(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) **N° de publication :** **2 857 596**
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) **N° d'enregistrement national :** **03 08796**

(51) Int Cl[7] : **A 61 K 35/78,** A 61 K 31/56, 7/48, 7/26, A 61 P 19/02, 17/02, 1/02

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION A1

(22) **Date de dépôt :** 18.07.03.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 21.01.05 Bulletin 05/03.

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

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

(71) **Demandeur(s) :** *LABORATOIRES EXPANSCIENCE Société anonyme* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** MSIKA PHILIPPE, PICCIRILLI ANTOINE et PICCARDI NATHALIE.

(73) **Titulaire(s) :**

(74) **Mandataire(s) :** REGIMBEAU.

(54) UTILISATION D'UNE COMPOSITION COSMETIQUE OU PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN EXTRAIT RICHE EN LUPEOL, A TITRE DE PRINCIPE ACTIF, POUR STIMULER LA SYNTHESE DES PROTEINES DE STRESS.

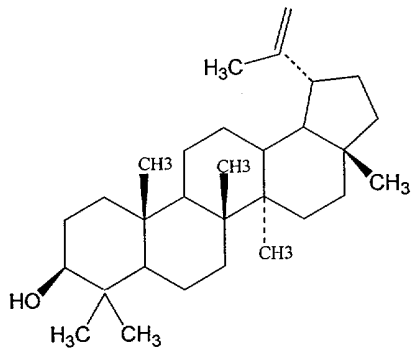
(57) La présente invention concerne l'utilisation d'un extrait riche en lupéol pour la fabrication d'une composition pharmaceutique ou cosmétique destinée à traiter et/ou prévenir une dégénérescence des tissus conjonctifs. Elle concerne également l'utilisation d'un extrait riche en lupéol pour la fabrication d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir et /ou traiter les pathologies articulaires non inflammatoires, les maladies parodontales, les vergetures. Elle concerne aussi l'utilisation d'un extrait riche en lupéol pour la fabrication d'une composition cosmétique en tant qu'agent cicatrisant, agent restructurant et agent anti-relâchement, de la peau et/ou des muqueuses.

FR 2 857 596 - A1

La présente invention concerne l'utilisation d'un extrait riche en lupéol pour la fabrication d'une composition pharmaceutique ou cosmétique destinée à traiter et/ou prévenir une dégénérescence des tissus conjonctifs.

Le lupin est une plante assez répandue, que l'on trouve en Europe, en Asie, ainsi qu'en Amérique du Nord et du Sud. Ce végétal est un proche parent du pois, de la fève, du soja et du haricot. Plusieurs espèces de lupin peuvent être citées comme étant les plus connues : lupinus albus (lupin blanc), lupinus angustifolius (lupin bleu), lupinus luteus (lupin jaune), lupinus mutabilis (lupin changeant), lupinus graecus, lupinus micranthus Guss, lupinus hispanicus, lupinus pilosus, lupinus cosentinii, lupinus atlanticus, lupinus princei et lupinus somaliensis. Une des espèces les plus courantes sur le territoire européen est le lupin blanc doux (lupinus albus), notamment la variété Arès présentant le gène pauper.

Le lupéol (1) appartient à la famille des triterpènes et plus particulièrement à celle des alcools triterpéniques.



(1)

Le lupéol présente un intérêt certain de par ses nombreuses activités biologiques. Il est notamment connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (Singh S. et coll., *Filoterapia*, 1997, 68, No. 1, 9) et analgésiques (De Miranda A. L. et coll., *Planta Med*, 2000, 66(3), 284), son action nephroprotectrice vis-à-vis des métaux lourds (Nagaraj M. et coll., *J. Appl. Toxicol*, 2000, 20(5), 413), son action anti-histaminique (De Medrano Villar M. J. et coll., *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, 1997, 19, No.

8, 515), ses activités anti-mitotiques (Zachariah R. et coll., *Indian J. Pharm. Sci.*, 1994, 56, No. 4, 129) et anti-virales (Kahlos K., *Filoterapia*, 1996, 67, No. 4, 344).

Le lupéol est aussi connu pour ses propriétés anti-oxydantes. En effet, le lupéol active la régénération des enzymes anti-oxydantes cutanées, qui ont été endommagées par les toxines environnementales. De plus, il est un agent chimiopréventif de la peau et il permet la suppression de la toxicité cutanée induite par le péroxyde de benzoyle (Saleem M, et al., 2001, Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor prevention induced by benzoyl peroxide in murine skin, *Pharmacol Res*, 43(2) :127-134).

