

Etude 12E2595

**Evaluation des activités restructurante et réparante
de la barrière cutanée du produit Easytattoo creme
Ref P04537V02/01 sur explants de peau humaine ex
vivo**

selon le devis D12-354-2

Produit testé Easytattoo creme Ref P04537V02/01

Promoteur de l'étude	MEDICAL BODY ART M. TASSI Jérôme 55 rue de Nancy 44300 NANTES Tél : 02 51 83 05 49 jtassi@medicalbodyart.com
Réalisation de l'étude par	Laboratoire BIO-EC 1, Chemin de Saulxier 91160 Longjumeau FRANCE Tél. +(33)1 69 41 42 21 Fax +(33)1 69 41 61 65 Contact info@bio-ec.fr Contact www.bio-ec.fr
Date de début d'expérimentation	30 octobre 2012
Date de fin d'expérimentation	10 décembre 2012
Directeur d'étude	E. Lati

Réalisation de l'étude

Responsable Phase <i>ex vivo</i>	C. Merle
Date	30.10.12 au 09.11.12
Responsable Phase histologique	C. Fays
Date	06.11.12 au 29.11.12
Responsable Phase Expertise	L. Peno-Mazzarino
Date	29.11.12 au 10.12.12
Partenaires et Sous-traitant ayant participé à l'étude	Aucun

SOMMAIRE

SOMMAIRE	2
BUT DE L'ETUDE	4
MATERIELS ET METHODES	4
1. Produits	4
2. Préparation des explants.....	5
3. Stripping	6
4. Application des produits	6
5. Réalisation des brûlures	6
6. Prélèvements.....	6
7. Traitements histologiques.....	6
7.1. Examen de la morphologie générale.....	7
7.2. Immunomarquage de la filaggrine	7
7.3. Immunomarquage de la transglutaminase membranaire (TGM)	7
7.4. Immunomarquage de la fibronectine	8
7.5. Immunomarquage de l'intégrine $\beta 4$	8

RESULTATS.....	9
1. Morphologie générale (<i>Activité restructurante</i>)	9
2. Immunomarquage de la Filaggrine (<i>Activité restructurante</i>)	11
3. Immunomarquage de la TGM (<i>Activité restructurante</i>).....	12
1. Morphologie générale (<i>Activité réparatrice</i>).....	13
2. Fibronectine (<i>Activité réparatrice</i>)	17
3. Intégrine $\beta 4$ (<i>Activité réparatrice</i>).....	18
DISCUSSION	19
1. Morphologie générale.....	19
2. Filaggrine	20
3. TGM	21
1. Morphologie générale.....	22
2. Fibronectine	23
3. Intégrine $\beta 4$	24
CONCLUSION	25
ANNEXES.....	26
DEVIATIONS.....	27
ATTESTATIONS.....	27
ARCHIVAGE DE L'ETUDE	28
RESUME DE L'ETUDE	29

BUT DE L'ETUDE

Cette étude a pour but d'explorer l'activité restructurante et réparatrice d'un produit sur les structures épidermiques et dermiques d'explants de peau humaine maintenus en survie.

- ▶ L'activité **restructurante** sera évaluée sur une peau strippée par :
 - une expertise histologique de la morphologie générale de la peau après coloration au trichrome de Masson,
 - Immunomarquage de la TGM
 - Immunomarquage de la fillagrine
- ▶ L'activité **réparatrice** sera évaluée sur une peau brûlée par :
 - une expertise histologique de la morphologie générale de la peau après coloration au trichrome de Masson
 - Immunomarquage de l'intégrine $\beta 4$
 - Immunomarquage de la fibronectine

MATERIELS ET METHODES

1. Produits

Le commanditaire a fourni un produit identifié comme suit :

Produit	Désignation	Référence	Lot	Aspect	Quantité
P	Easytattoo creme	P04537V02/01	I2006	Crème blanche	30 g

2. Préparation des explants

42 explants d'un diamètre d'environ 10 mm ont été préparés à partir d'une plastie abdominale d'une femme de type caucasien âgée de 65 ans (référence P984-AB65). Les explants ont été mis en survie en milieu BEM (BIO-EC's Explants Medium) à 37°C en atmosphère humide, enrichie de 5 % de CO₂.

Répartition des explants en 6 lots, comme suit :

Lot	Traitement	Nb explants	Prélèvement
T0	Aucun	3	J0
T	Aucun	9	J1, J3, J9
TS	Témoin strippé	9	J0, 3h, J1
PS	Stripping + produit	6	3h, J1
TB	Témoin Brûlée	9	J0, J3, J9
PB	Brulure + Produit	6	J3, J9

Répartition des lots en fonction de l'activité évaluée

Lot	Activité	Morpho	Filaggrine	TGM	Fibronectine	Intégrine β4
T0	Restructurante Réparatrice	+	+	+	+	+
TSJ0	Restructurante	+	+	+		
TBJ0	Réparatrice	+				
TS3H	Restructurante	+	+	+		
PS3H	Restructurante	+	+	+		
TJ1	Restructurante	+	+	+		
TSJ1	Restructurante	+	+	+		
PSJ1	Restructurante	+	+	+		
TJ3	Réparatrice	+			+	+
TBJ3	Réparatrice	+			+	+
PBJ3	Réparatrice	+			+	+
TJ9	Réparatrice	+			+	+
TBJ9	Réparatrice	+			+	+
PBJ9	Réparatrice	+			+	+

3. Stripping

La fonction barrière du stratum corneum a été altérée par élimination des couches supérieures du stratum corneum par stripping.

