

(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
9 août 2012 (09.08.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/104516 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 38/17 (2006.01) A61Q 7/02 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) G01N 33/00 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2012/050119

(22) Date de dépôt international :

20 janvier 2012 (20.01.2012)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1150713 31 janvier 2011 (31.01.2011) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **MUELLER, George** [DE/FR]; 9 rue de Berne, F-67000 Strasbourg (FR). **DUHERON, Vincent** [FR/FR]; 17 rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). **WILLIAMS, Ifor** [US/US];

Emory University School of Medicine, 1648 Pierce Drive, Atlanta, GA 30322 (US).

(74) Mandataire : **ENDERLIN, Eric**; NOVAGRAAF TECHNOLOGIES, 122 Rue Edouard Vaillant, F-92593 Levallois-Perret Cedex (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, 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, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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,

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : MODULATION OF EPIDERMO-PILOSEBACEOUS UNIT EPITHELIAL CELL PROLIFERATION VIA RANK

(54) Titre : MODULATION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES EPITHELIALES DE L'UNITE EPIDERMO-PILOSEBACEE VIA RANK

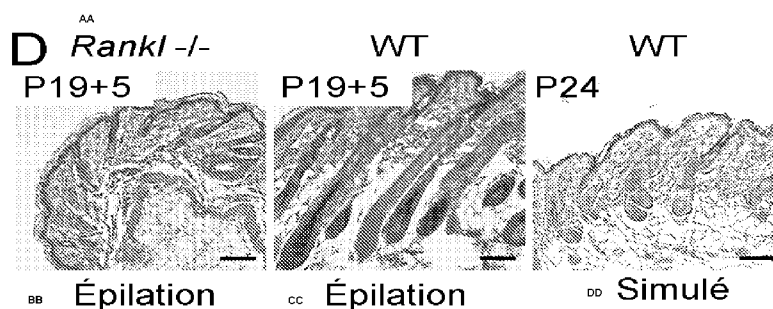


FIGURE 1

BB Hair removal
CC Hair removal
DD Simulated

(57) Abstract : The present invention relates to the modulation of homeostasis and/or the growth of epidermo-pilosebaceous unit epithelial cells, via modulation of the RANK receptor. The present invention has in particular a therapeutic use (inflammatory diseases such as psoriasis or atopic dermatitis, alopecia, hirsutism) and cosmetic use (head hair and body hair homeostasis and/or growth).

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à la modulation de l'homéostasie et/ou de la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-

[Suite sur la page suivante]

WO 2012/104516 A1



SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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

Publiée :

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

MODULATION DE LA PROLIFERATION DES CELLULES EPITHELIALES DE L'UNITE EPIDERMO-PILO-SEBACEE VIA RANK

DESCRIPTION

5

Domaine technique

La présente invention se rapporte à la modulation de la prolifération des cellules épithéliales de l'unité fonctionnelle épidermo-pilo-sébacée via la modulation du récepteur activateur de NF-κB (RANK, pour Receptor Activator of NF-κB).

10

La présente invention trouve une application en thérapeutique, par exemple dans le traitement de maladies inflammatoires de la peau (psoriasis, dermatite atypique, etc...), de l'alopecie (accélération de la chute des cheveux et/ou des poils), de l'hirsutisme [apparition d'une pilosité de type masculine dans des zones normalement glabres chez la femme (visage, cou, thorax, ligne blanche, régions fessières et intergénéitocrurales)], et en cosmétique, par exemple dans des compositions cosmétiques et procédés cosmétiques conduisant à moduler la croissance des cheveux et/ou des poils.

15

Dans la description ci-dessous, les références entre crochets ([1]) renvoient à la liste des références présentée à la fin du texte.

20

Etat de la technique

Le cycle normal de croissance des cheveux ou poils va de 2 à 6 ans. Chaque cheveu pousse d'environ 1 centimètre par mois au cours de cette phase. Environ 90 % des cheveux du cuir chevelu sont en phase de croissance (anagène). Environ 10% des cheveux du cuir chevelu, à un moment donné, sont dans une phase de repos (catagène). Après 2 à 3 mois, les cheveux qui étaient en repos chutent (télogène) pour être remplacés par la nouvelle repousse. Il est normal de perdre un certain nombre de cheveux (moins de 60 cheveux) chaque jour dans le cadre de

25

30

ce cycle. Toutefois, certaines personnes peuvent avoir une perte de cheveux excessive, du fait par exemple de changements hormonaux (grossesse), de stress, de maladie ou chirurgie majeure, etc.... Il existe des médicaments qui contribuent à ralentir ou même à empêcher le développement de la calvitie commune. Par exemple, le minoxidil (rogaïne®), est un vasodilatateur utilisé à l'origine, exclusivement comme médicament par voie orale pour traiter une pression sanguine élevée mais qui a présenté un effet secondaire intéressant pour le développement de la pilosité et arrêter le développement de la calvitie. Il a donc été produit sous forme topique à une concentration de 2 et 5%. Contrairement au grand nombre de lotions vendues en pharmacie sans ordonnance, vantées par de nombreuses publicités et parfois même, par la presse féminine ou masculine, seul le minoxidil (ainsi que le beaucoup plus récent finastéride avec lequel il serait susceptible de faire synergie) a une efficacité qui ait été médicalement démontrée (ce qui est très différent de "testé sous contrôle médical"). Le finastéride (propecia®) est un médicament anti-androgène synthétique qui agit en inhibant la 5-alpha réductase de type II, l'enzyme qui convertit la testostérone en dihydrotestostérone (DHT), pour soigner l'hypertrophie bénigne de la prostate, le cancer de la prostate et la calvitie. Il est disponible sur ordonnance, mais s'est montré inefficace chez les femmes. Toutefois, comme tout médicament pour combattre la perte de cheveux, l'effet secondaire le plus courant est la démangeaison du cuir chevelu. En particulier, le minoxidil peut être à l'origine de réactions allergiques, d'acné, de maux de tête, d'hypertrichose, mais plus grave causer des accès d'hypotension. En particulier, le finastéride peut être à l'origine d'impuissance, de désordres de l'éjaculation, de douleur des testicules, etc... Par ailleurs, à l'arrêt des traitements qui s'étalent généralement sur une durée de plus de 6 mois avant de juger des résultats, la perte de cheveux réapparaît. Si aucun traitement adéquat n'est disponible pour un type de chute de cheveux, d'autres solutions sont

envisageables : tissage des cheveux, prothèse capillaire, greffe de cheveux...

La peau est la plus grande surface épithéliale et son unité épidermo-pilo-sébacée comprend l'épiderme, le follicule pileux (HF) et la glande sébacée. Le HF a donc la particularité de subir des cycles de croissance (anagène), de régression (catagène) et de quiescence relative (télogène) [Paus et Cotsarelis, N. Engl. J. Med., 341 : 491-497, 1999] [1], ce qui en fait un excellent système pour l'étude des cellules (souches) de l'épiderme et du remodelage d'organes [Cotsarelis, J. Invest. Dermatol., 126 : 1459-1468, 2006 ; Fuchs, Nature, 445 : 834-842, 2007 ; Blanpain et al., Cell, 128 : 445-458, 2007 ; Watt et Hogan, Science, 287 : 1427-1430, 2000] [2-5]. Chaque HF est composé d'une partie supérieure permanente, qui inclut la glande sébacée et la région de renflement (bulbe pileux), et une partie cyclique inférieure temporaire. L'équilibre local des stimulateurs et inhibiteurs de croissance des cheveux/poils est critique pour l'initiation d'une nouvelle croissance des cheveux/poils [Fuchs, Cell, 137 : 811-819, 2009 ; Morgan, Nat. Genet., 40 : 1269-1270, 2008 ; Plikus et al., Int. J. Dev. Biol., 53 : 857-868, 2009 ; Schneider et al., Curr. Biol., 19 : R132-142, 2009] [6-9]. Curieusement, beaucoup de ces acteurs moléculaires opèrent également dans le développement et le remodelage osseux (e.g. membres de la superfamille TGF- et leurs antagonistes, hormones parathyroïdiennes et protéines Hedgehog) [Klopcic et al., Eur. J. Cell Biol., 86 : 781-799, 2007 ; Glass et al., Dev. Cell, 8 : 751-764, 2005 ; Kronenberg, Nature, 423 : 332-336, 2003 ; Aguila et Rowe, Immunol. Rev., 208 : 7-18, 2005 ; Ross et Christiano, J. Clin. Invest., 116 : 1140-1149, 2006] [10-14].

RANK, initialement identifié en tant que régulateur de la masse osseuse et plus récemment pour son rôle dans l'activation des cellules épithéliales de la glande mammaire, est une protéine transmembranaire de type I (partie N-terminale extracellulaire) appartenant à la superfamille des

récepteurs du TNF (TNFRSF11a) qui est surtout exprimée par les ostéoclastes et les cellules dendritiques [Leibbrandt et Penninger, Ann. NY Acad. Sci., 1143 : 123-150, 2008] [15]. Ce récepteur s'assemble à la surface des cellules sous la forme d'un complexe homotrimérique pour
5 interagir avec RANKL [références quant à la structure RANK–RANKL : Ta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 20281-20286, 2010 ; Liu et al., J. Immunol., 184 : 6910-6919, 2010] [55, 56].

RANKL est une cytokine de la superfamille du TNF. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) qui
10 est surtout présente dans les organes lymphoïdes (cellules stromales et lymphocytes T activés) et le tissu osseux où elle est exprimée à la surface des ostéoblastes (cellules responsables de la formation osseuse) sous la forme d'un homotrimère [Leibbrandt et Penninger, 2008, précité ; Naito et al., Genes Cells, 4 : 353-362, 1999] [15, 16]. Il existe deux isoformes de
15 RANKL (d'environ 40-45 kDa chacune) ainsi qu'une forme soluble (d'environ 30 kDa), cette dernière pouvant provenir d'un épissage alternatif ou d'un clivage protéolytique des formes membranaires par des protéases telles que TACE, MT1-MMP, MMP-7 et MMP-14 [Leibbrandt et Penninger, 2008, précité] [15].

20 OPG (ostéoprotégérine) est exprimé par les ostéoblastes et joue un rôle de récepteur leurre en interagissant avec RANKL [Leibbrandt et Penninger, 2008, précité] [15].

Des souris déficientes en RANK ou RANKL affichent une densité osseuse augmentée en raison d'une formation réduite d'ostéoclastes, mais
25 la perte du récepteur leurre (OPG) de RANKL conduit à une masse osseuse plus faible, du fait d'une activation incontrôlée de RANK [Walsh et Choi, Cytokine Growth Factor Rev., 14 : 251-263, 2003 ; Tanaka et al., Immunol Rev., 208 : 30-49, 2005] [17, 18]. RANK apparaît aujourd'hui comme un acteur important dans la croissance et la différenciation des
30 cellules épithéliales. Il est requis pour la formation des glandes mammaires

en lactation [Fata et al., cell, 103 : 41-50, 2000 ; Cao et al., Cell, 107 : 763-775, 2001 ; Beleut et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 2989-2994, 2010] [19-21], des cellules épithéliales médullaires du thymus [Rossi et al., J. Exp. Med., 14 : 14, 2007 ; Hikosaka et al., Immunity, 29 : 438-450, 2008 ; Akiyama et al., Immunity, 29 : 423-437, 2008] [22-24], des cellules des microvillosités de l'intestin [Knoop et al., J. Immunol., 183 : 5738-5747, 2009] [25] et a été impliqué dans la croissance et métastase de la prostate [Luo et al., Nature, 18 : 18, 2007 ; Armstrong et al., Prostate, 68 : 92-104, 2008] [26, 27] et des cancers épithéliaux mammaires [Schramek et al., nature, 468 : 98-102, 2010 ; Gonzalez-Suarez et al., Nature, 468 : 103-107, 2010] [28, 29]. Ainsi RANK affecte une large variété de cellules épithéliales de différents organes.

Actuellement, le développement de produits cosmétiques ou dermatologiques visant à faire repousser ou à contrôler la pousse du cheveu/poil chez l'homme nécessite de la peau chevelue d'un donneur.

Il existe donc un réel besoin de fournir de nouvelles compositions ou méthodologies pour régénérer une peau chevelue/poilue ou un follicule pileux ainsi que de nouvelles molécules permettant d'induire ou réduire la croissance du cheveu / poil, palliant les défauts, inconvénients et obstacles de l'art antérieur, en particulier d'une composition et/ou d'un procédé permettant la repousse ou le contrôle de la pousse du cheveu/poil facilement et en s'affranchissant de la peau d'un donneur, et la réduction des coûts et délais.

Description de l'invention

La présente invention a précisément pour but de répondre à ce besoin et aux inconvénients de l'art antérieur.

Les Inventeurs ont en effet mis en évidence de manière tout à fait inattendue que des souris déficientes en ligand L de RANK (RANKL) sont incapables d'initier une nouvelle phase de croissance du cycle pileux et affichent une homéostasie épidermique arrêtée. Par ailleurs, ils ont mis en

évidence que l'administration d'un anticorps anti-RANKL conduit à un retardement de la phase de croissance du poil. Ils ont également mis en évidence de manière inattendue que des souris transgéniques surexprimant RANK dans le follicule pileux ou l'administration de RANKL recombinaut active(nt) le cycle pileux et la croissance épidermique.

La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'un ligand de RANK pour la fabrication d'un médicament destiné à moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

La présente invention se rapporte également à un ligand de RANK pour utilisation comme médicament destiné à moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

On entend par « cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée » au sens de la présente invention, les cellules épithéliales de l'épiderme, du follicule pileux ou de la glande sébacée.

La présente invention se rapporte également à l'utilisation d'un ligand de RANK pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de maladies inflammatoires de la peau telles que psoriasis ou dermatite atypique, de l'alopécie, et/ou de l'hirsutisme.

La présente invention se rapporte également à un ligand de RANK pour utilisation comme médicament destiné au traitement de maladies inflammatoires de la peau telles que psoriasis ou dermatite atypique, de l'alopécie, et/ou de l'hirsutisme.

La présente invention a encore pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ligand de RANK et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

On entend par « excipient pharmaceutiquement acceptable » au sens de la présente invention, un quelconque véhicule, qui n'interfère pas avec l'efficacité de l'activité biologique de l'ingrédient actif et qui n'est pas toxique pour l'hôte auquel il est administré. Par exemple, pour l'administration parentérale, les ingrédients actifs ci-dessus peuvent être

formulés sous forme d'unité de doses pour injection dans des véhicules tels que solution saline, solution de dextrose, solution d'albumine sérique et de Ringer.

5 En plus du véhicule pharmaceutiquement acceptable, les compositions de la présente invention peuvent également comprendre des quantités mineures d'additifs, tels que diluants, lubrifiants (e.g. stéarate de magnésium), désintégrants (e.g. croscarmellose), agents stabilisants, excipients, tampons, agents émulsifiants, adjuvants, agents de solubilisation et agents de conservation.

