

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية و التجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :
MA 33318 B1

(51) Cl. internationale :
**A61K 31/01; A61K 31/047;
A61P 17/02; A61P 17/06**

(43) Date de publication :
01.06.2012

(21) N° Dépôt :
33428

(22) Date de Dépôt :
15.12.2010

(30) Données de Priorité :
16.05.2008 FR 0853185

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/EP2009/056007 18.05.2009

(71) Demandeur(s) :
**PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE, 45, PLACE ABEL GANCE-92100
BOULOGNE-BILLANCOURT (FR)**

(72) Inventeur(s) :
COUSTOU, Didier ; DUPLAN, Hélène

(74) Mandataire :
CABINET PATENTMARK

(54) Titre : **COMPOSITION EMOLLIENTE POUR LE TRAITEMENT PREVENTIF DE LA
DERMATITE ATOPIQUE**

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition à usage topique comprenant, en tant que principe actif, une association de glycérol, vaseline et paraffine liquide sous forme d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile pour utilisation pour la prévention de la dermatite atopique.

L'ensemble de ces résultats suggère que la composition A en application topique permet de restaurer la fonction barrière de la peau, de limiter voire d'empêcher la colonisation par le staphylocoque doré et constitue ainsi un

5 « traitement préventif primaire » empêchant l'apparition des maladies atopiques (dermatite atopique et/ou asthme bronchique allergique et/ou rhinite allergique communément appelé « rhume des foins ») et/ou des sensibilisations allergiques.



01 JUIN 2012

**COMPOSITION EMOLLIENTE POUR LE TRAITEMENT
PREVENTIF DE LA DERMATITE ATOPIQUE**

La présente invention concerne le domaine de l'atopie et du traitement des
5 affections qui y sont associées.

L'atopie est définie comme une prédisposition héréditaire à réagir de manière
symptomatique (maladie) à divers allergènes, tels que la poussière de maison, les
acariens, les pollens, les poils d'animaux, etc. Les affections réputées atopiques
comprennent la dermatite atopique (DA), l'asthme bronchique allergique et la rhinite
10 allergique ou « rhume des foins ».

La dermatite atopique (ou eczéma atopique) est une maladie dermatologique
fréquente, touchant 10 à 15% des nourrissons en France, en augmentation au cours
des dernières décennies.

La dermatite atopique est une maladie chronique qui évolue par poussées,
15 entrecoupées de périodes de rémission durant lesquelles les lésions sont toujours
présentes mais minimales se manifestant essentiellement par une xérose (sécheresse
cutanée) et un prurit.

L'inflammation de la peau est caractéristique des poussées qui se traduisent
par des signes et symptômes inflammatoires comprenant des rougeurs (érythème),
20 des vésicules, des croûtes, un suintement et des démangeaisons.

La maladie débute généralement entre l'âge de 3 mois et 2 ans mais peut
commencer encore plus tôt dès l'âge de 1 mois. Son évolution est souvent bonne
avec une rémission complète intervenant entre 5 et 8 ans dans la majorité des cas. La
résurgence à l'adolescence ou chez l'adulte jeune est possible. La maladie peut
25 persister à l'âge adulte dans 15 à 20 % des cas.

L'évolution vers une autre affection atopique est également possible. La
présence d'une DA dans l'enfance augmente le risque de développer un asthme et il
existe une corrélation nette entre la fréquence de la DA et la fréquence de l'asthme.
Le risque de survenue d'un asthme chez un enfant porteur d'une DA est estimé entre
30 30 et 40%.

Le risque de survenue d'une allergie alimentaire, le plus souvent avant 3 ans, ou d'une rhinite allergique, d'apparition plus tardive, varie selon les études.

Concernant la dermatite atopique, il existe une prédisposition génétique marquée, avec un risque de 30 à 50% de développer la maladie si l'un des parents est atteint, et de près de 80% si les deux parents sont atteints. La prédisposition génétique implique de nombreux gènes, codant soit pour des déterminants de la fonction barrière de l'épiderme, soit pour des acteurs de l'immunité innée ou adaptative. Tenant compte de nombreux travaux récents, on peut émettre l'hypothèse que la DA (voire les autres maladies atopiques) soient liées à une anomalie primitive de la fonction barrière de l'épiderme, responsable d'une perméabilité accrue aux agents environnementaux (allergènes et micro-organismes) responsables de l'activation immunologique et des manifestations allergiques.

L'anomalie de la perméabilité épidermique se traduit par une xérose cutanée et une augmentation de la perte insensible en eau et par la mise en évidence d'un polymorphisme de gènes codant pour des protéines épidermiques telles que la filaggrine (FLG), participant à la fonction barrière de l'épiderme (Palmer, 2006). Une étude récente confirme en France l'association d'un polymorphisme du gène FLG à la DA, avec un risque relatif supérieur à 3 (Hubiche, 2007).

