(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
4 novembre 2004 (04.11.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/093832 A2

(51) Classification internationale des brevets[7] : A61K 7/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000944

(22) Date de dépôt international : 16 avril 2004 (16.04.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/04826 17 avril 2003 (17.04.2003) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **SOCIETE D'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS (VINCIENCE SA)** [FR/FR]; 655, route du Pin Montard-Les Bouillides-, F-06410 Biot (FR).

(72) Inventeurs; et
(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **DAL FARRA, Claude** [FR/FR]; 30, chemin de San Peyre, F-06650 Opio (FR). **DOMLOGE, Nouha** [FR/FR]; 10, traverse du Barri, F-06560 Valbonne (FR). **PEYRONEL, Dominique** [FR/FR]; 25, avenue des Lys, F-13014 Marseille (FR).

(74) Mandataire : **SOCIETE D'EXTRACTION DES PRINCIPES ACTIFS (VINCIENCE SA)**; 655, route du Pin Montard -Les Bouillides-, F-06410 Biot (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :
— *relative au droit du déposant de revendiquer la priorité de la demande antérieure (règle 4.17.iii)) pour la désignation suivante US*
— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement*

Publiée :
— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) **Title:** COSMETIC OR PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING A COMBINATION OF AT LEAST ONE DIACYLGLYCEROL AND AT LEAST ONE FATTY ALCOHOL

(54) **Titre :** COMPOSITION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE COMPRENANT L'ASSOCIATION D'AU MOINS UN DIACYLGLYCEROL ET D'AU MOINS UN ALCOOL GRAS

(57) **Abstract:** The invention relates to a cosmetic and/or dermatological and/or pharmaceutical composition comprising, by way of active principle, at least a combination of diacylglycerol and at least one fatty alcohol. The invention also relates to the use thereof, for example, to care for the skin and/or skin appendages, as well as to the use thereof in order to treat signs of cutaneous ageing. The invention further relates to a cosmetic treatment method for the skin and/or skin appendages.

(57) **Abrégé :** La présente invention a pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique et/ou pharmaceutique comprenant, comme principe actif, au moins l'association de diacylglycérol et d'au moins un alcool gras. L'invention comprend aussi son utilisation, entre autres, pour les soins de la peau et/ou des phanères ainsi que son utilisation afin de traiter les manifestations du vieillissement cutané. L'invention concerne aussi un procédé de traitement cosmétique de la peau et/ou des phanères.

WO 2004/093832 A2

Composition cosmétique ou pharmaceutique comprenant l'association d'au moins un Diacylglycérol et d'au moins un alcool gras.

La présente invention concerne le domaine de la pharmaceutique, notamment le domaine de la dermatologie ainsi que le domaine de la cosmétique.

La présente invention a pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique et/ou pharmaceutique comprenant, comme principe actif, au moins l'association de diacylglycérol et d'au moins un alcool gras.

L'invention comprend aussi son utilisation pour traiter, entre autres, les manifestations du vieillissement cutané et pour protéger la peau contre les agressions extérieures.

La peau est un organe de revêtement recouvrant la totalité de la surface du corps. C'est un organe vital assurant des fonctions multiples telles que des fonctions sensitives, protectrices vis à vis d'agressions externes multiples, immunitaires, métaboliques ou encore thermorégulatrices. Ces rôles sont rendus possibles grâce à une structure complexe qui associe des structures tissulaires variées.

La peau est constituée de trois compartiments distincts superposés : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. L'épiderme est un épithélium de revêtement qui constitue la structure externe de la peau et assure sa fonction de protection. Cette fonction est assurée par la cohésion des cellules épithéliales et par la production d'une protéine filamenteuse et résistante, la kératine. Le derme est un tissu conjonctif constitué d'une substance fondamentale dans laquelle baignent les fibroblastes, des fibres de collagène et des fibres d'élastine, fibres protéiques synthétisées par les fibroblastes. Les fibres de collagène assurent une grande partie de la solidité du derme, elles participent à l'élasticité et surtout à la tonicité de la peau et/ou des muqueuses. Au-dessous du derme se trouve une couche de tissus adipeux : l'hypoderme.

La peau, comme tous les autres organes, est soumise au vieillissement. La première manifestation générale du vieillissement cutané est l'apparition de ridules. La peau devient moins souple, plus fine, souvent sèche et elle perd son élasticité. La perte de souplesse, de fermeté et d'hydratation de la peau, ainsi que l'apparition de rides et de ridules sont dues, vraisemblablement, à la perte inégale des différents types de macromolécules de la matrice cutanée.

Les facteurs qui interviennent dans le processus du vieillissement cutané sont variés et nombreux. Le phénomène de vieillissement de la peau s'accompagne, entre autres, d'une

perte des fonctions de la peau ainsi que d'une diminution de la réponse aux stimuli auxquels celle-ci peut être soumise. Toutes ces modifications résident dans des modifications au niveau cellulaire (*Dalziel et al., Clin Exp Dermatol 1991, 16(5): 315-23*).

Dans l'épiderme, le ralentissement de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes avec l'âge est un facteur permettant d'expliquer l'amincissement de la peau au cours du vieillissement. L'épiderme s'atrophie, la peau perd ainsi ses capacités de protection.

La baisse des capacités des cellules à se diviser et, notamment, des fibroblastes, est caractéristique des tissus âgés. Les fibroblastes, qui assurent un équilibre entre synthèse et dégradation des fibres de collagène et d'élastine, vont déplacer cet équilibre vers une dégradation des fibres. Cela se traduit par une perte d'élasticité et de tonicité du derme dont il résulte l'apparition de rides.

Les kératinocytes ainsi que les fibroblastes connaissent une diminution de leur prolifération associée à l'âge qui peut être due à une perte de réponse à la mitogénèse. Ainsi, dans les peaux âgées, les cellules perdent leur potentiel de prolifération et de réparation, elles diminuent la production de protéines "clés" telles que le collagène ou l'élastine.

Une exposition chronique aux ultra-violets, en particulier aux UVA et à d'autres facteurs environnementaux agressifs, accélère et aggrave le phénomène de vieillissement de la peau (appelé chrono-vieillissement) et conduit à une perturbation de l'expression des gènes de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

Un des mécanismes jouant un rôle majeur dans le processus du vieillissement est l'accumulation de dommages oxydatifs dans des molécules essentielles telles que dans les membranes lipidiques, les protéines, l'ADN, plus particulièrement l'ADN mitochondrial.

Une des conséquences importantes de l'accumulation de ces dommages est, notamment, une réduction de la capacité de la cellule à produire de l'ATP. En effet, avec l'âge les dommages de l'ADN mitochondrial s'accumulent (*Beckman et al., Ann NY Acad Sci, 854:118-27, 1989)*. Ce phénomène provoque une augmentation du stress oxydatif des cellules ainsi qu'une réduction de la quantité d'énergie intracellulaire (*Porteous et al., Eur J Biochem 1998, 257(1):192-201*).

Ainsi, la réduction de la concentration de l'ATP dans la cellule induit des problèmes importants. En effet, la synthèse d'ADN diminue, de même que la synthèse de protéines essentielles au bon fonctionnement de la peau, telles que les protéines de la matrice

extracellulaire ou bien la kératine. La diminution de la synthèse d'ATP a aussi pour conséquence directe une diminution de la prolifération et de la différenciation cellulaire.

