

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 903 902**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **06 06648**

⑤① Int Cl⁸ : **A 61 K 8/97** (2006.01), A 61 Q 19/00

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 21.07.06.

③⑦ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 25.01.08 Bulletin 08/04.

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

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *LABORATOIRES CLARINS Société
par actions simplifiée — FR.*

⑦② Inventeur(s) : COURTIN OLIVIER.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : LABORATOIRES CLARINS.

⑤④ UTILISATION D'UNE COMPOSITION COSMETIQUE POUR FAVORISER LA DEPIGMENTATION CUTANEE.

⑤⑦ La présente invention concerne l'utilisation d'un extrait
d'*Alchemilla vulgaris* dans une composition cosmétique dé-
pigmentante. La présente invention concerne également un
procédé de traitement cosmétique pour dépigmenter la
peau, comprenant l'application sur la peau d'une composi-
tion cosmétique comportant un extrait d'*Alchemilla vulgaris*.

FR 2 903 902 - A1



UTILISATION D'UNE COMPOSITION COSMETIQUE
POUR FAVORISER LA DEPIGMENTATION CUTANEE

La présente invention concerne
5 l'utilisation d'une composition cosmétique pour favoriser
la dépigmentation cutanée par exemple pour effacer ou
réduire les taches de vieillesse.

La pigmentation cutanée est liée à la
présence de cellules spécialisées, les mélanocytes. Ces
10 derniers représentent environ 5% des cellules de la couche
basale de l'épiderme. Ils possèdent des prolongations
dendritiques leur permettant d'entrer en contact avec
plusieurs kératinocytes. Les mélanocytes ont une fonction
principale, la synthèse de mélanine ou mélanogénèse.

15 La mélanogénèse est principalement
stimulée par les radiations UVA et UVB du spectre solaire.
Il en résulte une augmentation de la synthèse des pigments
mélaniques, de la dendricité et du nombre de mélanocytes.
Les UV qui pénètrent jusqu'à la couche basale de
20 l'épiderme peuvent agir directement sur les mélanocytes ou
indirectement en stimulant la production d'agents
mélanogéniques par les kératinocytes (endothéline-1,
monoxyde d'azote...).

La mélanine est synthétisée et stockée
25 dans des vésicules spécialisées, appelés mélanosomes. Les
mélanosomes sont acheminés du centre de la cellule vers
l'extrémité des dendrites où ils pourront être transférés
aux kératinocytes. Le relargage des mélanosomes par les
mélanocytes et la phagocytose par les kératinocytes sont
30 induits par les UV et modulés par de nombreux facteurs.

La formation de mélanine se fait
généralement de façon continue et harmonieuse dans la peau
et les cheveux. Mais dans certaines conditions ou sous
l'effet de certains facteurs, des dérèglements de la

pigmentation peuvent survenir et provoquer une hyperpigmentation. Plusieurs mécanismes peuvent en être à l'origine, les deux principaux sont l'activité accrue des mélanocytes ou la prolifération mélanocytaire. Une hyperactivité mélanocytaire est à l'origine des éphélides appelées communément taches de rousseur, et du chloasma aussi appelé masque de grossesse. La prolifération mélanocytaire est à l'origine du lentigo sénile encore appelé tache de vieillesse. Les taches brunes apparaissent avec l'âge, sur le dos des mains, les avant-bras, le visage touchant généralement les zones découvertes. Histologiquement le lentigo sénile présente une hyperpigmentation de la couche basale de l'épiderme avec augmentation du nombre de mélanosomes.

Ces taches liées à l'âge sont particulièrement mal supportées et de nombreuses personnes sont tentées de les faire disparaître. La cosmétologie propose de nombreux produits cosmétiques dépigmentants agissant généralement sur la tyrosinase, enzyme essentielle de la synthèse de mélanine. Ainsi dans le brevet FR 2 787 710 la Demanderesse avait proposé une composition cosmétique éclaircissante dont les actifs inhibent la tyrosinase. Il existe aussi certaines molécules aux propriétés dépigmentantes mais dont les effets secondaires sont trop toxiques pour être utilisés en cosmétologie.

