle de peau humaine *ex vivo* selon la revendication 1 pour
évaluer les effets dermatologiques, cosmétiques et/ou nutraceutiques de composés ou
formulations d'intérêt.

5. Utilisation selon la revendication 4 pour mettre en évidence la différenciation de
cellules souches dans le cas de n'importe quelle pathologie dermatologique.

6. Procédé de modélisation et d'analyse d'un traitement sélectionné de la peau
humaine, comprenant les étapes ci-dessous :

a) exposition de l'échantillon de peau d'un modèle de peau humaine selon la
revendication 1 au traitement sélectionné,

b) renouvellement du milieu de culture Skin Long Term Medium (SLTM) de la société
Biopredic® tous les un à trois jours jusqu'à onze jours et plus, et

c) observation de l'effet exercé par le traitement sur l'échantillon de peau.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le renouvellement du milieu
de culture est effectué tous les deux à trois jours, de préférence tous les deux jours.

8. Utilisation d'un échantillon de peau humaine *ex vivo* pour analyser un traitement sélectionné de la peau, caractérisé en ce que l'échantillon de peau humaine i) présente une/des dimension(s) comprise(s) entre 5 et 10 mm, ii) est constitué d'un épiderme et d'un derme, et iii) est placé sur un support de type insert présentant au niveau de sa base poreuse la même dimension que ledit échantillon de peau, la porosité de la base du support étant supérieure ou égale à 0,4 μm , le derme de l'échantillon de peau et la base du support baignant dans un contenant comprenant le milieu de culture Skin Long Term Medium (SLTM) de la société Biopredic®, ledit milieu de culture étant renouvelé tous les un à trois jours jusqu'à onze jours et plus.

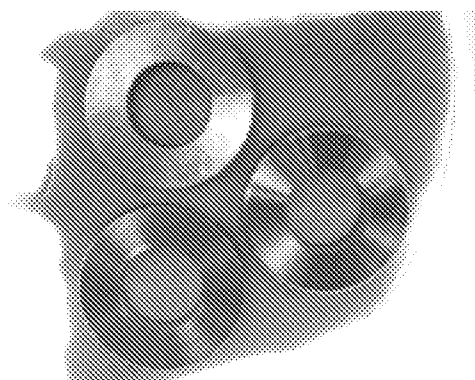
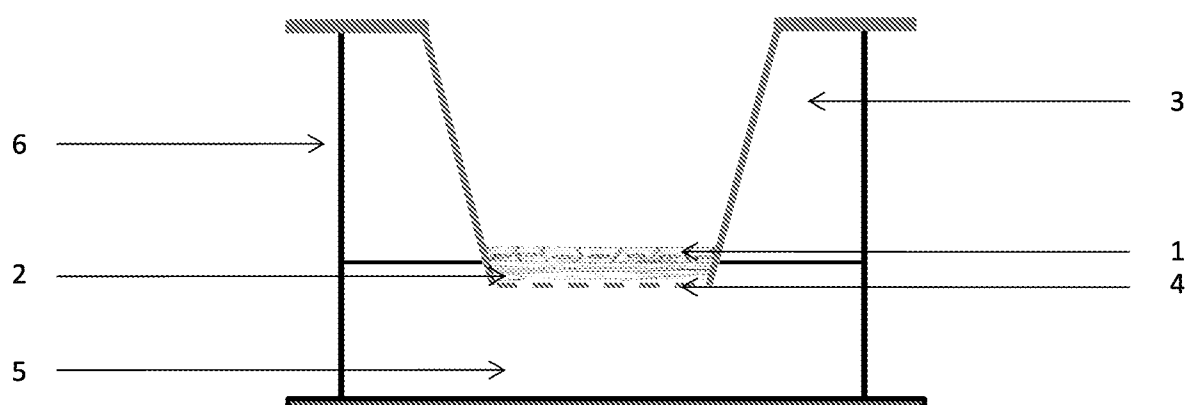
A/ Modèle anneaux dit «O-rings»**B/ Modèle selon l'invention**