De plus, il a été démontré (*O. Toussain et al., Exp Gerontol, 1995; 30 (1): 1-22*) que la production d'énergie cellulaire peut être considérablement déstabilisée lorsque la cellule subit un stress, ce qui accélère le processus de vieillissement. En effet, la cellule soumise à un stress va utiliser une grande partie de son énergie en réponse à ce stress. L'habileté à répondre à un stimulus ainsi que la capacité à contrebalancer un stress, processus qui nécessitent de l'énergie, seront considérablement diminués dans une cellule âgée ou dans une cellule soumise à un photo-vieillissement.

Ainsi, le phénomène du vieillissement cellulaire est en relation avec le stress que subit la cellule mais aussi en relation avec le processus de production d'énergie nécessaire à la cellule pour suivre, ainsi que pour assurer les différentes fonctions nécessaires à la différenciation cellulaire.

Les professionnels de la santé et de la cosmétique recherchent depuis de nombreuses années des moyens pour lutter ou, tout au moins, pour réduire les phénomènes du vieillissement cutané, ainsi que des moyens afin d'augmenter la résistance de la peau aux agressions extérieures et au stress qu'elle subit quotidiennement. Un certain nombre de substances introduites dans des produits cosmétiques ou pharmaceutiques ont vu le jour, mais il reste encore des progrès à faire afin de pouvoir disposer de produits cosmétiques ou pharmaceutiques capables de régler ces problèmes de manière satisfaisante.

Le problème technique à résoudre a donc été, pour les inventeurs, de trouver une nouvelle substance, cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable, qui soit capable de combattre à la fois le phénomène de vieillissement cutané et de protéger la peau d'une manière efficace afin qu'elle ne subisse pas les dégradations occasionnées par les agressions et les stress d'origine extérieure.

Les inventeurs ont réussi à sélectionner des substances particulières présentant des propriétés remarquables lorsque celles-ci sont appliquées sur la peau. Ainsi, de manière inattendue, les inventeurs ont découvert que l'association de certaines molécules, telle que l'association de diacylglycérol et d'alcool gras, a des propriétés remarquables et, notamment, qu'elle aide à prévenir les phénomènes du vieillissement cutané et qu'elle protège la peau.

La demanderesse a notamment découvert une composition qui a un effet sur la modulation de la concentration d'ATP dans la cellule, sur la concentration intracellulaire de calcium ainsi que sur la production de protéines essentielles à la peau.

En effet, cette composition permet d'augmenter significativement la concentration intracellulaire de l'ATP et la concentration de calcium. La cellule peut donc lutter de manière efficace contre tous les phénomènes de stress et prévenir les manifestations du vieillissement.

A la connaissance de la demanderesse, il n'a jamais été décrit dans l'art antérieur l'utilisation d'une composition contenant l'association de diacylglycérol et d'alcool gras, comme principe actif, en cosmétique et/ou en dermatologie et/ou en pharmaceutique.

Une propriété remarquable de l'association selon l'invention est qu'elle présente des effets plus importants que ceux qui sont raisonnablement attendus du fait de la simple addition des effets de chacun des composants constituant la composition.

Un des avantages de cette invention est donc de permettre l'utilisation de chacun des composants de la composition dans des proportions inférieures à ce qu'il est généralement courant d'utiliser.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention a pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique et/ou pharmaceutique comprenant, comme principe actif, au moins l'association d'au moins un diacylglycérol et d'au moins un alcool gras.

Par diacylglycérol, selon l'invention, on entend les composés de formule (I) :

(I)

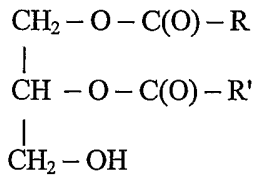


dans laquelle R et R' représentent la chaîne aliphatique d'un acide gras ; cet acide gras possédant une chaîne carbonée dont le nombre de carbone est compris entre 12 et 26. Préférentiellement selon l'invention, les groupements R et/ou R' possèdent une chaîne carbonée à 16, 17 ou 18 atomes de carbone. C'est-à-dire que les acides gras constitutifs du diacylglycérol seront constitués de 16 à 18 atomes de carbones.

Les groupements R et R' peuvent être des chaînes carbonées linéaires ou ramifiées, et/ou saturées ou insaturées, le nombre d'insaturation étant compris entre 1 et 6. Les groupements R et R' peuvent être aussi des chaînes mono- ou poly- hydroxylées, et/ou

mono- ou poly- méthoxylées, et/ou mono- ou poly-oxydées, et/ou mono- ou poly-époxylées. En résumé, les groupements R et R' peuvent se présenter sous les différentes formes naturellement présentes dans les matières grasses.

Préférentiellement selon l'invention, le diacylglycérol présent dans la composition est le 1,2 – diacylglycérol de formule :



Les diacylglycérols (DAG) sont des composés très étudiés, entre autres, pour leurs propriétés de marqueur. Ils occupent un rôle fondamental, notamment par l'action qu'ils exercent sur une protéine kinase C, et ont ainsi une fonction d'activateur cellulaire.

Les DAG existent sous la forme de plusieurs isomères : le 1,2-DAG et le 1,3-DAG. Ces isomères ont différentes origines ; en effet, l'isomère 1,2-DAG est attribué à une synthèse incomplète de triglycérides, (esters du glycérol à trois acides gras, TG), en particulier dans les huiles végétales ; tandis que les isomères 1,3 sont dus à une hydrolyse enzymatique ou chimique des triacylglycérols (durant le procédé d'extraction de l'huile par exemple).

Les DAG selon l'invention sont préférentiellement les 1,2-DAG. Ces DAG sont obtenus à partir de triglycérides, composés représentant la forme de réserve lipidique la plus commune de l'organisme, ils sont, en effet, les constituants les plus importants des matières grasses.

La méthode réactionnelle, utilisée selon la présente invention afin d'obtenir les DAG, peut être une réaction chimique effectuée en milieu acide ou alcalin comme, par exemple, une hydrolyse des matières grasses constituées de triglycérides. Cette hydrolyse peut encore être réalisée de manière enzymatique comme, par exemple, une réaction biochimique qui utilise une hydrolase telle qu'une lipase.

Les DAG constituants l'association selon l'invention pourront être obtenus à partir de différents types de matières grasses. Les matières grasses concernées dans la présente application peuvent être des huiles animales, végétales ou de synthèse, composées de triglycérides, triesters du glycérol et/ou d'acides gras. A titre d'exemple on peut citer des corps gras animaux, le suif, les huiles de poisson. On peut citer aussi les huiles d'origine

végétale, telles que, par exemple, l'huile d'olive, l'huile de colza, de soja, de maïs, de palme, de macadamia ou encore l'huile de tournesol, l'huile de graines de coton, l'huile de lin, l'huile de ricin, l'huile de carthame, l'huile d'amande douce etc. Ces huiles peuvent aussi être des huiles modifiées de manière chimique par trans-estérification ou tout autre procédé qui conserve la structure des triesters de glycérol.

Préférentiellement, les DAG utilisés dans la présente invention sont obtenus à partir de triglycérides ayant subi une hydrolyse enzymatique, notamment par des lipases, afin d'aboutir à du 1,2-DAG.