Les produits dépigmentants étant très prisés par les personnes âgées d'un côté et par toutes les femmes asiatiques pour qui la blancheur de la peau est essentielle, l'utilisation d'une composition dépigmentante à la fois efficace et sans effets secondaires néfastes est nécessaire.

Un nouveau récepteur impliqué dans le transfert des mélanosomes du mélanocyte vers le

kératinocyte vient d'être mis en évidence, il s'agit du récepteur du facteur de croissance kératinocytaire (nommé ci après KGFR). Ce récepteur activé par le facteur de croissance kératinocytaire (nommé ci après KGF) est
5 impliqué dans la phagocytose des mélanosomes au bout des dendrites du mélanocyte. (J Invest Dermatol 125 :1190-1199,2005).

La demanderesse a mis en évidence l'inactivation du KGFR par un extrait d'*Alchemilla vulgaris*. Le transfert des mélanosomes du mélanocyte vers
10 le kératinocyte par phagocytose étant diminué par l'action d'*Alchemilla vulgaris*, le kératinocyte est moins riche en mélanine, la peau se dépigmente, les taches de vieillesse sont effacées, le teint est éclairci et plus homogène.
15 L'extrait d'*Alchemilla vulgaris* peut également être utilisé de manière préventive. En effet il permet de prévenir l'apparition de taches de pigmentation d'origine pathologique comme le chloasma, ou naturelle comme les éphélides ou le lentigo sénile.

20 La présente invention concerne donc l'utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* dans une composition cosmétique ou dermatologique dépigmentante.

La présente invention concerne aussi
25 l'utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* dans une composition cosmétique ou dermatologique comme agent dépigmentant.

L'*Alchemilla vulgaris* est déjà utilisée en
30 cosmétologie comme agent nettoyant mais aussi pour ses propriétés astringente ou anti obésité. L'utilisation d'*Alchemilla vulgaris* a également été décrite pour repigmenter des lésions blanchâtres cicatricielles dans le brevet US4054649. De façon surprenante, la demanderesse a

mis en évidence le fait que certains extraits d'*Alchemilla vulgaris* avaient la propriété de favoriser la dépigmentation de la peau et/ou de prévenir l'apparition d'une pigmentation.

5 *Alchemilla vulgaris* est une plante vivace, haute de 20 à 40cm, à feuilles d'un vert très clair, arrondies et bordées de lobes arrondis dentés. Ses fleurs, qui s'épanouissent en été, minuscules, vertes et peu voyantes sont dépourvues de pétales.

10 L'Alchemille tient son nom de l'usage qu'en faisaient les alchimistes, qui recueillaient comme « eau céleste », pour préparer la pierre philosophale, la rosée du bord des feuilles et les gouttes d'eau qui s'amassent au centre de celles-ci.

15 De façon avantageuse, l'extrait utilisable dans le cadre de la présente invention est issu de la plante entière et il est obtenu par extraction au moyen d'un solvant tel que l'eau, un alcool, un glycol, la glycérine, l'acétone ou un mélange de ces solvants. De
20 préférence, il s'agit d'un extrait hydro glycolique. Après macération de la plante entière dans un mélange d'eau et de butylène glycol l'extrait est filtré. On obtient un liquide brun orangé d'odeur caractéristique présentant les caractéristiques analytiques suivantes :

- 25 - pH : 3.5 - 5.5
 - densité : 1.025 - 1.050
 - indice de réfraction : 1.385 - 1.415
 - matière sèche : 2.0 - 6.0%

30 On peut se procurer un extrait d'*Alchemilla vulgaris* utilisable selon l'invention par exemple auprès de la société Sederma, commercialisé sous la dénomination commerciale 'Alchemille BG'.

Selon l'invention, l'extrait d'*Alchemilla vulgaris* peut être utilisé avec un ou plusieurs autres actifs dépigmentants. Plus particulièrement, l'extrait d'*Alchemilla vulgaris* selon l'invention peut être associé
5 dans une composition cosmétique ou dermatologique à un extrait de persil, et/ou un extrait de camomille tels que décrits dans le brevet FR 2 787 710.

La composition selon l'invention contient
10 de l'ordre de 0,01 à 10 % en poids, et de préférence 0,01 à 5 % en poids d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* sous la forme d'une solution de concentration allant de 0.5 à 10% en matière sèche.

