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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
13 mars 2008 (13.03.2008)

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/029064 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/97 (2006.01) *A61Q 17/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/051887

(22) Date de dépôt international :
6 septembre 2007 (06.09.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0607851 6 septembre 2006 (06.09.2006) FR
0607852 6 septembre 2006 (06.09.2006) FR

(71) Déposant et
(72) Inventeur : **THOREL, Jean-Noël** [FR/FR]; 3 Rue de la Rochelle, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataires : **DENJEAN, Eric** etc.; Cabinet Laurent & Charras, 20 Rue Louis Chirpaz, BP 32, F-69134 ECULLY CEDEX (FR).

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

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, 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).

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

WO 2008/029064 A2

(54) **Title:** TOPICAL USE OF A PEPTIDE EXTRACT OF SOYBEAN AND/OR OF WHEAT AS PHOTOPROTECTIVE AGENT

(54) **Titre :** UTILISATION TOPIQUE D'UN EXTRAIT PEPTIDIQUE DE SOJA ET/OU DE BLE COMME AGENT PHOTOPROTECTEUR

(57) **Abstract:** Topical use of a peptide extract of soybean and/or of wheat as an agent for combating alteration of the cells of the skin, the lips, the hair and/or the mucous membranes, caused by UVA and UVB radiation.

(57) **Abrégé :** Utilisation ion topique d'un extrait peptidique de soja et/ou de blé comme agent destiné à lutter contre l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et les UVB.

UTILISATION TOPIQUE D'UN EXTRAIT PEPTIDIQUE DE SOJA ET/OU DE BLE COMME AGENT PHOTOPROTECTEUR

La présente invention se rapporte à une composition cosmétique et/ou dermatologique destinée à prévenir l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses par les radiations lumineuses et plus généralement, à agir comme agent photoprotecteur.

La composition de la présente invention peut appartenir à la gamme des produits anti-solaires, mais également à la gamme des produits de soin, comme par exemple des laits pour le corps ou des crèmes de jour, des sticks à lèvres, ainsi qu'à la gamme des produits de maquillage ou de traitement capillaire.

En effet, pour l'ensemble de cette gamme de produits, on cherche à lutter contre les effets néfastes des UVA et des UVB sur les cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses.

En effet, même si les radiations lumineuses de longueur d'onde comprise entre 290 nm et 400 nm, correspondant aux UVA (de longueur d'onde comprise entre 320 nm et 400 nm) et aux UVB (de longueur d'onde comprise entre 290 nm et 320 nm), sont nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme humain, elles provoquent aussi de nombreux effets négatifs. Les UVB sont ainsi plus particulièrement à l'origine d'érythèmes, de brûlures cutanées, tandis que les UVA sont à priori responsables de la formation de radicaux libres qui sont susceptibles d'induire une altération cutanée à long terme. Ces rayonnements UV doivent donc être filtrés.

De nombreuses compositions cosmétiques telles que, par exemple, produits anti-solaires ou encore crèmes de jours assurant la photoprotection (UVA et/ou UVB) de la peau ont été proposées à ce jour. Ces compositions se présentent assez souvent sous la forme d'une émulsion qui contient, à des concentrations diverses, un ou plusieurs filtres solaires. Il existe deux types de filtres solaires : d'une part les filtres organiques classiques lipophiles et/ou hydrophiles capables d'absorber sélectivement les rayonnements UV nocifs. Ils peuvent être introduits assez facilement dans les émulsions en les dispersant soit dans la phase huileuse, soit dans la phase aqueuse de

l'émulsion (selon leur caractère lipophile ou hydrophile). Le type de filtres et leur quantité sont sélectionnés en fonction de l'indice de protection recherché.

Il existe d'autre part les filtres minéraux, qui réfléchissent la lumière, utilisés en plus ou à la place des filtres organiques. Il s'agit en particulier des oxydes métalliques comme par exemple le dioxyde de titane et l'oxyde de zinc, qui confèrent d'excellentes propriétés protectrices contre les UV et une très bonne tolérance cutanée.