Les lipases sont des enzymes qui hydrolysent les esters du glycérol. On détermine plusieurs types de lipase en fonction de leur différent niveau de vitesse de réaction. On peut aussi classer ces enzymes en plusieurs groupes, en fonction de leurs différentes spécificités : spécificité vis à vis du substrat ; spécificité de position ou régiosélective ; spécificité vis à vis de la nature des acides gras ou typosélectivité ; spécificité vis à vis d'une position ou stéréospécificité.

Certaines lipases n'ont pas de spécificité particulière. D'autres sont régiosélectives : ainsi, par exemple, la lipase pancréatique et les lipases d'origine microbienne, d'*Aspergillus* ou de *Rhysopus*, sont des lipases 1,3. Les lipases régiosélectives sont d'un usage industriel courant aussi bien dans l'industrie des corps gras que dans les détergents. D'autres lipases sont stéréospécifiques comme la lipase de *Candida* qui possède une stéréospécificité de type *sn*2. La nomenclature *sn* détermine les positions *sn*1, *sn*2 et *sn*3 du squelette des triglycérides en fonction de la configuration du carbone asymétrique présenté en projection de Fisher

Dans la présente invention, on utilise, d'une manière préférentielle, une lipase stéréospécifique de type *sn*3. Cette lipase hydrolyse ainsi les triglycérides en formant préférentiellement du 1,2-diacylglycérol. La lipase utilisée peut être d'origine végétale (*Carica papaya)* ou microbienne (*Penicellium cyclopium).* Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, l'hydrolyse des triglycérides est réalisée avec une lipase de *Carica papaya* (*Villeneuve et al. JAOCS, 72, 6:753.1996*).

Les alcools gras sont des alcools aliphatiques à longue chaîne hydrocarbonée présentant une seule fonction hydroxyle en position terminale. Par un alcool gras, on entend les composés de formule (II) :

(II) R" – OH

dans laquelle R" représente la chaîne aliphatique d'un alcool gras. Cet alcool gras étant constitué par une chaîne carbonée comportant de 10 à 34 atomes de carbone.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les alcools gras possèdent une chaîne carbonée dont le nombre de carbone est compris entre 12 à 26. Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, l'alcool gras possède sur sa chaîne aliphatique entre 16 et 22 atomes de carbone.

Ainsi, ces alcools gras seront, de manière préférentielle, choisis parmi le groupe constitué d'alcool gras à chaîne aliphatique de taille moyenne, saturé ou insaturé.

Par ailleurs, la chaîne aliphatique des alcools gras, c'est-à-dire le groupement R", peut être une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée, et/ou saturée ou insaturée, le nombre d'insaturation étant compris entre 1 et 6. Le groupement R" peut être aussi une chaîne mono- ou poly- hydroxylée, et/ou mono- ou poly-méthoxylée, et/ou mono- ou poly-oxydée, et/ou mono- ou poly-époxylée. Elle pourra ainsi être présente sous toutes les formes naturelles existantes.

Ces alcools gras se trouvent en grande quantité dans les cires. Ces cires pouvant être d'origine animale, comme par exemple la cire d'abeille, d'origine végétale, comme la cire de jojoba, de carnauba, de candellila, ou encore d'origine minérale.

Ainsi, par exemple, l'hydrolyse contrôlée de la cire de l'huile de jojoba (cire qui constitue plus de 96 % de l'huile de jojoba) a pour effet de libérer les principaux alcools gras aliphatiques contenus dans celle-ci, ce qui permet d'obtenir un mélange d'alcools gras, à chaîne hydrocarbonée linéaire saturée ou insaturée.

En particulier, l'hydrolyse de l'huile de jojoba permet d'obtenir un mélange d'alcools gras d'un haut degré de pureté comportant, dans leur chaîne aliphatique, entre 16 et 22 atomes de carbone. Cette hydrolyse permet ainsi de concentrer tous les principes actifs qui sont susceptibles d'agir sur la peau.

D'une manière plus générale, il est possible d'obtenir des alcools gras à partir de l'hydrolyse suivie d'une réduction de n'importe quel acide gras. Ainsi, les alcools gras selon l'invention pourront être obtenus à partir d'acides gras. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les alcools gras seront obtenus à partir de cires. Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les alcools gras pourront être issus d'huiles végétales.

Les huiles les plus courantes sont constituées d'acides gras comportant de 12 à 26 atomes de carbones dans leur chaîne aliphatique, le plus souvent ce sont des acides gras comportant entre 16 et 18 atomes de carbone, ces acides gras peuvent être saturés ou insaturés. L'extrait lipidique ainsi hydrolysé et réduit conduira à des alcools gras possédant, sur leur chaîne aliphatique, des groupements comportant de 12 à 26 atomes de carbone.

Les alcools gras selon l'invention seront préférentiellement obtenus à partir d'une hydrolyse des cires présentes dans l'huile de jojoba (*Simmondsia chinensis).* Cette hydrolyse permettant de libérer les alcools gras constitutifs de cette cire. Cette hydrolyse peut être effectuée de manière chimique en milieu alcalin ou acide. Dans le cas d'une hydrolyse alcaline, les alcools gras, composant la fraction dite insaponifiable, seront récupérés classiquement par extraction avec un solvant non miscible à l'eau. L'hydrolyse de ces cires peut être également réalisée de manière enzymatique.

Une possibilité particulièrement avantageuse du procédé d'obtention de l'association selon l'invention consiste à réaliser cette opération simultanément à l'hydrolyse des triglycérides générant les diacylglycérols et en utilisant la même lipase.

Préférentiellement selon l'invention, les actifs constituant l'association, c'est-à-dire le diacylglycérol et/ou les alcools gras, seront d'origine végétale, c'est-à-dire qu'ils seront obtenus à partir de matière première d'origine végétale.

Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les diacylglycérols pourront être obtenus à partir d'huile d'origine végétale, comme par exemple l'huile d'olive. Les alcools gras seront aussi issus de végétaux, notamment des cires végétales. Ainsi, de manière préférentielle, les alcools gras selon l'invention pourront être obtenus à partir de cires constitutives des huiles végétales, telles que, par exemple, l'huile de Jojoba.

Selon l'invention, le terme "principe actif" peut se définir comme étant toute molécule ou tout ensemble de molécule susceptible d'apporter des modifications ou des modulations au fonctionnement d'un système biologique.

Selon un mode de réalisation particulier de la composition de l'invention, l'association sera réalisée dans des proportions particulières. Ainsi, la quantité de diacylglycérol représentera entre 0,1 et 99 % de l'association, l'alcool gras pouvant être présent en des quantités représentant entre 0,01 et 30 % du poids total du mélange constituant l'association. Préférentiellement le diacylglycérol représentera entre 55 et 95 % de

l'association, l'alcool gras sera présent en des quantités représentant entre 3 et 20 % du poids total de l'association.

