

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 879 444**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **04 13756**

⑤① Int Cl⁸ : A 61 K 7/075 (2006.01), A 61 K 7/06

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 22.12.04.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 23.06.06 Bulletin 06/25.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : L'OREAL Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : COMMO STEPHANE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤④ UTILISATION D'UN COMPOSE CAPABLE D'AUGMENTER LE TAUX DE GLUTATHION DANS LES MELANOCYTES POUR LE TRAITEMENT DE LA CANITIE.

⑤⑦ La présente invention se rapporte à l'utilisation de composés capables d'augmenter le taux de glutathion (GSH) dans les mélanocytes du follicule pileux pour le traitement de la canitie.

FR 2 879 444 - A1



La présente invention se rapporte à l'utilisation cosmétique d'un composé capable d'augmenter le taux de glutathion (GSH) dans les mélanocytes du follicule pileux pour traiter la canitie.

- 5 Le follicule pileux est une invagination tubulaire de l'épiderme qui s'enfonce jusqu'aux couches profondes du derme. La partie inférieure, ou bulbe pileux, comporte elle-même une invagination dans laquelle se trouve la papille dermique. La partie inférieure du bulbe est une zone de prolifération cellulaire où se trouvent les précurseurs des cellules kératinisées constituant le cheveu. Les cellules en ascension issues de ces précurseurs se kératinisent
10 progressivement dans la partie supérieure du bulbe, et cet ensemble de cellules kératinisées formera la tige pileuse.

La couleur des cheveux et des poils repose notamment sur la présence en quantités et ratios variables de deux groupes de mélanines : les eumélanines (pigments bruns et noirs)
15 et les phéomélanines (pigments rouges et jaunes). La pigmentation du cheveu et des poils requiert la présence de mélanocytes au niveau du bulbe du follicule pileux. Ces mélanocytes sont dans un état actif, c'est-à-dire qu'ils synthétisent des mélanines. Ces pigments sont transmis aux kératinocytes destinés à former la tige pileuse ce qui conduira à la pousse d'un cheveu ou d'un poil pigmenté. Cette structure est appelée ci-après « unité folliculaire de
20 pigmentation ».

Chez les mammifères, la mélanogénèse implique au moins trois enzymes : la tyrosinase, la DOPAchrome tautomérase (TRP-2, pour Tyrosinase Related Protein 2) et la DHICAoxydase (TRP-1, pour Tyrosinase Related Protein 1).

La tyrosinase est l'enzyme qui initie la biosynthèse des mélanines. Elle est également
25 décrite comme étant l'enzyme limitante de la mélanogénèse.

La TRP-2 catalyse la tautomérisation du DOPAchrome en acide 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA). En l'absence de TRP-2, le DOPAchrome subit une décarboxylation spontanée pour former le 5,6-dihydroxyindole (DHI).

DHICA et DHI sont tous deux des précurseurs de pigments, TRP-1 oxyde les molécules de
30 DHICA pour former des dérivés de quinones (Pawelek JM and Chakraborty AK. The enzymology of melanogenesis. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. New York: Oxford university press; 1998. p. 391-400).

Les trois enzymes, tyrosinase, TRP-2 et TRP-1, apparaissent spécifiquement impliquées dans la mélanogénèse. De plus, l'activité de ces trois enzymes a été décrite comme nécessaire à l'activité maximale de biosynthèse des eumélanines.

5 Le cheveu et le poil subissent un cycle. Ce cycle comprend une phase de croissance (phase anagène), une phase de dégénérescence (phase catagène) et une phase de repos (phase télogène) à la suite de laquelle une nouvelle phase anagène se développera. En raison de ce cycle pileux, et contrairement à l'unité de pigmentation épidermique, l'unité folliculaire de pigmentation doit également être cycliquement renouvelée.

10

La canitie (blanchissement naturel des cheveux) est liée à une raréfaction spécifique et progressive des mélanocytes des cheveux affectant à la fois les mélanocytes du bulbe pileux et les cellules précurseur de mélanocytes (Commo et al. Br J Dermatol 2004 ;150 :435-443). D'autres types cellulaires présents dans les follicules pileux ne sont pas affectés. De plus, cette raréfaction de mélanocytes n'est pas observée dans l'épiderme. La cause de cette raréfaction progressive et spécifique de mélanocytes et précurseurs de mélanocytes dans le follicule pileux n'est à ce jour pas identifiée.

15

Il apparaît donc nécessaire de lutter contre la disparition des mélanocytes des follicules pileux humains, processus affectant à la fois les mélanocytes actifs des bulbes et les mélanocytes quiescents de la région supérieure des follicules pileux, pour lutter contre la canitie.

20

La Demanderesse a déjà décrit un moyen de lutter contre le blanchissement des cheveux en agissant sur l'enzyme TRP-2 (WO 03/103568).

25

De façon surprenante et inattendue, la Demanderesse a maintenant découvert que l'expression de l'enzyme TRP-2 est corrélée à l'expression de GSH, en effet, l'expression de TRP-2 induit une augmentation du taux de GSH dans les mélanocytes.