10 L'administration de tels ingrédients actifs peut s'effectuer par voie intraveineuse, intra-musculaire ou sous-cutanée. Les autres voies d'administration qui peuvent établir les taux sanguins souhaités des ingrédients respectifs, sont comprises par la présente invention.

15 Ledit ligand de RANK ou ladite composition pharmaceutique peut être utilisée pour l'obtention d'un médicament destiné au traitement destiné au traitement de maladies inflammatoires de la peau telles que psoriasis ou dermatite atypique, de l'alopecie, et/ou de l'hirsutisme.

La présente invention a encore pour objet une composition cosmétique ou dermatologique comprenant un ligand de RANK.

20 Ladite composition cosmétique de l'invention peut comprendre en outre par exemple un ou plusieurs agents de formulation choisis parmi les corps gras, des actifs hydrosolubles, les gélifiants, les émulsionnants, les agents hydratants, les adoucissants, les antioxydants, les anti-inflammatoires, les conservateurs, les huiles, les glycols, les parfums, etc... et tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétologie.

25 Ladite composition cosmétique de l'invention peut se présenter sous toute forme connue de l'homme du métier dans le domaine de la cosmétique, comme par exemple, une crème, un lait, une lotion, un gel, un masque, etc..., sans aucune restriction galénique particulière autre que
30 celle pour l'application sur la peau.

Ladite composition cosmétique ou dermatologique peut être utilisée pour moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée. Elle peut notamment être utilisée pour provoquer ou stimuler la croissance des cheveux et/ou des poils, ou encore pour retarder ou inhiber la croissance des cheveux et/ou poils.

La présente invention se rapporte également à un procédé cosmétique destiné à moduler la croissance des cheveux et/ou poils comprenant une étape d'application sur la peau d'un ligand de RANK ou d'une composition cosmétique ou dermatologique selon l'invention.

Quelque soit l'utilisation ou l'application thérapeutique ou cosmétique, à titre d'exemple, le ligand de RANK peut être choisi parmi un agoniste de RANK : e.g. RANKL ou un analogue de celui-ci (par exemple autres cytokines de la superfamille du TNF activant RANK), anticorps anti-RANK agonistes pour induire la signalisation de RANK (www.rndsystems.com/pdf/af692.pdf), ou un antagoniste de RANK : e.g. OPG, anticorps anti-RANKL (Denosumab d'Amgen) [Kamijo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 347 : 124-132, 2006] [30], peptides qui bloquent RANK [Aoki et al., J. Clin. Invest., 116:1525-34, 2006] [53], et peptides qui antagonisent la signalisation de RANK [Ye et al., Nature, 418:443-7, 2002] [54].

RANKL est une cytokine de la superfamille du TNF. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de type II (partie N-terminale intracellulaire) qui est surtout présente dans les organes lymphoïdes et le tissu osseux où elle est exprimée à la surface des ostéoblastes (cellules responsables de la formation osseuse) sous la forme d'un homotrimère [Leibbrandt et Penninger, 2008, précité ; Naito et al., 1999, précité] [15, 16]. Il existe deux isoformes de RANKL (d'environ 40-45 kDa chacune) ainsi qu'une forme soluble (d'environ 30 kDa), cette dernière pouvant provenir d'un épissage alternatif ou d'un clivage protéolytique des formes membranaires par des protéases telles que TACE, MT1-MMP, MMP-7 et MMP-14 [Leibbrandt et Penninger, 2008, précité] [15].

La présente invention se rapporte également à un procédé d'identification d'une molécule candidate pour moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- 5 - préparation d'au moins une cellule ou d'un échantillon tissulaire exprimant RANK ;
- mise en contact de ladite au moins une cellule ou dudit échantillon tissulaire avec une molécule test ;
- détermination de l'expression ou l'activité de RANK ;

10 où une modulation de l'expression ou de l'activité de RANK en présence de la molécule test par rapport à l'expression ou l'activité de RANK en l'absence de ladite molécule test indique que la molécule test module l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

15 La « préparation d'au moins une cellule » est réalisée par n'importe quel moyen connu de l'homme du métier, par exemple il s'agit de cellules ou échantillon de cellules exprimant RANK, de cellules ou échantillon de cellules transfectées pour exprimer RANK, voire d'un animal non-humain transgénique pour RANK. De préférence l'échantillon tissulaire exprimant

20 RANK est une section de la peau d'un mammifère, préférentiellement humain.

La « mise en contact » est réalisée par n'importe quel moyen connu de l'homme du métier, par exemple ajout de la molécule test dans le surnageant de culture, injection (sous-cutanée) ou application topique (sur

25 l'épiderme ev. dans une formulation qui permet une pénétrance des couches suprabasales) de la molécule test.

La « détermination de l'activité ou de l'expression de RANK » est réalisée par n'importe quel moyen connu de l'homme du métier, par exemple par la visualisation directe de la stimulation ou de l'inhibition de la

30 croissance des poils, de l'épaisseur de l'épiderme, la mélanisation de la

peau en phase anagène rendant la peau noire, et/ou la quantification de l'ARNm de synthèse de kératine du poil ou de l'épiderme.

D'autres avantages pourront encore apparaître à l'homme du métier à la lecture des exemples ci-dessous, illustrés par les figures annexées, donnés à titre illustratif.

Brève description des figures

- La figure 1 représente la nécessité de RANK pour la phase anagène du HF **(A)** Les HF de souris *Rankl*^{-/-} sont arrêtés en phase télogène, alors que les souris WT de la même portée sont en phase anagène à P28 **(B)** Représentation schématique de la morphogenèse des et du cycle du HF dans les souris *Rankl*^{-/-} et contrôle, et l'incapacité de toutes les souris *Rankl*^{-/-} d'entrer en phase anagène à P28-49 **(C)** Arrêt des HF *Rankl*^{-/-} en phase télogène **(D)** 5 jours après l'épilation des poils à P19, les HF sont en phase anagène avancée dans les souris WT mais restent en phase télogène dans les souris *Rankl*^{-/-}. Les souris WT traitées à blanc affichent une phase anagène normale. Les barres d'échelle représentent 100µm, 50µm dans les encarts. Les sections incluses dans la paraffine sont colorées par l'hématoxyline-éosine.
- La figure 2 représente l'indépendance des cellules souches et du compartiment cellulaire mésenchymateux du HF vis-à-vis de la RANK-signalisation **(A)** Identification de cellules souches CD34⁺ **(B)** et de cellules (SHG) P-cadhérine⁺ dans des HF en phase télogène de souris contrôle et *Rankl*^{-/-} à P24 par immunofluorescence. Les noyaux ont été coloprés avec DAPI. DP = papille dermique. Les barres d'échelle représentent 20µm **(B)** Cytométrie en flux de cellules souches CD34⁺ parmi des kératinocytes kératine 14⁺ dans des HF en phase télogène de souris WT et *Rankl*^{-/-}. Les flèches pointent les cellules kératine 14⁺ CD34⁺ dans le quadrant supérieur droit. Le graphe montre le % de cellules CD34⁺ et kératine 14⁺ dans 3 souris KO et contrôles de la même portée. *p<0,05 **(C)** Identification de papille dermique folliculaire par leur activité phosphatase alcaline. Les

barres d'échelle représentent 20µm **(D)** Renouveaulement pileaire *Rankl*^{-/-} restauré après transplantation sur des souris nude à la semaine 3 et analyse à la semaine 6. Une section de peau *Rankl*^{-/-} montre des HF en phase anagène. L'image est représentative de 5 expérimentations de transplantation. La barre d'échelle représente 100µm. La section incluse dans la paraffine a été colorée par l'hématoxyline-éosine.

– La figure 3 représente l'expression de RANK, RANKL et OPG dans les cellules souches du follicule pileux **(A)** Localisation de RANK, RANKL et OPG dans les cellules souches en phase télogène WT **(B)** et les cellules souches (SHG) à P24 par immunofluorescence. Les noyaux ont été marqués avec DAPI. DP = papille dermique. Les barres d'échelle représentent 20µm. 6 souris ont été analysées pour RANK et RANKL, et 6 souris pour OPG **(B)** RT-PCR de *Rank*, *Rankl*, *Opg* et *Gapdh* dans des cellules SHG P-cadhérine⁺ et souches CD34⁺ triées par FACS **(C)** Mesures (moyenne ± écart-type) de la transcription des gènes *Rankl* et *Opg* par qRT-PCR dans la peau entière et **(D)** de RANKL et OPG solubles par ELISA dans des cultures peau-organe aux âges indiqués. n = nombre de souris par analyse, minimum de 6 souris / point dans le temps. **(E)** RT-PCR des transcrits de *Rank*, *Rankl*, *Opg* et *Gapdh* dans l'épiderme et le derme à P28 **(F)** Immunofluorescence de RANKL et de la kératine 14 sur une section de peau à P28. Les noyaux ont été colorés avec DAPI. La barre d'échelle représente 50µm **(G)** Immunofluorescence de RANKL et GATA-3 d'un HF en phase anagène. Les noyaux ont été colorés avec DAPI. La barre d'échelle représente 30µm **(H)** Hybridation *in situ* pour l'ARNm de RANKL (antisens) ou contrôle (sens) sur de la peau en phase anagène P28.

– La figure 4 représente l'entrée précoce en phase anagène dans les souris Rank-Tg et en réponse à RANKL recombinant **(A)** HF de souris WT en phase anagène II/IIIa, alors que les HF de souris *Rank*-Tg sont déjà en phase anagène IIIc à P24. Les barres d'échelle représente 100µm **(B)**

HF de souris WT en phase télogène, alors que les HF de souris Rank-Tg sont en phase anagène IV/V à P86. Les barres d'échelle représente 100µm **(C)** Représentation schématique de la morphogenèse des poils et des transitions de phase télogène à anagène du cycle pileux dans des souris *Rank-Tg* et contrôle. Les flèches rouges pointent à P24 et les flèches bleues pointent à P56, correspondant aux images des panneaux **(A)** et **(B)** **(D)** Souris WT âgées de 8 semaines recevant 2 injections en sous-cutanée de 100µg de RANKL-GST ou de contrôle GST avec un d'intervalle de 12h. 6 jours plus tard, la peau noire a été analysée pour la phase anagène. La représentation graphique de 3 souris traitées sur 4, dont les HF sont entrés en phase anagène, par rapport aux souris contrôle restant en phase télogène **(E)** Image de HF en phase anagène d'une souris traitée par RANKL-GST, alors qu'elles sont en phase télogène dans la souris contrôle GST. Les barres d'échelle représentent 100µm, 50µm dans l'encart. Les sections incluses dans la paraffine ont été colorées par l'hématoxyline-éosine.

– La figure 5 représente la régulation de l'homéostasie épidermique par RANK **(A)** Différentes épaisseurs de l'épiderme de la peau de souris Tg, WT, *Rankl*^{-/-} âgées de 4 semaines, visualisées sur des sections fixées, incluses dans la paraffine, colorées au trichrome de Masson. Les barres d'échelle représentent 20µm **(B)** Epaisseur d'épiderme mesurée sur 10 images choisies aléatoirement de 4 souris de chaque génotype par unité de temps. Les données sont une moyenne de l'écart-type **(C)** Identification (têtes de flèches) de cellules de l'épiderme interfolliculaires en prolifération BrdU⁺, colorées à l'éosine. Les barres d'échelle représentent 20µm **(D)** Graphique montrant le nombre de kératinocytes de l'épiderme BrdU⁺ pour chaque souris. Les données sont une moyenne de l'écart-type **(E)** Souris Tg recevant un anticorps anti-RANKL ou injectées à blanc (contrôle) tous les 3 jours de P10 à P45. Les peaux sont analysées pour le cycle du HF et la taille de l'épiderme sur des sections colorées avec de l'hématoxyline-éosine. Les barres d'échelle

représentent 50µm **(F)** Représentation schématique du stade du HF de 8 souris traitées et de 7 souris contrôle **(G)** Mesures de l'épaisseur de l'épiderme de 8 souris traitées et de 7 souris contrôle. Les barres représentent des valeurs moyennes. ep = épiderme. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

– La figure 6 représente **(A)** la RT-PCR des transcrits de *Rank*, *Rankl*, *Opg* et *Gapdh* dans la peau de souris âgées de 5 jours et de 15 jours **(B)** l'hybridation *in situ* pour l'ARNm de RANK et RANKL (antisens) ou contrôle (RANK sens) au jours 5 postpartum (P5) **(C)** la morphogenèse d'un follicule pileux normal de souris *Rankl*^{-/-}, affichant une phase anagène précoce à P5 et une entrée du cycle pileux normale avec une phase catagène II à P15. Les barres d'échelle représentent 100µm **(D)** la présence des 4 types de poils (monotriche, alène, auchène et zigzag) dans une souris *Rankl*^{-/-} âgée de 45 jours.

– La figure 7 représente **(A)** les follicules pileux *Rankl*^{-/-} ne parvenant pas à entrer en phase anagène au jour 40 post partum (P40) ou P45. Les follicules pileux WT sont en phase catagène VII à P40 et en seconde phase télogène à P45 (avec les cheveux club actuels). Les barres d'échelle représentent 100µm **(B)** les follicules pileux *Rankl*^{-/-} ne parvenant pas à entrer en phase anagène à P25. La peau du dos des souris *Rankl*^{-/-} et son contrôle de la même lignée WT ont été analysés pour l'initiation du renouvellement du HF à un âge où la phase anagène II est visible. Les barres d'échelle représentent 200µm. Les sections incluses dans la paraffine ont été colorées avec l'hématoxyline-éosine **(C)** l'identification de rares cellules RANKL⁺ par un immunomarquage anti-RANKL dans l'épiderme WT à P28 avec un contre-marquage DAPI. Les barres d'échelle représentent 10µm. * = marquage non spécifique du corneum stratum, les lignes pointillées indiquent la jonction dermo-épidermique **(D)** le marquage immunofluorescent de RANK dans une section de peau à P28 avec un contre-marquage DAPI. ORS = gaine de la racine externe, HF = follicule pileux, ep = épiderme. Les têtes des flèches pointent le renflement du

follicule pileux. La barre d'échelle représente 20 μ m **(E)** les sections de peau de souris WT à P28 montrant les cellules souches du renflement du follicule pileux doublement marqué α 6-RANK et CD34-RANK (flèches). Les noyaux ont été marqués avec DAPI. ep = épiderme, les têtes des flèches pointent le renflement. Les barres d'échelle représentent 20 μ m et 30 μ m (droite).