Bien entendu, la quantité efficace de principe actif correspond à la quantité nécessaire afin d'obtenir le résultat désiré.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le diacylglycérol de formule (I) précité est présent, à l'état pur, dans les compositions de l'invention en une quantité représentant de 10^{-6} % à 20 % du poids total de la composition, et préférentiellement en une quantité représentant de 10^{-3} % à 1 % du poids total de la composition finale.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'alcool gras de formule (II) précité est présent, à l'état pur, dans les compositions de l'invention en une quantité représentant de 10^{-6} % à 10 % du poids total de la composition, et préférentiellement en une quantité représentant de 10^{-4} % à 1 % du poids total de la composition finale.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, les composés actifs précités sont préalablement solubilisés ou dispersés dans un ou plusieurs solvants cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables comme l'eau, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol, le propylène glycol, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques, la vaseline, une huile végétale ou tout mélange de ces solvants.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, les composés actifs précités sont préalablement solubilisés dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les liposomes ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisés dans, ou fixés sur, tout vecteur cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de la composition cosmétique ou dermatologique ou pharmaceutique selon l'invention, la composition contiendra entre 60 et 95 % d'un excipient qui sera par exemple de la vaseline ou tout autre corps gras qui permettra une bonne solubilisation des composés actifs précités. Préférentiellement, la composition contiendra entre 80 et 90 % de cet excipient.

Par composés actifs précités, on entend les composés tels que définis précédemment, c'est-à-dire le diacylglycérol de formule (I) et les alcools gras de formules (II), ou encore tout mélange ou préparation les contenant.

La composition selon l'invention peut être une composition cosmétique ou dermatologique ou pharmaceutique. Préférentiellement selon l'invention, la composition est une composition cosmétique, car elle est destinée à améliorer l'aspect et les performances cutanées générales de l'individu qui en fait usage.

La composition selon l'invention est préférentiellement une composition cosmétique et/ou dermatologique adaptée à l'administration par voie topique cutanée comprenant un milieu cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

Il est bien évident que l'invention s'adresse aux mammifères en général et plus particulièrement aux êtres humains.

Quelle que soit la forme de l'invention, la composition selon l'invention peut être ingérée, injectée ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps), les cheveux, les ongles ou les muqueuses. Selon le mode d'administration, la composition selon l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées.

Préférentiellement, les compositions selon la présente invention se présenteront sous une forme galénique adaptée à l'administration par voie topique cutanée, et couvrent toutes les formes cosmétiques ou dermatologiques. Ces compositions doivent donc contenir un milieu cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau, les poils ou les cheveux.

Ces compositions pourront notamment se présenter sous forme d'une solution aqueuse, hydralcoolique ou huileuse ; d'une émulsion huile-dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples ; elles peuvent aussi se présenter sous forme de crèmes, de suspensions, ou encore de poudres, adaptées à une application sur la peau, les muqueuses, les lèvres et/ou les cheveux.

Ces compositions peuvent être plus ou moins fluides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse. Elles peuvent aussi se présenter sous forme solide, comme un stick ou être appliquées sur la peau sous forme d'aérosol. Elles peuvent être utilisées comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage de la peau.

Pour l'injection, la composition selon l'invention peut se présenter sous forme de lotion aqueuse, huileuse ou sous forme de sérum. Pour l'application sur les yeux, la composition peut se présenter sous forme de gouttes et pour l'ingestion, elle peut se présenter sous forme de capsules, de granulés, de sirops ou de comprimés.

Ces compositions comprennent, en outre, tout additif usuellement utilisé dans le domaine d'application envisagé ainsi que les adjuvants nécessaires à leur formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des anti-oxydants, des colorants, des filtres solaires, des agents auto-bronzants, des pigments, des charges, des conservateurs, des parfums, des absorbeurs d'odeur, des actifs cosmétiques ou pharmaceutiques, des huiles essentielles, des vitamines, des acides gras essentiels, des tensioactifs, des polymères filmogènes, etc.

Dans tous les cas, l'homme du métier veillera à ce que ces adjuvants ainsi que leurs proportions soient choisis de telle manière à ne pas nuire aux propriétés avantageuses recherchées de la composition selon l'invention. Ces adjuvants peuvent, par exemple, correspondre de 0,01 à 20 % du poids total de la composition.

Lorsque la composition de l'invention est une émulsion, la phase grasse peut représenter de 5 à 80 % en poids et de préférence de 5 à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les émulsionnants et co-émulsionnants utilisés dans la composition seront choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. Par exemple, ils peuvent être utilisés en une proportion allant de 0,3 à 30 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

Bien entendu, l'homme du métier veillera à choisir les éventuels composés complémentaires, actifs ou non-actifs, et/ou leurs quantités, de telle sorte que les propriétés avantageuses du mélange ne soient pas, ou sensiblement pas, altérées par l'adjonction envisagée.

Les compositions selon l'invention trouvent une application notamment comme compositions cosmétiques ou pharmaceutiques pour la peau, les muqueuses et/ou les semi-muqueuses. Elles trouvent une application toute particulière en tant que produit de protection et/ ou de soin de la peau, ou encore en tant que composition anti-ride et/ou anti-âge. On peut également envisager une application dans le domaine des compositions de maquillage de la peau du visage et du corps, telles que les rouges à lèvres, les fonds de teint, les crèmes teintées, les sticks anti-cernes, ou les compositions anti-solaires ou de bronzage artificiel.

Les compositions, objet de l'invention, trouvent leur application dans grand nombre de traitements notamment cosmétiques ou dermatologiques, et elles peuvent constituer une composition cosmétique, notamment pour le traitement, la protection, le soin, le

démaquillage et/ou le nettoyage de la peau, des lèvres et/ou des cheveux, et/ou pour le maquillage de la peau, des lèvres, des cils et/ou du corps.

La composition selon l'invention peut également consister en des préparations solides comprenant également des savons ou des pains de nettoyage. La composition peut être aussi conditionnée sous forme d'une composition pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression. La composition peut être aussi à usage bucco-dentaire, par exemple une pâte de dentifrice. La composition de l'invention peut aussi être une composition cosmétique destinée à une administration par voie orale. Pour une administration par voie orale, la composition selon l'invention peut se présenter sous toutes formes adaptées, particulièrement sous forme d'une solution buvable, d'un sirop, d'un comprimé, d'une dragée, d'une gélule, ou encore d'un complément nutritionnel.

Selon l'invention, on peut, entre autres, ajouter à la composition de l'invention d'autres agents actifs destinés notamment à la prévention et/ou au traitement des manifestations cutanées du vieillissement et/ou à la protection de la peau contre les agressions extérieures.

L'invention a également pour objet l'utilisation, comme ingrédient actif, de l'association d'au moins un composé de diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), dans ou pour la préparation d'une composition, l'association ou la composition étant destinées à traiter, de manière curative et/ou préventive, les signes cutanés du vieillissement ainsi qu'à améliorer l'aspect de la peau et/ou des phanères.