FIGURE 1

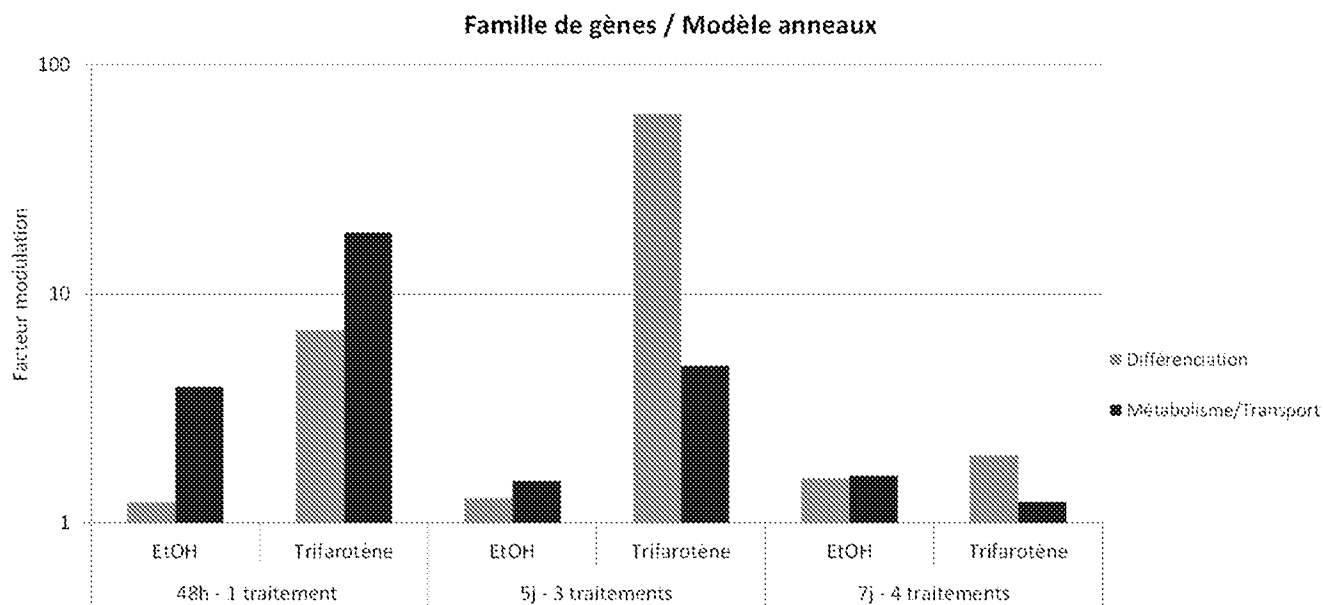
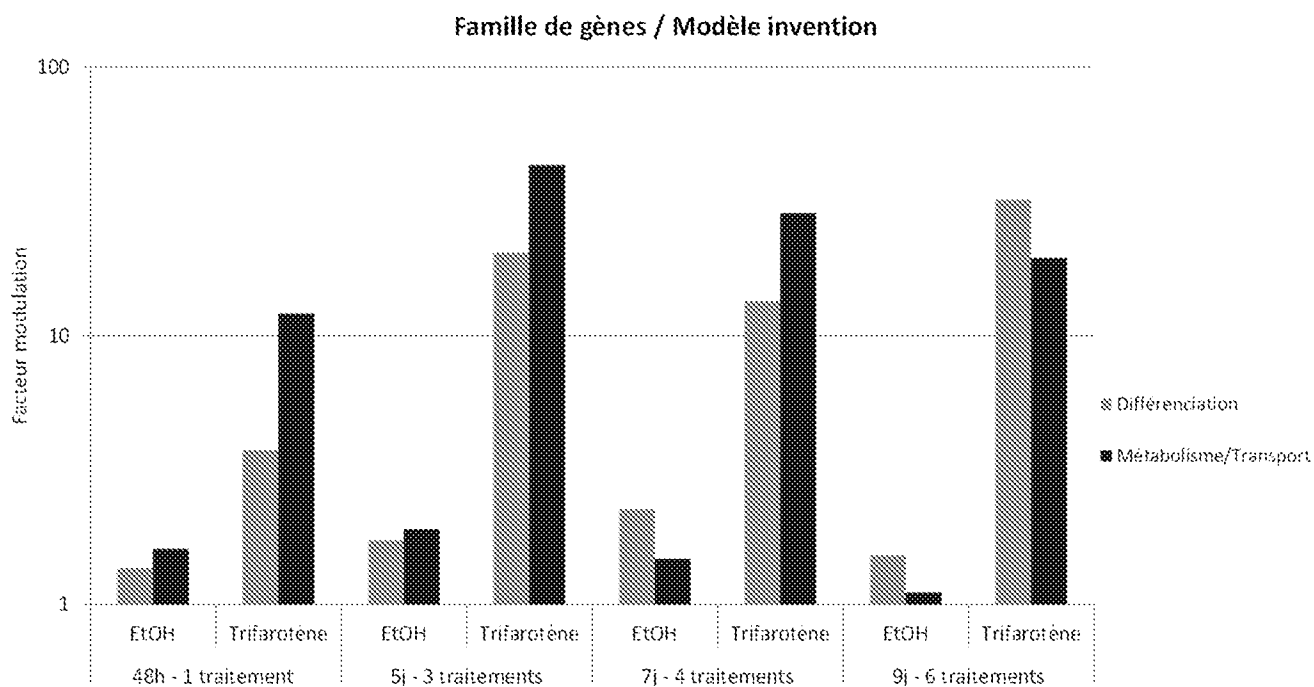
A/ Réponses pharmacologiques : Modèle anneaux**B/ Réponses pharmacologiques : Modèle selon l'invention**