Les explants ont été essuyés et 5 strippings au scotch ont été réalisés sur chaque explant.

4. Application des produits

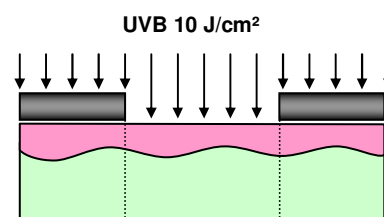
A J0, immédiatement après les strippings ou les brûlures, le produit a été appliqué sur les explants des lots concernés à raison de 2 mg par explant et étalés à l'aide d'une spatule.

Le traitement a été renouvelé à J2, J5, J7 et J8.

Les explants du lot T n'ont reçu aucun traitement.

5. Réalisation des brûlures

Au jour J0, le milieu de culture a été remplacé par du HBSS (Hank's Balanced Saline Solution). Puis le centre des explants concernés a été irradié à l'aide d'un simulateur UV (Vilbert Lourmat RMX 3W) avec une dose d'UVB de 10 J/ cm². A la fin des irradiations, le milieu de culture a entièrement été renouvelé (2ml).



6. Prélèvements

A J0, les explants des lots T0, TS et TB ont été prélevés et coupés en 2. Une partie a été fixée dans une solution de formol tamponné et la 2^{ème} partie a été congelée à -80 °C.

A J0+3h, J1, J3 et J9, 3 explants des lots concernés ont été prélevés et traités de la même façon.

7. Traitements histologiques

Après 24 heures de fixation dans le formol tamponné, les prélèvements ont été déshydratés et imprégnés en paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation Leica TP 1020 selon le mode opératoire MO-H-149.

Ils ont été mis en bloc selon le mode opératoire MO-H-153 à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG 1160.

Des coupes de 5 µm ont été réalisées selon le mode opératoire MO-H-173 à l'aide d'un microtome type Minot, Leica RM 2125 et montées sur des lames de verre histologiques Superfrost®.

Les prélèvements congelés ont été coupés à 7 µm dans un cryostat Leica CM 3050. Les coupes ont été collées sur des lames de verre histologique silanisées Superfrost® Plus, pour les immunomarquages.

Les observations microscopiques ont été réalisées en microscopie optique, à l'aide d'un microscope Leica type Orthoplan ou DMLB. Les prises de vue ont été réalisées avec une caméra Olympus DP72 et le logiciel Cell^D.

7.1. Examen de la morphologie générale

La morphologie générale a été examinée sur des coupes en paraffine colorées au trichrome de Masson variante de Goldner, selon le mode opératoire MO-H-157.

Lots concernés : tous les lots (42 explants)

7.2. Immunomarquage de la filaggrine

La protéolyse de la filaggrine produit des acides aminés, importants composants du NMF (natural moisturizing factor) formant le ciment inter-cornéocytaire responsable de la fonction barrière du stratum corneum.

La filaggrine a été marquée sur coupes paraffine formolées, avec un anti-corps monoclonal anti-filaggrine, clone AKH1, Santa Cruz ref sc-66192, fait sur souris au 1/3200^{ème} pendant 1h à température ambiante avec un système amplificateur biotine/streptavidine et révélé en FITC. Les noyaux ont été contre colorés à l'iodure de propidium.

L'immunomarquage a été réalisé à l'aide d'un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

Le marquage a été évalué par un examen microscopique.

Lots concernés : T0, TSJ0, TS3H, PS3H, TJ1, TSJ1 et PSJ1 (21 explants)

7.3. Immunomarquage de la transglutaminase membranaire (TGM)

La TGM est une enzyme impliquée dans la formation des enveloppes cornées du stratum corneum.

La TGM a été marquée sur coupes congelées à l'aide d'un anti-corps monoclonal anti-TGM, clone B.C1, de chez Harbor BioProducts, ref 621, fait sur souris, dilué au 1/100^{ème} pendant 2 heures à TA avec un système amplificateur Vectastain RTU Universal VECTOR avidine/biotine et révélé en FITC. Les noyaux ont été contre colorés à l'iodure de propidium.

Le marquage a été évalué par un examen microscopique.

Lots concernés : T0, TSJ0, TS3H, PS3H, TJ1, TSJ1 et PSJ1 (21 explants)

7.4. Immunomarquage de la fibronectine

La fibronectine a été marquée sur coupes congelées, avec un anti-corps monoclonal anti-fibronectine, clone TV-1, fait sur souris de chez Chemicon (ref MAB 88904), au 1/200^{ème} pendant 1h à température ambiante avec un système amplificateur biotine/streptavidine, révélé en FITC avec les noyaux contre colorés à l'iodure de propidium.

L'immunomarquage a été réalisé à l'aide d'un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

Le marquage a été évalué par un examen microscopique.