D'une manière plus générale, la composition selon l'invention aura une activité efficace dans tous les soins de la peau et/ou des phanères. Par les soins de la peau et/ou des phanères, on entend toutes les actions destinées à conserver ou à rétablir un bon fonctionnement de la peau et/ou des phanères ou encore tout moyen qui sert à préserver ou à améliorer leur apparence et/ou leur aspect. Ainsi le soin inclut l'hydratation, l'apaisement, la protection contre tous types d'agression, notamment la protection solaire, la lutte et la prévention des manifestations du vieillissement, notamment les manifestations cutanées du vieillissement. Par manifestations cutanées du vieillissement on entend toutes modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement comme, par exemple, les rides et ridules, la peau flétrie, la peau molle, la peau amincie, le manque d'élasticité et/ou de tonus de la peau, la peau terne et sans éclat mais également toutes modifications internes de la peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié comme, par exemple, toutes dégradations internes de la peau consécutives à une

exposition aux rayonnements ultra-violets. Par l'expression "améliorer l'aspect de la peau", on entend tous les phénomènes qui sont susceptibles d'avoir pour conséquence une amélioration visuelle de l'état de la peau. La peau présentera une meilleure apparence ; elle sera, par exemple, beaucoup plus belle, ferme et/ou lisse. Toutes les petites imperfections seront diminuées ou supprimées. L'aspect papyracé de la peau sera, par exemple, atténué.

Il a été constaté que l'association selon l'invention possède de nombreuses actions au niveau de la peau, notamment qu'elle permet de lutter contre les phénomènes du vieillissement cutané et qu'elle permet de protéger la peau contre tous types d'agressions extérieures. Ainsi, l'association selon l'invention peut être destinée à protéger les substrats kératiniques, et plus particulièrement à protéger la peau et/ou les phanères contre tous les types d'agressions extérieures.

L'utilisation de ce mélange, ou d'une composition le contenant, va permettre aux substrats kératiniques d'être protégés et de mieux résister au stress que produit sur eux l'environnement. On entend par le terme "agression extérieure" les agressions que peut produire l'environnement. Ces agressions peuvent être d'origine chimique, physique, biologique ou thermique. A titre d'exemple, on peut citer des agressions telles que la pollution, les UV, les frottements, l'eau à forte concentration de calcaire, les variations de température ou encore les produits à caractère irritant tels que les tensioactifs, les conservateurs ou les parfums.

L'association de composés selon l'invention permet d'augmenter la synthèse d'ATP intracellulaire des cellules de la peau (notamment les fibroblastes et les kératinocytes). Cette augmentation de la concentration d'ATP est très bénéfique à la cellule car la concentration d'ATP intracellulaire est étroitement liée à tous les phénomènes du vieillissement cutané et de stress de la cellule. L'invention a donc pour autre objet l'utilisation de l'association telle que définie précédemment, ou d'une composition cosmétique la comprenant, afin d'augmenter la synthèse d'ATP intracellulaire des cellules de la peau et, notamment, celle des fibroblastes du derme.

Des tests ont aussi démontré que l'association, telle que définie précédemment, permet d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire. Les composés selon l'invention peuvent donc aussi être utilisés dans le but d'augmenter la concentration intracellulaire de calcium des cellules de la peau, ce qui permet d'activer différents mécanismes favorables à la cellule pour l'aider à lutter contre le stress et le vieillissement.

Ces composés possèdent donc une action favorable au niveau du métabolisme énergétique des cellules de la peau, ainsi qu'une activité cytostimulante. Ils sont avantageusement utilisés en tant qu'agent de soin et de traitement pour la peau et/ou les phanères permettant d'activer le métabolisme énergétique cellulaire. Par agent permettant d'activer le métabolisme énergétique cellulaire, on entend, par exemple, des composés capables d'augmenter la synthèse d'ATP intracellulaire des cellules de la peau ou encore capables d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire. En effet, il a été démontré que les composées selon l'invention permettent d'augmenter la synthèse d'ATP intracellulaire; mais aussi qu'ils sont capables de provoquer une hausse de la concentration du calcium intracellulaire des cellules de la peau. Cette stimulation permet d'activer différents mécanismes favorables à la cellule, notamment afin de l'aider à lutter contre le stress et le vieillissement. L'association selon l'invention peut aussi avoir une action anti-oxydante.

Il a été mis en évidence de nombreuses propriétés de la composition selon l'invention. En effet, telles que les expériences le démontrent dans les exemples, l'association selon l'invention a des effets bénéfiques sur la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire. L'invention a donc pour autre objet l'utilisation, comme ingrédient actif, de l'association d'au moins un composé de diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), dans ou pour la préparation d'une composition, l'association ou la composition étant destinées à augmenter la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire.

Par protéines de la matrice extracellulaire, on entend, par exemple, des protéines telles que le collagène, la fibronectine ou encore l'élastine. Plus particulièrement l'association selon l'invention permet d'augmenter de manière importante la synthèse de fibronectine.

De la même manière, il a été démontré que l'association possède des effets bénéfiques sur la synthèse des protéines des kératinocytes. L'invention a donc pour autre objet l'utilisation de l'association, comme ingrédient actif, d'au moins un composé de diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), dans ou pour la préparation d'une composition, l'association ou la composition étant destinées à augmenter la synthèse de kératines.

L'association selon l'invention a donc une action efficace sur la barrière cutanée, l'association selon l'invention augmente donc la fonction de barrière cutanée de la peau. De plus, elle favorise ainsi la régénération tissulaire.

Un autre objet de l'invention est donc l'utilisation, comme ingrédient actif, de l'association d'au moins un composé de diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), dans ou pour la préparation d'une composition, l'association ou la composition étant destinées favoriser la différenciation cellulaire, et plus particulièrement, la différenciation cellulaire des cellules cutanées. De plus, l'association ou la composition selon l'invention pourront être utilisées afin d'augmenter la régénération tissulaire et/ou la cicatrisation de la peau.

Par ailleurs, l'invention concerne aussi l'utilisation, comme ingrédient actif, de l'association d'au moins un composé de diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), dans ou pour la préparation d'une composition, l'association ou la composition étant destinées à traiter les manifestations de l'inflammation et de l'irritation cutanée. La composition est, en effet, très bien adaptée aux soins des peaux sensibles et fragiles.

Ces diverses propriétés peuvent être utilisées notamment pour réaliser des compositions destinées à protéger la peau contre les agressions extérieures provoquées notamment par l'action du rayonnement solaire ou par d'autres agents physiques, chimiques ou biologiques, ou encore des compositions permettant de lutter contre le vieillissement de la peau, permettant de l'entretenir et de la soigner.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de traitement cosmétique pour traiter les peaux, notamment les peaux âgées et/ou pour combattre les phénomènes de vieillissement cellulaire consistant à appliquer sur la surface de la peau une quantité efficace de la composition telle que définie précédemment afin obtenir l'action désirée. La présente invention concerne, de la même manière, un procédé de traitement cosmétique afin de protéger la peau et/ou les phanères contre tous types d'agressions extérieures. Selon un autre aspect de l'invention, la présente invention concerne un procédé de traitement cosmétique afin de favoriser la différenciation cellulaire et/ou de favoriser la régénération tissulaire et/ou de renforcer la barrière cutanée de la peau et/ou des phanères.

Des modes de réalisation particuliers de ce procédé de traitement cosmétique résultent également de la description précédente.

Le procédé de traitement cosmétique de l'invention peut être mis en œuvre notamment en appliquant les compositions cosmétiques telles que définies ci-dessus, selon la technique d'utilisation habituelle de ces compositions, par exemple : application de crèmes,

de gels, de sérums, de lotions, de laits, de shampooings ou de compositions anti-solaires, sur la peau ou sur les cheveux, ou encore, application de dentifrice sur les gencives.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples donnés à titre illustratif et non limitatif.