FIGURE 2

3/6

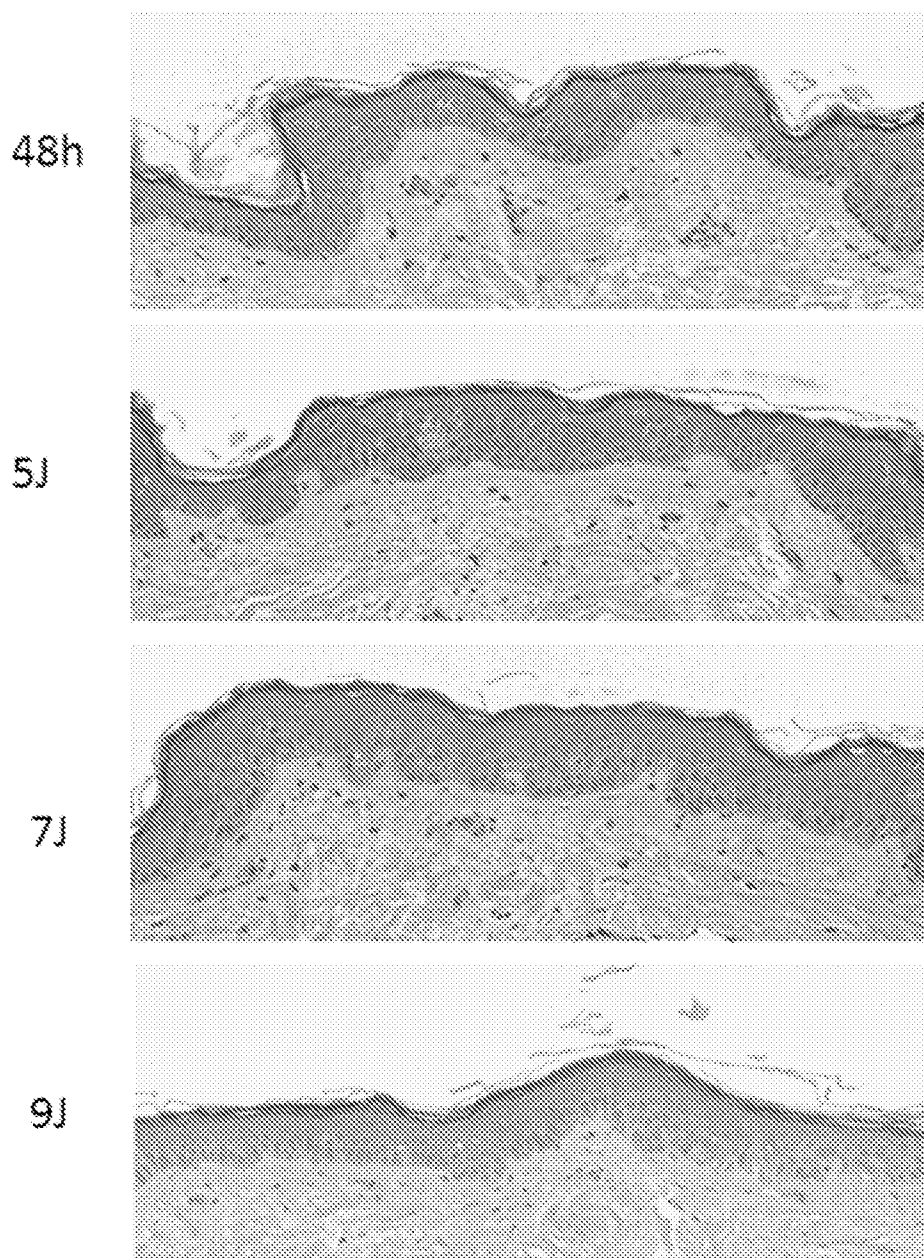