L'atopie peut être considérée comme une réaction d'hypersensibilité retardée de contact aux allergènes de l'environnement. Elle se présente généralement en deux phases. Une première phase de sensibilisation cliniquement muette et génératrice de lymphocytes T spécifiques au niveau cutané. Cette sensibilisation se fait par pénétration des allergènes de l'environnement au niveau cutané facilitée par la xérose. Une seconde phase d'activation des lymphocytes T spécifiques aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires.

Globalement, les manifestations de dermatite atopique résultent d'interactions complexes entre facteurs environnementaux, anomalies pharmacologiques, dysfonctionnements ou altérations des fonctions barrière de la peau, phénomènes immunologiques et susceptibilité génétique.



Parmi les nombreux facteurs, l'hyper réactivité cutanée, la réponse immunitaire inappropriée à divers micro-organismes ainsi que des infections secondaires semblent jouer un rôle dans la chronicité de la pathologie.

Le rôle de la flore cutanée dans l'apparition et/ou le maintien d'une activation immunitaire favorisant le développement de lésions d'eczéma est de mieux en mieux connu. L'altération de la fonction barrière de la peau associée à une certaine immunodéficience chez les patients atteints de dermatite atopique entraîne une colonisation par *Staphylococcus aureus* qui colonise la peau de 90% des patients ayant une DA, même en dehors des poussées évolutives de la maladie. (Current Opinion in Allergy and Clinical Immunol 2007, 7, 413).

Il existe une corrélation entre la sévérité de la maladie et, d'une part la densité de colonisation staphylococcique, et d'autre part la fréquence de positivité des IgE spécifiques anti-toxines staphylococciques (J Allergy Clin Immunol 2006 117, 1141 ; Am J Clin Dermatol, 2006, 7, 273 ; Clin rev Allergy Immunol, 2007, 33, 167 ; Current Opinion Allergy and Clinical Immunol 2004, 4, 373).

Ces éléments font suspecter pour le staphylocoque doré un rôle dans le développement d'une activation immunitaire locale responsable des manifestations cutanées de la dermatite atopique et peut-être des sensibilisations allergiques.

Outre le grattage, il existe de nombreux facteurs favorisant la colonisation par *Staphylococcus aureus* via l'altération du système primaire de défense cutané et en premier lieu l'altération de la composition lipidique du Stratum Corneum. Cette altération de la fonction barrière de la peau est ainsi responsable de la colonisation par le staphylocoque et aussi d'un accroissement de la perte en eau au niveau cutané, entraînant xérose, irritation, démangeaisons créant ainsi une sorte de cercle vicieux physiopathologique.

La prise en charge thérapeutique de la dermatite atopique peut s'envisager à différents niveaux essentiellement symptomatique mais aussi préventif. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la maladie.

Outre l'éviction des allergènes identifiés qui est souhaitable autant que faire se peut, l'hydratation de la peau en tant que moyen de restauration ou de maintien de son rôle barrière vient en complément du traitement symptomatique des poussées



par la corticothérapie locale qui constitue la thérapeutique de référence de cette maladie. D'autres anti-inflammatoires topiques non stéroïdiens (notamment les inhibiteurs de la calcineurine) peuvent aussi être utilisés pour traiter les poussées. Enfin la photothérapie, les immunosuppresseurs per os ou d'autres thérapeutiques
5 systémiques lourdes sont réservées aux formes sévères.

Cependant l'utilisation de corticoïdes, d'anti-inflammatoires et/ou d'immunosuppresseurs même par voie topique, en particulier chez des nourrissons ou de jeunes enfants, n'est pas anodine, expose à des effets indésirables et ne
10 constituent qu'un traitement symptomatique.

D'autre part, une phobie existe vis à vis de l'utilisation des corticoïdes ce qui ne facilite pas la prise en charge de cette maladie ni la compliance des patients, souvent mauvaise.

Enfin, *Staphylococcus aureus* pourrait induire une résistance aux corticoïdes
15 (Clin Rev Allergy Immunol 2007 33 167)

Il existe ainsi un besoin et une forte demande pour des alternatives thérapeutiques et plus particulièrement pour des traitements préventifs. Ces traitements visent à diminuer la fréquence et/ou l'intensité des poussées eczémateuses que l'on observe chez les patients atteints de dermatite atopique. Cette
20 approche constitue un acte de prévention tertiaire selon la définition de l'OMS puisqu'elle tend à éviter les complications (poussées inflammatoires) d'une maladie (dermatite atopique) déjà présente.

La demande WO2008048076 divulgue l'utilisation de glucosamine ou un de ses dérivés pour traiter la dermatite atopique.

25 La demande WO2007023226 divulgue l'utilisation d'un probiotique combiné à un prébiotique pour traiter la dermatite atopique chez les enfants.

On a maintenant constaté de manière tout à fait surprenante et inattendue qu'une association de type glycérol, vaseline et paraffine liquide sous forme d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile permettait de prévenir la dermatite
30 atopique.