Exemple 1 – Préparation d'une composition contenant du 1,2-diacylglycérol et des alcools gras d'origine végétale.

A – Le mélange peut être préparé en deux étapes distinctes, puis en réunissant, par simple mélange, les produits issus de ces deux procédés dans des proportions adéquates.

Les DAG sont préparés à partir d'un kilogramme d'huile d'olive et d'une quantité d'eau, ou de solution tampon, représentant de 1 % à 200 % du volume de l'huile (préférentiellement 150 %). Dans une cuve thermostatée, ce mélange est maintenu à une température comprise entre 30 et 70°C, préférentiellement à une température de 50°C. Le pH est compris entre 4 et 9, il est préférentiellement égal à 7,5. Ce mélange est maintenu sous agitation en présence d'une lipase issue de *Carica papaya,* dont la quantité est comprise entre 0,5 et 30 % du volume d'huile mis en oeuvre. La quantité d'enzyme utile dépend du degré de pureté de la lipase utilisée. La réaction est possible avec du suc de papaye brut, toutefois il est préférable d'utiliser une préparation purifiée de ce suc après solubilisation en milieu aqueux, conservée dans un polyol ou lyophilisée.

L'agitation et la température sont maintenues pendant une durée comprise entre une et six heures, c'est-à-dire pendant un temps suffisant pour que la quantité de diacylglycérol formée soit maximale. Le suivi de la réaction est effectué par la détermination d'indices classiques dans l'industrie des corps gras (comme par exemple des indices d'acide et d'hydroxyle) et par l'utilisation de méthodes chromatographiques pour la détermination de la concentration en diacylglycérol.

L'huile hydrolysée peut être ensuite utilisée en l'état, toutefois l'hydrolyse totale des triglycérides en diacylglycérols n'est, le plus souvent, pas complète. Le milieu réactionnel est donc constitué, principalement, de triglycérides non transformés, d'acides gras libres, de monoglycérides et de diacylglycérols de type 1, 2 et 1,3. Il est donc préférable de purifier cette huile afin d'augmenter la teneur en diacylglycérol de type 1,2. Classiquement les acides gras libres peuvent être éliminés sous forme de savon par lavage par une solution

aqueuse basique. Les autres composés sont séparés grâce à des techniques de précipitation, de distillation ou de chromatographie industrielle.

Les alcools gras sont préparés en hydrolysant une quantité d'un kilogramme d'huile de jojoba en présence de cinq volumes de potasse éthanolique 2M. L'hydrolyse s'effectue à reflux, pendant une durée de deux à quatre heures. Lorsque la réaction est terminée, vingt litres d'eau sont ajoutés au mélange réactionnel.

La fraction contenant les alcools gras est extraite par trois fois avec deux litres d'hexane, de dichlorométhane ou de tertiobutylméthyléther. Les fractions organiques sont, par la suite, réunies puis évaporées. On recueille alors environ 400 grammes d'une huile jaune constituée à plus de 90 % d'alcools gras.

Dans une dernière étape, on mélange, par exemple, un volume de la préparation contenant les alcools gras pour 20 volumes de la préparation contenant les DAG, telle qu'obtenue précédemment. On obtient alors une composition contenant, approximativement, 80 % de 1,2-DAG et 20 % d'alcool gras.

B - Une autre possibilité de préparation du mélange constituant la composition selon l'invention, est de produire simultanément, dans un même procédé, les DAG et les alcools gras.

Les DAG et les alcools gras sont préparés à partir de 1 kg d'huile d'olive et de 250 g d'huile de jojoba. L'hydrolyse de ce mélange est effectuée de la même manière que pour les DAG, c'est-à-dire de la même manière que précédemment.

Le mélange d'huile et de cires hydrolysées peut être ensuite utilisé en l'état, toutefois l'hydrolyse totale des triglycérides et de la cire n'est, le plus souvent, pas complète. Le milieu réactionnel est donc constitué, principalement, de triglycérides non transformés, de monoglycérides d'alcool gras et d'acide gras, et de diacylglycérols de type 1, 2 et 1,3.

Il est donc préférable de purifier cette huile afin d'augmenter la teneur en diacylglycérols de type 1,2 et en alcools gras. Les autres composés peuvent, de la même manière que précédemment, être séparés grâce à des techniques de précipitation, de distillation ou de chromatographie industrielle.

On obtient alors un mélange contenant essentiellement du 1,2-diacylglycérol et des alcools gras.

Exemple 2 – Mise en évidence de l'effet de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur la synthèse d'ATP.

Le but de cette étude est de déterminer l'influence de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur la production d'ATP par les cellules de la peau. Cette étude s'effectue à l'aide d'un Kit : "ATP Bioluminescence Assay Kit HS II", qui permet d'apprécier le taux d'ATP intracellulaire.

Des fibroblastes et des cellules humaines HaCat ont été cultivés puis mis en culture dans des plaques à 12 puits. Lorsque les cellules sont arrivées à 60 % de confluence, des solutions contenant 0,3 % de la préparation de l'exemple 1 ont été appliquées sur les cellules pendant des durées de 5, 15 et 30 minutes, des tests contrôles ont été effectués en appliquant, sur les cellules, des solutions ne contenant pas d'actif.

A la fin du temps d'incubation, les plaques sont vidées, puis rincées avec du PBS froid puis 250 µL d'un tampon de lyse, fournis par le kit, sont ajoutés. Les cellules sont ensuite récoltées et chaque puits est rincé avec 500 µL de PBS froid. Une dilution au 1/1000ème est effectuée pour chaque condition, avec du PBS froid, avant chaque lecture. Le dosage d'ATP est réalisé sur ces échantillons : 50 µL de cette dilution sont déposés dans une luma-cuvette et 50 µL de luminol sont ajoutés. Après 10 secondes, la lecture de la luminescence est déclenchée. Les mesures sont effectuées à l'aide d'un appareil : le Biocounter M2010A LUMAC®/3M.

Les résultats expriment le pourcentage d'augmentation de la luminescence, mesurée au bout de 15 minutes d'incubation, dans les cellules traitées avec les actifs par rapport aux cellules non traitées. Cette augmentation de luminescence exprime l'augmentation de la quantité d'ATP intracellulaire, la luminescence étant proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans les cellules.

	Augmentation de luminescence en %
Cellules HaCat	+ 320 %
Fibroblastes	+ 89 %

Ces résultats démontrent qu'en présence de l'association des deux actifs, la quantité d'ATP intracellulaire augmente significativement par rapport aux cellules non traitées avec les actifs.

Exemple 3 – Mise en évidence de l'effet de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur la quantité de calcium intracellulaire.

L'objectif de ce test est de démontrer l'influence de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur la quantité de calcium présente dans les cellules de la peau. Cette étude s'effectue par la technique d'imagerie confocale de fluorescence et à l'aide de sondes particulières qui permettent d'apprécier la quantité de calcium intracellulaire.

Des fibroblastes ont été cultivés puis mis en culture dans des boites de cultures de diamètres 35. Lorsque les cellules sont arrivées à 70 % de confluence, des solutions contenant 0,3 % de la préparation de l'exemple 1 sont appliquées sur les cellules, des tests contrôles ont été effectués en appliquant, sur les cellules, une solution ne contenant pas d'actif.