Le lupéol permet le contrôle de la prolifération des kératinocytes, et il peut donc être utilisé dans des compositions anti-inflammatoires.

Il a également été trouvé que le lupéol permet de réduire efficacement les risques de formation de calculs et il est donc utilisé dans le traitement des maladies urinaires (Malini MM, et al. (2000) Protective effect of triterpenes on calcium oxalate crystal induced peroxidative changes in experimental urolithiasis. *Pharmacol Res*. 41(4) :413-418).

Le lupéol peut également être utilisé en tant qu'intermédiaire de synthèse, notamment pour la préparation de phyto-hormones et d'analogues de stéroides.

Le lupéol est présent dans de nombreux végétaux tels que l'Aloe vera ou l'écorce de Crataeva nurvala. Il a été isolé à plusieurs reprises à partir de plantes diverses comme le Bresk.

Il a également été extrait des coques de lupin. La demande de brevet FR 2 822 821 décrit un extrait de coques de graines de lupin contenant du lupéol, avantageusement, l'extrait présente un taux de lupéol supérieur à 30% en poids, de préférence supérieur à 50% en poids. De manière encore plus avantageuse, l'extrait de coques de graines de lupin présente un taux de lupéol compris entre 70 et 100%.

La demande de brevet FR 2 822 821 décrit également un procédé d'obtention d'un extrait de coques de graines de lupin, qui comprend au moins la succession d'étapes suivantes :

- broyage des coques de lupin,
- extraction des lipides totaux contenus dans les coques de lupin broyées à l'aide d'un solvant organique choisi dans le groupe constitué par les alcanes

aliphatiques, les alcanes aromatiques, les alcools aliphatiques et leurs dérivés halogénés, et

- purification des lipides obtenus pour obtenir un extrait riche en lupéol.

Les protéines du choc thermique (famille des HSP, Heat stress ou shock protein), ci après dénommées protéines de stress et abrégées HSP, sont présentent dans tous les organismes des bactéries jusqu'à l'homme. Il existe 5 groupes majeurs de HSP caractérisés par leur poids moléculaire :

- 20-30 kDa ;
- 50-60 kDa ;
- 70 kDa ;
- 90 kDa ; et
- 100-110 kDa.

L'ubiquitine, ainsi que l'hème oxygénase appartiennent également à la grande famille des HSPs.

Les HSP sont exprimées de manière constitutionnelle dans des conditions physiologiques et possèdent des activités basiques et indispensables à la synthèse protéique, tout en protégeant les cellules de nombreuses agressions telle qu'une élévation de température, le rayonnement ultra-violet, l'ischémie-reperfusion et l'apopotose.

La fonction chaperon des HSP est l'une des grandes fonctions protéiques à avoir été découverte. Initialement mise en évidence dans le cadre d'un stress thermique, la présence de ces protéines à un niveau déjà important dans toutes cellules en l'absence de stress a suggéré qu'elles participaient au repliement normal des protéines. Ces chaperones sont capables d'inhiber l'agrégation de protéines partiellement dénaturées et de les replier en utilisant de l'ATP. Elles empêchent les associations inappropriées de protéines, et sont impliquées dans le transport intracellulaire et la sécrétion des protéines.

L'HSP47 est une protéine localisée dans le réticulum endoplasmique des cellules (compartiment de la synthèse protéique) et elle se fixe spécifiquement sur différents types de collagène et de pro-collagène, notamment de type I, II, III, IV et V. L'HSP47 est impliquée dans le « système contrôle qualité » de la cellule, empêchant que cette

dernière ne sécrète du pro-collagène avec une structure inadéquate. Une corrélation entre sur-expression du collagène et de l'HSP47 a été démontrée chez l'homme.

Les collagènes représentent environ 30% des protéines totales et sont les constituants majeurs de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs tels que le derme (70% des protéines de la matrice extracellulaire), le cartilage ou le tissu conjonctif gingival (60 à 65% des protéines). A ce jour, 19 types de collagène différents ont été décrits. Par définition, ils possèdent des domaines en triple hélice en proportions variables et forment des structures organisées au sein de la matrice extracellulaire comme des fibrilles, des filaments ou des réseaux. Les collagènes sont synthétisés à partir d'un pro-collagène par les cellules conjonctives telles que les fibroblastes dermiques et gingivaux, ainsi que par les chondrocytes au niveau du cartilage articulaire. Les fibres de collagène synthétisées se renforcent et s'assemblent en faisceaux qui constituent la fibre collagène définitive et insoluble, qui pourra répondre dans l'avenir aux contraintes de traction.