Lots concernés : T0, TJ3, TBJ3, PBJ3, TJ9, TBJ9 et PBJ9 (21 explants)

7.5. Immunomarquage de l'intégrine $\beta 4$

L'intégrine $\beta 4$ a été marquée sur coupes congelées, avec un anti-corps monoclonal anti-intégrine $\beta 4$ clone 3 E1 (CD104), fait sur souris de chez Chemicon (ref MAB 1964), au 1/600^{ème} pendant 1h à température ambiante avec un système amplificateur biotine/streptavidine, révélé en FITC avec les noyaux contre colorés à l'iodure de propidium.

L'immunomarquage a été réalisé à l'aide d'un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

Le marquage a été évalué par un examen microscopique.

Lots concernés : T0, TJ3, TBJ3, PBJ3, TJ9, TBJ9 et PBJ9 (21 explants)

RESULTATS

► Activité restructurante

1. Morphologie générale

(Activité restructurante)

Lot Témoin, à J0 (T0)

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement compact, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin Strippé, à J0 (TSJ0)

Le stratum corneum est peu épais, assez compact, nettement kératinisé à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin Strippé, à J0+3H (TS3H)

Le stratum corneum est peu épais, assez compact, nettement kératinisé à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Produit Strippé, à J0+3H (PS3H)

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin, à J1 (TJ1)

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement feuilleté, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin Strippé, à J1 (TSJ1)

Le stratum corneum est peu épais, assez compact, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 3 à 4 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Produit Strippé, à J1 (PSJ1)

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement feuilleté et nettement kératinisé à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

2. Immunomarquage de la Filaggrine

(Activité restructurante)

A J0 (T0), le marquage est assez net (intensité) sur 4 à 5 assises cellulaires (ACell) à la base du stratum corneum.

Le marquage sur les autres lots est présenté ci-dessous:

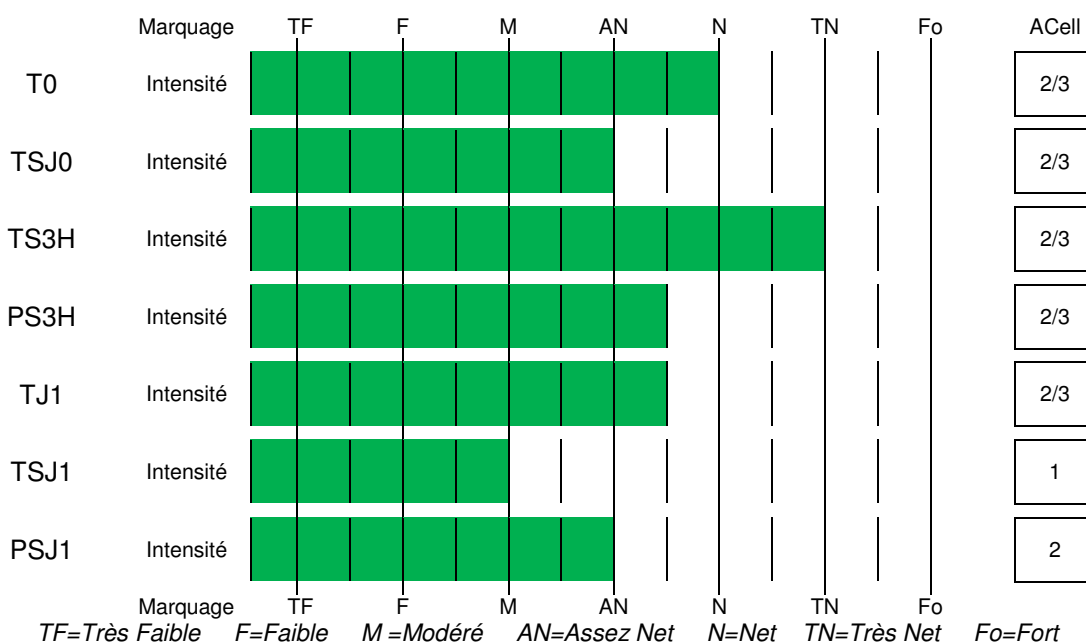
	Marquage	TF	F	M	AN	N	TN	Fo	ACell
T0	Intensité								3/4
TSJ0	Intensité								3/4
TS3H	Intensité								3/4
PS3H	Intensité								3/4
TJ1	Intensité								4/5
TSJ1	Intensité								3/4
PSJ1	Intensité								5/6
	Marquage	TF	F	M	AN	N	TN	Fo	
	TF=Très Faible F=Faible M=Modéré AN=Assez Net N=Net TN=Très Net Fo=Fort								

3. Immunomarquage de la TGM

(Activité restructurante)

A J0 (T0), le marquage est assez net à net (intensité) sur environ 3 assises cellulaires (ACell) à la base du stratum corneum.

Le marquage sur les autres lots est présenté ci-dessous:



► **Activité réparatrice**

1. Morphologie générale

(Activité réparatrice)

Lot Témoin, à J0 (T0)

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement compact, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin brûlé, à J0 (TBJ0)

Zone normale

Le stratum corneum est modérément épais, légèrement compact, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Zone brûlée

La morphologie est similaire à celle de la zone normale

Lot Témoin, à J3 (TJ3)

Le stratum corneum est modérément épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une assez bonne morphologie.

Une légère spongiose est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Lot Témoin brûlé, à J3 (TBJ3)

Zone normale

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une assez bonne morphologie.

Une légère spongiose est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Bord de la brûlure

Le bord de la lésion est assez net, sans bourgeon de croissance.

