

⑲ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

⑪ N° de publication : **2 834 639**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

⑫ N° d'enregistrement national : **02 07472**

⑮ Int Cl⁷ : **A 61 K 31/352**, A 61 K 7/48, A 61 P 17/02 // (A 61 K
31/352, 35:78)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑳ Date de dépôt : 18.06.02.

㉑ Priorité : 11.01.02 FR 00200342.

㉒ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 18.07.03 Bulletin 03/29.

㉓ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

㉔ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

㉕ Demandeur(s) : *LABORATOIRE MEDIX Société ano-
nyme — FR.*

㉖ Inventeur(s) : CHARAGNAC JEAN LUC.

㉗ Titulaire(s) :

㉘ Mandataire(s) : REGIMBEAU.

㉙ **COMPOSITION COMPRENANT EN ASSOCIATION AU MOINS UN FLAVONOÏDE ET AU MOINS UNE HUILE
VÉGÉTALE, SON UTILISATION COMME AGENT DERMATOLOGIQUE OU DERMATOCOSMÉTIQUE.**

㉚ La présente invention concerne une composition com-
prenant en association : au moins un flavonoïde et au moins
une huile végétale. L'invention a également pour objet une
telle composition pour son utilisation comme agent derma-
tologique ou dermato-cosmétique, notamment comme
agent anti-inflammatoire et comme agent régénérateur du
tissu épidermique et dermique, ou encore pour son utiliza-
tion dans la prévention ou le traitement des oedèmes, des
escarres, ou des troubles de la micro-circulation cutanée,
ou encore dans le traitement des radiodermites.

FR 2 834 639 - A1



La présente invention concerne une nouvelle composition comprenant en
5 association au moins un flavonoïde et au moins une huile végétale riche en acide
linoléique et/ou en acide alpha-linolénique. L'invention a également pour objet une
telle composition pour son utilisation comme agent dermatologique ou dermato-
cosmétique, notamment comme agent anti-inflammatoire et comme agent régénérateur
10 du tissu épidermique et dermique, ou encore pour son utilisation dans la prévention ou
le traitement des oedèmes, des escarres, ou des troubles de la micro-circulation
cutanée, ou encore dans le traitement des radiodermites.

De nombreuses compositions pour la peau, à base de corps peroxydés tels que
des huiles peroxydées, ont été utilisées dans l'art antérieur, notamment pour faciliter la
restructuration cellulaire de la peau du visage ou du corps, ou traiter la condition
15 inflammatoire liée aux peaux sèches (FR 2 591 104), ou encore pour préserver et
améliorer l'état de la peau, en prévenant par exemple les troubles de la micro-
circulation (FR 2 750 331).

La demanderesse a découvert de manière surprenante que l'association des
deux composés suivants : un bioflavonoïde, tel que la troxérutine, ainsi qu'une huile
20 végétale riche en acide linoléique et/ou en acide alpha-linolénique, dans des
compositions pour la peau, telles que des compositions dermatologiques ou dermato-
cosmétiques, permettait de traiter divers troubles et affections cutanés, et ceci de
manière beaucoup plus efficace que les compositions à base de composés peroxydés
utilisées jusqu'à présent.

25 Il a ainsi été découvert que l'association des deux composés selon la présente
invention présentaient divers avantages, par rapport à l'utilisation d'une huile
peroxygénée dans une composition pour application cutanée, tels qu'une amélioration
de la dynamique micro-circulatoire, une réduction de la dilatation capillaire induite et
de l'œdème interstitiel secondaire, une augmentation de l'épaisseur de la couche
30 cornée compacte, une modulation positive sur la protection des protéines de structure
de l'épithélium, une augmentation des lipides totaux, ainsi qu'une stimulation de la
prolifération épithéliale.

En outre, les flavonoïdes ainsi que les huiles végétales s'avèrent être des composés, cosmétiquement, pharmaceutiquement et dermatologiquement acceptables, non agressifs, ni toxiques, ni irritants pour la peau, hypoallergéniques, apaisants, hydratants et anti-inflammatoires pour la peau. De plus, ces composés sont disponibles
5 commercialement.

Ainsi, la demanderesse a montré que les actifs suivants : flavonoïde et huile végétale, auxquels peut être ajouté un autre composé tel qu'un extrait peptidique de lupin, pouvaient être utilisés en association dans des compositions pharmaceutiques, dermatologiques ou dermato-cosmétiques, notamment en tant qu'agents anti-
10 inflammatoires, en tant qu'agents régénérateurs du tissu épidermique et dermique, dans la prévention ou le traitement des oedèmes, des escarres, ou des troubles de la micro-circulation cutanée, ou encore dans le traitement des radiodermites.

La présente invention a ainsi pour objet une composition comprenant en
15 association :

(a) au moins un flavonoïde, et

(b) au moins une huile végétale contenant au moins 20% en poids d'acide linoléique et/ou au moins 10% en poids d'acide alpha-linolénique, par rapport aux acides gras
20 totaux de l'huile.

Les acides linoléiques (C18:2) sont des acides gras de la famille n-6, et les acides alpha-linolénique (C18:3) sont des acides gras de la famille n-3.

L'huile végétale (b) selon la présente invention est une huile riche en acide linoléique et/ou en acide alpha-linolénique.