Les inventeurs ont mis en évidence un effet inhibiteur de cette association sur l'adhésion de *Staphylococcus aureus* à des kératinocytes en culture. L'association glycérol, vaseline et paraffine liquide permet donc de prévenir le rôle infectieux de *Staphylococcus aureus* chez le patient atopique ainsi que son rôle sur l'entretien de la réaction inflammatoire par la production d'IgE spécifiques en inhibant la colonisation de la peau par *Staphylococcus aureus*.

En outre, les inventeurs ont montré que cette association restaure le rôle de barrière protectrice et fonctionnelle de la peau. Pour cela, les inventeurs ont utilisé un modèle de peau *ex vivo* de déshydratation cutanée induite. De plus, ils ont suivi l'expression de marqueurs épidermiques et l'activité sérine protéase.

La présente invention a ainsi pour objet une composition à usage topique comprenant, en tant que principe actif, une association de glycérol, vaseline et paraffine liquide, sous forme d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile pour son utilisation pour la prévention de la dermatite atopique.

De préférence, la prévention est de type primaire.

Au sens de la présente invention, « prévenir », « prévention » ou « traitement préventif » signifie éviter l'apparition d'une maladie, d'un trouble ou d'un ou plusieurs signes et/ou symptômes.

Au sens de la présente invention, « prévention primaire » ou « traitement préventif primaire » signifie empêcher l'apparition des maladies atopiques (dermatite atopique et/ou asthme bronchique allergique et/ou rhinite allergique communément appelé « rhume des foins ») et/ou des sensibilisations allergiques en agissant avant les premières manifestations cliniques de l'atopie c'est à dire dès la naissance.

Au sens de la présente invention, on appellera « association active » l'association glycérol, vaseline et paraffine liquide sous forme d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile.

Avantageusement, le glycérol, la vaseline et la paraffine liquide présentent les critères décrits et contrôlés selon « European Pharmacopeia », 6ème Edition.

Avantageusement, la vaseline de l'association active présente un point de goutte compris entre 35 et 70°C, de préférence compris entre 51 et 57°C, de manière

particulièrement préférée d'environ 54°C. Le point de goutte est mesuré selon le procédé 2.2.17 décrit dans « European Pharmacopoeia », 6ème Edition.

Avantageusement, la vaseline de l'association active présente une consistance comprise entre 175 et 195 1/10 mm, de préférence d'environ 185 1/10 mm
5 (pénétration au cône à 25°C).

Avantageusement, la vaseline de l'association active présente une viscosité comprise entre 4 et 5 cSt à 100°C, de préférence d'environ 4,8 cSt à 100°C.

Dans la composition selon l'invention, l'association active est présente selon une proportion comprise entre 10 et 50 % et préférentiellement entre 20 et 30 % en
10 poids par rapport au poids total de la composition ; la concentration en glycérol est comprise entre 5 et 30 %, préférentiellement entre 10 et 20 % et de manière particulièrement préférée est d'environ 15% en poids par rapport au poids total de la composition, la concentration en vaseline est comprise entre 3 et 20 %, préférentiellement entre 5 et 10 % et de manière particulièrement préférée est
15 d'environ 8% en poids par rapport au poids total de la composition et la concentration en paraffine liquide est comprise entre 0,5 et 5 %, préférentiellement entre 1 et 3 % et de manière particulièrement préférée est d'environ 2% en poids par rapport au poids total de la composition.

Dans la phase aqueuse, l'eau est comprise entre 30 et 80 % en poids par
20 rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention comprend environ 15% de glycérol, environ 8% de vaseline et environ 2% de paraffine liquide en poids par rapport au poids total de la composition.

La composition dermatologique selon l'invention comprend, en outre, des
25 excipients usuels dermatologiquement compatibles.

La composition dermatologique selon la présente invention peut être préparée sous la forme d'une émulsion eau dans huile (E/H) ou huile dans eau (H/E), d'une émulsion multiple comme par exemple, une émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E) ou une émulsion huile dans eau dans huile (H/E/H), ou encore sous la forme
30 d'une hydrodispersion ou une lipodispersion, un gel ou un aérosol.

Les excipients dermatologiquement compatibles peuvent être tout excipient parmi ceux connus de l'homme de l'art en vue d'obtenir une composition pour l'application topique sous forme de crème, d'une lotion, d'un gel, d'une pommade, d'une émulsion, d'une microémulsion, d'un spray, etc

5 La composition selon l'invention peut en particulier contenir des additifs et aides à la formulation, tels que des émulsionnants, des épaississants, des gélifiants, des fixateurs d'eau, des agents d'étalement, des stabilisants, des colorants, des parfums et des conservateurs.

Des émulsionnants appropriés comprennent l'acide stéarique, la trolamine, le
10 PEG-40-stéarate.