Zone brûlée

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une morphologie nettement altérée. De très nombreuses cellules sont non-viables ($\pm 95\%$) avec des noyaux pycnotiques, œdème périnucléaire ou noyau caryolytique sont observées dans tout l'épiderme. Seules quelques cellules viables ($\pm 5\%$) subsistent dans les couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est assez bonne ; quelques cellules à noyaux pycnotiques sont observées.

Lot Produit brûlé, à J3 (PBJ3)

Zone normale

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une assez bonne morphologie. Une légère spongiose est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau assez dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Bord de la brûlure

Le bord de la lésion est assez net, sans bourgeon de croissance.

Zone brûlée

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une morphologie nettement altérée. De très nombreuses cellules sont non-viables ($\pm 90\%$) avec des noyaux pycnotiques, œdème périnucléaire ou noyau caryolytique sont observées dans tout l'épiderme. Seules quelques cellules viables ($\pm 10\%$) subsistent dans les couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau assez dense. La morphologie des cellules dermiques est assez bonne ; quelques cellules à noyaux pycnotiques sont observées.

Lot Témoin, à J9 (TJ9)

Le stratum corneum est assez épais, assez bien feuilleté, modérément kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 3 à 4 assises cellulaires avec une morphologie légèrement altérée. Quelques cellules à noyau pycnotique sont observées. Une spongiose modérée est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène assez épais formant un réseau assez dense. La morphologie des cellules dermiques est assez bonne.

Lot Témoin brûlé, à J9 (TBJ9)

Zone normale

Le stratum corneum est assez épais, assez bien feuilleté, modérément kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une morphologie légèrement altérée. Quelques cellules à noyau pycnotique sont observées. Une spongiose nette est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau plus ou moins dense. La morphologie des cellules dermiques est assez bonne.

Bord de la brûlure

Le bourgeon de croissance progresse sous la lésion sur 1 à 2 champs microscopique. Il présente une bonne morphologie et est assez bien stratifié (2 à 3 assises cellulaires).

Zone brûlée

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 3 à 4 assises cellulaires avec une morphologie très nettement altérée. De très nombreuses cellules sont non-viables (>95%) avec des noyaux pycnotiques, œdème périnucléaire ou noyau caryolytique sont observées dans tout l'épiderme. Seules quelques cellules viables (<5%) subsistent dans les couches basales. Une nette spongiose et une légère acantholyse sont observées en basale.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau plus ou moins dense. La morphologie des cellules dermiques est modérément altérée ; un nombre modéré de cellules à noyaux pycnotiques sont observées.

Lot Produit brûlé, à J9 (PBJ9)

Zone normale

Le stratum corneum est assez épais, assez bien feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une morphologie légèrement altérée. Quelques cellules à noyau pycnotique sont observées. Une spongiose modérée est observée au niveau des couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau assez dense. La morphologie des cellules dermiques est assez bonne.

Bord de la brûlure

Le bourgeon de croissance progresse sous la lésion sur 1 à 2 champs microscopique. Il présente une bonne morphologie et est assez bien stratifié (2 à 3 assises cellulaires).

Zone brûlée

Le stratum corneum est assez épais, modérément feuilleté, légèrement kératinisé en surface et nettement à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une morphologie nettement altérée. De très nombreuses cellules sont non-viables (>95%) avec des noyaux pycnotiques, œdème périnucléaire ou noyau caryolytique sont observées dans tout l'épiderme. Seuls quelques foyers de cellules viables subsistent dans les couches basales.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène modérément épais formant un réseau plus ou moins dense. La morphologie des cellules dermiques est modérément altérée ; un nombre modéré de cellules à noyaux pycnotiques sont observées.

2. Fibronectine

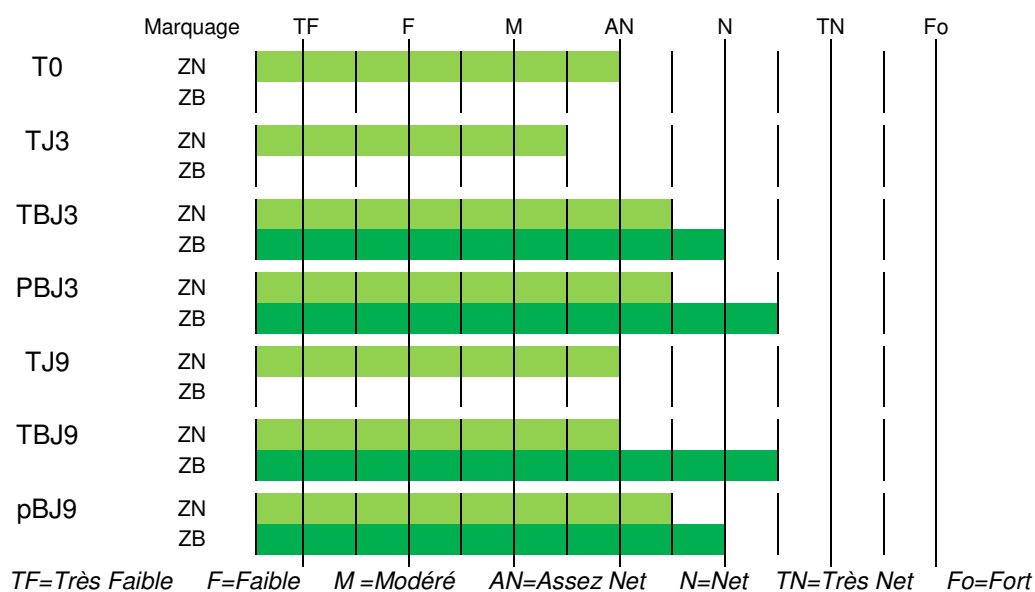
(Activité réparatrice)

Aucun marquage n'est observé après avoir remplacé l'anti-corps primaire par du PBS

A J0 (T0),

Le marquage est **assez net** dans le derme papillaire.