Par le terme d'"huile riche en acide linoléique", on entend au sens de la présente invention, les huiles contenant au moins 20% en poids, de préférence de 20 à 50% en poids, d'acide linoléique par rapport aux acides gras totaux de l'huile. A titre d'exemple d'huile riche en acide linoléique, on peut citer l'huile de tournesol ou l'huile de pépins de raisin.
25

Par le terme d'"huile riche en acide alpha-linolénique", on entend au sens de la présente invention, les huiles contenant au moins 10% en poids, de préférence de 10 à 40% en poids, d'acide alpha-linolénique par rapport aux acides gras totaux de l'huile.
30

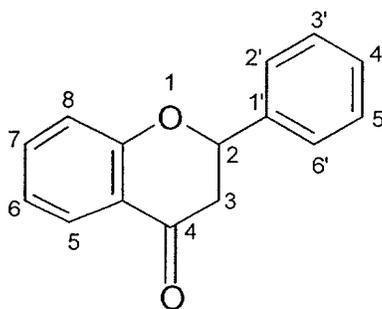
A titre d'exemple d'huile riche en acide alpha-linolénique, on peut citer l'huile de chia, l'huile de lin et l'huile de Rosier Muscat.

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, l'huile végétale (b) contient de 30 à 50% en poids d'acide linoléique et/ou de 25 à 40% en poids d'acide alpha-linolénique.

Avantageusement selon la présente invention, l'huile végétale (b) est l'huile de Rosier Muscat. Cette huile peut présenter une teneur en acide linoléique d'environ 30 à 50% en poids, et une teneur en acide alpha-linolénique d'environ 25 à 40% en poids. L'huile de Rosier Muscat peut être extraite des graines du fruit du rosier, avantageusement selon le procédé consistant à extraire l'huile par pression à froid.

Les flavonoïdes, encore connus sous le nom de bioflavonoïdes, sont des polyphénols comportant un squelette de base à 15 atomes de carbone résultant de la fusion de deux unités aromatiques, dont l'une dérive du benzène et l'autre du phénylpropane.

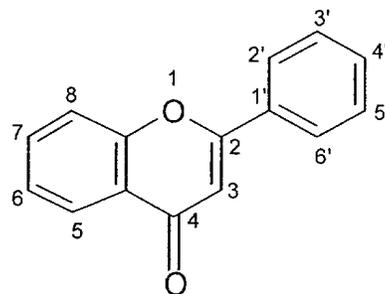
Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, le flavonoïde (a) est une flavanone, de formule générale (I) :



(I)

20

Dans un autre mode de réalisation particulier de la présente invention, le flavonoïde (a) est une flavone, de formule générale (II) :



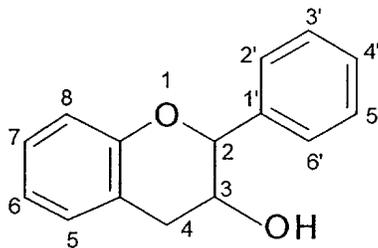
(II)

Les flavones ou flavanones utilisables selon la présente invention sont obtenues par synthèse chimique ou sont des substances naturelles extraites de produits naturels, notamment à partir de végétaux. Les flavonoïdes (a) selon la présente invention peuvent être sous forme aglycone ou sous forme glycosylée. Les formes glycosylées des flavonoïdes selon la présente invention, qui sont les formes les plus abondantes dans la nature, peuvent comporter un ou plusieurs oses, pouvant notamment être le rutinose, le mannose, le rhamnose, le glucose, etc. Avantagement selon la présente invention, lorsque les flavonoïdes (a) sont sous forme glycolysée, ils sont substitués par un groupe O-rutinose, de préférence en position 3 ou 7.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le flavonoïde (a) est une flavanone, ledit flavonoïde est choisi dans le groupe constitué par la naringénine, la naringine, l'hespérétine, et l'hesperidine.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le flavonoïde (a) est une flavone, ledit flavonoïde est choisi dans le groupe constitué par la rutine, la troxérutine, la diosmine, la diosmétine, la chrysine, la quercétine et la lutéoline.

Le flavonoïde (a) selon la présente invention peut également être un flavanol qui correspond à une flavone substituée en position 3 par un groupe hydroxy, ou un dihydroflavonol qui correspond à une flavanone substituée en position 3 par un groupe hydroxy. Le flavonoïde (a) peut également être un flavanol qui répond à la formule générale (III) suivante, ou encore un flavandiol (leucoanthocyanidine) qui correspond à un flavanol substitué en position 4 par un groupe hydroxy.



(III)

La cathéchine ou la leucocyanidine peuvent ainsi être notamment utilisés en tant que flavonoïde (a) selon la présente invention.

5 Le flavonoïde (a) selon la présente invention peut également être un biflavonoïde, ou encore un isoflavonoïde, tel qu'une isoflavone ou une isoflavanone. Les isoflavanones et les isoflavones correspondent respectivement aux flavanones (I) et flavones (II), mais dont le groupe phényle, numéroté de 1' à 6' sur les formules (I) et (II) ci-dessus, est substitué en position 3, au lieu d'être substitué en position 2.

10 Avantageusement selon la présente invention, le flavonoïde (a) et l'huile végétale (b) constituent les seuls principes actifs de la composition.

Avantageusement selon la présente invention, la composition contient en outre : (c) au moins un extrait peptidique de lupin. Les extraits peptidiques de lupin (c) selon la présente invention peuvent être extraits de diverses variétés du lupin (lupinus). De manière avantageuse selon la présente invention, les extraits (c) sont issus du lupin blanc doux (lupinus albus), de genre européen, de préférence la variété Arès de faible teneur en alcaloïdes.

20 De façon générale, l'invention comprend les farines de lupin lipidées, ou encore les extraits peptidiques comprenant encore les sucres.

Avantageusement selon la présente invention, l'extrait peptidique de lupin (c) comprend des peptides glutaminés de faible poids moléculaire et des oligosaccharides.