De préférence, la composition selon l'invention présente environ 5% d'émulsionnants en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 1 et 5% d'acide stéarique, de préférence environ 3% en poids par rapport au poids total de la
15 composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 0 et 2% de trolamine, de préférence environ 0,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 0 et 2% de
20 PEG-40-stéarate, de préférence environ 0,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Des épaississants appropriés comprennent le monostéarate de glycérol, le PEG.

De préférence, la composition selon l'invention présente environ 5%
25 d'épaississants en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 2 et 10% de monostéarate de glycérol, de préférence environ 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Des conservateurs appropriés comprennent le parahydroxybenzoate de propyle, le chlorocrésol.
30

De préférence, la composition selon l'invention présente environ 0,1% de conservateurs en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 0,05 et 1% de parahydroxybenzoate de propyle, de préférence environ 0,1% en poids par rapport au poids total de la composition.

Des agents d'étalement appropriés comprennent la diméthicone, le polydiméthylcyclosiloxane.

De préférence, la composition selon l'invention présente environ 2% d'agents d'étalement en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 0,2 et 2% de diméthicone, de préférence environ 0,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 1 et 3% de polydiméthylcyclosiloxane, de préférence environ 2,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Des fixateurs d'eau appropriés comprennent le polyéthylène glycol, de préférence le polyéthylène glycol 600.

De préférence, la composition selon l'invention présente environ 8% de fixateurs d'eau en poids par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, la composition selon l'invention présente entre 2 et 10% de polyéthylène glycol, de préférence environ 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

L'eau utilisée pour la phase aqueuse de l'émulsion peut être une eau distillée ou une eau thermale ayant des propriétés dermato-cosmétique.

Avantageusement, la composition selon l'invention comprend :

- environ 15 % de glycérol,
- environ 8% de vaseline,
- environ 2% de paraffine liquide, et à titre d'excipients :
- environ 1 à 5% d'acide stéarique,
- environ 2 à 10% de monostéarate de glycérol,
- environ 1 à 3% de polydiméthylcyclosiloxane,

- environ 0,2 à 2% de diméthicone,
 - environ 2 à 10% de polyéthylène glycol 600,
 - environ 0 à 2% de trolamine,
 - environ 0,05 à 1% de parahydroxybenzoate de propyle
- 5 - jusqu'à 100% en eau.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'une composition selon l'invention pour la fabrication d'un médicament destiné à prévenir la dermatite atopique.

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : Formulations

Composition A

- 15 g de glycérol,
- 15 - 8 g de vaseline,
- 2 g de paraffine liquide,
- 0,5 g de trolamine,
- et à titre d'excipients acide stéarique, monostéarate de glycérol, polydiméthylcyclosiloxane, diméthicone, polyéthylène glycol (PEG) 600,
- 20 - parahydroxybenzoate de propyle
- eau jusqu'à 100 g.

Composition A'

- 15 g de glycérol,
- 8 g de vaseline,
- 25 - 2 g de paraffine liquide,
- 1,5 g d'acide stéarique,
- 5 g de monostéarate de glycérol,
- 1,5 g de polydiméthylcyclosiloxane,
- 0,5 g de diméthicone,
- 30 - 5 g de polyéthylène glycol 600,
- 0,15 g de trolamine,

- 0,1 g de parahydroxybenzoate de propyle
- eau jusqu'à 100 g.

Composition B

- 5 - 15 g de glycérol,
- 8 g de vaseline,
- 2 g de paraffine liquide,
- 0,5 g de PEG-40-stéarate,
- et à titre d'excipients acide stéarique, monostéarate de glycérol,
- 10 polydiméthylcyclosiloxane, diméthicone, polyéthylène glycol 600, chlorocrésol,
- eau jusqu'à 100 g.

Composition B'

- 15 g de glycérol,
- 15 - 8 g de vaseline,
- 2 g de paraffine liquide,
- 3 g d'acide stéarique,
- 5 g de monostéarate de glycérol,
- 2 g de polydiméthylcyclosiloxane,
- 20 - 0,5 g de diméthicone,
- 0,1 g de trolamine,
- 3 g de polyéthylène glycol 600,
- 0,5 g de PEG-40-stéarate,
- 0,075 g de chlorocrésol,
- 25 - eau jusqu'à 100 g.

Exemple 2 : Test de cytotoxicité

Principe

Le principe du test est basé sur la transformation enzymatique d'un sel de
30 tétrazolium, le « sodium 3,3 [1[(phenyl amino) carbonyl]-3-4-tétrazolium bis (4-



methoxy-6nitro)] benzène sulfonic acid hydrate » soit XTT, en un produit coloré, le formazan.

- Le XTT est réduit par la déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes en présence d'un agent couplant d'électrons, le coenzyme Q, en un composé
- 5 hydrosoluble jaune/orangé, le formazan, dosable par spectrophotométrie à 450 nm.