30

Ainsi, il a été mis en évidence que dans les mélanocytes qui n'expriment pas TRP-2 (par exemple, les précurseurs de mélanocytes du cheveu), il y a un taux de GSH bas en comparaison des mélanocytes qui expriment l'enzyme TRP-2 (par exemple, tous les mélanocytes de la peau).

Ainsi, la Demanderesse a maintenant identifié une nouvelle cible pour le traitement de la canitie, elle a mis en évidence que les composés capables d'augmenter le taux de GSH dans les mélanocytes conduisaient, contrairement à leur effet dépigmentant décrit dans la littérature, à la restauration de la pigmentation des cheveux.

5

Cette utilisation revêt un caractère particulièrement surprenant compte tenu du fait que les composés connus pour augmenter le taux de GSH dans les mélanocytes, tels que l'acide lipoïque et les hydrocoumarines (Yamamura et al. 2002, Lin et al. 2002), sont décrits comme des agents limitant la synthèse des mélanines et ainsi diminuant la pigmentation de la peau en accord avec la démonstration que le GSH est défavorable à la synthèse des mélanines (Del Marmol et al. 1993, Jara et al. 1988).

10

Ainsi l'objet de la présente invention se rapporte à l'utilisation de composés capables d'augmenter le taux de GSH dans les mélanocytes du cheveu comme agent permettant de prévenir, limiter ou arrêter la progression de la canitie, et favoriser la re-pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils.

15

En particulier, l'objet de l'invention concerne l'utilisation d'un composé capable d'augmenter le taux de GSH pour prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie.

20

Les composés capables d'augmenter le taux de GSH sont, par exemple, des composés induisant la synthèse de GSH ou bien des composés limitant sa consommation, ils pourront notamment être identifiés par la méthode suivante :

a- mise en culture des mélanocytes, par exemple une culture primaire de mélanocytes de peau ou de cheveu obtenu comme décrit dans l'article de Commo et al ; Pigment Cell Res 2004 ;17 :488-497.

25

b- ajout au milieu de culture d'un composé pour lequel ont souhaite tester la propriété d'augmenter le taux de GSH.

c- incubation des mélanocytes pendant un temps suffisamment long pour permettre au composé d'être actif.

30

d- mesure du taux de GSH.

e- sélection des composés qui augmentent le taux de GSH.

Dans un mode de réalisation particulier de la méthode d'identification d'un composé qui augmente le taux de GSH, les cultures cellulaires sont réalisées en étuve, à 37°C, 5% CO₂.

5 En particulier, l'étape (a) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sontensemencés à J0 avec du milieu M2 (PromoCell, Heidelberg, D). Il peut s'agir par exemple d'une culture primaire de mélanocytes de cheveu ou de peau obtenue comme décrit dans l'article de Commo et al. *Pigment Cell Res* 2004 ;17 :488-497.

Les cellules sont maintenues dans ce milieu de culture entre 12 et 72 heures avant le traitement.

10

L'étape (b) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sont traités en culture par le composé pour lequel on souhaite tester la propriété d'augmenter le taux de GSH pendant le temps nécessaire pour révéler cette propriété, ce temps est généralement compris entre 12 et 72 heures.

15

L'étape (d) de mesure du taux de GSH pourra être réalisée par exemple par méthode HPLC. Dans un mode particulier de cette mesure, les acides aminés (AA) libres extraits des cellules cultivées et traitées sont analysés à l'aide de l'auto-analyseur d'acides aminés HITACHI L-8500. De cette façon les acides aminés libres sont séparés sur une colonne échangeuse d'ion par des éluants à base de sels de lithium, puis dosés par colorimétrie après réaction à la ninhydrine.

20

Le dosage de GSH peut également être réalisé par une méthode de fluorescence à l'aide d'une sonde fluorescente de GSH intracellulaire, par exemple telle que le Monochlorobimane (Molecular Probes, USA).

25

Alternativement le dosage de GSH peut-être réalisé à l'aide de kit commerciaux tels que le kit *Bioxytech GSH-400 colorimetric assay* (Calbiochem, USA).

30 L'objet de l'invention se rapporte aussi à l'utilisation d'un composé capable d'augmenter le taux de GSH pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris.

Le composé capable d'augmenter le taux de GSH pourra notamment être choisi parmi la quercitine, l'acide lipoïque, l'oltipraz, le kahweol, le cafestol, l'angelicalactone, le diallyl

sulfide, le bensyl isothiocyanate (Scharf G et al. Nutr Cancer. 2003 ;45(1) :74-83, Huber WW et al. Environ Mol Mutagen. 2004 ;44(4) :265-276, Sheen LY et al. Food Chem Toxicol 1996 ;34(10) :971-978, Gupta E et al. Clin Cancer Res. 1995 ;1(10) :1133-1138).

- 5 De préférence, le composé capable d'augmenter le taux de GSH ne sera pas le Nacetyl cystéine.

10 Un objet de l'invention est également une composition pour lutter contre la canitie, comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable, au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH tel que défini précédemment associé à un autre actif choisi parmi les agents de lutte des états desquamatifs du cuir chevelu, des agents favorisant la repousse des cheveux, des extraits végétaux à activité pro-pigmentante.