Néanmoins, ces deux catégories de filtres solaires présentent certains inconvénients. Les filtres organiques doivent être utilisés en grande quantité pour obtenir de forts indices de protection et ils peuvent alors être responsables de problèmes de tolérance ; de plus, ils sont soupçonnés de possibles actions hormonales œstrogéniques, ce qui pourrait être biologiquement dangereux, si ces risques étaient confirmés, en particulier chez les jeunes garçons. Les filtres minéraux, quant à eux, posent des problèmes de galénique cosmétique. En effet, les produits de protection solaire les contenant se présentent souvent sous forme d'émulsions plus ou moins épaisses, difficiles à appliquer et à étaler, lourdes et poisseuses. En outre, à ces défauts s'ajoute, avec certains filtres minéraux comme le dioxyde de titane, un effet de blanchissement lors de l'étalement sur la peau.

Le but de la présente invention est donc de surmonter ces inconvénients et de proposer une composition photoprotectrice destinée à prévenir l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses par les radiations lumineuses du type UVA et UVB ne contenant pas ou très peu de filtres solaires.

Le Demandeur a constaté que de manière tout à fait surprenante, il était possible de lutter efficacement contre les effets nocifs à la fois des UVA et des UVB, en agissant biologiquement au niveau des cellules de la peau et non plus au moyen d'un filtre ou d'un écran anti UVA ou anti UVB. Avantageusement, cette action biologique peut être mise en œuvre au moyen de substances biomimétiques, c'est-à-dire de substances présentant la structure et/ou exerçant la fonction ou l'activité biomécanique, biophysique, ou biologique de tout composant cutané, l'objectif étant d'adapter la réponse des cellules de la peau aux effets des rayonnements UVA et UVB.

En d'autres termes, le Demandeur a cherché à substituer tout ou partie des filtres solaires connus et désignés par la suite comme « filtre solaire externe », par des

constituants assurant une action biologique au niveau des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses permettant de protéger lesdites cellules contre les effets néfastes des UVA et UVB. Cette action biologique également désignée par la suite comme « protection interne » peut consister en :

- une protection de l'ADN,
- une diminution de l'immunosuppression,
- une action antiradicalaire etc….

Cette nouvelle approche a permis dans un premier temps au Demandeur de découvrir que les extraits peptidiques de soja ou de blé, lorsqu'ils étaient appliqués in vivo, sur la peau, permettaient de protéger biologiquement les cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses contre les effets néfastes des UVA et UVB.

Dès lors et selon un premier aspect, l'invention a pour objet l'utilisation topique d'un extrait peptidique de soja et/ou de blé comme photoprotecteur et plus précisément comme agent destiné à lutter contre l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et les UVB, avantageusement dans ce second cas lorsque ces extraits sont associés à d'autres constituants assurant la « protection interne » des cellules et /ou des « filtres solaires externes ». Les extraits peptidiques de l'invention n'agissent donc pas comme un filtre ou un écran anti UVA ou anti UVB en ce sens que les cellules continuent à absorber ces rayons lumineux ; par contre, les extraits peptidiques de l'invention interviennent biologiquement au niveau des cellules, en limitant les effets néfastes des rayonnements tout en continuant à bénéficier des effets positifs.

Dans un mode de réalisation particulier, les extraits peptidiques de soja et de blé sont utilisés ensemble, par exemple dans un rapport en poids respectivement compris entre 80/20 et 20/80, avantageusement compris entre 70/30 et 30/70, de préférence égal à 60/40.

En pratique, les extraits peptidiques proviennent de graines de soja et de blé. Une hydrolyse enzymatique desdites graines par l'intermédiaire de peptidases permet de récupérer des peptides qui ont une taille moyenne de 700 Daltons (lorsque cette taille moyenne des peptides est atteinte, les peptidases sont alors inactivées).

Préférentiellement, l'extrait peptidique de soja est l'extrait identifié sous le numéro CAS 68607-88-5 de même que l'extrait peptidique de blé est l'extrait identifié sous le numéro CAS 70084-87-6.

En pratique, les extraits peptidiques précédemment décrits sont utilisés au sein d'une composition cosmétique comprenant un milieu physiologiquement acceptable.