Traitement par le produit

- Les microplaques de 96 puits sontensemencées à 10^5 cellules/ml, après 24 heures d'incubation le milieu de culture est éliminé et les microplaques sont rincées au PBS.
- 10 100 μ l des différentes dilutions de produit test sont ajoutés dans chaque cupule de microplaques. Des témoins sans produit sont réalisés dans les mêmes conditions.
- Les microplaques sont mises à incuber pendant 2 heures à 37°C sous 5 % de CO₂.

Révélation de la cytotoxicité

- 15 Après incubation, les microplaques sont lavées 2 fois au PBS. Ensuite, 100 μ l d'un mélange XTT (1mg/ml)/coenzyme Q (0,2 mg/ml) sont ajoutés dans chaque puits de la plaque 96 puits.
- Après 3 heures d'incubation, 100 μ l d'une solution de SDS à 10% sont ajoutés dans chaque puits.
- 20 La lecture immédiate de la densité optique à 450 nm est effectuée au spectrophotomètre POLARstar (BMG, France).

Expression des résultats

- La densité optique relevée est proportionnelle à la population cellulaire viable.
- 25 Ce test nous permet donc d'analyser à partir d'une densité optique correspondante au témoin, une cytotoxicité cellulaire lorsque la densité optique est inférieure à celle du lot témoin :
- $$\% \text{ de viabilité} = (\text{DO Traité} - \text{DO Témoin}) / \text{DO Témoin} \times 10$$
- Le produit est considéré cytotoxique si le pourcentage de viabilité $\leq 30\%$.
- 30 Les essais intra-manipulation sont réalisés 8 fois.

Résultats

En fonction du degré de non cytotoxicité des produits les concentrations choisies pour le test d'adhésion sont les suivantes :

- Composition A : 6%, 3%, 1,5%, 0,8% et 0,4%
- 5 - Atopiclair® : 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,1% et 0,05%
- Physiogel® : 6%, 3%, 1,5%, 0,8% et 0,4%
- Composition B : 3%, 1,5%, 0,8%, 0,4% et 0,2%

Exemple 3 : Test d'adhésion

10 Principe

Marquage des bactéries par l'adénine tritiée (sigma) et détermination du taux de bactéries adhérees à la surface des kératinocytes par évaluation du taux de la radioactivité.

15 Marquage des bactéries par l'adénine tritiée

Le marquage des bactéries s'effectue en présence de 30 µCi d'adénine tritiée dans du milieu de culture adéquat. Après une incubation de 18 heures à 37°C, les microorganismes sont lavés trois fois dans du PBS pour éliminer la radioactivité non incorporée.

- 20 Les suspensions sont ajustées à 2×10^8 microorganismes/ml dans le milieu de maintien.

Effet inhibiteur d'adhésion

- 25 500 µl de bactéries marquées en présence de chaque dilution test du produit sont déposés à la surface du tapis cellulaire.

Après une incubation de 2 heures (37°C, 5% de CO₂), 3 lavages au PBS sont réalisés.

Lyse des cellules

Les bactéries adhérentes aux kératinocytes sont lysées par 500 µl d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,5 N à 0,1% de sodium dodécyl sulfate pendant 18 heures à 37°C.

Le lysat de chaque puits est prélevé et placé dans les tubes de comptage. 2 ml de
5 liquide de scintillation sont ajoutés dans chaque tube.

Expression des résultats

La lecture se fait au compteur β qui exprime le taux de radioactivité en cpm (coups par minutes).

10 - Le pourcentage d'inhibition d'adhésion est calculé selon la formule :

$$\% \text{ inhibition} = ((\text{cpm Essai} - \text{cpm Contrôle}) / \text{cpm Contrôle}) \times 100$$

Le pourcentage d'inhibition d'adhésion est significatif si sa valeur $\leq 30\%$.

Les essais sont réalisés en quadriplate.

15 Conclusion

- La composition A inhibe significativement l'adhésion du *S. aureus* aux kératinocytes après 2 heures d'incubation à 6% et 3%.

- Le produit Physiogel inhibe significativement l'adhésion du *S. aureus* aux kératinocytes après 2 heures d'incubation à 6% et pas à 3%.

20 - Le produit Atopielair n'a aucun effet sur l'adhésion du *S. aureus* aux kératinocytes

- En présence de la composition B l'adhésion du *S. aureus* aux kératinocytes est anormalement augmentée.

Exemple 4 : analyse de la régulation de la déshydratation cutanée induite

25 Nous évaluons ici l'activité hydratante de la composition A et l'amélioration subséquente de la fonction barrière de la peau en utilisant un modèle de peau *ex vivo* de déshydratation cutanée induite.

Nous observons l'expression des marqueurs épidermiques moléculaires différentiels par PCR quantitative et immuno-histochimie.

30 Nous suivons également l'activité des enzymes à serine protéase par zymographie *in situ* et la dégradation de protéines cornéodesmosomales par western blotting.

La fonctionnalité de la barrière de la peau est analysée en utilisant des sondes fluorescentes.