15 La composition selon l'invention comprend une quantité de composé capable d'augmenter le taux de GSH comprise entre 0.001 % et 10 % en poids par volume, préférentiellement entre 0,01 et 5% en poids par volume et encore plus préférentiellement entre 0,1 et 1% en poids par volume.

20 La composition selon l'invention peut être administrée par voie orale ou appliquée topiquement sur la peau (sur toute zone cutanée du corps recouverte de poils) et/ou le cuir chevelu.

25 Par voie orale, la composition selon l'invention peut contenir, le ou les composés capables d'augmenter le taux de GSH en solution dans un liquide alimentaire tel qu'une solution aqueuse ou hydroalcoolique, éventuellement aromatisée. Ils peuvent également être incorporés dans un excipient solide ingérable et se présenter par exemple sous forme de granulés, de pilules, de comprimés ou de dragées. Ils peuvent également être placés en solution dans un liquide alimentaire conditionné lui-même éventuellement dans des capsules ingérables.

30

Selon le mode d'administration, la composition de l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées, particulièrement en cosmétologie.

Une composition préférée de l'invention est une composition cosmétique adaptée à une application topique sur le cuir chevelu et/ou la peau.

Pour une application topique, la composition utilisable selon l'invention peut être notamment sous la forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse ou de dispersion du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues
5 par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique. Elle peut ainsi se présenter sous forme d'onguent, de teinture, de crème, de pommade, de poudre, de timbre, de tampon imbibé, de solution,
10 d'émulsion ou de dispersion vésiculaire, de lotion, de gel, de spray, de suspension, de shampooing, d'aérosol ou de mousse. Elles peuvent être anhydres ou aqueuses. Elle peut également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

15

La composition utilisable selon l'invention peut en particulier être une composition pour soins capillaires, et notamment un shampooing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampooings colorants, des lotions
20 restructurantes pour les cheveux, de masque.

La composition cosmétique selon l'invention sera préférentiellement une crème, une lotion capillaire, un shampooing ou un après-shampooing.

25 Les quantités des différents constituants des compositions utilisables selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5% à 80% en poids, et de préférence de 5% à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux
30 classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à 30% en poids, et de préférence de 0,5 à 20% en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion

peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une solution ou un gel huileux, la phase grasse peut représenter plus de 90% du poids total de la composition.

5

Dans une variante de l'invention, la composition sera telle que le composé capable d'augmenter le taux de GSH est encapsulé dans un enrobage tel que des microsphères, des nanosphères, des oléosomes ou des nanocapsules, l'enrobage sera choisi selon la nature chimique du composé capable d'augmenter le taux de GSH.

10

A titre d'exemple, les microsphères pourront être préparées selon la méthode décrite dans la demande de brevet EP 0 375 520.

15 Les nanosphères pourront se présenter sous forme de suspension aqueuse et être préparées selon les méthodes décrites dans les demandes de brevet FR 0015686 et FR 0101438.

20 Les oléosomes consistent en une émulsion huile dans eau formée par des globules huileux pourvus d'un enrobage cristal liquide lamellaire dispersé dans une phase aqueuse (voir les demandes de brevet EP 0 641 557 et EP 0 705 593).

25 Le composé capable d'augmenter le taux de GSH pourra aussi être encapsulé dans des nanocapsules consistant en un enrobage lamellaire obtenu à partir d'un tensio-actif siliciné (voir la demande de brevet EP 0 780 115), les nanocapsules pourront également être préparées à base de polyesters sulfoniques hydrodispersibles (voir la demande de brevet FR 0113337).

30 Le composé capable d'augmenter le taux de GSH pourra également être complexé à la surface de globules huileux cationiques, quel que soit leur taille (voir les demandes de brevet EP 1 010 413, EP 1 010 414, EP 1 010 415, EP 1 010 416, EP 1 013 338, EP 1 016 453, EP 1 018 363, EP 1 020 219, EP 1 025 898, EP 1 120 101, EP 1 120 102, EP 1 129 684, EP 1 160 005 et EP 1 172 077).

Le composé capable d'augmenter le taux de GSH peut enfin être complexé à la surface de nanocapsules ou nanoparticules pourvues d'un enrobage lamellaire (Voir EP 0 447 318 et EP 0 557 489) et contenant un tensio-actif cationique à la surface (voir les références citées précédemment pour les tensio-actifs cationiques).

5

En particulier, on préférera une composition telle que l'enrobage contenant le composé capable d'augmenter le taux de GSH a un diamètre inférieur ou égale à 10 µm. Lorsque l'enrobage ne forme pas une vésicule sphérique, on entend par diamètre la dimension la plus grande de la vésicule.

10

De façon connue, la composition selon l'invention peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple de 0,01% à 10% du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

15

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique).

20

Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose[®] 63 par la société Gattefosse.

25

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs, notamment l'éthanol et l'isopropanol, le propylène glycol.

30

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que

l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium et la silice hydrophobe, éthylcellulose, polyéthylène.