15 La composition cosmétique de la présente invention à application topique peut constituer notamment une composition de protection, de traitement ou de soin cosmétique ou dermatologique pour le visage, pour le cou, pour les mains ou pour le corps, comme, par exemple,
20 crèmes de jour, crèmes de nuit, laits corporels.

La composition cosmétique selon la présente invention peut contenir un ou plusieurs autres composants connus de l'homme du métier, comme des agents
25 de formulation ou additifs d'usage connu et classique dans les compositions cosmétiques. A titre d'exemple et de façon non limitative, de tels agents de formulation et additifs peuvent être des gélifiants hydrophiles ou lipophiles, des adoucissants, des colorants, des agents
30 solubilisants, des agents de texture, des parfums, des charges, des actifs filmogènes, des conservateurs, des tensio-actifs, des émulsionnants, des huiles, des glycols, des vitamines, des filtres solaires,... Grâce à ses connaissances en matière de cosmétiques, l'homme du métier

saura quels agents de formulation ajouter à la composition cosmétique selon l'invention et en quelles quantités en fonction des propriétés recherchées.

Avantageusement la composition selon
5 l'invention peut contenir un ou plusieurs filtres solaires d'origine synthétique ou naturelle, anti UVA ou anti UVB. De façon avantageuse la composition selon l'invention peut contenir aussi un ou plusieurs actifs anti âge, notamment des actifs hydratants, des actifs anti-rides, des
10 tenseurs.

De plus, la composition cosmétique selon la présente invention peut se présenter sous toute forme connue de l'homme du métier dans le domaine de la
15 cosmétique sans aucune autre restriction galénique particulière que celle pour l'application sur la peau. Ainsi, la composition cosmétique selon l'invention peut avoir la forme d'une solution ou suspension aqueuse, alcoolique ou d'une suspension huileuse ou d'une solution
20 ou d'une dispersion de type lotion ou sérum, d'une émulsion de consistance liquide ou semi-liquide de type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (émulsion Huile dans Eau : H/E) ou inversement (Eau dans Huile : E/H), ou d'une émulsion du
25 type crème H/E ou E/H ou d'un gel, d'une lotion, d'un masque. On peut également envisager les formulations cosmétiques selon l'invention sous la forme d'une mousse ou encore sous forme de compositions pour aérosol comprenant également un agent propulseur sous pression.

30

La présente invention concerne également un procédé de traitement cosmétique pour dépigmenter la peau et/ou pour prévenir l'apparition d'une pigmentation,

comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique comportant un extrait d'*Alchemilla vulgaris*.

La présente invention concerne aussi l'utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* pour la
5 préparation d'une composition dermatologique destinée à prévenir ou traiter une hyperpigmentation de la peau.

Chez les personnes ayant une peau colorée, telles que les asiatiques par exemple, l'utilisation d'un
10 extrait d'*Alchemilla vulgaris* selon la présente invention permet d'obtenir et de conserver un teint plus clair, et cela de façon homogène sur l'ensemble de la zone traitée. Chez les personnes ayant une hyperpigmentation de la peau sous forme de taches, d'origine pathologique ou naturelle, l'utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* permet de
15 restaurer l'homogénéité du teint, par un éclaircissement des zones hyperpigmentées.

Les exemples ci-après concernent, d'une part l'évaluation de l'inhibition par un extrait d'*Alchemilla vulgaris* du transfert des mélanosomes du
20 mélanocyte vers le kératinocyte, et d'autre part des compositions objets de la présente invention.

Les exemples font référence aux figures suivantes dans lesquelles :

- 25 - la figure 1 représente le témoin non traité
- la figure 2 représente l'incorporation de billes fluorescentes dans le témoin traité au KGF
- 30 - la figure 3 représente l'incorporation de billes fluorescentes dans les cellules traitées au KGF et avec l'extrait d'*Alchemilla vulgaris*.