Matériel et méthodes

5

I. Modèles tissulaires

1. Préparation des explants cutanés

10 Le laboratoire récupère des prélèvements de peau provenant de déchets opératoires de chirurgie plastique (diminutions mammaires). L'utilisation de ces prélèvements rentre dans le cadre de « la déclaration d'activité de conservation et de préparation d'éléments du corps humain pour les besoins de programme de recherche du groupe Pierre Fabre » faite au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
15 Recherche.

Ces prélèvements sont lavés dans 10 bains de PBS puis découpés à l'emporte-pièce en disques de 2 cm de diamètre. Les explants cutanés sont étalés sur une grille dans une boîte de Pétri et un anneau de 1 cm de diamètre est scellé sur la peau pour délimiter la zone de traitement.

20

2. Cinétique des modèles

Pour le modèle de déshydratation induite, la peau est desséchée pendant 2 heures sous la hotte de culture cellulaire dans une boîte sans couvercle puis est mise
25 à l'étuve pour un traitement topique avec ou sans association active pendant 2 heures. Le témoin négatif du stress de déshydratation subit la même cinétique dans une boîte de Pétri fermée.

3. Prélèvements pour l'analyse

Après le traitement, 2 biopsies de 6 mm de diamètre sont prélevées pour l'analyse de l'expression des ARN et une biopsie de 4 mm de diamètre incluse dans un bloc de résine Tissue Tek® (Sakura Finetek) pour l'histologie. Pour l'analyse des protéines, la peau est exposée à un choc thermique dans un bain d'eau à 60°C pendant 5 minutes puis à 4°C pendant 2 minutes afin de séparer l'épiderme du derme.

Les biopsies et les épidermes sont congelés dans l'azote liquide et stockés à -80°C avant d'être analysés.

10 II. Analyse du transcriptome par PCR quantitative

Les biopsies de peau sont broyées dans un mortier préalablement refroidi à l'azote liquide et les ARNs sont extraits grâce à un kit RNeasy® (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN est ensuite dosé à l'aide d'un Bioanalyser 2100® (Agilent Technologies) sur puces RNA 6000 Nano LabChip®. L'ADNc est obtenu à partir d'1 µg d'ARN par réaction enzymatique de rétro-transcription réalisée avec un kit Acces RT-PCR Core Reagents® (Promega), à l'aide d'amorces oligo dT. Les niveaux d'expression génique sont analysés par PCR quantitative sur un thermocycleur à fluorescence ICycler iQ® (Biorad) avec des kits PCR iQ™ SYBR® Green Super Mix (Biorad) suivant un protocole de 40 cycles comprenant une dénaturation à 95°C (15 sec) et une élongation à 60°C (1 mm). L'accumulation du produit de PCR proportionnelle à l'émission de fluorescence (intercalant SYBR® Green) est visualisée cycle après cycle grâce au logiciel iCycler.

Le logiciel d'analyse iCycler version 3.1 délivre des valeurs brutes de C_T (Cycle Threshold): cycle à partir duquel l'amplification d'ADNc débute. L'expression de plusieurs gènes de référence est analysée en parallèle à l'aide du programme Genorm version 3.4 qui permet de choisir le gène de référence le plus stable d'un échantillon à l'autre. Ce gène sert ensuite de référence pour la normalisation des résultats par le calcul du $\Delta C_T = C_T \text{ gène d'intérêt} - C_T \text{ gène de référence}$.

Le facteur d'induction (FI) est ensuite calculé pour chaque traitement par rapport à la condition contrôle correspondante. $FI = 2^{-\Delta\Delta C_T}$ où $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ traité} - \Delta C_T \text{ contrôle}$. L'expression des ARNm est évaluée en duplicate pour cinq expériences provenant de 5 individus différents. Lorsque le facteur d'induction par rapport au contrôle est supérieur à 2, on considère que l'expression du gène est induite et lorsqu'il est inférieur à 0,5, on considère que l'expression est réprimée. L'effet du principe actif sur la réponse au stress causée dans le modèle est évalué par le pourcentage d'inhibition calculé avec la formule suivante:

$$10 \quad \% \text{ d'inhibition} = 100 * \frac{(FI \text{ stressé} - FI \text{ témoin sans stress}) - (FI \text{ traité} - FI \text{ témoin sans stress})}{(FI \text{ stressé} - FI \text{ témoin sans stress})}$$

de réponse au stress

Par rapport au modèle d'étude, la condition « témoin sans stress » correspond au contrôle non desséché; la condition « stressé » correspond à une biopsie de peau qui a été desséchée 2 heures puis qui a passé 2 heures supplémentaire en condition contrôle (c'est-à-dire sans traitement topique); enfin la condition « traité » est la peau qui a subi 2 heures de dessèchement suivies de 2 heures de traitement topique par un émollient.