La sonde utilisée pour détecter le calcium est la sonde Fluo-4 AM (F-14217). Ces sondes ont la propriété d'exprimer une fluorescence d'intensité croissante lors de leur liaison avec le calcium. La sonde Fluo-4 est incubée pendant 20 minutes à raison de 5 µL à 1 mM dans 1,5 mL de milieu contenant les cellules. Les cellules sont rincées avec 2 mL de milieu, puis elles sont mises sous le microscope. Un état basal est mesuré pendant quelques secondes puis une solution contenant des actifs, ou une solution contrôle n'en contenant pas, est ajoutée. Des enregistrements sont effectués par microscopie confocale toutes les 6 secondes. Les actifs sont ajoutés après 3 stimulations qui enregistrent le taux basal, puis toutes les 6 secondes pendant 15 minutes.

Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1. La figure 1 illustre le résultat des mesures de fluorescence (en pixel), sur 4 cellules, en fonction du temps (en seconde). Ils mettent en évidence que, sur les cellules sélectionnées, une augmentation importante d'intensité de fluorescence est observée une minute après l'ajout des actifs. Cette augmentation d'intensité reflète l'augmentation de la quantité de calcium intracellulaire. Ce pic d'intensité est absent dans les cellules testées avec la solution ne contenant pas d'actif.

Ces résultats démontrent ainsi que l'association du 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras a une action positive sur la quantité de calcium intracellulaire. Cette association permet donc d'augmenter la quantité de calcium dans les cellules de la peau.

Exemple 4 – Mise en évidence par immunofluorescence de l'effet de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur l'expression de la fibronectine.

Le but de l'étude est de déterminer l'influence de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur la synthèse de fibronectine, par les fibroblastes, par la technique d'immunofluorescence.

L'immunofluorescence est une technique semi-quantitative qui permet d'apprécier le taux de chacune des protéines présentes dans le cytoplasme cellulaire.

Des fibroblastes humains sont ensemencés dans des Lab-teks® puis mis en culture pendant une nuit. Après aspiration du milieu, une composition contenant 0,3 % de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras tel que défini dans l'exemple 1, ou une composition contrôle ne contenant pas les actifs, est ajoutée. Les cellules sont ensuite incubées durant 24 h. Après élimination des surnageants et rinçage des cultures, les cellules sont fixées avec du méthanol pendant 4 minutes à 4°C puis rincées avec du tampon PBS. 200 µL d'anticorps anti-fibronectines sont alors ajoutés. L'incubation dure 2 heures à température ambiante. Les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au PBS. 200 µL d'anticorps secondaires, couplés à un marqueur fluorescent (la fluorescéine) sont ensuite additionnés. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au PBS. Les lames sont alors montées puis examinées au microscope à Epi-fluorescence. Les quantités de fibronectine, synthétisées par les cellules, sont proportionnelles à l'intensité de la fluorescence.

Les résultats obtenus démontrent que l'ajout de l'association de ces actifs dans le milieu de culture des fibroblastes a pour effet d'augmenter la synthèse de fibronectine par les cellules. Cette stimulation a été observée de manière importante. En effet, lorsque les fibroblastes sont incubés en présence de la composition contenant les actifs, on assiste au bout de 24 heures à une augmentation de l'intensité de la fluorescence traduisant ainsi une stimulation de la synthèse de la fibronectine par les fibroblastes.

Exemple 5 – Mise en évidence par immunofluorescence de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras sur l'expression de kératines.

Le but de l'étude est de déterminer l'influence de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras telle qu'obtenue dans l'exemple 1 sur la synthèse de kératines, par les kératinocytes, par la technique d'immunofluorescence.

Une étude par la technique d'immunofluorescence, identique à celle de l'exemple 4, a été effectuée sur des kératinocytes humains HaCat, avec des anticorps anti-kératines Pan cK.

Les résultats obtenus démontrent que l'ajout de l'association de 1,2-diacylglycérol et d'un alcool gras dans le milieu de culture des kératinocytes a pour effet d'augmenter la synthèse de kératine par les cellules. Cette stimulation a été observée de manière importante. En effet, lorsque les kératinocytes sont incubés en présence de la composition contenant les actifs, on assiste, au bout de 24 heures, à une augmentation de l'intensité de la fluorescence traduisant ainsi une stimulation de la synthèse de kératine par les kératinocytes.

Exemple 6 – Préparation de compositions

1 - Crème de jour (émulsion huile-dans-eau) :

Noms commerciaux	*Noms INCI*	*% massique*
	PHASE A	
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	5.00
Huile de Jojoba	Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil	3.00
Huile de Vaseline	Paraffinum Liquidum (Mineral Oil)	5.00
Isopropyl Palmitate	Isopropyl Palmitate	7.00
Extrait de l'exemple 1		0.30
	PHASE B	
Glycerine	Glycerin	5.00
Allantoïne	Allantoin	0.10
Sepigel 305	Polyacrylamide(and) C13-14 Isoparaffin (and) Laureth-7	0.30
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	qsp
Conservateur	Preservative	qsp
	PHASE C	
Parfum	Parfum (Fragrance)	qsp

Les phases A et B ont été chauffées à une température comprise entre 75 et 80°C. La phase A a été émulsionnée dans B, puis la phase C a été additionnée après refroidissement à partir de 30°C.

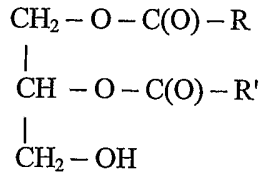
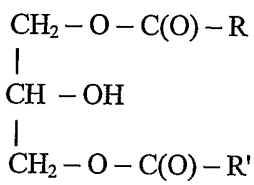
2 - Crème de nuit (émulsion eau-dans-huile) :

Noms commerciaux	*Noms INCI*	*% massique*
	Phase A	
Arlacel P 135	PEG-30 Dipolyhydroxystearate	2.00
Cetiol SN	Cetearyl Isononanoate	3.00
Parleam	Hydrogenated Polyisobutene	3.00
Estol 3609	Triethylhexanoin	9.00
Estol 1543	Ethylhexyl Palmitate	3.00
Extrait de l'exemple 1		0.50
	PHASE B	
Eau	Aqua (Water)	qsp
Atlas G-2330	Sorbeth-30	4.00
Sulfate de Magnesium 7 H_2O	Magnesium Sulfate	0.70
	PHASE C	
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben (and) Butylparaben (and) Isobutylparaben	0.50
	PHASE D	
Parfum	Parfum (Fragrance)	qsp

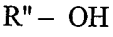
Les phases A et B ont été chauffées à une température de 75 et 80°C. La phase B a été émulsionnée dans A sous agitation, puis le mélange a été refroidi jusqu'à 40°C par une agitation intense. Puis la phase C a été additionnée et le refroidissement a été poursuivi, sous agitation, jusqu'à une température ambiante. La phase D a en suite été introduit à une température située en dessous de 30°C.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique et/ou dermatologique et/ou pharmaceutique comprenant, comme principe actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins l'association d'un diacylglycérol de formule (I) :

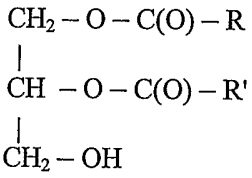
(I)  ou 

dans laquelle R et R' représentent la chaîne aliphatique d'un acide gras possédant une chaîne carbonée dont le nombre de carbone est compris entre 12 et 26 ;
et d'au moins un alcool gras de formule (II) :

(II) 

dans laquelle R" représente la chaîne aliphatique d'un alcool gras possédant une chaîne carbonée dont le nombre de carbone est compris entre 10 à 34.