On entend dans la présente demande par « milieu physiologiquement acceptable », un milieu compatible avec la peau, les lèvres, les cheveux et les muqueuses.

Dans un mode de réalisation particulier, l'invention a donc également pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique topique comprenant un extrait peptidique de soja et/ou un extrait peptidique de blé représentant de 0,01 à 20 %, avantageusement de 0,1 à 10 %, de préférence de 0,2 à 0,7% du poids total de la composition, très préférentiellement 0.4%.

Dans un mode de réalisation avantageux, la composition ne contient pas le tripeptide synthétique GHK (glycyl-histidyl-lysine ; INCl : Tripeptide-1).

De préférence, lorsque la composition contient les deux extraits peptidiques, le rapport pondéral extrait peptidique de soja et/ou un extrait peptidique de blé est compris entre 80/20 et 20/80, avantageusement compris entre 70/30 et 30/70, de préférence égal à 60/40.

Comme déjà mentionné, le Demandeur a constaté que les extraits peptidiques de soja ou de blé, seuls ou en mélange permettaient de lutter contre l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et UVB, à fortiori lorsque ces extraits étaient associés à des filtres solaires externes et/ou à d'autres constituants assurant la « protection interne » des cellules.

Le Demandeur a ainsi démontré que certains constituants exerçant une activité biologique in vivo sur les cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses soumises à un rayonnement UVA et UVB, agissaient de manière synergique avec les filtres solaires organiques ou minéraux permettant assurer d'une part «une protection interne », et d'autre part « une protection solaire externe » en

réfléchissant ou absorbant la lumière. Il s'ensuit que le taux de filtres utilisé, peut être abaissé, diminuant de fait les risques précédemment évoqués.

En d'autres termes, dans un mode de réalisation particulier, l'invention a pour objet une composition cosmétique et/ou dermatologique comprenant au moins un extrait peptidique de soja et/ou de blé et au moins un filtre solaire choisi parmi les filtres minéraux, les filtres organiques ou leurs mélanges.

Dans un mode de réalisation particulier, une telle composition ne contient pas le tripeptide synthétique GHK (glycyl-histidyl-lysine ; INCl : Tripeptide-1).

En pratique, les extraits peptidiques de soja et de blé utilisés seuls ou en association représentent également dans ce cas, de 0,01 à 20 %, avantageusement de 0,1 à 10 % en poids, par exemple 0.4% du poids total de la composition.

De même, lorsque la composition contient les deux extraits peptidiques, le rapport pondéral extrait peptidique de soja /extrait peptidique de blé est compris en pratique entre 80/20 et 20/80, avantageusement compris entre 70/30 et 30/70, de préférence égal à 60/40.

Tous les filtres minéraux connus en soi pour leur activité photoprotectrice externe par réfléchissement de la lumière sont utilisables dans la présente invention. Dans un mode de réalisation de l'invention, il s'agit d'oxydes métalliques, qui peuvent être notamment choisis parmi les oxydes de titane (dioxyde de titane amorphe ou cristallisé sous forme rutile et/ou anatase), les oxydes de zinc, les oxydes de fer, les oxydes de zirconium, les oxydes de cérium ou leurs mélanges.

Ces oxydes métalliques peuvent être sous forme de particules ayant une taille micrométrique ou nanométrique (nano-pigments). Dans un mode de réalisation particulier, les nano-pigments sont utilisés et leur taille moyenne est comprise par exemple entre 5 nm et 100 nm. Ces filtres minéraux peuvent être également enrobés.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, on utilise des nano-oxydes de titane enrobés hydrophobes pouvant se présenter sous forme de charge solide ou sous forme de dispersion dans un milieu adapté à leur enrobage.

De même tous les filtres organiques UVA et UVB communément employés dans le domaine de la cosmétique, et connus pour leur activité photoprotectrice externe par absorption de la lumière sont utilisables dans la présente invention.

Comme filtres UVA, on peut citer par exemple les dérivés de dibenzoylméthane, les dérivés de benzophénone, les anthranilates, les dérivés de triazine, et les mélanges de ces filtres.