Le marquage sur les autres lots est présenté ci-dessous:



3. Intégrine $\beta 4$

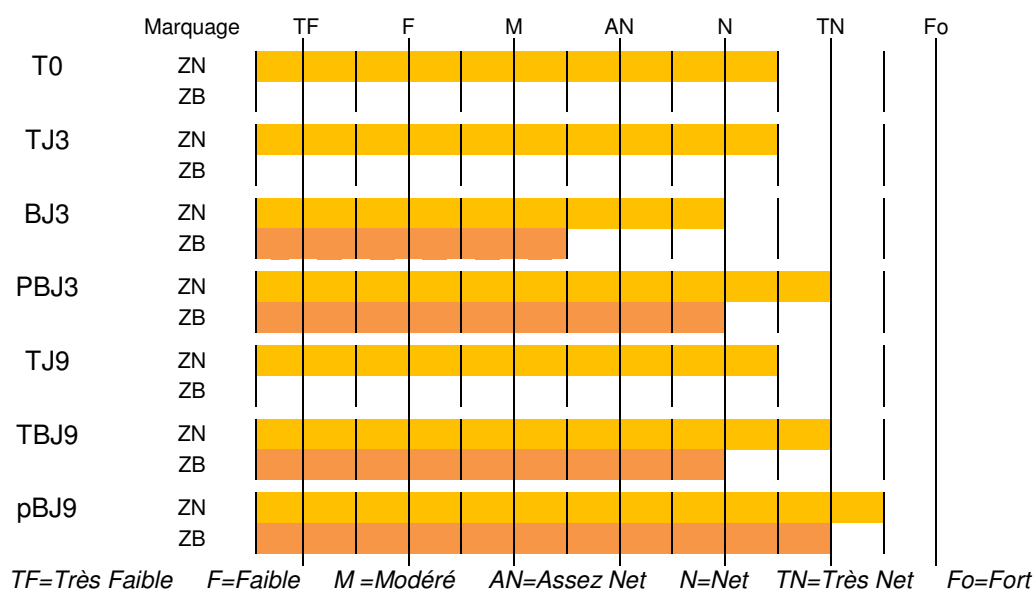
(Activité réparatrice)

Aucun marquage n'est observé après avoir remplacé l'anti-corps primaire par du PBS

A J0 (T0),

Sur la zone normale, le marquage est **net à très net** le long de la JDE.

Le marquage sur les autres lots est présenté ci-dessous:



DISCUSSION

► Activité restructurante

1. Morphologie générale

A J0, sur le lot Témoin (**T0**), le stratum corneum (SC) est modérément épais, légèrement compact, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Après stripping (**TSJ0**), la morphologie épidermique est bonne, mais le SC est moins épais et plus compact.

→ Le stripping a altéré la morphologie du SC et par conséquent a altéré sa fonction barrière.

Au temps 3 heures après le stripping (**TS3H**), la morphologie est similaire à celle observée à J0.

Dans les mêmes conditions mais après application du produit (**PS3H**), le SC est modérément épais et légèrement feuilleté comme cela est observé sur le témoin non strippé.

→ Le produit P a compensé les effets du stripping et permet de rétablir une morphologie du SC proche de celle observée sans stripping.

A J1, soit 24 heures après le début de l'étude, la morphologie générale est bonne (**TJ1**).

Pour le lot strippé (**TSJ1**), la morphologie est bonne, mais le SC reste peu épais, compact et l'épiderme a perdu une assise cellulaire.

→ L'épiderme a accéléré la différenciation de sa dernière couche de kératinocytes, pour reconstituer du SC dont la partie supérieure du SC a été éliminée par stripping.

Dans les mêmes conditions mais après application du produit (**PSJ1**), le SC est modérément épais et légèrement feuilleté comme cela est observé sur le témoin non strippé.

→ Le produit P a compensé les effets du stripping et permet de conserver une morphologie de l'épiderme et du SC comparable à celle du témoin non strippé.

2. Filaggrine

A J0 (T0), le marquage est modéré à assez net sur 3 à 4 assises cellulaires à la base du stratum corneum.

Aussitôt après les strippings (TSJ0), une légère augmentation de l'expression de la filaggrine est observée.

3h après les strippings (TS3H), l'expression de la filaggrine est légèrement inférieure à celle observée à TSJ0.

➔ Les strippings induisent une légère diminution de l'expression de la filaggrine.

Comparé au lot strippé (TS3H), le produit P n'induit pas de modification de l'expression de la filaggrine (DP3H).

A J1, l'expression de la filaggrine (TJ1) est assez nettement supérieure (intensité + nombre d'assises cellulaires) à celle observée à T0.