25 De manière avantageuse selon la présente invention, l'extrait peptidique de lupin (c) est obtenu par hydrolyse de la fraction protéique de lupin, qui contient majoritairement des acides aminés, des peptides et des protéines. L'hydrolyse peut être effectuée par n'importe quel moyen approprié, notamment une hydrolyse enzymatique, acide ou basique. Avantageusement selon la présente invention, lorsque l'extrait peptidique de lupin (c) est hydrolysé, ledit extrait, sous forme de solution aqueuse,

contient 45 à 55 g/l de matières sèches, 24 à 32 g/l de protéines et 8 à 14 g/l de sucres totaux (sucres simples et oligosaccharides). Un extrait peptidique de lupin (c) selon la présente invention peut être disponible commercialement auprès de Silab (Structurine).

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, l'extrait peptidique de lupin (c) peut être obtenu selon le procédé comprenant les étapes suivantes :

- préparation d'un tourteau de lupin délipidé et broyé ou d'une farine de lupin (lipidée) micronisée,
- extraction des fractions protéiques et osiques solubles ou précipitation à pH acide (4 ou 5) selon le point isoélectrique,
- éventuellement séparation de la fraction protéique,
- éventuellement hydrolyse de la fraction protéique et récupération, éventuellement après filtration, de l'extrait protéique.

De préférence, l'extrait protéique présente la composition en acides aminés suivante (les concentrations données ci-dessous peuvent varier de plus ou moins 50 %):

| | |
|---------------------|---------------|
| Aspartique | 5.0 g / 100 g |
| Thréonine | 2.1 g / 100 g |
| Sérine | 2.8 g / 100 g |
| 20 Acide Glutamique | 9.8 g / 100 g |
| Glycine | 2 g / 100 g |
| Alanine | 2.1 g / 100 g |
| Valine | 1.8 g / 100 g |
| Cystine | 0.4 g / 100 g |
| 25 Méthionine | 0.1 g / 100 g |
| Isoleucine | 1.9 g / 100 g |
| Leucine | 3.6 g / 100 g |
| Tyrosine | 1.9 g / 100 g |
| Phénylalanine | 1.9 g / 100 g |
| 30 Ornithine | 0.1 g / 100 g |
| Lysine | 2 g / 100 g |
| Histidine | 1.1 g / 100 g |

| | |
|----------|---------------|
| Arginine | 5 g / 100 g |
| Proline | 1.9 g / 100 g |

Avantageusement selon la présente invention, le flavonoïde (a) est présent à
5 une concentration comprise entre 0,1 et 20 %, de manière encore plus avantageuse
entre 1 et 10 %, par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement selon la présente invention, l'huile végétale (b) est présente à
une concentration comprise entre 10 et 60 %, de manière encore plus avantageuse
entre 20 et 40 %, par rapport au poids total de la composition.

10 Avantageusement selon la présente invention, l'extrait peptidique de lupin (c),
lorsqu'il est présent dans la composition selon la présente invention, est présent à une
concentration comprise entre 0,1 et 20 %, avantageusement entre 1 et 10 %, par
rapport au poids total de la composition.

15 Les compositions selon la présente invention peuvent être des compositions
pharmaceutiques, dermatologiques ou dermo-cosmétiques. Les compositions selon la
présente invention peuvent par ailleurs contenir des véhicules et excipients
cosmétologiquement et/ou pharmaceutiquement acceptables, ainsi que des additifs
cosmétologiques conventionnels, connus de l'homme du métier.

20 Avantageusement, les compositions selon la présente invention sont formulées
pour être administrée par voie topique externe, par exemple sous forme de crème
blanche ou colorée, de pommade, de lait, de lotion, d'onguent, de sérum, de pâte, de
mousse, ou d'aérosol.

De manière encore plus avantageuse selon la présente invention, les
25 compositions se présentent sous forme d'une émulsion. En particulier, les compositions
contiennent en outre un polymère émulsifiant de type Pemulen. De manière encore
plus avantageuse, les compositions selon la présente invention sont conditionnées sous
forme de spray.

Les Pemulen sont des polymères de haut poids moléculaire à longue portion
30 hydrophile et à plus courte portion lipophile. Leur structure chimique leur permet de
jouer efficacement le rôle d'émulsifiant dans les émulsions huile-dans-eau. La partie
lipophile adsorbe à l'interface huile-eau, et la partie hydrophile gonfle dans la phase

aqueuse pour former des émulsions d'une grande stabilité avec une large gamme d'huiles.

Les émulsions réalisées avec de faibles quantités de Pemulen sont très stables. Entourées par un gel aqueux à seuil d'écoulement élevé, les gouttelettes d'huile sont protégées et maintenues en suspension. En formant des émulsions huile-dans-eau (H/E), les molécules de Pemulen forment une couche de gel adsorbé autour de chaque gouttelette d'huile, la partie lipophile du polymère étant fixée dans la phase huileuse. Ainsi, quand deux gouttelettes s'approchent l'une de l'autre, une force de répulsion est engendrée par la présence de ces couches de gel adsorbé.

Les Pemulen sont ainsi avantageusement utilisés dans le cadre de la présente invention, car ils surmontent de nombreux inconvénients rencontrés dans les émulsions classiques. Ils éliminent ainsi l'irritation potentielle pouvant être associée aux surfactants, de faibles quantités de surfactants pouvant toutefois être ajoutées pour optimiser certaines caractéristiques de l'émulsion. A l'application, une couche homogène d'huile se forme immédiatement sur la peau. Ce film ne contient aucun résidu de surfactant et résiste à l'immersion dans l'eau.

Ces polymères Pemulen présentent également divers autres avantages sur les émulsifiants conventionnels : ils sont efficaces à très faible concentration (0,1% à 0,5%), permettant ainsi de réduire les coûts de formulation ; ils émulsifient toute huile, et ce, même à température ambiante ; ils émulsifient les cires, pour peu qu'elles soient fondues pendant la préparation ; des émulsions stables peuvent être réalisées avec des surfactants qui seront employés en faibles quantités afin d'optimiser la taille des gouttelettes d'huile et apporter une émollience ou un étalement supplémentaire, ou encore d'autres propriétés esthétiques ; ils possèdent une excellente stabilité à long terme (sur plus de deux ans) ; le relargage de la phase huileuse peut être déclenché lors d'un contact avec des surfaces contenant des électrolytes.