Les tissus conjonctifs jouent un rôle majeur en tant que support et soutien pour les autres éléments constitutifs de l'organe et en tant qu'absorbeur de choc. Par exemple le tissu conjonctif gingival assure le soutien des dents. Au niveau cutané, le derme est notamment responsable de la fermeté de la peau.

Une dégénérescence des tissus conjonctifs, liée à une altération du réseau collagénique, telle qu'une inhibition de la synthèse du collagène et/ou du pro-collagène, une synthèse imparfaite du collagène et/ou du pro-collagène, une dégradation des fibres de collagène, une diminution du nombre des fibroblastes et de leur métabolisme, peuvent donc avoir des conséquences importantes.

La Demanderesse a découvert qu'un extrait riche en lupéol peut également être utilisé pour stimuler la synthèse des protéines de stress et plus particulièrement pour stimuler la synthèse de l'HSP47 (Heat Schock Protein 47) afin de traiter et/ou de prévenir la dégénérescence des tissus conjonctifs relative à des processus internes et/ou à des agressions extérieures.

La Demanderesse a ainsi découvert qu'un extrait riche en lupéol peut permettre de contrôler la structure normale du collagène, via la stimulation de la synthèse de

l'HSP47, lorsque la peau et/ou les articulations et/ou les tissus conjonctifs gingivaux sont soumis à un environnement stressant. Cet environnement stressant peut être une contrainte physique, induite par exemple par une prise de poids pouvant notamment entraîner une variation du phénotype et du métabolisme des fibroblastes, une expositions aux radiations, notamment aux radiations UV, une sénescence ou une inflammation.

Par le terme d'extrait "riche en lupéol", on entend au sens de la présente invention, un extrait présentant un taux de lupéol supérieur à 30% en poids, avantageusement supérieur à 50% en poids, et de manière encore plus avantageuse compris entre 70 et 100% en poids.

La présente invention a pour principal objet l'utilisation d'un extrait riche en lupéol pour la fabrication d'une composition cosmétique ou pharmaceutique destinée à traiter et/ou prévenir la dégénérescence des tissus conjonctifs au niveau du derme et/ou du cartilage, et/ou du tissu conjonctif gingival, liée à une anomalie de la production du collagène.

Un extrait riche en lupéol selon la présente invention peut ainsi être utilisé dans une composition cosmétique destinée à traiter et/ou prévenir la dégénérescence des tissus conjonctifs au niveau du derme et/ou du cartilage, et/ou du tissu conjonctif gingival.

Un extrait riche en lupéol peut également être utilisé pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter et/ou prévenir la dégénérescence des tissus conjonctifs au niveau du derme et/ou du cartilage, et/ou du tissu conjonctif gingival.

Dans le cadre de la présente invention, on parlera indifféremment de composition pharmaceutique ou de médicament.

Au sens de la présente invention, on entend par « anomalie de la production du collagène », une synthèse insuffisante du collagène et/ou du pro-collagène par les fibroblastes ou les chondrocytes, une synthèse imparfaite des collagènes et/ou des pro-collagènes, une dégradation des fibres de collagènes, une diminution du nombre de fibroblastes ou de chondrocytes et de leur métabolisme.

Au sens de la présente invention, on entend par « synthèse imparfaite » du collagène, toute synthèse d'un collagène ou pro-collagène présentant des anomalies de structure,

ne pouvant plus notamment remplir sa fonction de soutien mécanique de la peau et/ou des articulations et/ou des tissus conjonctifs gingivaux.

L'anomalie de la production du collagène peut être induite par un facteur stress interne ou externe. Par exemple, sous une contrainte physique, telle qu'une prise de poids, une surcharge pondérale, une distension des tissus notamment dans le cadre d'une grossesse, à la suite d'une irradiation, notamment aux rayons ultraviolets, suite à une inflammation ou dans un état de sénescence, les fibroblastes ou les chondrocytes, soumis à ces contraintes externes, peuvent synthétiser du collagène de structure anormale.

L'anomalie de la production du collagène peut notamment être une inhibition de la synthèse ou une synthèse imparfaite des pro-collagènes et collagènes, en particulier des pro-collagènes et/ou collagènes du type I, II, III, IV ou V.

L'extrait riche en lupéol selon la présente invention joue le rôle d'un promoteur de la synthèse des protéines de stress, notamment de la synthèse de l'HSP47. Cette activation des protéines de stress, avantageusement de l'HSP47, permet de stimuler le métabolisme et la prolifération des fibroblastes et des chondrocytes et ainsi de lutter contre et/ou de prévenir la dégénérescence du réseau collagénique.

La composition cosmétique selon l'invention est destinée à stimuler la synthèse des protéines de stress HSP, en particulier la synthèse de l'HSP47, et ainsi l'activité des fibroblastes et des chondrocytes.