I.EVALUATION DE L'INHIBITION D'UN EXTRAIT D'ALCHEMILLA VULGARIS SUR LE TRANSFERT DES MELANOSOMES

A. PRINCIPE

Le KGFR constitue le récepteur
kératinocytaire du KGF facteur de croissance intervenant
5 dans la prolifération et la différenciation épidermique.
Ce récepteur est internalisé lors de la fixation du KGF.
Il a été montré que le KGFR a un rôle à jouer dans le
transfert des mélanosomes des mélanocytes aux
kératinocytes. En effet, sous l'effet de KGF, ceux-ci
10 entrent plus facilement dans la cellule. Les mélanosomes
se co-localisent avec le KGFR dans des vésicules
d'internalisation. Cette technique permet de mettre en
évidence l'effet de certaines molécules sur la voie
spécifique du transfert via une activation au KGF. Elle
15 met en jeu l'utilisation de fluosphères mimant les
mélanosomes sur un modèle d'étude cellulaire de
kératinocytes humains en monocouche. (J. Invest. Dermatol
125 :1190-1199 2005).

B. MATERIEL ET METHODE

20 1. Ensemencement

Les kératinocytes humains sont cultivés,
sur lamelle de verre dans des puits d'une plaque 6 puits,
à raison de $40 \cdot 10^3$ cellules/3 ml par puits, à 37°C, dans
un milieu DMEM (milieu essentiel modifié Dulbecco)
25 contenant 2mM de L-glutamine et 10% de sérum de veau fœtal
(SVF), dans une atmosphère saturée en humidité avec 5% de
CO₂. Les cultures sont incubées 72 heures.

2. Traitements

30 Les cellules sont rincées et incubées 48
heures comme suit :

- milieu seul (témoin)
- Extrait d'*Alchemilla vulgaris* 0,05%*

- Extrait d'*Alchemilla vulgaris* 0,1%*
- Extrait d'*Alchemilla vulgaris* 0,2%*

* dans le milieu, volume final 3 ml,
5 concentration révélée non cytotoxique pour les cellules au
test de réduction au bleu de Formazan.

3. Traitements et incorporation des fluosphères par les cellules

10 Le milieu pour les billes et les
traitements pour cette étape est différent de celui
utilisé précédemment : DMEM 10% SVF inactivé 0,5% BSA
(albumine de sérum bovin).

15 a) Préparation des billes fluorescentes

Les billes se préparent dans le milieu de
culture précédent. L'utilisation d'albumine de sérum bovin
permet de faciliter la répartition homogène des billes
dans la solution. Le sérum de veau fœtal inactivé apporte
20 moins de nutriments et de facteurs de croissance pouvant
interagir avec le KGF apporté par l'expérience.

Une concentration de 4.10^9 particules/ml
est utilisée pour l'expérimentation. Le flacon contenant
les billes est passé au vortex à sa sortie du
25 réfrigérateur puis placé dans le bain à ultra-son pour une
durée de 20 minutes. Les billes passent à nouveau au
vortex vigoureusement et la quantité nécessaire pour
préparer la solution de travail est prélevée (sous la
hotte) et mise en suspension dans le milieu. La solution
30 de travail est ensuite passée au vortex puis plongée dans
le bain à ultra-son pendant 10 minutes.

Ces étapes sont nécessaires afin d'obtenir
une solution de billes la plus homogène possible.

b) Préparation des traitements

La solution de travail de billes est répartie dans différents tubes 15ml correspondant aux différentes concentrations du traitement à appliquer. Le KGF (10µg/ml) est ajouté à chacun des tubes afin d'obtenir
5 une concentration finale de 20ng/ml. Chaque solution est mélangée par aspiration-refoulement à la pipette.

c) Phagocytose

10 Un volume de 3 ml de chaque solution contenant le KGF, les billes fluorescentes et l'extrait d'*Alchemilla vulgaris* à différentes concentrations (0,05 ; 0,1 ; 0,2%) est déposé dans chaque puits. Un puits témoin positif KGF seul est prévu.

15 Les plaques sont agitées par rotations manuelles afin de répartir la solution de façon homogène. Les cellules sont incubées 2h dans l'incubateur 37°C-5%CO₂, temps nécessaire pour que le KGFR soit internalisé sous l'effet du KGF.