Comme filtres UVB, on peut citer par exemple les dérivés de l'acide salicylique, les dérivés de l'acide cinnamique, les dérivés de β,β'-diphénylacrylate liquide, les dérivés de l'acide p-aminobenzoïque, le 4-méthyl benzylidène camphre, l'acide 2-phénylbenzimidazole 5-sulfonique, les dérivés de 1,3,5-triazine, et les mélanges de ces filtres.

En fonction du résultat recherché, un mélange de filtres UVA et UVB peut être utilisé.

La composition de l'invention peut contenir de 0,5 à 50 % en poids de filtre solaire par rapport au poids total de la composition, bien que l'objectif soit qu'elle contienne une quantité de filtre moindre, de manière à diminuer les effets secondaires précédemment évoqués.

Dans un mode particulier de réalisation, la teneur en filtre solaire est comprise entre 1 et 20 %.

Dans un autre mode de réalisation, elle est comprise entre 2 % et 15 % par rapport au poids total de la composition, avantageusement entre 7 et 10%.

Le Demandeur a notamment démontré que la mise en oeuvre d'oxyde de titane, à raison de 2 à 5%, ou de butyl octyl salicylate, à raison de 7 à 10% en poids de la composition totale, donnait de bon résultats en terme de SPF (Sun Protecting Factor, indice permettant d'apprécier l'efficacité de protection d'un produit solaire, plus le SPF est élevé et meilleure sera la protection).

Selon une autre caractéristique de l'invention, la composition cosmétique et/ou dermatologique contient au moins un ou tous les constituants suivants exerçant une activité biologique in vivo sur les cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses soumises à une rayonnement UVA et UVB en présence ou non d'un filtre solaire, respectivement :

- un agent anti-radicalaire préservant les structures cellulaires, tel que par exemple la vitamine E et/ou ses dérivés liposolubles ou hydrosolubles, en en particulier ses isomères tocotrienol et/ou tocophérol, représentant par exemple entre 0,001 et 10%, avantageusement entre 0,02 et 2%, de préférence de l'ordre de 0,04% en poids de la composition totale,
- un agent protecteur d'ADN augmentant le taux d'ATP, tel que par exemple la créatine, représentant par exemple entre 0,1 et 2%, avantageusement 0,5% en poids de la composition totale,
- un agent limitant l'immunosuppression, tel que par exemple la vitamine PP, représentant par exemple entre 0,001 et 1%, avantageusement de 0,01% à 0,3% en poids de la composition totale,
- un agent protecteur de la protéine p53, tel que par exemple l'epigallocathéchine gallate (EGCG), représentant par exemple entre 0,001 et 0,1%, avantageusement de 0,005% à 0,05% en poids de la composition totale,
- un agent limitant l'action des ions fer impliqués dans la formation des radicaux libres, tel que par exemple l'EDTA, représentant par exemple entre 0,01 et 1%, avantageusement entre 0,2% et 0,5% en poids de la composition totale.

La composition de l'invention peut également contenir des adjuvants comme ceux habituellement utilisés dans le domaine de la cosmétique, tels que des actifs, des conservateurs, des antioxydants, des agents complexants, des solvants, des parfums, des charges, des bactéricides, des électrolytes, des absorbeurs d'odeur, des matières colorantes ou encore des vésicules lipidiques. Le choix de ces adjuvants, ainsi que leurs concentrations, doivent être déterminés de telle sorte qu'ils ne modifient pas les propriétés et les avantages recherchés pour la composition de la présente invention.

La composition de l'invention est destinée à une application topique et plus particulièrement à une application sur la peau, les lèvres, les cheveux et/ou les muqueuses.

La composition de l'invention peut se présenter sous toutes les formes galéniques normalement utilisées dans les domaines cosmétique et dermatologique, comme par exemple, mais de façon non limitative, sous la forme d'une solution aqueuse éventuellement gélifiée, d'une dispersion du type lotion pouvant être biphasée, d'une émulsion (H/E) ou inversement (E/H), plus ou moins fluide, ou d'une émulsion multiple comme par exemple une émulsion triple (E/H/E ou H/E/H), ou encore sous la forme d'une dispersion vésiculaire de type ionique (liposomes) et/ou non ionique. Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles, connues de l'homme de l'art.