– La figure 8 représente **(A)** la surexpression de RANK (tête de flèche) sous le contrôle du promoteur de gène S100A8 dans les cellules SHG P-cadhérine⁺. Les noyaux ont été marqués avec DAPI. B=renflement, DP=papille dermique. La barre d'échelle représente 20 μ m **(B)** RANK-transgénique induisant la signalisation NF- κ B. Les cellules HEK 293T ont été transfectées de manière transitoire avec le plasmide d'expression de *Rank* transgénique et un plasmide d'expression de la luciférase sous le contrôle de NF- κ B. Les cellules ont été stimulés avec RANKL recombinant. L'activité du promoteur NF- κ B a été exprimée comme le facteur d'augmentation des unités luciférase par rapport aux cellules ayant seulement reçu le plasmide rapporteur NF- κ B. Les données sont représentatives de 3 expérimentations **(C)** les mesures (moyenne $\pm$ écart-type) des protéines OPG et RANKL solubles par ELISA dans des cultures peau-organe, aux âges indiqués dans les souris contrôle (WT) et Rank-transgénique (Tg) **(D)** les souris *Rank*-Tg âgées de 3 mois présentant une alopecie discrète par rapport aux souris de même portée contrôle (E) les cellules HEK 293T exprimant de manière stable RANK et transfectées avec le plasmide rapporteur NF- κ B ont été stimulées avec différentes concentrations de RANKL-GST. Les données ont été exprimées comme le facteur d'augmentation des unités luciférase par rapport aux cellules non stimulées. Elles représentent les moyennes de triplicatas et sont représentatives de 3 expérimentations.

– La figure 9 représente **(A)** l'immunolocalisation de RANK endogène de kératinocytes basaux dans des souris *Rank*-transgénique

(Tg) et WT. Le contrôle a été réalisé via une immunoglobuline de chèvre antigène-non spécifique. Les noyaux ont été colorés par DAPI. Les barres d'échelle représentent 10µm. * = coloration non spécifique du corneum stratum, les lignes pointillées indiquent la jonction dermo-épidermique **(B)**

5 le TNF α et l'IL-1 β mesurés par ELISA dans les surnageants de cultures peau-organe de 24h de souris *Rank*-Tg et WT à des âges différents. Les niveaux en cytokine ont été normalisés au poids de peau. Chaque point de données représente une souris et les barres d'échelles représentent la valeur moyenne ($\pm$ écart-type des barres verticales). (**p<0,01) **(C)**

10 l'immunomarquage des cellules T CD3⁺ (flèches) dans la peau de souris *Rank*-Tg et WT. Le contre-marquage a été réalisé avec DAPI. Un marquage non spécifique du corneum stratum est indiqué par un astérisque. Les lignes pointillées indiquent la jonction dermo-épidermique. Les images sont représentatives d'au moins 3 souris de chaque groupe. Les barres

15 d'échelle représentent 20µm **(D)** la récupération cellulaire augmentée de kératinocytes épidermiques primaires de souris *Rank*-Tg âgées de 3 semaines par rapport aux contrôles WT, 15 jours après l'ensemencement d'un milieu de croissance de kératinocytes à faible teneur en calcium. Les données sont l'écart-type moyen de doublons et sont représentatives de 3

20 expérimentations. (p<0,01)

– La figure 10 représente **(A)** l'immunolocalisation de la coloration des cytokératine 14, cytokératine 10, loricrine, involucrine, filaggrine et DAPI-nucléaire de la peau de souris *Rank*-transgénique, WT et *Rank*-/-.

25 Les barres d'échelle représentent 20µm. Les lignes pointillées indiquent la jonction dermo-épidermique. ep = épithélium **(B)** le test de la barrière épidermique avec le bleu de toluidine. Les souris WT et Tg âgées de 8 semaines sacrifiées ont été rasées et leur peau coupée avec des ciseaux au site indiqué, avant le test de pénétration du bleu de toluidine. A noter, la souris Tg est en phase anagène à 8 semaines, ce qui rend la peau

30 relativement noire.

– La figure 11 représente la séquence de la construction *Rank* transgénique murine.

EXEMPLES

5

Exemple 1 : Matériel et Méthodes

Animaux

Les souris ont été maintenues dans un établissement fermé exempt de parasites et de virus suivant les lignes directrices de faculté et avec son accord de bioéthique animale (AL/01/20/11/08). Les souris *Rankl*^{-/-} ont été identifiées par le manque de dents, une taille plus petite et une PCR d'ADN génomique (cf. tableau 1 ci-dessous).

Tableau 1

<i>Rankl</i> ^{-/-}	sens	5'-CCAAGTAGTGGATTCTAAATCCTG
	anti-sens 1	5'-GGTTGGACACCTGAATGCTAATTTTC (345 pb)
	anti-sens 2	5'-ATTCGCAGCGCATCCCTTCTATCG (575 pb)
<i>RANK-Tg</i>	sens	5'-ATGGACTACAAAGACGATGACGACA
	anti-sens	5'-TGCCAGGAATCCACCGCCACCAG (264 pb)

Les échantillons de peau des souris *Rankl*^{-/-} [Rossi et al., 2007, précité] [22] ont été aimablement fournies par Graham Anderson, Université de Birmingham, UK. Les souris *Rank-Tg* ont été génotypées par PCR (figure 11 et tableau 1). Pour la transplantation de peau, les poils ont été coupés, la peau a été excisée et transplantée chez les souris nude (Harlan, Gannat, France) et suturée. Un jet cicatrisant a été appliqué. Une épilation de la peau a été réalisée sur les souris anesthésiées. 100 µg de RANKL-glutathione-s-transférase (GST) ou de contrôle GST ont été injectés en sous-cutanée au niveau de la région du cou de souris C57BL/6 âgées de 8 semaines à 12 heures d'intervalle. Un anticorps monoclonal anti-RANKL (IK22-5) [Kamijo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 347 : 124-132, Epub 2006 Jun2023, 2006] [30] a été injecté en sous-cutanée

dans les souris Tg tous les 3 jours, 10 µg à P10, 25 µg de P13 à P28 et 50 µg de P31 à P45.

Histologie-immunofluorescence

La peau du dos a été fixée dans de la formaline 4% et inclus dans la paraffine. Des sections (6 µm) ont été coupées, déparaffinées et colorées par l'hématoxyline-éosine ou le trichrome de Masson (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Alternativement, la peau a été congelée dans l'OCT-Compound (TissuTEK, Delta Microscopie, Toulouse, France) et des sections (8 µm) ont été coupées, fixées dans l'acétone à -20°C pendant 10 min. Toutes les sections ont été bloquées avec du sérum de chèvre ou d'âne 2% (Sigma-Aldrich) et puis incubées toute une nuit à 4°C avec un anticorps primaire (cf. tableau 2 ci-dessous) dilué dans une solution saline tamponnée et sérum bloquant 1%.

Tableau 2

Cible	Espèce	Clone et désignation	Conjugaison	Application*	Vendeur	Facteur de dilution
RANK# endogène	Chèvre	N20 SC-7626	Purifié	IF (congelé)	Santa cruz, CliniSciences, Montrouge, France	1/200
RANK transgénique	Chèvre	AF 692	Purifié	IF (congelé)	R&D Systems Lille, France	1/200
RANKL#	Chèvre	AF 462	Purifié	IF (congelé)	R&D Systems	1/100
OPG	Souris	OPG4-1	Ascite	IF (congelé)	Alexis, Axxora, Coger, Paris, France	1/2000
CD34	Rat	14-0341	Purifié	IF/FACS	eBioscience, CliniSciences, Montrouge, France	1/150

P-cadhérine	Chèvre	BAF 761	Biotine	IF/FACS	R&D Systems	1/100 1/20000
GATA-3	Souris	HG3-31 SC-268	Purifié	IF	Santa Cruz	1/200
Intégrine α6	Rat	19765	Purifié	IF	Abcam, Paris, France	1/50
Filaggrine	Lapin	PRB-417P	Purifié	IF	Covance, Eurogentec, Seriaing, Belgium	1/2000
Kératine 10	Lapin	PRB-159P	Purifié	IF	Covance	1/2000
Kératine 14	Lapin	PRB-155P	Purifié	IF/FACS	Covance	1/2000
Loricrine	Lapin	PB-145P	Purifié	IF	Covance	1/2000
Involucrine	Lapin	PRB-140C	Purifié	IF	Covance	1/2000
BrdU	Rat	AbC117-7513	Purifié	IHC	AbCys, Paris, France	1/100
CD3ε	Rat	145-2C11	Purifié	IHC	BD Biosciences	1/200

* (IF) immunofluorescence, (FACS) trieur de cellules activé par fluorescence, (IHC) immunohistochimie

Réhaussement du signal avec le système d'amplification Tyramide (Dupont) de RANK endogène et RANKL endogène dans les HF en phase télogène et l'épiderme

Les anticorps secondaires marqués au fluorochrome (Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ont été incubés pendant 1h à température ambiante. Pour les sections congelées, les sections ont été fixées dans la formaline avant coloration DAPI (Molecular Probes, Invitrogen). L'amplification du signal de la tyramide (PerkinElmer, Courtaboeuf, France) a été utilisée pour visualiser RANK et RANKL dans les souris WT. Pour révéler la phosphatase alcaline endogène de la papille dermique, les sections congelées fixées à l'acétone ont été incubées avec BCIP/NBT (Pierce, Thermo Scientific, Illkirch, France) jusqu'au développement complet de la couleur.

RT-PCR

L'ARN des cellules SHG et du renflement triées [Greco et al., Cell Stem Cell, 4 : 155-169, 2009] [31] ont extraites en utilisant le RNeasy Micro (QIAgen, Courtaboeuf, France). L'ADNc a été synthétisé et amplifié en utilisant le protocole QuantiTect Whole Transcriptome (QIAgen). Pour la séparation épiderme-derme, les poils ont été coupés avec des ciseaux et de la crème dépilatoire (Nair) a été appliquée. Après 5 min., l'émulsion crème-poil a été retirée et la peau a été incubée pendant 4h à 37°C avec 1mg/ml de dispase II (Roche Diagnostic). L'épiderme a alors été soigneusement retirée avec une pince. L'épiderme, le derme ou la peau entière congelés rapidement a été broyé en utilisant un pilon ou mortier rempli d'azote liquide, placé dans de la glace sèche. L'ARN a été extrait de la poudre obtenu par le TRI Reagent® (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) et nettoyé par RNeasy (QIAgen). L'ADNc a été synthétisé en utilisant les amorces ImProm-II RT et oligo(dT)₁₅ (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Des PCR classique et en temps réel ont été réalisées avec des amorces spécifiques de gènes (cf. tableau 3 ci-dessous).

Tableau 3

RANK	sens antisens	5'-TGCGTGCTGCTCGTTCCA 5'-TGCCAGGATCCACCGCCACCAG (262 pb)
RANKL	sens antisens	5'-AGCATCGCTCTGTTCTGT 5'-TCGTGCTCCCTCCTTTCATC (592 pb)
PCR (en temps réel)	sens antisens sonde	5'-CAGCATCGCTCTGTTCTGT 5'-GCAGTGAGTGCTGTCTTCTGA 5'-TCGAGCGCAGATGGATCCTAACAGAA
OPG	sens antisens	5'-TGATGAGTTGTGTATTGCAGC 5'-TCTTACACTCTCGGCATTC (485 pb)
PCR (en temps réel)	sens antisens sonde	5'-CGAGGACCACAATGAACAAGTG 5'-TGGGTTGTCCATTCAATGAGT 5'-CTGTGCTGCGCACTCCTGTGCT
GAPDH	sens antisens	5'-TCCATGACAACCTTGGTATCGTGG 5'-GTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAGAC (695 pb)

Les réactions de PCR en temps réel ont été menées en utilisant Eurogentec qCR MasterMix Plus Low ROX sur un thermocycleur Stratagen MX4000. Les valeurs CT des gènes cibles ont été normalisées à la GAPDH et β -actine (amorces Applied Biosystems). Le facteur d'expression a été calculé en utilisant un outil logiciel d'expression relative (REST) (<http://www.gene-quantification.de/rest.html>).

Prolifération cellulaire

Pour visualiser les cellules en prolifération, les souris ont été injectées en intrapéritonéale avec 1mg de BrdU (Sigma-Aldrich) 3h avant le sacrifice. Les tissus de peau du dos ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% et inclus dans la paraffine. La récupération de l'antigène a été réalisée dans un tampon citrate bouillant à pH 6 pendant 10 min., et la peroxydase endogène a été inhibée dans H₂O₂ 3%. L'anticorps anti-BrdU a été incubé toute la nuit à 4°C. Puis, les sections ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de rat (H+L) couplé à la biotine pendant 1h30 à température ambiante, suivi par le complexe ABC conjugué au raifort (VectorLabs) pendant 1h30. Le marquage a été révélé avec DAB (DiAminoBenzidine)-Ni et arrêté avec de l'eau distillée. Les sections ont été colorées avec de l'éosine.

ELISA

La peau du dos de souris a été excisée et pesée. Elle a été introduite, côté poil vers le haut, en milieu de culture cellulaire contenant du sérum de veau fœtal 10% (Invitrogen), des antibiotiques et fongicides, dans un incubateur de culture cellulaire pendant 24h à 37°C. Le milieu de culture acellulaire a été stérilisé par filtration et RANKL et OPG solubles ont été mesurés par ELISA (DuoSet ELISA, R&D Systems, Lille, France). Les résultats ont été normalisés au poids de peau.

Cytométrie en flux

Les cellules du HF ont été libérées de la peau entière comme précédemment décrit [Greco et al., 2009, précité] [31]. Elles ont été colorées pour CD34, révélées par un anticorps secondaire Alexa₆₄₇ de

chèvre anti-rat (Molecular Probes, Invitrogen), fixées, perméabilisées et colorées pour la kératine 14, révélées par un anticorps d'âne conjugué au FITC anti-lapin (Molecular Probes, Invitrogen). Les cellules ont été analysées en utilisant un cytomètre en flux FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, Le Pont de Claix, France). Pour le tri, les cellules ont été en plus marquées pour la P-cadhérine suivi par la streptavidine-APC et triées sur le trieur de cellules FACS Aria II (Becton Dickinson Biosciences) en cellules SHG P-cadhérine et cellules du renflement CD34⁺.

Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* de l'ARNm de RANK et RANKL a été réalisée en utilisant des sondes ARNm sens et antisens marquées à la digoxigénine-UTP, comme précédemment décrit [Mueller et al., J. Immunol., 167 : 5052-5060, 2001] [32]. Le signal a été développé avec du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) et du nitro bleu de tétrazolium (NBT ; Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, MD, USA) pendant 1 à 2 jours à température ambiante dans le noir.