24H après les strippings (TSJ1), l'expression de la filaggrine est modérément inférieure (intensité + nombre d'assises cellulaires) à celle du témoin (TJ1).

24h après les strippings et le traitement avec le produit P, l'expression de la filaggrine est légèrement supérieure (nombre d'assises cellulaires) à celle du témoin (TJ1).

➔ Le produit P rétablit l'expression de la filaggrine altérée par l'effet des strippings, comparé au témoin strippé (TSJ1) et augmente légèrement l'expression de la filaggrine, comparé au témoin normal (TJ1).

3. TGM

A J0 (T0), le marquage est net (intensité) sur environ 2 à 3 assises cellulaires (ACell) à la base du stratum corneum
Aussitôt après la délipidation (TSJ0), une diminution modérée de l'expression de la TGM est observée.

3h après les strippings (TS3H), l'expression de la TGM est légèrement supérieure à celle observée à TSJ0.

→ Les strippings induisent une augmentation modérée de la TGM pour lutter contre l'effet des strippings.

Comparé au lot strippé (TS3H), le produit P induit une assez nette diminution de l'expression de la TGM (DP3H).

→ Le produit P réduit l'effet des strippings sur la TGM.

A J1, l'expression de la TGM (TJ1) est légèrement inférieure à celle observée à T0.

24h après la délipidation, l'expression de la TGM est légèrement inférieure à celle du témoin (TJ1).

24h après délipidation et traitement avec le produit P, l'expression de la TGM est comparable à celle du lot délipidé (DJ1).

24H après les strippings (TSJ1), l'expression de la TGM est nettement inférieure (intensité + nombre d'assises cellulaires) à celle du témoin (TJ1).

24h après les strippings et le traitement avec le produit P, l'expression de la TGM est modérément inférieure (intensité + nombre d'assises cellulaires) à celle du témoin (TJ1).

→ Le produit P limite l'effet des strippings sur l'expression de la TGM, comparé au témoin strippé (TSJ1) et rétabli presque entièrement l'expression de la TGM, comparé au témoin normal (TJ1).

► Activité réparatrice

1. Morphologie générale

A J0, sur le lot Témoin (**T0**), le stratum corneum (SC) est modérément épais, légèrement compact, nettement kératinisé en surface et à sa base.

L'épiderme présente 4 à 5 assises cellulaires avec une bonne morphologie.

Le relief de la jonction dermo-épidermique est modéré.

Le derme papillaire montre des faisceaux de collagène peu épais formant un réseau modérément dense. La morphologie des cellules dermiques est bonne.

Après brûlure UV (**TBJ0**), la morphologie épidermique est similaire à celle observée pour le lot T0.

A J3, sur le lot témoin (**TJ3**), la morphologie générale est assez bonne et proche de celle observée à T0.

Trois jours après la brûlure (**TBJ3**), de nettes altérations de la morphologie de l'épiderme sont observées. Le bord de la lésion est assez net, sans bourgeon de croissance.

Trois jours après la brûlure et traitement avec le produit P (**PBJ3**), de nettes altérations de la morphologie de l'épiderme sont observées, mais un nombre légèrement plus important de cellules viables persistent dans l'épiderme. Le bord de la lésion est assez net, sans bourgeon de croissance.

A J9, sur le lot témoin (**TJ9**), la morphologie générale est légèrement altérée.

Neuf jours après la brûlure (**TBJ9**), de nettes altérations de la morphologie de l'épiderme sont observées. Un bourgeon de croissance progresse assez nettement sous la zone brûlée avec une bonne morphologie et une bonne stratification.

Neuf jours après la brûlure et traitement avec le produit P (**PBJ9**), de nettes altérations de la morphologie de l'épiderme sont observées, mais quelques foyers de cellules viables persistent dans l'épiderme. Le bourgeon de croissance sur le bord de la brûlure est comparable à celui observé sur le témoin (**TBJ9**).

2. Fibronectine

A J0 (**T0**),

Sur la zone normale, le marquage est assez net dans le derme papillaire.

A J3,

Sur le lot non traité sans brûlure (**TJ3**), l'expression de la fibronectine est modérée à assez nette, légèrement inférieure à celle observée à J0.

Sur le lot brûlé (**BJ3**), l'expression de la fibronectine est modérée à assez nette en dehors de la brûlure (zone normale) et nette sur la lésion.

➔ La brûlure induit une légère augmentation de l'expression de la fibronectine.

Sur le lot brûlé traité avec le produit P (**BPJ3**), l'expression de la fibronectine sur la zone normale assez nette à nette, mais elle est nette à très nette sur la zone brûlée.

➔ Comparé au témoin brûlé et non traité (TBJ3), le produit P induit une légère augmentation de l'expression de la fibronectine.

A J9,

Sur le lot non traité sans brûlure (**TJ9**), l'expression de la fibronectine est assez nette, comparable à celle observée à J0.

Sur le lot brûlé (**BJ9**), l'expression de la fibronectine est assez nette en dehors de la brûlure (zone normale) et nette à très nette sur la lésion.

➔ La brûlure induit une assez nette augmentation de l'expression de la fibronectine.

Sur le lot brûlé traité avec le produit P (**BPJ9**), l'expression de la fibronectine sur la zone normale est légèrement augmentée et elle est légèrement augmentée sur la zone brûlée.