L'invention a également pour objet un procédé de traitement cosmétique pour prévenir l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et UVB, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer sur la peau, les lèvres, les cheveux et/ou les muqueuses les compositions précédemment décrites comprenant toutes au moins un extrait peptidique de soja ou de blé, éventuellement au moins un filtre solaire et/ou un des éléments précités présentant une activité biologique in vivo avec la peau vis-à-vis du rayonnement lumineux.

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront bien des exemples qui suivent.

A/ EFFICACITE PHOTOPROTECTRICE

Exemple 1 : Efficacité photoprotectrice d'un mélange d'extraits peptidiques de soja et de blé utilisé seul, vis-à-vis des UVA

L'objectif de ce premier test est de démontrer que les extraits peptidiques de l'invention permettent à eux seuls de lutter contre les effets nocifs des rayonnements UVA en agissant sur le génome des cellules. Les essais sont conduits in vitro.

Extrait désigné EV

Les extraits peptidiques sont obtenus par hydrolyse enzymatique de graines de soja ou de blé par l'intermédiaire de peptidases, les peptides obtenus ayant une taille moyenne de 700 Daltons. Les peptides de soja et de blé sont mis en solution à 10% dans un ratio 60/40, ladite solution étant ensuite diluée et testée à une concentration 1%. Les extraits utilisés correspondent aux numéros CAS 68607-88-5 (extrait peptidique de soja) et CAS 70084-87 (extrait peptidique de blé).

L'efficacité photoprotectrice du mélange d'extraits selon l'invention a été testée selon le plan d'expérience ci-après décrit.

La capacité de photoprotection interne de l'extrait végétal EV par son action sur le génome a été testée, contre les rayonnements UVA à 365 nm. L'évaluation a été réalisée par le test des comètes sur des primo-cultures de mélanocytes humains normaux (méthode décrite dans le brevet FR2774395 et dans la publication - Evaluation of Sunscreen protection in human melanocytes exposed to UVA or UVB irradiation using the alkaline comet assay; Photochemistry and Photobiology, vol 74,Iss.3, P417 423– (2001)).

Culture de mélanocytes

Les cultures de mélanocytes humains normaux (MHN) sont réalisées à partir de prépuces d'enfants et de nouveau-nés ayant un phimosis. Les mélanocytes obtenus à partir de fragments de peau sont placés dans le milieu MCDB 153 (Sigma St Louis, MO, USA) auquel ont été ajoutés 30 µg/ml d'extrait pituitaire bovin (BPE) (Life Technologies, Paisley, Angleterre), 2% de sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher, Brumath, France), 16 nM de phorbol-12-myristate-13-acetate (Sigma), 5µg/ml d'insuline et 1,1 µM d'hydrocortisone (Sigma). Les cultures sont maintenues dans un incubateur à 37°C et sous atmosphère contenant 5% de CO_2. Des cultures pures de mélanocytes sont obtenues au bout de 2 à 3 semaines.

Préparation des lames et irradiation des cellules

Après un traitement avec un mélange trypsine / EDTA (0,05% / 0,02%) pendant 2 à 3 minutes, les cellules sont récupérées par centrifugation et placées dans du tampon PBS

sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Sigma). Suivant une seconde centrifugation, les cellules (dont le nombre est compris entre 4,5 x 10^4 et 5,0 x 10^4) sont placées en suspension dans 0,5% d'agarose Low Melting Point, LMP (Sigma). Le mélange est directement déposé sur des lames de microscope qui sont recouvertes d'une pré-couche d'agarose (1,6%) séchée pendant une nuit à température ambiante et fraîchement précoatée avec une seconde couche d'agarose (0,8%). Une troisième couche d'agarose LMP est enfin déposée pour emprisonner les kératinocytes.