Mesure de la signalisation RANK

L'ADNc murin Rank transgénique et endogène a été amplifié de l'ADNc de peau *Rank-Tg* et WT et cloné dans pCR3.1 (Invitrogen) sous le contrôle du promoteur CMV. Les cellules HEK 293T ont été transfectées de manière transitoire en utilisant Eugene (Roche) ou une lignée cellulaire stable a été obtenue sous la sélection par G418. Pour la mesure de la signalisation NF- κ B, le vecteur rapporteur de la NF- κ B1-luciférase (Panomics, Milan, Italie) a été transfecté de manière transitoire et 24h plus tard RANKL-GST a été ajouté. L'activité de la luciférase a été mesurée 24h plus tard, en utilisant les instructions des fabricants (Promega).

Production des cytokines de la peau

La peau de souris *Rank-Tg* et WT a été pesée et introduite, côté poil vers le haut, dans un milieu de culture cellulaire contenant du sérum de veau fœtal 10% (Invitrogen), des antibiotique et fongicides, dans un incubateur de culture cellulaire pendant 24h à 37°C. Le milieu de culture

acellulaire a été stérilisé par filtration. Des ELISA TNF- α et IL-1 β ont été réalisées en utilisant des anticorps anti-TNF α (BD Biosciences) et le kit ELISA DuoSet (R&D Systems) pour IL-1 β .

Culture primaire de kératinocytes

5 Les poils de souris *Rank*-Tg et WT âgées de 21 jours ont été retirés (crème Nair) et digérés avec la dispase II (Roche) pendant 18h à 4°C. L'épiderme a été décollé et trypsinisé (Gibco-Invitrogen) pendant 30 min. à température ambiante pour libérer les kératinocytes basaux. Ces cellules ont alors été placées en culture dans un milieu de croissance de
10 kératinocytes à faible teneur en calcium (CnT 57, CellnTec, Berne, Suisse) à une densité cellulaire initiale de 6×10^3 cellules/cm². Les cultures ont été conservées sous CO₂ 5%/humidité 95% à 37°C pendant 15 jours avec un changement de milieu tous les 4 jours. Les cellules ont été détachés avec la trypsine et comptabilisées.

Test de la barrière épidermique

15 Des souris WT et Tg âgées de 8 semaines ont été rasées et leur peau a été coupée avec des ciseaux au niveau du dos. Elle a alors été déshydratée par étapes successives dans du méthanol et, après réhydratation, baignée dans du bleu de toluidine 0,01% pendant 1 min..
20 Après lavage dans l'eau, les poils ont été complètement retirés avec une crème dépilatoire (Nair) et les souris ont été photographiées.

Exemple 2 : La stimulation de RANK n'est pas indispensable pour le développement normal du HF mais est requise pour la phase anagène du HF

25 De nombreux régulateurs moléculaires du cycle du follicule pileux (HF) commandent également le développement du HF [Schmidt-Ullrich et Paus, Bioessays, 27 : 247-261, 2005] [33]. Par conséquent, l'importance de la stimulation de RANK dans la morphogenèse du HF a été étudiée.

30 L'expression de l'ARNm de RANK, RANKL et OPG a été analysée par RT-PCR dans la peau totale de souris sauvages (WT), 5 (P5) et 15

(P15) jours après la naissance, et il a été trouvé que les gènes étaient transcriptionnellement actifs (figure 6A). L'hybridation *in situ* de l'ARNm de RANK et RANKL à P5 a montré que les gènes ont été transcrits dans l'épiderme et la HF (figure 6B). Cela a confirmé de précédentes données quant à l'expression de RANK et RANKL dans l'épiderme et HF embryonnaires [Kartsogiannis et al., Bone, 25 : 525-534, 1999] [34]. La morphogenèse de HF de souris *Rankl*^{-/-} et souris contrôle de la même portée a été comparée. A P5, les HF de la peau du dos des souris WT étaient en morphogenèse HF postnatale, et à P15 ont commencé à entrer en phase catagène. Exactement le même phénomène a été observé dans les souris *Rankl*^{-/-} (figure 6C), dont la morphogenèse HF postnatale et le phénotype des cheveux macroscopique ont semblé impossibles à distinguer de ceux des souris WT la même portée [Paus et al., J. Invest. Dermatol., 113 : 523-532, 1999] [35]. En outre, les quatre types de cheveux (monotriche, poinçon, auchène et zigzag) ont été formés (figure 6D). Cela a démontré que la stimulation par RANK n'est pas indispensable pour la morphogenèse du HF.

Puis, il a été étudié si l'absence de stimulation par RANK a affecté le cycle de renouvellement du HF avec une entrée dans la phase de croissance du cheveu à environ P24 dans les souris C57BL/6 [Muller-Rover et al., J. Invest. Dermatol., 117 : 3-15, 2001] [36]. De manière frappante, les HF des souris *Rankl*^{-/-} ne sont pas entrés en phase anagène de P28 à P49, alors que les souris WT de la même portée ont depuis longtemps procédé en phase anagène ou ont déjà atteint leur seconde phase catagène (figure 1A,B et figure 7A). Egalement à P25, il n'y a aucun signe d'initiation de la phase anagènes, démontrant un réel blocage du cycle HF, plutôt que l'apparition d'une phase de croissance considérablement réduite, ratée (figure 7B). Comme attendu, étant donné que RANKL est le seul ligand de RANK [Bossen et al., J. Biol. Chem., 281 : 13964-13971, 2006] [37], les souris *Rankl*^{-/-} ont également omis

d'effectuer la transition de la phase télogène à la phase anagène (figure 1C).

Dans la mesure où l'épilation des cheveux peut provoquer expérimentalement une activation du cycle pileux [Wilson et al.,
5 Differentiation, 55 : 127-136, 1994] [38], ce stimulus a été testé sur les souris *Rankl*^{-/-}. 5 jours après l'épilation pileux, des souris contrôles âgées de 24 jours étaient en phase anagène avancée, mais les souris déficientes pour *Rankl* sont toujours restées en phase télogène (figure 1D). Ainsi, en l'absence de stimulation de RANK par RANKL, le HF des souris a été
10 arrêté dans la première phase télogène postnatale et a été incapable d'entrer en phase de croissance anagène.

**Exemple 3 : l'arrêt en phase télogène en l'absence de stimulation de RANK ne résulte pas de défauts du compartiment des cellules
15 souches du HF ou d'un mésenchyme du HF défectueux**

Au moins deux sous-populations distinctes de cellules épithéliales du HF sont nécessaires pour la formation de la phase anagène normale, les cellules souches du renflement [Cotsarelis, 2006, précité ; Panteleyev et al., J. Cell Sci., 114 : 3419-3431, 2001] [2, 39] et les cellules germinales
20 secondaires des cheveux (SHG) [Greco et al., 2009, précité ; Jaks et al., Nat. Genet., 40 : 1291-1299, 2008] [31, 40]. Par conséquent, la présence de ces cellules dans des animaux *Rankl*^{-/-} a été étudiée.

L'immunofluorescence pour CD34, un marqueur des cellules souches murines du renflement (aussi appelées cellules souches du follicule pileux)
25 [Tumbar et al., Science, 303 : 359-363, 2004] [41], a montré que le renflement a été préservé dans le HF de la phase télogène des souris *Rankl*^{-/-} (figure 2A). Leur quantification par cytométrie en flux a révélée que la quantité a seulement été légèrement réduite (figure 2B). L'immunofluorescence pour la cadhérine-P [Greco et al., 2009, précité]
30 [31], a montré que les cellules SHG étaient également présentes (figure

2A). Ainsi, l'absence de RANKL n'a pas suffisamment dépleté ces cellules pour expliquer l'arrêt du HF en phase télogène.

Le développement de la phase anagène nécessite également des signaux inductifs de la papille dermique (DP) folliculaire mésenchymateuse [Jahoda et Reynolds, Dermatol. Clin., 14 : 573-583, 1996] [42]. Par conséquent, sa présence a été étudiée par histochimie utilisant l'enzyme phosphatase alcaline [Handjiski et al., Br. J. Dermatol., 131 : 303-310, 1994] [43]. L'activité de l'enzyme dans la bonne position sous le HF a révélé la présence de DP morphologiquement et enzyme-histochimiquement normales dans les souris *Rankl*^{-/-} (figure 2C). Cela a démontré que le HF de la phase télogène des souris *Rankl*^{-/-} contenait tous les éléments cellulaires requis pour la transition télogène-anagène.

Il a alors été étudié si l'arrêt du cycle pileux peut être sauvé. Pour ce faire, la peau rasée de souris *Rankl*^{-/-} âgées de 21 jours, dont les HF étaient tous en phase télogène, a été transplantée sur des souris nude du même âge. Comme RANKL est produit au cours de la cicatrisation par néo-vascularisation et par les kératinocytes épidermiques activés [Loser et al., Nat. Med., 12 : 1372-1379, 2006 ; Collin-Osdoby et al., J. Biol. Chem., 276 : 20659-20672, 2001] [44, 45], on pourrait s'attendre à ce que le destinataire RANKL soit synthétisé et complémente la déficience génétique. La repousse pileuse et le développement de la phase anagène de la peau greffée ont été suivis. Il a été observé qu'en 10 jours à la fois la peau transplantée des souris *Rankl*^{-/-} et WT a acquis une apparence noire, signe de phase anagène, et qu'en 3 semaines tous les transplants ont présenté une repousse pileuse complète (figure 2D). Les sections de peau ont confirmé que les HF des souris déficientes pour *Rankl* étaient en phase anagène. Ces résultats ont établi que le compartiment des cellules souches épithéliales et le mésenchyme du HF inductif des HF des souris *Rankl*^{-/-} étaient fonctionnels.

Exemple 4 : RANK est exprimé par les cellules souches épithéliales du HF

Afin de mieux comprendre comment RANK régule la transition télogène-anagène, le site de l'expression de RANK dans les HF de la phase télogène a été déterminé.

Un marquage immunofluorescent a localisé RANK au niveau du renflement et des cellules SHG (figure 3A). RANKL et le récepteur OPG leurre de RANKL sont également exprimés au niveaux de ces sites (figure 3A). L'immunoréactivité de RANK et RANKL a été faible, nécessitant une amplification du signal, alors que le récepteur OPG a pu être facilement visualisé sans amplification. Cela concorde avec des résultats de profil génétique publiés, qui ont démontré une transcription abondante de *Opg* dans les cellules épithéliales murines du renflement [Morris et al., Nat. Biotechnol., 22 : 411-417, 2004 ; Greco et al., 2009, précité] [46, 31]. RANK, RANKL ou le récepteur OPG ont été indétectables dans le DP. Une RT-PCR de cellules CD34⁺ et P-cadhérine⁺, qui ont été isolées et triées par FACS [Greco et al., 2009, précité] [31], a confirmé l'activité transcriptionnelle de *Rank*, *Rankl* et *Opg* dans les cellules épithéliales du renflement CD34⁺ et les cellules épithéliales SHG P-cadhérine⁺ (figure 3B).

Il a ensuite été étudié si l'expression de RANKL et OPG a changé au cours du cycle pilaire en mesurant leur ARNm par qRT-PCR dans la peau totale. L'expression du gène de OPG a été maximale du début au milieu de la phase télogène, alors que celle de RANKL a culminé en début de phase anagène (figure 3C). Comme RANKL et OPG sont des protéines solubles, leur niveau en protéine a été mesuré par ELISA dans surnageant d'une culture de peau de 24h. La figure 3G a démontré que les niveaux de protéines RANKL et OPG reflétaient les changements en ARNm avec des niveaux maximums de OPG à la phase télogène suivis par un pic de RANKL. Pour découvrir le site de l'expression de RANKL au cours de son pic, une RT-PCT a été réalisée sur l'épiderme et derme séparés (figure 3E). Il a été montré que l'expression de RANKL est restreinte au derme.

Un marquage immunofluorescent anti-RANKL/kératine 14 de la peau entière a révélé la présence de RANKL dans le HF inférieur (figure 3F) et un co-marquage avec GATA-3, un marqueur de la gaine de la racine interne du HF [Kaufman et al., Genes Dev., 17 : 2108-2122, 2003] [47], a démontré que RANKL était localisé au niveau de la gaine de la racine interne et de la cuticule (figure 3G). Du fait que RANKL est une protéine soluble et que la détection au niveau de ces sites pourrait être la conséquence d'une liaison à des composants extracellulaires, son ARNm a été visualisé sur des sections par hybridation *in situ* (figure 3H). De nouveau, l'activité du gène RANK a été identifiée dans le HF inférieur. Il n'y a aucune expression de RANKL dans l'épiderme sauf pour quelques rares cellules RANKL⁺, en accord avec de précédents résultats [Loser et al., 2006, précité] [44] (figure 7C).

Dans la peau en phase anagène, RANK a été identifié dans le renflement, la gaine de la racine externe et l'épiderme (figure 7D). Un double-marquage de RANK avec CD34 et l'intégrine $\alpha 6$, deux marqueurs des cellules du renflement [Morris et al., 2004, précité ; Tumber et al., 2004, précité] [46, 41], a validé l'expression de RANK dans les cellules souches du renflement en phase anagène (figure 7E). Pris ensemble, ces résultats ont démontré que RANK, RANKL et OPG étaient exprimés par les cellules du renflement et les cellules SHG. Comme le cycle pileux progresse de la phase télogène à la phase anagène, l'expression de OPG diminue mais celle de RANKL augmente. Cela a démontré qu'à la transition de phase télogène-anagène plus de RANKL OPG-libre était disponible pour lier RANK et conduire les cellules souche du HF en prolifération.

Exemple 5 : La stimulation de RANK déclenche l'entrée en phase anagène

Afin d'examiner plus avant l'importance de l'activation par RANK de l'induction de la phase anagène, une souris transgénique (Tg) pour *Rank*

sous le contrôle du promoteur du gène S100A8. Ce promoteur a déjà été identifié comme actif dans le HF humain [Schmidt et al., J. Invest. Dermatol., 117 : 748-750, 2001] [48], et, récemment, a été trouvé transcrit dans les cellules SHG [Greco et al., 2009, précité] [31]. Un marquage immunofluorescent des HF en phase télogène a confirmé que RANK était surexprimé dans les cellules SHG (figure 8A). RANK endogène n'a pas été identifié du fait que sa visualisation nécessitait une amplification du signal. L'expression de la construction RANK Tg dans les cellules embryonnaires humaines de rein (HEK) 293T a montré que RANK était localisé à la surface cellulaire et qu'il activait la signalisation NF- κ B comme attendu [Anderson et al., Nature, 390 : 175-179, 1997] [49] (figure 8B). La production de RANKL et OPG a également été suivie dans ces souris, par ELISA de cultures de peau de la semaine 3 à 5. Les souris Tg ont affiché une augmentation de RANKL en particulier pendant son pic de production en phase anagène, mais ont montré un niveau de OPG réduit (figure 8C). Ainsi, avec une surexpression de RANK dans le HF et un ratio activation RANK-RANKL / OPG plus favorable, un engagement accru de RANK du de HF était attendu.