2. Composition selon la revendication 1 caractérisée par le fait que le diacylglycérol est le 1,2 – diacylglycérol de formule :



3. Composition selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce que les groupements R, R' et/ou R" sont des chaînes aliphatiques linéaires ou ramifiées ; et/ou saturées ou insaturées, le nombre d'insaturation étant compris entre 1 et 6 ; et/ou mono- ou poly-hydroxylées ; et/ou mono- ou poly-méthoxylées ; et/ou mono- ou poly-oxydées ; et/ou mono- ou poly-époxylées.

4. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisée par le fait que les groupements R et/ou R', possèdent sur leur chaîne carbonée 16, 17 ou 18 atomes de carbone.

5. Composition l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée par le fait que les alcools gras possèdent une chaîne carbonée comportant de 12 à 26 atomes de carbone, préférentiellement, de 16 et 22 atomes de carbone.

6. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que le diacylglycérol de formule (I) et/ou l'alcool gras de formule (II) sont d'origine végétale.

7. Composition selon la revendication 6 caractérisée en ce que le diacylglycérol de formule (I) est obtenu à partir d'une huile d'origine végétale, et notamment à partir de l'huile d'olive.

8. Composition selon la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce que l'alcool gras de formule (II) est obtenu à partir d'huile d'origine végétale, et notamment à partir de l'huile de jojoba.

9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que le diacylglycérol est présent dans des proportions représentant entre 0,1 et 99 % et l'alcool gras dans des proportions représentant entre 0,01 et 30 % du poids total du mélange constituant l'association ; préférentiellement le diacylglycérol représente entre 55 et 95 % et l'alcool gras entre 3 et 20 % du poids total de l'association.

10. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que le diacylglycérol de formule (I), à l'état pur, est présent en une quantité représentant de 10^{-6} % à 20 % du poids total de la composition, préférentiellement en une quantité représentant de 10^{-3} % à 1 % du poids total de la composition finale.

11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que l'alcool gras de formule (II), à l'état pur, est présent en une quantité

représentant de 10^{-6} % à 10 % du poids total de la composition, et préférentiellement en une quantité représentant de 10^{-4} % à 1 % du poids total de la composition finale.

12. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme d'une composition cosmétique et/ou dermatologique adaptée à l'administration par voie topique cutanée, pour la peau, les muqueuses et/ou les phanères, comprenant un milieu cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

13. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que les composés actifs sont préalablement solubilisés ou dispersés dans un ou plusieurs solvants cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptables comme l'eau, l'éthanol, le propanol ou l'isopropanol, le propylène glycol, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques, la vaseline, une huile végétale ou tout mélange de ces solvants.

14. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisée en ce que les composés actifs sont préalablement solubilisés dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les liposomes ou adsorbés sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisés dans, ou fixés sur, tout vecteur cosmétiquement ou pharmaceutiquement acceptable.

15. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme d'une solution aqueuse, hydralcoolique ou huileuse ou sous la forme d'une émulsion huile-dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples ou sous forme de crème, de suspensions, ou encore poudres ; ces compositions pouvant être plus ou moins fluides ou solides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte, d'une mousse ou d'un stick.

16. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme

ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à traiter, de manière curative et/ou préventive, les signes cutanés du vieillissement, et/ou à améliorer l'aspect de la peau et/ou des phanères

17. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à protéger la peau et/ou les phanères contre les agressions extérieures, et/ou à renforcer la barrière cutanée de la peau.

18. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à augmenter la synthèse de protéines de la matrice extra-cellulaire.

19. Utilisation selon la revendication 18, caractérisée en ce que l'association ou la composition sont destinées à augmenter la synthèse de fibronectine.

20. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à augmenter la synthèse de kératine.

21. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à augmenter la synthèse d'ATP dans les cellules de la peau.

22. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la

composition étant destinées à augmenter la concentration de calcium intracellulaire dans les cellules de la peau.

23. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à favoriser la régénération tissulaire et/ou la cicatrisation de la peau.

24. Utilisation de l'association d'au moins un diacylglycérol de formule (I) et d'au moins un alcool gras de formule (II), telle que définie dans les revendications 1 à 9, comme ingrédient actif, dans ou pour la préparation d'une composition ; l'association ou la composition étant destinées à augmenter la différenciation cellulaire des cellules cutanées.

25. Procédé de traitement cosmétique pour traiter les peaux âgées et/ou pour combattre les phénomènes du vieillissement cellulaire et/ou pour protéger la peau et/ou les phanères contre tous les types d'agressions extérieures et/ou pour favoriser la différentiation cellulaire et/ou pour favoriser la régénération tissulaire et/ou pour renforcer la barrière de la peau et/ou des phanères consistant à appliquer sur la surface de la peau et/ou des phanères une quantité efficace de la composition telle que définie selon les revendications 1 à 14.

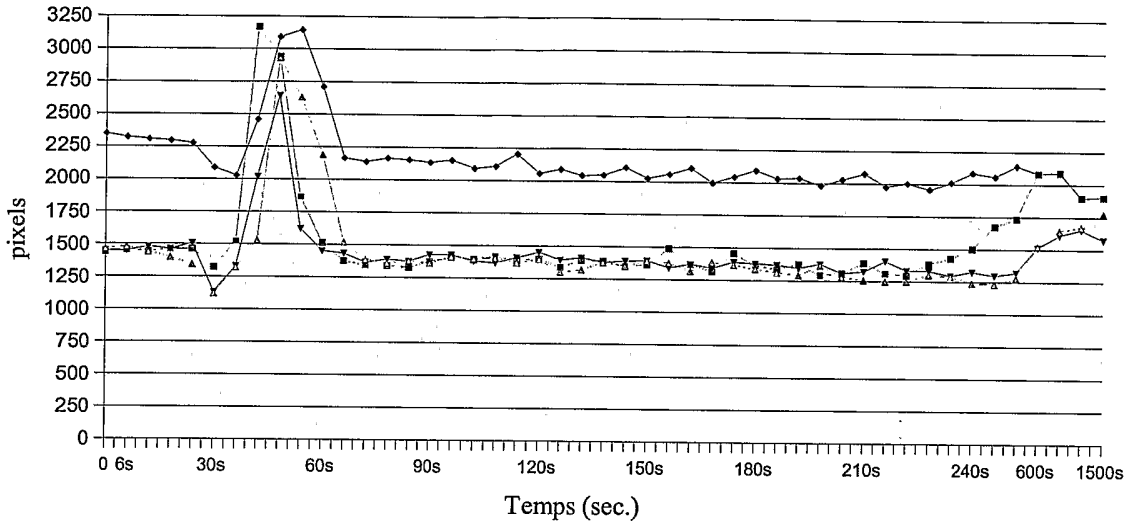

3250
3000
2750
2500
2250
2000
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
pixels
0 6s
30s
60s
90s
120s
150s
180s
210s
240s
600s
1500s
Temps (sec.)

FIGURE 1