Les irradiations UVA sont générées par un irradiateur UV Bio-Sun (Vilbert Lourmat, Marne la Vallée). Cet appareil est équipé de lampes monochromatiques qui émettent à des longueurs d'onde de 365 nm. Les lampes délivrent une énergie calculée, à l'aide d'un radiomètre de type RMW-365/312 de 4.0 mW/cm^2 pour les UVA : les énergies délivrées sont alors de 0,8 J/cm^2. Les cellules sont irradiées par les UVA sur un bain de glace et le test des comètes est réalisé immédiatement après l'exposition.

Test des comètes (technique des lames sèches)

Le protocole du test des comètes est celui de De Méo et Coll (Méo M, Laget M, Castegnaro M, Duménil G. ; Genotoxic activity of potassium permanganate in acidic solutions ; Mutation Res. 1991; 260; 295-306) en incorporant la technique des « lames sèches » (Klaude M, Ericksson S, Nygren J, Annstrom G. The comet assay: mechanism and technical consideration. Mutation Res. 1996; 363; 89-96). Les lames sont placées, après les irradiations, dans un bain de lyse contenant 2,5 M de NaCl, 100 mM de Na_2EDTA, 10 mM de Tris-HCl pH 10, 1% de sodium sarcosinate, 1% de triton X-100 et 10% de DMSO. La lyse cellulaire s'effectue à 4°C pendant 60 min suivie par la dénaturation de l'ADN à température ambiante pendant 20 min dans une solution fortement alcaline comprenant 1 mM de Na_2EDTA et 300 mM de NaOH à un pH supérieur à 13,0. Après une électrophorèse (25V, 300 mA) pendant 20 min, les lames sont neutralisées par le tampon Tris-HCI (0,4 M ; pH 7,4) et déshydratées dans de l'éthanol ou du méthanol absolu.

Observation microscopique et analyse d'images

Les lames sont colorées par une solution de bromure d'éthidium et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence BH2-RFL (Olympus, Japon) équipé d'un filtre dichroïque 20BG-W (excitation : 515-560 nm ; émission : 590 nm) et d'un objectif Apo

D-Plan 20x. L'analyse d'images s'effectue avec une caméra CCD monochrome haute sensibilité (Cohu 4912-5000) couplée à une carte d'acquisition Matrox IP-8. L'ensemble est piloté par le logiciel Fenestra Komet (Kinetic Imaging, Liverpool, RU, version 3.1).

Un total de 100 cellules par échantillon (50 cellules par lame) est analysé. Le paramètre utilisé est "Olive Tail Moment" (OTM qui est défini comme le produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète par la longueur de celle-ci exprimée en µm). Pour chaque série d'expériences, un contrôle négatif (cellules non irradiées) et un contrôle positif (cellules irradiées sans écran) sont inclus.

La photoprotection interne a été mesurée après un traitement de 120 min à 37°C. La dose d'irradiation était de 0,8 J/cm^2 pour les rayonnements UVA (365 nm). Le test des comètes a été effectué immédiatement après irradiation. Les contrôles négatifs comprenaient des mélanocytes non traités et non irradiés et des mélanocytes traités par les deux mélanges et non irradiés. Le paramètre mesuré était le coefficient de protection génomique UVA (CPG_{UVA}).

Les résultats sont résumés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Protection interne de l'extrait végétal EV, 1%

Lames N°	Condition	Moy±ET	Med	OTMχ^2±ET	CPG_{UVA} (%)
1-2	NI	1,08±0,10	0,89	2,15±0,15	100%
3-4	UVA	8,05±0,54	6,58	8,71±0,42	0%
5-6	EV/NI	1,76±0,24	1,16	2,09±0,01	-
7-8	EV/UVA	5,86±0,38	4,95	7,49±0,26	17,7%*

- NI : cellules non irradiées.
- UVA : cellules irradiées par des rayonnements UVA (0.8 J/cm^2).
- EV/NI : cellules traitées directement dans le milieu avec l'extrait végétal (1%) pendant deux heures à 37°C.
- EV/UVA : cellules traitées directement dans le milieu avec l'extrait végétal (1%) pendant deux heures à 37°C puis irradiées par des rayonnements UVA (0,8 J/cm^2).