La composition pharmaceutique ou le médicament selon l'invention est destiné à stimuler la synthèse des protéines de stress HSP, en particulier la synthèse de l'HSP47, et ainsi l'activité des fibroblastes et des chondrocytes.

Selon une variante avantageuse de l'invention, la composition pharmaceutique ou le médicament est destiné à traiter et/ou prévenir les pathologies articulaires, notamment les pathologies articulaires non inflammatoires.

Les pathologies articulaires sont caractérisées par un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire qui entoure les chondrocytes. Le cartilage articulaire, qui est principalement constitué d'un réseau de fibres de collagène, d'un gel de protéoglycanes hydrophiles et de chondrocytes, joue un double rôle mécanique essentiel pour la protection de l'os sous-chondral. D'une part il diminue les forces de

frottement lors du déplacement des segments osseux et, d'autre part, il assure la transmission, la répartition et l'amortissement des contraintes subies par l'articulation.

A l'âge adulte, le renouvellement du réseau collagénique au sein du cartilage articulaire est très faible. Il est donc important de pouvoir stimuler la synthèse des collagènes et des pro-collagènes et/ou atténuer une altération du réseau collagénique, qui sont les constituants majeurs du cartilage. La composition pharmaceutique selon la présente invention permet la stimulation de la synthèse de l'HSP47 qui permet ainsi de lutter contre et/ou de prévenir la dégénérescence du tissu conjonctif du cartilage articulaire.

Avantageusement, le médicament selon l'invention est destiné à prévenir et/ou traiter l'arthrose, qui peut être due à une lésion primitive du cartilage avec modification de la structure des tissus conjonctifs et une diminution des protéoglycannes.

Le médicament ou la composition pharmaceutique selon l'invention est également destiné à prévenir et/ou traiter les maladies parodontales. Particulièrement, la composition pharmaceutique selon l'invention est destinée à prévenir et/ou traiter la gingivite ou la parodontite.

Les maladies parodontales, dont la conséquence ultime est la perte de la dent, se traduisent notamment par une dégénérescence des tissus conjonctifs gingivaux. Le tissu conjonctif gingival est composé de 60 à 65 % de collagènes. La composition pharmaceutique selon la présente invention permet de lutter et/ou de prévenir la dégénérescence du tissu conjonctif gingival, via une stimulation de la synthèse de l'HSP47 qui va permettre de promouvoir l'expression du collagène.

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, le médicament selon l'invention est destiné à la prévention et/ou au traitement des vergetures.

Les vergetures peuvent être considérées comme une atteinte de la cellule fibroblastique caractérisée notamment par une inhibition de l'expression des gènes codants pour la fibronectine, les collagènes de type I et II et une transformation des fibroblastes en myofibroblastes sous l'effet des distensions mécaniques. Cette dégénérescence du tissu collagénique conduit à la formation d'une cicatrice dermique atrophique. Un des principaux facteurs déclenchant est le stress mécanique.

La composition pharmaceutique selon la présente invention est avantageusement à application topique. On entend par application topique aussi bien une application de la composition au niveau de la peau qu'au niveau buccal, notamment au niveau des gencives.

La composition pharmaceutique selon l'invention se caractérise en ce que la concentration en extrait riche en lupéol est comprise entre 0,001% et 10 % en poids, par rapport au poids total de la composition pharmaceutique.

La composition cosmétique selon la présente invention permet de favoriser la résistance au stress et aux contraintes mécaniques de la peau et/ou des articulations et/ou des tissus conjonctifs gingivaux.

Ladite composition cosmétique permet aux tissus conjonctifs de résister au stress sous une contrainte physique, telle qu'un prise de poids, une surcharge pondérale, une distension des tissus notamment dans le cadre d'une grossesse, une irradiation, notamment aux ultra-violets.

Selon une variante avantageuse de l'invention, la composition cosmétique est utile en tant qu'agent cicatrisant de la peau et/ou des articulations et/ou des tissus conjonctifs gingivaux. En effet, la composition cosmétique selon l'invention permet de stimuler l'activité des fibroblastes et des chondrocytes, qui synthétisent le collagène nécessaire pour combler la perte de substance par un nouveau tissu.

La composition cosmétique est avantageusement utilisée pour notamment prévenir et/ou traiter les vergetures ou leur apparition.

Selon une autre variante avantageuse de l'invention, la composition cosmétique est utile en tant qu'agent restructurant de la peau.