- 5 Les compositions utilisables selon l'invention peuvent associer au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH à d'autres agents actifs. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :
- les agents modulant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation des cellules de la peau tels que le rétinol et ses esters, la vitamine D et ses dérivés, les
 - 10 oestrogènes tels que l'oestradiol, les modulateurs de l'AMPc tels que les dérivés de POMC, l'adénosine, ou la forskoline et ses dérivés, les prostaglandines et leurs dérivés, la triiodotrionine et ses dérivés ;
 - des extraits de végétaux tels que ceux d'Iridacées ou de soja, extraits pouvant alors contenir ou non des isoflavones ;
 - 15 - des extraits de micro-organismes ;
 - les agents anti-radicaux libres tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases ou ses mimétiques, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses esters ;
 - les anti-séborrhéiques tels que certains acides aminés soufrés, l'acide 13-cis rétinolique,
 - 20 l'acétate de cyprotérone ;
 - les autres agents de lutte contre les états desquamatifs du cuir chevelu comme le zinc pyrithione, le disulfure de sélénium, le climbazole, l'acide undécylénique, le Kétoconazole, la piroctone olamine (octopirox) ou la ciclopiroctone (ciclopirox) ;
 - en particulier, il pourra s'agir d'actifs stimulant la repousse et/ou favorisant le ralentissement
 - 25 de la chute des cheveux, on peut plus particulièrement citer à titre non limitatif :
 - les esters d'acide nicotinique, dont notamment le nicotinate de tocophérol, le nicotinate de benzyle et les nicotinates d'alkyles en C₁-C₆ comme les nicotinates de méthyle ou d'hexyle ;
 - les dérivés de pyrimidine, comme le 2,4-diamino 6-piperidinopyrimidine 3-oxyde ou
 - 30 "Minoxidil" décrit dans les brevets US 4,139,619 et US 4,596,812 ; l'Aminexil ou 2,4 diamino pyrimidine 3 oxyde décrit dans WO96/09048 ;
 - les agents inhibiteur de la lipoxygénase ou inducteur de la cyclooxydase favorisant la repousse des cheveux comme ceux décrits par la Demanderesse dans la demande de brevet européen EP 0 648 488 ;

- les agents antibactériens tels que les macrolides, les pyranosides et les tétracyclines, et notamment l'Erythromycine ;
- les agents antagonistes de calcium, comme la Cinnarizine, la Nimodipine et la Nifedipine ;
- des hormones, telles que l'estriol ou des analogues, ou la thyroxine et ses sels ;
- 5 - des agents antiandrogènes, tels que l'oxendolone, la spironolactone, le diéthylstilbestrol et la flutamide ;
- des inhibiteurs stéroïdiens ou non stéroïdiens des 5- α -réductases tels que ceux décrits par la Demanderesse dans les demandes de brevet européen EP 0 964 852 et EP 1 068 858 ou encore le finastéride ;
- 10 - des agonistes des canaux potassiques dépendant de l'ATP tels que la cromakalim et le nicorandil ;
- des extraits végétaux à activité pro-pigmentante comme les extraits de chrysanthème tels que décrits dans FR 2768343 et les extraits de Sanguisorba décrits dans FR 2782920A1.

- 15 De préférence, le composé capable d'augmenter le taux de GSH est associé à un autre actif choisi parmi les agents de lutte des états desquamatifs du cuir chevelu, des agents favorisant la repousse des cheveux, des extraits végétaux à activité propigmentante.

20 Un autre objet de la présente invention se rapporte à un procédé de traitement cosmétique de la canitie caractérisé en ce qu'on administre ou qu'on applique sur la zone à traiter une composition telle que définie précédemment comprenant au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH.

25 L'invention se rapporte aussi à un procédé de traitement cosmétique destiné à maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs caractérisé en ce qu'on administre ou qu'on applique sur la zone à traiter une composition telle que définie précédemment comprenant au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH.

30 Les procédés de traitement de la canitie et de pigmentation des cheveux et/ou des poils gris ou blancs peuvent également consister en l'ingestion d'une composition comprenant au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH.

Les zones à traiter peuvent être, par exemple et sans aucune limitation, le cuir chevelu, les sourcils, la moustache et/ou la barbe et toute zone de la peau recouverte de poils.

Plus particulièrement, les procédés de traitement cosmétique de la canitie et de pigmentation naturelle des cheveux et/ou poils gris ou blancs consistent à appliquer une composition comprenant au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH.

5

Les procédés de traitement cosmétique pour lutter contre la canitie et/ou pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs peut par exemple consister à appliquer la composition sur les cheveux et le cuir chevelu, le soir, garder la composition toute la nuit et éventuellement effectuer un shampoing le matin ou laver les
10 cheveux à l'aide de cette composition et à laisser à nouveau en contact quelques minutes avant de rincer. La composition conforme à l'invention s'est révélée particulièrement intéressante lorsqu'elle est appliquée sous forme de lotion capillaire, éventuellement rincée ou même sous forme d'un shampoing.