En effet, il a été montré que la première entrée en phase anagène a été avancé de 1 à 2 jours (figure 4A,C). Par ailleurs, deux cycles de phase anagène prématurés évoluant rapidement ont eu lieu aux semaines 8 et 11, alors que les souris contrôles de même portée étaient en phase télogène (figure 4B,C). Les souris Tg âgées de 3 mois ont montré une légère alopecie (figure 8D), similaire à celle d'autres souris mutantes avec un cycle de HF anormalement rapide [Mecklenburg et al., Exp. Dermatol., 14 : 561-570, 2005] [50].

Afin de savoir si le renouvellement pileux pouvait être prématurément induit dans des souris WT par stimulation de RANK, un RANKL recombinant (r) a été injecté en sous-cutané à des souris âgées de 8 semaines en phase télogène. La fonctionnalité de RANKLr fusionnée à l'étiquette glutathione-s-transférase (GST) a été confirmée par signalisation

NF- κ B dans des cellules HEK 293T exprimant RANK (figure 8E). les souris contrôle ont reçu seulement GST. L'analyse de cycle pilaire 6 jours après l'injection a révélé que 3 souris sur 4 ont répondu à RANKLr-GST par une phase anagène prématurée (figure 3F,G). Ces résultats soutiennent l'importance de la stimulation de RANK comme un signal d'entrée du cycle pilaire crucial.

Exemple 6 : RANKL régule l'homéostasie épidermique

Comme des animaux Rank-Tg ont exprimé plus de RANKL soluble mais moins de OPG dans la peau, il a été étudié si cela pourrait affecter l'épiderme. Premièrement, l'expression de RANK dans l'épiderme a été analysée dans les souris Tg et il a été trouvé qu'il était exprimé par les kératinocytes basaux (figure 9A). La détection de RANK Tg était exclue, du fait que l'anticorps est dirigé contre le peptide N-terminal, qui est absent de la construction ADNc (figure 11). Il est évident que l'épithélium *Rank*-Tg a été considérablement épaissi (figure 5A,B). Au contraire, la taille de l'épiderme des souris déficiente en *Rankl* a été légèrement mais significativement réduite (figure 5A,B). Par conséquent, le taux de renouvellement de l'épiderme a été déterminé en utilisant l'analogue de la thymidine BrdU. Les kératinocytes BrdU⁺ en prolifération ont été pratiquement absents dans les souris déficientes en *Rankl* mais très abondantes dans l'épiderme des souris Rank-Tg (figure 5C). La quantification des cellules épithéliales interfolliculaires BrdU⁺ par comptage de cellules sur les sections ont mis en évidence une réduction significative pour les souris déficientes en *Rankl* et une augmentation de 8 fois très significative pour les souris Tg (figure 5D). Ensuite, la peau des souris Tg a été analysée pour des signes d'activation cellulaire en mesurant la libération de TNF α et d'IL-1 β . Comme montré dans la figure 9B, il y a eu une petite mais significative augmentation en TNF α et IL-1 β dans la peau de souris Tg à P21 et P30, respectivement. Cependant, il n'y a eu aucune infiltration de cellules T CD3⁺ non dermiques (figure 9C) et la culture de

kératinocytes à P21 a résulté en 3 fois plus de récupération de cellules après 2 semaines par rapport au WT (figure 9D). Cela soutient une prolifération cellulaire autonome améliorée dans les souris Tg, encore que, du fait d'une production augmentée de cytokines inflammatoires, leur contribution au renouvellement accéléré de l'épiderme ne peut pas être formellement exclue. Sauf pour la kératine 14, qui s'est étendue au-delà de sa restriction normale dans les animaux Tg et qui est probablement secondaire à la vitesse élevée de prolifération [Hobbs et al., J. Invest. Dermatol., 123 : 503-515, 2004 ; Pasparakis et al., Nature, 417 : 861-866, 2002] [51, 52], la différenciation de l'épiderme dans les deux modèles murins a été normale à en juger par l'expression de la kératine 10, la loricrine, l'involucrine et la filagrine (figure 10A). Par ailleurs, il n'y a pas eu de pénétration de bleu de toluidine (figure 10B), démontrant une fonction normale de la barrière de la peau. Finalement, les souris Tg ont été traitées avec un anticorps monoclonal anti-RANKL. Comme montré dans la figure 5E,F,G, cela a entraîné un retard dans le cycle pileux et une épaisseur épidermique significativement réduite.

Ensemble, ces données ont démontré que RANKL joue un rôle important dans le renouvellement de l'épiderme qui intervient normalement au cours de la phase anagène, une source naturelle de RANKL, mais qui est anormalement augmenté conduisant à une hyperplasie épidermique lorsque RANKL est surproduit.

Listes des références

1. Paus et Cotsarelis, N. Engl. J. Med., 341 : 491-497, 1999
2. Cotsarelis, J. Invest. Dermatol., 126 : 1459-1468, 2006
- 5 3. Fuchs, Nature, 445 : 834-842, 2007
4. Blanpain et al., Cell, 128 : 445-458, 2007
5. Watt et Hogan, Science, 287 : 1427-1430, 2000
6. Fuchs, Cell, 137 : 811-819, 2009
7. Morgan, Nat. Genet., 40 : 1269-1270, 2008
- 10 8. Plikus et al., Int. J. Dev. Biol., 53 : 857-868, 2009
9. Schneider et al., Curr. Biol., 19 : R132-142, 2009
10. Klopčič et al., Eur. J. Cell Biol., 86 : 781-799, 2007
11. Glass et al., Dev. Cell, 8 : 751-764, 2005
12. Kronenberg, Nature, 423 : 332-336, 2003
- 15 13. Aguila et Rowe, Immunol. Rev., 208 : 7-18, 2005
14. Rossi et Christiano, J. Clin. Invest., 116 : 1140-1149, 2006
15. Leibbrandt et Penninger, Ann. NY Acad. Sci., 1143 : 123-150, 2008
16. Naito et al., Genes Cells, 4 : 353-362, 1999
17. Walsh et Choi, Cytokine Growth Factor Rev., 14 : 251-263, 2003
- 20 18. Tanaka et al., Immunol Rev., 208 : 30-49, 2005
19. Fata et al., cell, 103 : 41-50, 2000
20. Cao et al., Cell, 107 : 763-775, 2001
21. Beleut et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 2989-2994, 2010
22. Rossi et al., J. Exp. Med., 14 : 14, 2007
- 25 23. Hikosaka et al., Immunity, 29 : 438-450, 2008
24. Akiyama et al., Immunity, 29 : 423-437, 2008
25. Knoop et al., J. Immunol., 183 : 5738-5747, 2009
26. Luo et al., Nature, 18 : 18, 2007
27. Armstrong et al., Prostate, 68 : 92-104, 2008
- 30 28. Schramek et al., nature, 468 : 98-102, 2010

29. Gonzalez-Suarez et al., Nature, 468 : 103-107, 2010
30. Kamijo et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 347 : 124-132,
Epub 2006 Jun2023, 2006
31. Greco et al., Cell Stem Cell, 4 : 155-169, 2009
- 5 32. Mueller et al., J. Immunol., 167 : 5052-5060, 2001
33. Schmidt-Ullrich et Paus, Bioessays, 27 : 247-261, 2005
34. Kartsogiannis et al., Bone, 25 : 525-534, 1999
35. Paus et al., J. Invest. Dermatol., 113 : 523-532, 1999
36. Muller-Rover et al., J. Invest. Dermatol., 117 : 3-15, 2001
- 10 37. Bossen et al., J. Biol. Chem., 281 : 13964-13971, 2006
38. Wilson et al., Differentiation, 55 : 127-136, 1994
39. Panteleyev et al., J. Cell Sci., 114 : 3419-3431, 2001
40. Jaks et al., Nat. Genet., 40 : 1291-1299, 2008
41. Tumber et al., Science, 303 : 359-363, 2004
- 15 42. Jahoda et Reynolds, Dermatol. Clin., 14 : 573-583, 1996
43. Handjiski et al., Br. J. Dermatol., 131 : 303-310, 1994
44. Loser et al., Nat. Med., 12 : 1372-1379, 2006
45. Collin-Osdoby et al., J. Biol. Chem., 276 : 20659-20672, 2001
46. Morris et al., Nat. Biotechnol., 22 : 411-417, 2004
- 20 47. Kaufman et al., Genes Dev., 17 : 2108-2122, 2003
48. Schmidt et al., J. Invest. Dermatol., 117 : 748-750, 2001
49. Anderson et al., Nature, 390 : 175-179, 1997
50. Mecklenburg et al., Exp. Dermatol., 14 : 561-570, 2005
51. Hobbs et al., J. Invest. Dermatol., 123 : 503-515, 2004
- 25 52. Pasparakis et al., Nature, 417 : 861-866, 2002
53. Aoki et al., J. Clin. Invest., 116:1525-1534, 2006
54. Ye et al., Nature, 418 : 443-447, 2002
55. Ta et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107 : 20281-20286, 2010
56. Liu et al., J. Immunol., 184 : 6910-6919, 2010

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'un ligand de RANK pour la fabrication d'un médicament destiné à moduler l'homéostasie et/ou la croissance des
5 cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

2. Utilisation selon la revendication 1, où les cellules épithéliales sont des cellules de l'épiderme, du follicule pileux ou de la glande sébacée.

10 3. Utilisation d'un ligand de RANK pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement de maladies inflammatoires de la peau choisies dans le groupe comprenant le psoriasis et la dermatite atypique, de l'alopécie et/ou de l'hirsutisme.

15 4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, où le ligand de RANK est RANKL.

5. Composition pharmaceutique comprenant au moins un ligand de RANK et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

20 6. Composition selon la revendication 5, où ledit ligand de RANK est RANKL.

25 7. Utilisation d'une composition pharmaceutique telle que définie dans la revendication 5 ou 6 pour la fabrication d'un médicament de maladies inflammatoires de la peau choisies dans le groupe comprenant le psoriasis, la dermatite atypique, de l'alopécie et/ou de l'hirsutisme.

30 8. Composition cosmétique ou dermatologique comprenant au moins un ligand de RANK et un agent de formulation acceptable.

9. Composition selon la revendication 8, où ledit ligand de RANK est RANKL.

5 10. Utilisation cosmétique d'une composition telle que définie dans la revendication 8 ou 9 pour moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

11. Utilisation cosmétique selon la revendication 10, pour provoquer ou stimuler la croissance des cheveux et/ou des poils.

10

12. Utilisation cosmétique selon la revendication 10, pour retarder ou inhiber la croissance des cheveux et/ou poils.

15 13. Procédé cosmétique destiné à moduler la croissance des cheveux et/ou des poils comprenant une étape d'application sur la peau d'un ligand de RANK ou d'une composition cosmétique ou dermatologique telle que définie dans la revendication 8 ou 9.

20 14. Procédé d'identification d'une molécule candidate pour moduler l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- préparation d'au moins une cellule ou d'un échantillon tissulaire exprimant RANK ;
- mise en contact de ladite au moins une cellule ou dudit échantillon
25 tissulaire avec une molécule test ;
- détermination de l'expression ou l'activité de RANK ;

où une modulation de l'expression ou de l'activité de RANK en présence de la molécule test par rapport à l'expression ou l'activité de RANK en l'absence de ladite molécule test indique que la molécule
30 test module l'homéostasie et/ou la croissance des cellules épithéliales de l'unité épidermo-pilo-sébacée.