20

d) Arrêt de la phagocytose

Lorsque le temps d'incubation est écoulé, l'incorporation des billes par les cellules doit être stoppée en retirant les billes restées à l'état
25 extracellulaire. Pour ceci :

- on retire avec le système d'aspiration l'intégralité du contenu de chaque puits;
- on dépose 1 ml de SVF inactivé dans chaque puits, on agite et on place pendant 20 minutes
30 minimum à l'incubateur 37°C-5%CO₂ ;

- on retire le SVF et on procède à 4 rinçages vigoureux d'1 minute environ avec 2 à 3 ml de DMEM complet froid en agitant bien les plaques à chaque rinçage ;

- on procède ensuite à 2 rinçages au tampon salin phosphaté (PBS) en agitant bien les plaques ou et en aspirant bien le PBS lors du dernier rinçage.

3. Visualisation du transfert

5 La visualisation se fait le jour même. Après le retrait des billes extracellulaires, la fixation des cellules (méthanol -20°C) est réalisée sur les lamelles pour visualiser les fluosphères ainsi que les kératinocytes en marquant la cytokératine par la technique
10 immunocytochimique.

Pour le marquage, l'anticorps primaire utilisé est l'IgG de lapin anti-cytokératine humaine; l'anticorps secondaire est l'IgG de chèvre anti-lapin
15 couplé au FITC. Le microscope à fluorescence couplé à un logiciel d'analyse d'image nous permet de révéler le marquage et de prendre des photos.

II. EXEMPLES

20

CREME ECLAIRCISSANTE

		%
25	GOMME XANTHANE	0,10
	GLYCERINE	5,00
	CETEARYL GLUCOSIDE	3,00
	MONOSTEARATE DE GLYCEROL AE	2,00
	TRYGLYCERIDE C ₈ C ₁₀	10,00
30	HUILE DE SILICONE	3,00
	EXTRAIT DE PERSIL	1,00
	EXTRAIT DE CAMOMILLE	1,00
	EXTRAIT D'ALCHEMILLA VULGARIS ..	2,00
	CONSERVATEURS	1,00
35	PARFUM	0,30

EAU DEMINERALISEE Q.S.P 100

GEL ECLAIRCISSANT

5			%
	GLYCERINE	3,00	
	GOMME XANTHANE	0,20	
10	ETHANOL	5,00	
	EXTRAIT DE PERSIL	1,00	
	EXTRAIT DE CAMOMILLE	1,00	
	EXTRAIT D'ALCHEMILLA VUGARIS	2,00	
	CONSERVATEURS	0,50	
15	SOLUBILISANT	0,50	
	PARFUM	0,20	
	EAU DEMINERALISEE	Q.S.P	100

LOTION ECLAIRCISSANTE

20			%
	GLYCOL	2,00	
25	CHLORURE DE SODIUM	1,00	
	ETHANOL	5,00	
	EXTRAIT DE PERSIL	1,00	
	EXTRAIT DE CAMOMILLE	1,00	
	EXTRAIT D'ALCHEMILLA VUGARIS	2,00	
30	CONSERVATEURS	0,50	
	SOLUBILISANT	0,30	
	PARFUM	0,10	
	EAU DEMINERALISEE	Q.S.P	100

REVENDICATIONS

5 1) Utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* dans une composition cosmétique dépigmentante.

 2) Utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* dans une composition cosmétique comme agent
10 dépigmentant.

 3) Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'extrait d'*Alchemilla vulgaris* est issu de la plante entière.

15 4) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait d'*Alchemilla vulgaris* est un extrait hydro glycolique.

 5) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la
20 composition contient de l'ordre de 0,01 à 10 % en poids, et de préférence 0,01 à 5 % en poids d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* sous la forme d'une solution de concentration allant de 0.5 à 10% en matière sèche.

25 6) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition contient en outre un extrait de persil.

30 7) Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la composition contient en outre un extrait de camomille.

8) Procédé de traitement cosmétique pour dépigmenter la peau, comprenant l'application sur la peau d'une composition cosmétique comportant un extrait d'*Alchemilla vulgaris*.

5 9) Utilisation d'un extrait d'*Alchemilla vulgaris* pour la préparation d'une composition dermatologique destinée à prévenir ou traiter une hyperpigmentation de la peau.