La composition cosmétique est également avantageusement utile en tant qu'agent anti-relâchement de la peau. Le viellissement cutané est notamment caractérisé par une diminution de nombre de fibroblastes ainsi que par une diminution de leur activité. La composition cosmétique selon l'invention permet de stimuler le métabolisme et la prolifération des fibroblastes. Elle est donc avantageusement utilisée pour prévenir et/ou retarder le vieillissement cutané chronologique, extrinsèque, notamment dû au soleil, au tabac, à la pollution, au stress, et ménopausique.

La composition cosmétique selon l'invention agit au niveau du derme de la peau.

Selon une variante avantageuse de l'invention, la composition cosmétique est destinée aux femmes enceintes.

La composition cosmétique peut aussi être utilisée en tant que bain de bouche ou pâte dentifrice.

Au sens de la présente invention, l'expression « pâte dentifrice » inclut toutes les formulations classiques de dentifrice, que ce soit notamment sous la forme d'un gel de dentifrice, d'une pâte de dentifrice ou d'une combinaison pâte et gel de dentifrice.

La composition cosmétique est avantageusement à application topique. On entend par application topique aussi bien une application de la composition au niveau de la peau qu'au niveau buccal, notamment au niveau des gencives.

La composition cosmétique selon l'invention se caractérise en ce que la concentration en extrait riche en lupéol est comprise entre 0,001 et 10% en poids, par rapport au poids total de la composition cosmétique.

L'extrait riche en lupéol présente un taux de lupéol supérieur à 30% en poids, avantageusement supérieur à 50% en poids, et de manière encore plus avantageuse compris entre 70 et 100% en poids.

Ainsi, la composition cosmétique selon l'invention se caractérise en ce que la concentration en lupéol est comprise entre 0,0003 et 10% en poids, avantageusement entre 0,007 et 10% en poids, par rapport au poids total de la composition cosmétique.

La composition qui permet la mise en oeuvre de l'invention comprend un support cosmétiquement acceptable, c'est à dire un support compatible avec la peau et peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées pour une application topique, notamment sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile ou multiple, d'un gel aqueux ou huileux, d'un produit anhydre liquide, pâteux ou solide, d'une dispersion d'huile dans une phase aqueuse à l'aide de sphérules, ces sphérules pouvant être des nanoparticules polymériques telles que les nanosphères et les nanocapsules ou mieux des vésicules lipidiques de type ionique et ou non-ionique, d'un dispositif trans-dermique ou sous toute autre forme pour application topique.

Cette composition peut être plus ou moins fluide et avoir l'aspect d'une crème blanche ou colorée, d'une pommade, d'un lait, d'une lotion, d'un sérum, d'une pâte, d'une mousse ou d'un gel.

Elle peut éventuellement être appliquée sur la peau sous forme d'aérosol. Elle peut également se présenter sous forme solide, et par exemple sous forme de stick. Elle peut aussi être appliquée au moyen d'un patch.

Avantageusement, le milieu cosmétiquement acceptable est une solution huileuse, une émulsion eau-dans-huile, une émulsion huile-dans eau, une microémulsion, un gel huileux, un gel anhydre, une dispersion de vésicules, de microcapsules ou de microparticules, un dispositif trans-dermique

La composition selon l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les actifs hydrophiles ou lipophiles, les épaississants, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les agents chélateurs, les absorbeurs d'odeur, des filtres chimiques ou minéraux, des pigments minéraux, les tensioactifs, les polymères, les huiles de silicone et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés, et par exemple de 0,01 à 20% du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse, dans les vésicules lipidiques et ou dans les nanoparticules.

Lorsque la composition de 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% du poids total de la composition. Les huiles, les émulsionnants et les coémulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. L'émulsionnant et le coémulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3 à 30% en poids, et de préférence de 0,5 à 20% du poids total de la composition.

Comme huiles utilisables dans les compositions permettant de mettre en œuvre l'invention, on peut citer les huiles minérales, les huiles d'origine végétale (huile d'abricot, huile de tournesol, de prune), les huiles d'origine animale, les huiles de synthèse, les huiles siliconées et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers). On peut

aussi utiliser comme matières grasses des alcools gras (alcool cétylique), des acides gras, des cires (cire d'abeilles).

Comme émulsionnants et coémulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple les esters d'acide gras et de polyéthylène glycol tels que le stéarate de PEG-40, le stéarate de PEG-100, les esters d'acide gras et de polyol tels que le stearate de glycéryle et le tristéarate de sorbitane.

Comme gélifiants hydrophiles, on peut citer en particulier les polymères carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides, 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, la silice hydrophobe et les polyethylenes.