15 **Figures :****Figure 1 :**

La figure 1 représente un Western Blot avec des anticorps anti-TRP-2 et anti-vimentine sur les lignées de mélanocytes WM35-wt (wild type), C2, C4, C7 et C8 (clones transfectés et sélectionnés) tel que décrit dans l'exemple 1. Il ressort de ce Western Blot que seuls les
20 clones C2, C4 et C8 expriment TRP-2.

Figure 2 :

La figure 2 est un histogramme représentant le ratio GSH sur la somme d'une sélection d'acides aminés dosés (voir exemple 1, partie C) dans les lignées de mélanocytes WM35-wt
25 (wild type), C2, C4, C7 et C8.

Exemple 1: Dosage du GSH dans des mélanocytes en fonction de l'expression de TRP-2.30 **A- obtention de lignées de mélanocytes TRP-2 positives et TRP-2 négatives.**

A1 : Clonage de la protéine TRP-2.

La totalité de la région de l'ARN messager codant la protéine TRP-2 est clonée, à partir d'ARN messagers extraits d'une culture primaire de mélanocytes de peau, par la technique de RT-PCR à l'aide des sondes 5'-GGAGATGGTGAGAAGCGCTAC-3' et 5'-

GCGGAAACTACAGCTAAGCAT-3', d'après la séquence Genebank D17547. Le produit de PCR obtenu est cloné à nouveau à l'aide de sondes contenant des séquences nucléotidiques correspondant aux sites de restriction pour le clonage dans un vecteur d'expression eucaryote : 5'-AGGGATCCATGAGCCCCCTTTGGTGGGGGTTT-3' et 5'-GGAATTCAGCACCTAGGCTTC-3'. Le vecteur d'expression utilisé est le pCDNA3.1 (+).
 5 Le vecteur contenant la région codant la protéine TRP-2 est ensuite produit à partir de bactéries compétentes puis purifié, ce vecteur est ensuite nommé pCDNA-TRP2.

A2 : Obtention de lignées de mélanomes TRP-2 positives.

Des cellules du type mélanome WM35 qui expriment peu la protéine TRP-2 de façon constitutive *in vitro* sont transfectées par le plasmide pCDNA-TRP2. Les cellules transfectées de façon stable sont ensuite sélectionnées par un traitement à la généticine (G418). Les clones obtenus sont ensuite isolés et amplifiés.
 10

B : Vérification de l'expression différentielle de TRP-2 dans les différents clones sélectionnés, par la méthode du western blot (voir Commo et al ; Pigment Cell Res 2004 ;17 :488-497)
 15

Des cultures de chacun des clones sont lysées avec un même tampon de lyse approprié pour extraction protéique et analyse en *western blot*. Le taux de TRP-2 dans les différents extraits est déterminé par la méthode du western blot à partir de 8 µg d'extraits protéiques. Le *Western blot* (voir protocole dans Maniatis *et al.*) est réalisé avec les anticorps suivants :
 20 αPEP8h, anticorps polyclonal donné par Dr VJ Hearing (NIH, Bethesda, USA), et αvimentine, anticorps monoclonal Vim3B4 (Cymbus, UK).

La **figure 1** montre que les clones C2, C4 et C8 expriment plus la protéine TRP-2 en comparaison du clone 7 et de la lignée sauvage (wt).

C : Dosage du GSH dans les clones TRP-2 positifs et TRP-2 négatifs.
 25

Pour chacun des clones étudiés, les cellules sontensemencées à raison de 2×10^4 cellules/cm². Les cultures cellulaires sont ensuite lysées à l'aide d'un tampon de lyse pH 2. Les acides aminés (AA) libres extraits sont analysés à l'aide de l'auto-analyseur d'acides aminés HITACHI L-8500. De cette façon les AA libres sont séparés sur une colonne échangeuse d'ion par des éluants à base de sels de lithium, puis dosés par colorimétrie après réaction à la ninhydrine. Dans chaque extrait le taux de GSH mesuré est rapporté à la somme des AA (proline (P), glycine (G), alanine (A), valine (V), cystéine (C), méthionine (M), isoleucine (I), leucine (L), tyrosine (Y), phénylalanine (F), lysine (K), histidine (H), arginine (R)) de façon à normalisé l'échantillon.
 30

La **figure 2** montre que les clones C2, C4, et C8 possèdent un taux de GSH plus élevé que le clone C7 et que la lignée sauvage.

5 **Exemple 2 - Exemple de l'effet de composés qui augmentent le taux de GSH ou limitent sa diminution sur la viabilité des mélanocytes TRP-2(-).**

- 10 a- mise en culture de deux types cellulaires exprimant TRP-2 et n'exprimant pas TRP-2, respectivement Cell-TRP2(+) et Cell-TRP2(-), il peut s'agir de tous types cellulaires, de préférence des mélanocytes.
- b- ajout au milieu de culture des cellules Cell-TRP2(-) d'un composé capable de favoriser l'accumulation de GSH.
- 15 c- incubation des cultures pendant un temps suffisamment long pour permettre l'augmentation du taux de GSH dans les cellules.
- d- exposition des cellules à une condition induisant l'apoptose ou la sénescence.
- e- mesure de l'apoptose ou de la sénescence.
- f- sélection des composés favorisant l'accumulation du GSH et permettant de protéger les cellules TRP2(-).