➔ Comparé au témoin brûlé et non traité (TBJ9), le produit P induit une légère diminution de la fibronectine, traduisant un retour à la normale de l'expression de la fibronectine.

3. Intégrine $\beta 4$

A J0 (**T0**),

Sur la zone normale, le marquage est net à très net sur les cellules de la couche basale de l'épiderme.

A J3,

Sur le lot non traité sans brûlure (**TJ3**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ est comparable à celle observée à J0.

Sur le lot brûlé (**BJ3**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ est nette en dehors de la brûlure (zone normale) et modérée à assez nette sur la lésion.

➔ La brûlure induit une assez nette diminution de l'expression de l'intégrine $\beta 4$.

Sur le lot brûlé traité avec le produit P (**BPJ3**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ sur la zone normale très nette et elle nette sur la zone brûlée.

➔ Comparé au témoin brûlé et non traité (TBJ3), le produit P induit une assez nette augmentation de l'expression de l'intégrine $\beta 4$.

A J9,

Sur le lot non traité sans brûlure (**TJ9**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ est très nette, légèrement supérieure à celle observée à J0.

Sur le lot brûlé (**BJ9**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ est très nette en dehors de la brûlure (zone normale) et nette sur la lésion.

➔ La brûlure induit une diminution modérée de l'expression de l'intégrine $\beta 4$.

Sur le lot brûlé traité avec le produit P (**BPJ9**), l'expression de l'intégrine $\beta 4$ sur la zone normale est très nette à forte et elle est très nette sur la zone brûlée.

➔ Comparé au témoin brûlé et non traité (TBJ9), le produit P induit une augmentation modérée de l'expression de l'intégrine $\beta 4$.

CONCLUSION

► Activité restructurante

Au niveau morphologique, le produit Easytattoo creme (P) compense rapidement (3 heures) l'altération de la barrière cutanée induite par strappings. Cette action se prolonge 24 heures après les strappings.

Le produit Easytattoo creme (P) rétablit rapidement (3 heures) l'expression de la filaggrine altérée par l'effet des strappings et augmente légèrement l'expression de la filaggrine après 24 heures de traitement, comparé au témoin non strappé.

Le produit Easytattoo creme (P) limite rapidement (3 heures) l'effet des strappings sur l'expression de la TGM et rétablit presque entièrement l'expression de la TGM après 24 heures de traitement.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une activité restructurante importante qui permet de compenser rapidement (en 3 heures) une altération de la fonction barrière du stratum corneum. Cette activité permet de rétablir une fonction quasi normale après 24 heures de traitement.

► Activité réparatrice

Au niveau morphologique, le produit Easytattoo creme (P) réduit légèrement les effets de la brûlure UV favorisant la formation de foyers de cellules viables à même de favoriser la réparation de la zone lésée. Mais, le produit Easytattoo creme (P) ne montre pas d'activité sur la progression du bourgeon de croissance sur les bords de la lésion.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une légère activité protectrice.

Après trois jours de traitement, le produit Easytattoo creme (P) augmente l'expression de la fibronectine pour favoriser la réparation de la zone brûlée et favorise un retour à la normale après 9 jours de traitement.

Après trois jours de traitement, le produit Easytattoo creme (P) augmente assez nettement l'expression de l'intégrine $\beta 4$ pour favoriser la réparation de la zone brûlée. Cette augmentation est plus mesurée après neuf jours.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une activité réparatrice importante qui s'exprime dès 3 jours de traitement, permettant une réparation plus rapide de la zone lésée.

ANNEXES

Glossaire des termes histologiques utilisés

Parakératose	Kératinisation anormale au niveau de la couche granuleuse (dernière couche épidermique vivante) se caractérisant par la persistance de noyaux dans les couches kératinisées.
Noyaux pycnotiques	Condensation du contenu nucléaire, le noyau se rétracte et devient hypercolorable ⇒ <i>Dégénérescence nucléaire conduisant à la nécrose cellulaire</i>
Noyaux caryolytiques	Dissolution des éléments du noyau qui devient peu colorable puis invisible ⇒ <i>Dégénérescence nucléaire conduisant à la nécrose cellulaire</i>
Œdème cellulaire	Gonflement de la cellule dû à une accumulation ou un excès de liquide.
Spongiose	Œdème inter cellulaire sans rupture des liaisons desmosomiales
Acantholyse	Œdème inter cellulaire avec rupture des liaisons desmosomiales.
Acanthose épidermique	Augmentation de l'épaisseur de l'épiderme due à une augmentation du nombre d'assise cellulaire (acanthose hyperplasique) ou à une augmentation de la taille des kératinocytes (acanthose hypertrophique).
Cellule dyskératosique	Cellule à noyau pycnotique et cytoplasme acidophile (rouge) : défaut de maturation kératinocytaire ou cellule en voie d'apoptose.
Décollement de la jonction dermo-épidermique	Protéolyse d'un des composants de la jonction dermo-épidermique.

DEVIATIONS

Conformément aux dispositions prévues dans le devis, pour faire correspondre le planning de l'étude aux jours ouvrés, les jours de traitements et de prélèvements ont été modifiés mais le nombre de traitements a été respecté.