15. Procédé selon la revendication 14, où l'échantillon tissulaire est une section de la peau.

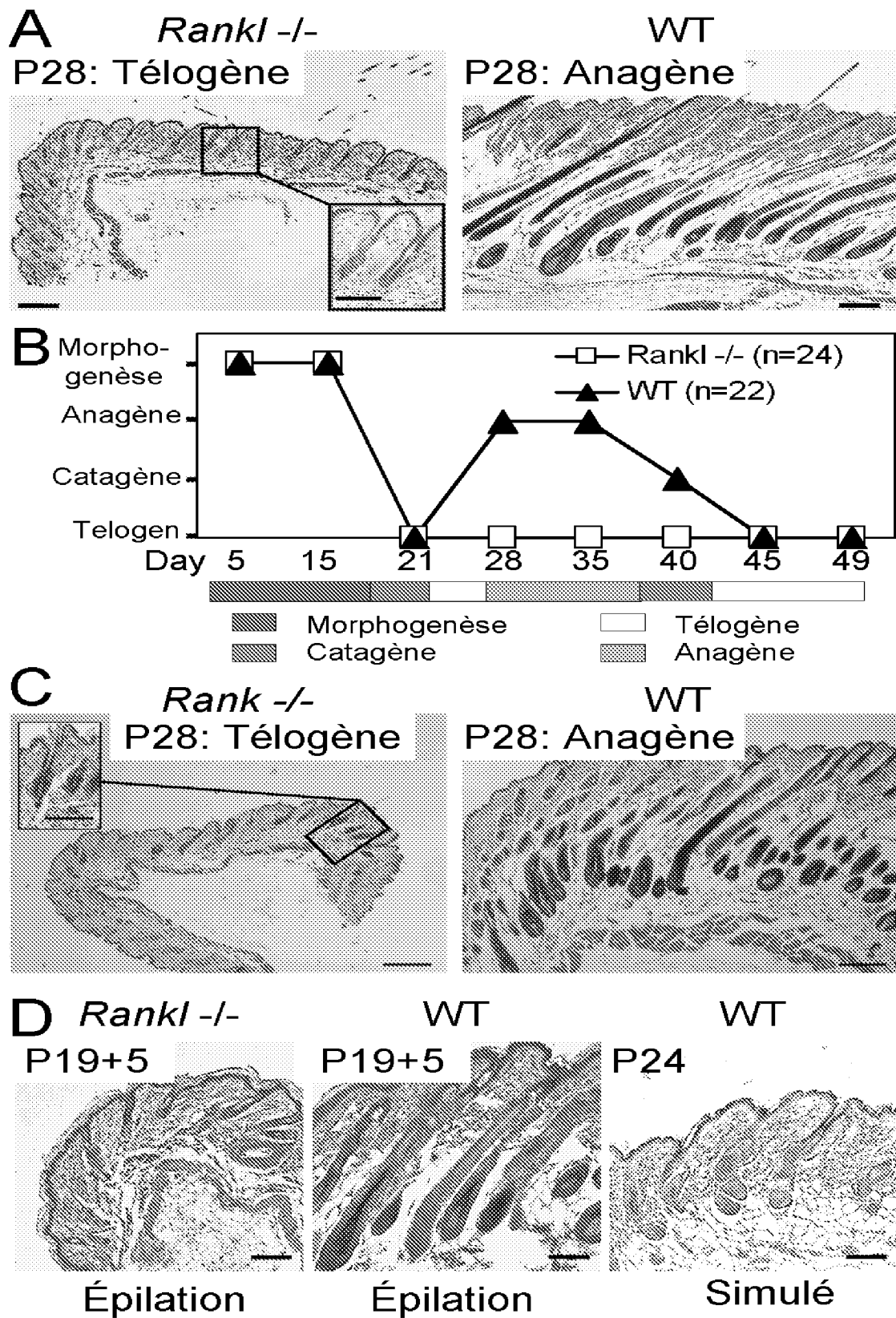


FIGURE 1

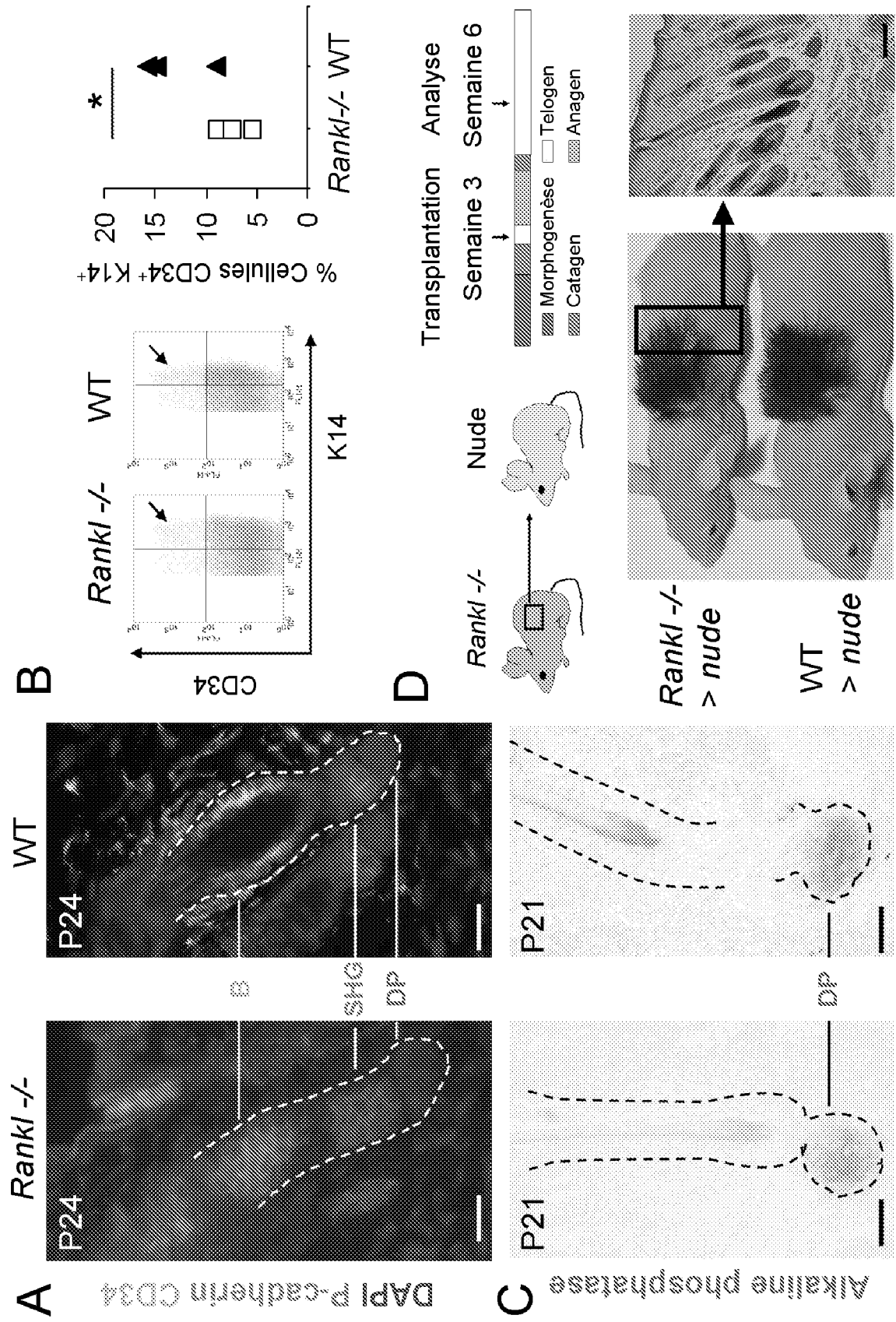


FIGURE 2

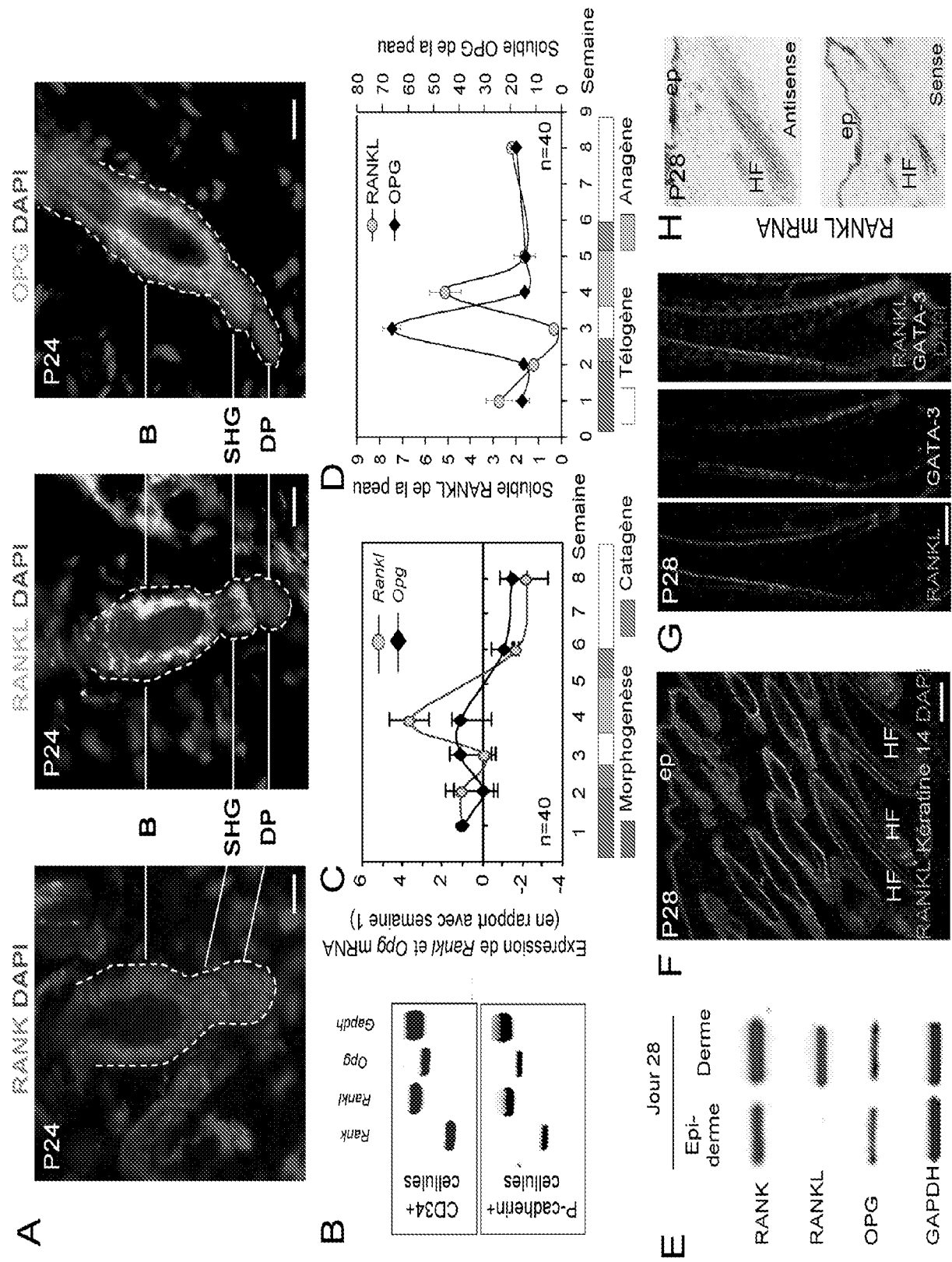