La présente invention a également pour objet les compositions décrites ci-dessus pour leur utilisation comme agents dermatologiques ou dermato-cosmétiques.

30

La présente invention a également pour objet les compositions décrites ci-dessus pour leur utilisation comme agents anti-inflammatoires ou comme agent

régénérateurs du tissu épidermique et dermique, permettant ainsi d'augmenter le renouvellement cellulaire de l'épiderme.

La présente invention a également pour objet les compositions décrites ci-dessus pour leur utilisation dans la prévention ou le traitement des oedèmes, des escarres, des troubles de la micro-circulation cutanée, ou des ulcères.

La présente invention a également pour objet les compositions décrites ci-dessus pour leur utilisation dans le traitement des radiodermites. Les radiodermites se caractérisent notamment par des troubles de la micro-circulation cutanée et de la régénération de l'épithélium.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer l'invention sans aucunement en limiter la portée. A moins qu'il n'en soit précisé autrement, les pourcentages indiqués dans les exemples suivants sont des pourcentages en poids. Dans les exemples suivants, l'huile de rosier muscat a été extraite de graines de rosier par pression à froid et l'extrait peptidique de lupin a été fourni par Silab (Structurine).

15

Exemples de compositions selon la présente invention :

Exemple 1 : Composition contenant de la Troxérutine (a), de l'huile de Rosier Muscat (b) et un extrait peptidique de lupin (c)

20

| Phases | Matières premières | % |
|--------------|---|------------|
| Aqueuse | Eau purifiée | 55,55 |
| | Mélange conservateurs | 0,8 |
| | Pemulen TR2 NF | 0,2 |
| | Carbopol 981 NF | 0,05 |
| | NaOH (10% m/m) | 0,8 |
| | Extrait peptidique de lupin (Structurine) | 7 |
| | Troxérutine | 5 |
| Grasse | Huile de Rosier Muscat | 30 |
| | Mélange conservateurs | 0,2 |
| | EDTA di Na (Dissolvine Na 2P) | 0,1 |
| | Arôme yerbatone | 0,3 |
| TOTAL | | 100 |

Composition mélange conservateurs : Phenoxyéthanol 73,3 %

| | |
|-------------|--------|
| PHB Méthyle | 20,0 % |
| PHB Propyle | 6,7 % |

Exemple 2 : Composition contenant de la Troxérutine (a) et de l'huile de Rosier Muscat

5 (b)

| Phases | Matières premières | % |
|--------------|----------------------------------|------------|
| Aqueuse | Eau purifiée | 62,55 |
| | Mélange conservateurs | 0,8 |
| | Pemulen TR2 NF | 0,2 |
| | Carbopol 981 NF | 0,05 |
| | NaOH (10% m/m) | 0,8 |
| | Troxérutine | 5 |
| Grasse | Huile de Rosier Muscat | 30 |
| | Mélange conservateurs | 0,2 |
| | EDTA di Na (Dissolvine Na 2P) | 0,1 |
| | Arôme yerbatone | 0,3 |
| TOTAL | | 100 |

| | | |
|-------------------------------------|----------------|--------|
| Composition mélange conservateurs : | Phenoxyéthanol | 73,3 % |
| | PHB Méthyle | 20,0 % |
| | PHB Propyle | 6,7 % |

10

Exemple 3 : Composition contenant de la Troxérutine (a) et de l'huile de Rosier Muscat

(b)

| Phases | Matières premières | % |
|--------------------|--------------------------------|------------|
| Aqueuse | Eau purifiée | 62,2 |
| | Mélange conservateurs | 0,8 |
| | Pemulen TR2 NF | 0,2 |
| | Carbopol 981 NF | 0,05 |
| | EDTA di Na (Dissolvine NA 2 P) | 0,1 |
| | Troxérutine | 5 |
| Grasse | Huile de Rosier Muscat | 30 |
| | Mélange conservateurs | 0,2 |
| | Butylhydroxyanisole (BHA) | 0,015 |
| | Butylhydroxytoluène (BHT) | 0,03 |
| | DL alpha tocophéryle acétate | 0,3 |
| | Arôme yerbatone | 0,3 |
| Après émulsionnage | NaOH (Solution à 10 % m/m) | 0,8 |
| TOTAL | | 100 |

Evaluation des modifications trophiques et hémodynamiques induites par l'application de compositions selon la présente invention sur un modèle expérimental de peau humaine maintenue en survie

- 5 L'objet de cette étude est d'évaluer l'action de compositions selon la présente invention sur un modèle expérimental de peau humaine maintenue en survie. Les compositions utilisées sont celles des exemples 1 et 2, qui se présentent sous la forme d'une émulsion pour application cutanée. Ces compositions seront désignées respectivement ci-après par les terme M109/1 (exemple 1) et M109/2 (exemple 2).
- 10 L'action des produits M109/1 et M109/2 d'une part sur les protéines de structure et les lipides épidermiques, et d'autre part sur le tonus vasculaire entraînant une diminution des oedèmes par réduction de la perméabilité capillaire et permettant ainsi de concourir à la prévention de la survenue d'escarres a ainsi été évaluée.