FIGURE 1:



FIGURE 2:

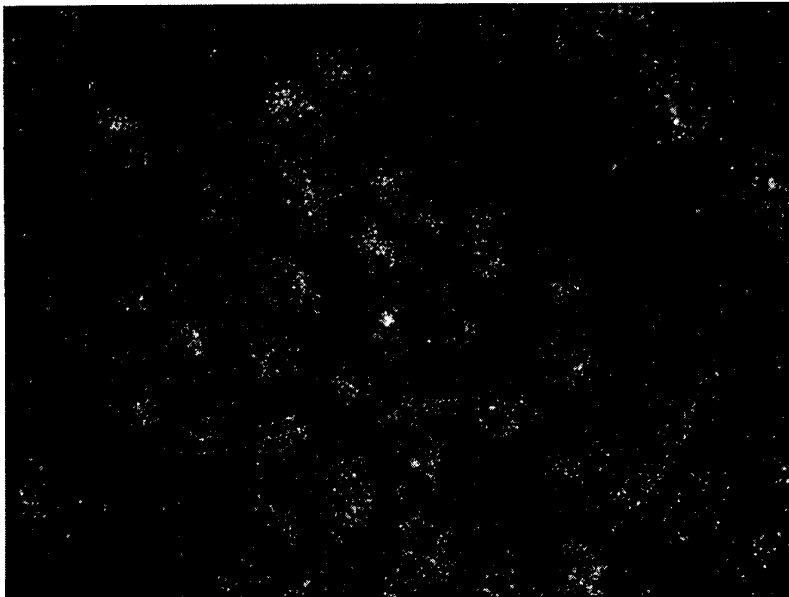
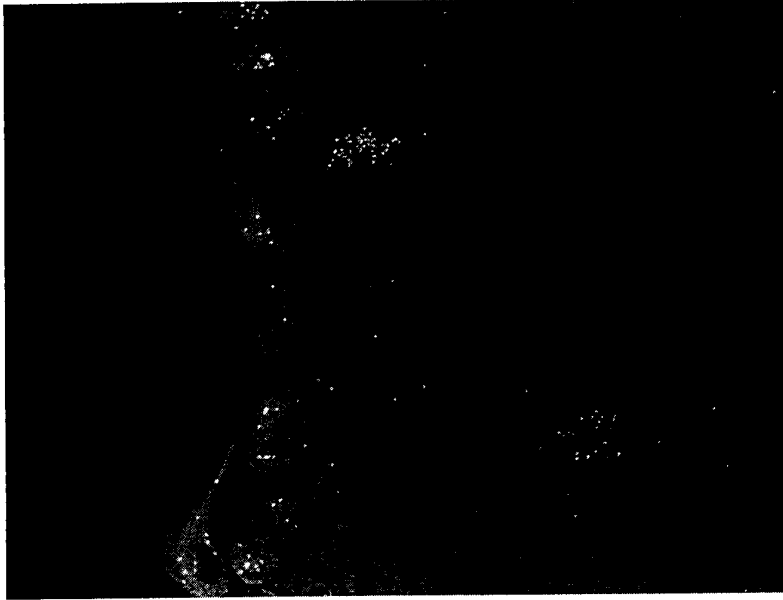


FIGURE 3 :





**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 681950
FR 0606648

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, des parties pertinentes		
X	DATABASE WPI Week 200515 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2005-139507 XP002422407 & KR 2004 087 777 A (AEKYUNG IND CO LTD) 15 octobre 2004 (2004-10-15)	1,2,8,9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61Q A61K
Y	* abrégé *	1-9	
D,A	FR 2 332 026 A2 (CARIEL LEON [FR] CARIEL LEON) 17 juin 1977 (1977-06-17)		
X	US 2004/166069 A1 (GUPTA SHYAM K [US]) 26 août 2004 (2004-08-26)	1,2,8,9	
Y	* alinéa [0007]; revendication 1 *	1-9	
D,Y	FR 2 787 710 A1 (CLARINS [FR]) 30 juin 2000 (2000-06-30) * revendications *	1-9	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
28 février 2007		Pregetter, Magdalena	
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	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0606648 FA 681950**

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 28-02-2007

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
KR 2004087777 A		AUCUN	
FR 2332026 A2	17-06-1977	US 4054649 A	18-10-1977
US 2004166069 A1	26-08-2004	AUCUN	
FR 2787710 A1	30-06-2000	JP 2000191504 A	11-07-2000