Les modes d'administration, les posologies et les formes galéniques optimales des composés et compositions selon l'invention peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement cosmétique, de préférence dermatologique, adapté à un patient comme par exemple le poids corporel du patient, l'excès de graisse constaté, l'aspect du tissu cellulitique, la tolérance au traitement, le type de peau.

La composition utilisée selon l'invention peut contenir d'autres actifs.

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, le lupéol est obtenu à partir de coques de lupin avantageusement choisi dans le groupe constitué par le lupinus angustifolius, le lupinus albus, le lupinus luteus, le lupinus mutabilis, le lupinus graecus, le lupinus micranthus Guss, le lupinus hispanicus, le lupinus pilosus, le lupinus cosentinii, le lupinus atlanticus, le lupinus princei et le lupinus somaliensis.

Selon une variante avantageuse de l'invention, le lupéol est obtenu à partir de coques de lupinus albus, de préférence le lupinus albus de variété très portant le gène pauper.

Les exemples suivants illustrent la présente invention sans en limiter la portée.

EXEMPLE 1 : Composition d'un extrait riche en lupéol

Le tableau 1 suivant donne une composition particulière d'extrait riche en lupéol utilisé dans le cadre de la présente invention, ainsi que les spécifications que doit satisfaire un extrait de lupéol pour pouvoir être considéré comme étant un extrait riche en lupéol selon la présente invention.

Critère de composition	**Résultats**	**Spécifications**
Aspect	Solide beige à jaune clair	Solide beige à jaune clair
Teneur en lupéol (g/100g)	84,7	75,0-90,0
Teneur en stérols totaux (g/100g)	12,2	8,0-20,0
Composition relative en stérols (%) Béta-sitostérol Campestérol Stigmastérol	 72,9 5,7 21,4	 65,0-80,0 2,0-10,0 15,0-30,0
Perte à la dessication (g/100g) (1)	0,03	< 0,2

Tableau 1

(1) 1 heure à 105°C

EXEMPLE 2: Effets du lupéol sur l'expression du gène codant pour la protéine de stress HSP47.

Nous avons utilisé la méthode des « cDNA micro array » pour étudier les effets du produit sur l'expression des gènes codant pour des protéines structurales et régulatrices d'intérêt potentiel dans la physiologie cutanée. Une telle approche permet de « screener » en une seule étape les effets d'un produit ou d'un traitement sur l'expression des gènes dans un système biologique donné et d'avoir une signature des effets de ce traitement.

Conditions de culture et produits à l'essai

Le produit a été appliqué sur des fibroblastes cutanés humains cultivés dans du MEM/M199 pendant 18 heures. Le lupéol, en solution dans l'éthanol a été testé à la

concentration de 4,5 µg/ml, cette concentration correspond à une dose non cytotoxique.

Analyse de l'expression différentielle des gènes

La méthodologie utilisée est celle préconisée par Clontech (Palo Alto, USA), et comprend :

- une étape d'extraction et de purification des ARN totaux ;
- une étape de purification des ARN messagers selon le protocole AtlasPure (Clontech) ;
- le marquage des sondes ADN au P^{32} par reverse-transcription ;
- la purification des sondes marquées par chromatographie sur colonne d'exclusion et vérification de la qualité et de l'équivalence par comptage en scintillation liquide ; et
- hybridation des membranes (fournies par la société Custom ATLAS BIOAlternative) avec les sondes radio-marquées (68°C, une nuit).

Analyse des résultats

L'analyse des membranes a lieu par quantification directe de la radioactivité des spots à l'aide d'un PhosphoImager Cyclone (fourni par la société Packard Instrument).

Les résultats sont exprimés en unités relatives (UR, radioactivité moyenne des points du double spot correspondant à chaque gène, corrigé du bruit de fond et des différences d'intensité de marquage des sondes). Dans cette expérience, on a considéré de façon arbitraire qu'un gène était exprimé de façon significative lorsque son UR était supérieur ou égale à 2.

Les résultats ont été analysés au cas par cas, marqueur par marqueur. Arbitrairement, la limite de significativité a été fixée à environ +30% du contrôle pour un effet stimulant, c'est-à-dire pour un effet supérieur à 130%.

Résultats

Dans nos conditions expérimentales, une incubation de 18 heures en présence de 4,5 µg/ml de lupéol induit une régulation positive de l'expression du gène codant pour l'HSP47 (cf tableau 2).

	Cellules contrôles	Cellules + Lupéol 4,5 µg/ml, 18 heures
UR	28,2	36,4 (129% du contrôle)

Tableau 2

Conclusion

Les résultats de l'exemple 2 suggère que le lupéol pourrait de manière tout à fait inattendue stimuler le gène codant pour la protéine de stress HSP47 dans des fibroblastes cutanés humains en culture.