20

Dans un mode de réalisation particulier de la méthode, les cultures cellulaires sont réalisées en étuve, à 37°C, 5% CO₂.

- 25 En particulier, l'étape (a) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les cellules sontensemencés à la densité de 5x10⁴ cellules/cm², à J0 avec du milieu M2 (PromoCell, Heidelberg, D). Les cellules sont maintenues dans ce milieu de culture entre 12 et 72 heures avant le traitement.

- 30 L'étape (b) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les cellules sont traités en culture par le composé à tester pendant le temps nécessaire pour révéler cette propriété, ce temps est généralement compris entre 12 et 72 heures.

Pour la réalisation de l'étape (d) les populations Cell-TRP2(+) et Cell-TRP2(-) sont exposées à une condition induisant l'apoptose ou la sénescence en culture, il pourra s'agir, par

exemple, d'un traitement par le cis-platine (Pak B.J. et al., 2000, Melanoma Res. 10 :499-505) ou l'oxaliplatine, par un agent toxique ou un composé précurseur de molécules toxiques tels que l'adriamycine, la dihydroxyphénylalanine, le paraquat, le paracétamol, le 4-hydroxyoestradiol, ou encore le 4-hydroxyanisole, d'une exposition aux rayonnements ultraviolets, d'un stress oxydatif (H_2O_2 , diethylmaleate) (voir Vaux D.L. & Strasser A., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci. 93 :2239-2244).

Pour la réalisation de l'étape (e), on pourra utiliser les méthodes de révélation de l'apoptose ou de la sénescence suivantes :

- 10 - la réponse apoptotique peut être déterminée par toute méthode permettant de révéler l'apoptose cellulaire, par exemple, identification de la fragmentation de l'ADN après électrophorèse sur gel d'agarose, marquage des fragments d'ADN par la méthode du "TUNEL" (Gavrieli Y et al. J Cell Biol 1992 ;119:493-501), révélation de l'anexine V (ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit (1996) CLONTECHniques XI(3) :9-11 (BD Biosciences, Belgium)), dosage des nucléosomes cytosoliques (Kit Cell Death Detection ElisaPlus (1-774-425, Roche, Allemagne).
- 15 - la réponse sénescence peut être déterminée par toute méthode permettant de révéler la sénescence cellulaire, par exemple, détermination d'un raccourcissement des télomères, mesure de l'activité de la télomérase (TRAPEze kit, Intergen), détermination de la diminution du taux de cycline E, détermination de la diminution du taux de protéine Rb phosphorylée (Bandyopadhyay D et al. Experimental Gerontology 2001 ;36 :1265-1275), mesure de l'activité beta-Galactosidase (Dimri GP et al. PNAS 1995 ;92 :9363-9367)

25 **Exemple 3 - Compositions**

- lotion capillaire

Composé capable d'agir sur la voie métabolique

| | | |
|----|------------------------------|-------|
| | de la DOPAchrome tautomérase | 0,5 g |
| 30 | Propylène glycol | 20 g |
| | Ethanol 95° | 30 g |
| | Eau | qsp |
| | | 100 g |

Cette lotion est appliquée quotidiennement sur les zones à traiter et de préférence sur l'ensemble du cuir chevelu pendant au moins 10 jours et préférentiellement 1 à 2 mois. On constate alors une diminution de l'apparition des cheveux blancs ou gris et une repigmentation des cheveux gris.

5

- shampooing traitant

| | | |
|--|--|-------|
| Composé capable d'agir sur la voie métabolique | | |
| | de la DOPAchrome tautomérase | 1,5 g |
| | Polyglycéryl 3-hydroxylarylether | 26 g |
| 10 | Hydroxy propyl cellulose vendue sous la dénomination de Klucell G par la société Hercules | 2 g |
| | Conservateurs | qs |
| | Ethanol 95° | 50 g |
| | Eau | 100 g |
| | qsp | |

15

Ce shampooing est utilisé à chaque lavage avec un temps de pose d'environ d'une minute. Un usage prolongé, de l'ordre de deux mois, conduit à la repigmentation progressive des cheveux gris.

20 Ce shampooing peut également être utilisé à titre préventif afin de retardé le blanchiment des cheveux.

- Gel traitant

| | | |
|--|--|---------|
| Composé capable d'agir sur la voie métabolique | | |
| | de la DOPAchrome tautomérase | 0,75 g |
| 25 | Huiles essentielles d'Eucalyptus | 1 g |
| | Econazole | 0,2 g |
| | Lauryl polyglyceryl 6 cetearyl glycoether | 1,9 g |
| | Conservateurs | qs |
| | Carbopol 934P vendu par la société BF Goodrich Corporation | 0,3 g |
| 30 | Agent de neutralisation | qs pH 7 |
| | Eau | 100 g |
| | qsp | |

Ce gel est appliqué sur les zones à traiter deux fois par jour (matin et soir) avec un massage terminal. Après trois mois d'application, on observe une repigmentation des poils ou cheveux de la zone traitée.