III. Analyse de l'expression protéique par Western Blot

Les épidermes traités sont broyés dans un mortier refroidi à l'azote liquide et les protéines sont extraites dans un tampon de lyse RIPA (Tris HCl pH8 50mM; NaCl 150mM; Triton X 100 IX; Na+Desoxycholate 1%; SDS 0,1%; EDTA 5mM ; DTT 100mM; cocktail d'inhibiteur de protéases (référence P8340, SIGMA).

Les protéines sont ensuite dosées par la méthode DC-DC Protein Assay (Biorad) et analysées par Western Blot. Pour chaque condition, 25 à 40µg de protéines totales sont déposées sur des gels Tris-Glycine à 7,5% de polyacrylamide. Le mélange protéique est séparé par électrophorèse à l'aide du système Mini Protean II (Biorad) et les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Hybond-P, Amersham). La protéine d'intérêt est révélée par un anticorps spécifique et un kit ECL+ (Amersham). La quantité de protéines et la proportion de forme dégradée sont

calculées grâce au logiciel Image Master TotalLab version 1.11 (Amersham) après normalisation par rapport à la β -actine (protéine de référence).

IV. Techniques histologiques

Les biopsies de peau sont sectionnées au cryotome (Leica CM 3050s) en
5 coupes de 5 μ m d'épaisseur et déposées sur des lames d'observation (Starfrost®).

1. Immunohistochimie

Les cryocoupes sont fixées 10 minutes à l'acétone à 20°C puis réhydratées au PBS avant d'être analysées par marquage immunochimique. Après fixation et
10 réhydratation, les coupes de peau sont saturées avec une solution de BSA 3% et incubées 1 heure avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Dans un deuxième temps, elles sont incubées pendant 1 heure avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa-488 ou Alexa-555 et enfin montées dans du Mowiol contenant du DAPI pour marquer les noyaux.

15 2 Zymographie *in situ*

Après une fixation de 10 minutes dans l'acétone à -20°C, les coupes sont rincées dans une solution de lavage (Tween 20 1% dans l'eau) et incubées 2 heures à 37°C avec une solution contenant le substrat spécifique des enzymes d'intérêt couplé à un fluorophore (annexe). Lorsque l'enzyme est active, le fluorophore est clivé,
20 libérant un signal fluorescent observable au microscope. Les lames marquées sont ensuite observées au microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse 50i) ou au microscope confocal inversé Zeiss Axiovert 100.

3 Sonde fluorescente

Après le traitement de déshydratation, les explants cutanés sont incubés
25 pendant une heure supplémentaire à l'étuve à 37°C avec une sonde fluorescente Lucifer Yellow Carboxyhydrazide dilithium salt (Invitrogen) à 1mM dans du tampon HBSS. La peau est ensuite rincée dans un bain d'HBSS pendant 1 minute puis des

biopsies de 4mm de diamètre sont prélevées et incluses dans de la résine Tissue TekR® (Sakura Finetek) (Matsuki et al 1998). La peau est ensuite coupée, les noyaux sont marqués au DAPI et les lames sont observées au microscope à fluorescence à une longueur d'onde de 450 nm comme décrit ci-dessus.

5

Résultats

I. Modèle de rupture de la fonction barrière par dessèchement induit

1. Mesure de la perméabilité cutanée par une sonde fluorescente

La première analyse a consisté à étudier un paramètre fonctionnel
10 fondamental dans la fonction barrière cutanée : la perméabilité des couches
supérieures de l'épiderme. L'incubation de la peau avec une sonde fluorescente
(Lucifer Yellow) après l'expérience de dessèchement a permis de caractériser la
modulation de la perméabilité cutanée. En condition contrôle, le marquage est très
faible et superficiel, la sonde pénètre peu à travers la couche cornée et est éliminée
15 lors du rinçage. Après deux heures de dessèchement, le marquage est observable
dans les strates plus profondes de la couche cornée. Le dessèchement rend la peau
plus perméable, sa fonction barrière est détériorée. Le traitement topique par la
composition A suite aux deux heures de dessèchement restaure l'imperméabilité du
SC vis à vis de la sonde, le marquage est à nouveau faible et superficiel, comme dans
20 la condition contrôle. On peut alors conclure que le traitement hydratant a un effet
réparateur sur la peau desséchée et sur la fonction barrière cutanée observable sur le
modèle tissulaire.

2. Effets sur la régulation du transcriptome et du protéome

L'expression de différents gènes potentiellement impliqués dans
25 l'homéostasie de la fonction barrière épidermique a été mesurée par PCR quantitative
dans les différentes conditions de stress ou de traitement du modèle de dessèchement.
L'analyse par immunohistochimie a permis de montrer la réorganisation de
l'expression de certaines protéines en termes de localisation, par exemple les

jonctions serrées. La dégradation des protéines cornéodesmosomales a été analysée par Western-Blot.

Les cibles étudiées à l'aide de ces différentes approches ont été regroupées selon leur rôle physiologique (voir tableau 1). L'objectif de cette étude est d'observer une réponse au stress visualisable et une correction de l'effet du stress par l'application topique de la composition A.