EXEMPLE 3: Effets du lupéol sur l'expression de la protéine de stress HSP47 dans un modèle de fibroblastes en culture

Afin de vérifier cette stimulation potentielle de l'HSP47 révélée par le screening, nous avons étudié l'expression de la protéine HSP47 par la technique du western-blot.

Cette technique consiste en :

- une séparation des différentes protéines sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ;
- un transfert des protéines sur une membrane spécifique (membrane PVDF, commercialisée par la société Biorad) ;
- un Marquage de la protéine d'intérêt par un anti-corps spécifique (HSP47, Stressgen) ;
- une Révélation « colorimétrique » (Sigma Fast, BCPIP/NBT).

Différentes concentrations non cytotoxiques (5, 10 et 20 µg/ml), ainsi que plusieurs temps d'incubation (24 et 48 heures) ont été testés.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons enregistré une stimulation de la production d'HSP47 pour une dose de 20 µg/ml et un temps d'incubation de 48h.

Les inventeurs ont montré, de manière tout à fait surprenante, en utilisant la technique des micro arrays, ainsi que la technique du western-blot, que le lupéol stimulait la production de l'HSP47 au niveau transcriptionnel (ARNm) et traductionnel, c'est-à-dire au niveau des protéines.

Dans les exemples 4 à 7 suivants, les proportions sont données en pourcentage (p/p) et les abréviations QS signifient Quantité Suffisante, QSP signifient Quantité Suffisante Pour.

EXEMPLE 4 : Bain de bouche

Extrait riche en lupéol	**0,1 à 10%**
Alcool éthylique	10%
Glycérine	10%
Huile de ricin hydrogénée, Ethoxylée à 40 moles EO (Crémophor co410)	0,5%
Poly(Methyl vinyl ether/Acide Maléïque (Gantrez S97BF)	0,2%
Soude	0,15%
Fluorure de sodium	0,05%
Arôme Cannelle-Menthe	0,1%
Triclosan	0,03%
Chlorure de zinc	0,01%
Saccharine sodique	0,01%
Colorant C.I. 16255 (E 124)	0,0025%
Eau purifiée	QSP 100%

EXEMPLE 5 : Pâte dentifrice

Extrait riche en lupéol	**0,1 à 10%**
Monofuorophosphate de sodium	0,75%
Fluorure de Sodium	0,10%
Sorbitol à 70%	35%
Silice synthétique à fort pouvoir abrasif	13%
Silice synthétique à faible pouvoir abrasif	5%
Carboxymethylcellulose sodique	1,6%
Lauryl sulfate de sodium	1%
Arôme mentholé	0,85%
Oxyde de titane	0,5%
Lessive de soude	0,5%
Cyclamate de sodium	0,3%
Menthol	0,15%
Saccharine sodique	0,07%
Eau purifiée	QSP 100%

EXEMPLE 6 : Crème anti-vergeture

Eau	QSP 100%
Acide Lactique	10,0%
Triéthanolamine	7,5%
Cyclométhicone	5,4%
Ethylhéxyle Palmitate	4,5%
Glycérides de Coco Hydrogenées	3,0%
Méthylsilanol de Lactate de Sodium	3,0%
Propylène Glycol	2,5%
Néopentanoate Isodécylique	2,0%
Protéine Hydrolysée de Soja	2,0%
Stéarate de Glycérol	1,7%
Alcool Arachidique	1,6%
Alcool Cétylique	1,3%
Acide Stéarique	1,0%
Extrait riche en lupéol	**0,1 à 10%**
Alcool Béhénylique	0,9%
Polyacrylamide	0,8%
Extrait de feuilles de Sophora Japonica	0,5%
Glucoside Arachidique	0,4%
Cire d'abeille	0,4%
Isoparaffine C13-14	0,4%
DEA-Phosphate Cétylique	0,3%
Gluconate de Zinc	0,2%
Glycérine	0,1%
Alcool Cétéarylique	0,1%
Palmitate Cétylique	0,1%
Glycérides de Coco	0,1%
Laureth-7	0,1%
Extrait d'Enteromorpha Compressa	0,1%
Parfum	QS
Conservateurs	QS