15 **1. Modèle expérimental**

Le premier modèle expérimental sur peau humaine maintenue en survie a permis d'altérer les qualités protectrices de l'épithélium telles qu'elles se présentent au stade initial de l'escarre (stade 1), et de montrer l'action des produits M109/1 et M109/2. Pour ce faire, un modèle d'altération du stratum corneum par application d'acétone a été utilisé. L'étude a été effectuée en analysant la modulation de la transglutaminase de type 1 (témoignant de la différenciation terminale), de la qualité du stratum corneum et du taux de lipides épidermiques. Les lipides jouent un rôle essentiel dans la rétention d'eau et la limitation de l'évaporation d'eau, ainsi que dans le maintien des NMF à l'intérieur des cornéocytes. La modulation de la transglutaminase de type I témoigne d'une bonne différenciation épithéliale. Ces résultats ont été corrélés à l'analyse histologique du stratum corneum (SC) et plus particulièrement des zones SC compactum.

20

25

Le second protocole a fait appel à un modèle expérimental de vasodilatation sur peau humaine maintenue en survie en utilisant comme neuromédiateur la substance P (SP) qui est un puissant agent vasodilatateur cutané. L'évaluation de l'effet a été histologique avec évaluation du calibre des capillaires

30

Enfin, la modulation de la prolifération cellulaire a été également évaluée par analyse immunohistochimique de la protéine Ki67 (témoin des cellules en phase de prolifération).

5 **2. Matériel et méthodes**

2.1. Maintien en survie de peau humaine

Les cultures d'organe (6 donneurs différents) ont été réalisées à partir de fragments de peau issus d'opérations de chirurgie plastique. Les fragments de peau ont été placés dans des inserts eux-mêmes positionnés sur des puits de culture. Le milieu de culture (antibiotiques, SVF) a été ajouté dans le fond des puits, un passage s'effectuant par diffusion lente entre les deux compartiments par l'intermédiaire d'une membrane poreuse (12 μm). Deux séries de peaux ont été maintenues en survie, l'une pour une étude au niveau épidermique, l'autre pour une étude au niveau dermique.

15 **2.2. Modèle expérimental pour l'évaluation des protéines de structure, des lipides épidermiques, du stratum corneum, et de l'augmentation du tonus vasculaire**

Le complexe de 2 produits (lots M109/1 et M109/2) a été appliqué en surface une fois par jour pendant 48 heures. Les fragments de peau ont été soumis à l'action d'un neuromédiateur pour l'analyse du tonus vasculaire : la substance P (5 μM), qui a été ajoutée dans le milieu de culture pendant 24 heures supplémentaires. Enfin, le dernier jour de culture, les fragments de peau ont été également soumis à une déshydratation afin d'altérer la fonction barrière en appliquant de l'acétone à la surface de la peau pendant 15 minutes. Les comparaisons suivantes ont été réalisées :

- peau témoin,
- 25 - peau déshydratée et soumise à l'action de la substance P,
- peau déshydratée, soumise à l'action de la substance P et traitée par le complexe M109/1,
- Peau déshydratée, soumise à l'action de la substance P et traitée par le complexe M109/2.

30 Les peaux maintenues en survie ont été stoppées à J3 (au bout de 3 jours) pour des analyses histologiques (après fixation dans le liquide de Bouin et inclusion en paraffine) et des dosages de lipides.

3. Analyses

3.1. Analyse immunohistochimique de la transglutaminase de type 1

A partir des fragments inclus en paraffine, il est possible de détecter par immunohistochimie un marqueur de différenciation terminale tel que la transglutaminase de type I (anticorps BT 621, Clinisciences). L'immunodétection est réalisée à l'aide d'une technique d'immunoperoxydase indirecte en 3 couches (kit ABC Peroxydase, Vector Laboratories) et révélée en DAB (Diaminobenzidine). L'intensité du marquage immunohistochimique de la transglutaminase de type 1 a été évaluée à l'aide de différents scores histologiques semi-quantitatifs :

Score 1 : + intensité faible

Score 2 : + à ++ intensité légèrement augmentée

Score 3 : ++ intensité modérée

Score 4 : ++ à +++ : intensité importante

15

3.2. Analyse histologique de l'épaisseur de la couche cornée

L'épaisseur de la couche cornée a également été mesurée sur les coupes histologiques. Le nombre de secteurs de stratum corneum de type compactum a été comptabilisé (10 champs à l'objectif x 40). Une analyse morphométrique de l'épaisseur de ce stratum compactum a été réalisée (μm).

20

3.3. Dosage des lipides

Les lipides du sébum (esters de cholestérol, squalènes, triglycérides et diglycérides) et du stratum corneum (acides gras libres, cholestérol et lipides divers dont les céramides de type I à VI, glycérol, monoglycérides) ont été obtenus par extraction directe à l'aide d'un solvant type chloroforme/méthanol (2/1). Ils ont été séparés par chromatographie sur couche mince. La taille de spots correspondant à chaque classe de lipide a été mesurée par densitométrie (scanner). Les résultats sont exprimés en % de chacune des classes de lipides par rapport à la quantité totale de lipide en séparant les lipides du sébum et du stratum corneum. La quantité totale de lipides par peau a également été évaluée.

30

3.4. Analyse histologique de la vasoconstriction

Après coloration par l'hémalun-éosine, la dilatation vasculaire a été évaluée par un comptage du nombre de vaisseaux dilatés sur l'ensemble de la coupe histologique (16 champs au grossissement 40). Ce nombre a été rapporté au nombre total de vaisseaux afin de calculer le pourcentage de vaisseaux dilatés. Par ailleurs, une analyse morphométrique de la surface (μm^2) occupée par la lumière des vaisseaux a été réalisée afin de déterminer la surface moyenne (μm^2) occupée par les vaisseaux.

3.5. Evaluation de la prolifération cellulaire par immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-Ki67

La prolifération épithéliale a été analysée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (marqueur des cellules en phases M, S, G1 et G2 du cycle cellulaire). L'immunodétection a été réalisée à l'aide d'une technique d'immunoperoxydase indirecte en 3 couches, amplifiée (kit DAKO) et révélée en AEC. Le nombre de cellules marquées est évalué par rapport à un total de 200 à 400 cellules. Le pourcentage de cellules en cours de prolifération au niveau de la couche basale a ainsi été calculé.