FIGURE 3

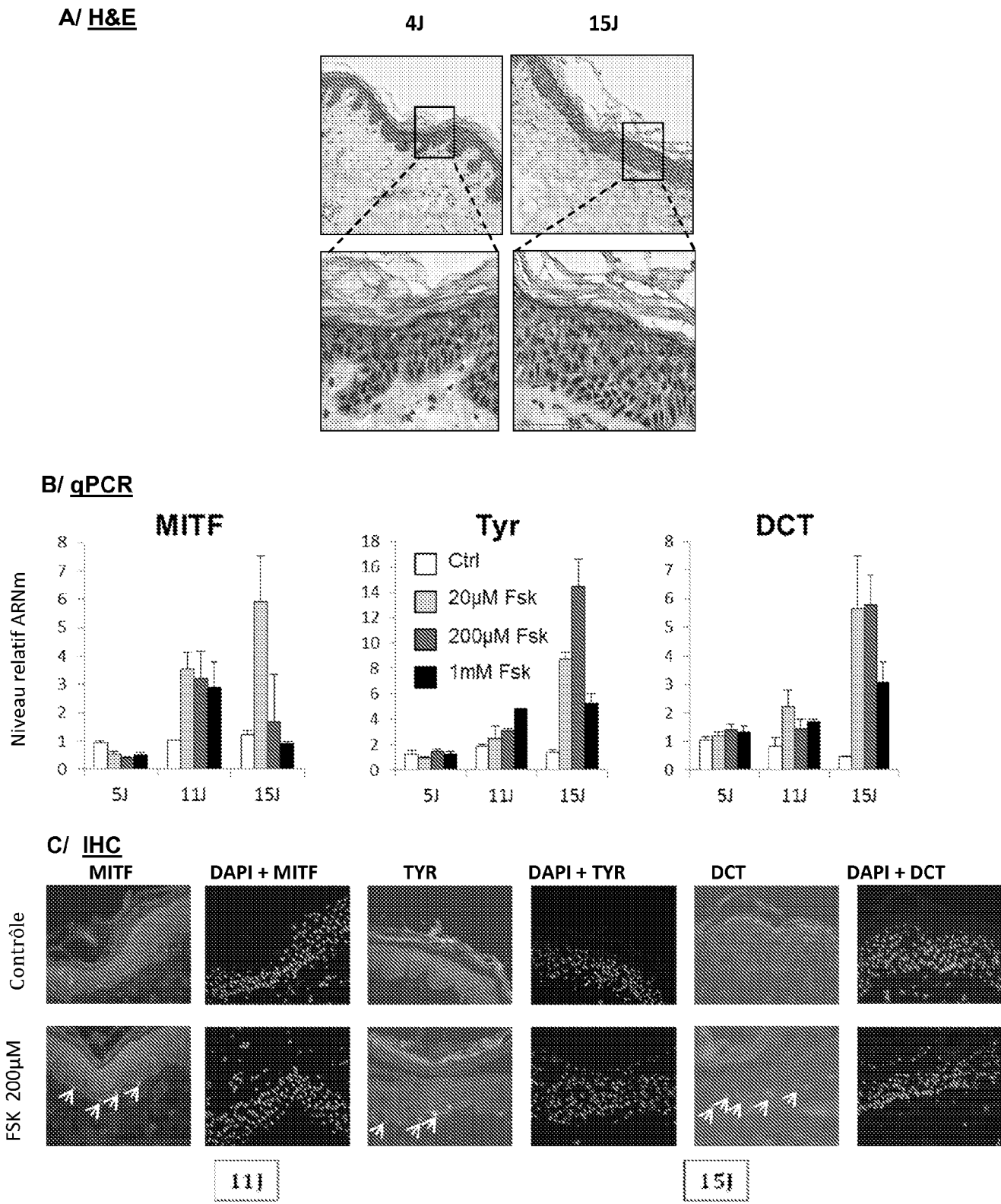