EXEMPLE 7 : Gel restructurant

Eau	QSP 100%
PEG-6	3,60%
Butylène glycol	2,70%
Dextrine	1,86%
Triméthicone de Phényl	1,20%
Extrait riche en lupéol	**0,1 à 10%**
crosspolymère Acrylates/ acrylate d'alkyl C10-30	0,60%
Crosspolymère Diméthicone/ Diméthicone de Phényle vinyle	0,30%
Extrait de Fleurs de Sophora Japonica	0,20%
Gomme Xanthane	0,15%
PPG 26-Buteth-26	0,11%
4,5,7-Trihydroxyisoflavone	0,10%
Protéine de Soja Hydrolysée	0,10%
Glucose	0,08%
Huile de ricin hydrogénée PEG 40	0,07%
Sorbitol	0,04%
Extrait de Centella Asiatica	0,04%
Glycérine	0,04%
Acide Citrique	0,02%
Extrait d'Enteromorpha Compressa	0,02%
Parfum	QS
Conservateurs	QS

Revendications

1. Utilisation d'un extrait riche en lupéol pour fabriquer une composition pharmaceutique ou cosmétique, destinée à traiter ou prévenir une dégénérescence des tissus conjonctifs, au niveau du derme et/ou du cartilage, notamment du cartilage articulaire, et/ou du tissu conjonctif gingival, liée à une anomalie de la production de collagène, en particulier du collagène du type I, II, III, IV ou V.

2. Utilisation selon la revendication 1 pour activer la synthèse des protéines de stress, notamment de l'HSP47.

3. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition pharmaceutique est destinée à traiter et/ou prévenir les pathologies articulaires, telles que l'arthrose, les maladies parodontales, telles que la gingivite ou la parodontite, à traiter les vergetures ou à prévenir leur apparition.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 2 de la composition cosmétique, en tant qu'agent cicatrisant, agent restructurant et agent anti-relâchement de la peau.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que la composition cosmétique permet aux tissus conjonctifs de résister au stress sous une contrainte physique telle qu'un prise de poids, une surcharge pondérale, une distension desdits tissus notamment dans le cadre d'une grossesse, une irradiation, notamment aux ultra-violets.

6. Utilisation selon la revendication 4 ou 5, pour prévenir et/ou retarder le vieillissement cutané, pour prévenir et/ou traiter les vergetures ou leur apparition.

7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisée en ce que la composition cosmétique est destinée aux femmes enceintes.

8. Utilisation selon la revendication 4, de la composition en tant que bain de bouche ou pâte dentifrice.

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que la composition cosmétique est à application topique.

10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 4 à 9, caractérisée en ce que la composition cosmétique comprend entre 0,001 et 10% en poids d'extrait riche en lupéol.

11. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait présente un taux de lupéol supérieur à 30% en poids, de préférence supérieur à 50% en poids.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'extrait présente un taux de lupéol compris entre 70 et 100% en poids.

13. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le lupéol est obtenu à partir des coques de lupinus albus, de préférence le lupinus albus de variété Arès portant le gène pauper.

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement national

FA 646287
FR 0308796

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	GOGLY B ET AL: "Effects of vegetable extract from lupinus albus (Lu105) on the degradation by human leucocyte elastase and bacterial collagenase of gingival collagen and elastic fibers" JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, vol. 119, no. 1, juillet 2002 (2002-07), page 232, XP002286368 & 63RD ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY; LOS ANGELES, CALIFORNIA, USA; MAY 15-18, 2002 ISSN: 0022-202X * le document en entier *	1-13	A61K35/78 A61K31/56 A61K7/48 A61K7/26 A61P19/02 A61P17/02 A61P1/02
A	SALEEM MOHAMMAD ET AL: "Lupeol, a triterpene, inhibits early responses of tumor promotion induced by benzoyl peroxide in murine skin" PHARMACOLOGICAL RESEARCH, vol. 43, no. 2, février 2001 (2001-02), pages 127-134, XP002286369 ISSN: 1043-6618		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
A	WO 98/47479 A (PHARMASCIENCE LAB ; MSIKA PHILIPPE (FR); RANCUREL ALAIN (FR); MONTAUDO) 29 octobre 1998 (1998-10-29)		A61K
A	FR 2 778 565 A (LIMOUSINE D APPLIC BIOLOG SILA) 19 novembre 1999 (1999-11-19)		

Date d'achèvement de la recherche	Examinateur
29 juin 2004	Rempp, G

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

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0308796 FA 646287

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 29-06-2004
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 9847479 A	29-10-1998	FR 2762512 A1	30-10-1998
		AU 7535298 A	13-11-1998
		CA 2258800 A1	29-10-1998
		EP 0914090 A1	12-05-1999
		WO 9847479 A1	29-10-1998
		JP 2000514835 T	07-11-2000
		US 6146616 A	14-11-2000
FR 2778565 A	19-11-1999	FR 2778565 A1	19-11-1999
		JP 2000026272 A	25-01-2000

EPO FORM P0465