RENDICATIONS

1. Utilisation cosmétique d'un composé capable d'augmenter le taux de GSH pour prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie.
5
2. Utilisation selon la revendication 1 pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que le composé capable
10 d'augmenter le taux de GSH est choisi parmi la quercitine, l'acide lipoïque, l'oltipraz, le kahweol, le cafestol, l'angelicalactone, le diallyl sulfide, le bensyl isothiocyanate.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que
15 l'utilisation du composé capable d'augmenter le taux de GSH est par voie topique ou orale.
5. Composition cosmétique pour lutter contre la canitie comprenant dans un milieu
cosmétiquement acceptable au moins un composé capable d'augmenter le taux de GSH
associé à un autre actif choisi parmi les agents de lutte des états desquamatifs du cuir
chevelu, des agents favorisant la repousse des cheveux, des extraits végétaux à activité
20 propigmentante.
6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que le composé capable
d'augmenter le taux de GSH est encapsulé dans un enrobage tel que des microsphères,
des nanosphères, des oléosomes ou des nanocapsules.
- 25 7. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 6, caractérisée en ce qu'elle
est adaptée à une application topique sur le cuir chevelu et/ou sur les zones de la peau
recouvertes de poils.
- 30 8. Procédé de traitement cosmétique de la canitie, caractérisé en ce qu'on administre
oralement ou qu'on applique topiquement sur la zone à traiter une composition comprenant
un composé capable d'augmenter le taux de GSH.

1/1

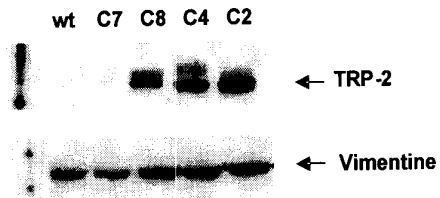


Figure 1

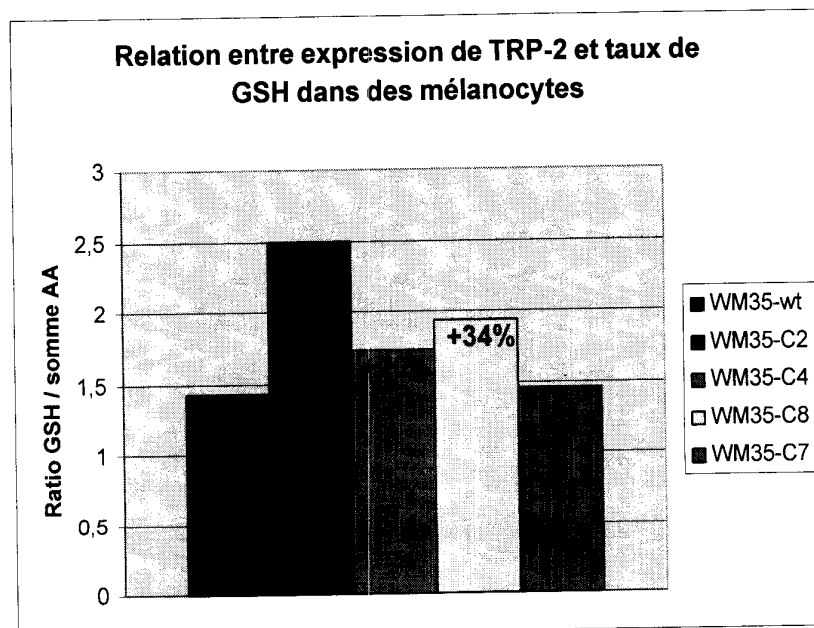


Figure 2



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 658974
FR 0413756

| 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 | EP 0 656 201 A (FREE RADICAL SCIENCES INC) 7 juin 1995 (1995-06-07) | 1,4,5,7, 8 | A61K7/06 A61K7/075 |
| Y | ----- | 6 | |
| Y | US 2004/205910 A1 (LI LINGNA ET AL) 21 octobre 2004 (2004-10-21) * revendications * | 6 | |
| X | US 5 516 507 A (N'GUYEN ET AL) 14 mai 1996 (1996-05-14) * colonne 4, ligne 52 - ligne 59 * * revendications * | 1,4,5,7, 8 | |
| X | US 6 465 421 B1 (DURANTON ALBERT ET AL) 15 octobre 2002 (2002-10-15) * exemples 8,11 * * revendications * | 1,3-5,7, 8 | |
| X | WO 01/93824 A (BASF AKTIENGESELLSCHAFT; STREICHER, HARALD; JENTZSCH, AXEL) 13 décembre 2001 (2001-12-13) * page 8, ligne 17 - ligne 18 * * page 9, ligne 26 * * revendication 1 * | 1,3-5,7, 8 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K |
| X | DATABASE WPI Section Ch, Week 200502 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B05, AN 2005-019056 XP002343902 & KR 2004 072 322 A (AMOREPACIFIC CORP) 18 août 2004 (2004-08-18) * abrégé * | 5,7,8 | |
| | ----- -/-- | | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 8 septembre 2005 | | Pelli Wablat, B | |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS | | | |
| <p>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</p> | | | |
| <p>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</p> | | | |