ATTESTATIONS

L'étude qui fait l'objet de ce présent rapport a été réalisée selon les Bonnes Pratiques du Laboratoires (Arrêté du 10 Aout 2004), ainsi qu'en respectant les procédures et modes opératoires validés par le Laboratoire BIO-EC.

Les audits réalisés permettent de s'assurer que toutes les étapes de l'étude sont contrôlées. Les dates et les phases inspectées lors de nos différents audits sont indiquées dans le tableau ci-dessous :

Type d'audit	Date	Etape contrôlée	Date des comptes rendus au Directeur d'Etude	Date des comptes rendus à la Direction
Externe	07/2006	Laboratoire d'histologie	27/07/2006	27/07/2006
Externe	22/06/2010	Laboratoire d'histologie	22/06/2010	22/06/2010
Externe	24/08/2010	Laboratoire d'histologie	/	/
Interne	21/06/2012	Laboratoire d'histologie	03/07/2012	03/07/2012
Externe	16/07/2012	Laboratoire d'histologie	20/07/2012	20/07/2012

Ce rapport a été examiné par le Responsable Qualité qui atteste que les méthodes et les modes opératoires ont été entièrement respectés.

Ce rapport a été examiné par le Directeur d'étude qui atteste que les observations et les résultats obtenus sont fidèlement indiqués et reflètent avec exactitude les données brutes de l'étude.

Responsable **Assurance qualité** **M. DANIEL**

Date et signature :

Directeur d'étude **E. LATI**

Date et signature :

ARCHIVAGE DE L'ETUDE

- Archivage des données brutes

Les données brutes obtenues sont :

- Observations microscopiques
- Résultats d'analyses d'images
- Résultats de dosages
- Résultats à l'aide d'appareils biométrieologiques

Toutes ces données brutes sont conservées dans le dossier papier de l'étude, et une sauvegarde informatique est faite lorsque cela est possible (suivant les appareils).

- Archivage des produits ; échantillons ; blocs et lames

Les produits confiés au Laboratoire BIO-EC sont conservés pendant 1 an après remise du rapport d'étude.

Les blocs en paraffine, les lames colorées et les immunomarquages révélés en peroxydase et phosphatase alcaline seront conservés 15 ans dans les locaux de BIO-EC.

Les immunomarquages fluorescents seront gardés 1 mois au congélateur à -20 °C.

Les blocs congelés resteront en possession du laboratoire 2 ans à -80 °C. Par la suite ils seront tous éliminés, sauf avis contraire dûment stipulé par le client.

- Archivage du rapport final

Le dossier d'étude papier est archivé et conservé pendant 20 ans.

Le dossier d'étude informatique (données brutes, images, rapports préliminaires et rapports final) ainsi que toutes les données informatiques sont sauvegardées en local par duplication (RISCBOX en RAID 1) et font l'objet d'une sauvegarde externe journalière avec le service BackUpia (RISC GROUP).

Notre système informatique est protégé par le service antivirus McAfee SaaS.



RESUME DE L'ETUDE

Produit

P: Easytattoo creme Ref P04537V02/01

Modèle

Human skin explants *ex vivo*.

Activité restructurante: Elimination de la partie supérieure du SC par stripping

Activité réparatrice: Brûlure par UVB (10J/cm²)

Traitement topique : 2mg/cm² après stripping ou UVB, à J0, J2, J5, J7 et J8

Prélèvement à J0, J0+3h, J1, J3 et J9

Résultats / Conclusion

▶ Activité restructurante

Au niveau morphologique, le produit Easytattoo creme (P) compense rapidement (3 heures) l'altération de la barrière cutanée induite par strippings. Cette action se prolonge 24 heures après les strippings.

Le produit Easytattoo creme (P) rétablit rapidement (3 heures) l'expression de la filaggrine altérée par l'effet des strippings et augmente légèrement l'expression de la filaggrine après 24 heures de traitement, comparé au témoin non strippé.

Le produit Easytattoo creme (P) limite rapidement (3 heures) l'effet des strippings sur l'expression de la TGM et rétablit presque entièrement l'expression de la TGM après 24 heures de traitement.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une activité restructurante importante qui permet de compenser rapidement (en 3 heures) une altération de la fonction barrière du stratum corneum. Cette activité permet de rétablir une fonction quasi normale après 24 heures de traitement.

▶ Activité réparatrice

Au niveau morphologique, le produit Easytattoo creme (P) réduit légèrement les effets de la brûlure UV favorisant la formation de foyers de cellules viables à même de favoriser la réparation de la zone lésée. Mais, le produit Easytattoo creme (P) ne montre pas d'activité sur la progression du bourgeon de croissance sur les bords de la lésion.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une légère activité protectrice.

Après trois jours de traitement, le produit Easytattoo creme (P) augmente l'expression de la fibronectine pour favoriser la réparation de la zone brûlée et favorise un retour à la normale après 9 jours de traitement.

Après trois jours de traitement, le produit Easytattoo creme (P) augmente assez nettement l'expression de l'intégrine $\beta 4$ pour favoriser la réparation de la zone brûlée. Cette augmentation est plus mesurée après neuf jours.

Le produit Easytattoo creme (P) présente une activité réparatrice importante qui s'exprime dès 3 jours de traitement, permettant une réparation plus rapide de la zone lésée.