3.6. Statistiques

L'analyse statistique sera effectuée par le test de Student dit de l'écart réduit ou test des échantillons appariés, avec un risque alpha de 5 %.

4. Résultats

4.1. Evaluation de la transglutaminase de type 1

Les résultats de l'évaluation immunohistochimique de la transglutaminase de type 1 (intensité de l'immunomarquage à l'aide de scores semi-quantitatifs) sont exposés dans le tableau I.

Tableau I :

| | |
|--------------------------------|-------------|
| Peau témoin | 2,25 ± 1 |
| Peau + acétone | 1,66 ± 1 |
| Peau + acétone + M109/1 | 3,3 ± 0,5 # |
| Peau + acétone + M109/2 | 2,8 ± 0,7 # |

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

- 5 Ainsi, l'application d'acétone sur le modèle expérimental tend à diminuer l'intensité de cet immunomarquage. Le traitement préventif de ces peaux par les produits M109/1 et M109/2 a permis d'augmenter l'intensité de cet immunomarquage à un niveau statistiquement différent de celui de la peau déshydratée ($p < 0,05$). Ces produits permettent donc d'améliorer la différenciation terminale de l'épithélium, avec une
- 10 légère supériorité de M109/1 par rapport à M109/2, mais sans significativité.

4.2. Evaluation de l'épaisseur du stratum corneum compactum

- Les résultats concernant le stratum corneum sont exposés dans les tableaux II et III. La moyenne de l'épaisseur du stratum corneum compactum est ainsi présentée dans le
- 15 tableau II, alors que le pourcentage de stratum corneum compactum par coupe analysée est présenté dans le tableau III.

Tableau II : Moyenne de l'épaisseur du stratum corneum compactum (hemalun-éosine, en μm) :

20

| | |
|--------------------------------|---------------|
| Peau témoin | 10,7 ± 3 |
| Peau + acétone | 4 ± 1,65* |
| Peau + acétone + M109/1 | 8,5 ± 3,6 # |
| Peau + acétone + M109/2 | 7,65 ± 1,9 *# |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

5 Tableau III : Pourcentage de stratum corneum compactum par coupe analysée (10 champs examinés à l'objectif x 40, hemalun-éosine) :

| | |
|--------------------------------|------------------------|
| Peau témoin | 69,55 ± 1,73 |
| Peau + acétone | 33,13 ± 14,6* |
| Peau + acétone + M109/1 | 49,9 ± 12,2*# |
| Peau + acétone + M109/2 | 49,16 ± 13,35*# |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

10

La déshydratation par l'acétone a permis d'obtenir une diminution significative du stratum corneum de type compactum ($p < 0,05$). L'application des produits M109/1 et M109/2 montre une augmentation significative des secteurs de stratum corneum compactum et de son épaisseur ($p < 0,05$). Leur efficacité est pratiquement identique sur

15

ce paramètre.

4.3 Dosage des lipides

20 Les résultats concernant le dosage des lipides sont exposés dans les tableaux IV, V et VI. Le dosage des lipides totaux est ainsi présenté dans le tableau IV, le dosage des lipides du sébum est quant à lui présenté dans le tableau V, alors que le dosage des lipides intercellulaires du stratum corneum est présenté dans le tableau VI.

25 Tableau IV : Dosage des lipides totaux (surface des pics) :

| | moyenne ± SD |
|-------------|------------------------|
| Peau témoin | 10 604,5 ± 4239 |

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| Peau + acétone | 6579,2 ± 2748* |
| Peau + acétone + M109/1 | 14 035,3 ± 3637*# |
| Peau + acétone + M109/2 | 14 344,5 ± 5289 # |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

5 Tableau V : Dosage des lipides du sébum (moyenne ± ET (%)) :

| | diglycérides | triglycérides | squalènes | Ester de cholestérol |
|-----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|
| Peau témoin | 1 ± 0,2 | 27,2 ± 16 | 30,75 ± 10,5 | 0,35 ± 0,3 |
| Peau + acétone | 1,16 ± 0,6 | 31 ± 20,5 | 27,7 ± 8,8 | 0,55 ± 0,6 |
| Peau + acétone + M109/1 | 1,9 ± 0,8* | 47 ± 21* | 20,54 ± 6,8 | 0,47 ± 0,3 |
| Peau + acétone + M109/2 | 1,7 ± 0,84 | 52,56 ± 20* | 19,35 ± 7,2* | 0,42 ± 0,24 |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

10 Tableau VI : Dosage des lipides intercellulaires du stratum corneum (moyenne ± ET (%)):

| | cholestérol | Lipides divers, céramides | Acides gras libres |
|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------------|
| Peau témoin | 19,5 ± 4,4 | 11,4 ± 3 | 8,4 ± 10,5 |
| Peau + acétone | 23,35 ± 7 | 8 ± 3,25 | 11,9 ± 14,7 |
| Peau + acétone + M109/1 | 12,6 ± 4,4*# | 9,3 ± 1,1 | 8 ± 10,2 |
| Peau + acétone + M109/2 | 8,9 ± 3,5*# | 10,7 ± 5,6 | 11,2 ± 18 |

Lipides divers : céramides de type I à VI, glycérol, monoglycérides...

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

5 Une diminution statistiquement significative des lipides totaux, après application d'acétone, peut ainsi être observée dans le tableau IV ($p < 0,05$). L'application préventive des produits M109/1 et M109/2 induit une augmentation significative des lipides de façon similaire ($p < 0,05$).