FIGURE 3

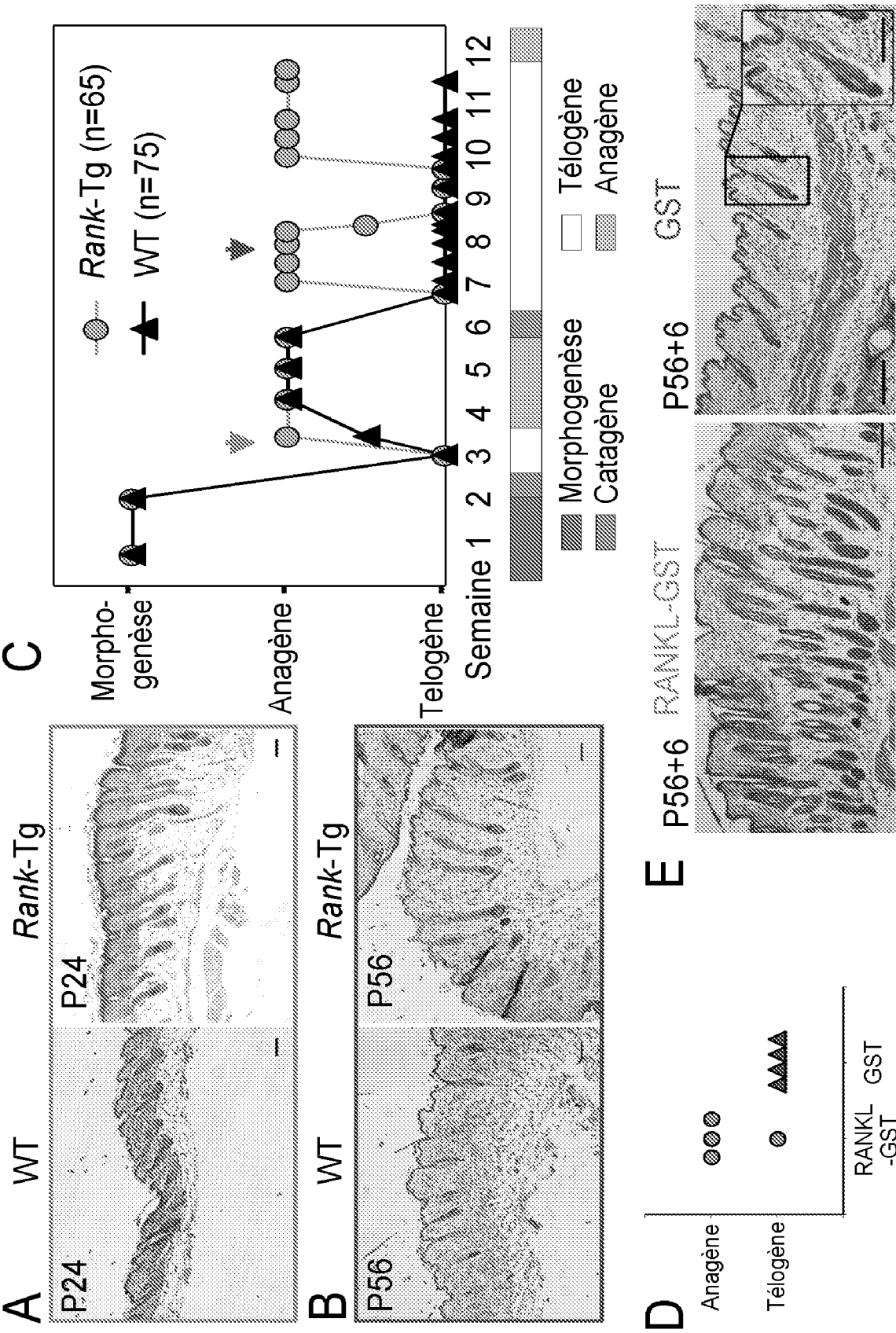


FIGURE 4

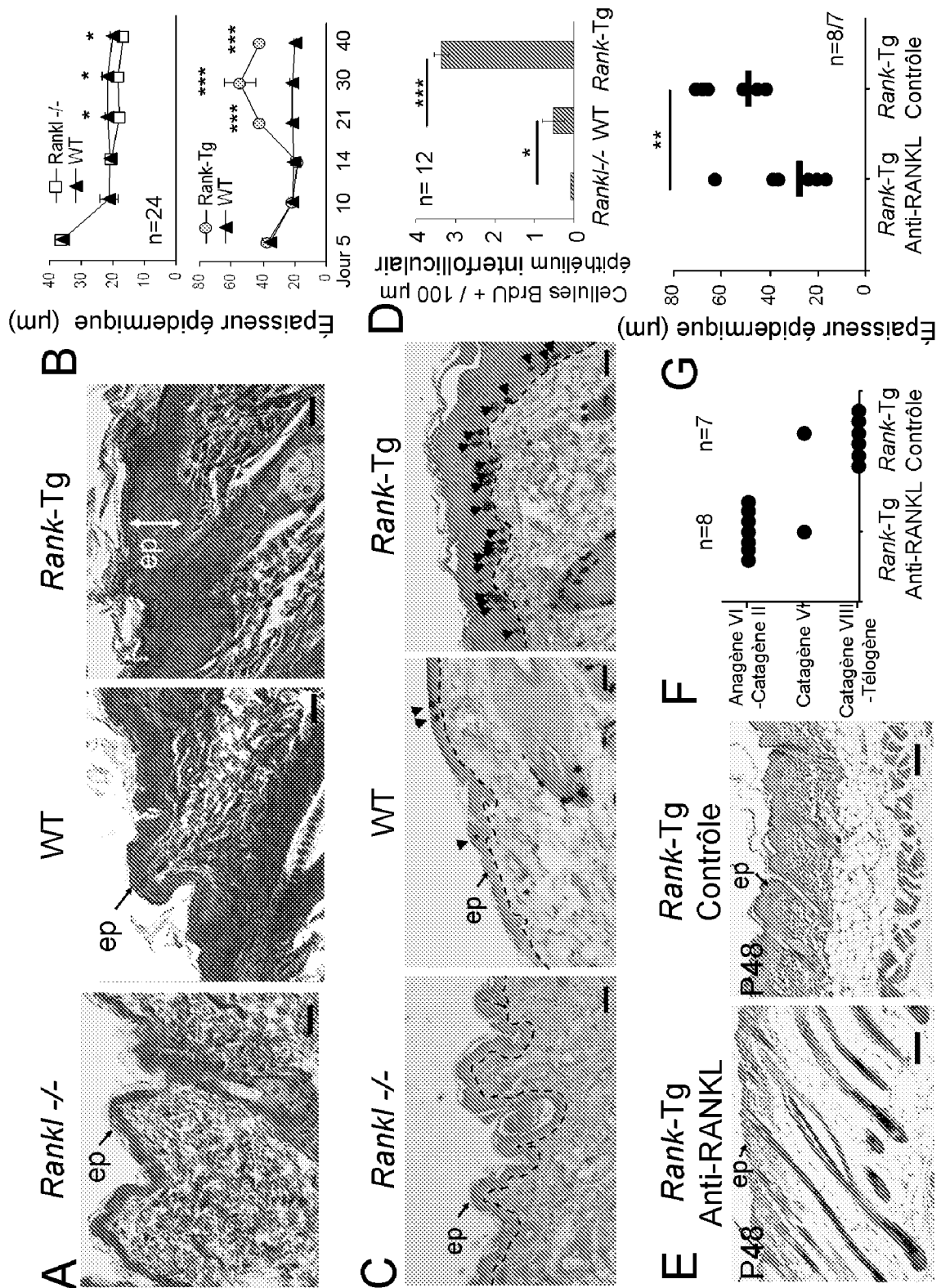


FIGURE 5

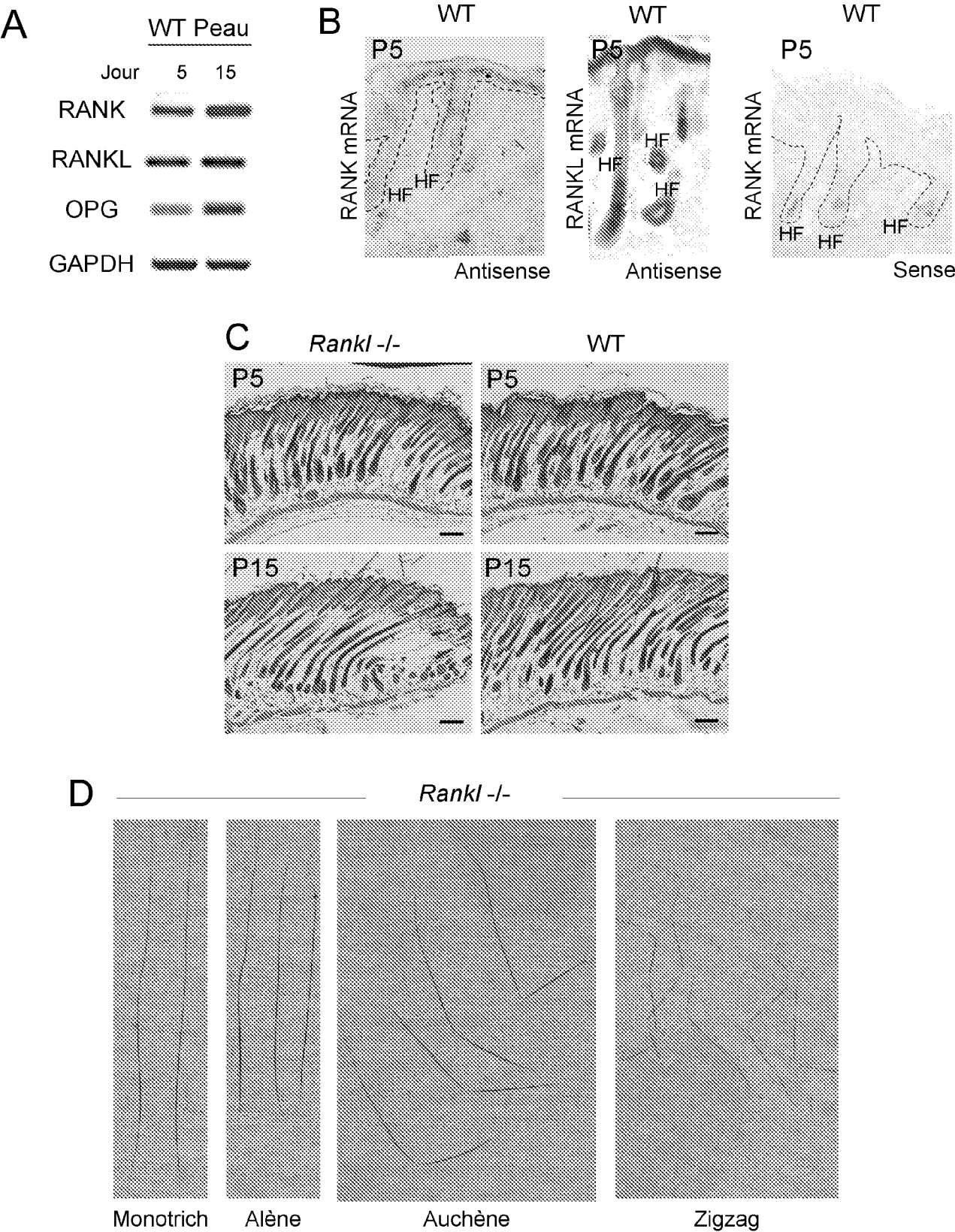
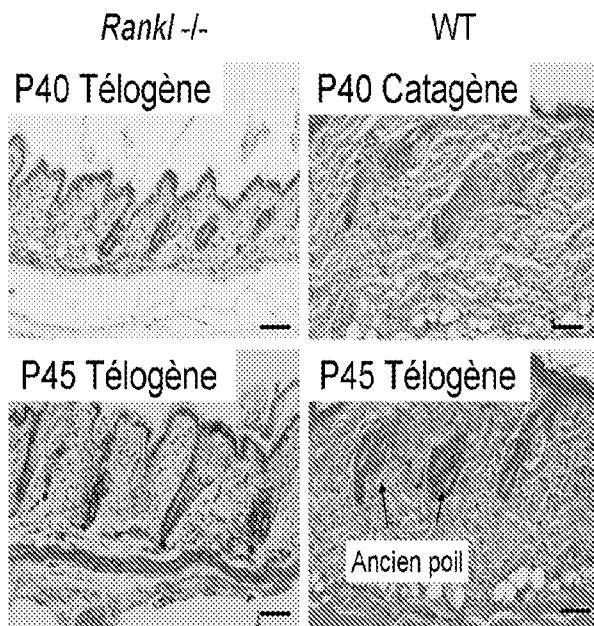
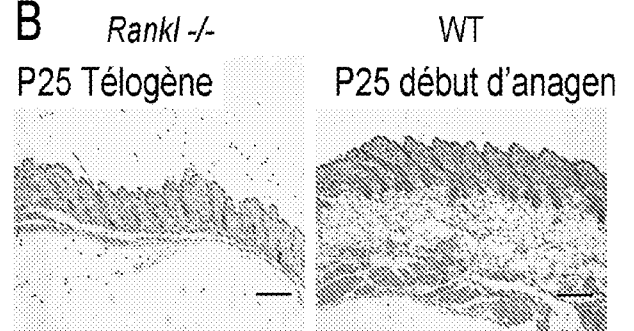