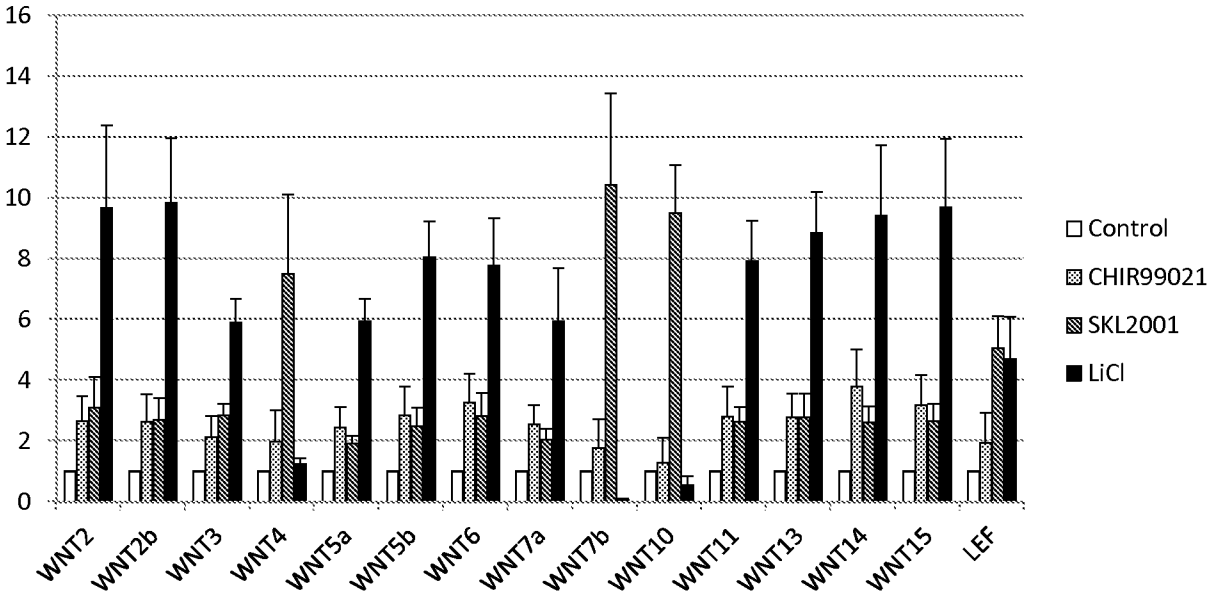