10 En ce qui concerne les lipides du sébum (Tableau V), le traitement préventif par le produit M109/1 permet d'observer une augmentation significative des diglycérides et des triglycérides de façon significative par rapport aux peaux témoins ($p < 0,05$). Le traitement préventif par le produit M109/2 permet quant à lui d'observer une augmentation de squalènes et des triglycérides de façon significative par rapport aux peaux témoins ($p < 0,05$).

15 En ce qui concerne les lipides du stratum corneum (Tableau VI), l'application préventive des produits M109/1 et M109/2 n'implique pas de modification du pourcentage des lipides divers, dont les céramides. Un procédé de calcul différent a permis d'exprimer les résultats en ng de lipides divers/mg d'épiderme. Les résultats suivants ont été obtenus :

- peaux témoins : $4121,4 \pm 1903$ ng/mg
- 20 - peaux + acétone : 2992 ± 1368 ng/mg
- peaux + acétone + M109/1 : $3721,5 \pm 1304,8$ ng/mg
- peaux + acétone + M109/2 : $5379,45 \pm 1635$ ng/mg (résultat significativement différent des peaux témoins, des peaux + acétone et des peaux + acétone + M109/1).

En outre, l'application du produit M109 n'a pas modifié le taux d'acides gras libres.

25 Dans le modèle expérimental, le pourcentage de cholestérol est significativement diminué après application des produits M109/1 et M109/2 ($p < 0,05$), que ce soit par rapport aux peaux témoins ou par rapport aux peaux déshydratées par l'acétone.

4.4. Evaluation de la modulation vasculaire

30 a) Evaluation du pourcentage global de capillaires dilatés

Les résultats concernant le pourcentage global de capillaires dilatés sont exposés dans le tableau VII.

Tableau VII : Evaluation histologique du calibre des capillaires dermiques (hemalun-
éosine), % de vaisseaux dilatés :

| | % |
|--------------------|---------------|
| Peau témoin | 58,25 ± 8,4 |
| Peau + SP | 88,9 ± 6,2* |
| Peau + SP + M109/1 | 43 ± 10,2 # |
| Peau + SP + M109/2 | 54,45 ± 9,3 # |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

5 # : différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par la substance P (test apparié de Student, $p < 0,05$)

L'application de substance P induit une vasodilatation statistiquement significative par rapport à la peau témoin ($p < 0,05$). Après application des produits M109/1 et M109/2,
10 le pourcentage de capillaires dilatés est significativement diminué, par rapport aux peaux traitées par l'acétone ($p < 0,05$). Le produit M109/1 montre une supériorité d'action par rapport au produit M109/2, mais pas de façon significative.

b) Mesure de la surface moyenne des capillaires

15 Les résultats concernant la mesure de la surface moyenne des capillaires sont exposés dans le Tableau VIII.

Tableau VIII : Mesure de la surface des capillaires dilatés :

| | Surface en μm^2 |
|--------------------|----------------------------|
| Peau témoin | 73,84 ± 44,6 |
| Peau + SP | 155,2 ± 31,2* |
| Peau + SP + M109/1 | 43,7 ± 12,35 # |
| Peau + SP + M109/2 | 54,4 ± 9,1 # |

20 * : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

L'application de substance P induit une augmentation statistiquement significative de la surface moyenne des capillaires par rapport à la peau témoin ($p < 0,05$). Après l'application des produits M109/1 et M109/2 permet de diminuer la surface moyenne des capillaires par rapport aux peaux traitées par l'acétone ($p < 0,05$). Là encore, le produit M109/2 montre une supériorité d'action par rapport au produit M109/1, mais pas de façon significative.

10

4.5 Evaluation de l'activité mitotique

Les résultats concernant l'évaluation de la prolifération épithéliale analysée par immunohistochimie sont exposés dans le tableau IX.

15 Tableau IX: Analyse de la prolifération après immunomarquage à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 (% de cellules basales positives) :

| | |
|-------------------------------------|-----------------------|
| Peau témoin | 6,3 ± 4,3 |
| Peau + SP + acétone | 5,7 ± 4,4 |
| Peau + SP + acétone + M109/1 | 8,2 ± 4,75 # |
| Peau + SP + acétone + M109/2 | 11,74 ± 8,1* # |

* : différence statistiquement significative par rapport à la peau témoin (test apparié de Student, $p < 0,05$)

: différence statistiquement significative par rapport à la peau traitée par l'acétone (test apparié de Student, $p < 0,05$)

20

La prolifération épithéliale analysée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-Ki67 n'est pas modifiée dans le modèle expérimental (application de substance P, puis d'acétone) : il n'y a pas de différence significative entre les peaux témoins et les peaux expérimentales.

25

En revanche, la prolifération est augmentée de façon statistiquement significative après application des produits M109/1 et M109/2 par rapport aux peaux

expérimentales ($p < 0,05$). Là encore, le produit M109/2 montre une supériorité d'action par rapport au produit M109/1, mais pas de façon significative.

5. Conclusions

5 Le modèle expérimental de peau humaine déshydratée a permis de mettre en évidence une modulation positive des produits M109/1 et M109/2 sur la protection d'une protéine de structure de l'épithélium, la transglutaminase de type 1. En effet, l'application préventive de ces produits avant l'étape de déshydratation a permis d'améliorer la différenciation épithéliale. Ce résultat peut-être corrélé avec une
10 augmentation significative des secteurs de stratum corneum compactum et de son épaisseur.

La quantité de lipides totaux épidermiques est significativement augmentée après application des produits M109/1 et M109/2 dans ce modèle de peau déshydratée. En ce qui concerne les céramides, l'efficacité de M109/2 est significativement
15 supérieure à celle de M109/1.

Le modèle expérimental de vasodilatation par la substance P a permis de mettre en évidence une efficacité des produits M109/1 et M109/2 sur le tonus vasculaire.