Le travail réalisé a également permis de mettre en évidence les différents niveaux de régulation de certaines cibles. Nous avons ainsi pu constater que les enzymes de la desquamation n'étaient pas régulées au niveau transcriptionnel mais plus spécialement au niveau de leur activité (Cf. Résultats 3.)

Tableau 1 : Récapitulatif des cibles et de la réponse pharmacologique étudiées dans le modèle de dessèchement.

15

O=La cible réagit dans le modèle ;

X=La cible ne réagit pas dans le modèle

O=Oui
N=Non

Cible	Réponse au stress	Inhibition de la réponse au stress par la composition A
Perméabilité cutanée	O	O
Desmogléine 1	O	O
Cdsn	X	X
Desmocolline	O	O
Plakoglobine	O	X
KLK5	O	X
KLK7	X	X

KLK8	X	X
Protéases à sérine	O	O
Cathépsine D	X	X
ABC A12	O	O
ABC G1	X	X
B-GC	X	X
DES 2	X	X
Filaggrine	O	O
Involucrine	X	X
TG1	X	X
TG3	X	X
Caspase 14	X	X
Elox-3	O	X
12R-LOX	X	X
HAS 2	O	X
CD44	X	X
AQP3	O	O
NHE1	O	O
IL-1 α	O	O
Occludine	O	O
Claudine 1	O	O

Claudine 4	O	O
ZO-1	X	X
E-Cadherine	X	X
β Catenine	X	X

3. Mesure de l'activité enzymatique liée à la desquamation

L'activité des protéases à sérine a été évaluée par zymographie *in Situ* sur le modèle de déshydratation et observée au microscope confocal dans la condition

5 contrôle après deux heures de dessèchement et après deux heures de dessèchement suivies par une incubation de deux heures avec la composition A. Le marquage est le plus intense dans la condition contrôle, il correspond à une activité forte normale. Ce marquage diminue et devient irrégulier le long de la couche cornée après deux heures

10 de dessèchement alors que son intensité est augmentée et la localisation de l'activité réorganisée après les deux heures d'incubation avec la composition A. Le dessèchement a pour effet de diminuer et perturber l'activité enzymatique. Ces résultats sont cohérents avec la diminution de la dégradation des protéines cornéodesmosomales que nous observons avec le dessèchement et confirme l'effet

15 du dessèchement sur la diminution de la desquamation observée sur le modèle mis au point. La composition A est capable de restaurer l'activité enzymatique de la peau déshydratée ce qui confirme l'effet de cette composition pour un retour de l'homéostasie de la desquamation.

20 Ces résultats montrent que la composition A permet de restaurer le niveau d'expression des cibles moléculaires dont l'expression est accrue par le stress de déshydratation cutané induit. La composition A permet également de restaurer l'activité sérine protéase. En outre, l'application topique de la composition A permet de supprimer l'inflammation induite par le stress.

Revendications

1. Composition à usage topique comprenant, en tant que principe actif, une
5 association de glycérol, vaseline et paraffine liquide sous forme d'une émulsion huile
dans eau ou eau dans huile pour utilisation pour la prévention de la dermatite
atopique.
2. Composition selon la revendication 1 pour utilisation pour la prévention
10 primaire de la dermatite atopique.
3. Composition selon la revendication 1 ou 2 dans laquelle la vaseline présente
un point de goutte compris entre 35 et 70°C.
- 15 4. Composition selon la revendication 3 dans laquelle la vaseline présente un
point de goutte compris entre 51 et 57°C, notamment 54°C.
5. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes dans
laquelle la vaseline présente une consistance comprise entre 175 et 195 1/10 mm
20 (pénétration au cône à 25°C).
6. Composition selon la revendication 5 dans laquelle la vaseline présente une
consistance d'environ 185 1/10 mm (pénétration au cône à 25°C).
- 25 7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes dans
laquelle la vaseline présente une viscosité comprise entre 4 et 5 cSt à 100°C.
8. Composition selon la revendication 7 dans laquelle la vaseline présente une
viscosité d'environ 4,8 cSt à 100°C.

30

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant environ 15% de glycérol, environ 8% de vaseline et environ 2% de paraffine liquide.
- 5 10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes comprenant un ou plusieurs excipients choisis dans le groupe constitué de acide stéarique, monostéarate de glycérol, polydiméthylcyclosiloxane, diméthicone, polyéthylène glycol 600, trolamine, parahydroxybenzoate de propyle, eau distillée.
- 10 11. Utilisation d'une composition comprenant, en tant que principe actif, une association de glycérol, vaseline et paraffine liquide sous forme d'une émulsion huile dans eau ou eau dans huile pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir la dermatite atopique.
- 15 12. Utilisation d'une composition telle que décrite dans les revendications 3 à 10 pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir la dermatite atopique.