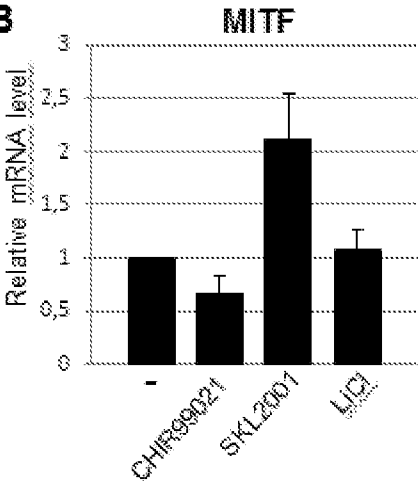
FIGURE 4

5/6

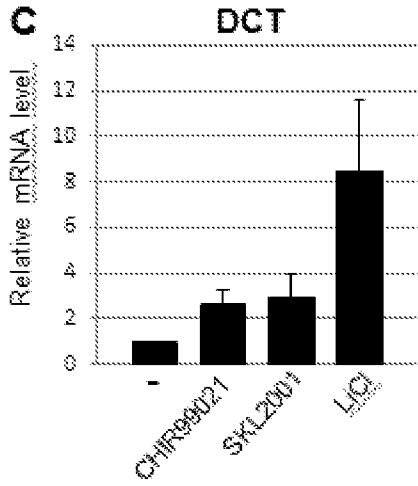
A



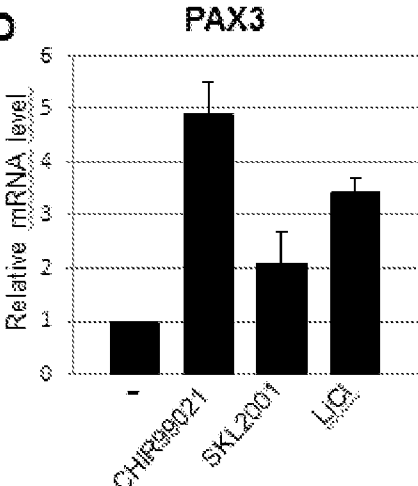
B



C



D



E

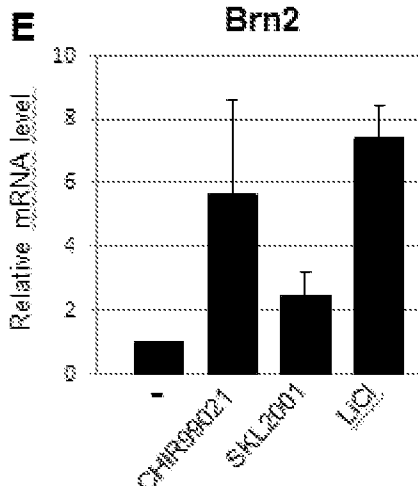


FIGURE 5

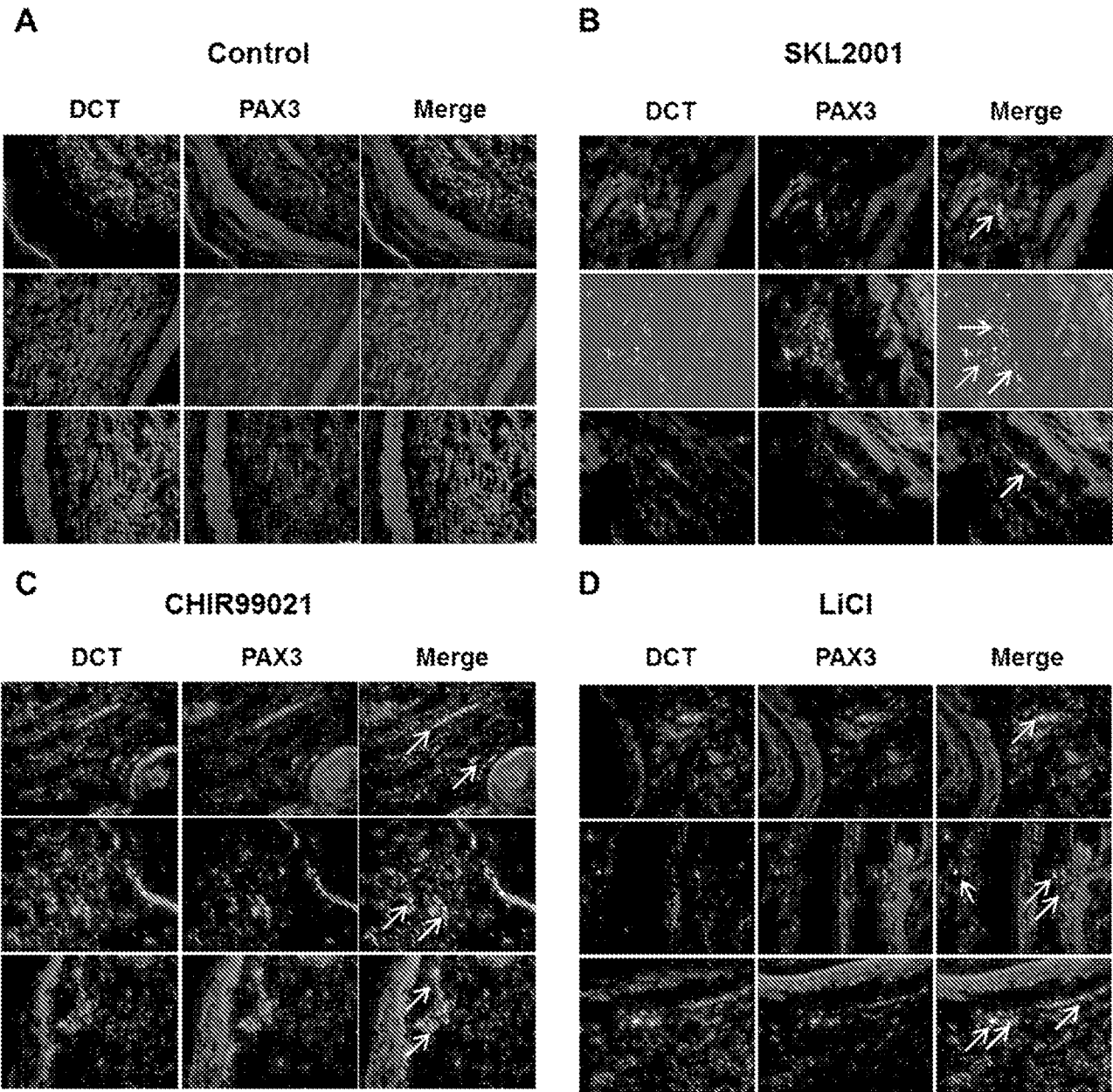


FIGURE 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/053611

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/071 A61L27/00 A61N1/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N A61L A61N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ANTONIO PERAMO ET AL: "Visible effects of rapamycin (sirolimus) on human skin explants in vitro", ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 305, no. 2, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 163-171, XP055216189, ISSN: 0340-3696, DOI: 10.1007/s00403-012-1288-3 page 164, paragraph 3 figure 1 ----- -/--	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 March 2016

Date of mailing of the international search report

17/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zuber Perez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2015/053611

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LEBONVALLET N ET AL: "The evolution and use of skin explants: Potential and limitations for dermatological research", EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOLOGY, JOHN LIBBEY EUROTEXT, FR, vol. 20, no. 6, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 671-684, XP002626329, ISSN: 1167-1122, DOI: 10.1684/EJD.2010.1054 the whole document page 675 - page 679 figure 1	1-8
A	----- BEREN ATAÇ ET AL: "Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion", LAB ON A CHIP, vol. 13, no. 18, 1 January 2013 (2013-01-01), page 3555, XP055216337, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c3lc50227a the whole document	1-8