Enfin, les produits M109/1 et M109/2 ont permis d'obtenir une modulation positive de la prolifération épithéliale, augmentée de façon significative par rapport
20 aux peaux expérimentales.

Ainsi, le produit M109/2 semble particulièrement efficace sur les paramètres céramides, vasodilatation et prolifération, tandis que le produit M109/1 semble particulièrement efficace en ce qui concerne la différenciation épithéliale.

REVENDICATIONS

- 5 1. Composition comprenant en association :
- (a) au moins un flavonoïde, et
- (b) au moins une huile végétale contenant au moins 20% en poids d'acide linoléique et/ou au moins 10% en poids d'acide alpha-linolénique.
- 10 2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'huile végétale (b) contient de 30 à 50% en poids d'acide linoléique et/ou de 25 à 40% en poids d'acide alpha-linolénique.
3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'huile végétale (b) est l'huile de Rosier Muscat.
- 15 4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le flavonoïde (a) est une flavanone, avantageusement choisie dans le groupe constitué par la naringénine, la naringine, l'hespérétine, et l'hespéridine.
5. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le flavonoïde (a) est une flavone, avantageusement choisie dans le groupe constitué par la rutine, la troxérutine, la diosmine, la diosmétine, la chrysine, la quercétine et la lutéoline.
- 20 6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le flavonoïde (a) et l'huile végétale (b) constituent les seuls principes actifs de la composition.
7. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre : (c) au moins un extrait peptidique de lupin.
- 25 8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'extrait peptidique de lupin (c) comprend des peptides glutaminés de faible poids moléculaire et des oligosaccharides.
9. Composition selon la revendication 7 ou 8, caractérisée en ce que l'extrait peptidique de lupin (c) est obtenu par hydrolyse de la fraction protéique de lupin.
- 30 10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le flavonoïde (a) est présent à une concentration comprise entre

0,1 et 20 %, avantageusement entre 1 et 10 %, par rapport au poids total de la composition.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'huile végétale (b) est présente à une concentration comprise
5 entre 10 et 60 %, avantageusement entre 20 et 40 %, par rapport au poids total de la composition.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications 7 à 11, caractérisée en ce que l'extrait peptidique de lupin (c) est présent à une concentration
10 comprise entre 0,1 et 20 %, avantageusement entre 1 et 10 %, par rapport au poids total de la composition.

13. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition est formulée pour être administrée par voie topique.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes,
15 caractérisée en ce que la composition se présente sous forme d'une émulsion.

15. Composition selon la revendication 14, caractérisée en ce que la composition contient en outre un polymère émulsifiant de type Pemulen.

16. Composition selon l'une quelconque des revendications 13 à 15, caractérisée en ce que la composition est conditionnée sous forme de spray.

17. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 pour son utilisation comme agent dermatologique ou dermato-cosmétique.
20

18. Composition selon la revendication 17 pour son utilisation comme agent anti-inflammatoire ou comme agent régénérateur du tissu épidermique et dermique.

19. Composition selon la revendication 17 pour son utilisation dans la
25 prévention ou le traitement des oedèmes, des escarres, des troubles de la micro-circulation cutanée, ou des ulcères.

20. Composition selon la revendication 17 pour son utilisation dans le traitement des radiodermites.

| DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS | | Revendication(s) concernée(s) | Classement attribué à l'invention par l'INPI |
|--|---|--|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | | |
| X | WO 02 02074 A (UNILEVER) 10 janvier 2002 (2002-01-10) * revendications 1,5 * * page 4 - page 5 * * page 8, ligne 1-8 * * page 57 - page 60 * * page 67, ligne 10-14 * * page 71, ligne 19-26 * | 1,2,4-6, 10,13, 14,16-18 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) |
| X | WO 01 08652 A (UNILEVER) 8 février 2001 (2001-02-08) * revendications 1,4,5,7,9 * * page 8, ligne 25 - page 9, ligne 10 * * page 9, ligne 33 - page 10, ligne 3 * * page 10, ligne 20-29 * | 1,2,4-6, 10,13, 14,16-18 | |
| X | WO 98 42309 A (W.T.CRANDALL) 1 octobre 1998 (1998-10-01) * revendications 1,10,11,15 * * page 8, ligne 14-23 * * page 9, ligne 2-4 * * page 11, ligne 21 - page 12, ligne 10 * * page 12, ligne 31 - page 13, ligne 6 * | 1,2,4,5, 13,16-18 | |
| X | FR 2 694 692 A (J.N.THOREL) 18 février 1994 (1994-02-18) * revendications 1,4,5 * * page 4 * * page 5, ligne 12-14 * | 1-3,10, 11,13, 14,17,18 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 31 octobre 2002 | | Peeters, J | |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS | | T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | | |

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0207472 FA 619871**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **31-10-2002**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | Membre(s) de la famille de brevet(s) | | Date de publication |
|---|---|------------------------|---|--|--|
| JP 8268830 | A | 15-10-1996 | AUCUN | | |
| JP 63174912 | A | 19-07-1988 | AUCUN | | |
| JP 63005036 | A | 11-01-1988 | AUCUN | | |
| WO 0202074 | A | 10-01-2002 | AU WO | 7968701 A 0202074 A2 | 14-01-2002 10-01-2002 |
| WO 0108652 | A | 08-02-2001 | AU CN WO EP | 6985500 A 1376050 T 0108652 A1 1198222 A1 | 19-02-2001 23-10-2002 08-02-2001 24-04-2002 |
| WO 9842309 | A | 01-10-1998 | US AU WO US | 5945409 A 6775098 A 9842309 A1 6316428 B1 | 31-08-1999 20-10-1998 01-10-1998 13-11-2001 |
| FR 2694692 | A | 18-02-1994 | FR | 2694692 A1 | 18-02-1994 |