1
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 658974
FR 0413756

| 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 | DATABASE WPI Section Ch, Week 199120 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 1991-143142 XP002343903 & JP 03 077809 A (ALSOA SOGO KENKYUSH) 3 avril 1991 (1991-04-03) * abrégé * | 5 | |
| A | DATABASE WPI Section Ch, Week 199511 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 1995-077960 XP002343904 & JP 07 002677 A (TOYO SEITO KK) 6 janvier 1995 (1995-01-06) * abrégé * | 1-8 | |
| E | FR 2 863 484 A (L'OREAL) 17 juin 2005 (2005-06-17) * revendications; exemples * | 1,2,4-8 | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) |
| A | WO 03/103616 A (L'OREAL; COMMO, STEPHANE; GAILLARD, OLIVIER; BERNARD, BRUNO) 18 décembre 2003 (2003-12-18) * revendications 4-16 * | 1-8 | |
| Date d'achèvement de la recherche | | Examineur | |
| 8 septembre 2005 | | Pelli Wablat, B | |
| CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS | | | |
| 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 | | 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 | |

1
EPO FORM 1503 12.98 (F04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0413756 FA 658974**

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 08-09-2005

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 |
|---|------------|------------------------|---|------------------------|
| EP 0656201 | A | 07-06-1995 | AU 7752694 A | 18-05-1995 |
| | | | CA 2135227 A1 | 10-05-1995 |
| | | | EP 0656201 A1 | 07-06-1995 |
| | | | JP 7238007 A | 12-09-1995 |
| US 2004205910 | A1 | 21-10-2004 | US 6733776 B1 | 11-05-2004 |
| | | | US 5753263 A | 19-05-1998 |
| | | | US 5641508 A | 24-06-1997 |
| | | | US 2003059464 A1 | 27-03-2003 |
| | | | US 5914126 A | 22-06-1999 |
| | | | US 6224901 B1 | 01-05-2001 |
| | | | US 5965157 A | 12-10-1999 |
| | | | AT 209887 T | 15-12-2001 |
| | | | AU 6554594 A | 24-10-1994 |
| | | | CA 2159626 A1 | 13-10-1994 |
| | | | DE 69429337 D1 | 17-01-2002 |
| | | | DE 69429337 T2 | 10-10-2002 |
| | | | EP 0692972 A1 | 24-01-1996 |
| | | | JP 2950520 B2 | 20-09-1999 |
| | | | JP 8511510 T | 03-12-1996 |
| | | | US 6261596 B1 | 17-07-2001 |
| WO 9422468 A1 | 13-10-1994 | | | |
| US 5516507 | A | 14-05-1996 | FR 2704754 A1 | 10-11-1994 |
| | | | CA 2122969 A1 | 08-11-1994 |
| | | | DE 69405636 D1 | 23-10-1997 |
| | | | DE 69405636 T2 | 09-04-1998 |
| | | | EP 0623342 A1 | 09-11-1994 |
| | | | ES 2107762 T3 | 01-12-1997 |
| | | | JP 7048241 A | 21-02-1995 |
| US 6465421 | B1 | 15-10-2002 | FR 2711060 A1 | 21-04-1995 |
| | | | US 2003064929 A1 | 03-04-2003 |
| | | | CA 2132507 A1 | 14-04-1995 |
| | | | DE 69426351 D1 | 04-01-2001 |
| | | | DE 69426351 T2 | 05-04-2001 |
| | | | EP 0648488 A1 | 19-04-1995 |
| | | | ES 2154287 T3 | 01-04-2001 |
| | | | JP 2883821 B2 | 19-04-1999 |
| | | | JP 7238037 A | 12-09-1995 |
| WO 0193824 | A | 13-12-2001 | DE 10027875 A1 | 13-12-2001 |
| | | | AU 7055401 A | 17-12-2001 |
| | | | WO 0193824 A1 | 13-12-2001 |
| | | | EP 1294353 A1 | 26-03-2003 |
| | | | JP 2003535115 T | 25-11-2003 |

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0413756 FA 658974**

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 08-09-2005

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 |
|---|---|------------------------|---|------------------------|
| WO 0193824 | A | | US 2003180337 A1 | 25-09-2003 |
| KR 2004072322 | A | | AUCUN | |
| JP 3077809 | A | 03-04-1991 | AUCUN | |
| JP 7002677 | A | 06-01-1995 | AUCUN | |
| FR 2863484 | A | 17-06-2005 | FR 2863484 A1 | 17-06-2005 |
| | | | WO 2005065633 A1 | 21-07-2005 |
| WO 03103616 | A | 18-12-2003 | FR 2840531 A1 | 12-12-2003 |
| | | | AU 2003255653 A1 | 22-12-2003 |
| | | | CA 2487945 A1 | 18-12-2003 |
| | | | EP 1515688 A2 | 23-03-2005 |
| | | | WO 03103616 A2 | 18-12-2003 |
| | | | US 2005186233 A1 | 25-08-2005 |

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82