L	----- Anaximandre: "Biopredic - Skin Long Term Culture (Product MIL305)", 4 March 2016 (2016-03-04), XP055255180, Retrieved from the Internet: URL: http://www.biopredic.com/index.php?rub=skin [retrieved on 2016-03-04] the whole document -----	1-8

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2015/053611

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. C12N5/071 A61L27/00 A61N1/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) C12N A61L A61N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	ANTONIO PERAMO ET AL: "Visible effects of rapamycin (sirolimus) on human skin explants in vitro", ARCHIVES OF DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 305, no. 2, 1 mars 2013 (2013-03-01), pages 163-171, XP055216189, ISSN: 0340-3696, DOI: 10.1007/s00403-012-1288-3 page 164, alinéa 3 figure 1 ----- -/--	1-8
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
4 mars 2016		17/03/2016
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale		Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Zuber Perez, C

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	LEBONVALLET N ET AL: "The evolution and use of skin explants: Potential and limitations for dermatological research", EUROPEAN JOURNAL OF DERMATOLOGY, JOHN LIBBEY EUROTTEXT, FR, vol. 20, no. 6, 1 novembre 2010 (2010-11-01), pages 671-684, XP002626329, ISSN: 1167-1122, DOI: 10.1684/EJD.2010.1054 le document en entier page 675 - page 679 figure 1	1-8
A	----- BEREN ATAÇ ET AL: "Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion", LAB ON A CHIP, vol. 13, no. 18, 1 janvier 2013 (2013-01-01), page 3555, XP055216337, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/c3lc50227a le document en entier	1-8
L	----- Anaximandre: "Biopredic - Skin Long Term Culture (Product MIL305)", 4 mars 2016 (2016-03-04), XP055255180, Extrait de l'Internet: URL:http://www.biopredic.com/index.php?rub=skin [extrait le 2016-03-04] le document en entier -----	1-8