FIGURE 6

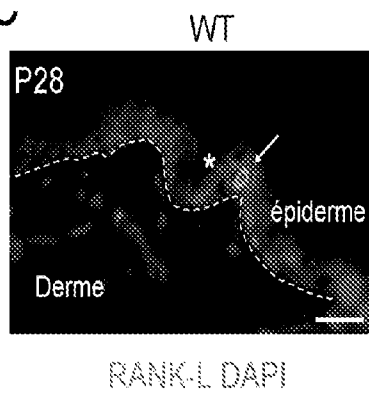
A



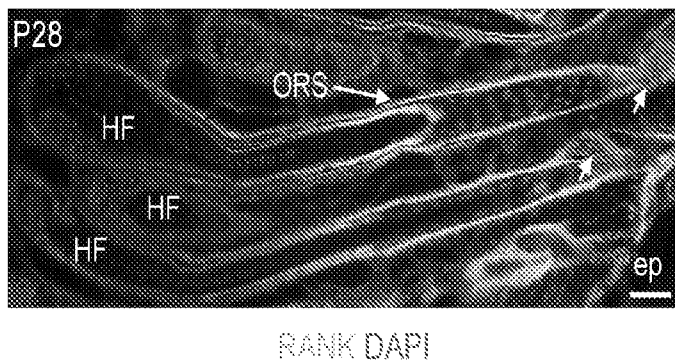
B



C



D



E

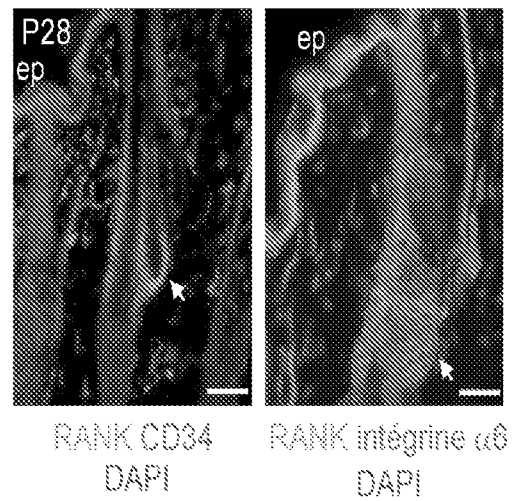


FIGURE 7

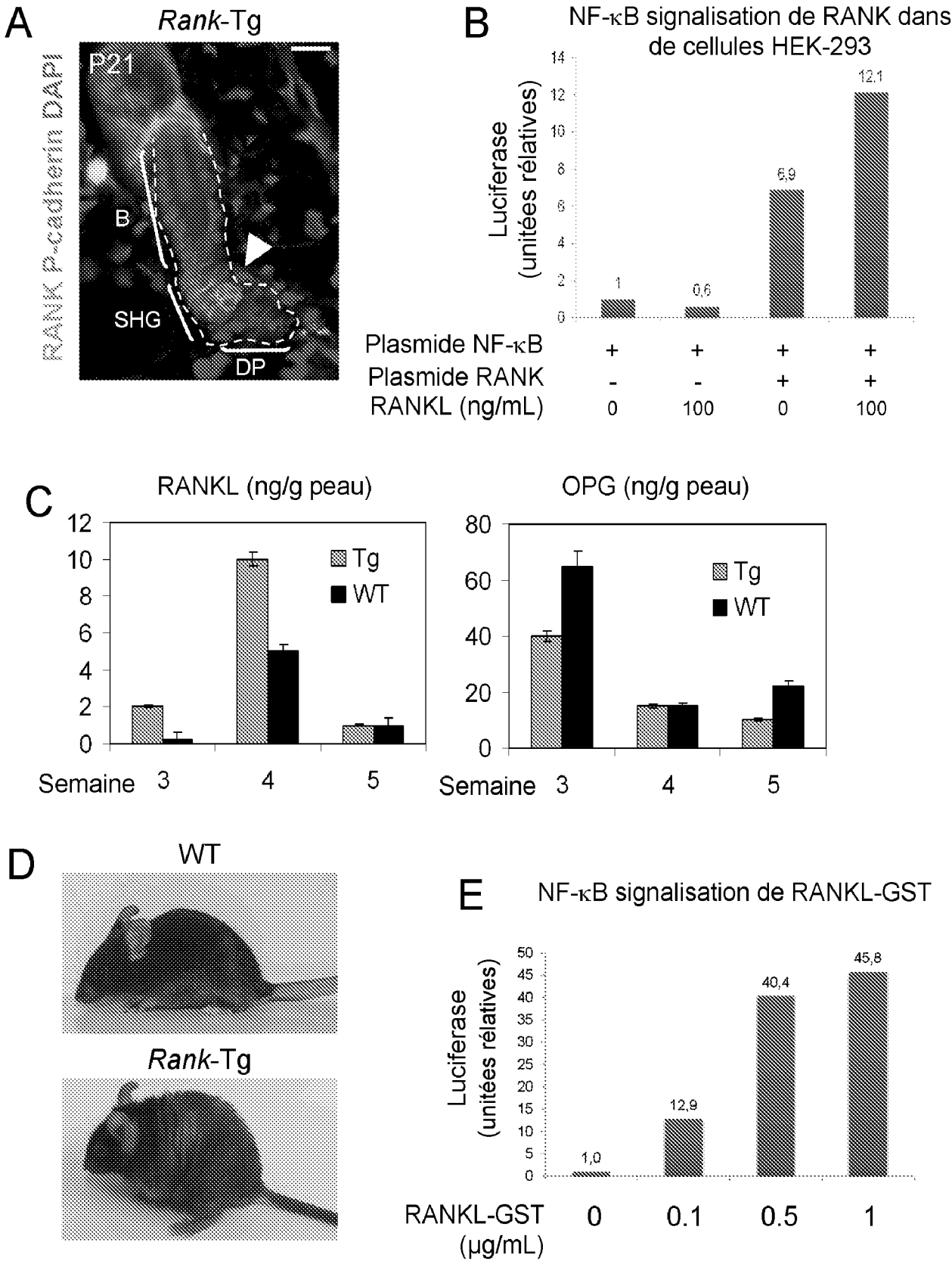


FIGURE 8

9/11

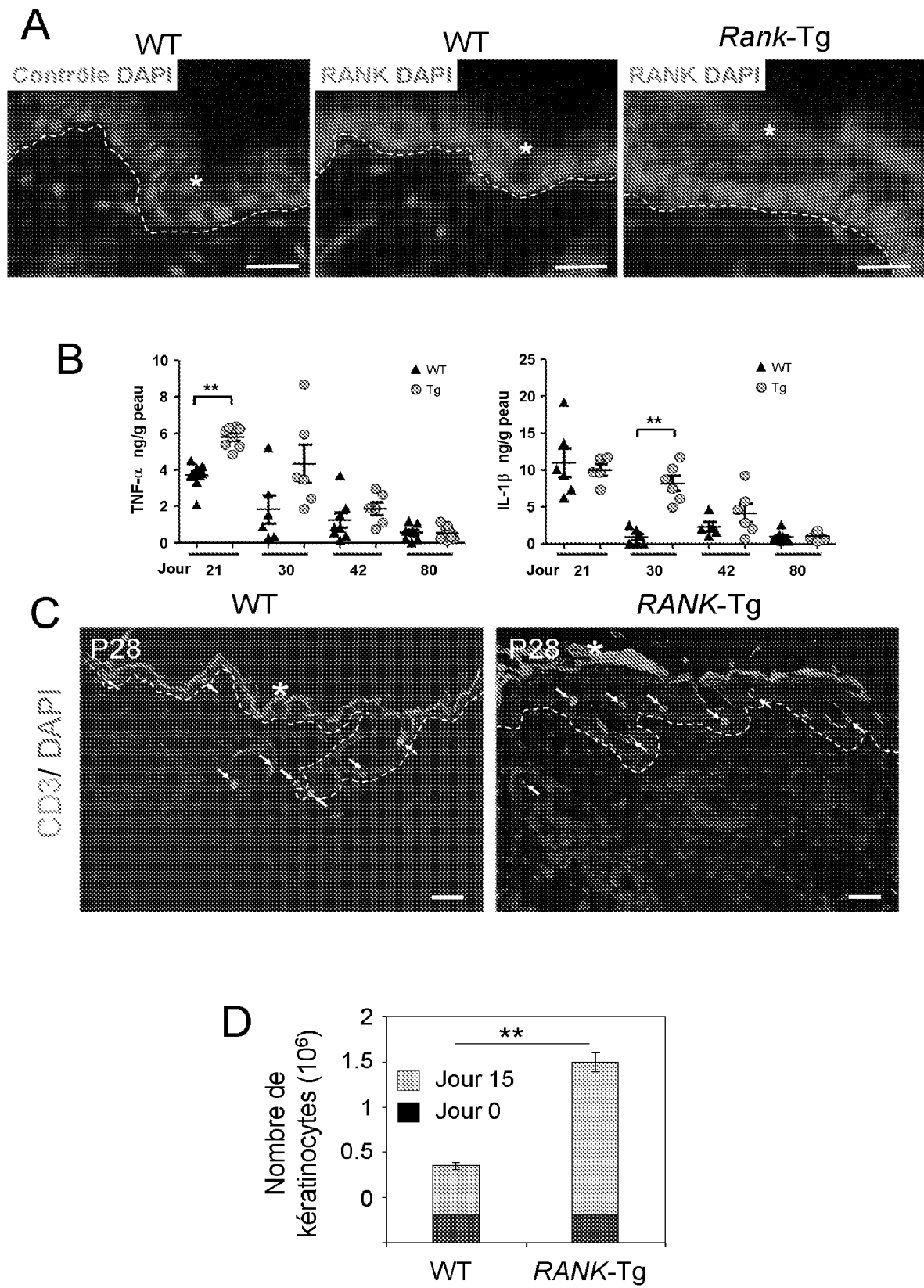
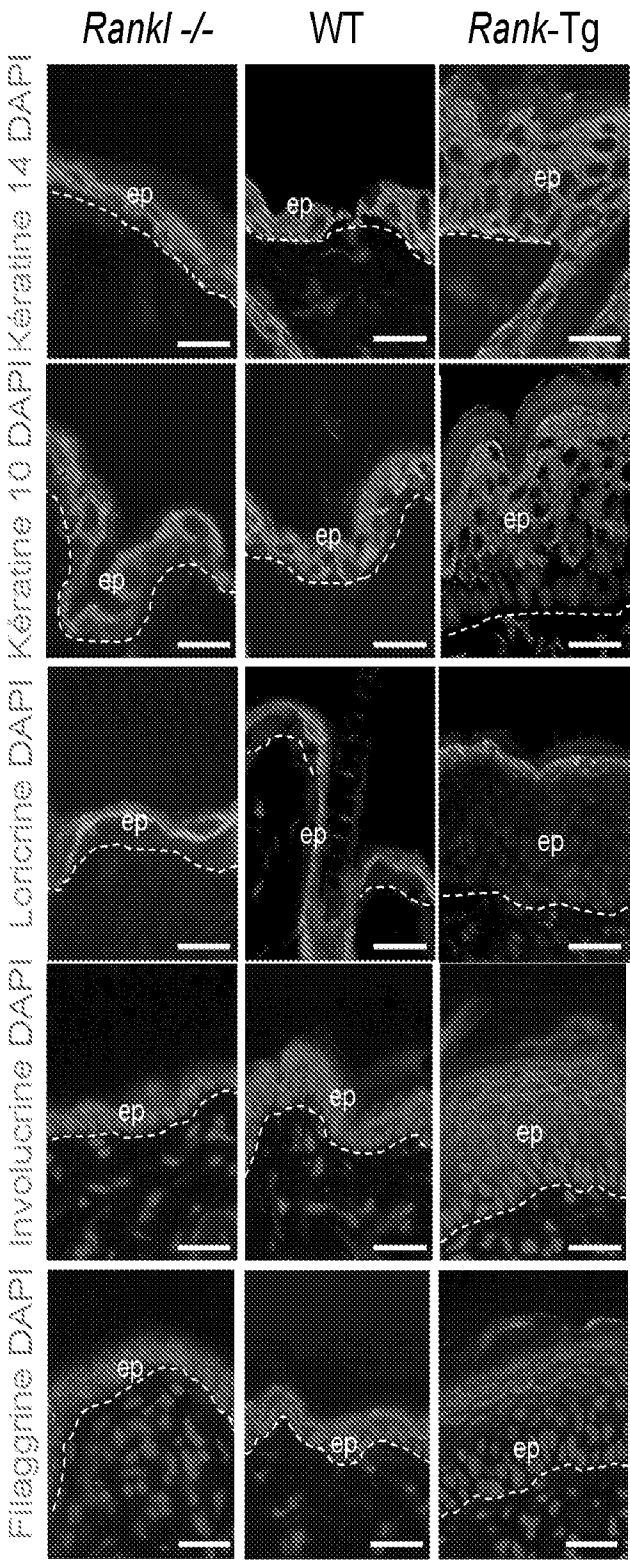
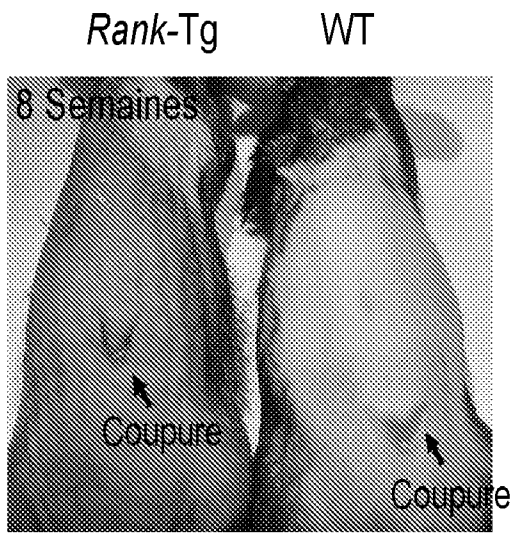


FIGURE 9

A



B



Test de pénétration de Bleu Toluidine

FIGURE 10

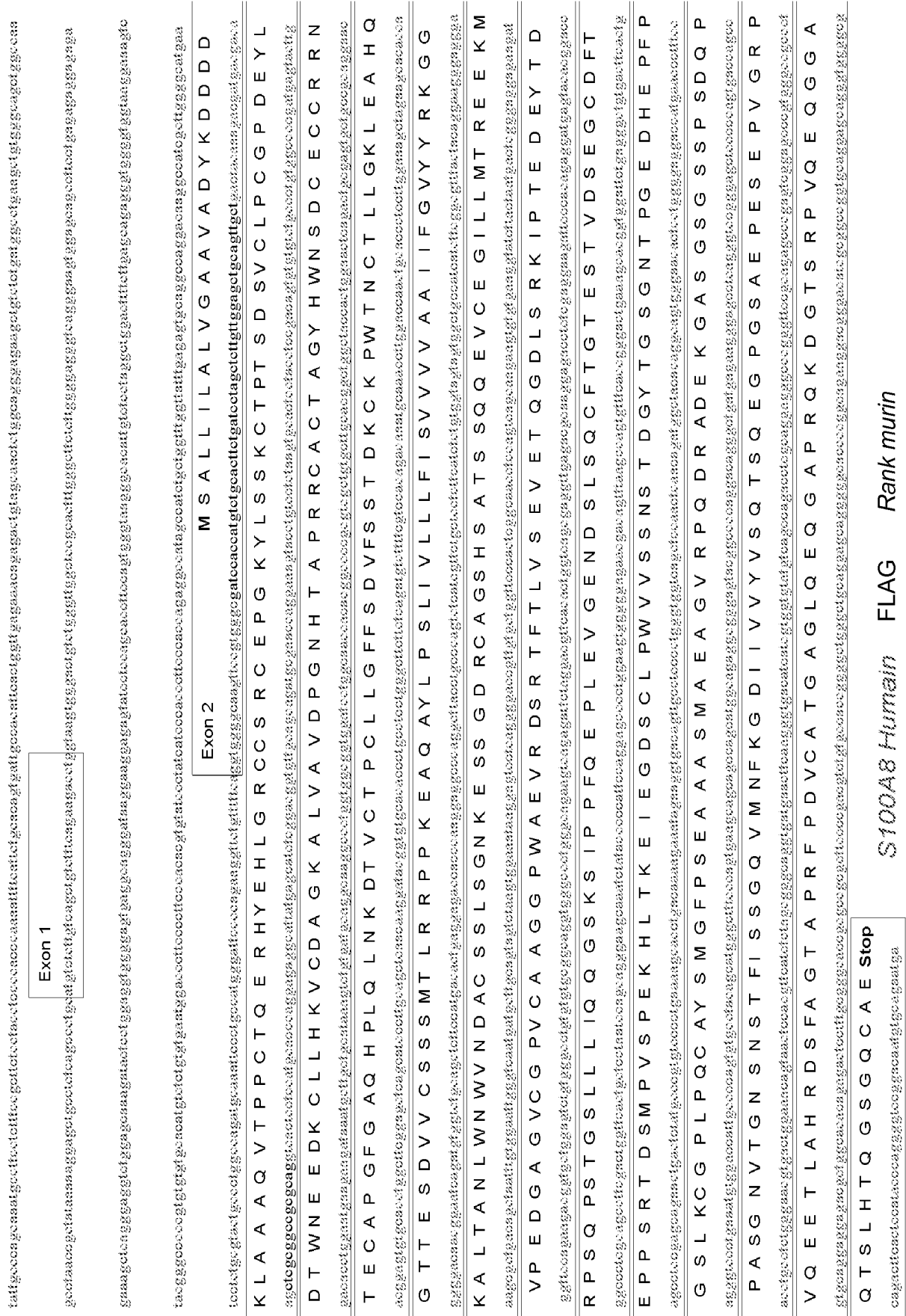


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2012/050119

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	A61K38/17 G01N33/00	A61K38/19 A61K8/64 A61Q7/02 A61P17/00
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) A61K G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 854 458 A1 (IMBA INST FUER MOLEKULARE BIOT [AT]) 14 November 2007 (2007-11-14)	1-11,13
Y	paragraphs [0008], [0016], [0024]; claims 1,6	12,14,15
X	----- WO 99/53942 A1 (AMGEN INC [US]) 28 October 1999 (1999-10-28) page 20, line 32 - page 21, line 28	5,6,8,9
X	----- WO 02/098362 A2 (IMMUNEX CORP [US]; DOUGALL WILLIAM C [US]) 12 December 2002 (2002-12-12) page 22, lines 1-21	5,8
	----- -/-	
☒ 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 document 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 3 April 2012		Date of mailing of the international search report 18/04/2012
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 Bochelen, Damien

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2012/050119

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DUHERON V ET AL: "Hair follicle RANK-ligand regulates epithelial growth via Bcl-3", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 129, no. Suppl. 1, April 2009 (2009-04), page S98, XP009158155, & 69TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-OF-INVESTIGATIVE-DERMATOLOGY; MONTREAL, CANADA; MAY 06 -09, 2009 ISSN: 0022-202X abstract -----	12,14,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2012/050119

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1854458	A1	14-11-2007	CA 2651201 A1 15-11-2007
			EP 1854458 A1 14-11-2007
			EP 2029123 A2 04-03-2009
			JP 2009536171 A 08-10-2009
			US 2009162426 A1 25-06-2009
			WO 2007128564 A2 15-11-2007
WO 9953942	A1	28-10-1999	AT 303817 T 15-09-2005
			AU 757806 B2 06-03-2003
			AU 3660599 A 08-11-1999
			CA 2325360 A1 28-10-1999
			DE 69927147 D1 13-10-2005
			DE 69927147 T2 26-01-2006
			DK 1073456 T3 24-10-2005
			EP 1073456 A1 07-02-2001
			ES 2248998 T3 16-03-2006
			JP 4776774 B2 21-09-2011
			JP 2002512199 A 23-04-2002
			SI 1073456 T1 31-12-2005
			US 6790823 B1 14-09-2004
			WO 9953942 A1 28-10-1999
WO 02098362	A2	12-12-2002	CA 2449658 A1 12-12-2002
			EP 1432438 A2 30-06-2004
			JP 2005515159 A 26-05-2005
			MX PA03011270 A 18-03-2004
			WO 02098362 A2 12-12-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050119

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61K38/17 A61K38/19 A61K8/64 A61Q7/02 A61P17/00 G01N33/00 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) A61K G01N		
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, EMBASE, BIOSIS, COMPENDEX, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 1 854 458 A1 (IMBA INST FUER MOLEKULARE BIOT [AT]) 14 novembre 2007 (2007-11-14)	1-11,13
Y	alinéas [0008], [0016], [0024]; revendications 1,6	12,14,15
X	WO 99/53942 A1 (AMGEN INC [US]) 28 octobre 1999 (1999-10-28) page 20, ligne 32 - page 21, ligne 28	5,6,8,9
X	WO 02/098362 A2 (IMMUNEX CORP [US]; DOUGALL WILLIAM C [US]) 12 décembre 2002 (2002-12-12) page 22, ligne 1-21	5,8
	----- -/-	
☒ 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 3 avril 2012		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 18/04/2012
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Bochelen, Damien

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	DUHERON V ET AL: "Hair follicle RANK-ligand regulates epithelial growth via Bcl-3", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 129, no. Suppl. 1, avril 2009 (2009-04), page S98, XP009158155, & 69TH ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY-OF-INVESTIGATIVE-DERMATOLOGY; MONTREAL, CANADA; MAY 06 -09, 2009 ISSN: 0022-202X abrégé -----	12,14,15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2012/050119

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1854458	A1	14-11-2007	CA 2651201 A1	15-11-2007
			EP 1854458 A1	14-11-2007
			EP 2029123 A2	04-03-2009
			JP 2009536171 A	08-10-2009
			US 2009162426 A1	25-06-2009
			WO 2007128564 A2	15-11-2007

WO 9953942	A1	28-10-1999	AT 303817 T	15-09-2005
			AU 757806 B2	06-03-2003
			AU 3660599 A	08-11-1999
			CA 2325360 A1	28-10-1999
			DE 69927147 D1	13-10-2005
			DE 69927147 T2	26-01-2006
			DK 1073456 T3	24-10-2005
			EP 1073456 A1	07-02-2001
			ES 2248998 T3	16-03-2006
			JP 4776774 B2	21-09-2011
			JP 2002512199 A	23-04-2002
			SI 1073456 T1	31-12-2005
			US 6790823 B1	14-09-2004
			WO 9953942 A1	28-10-1999

WO 02098362	A2	12-12-2002	CA 2449658 A1	12-12-2002
			EP 1432438 A2	30-06-2004
			JP 2005515159 A	26-05-2005
			MX PA03011270 A	18-03-2004
			WO 02098362 A2	12-12-2002