- Probabilité avec :
- NS : non significatif ; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$
- Moy : moyenne des OTM
- Médiane OTM : valeur médiane de l'Olive Tail Moment
- χ^2 OTM : paramètre calculé par régression des distributions des OTM selon une fonction χ^2 (voir : Bauer et Coll (Bauer E, Recknagel RD, Fiedler U, Wollweber L, Bock C, Greulich KO ; the distribution of the tail moments in single cell electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution ; Mutation Res. 1998; 398: 101-110)).
- CPG_{UVA} : coefficient de protection génomique UVA

Les coefficients de protection génomique (CPG_{UVA}) sont calculés avec la formule :

$$CPG = \left[1 - \frac{(\chi^2 OTM_e - \chi^2 OTM_{Ce})}{(\chi^2 OTM_{C+} - \chi^2 OTM_{C-})} \right] x100$$

Avec χ^2 OTM_e: χ^2 OTM de l'échantillon ; χ^2 OTM_{ce} : χ^2 OTM du contrôle non irradié de l'échantillon; χ^2 OTM_{C-} : χ^2 OTM du contrôle non irradié ; χ^2 OTM_{C+} : χ^2 OTM du contrôle irradié.

Plus la valeur du CGP est grande, et plus la protection est grande. Par contre, c'est l'inverse pour l'OTM.

Conclusion :

Le CPG_{UVA} de EV est de 17,7% ce qui démontre clairement que les extraits seuls ont une activité de protection du génome vis-à-vis des UVA.

Il est à noter que le test des comètes à été réalisé vis-à-vis des UVB mais il s'est avéré non concluant. Ce n'est pas pour autant que l'extrait EV serait totalement dépourvu d'efficacité vis-à-vis des UVB et il est au contraire démontré dans l'exemple 4 que in vivo, l'extrait EV a une activité vis-à-vis des UVB, probablement par le biais d'une autre voie que celle de la protection du génome.

Exemple 2 : Efficacité photoprotectrice d'un mélange d'extraits peptidiques de soja et de blé utilisé en association avec des fitres, vis-à-vis des UVA

Ce test vis à démontrer que l'extrait EV de l'exemple 1 conserve son action sur le génome vis-à-vis des UVA lorsqu'il est associé aux filtres UVA et UVB d'un lait solaire

L'efficacité photoprotectrice par le test des comètes du mélange d'extraits selon l'invention a été mesurée selon le même plan d'expérience que celui de l'exemple 1.

La capacité de photoprotection interne vis-à-vis des UVA à 365 nm de l'extrait végétal EV a été mesurée seul et en mélange avec un produit solaire de SPF 15 contenant une forte proportion de filtres UVA. (Lait Sun Trainer LST, réf : 03E.24EG31.1)

Les résultats sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Protection interne de l'extrait végétal EV, 1% et photoprotection du produit solaire LST contre les rayonnements UVA.

Lames N°	Condition	Moy±ET	Med	OTMχ^2±ET	CPG_{UVA} (%)
1-2	NI	1,08±0,10	0,89	2,15±0,15	100%
3-4	UVA	8,05±0,54	6,58	8,71±0,42	0%
5-6	EV/NI	1,76±0,24	1,16	2,09±0,01	-
7-8	EV/UVA	5,86±0,38	4,95	7,49±0,26	17,7%*
9-10	LST/UVA	3,07±0,25	2,49	4,40±0,12	65,7%***
11-12	LST/EV/UVA	2,73±0,24	2,04	3,36±0,12	80,6%***

- LST/UVA : 10 µl du Lait Sun Trainer SPF15 déposé sur une lame de quartz (5 cm x 5 cm) puis cellules irradiées par des rayonnements UVA (1,2 J/cm^2).
- LST/EV/UVA : cellules traitées directement dans le milieu avec l'extrait végétal (1%) pendant 2 heures à 37°C puis irradiées par des UVA (0,8 J/cm^2) à travers une lame de quartz (5 cm x 5 cm) sur laquelle est déposé un volume de 10 µl du Lait Sun Trainer.

Conclusion :

Le CPG_{UVA} de EV est de 17,7%. Le CPG_{UVA} de la photoprotection externe de LST est de 65,7%. Le cumul de la photoprotection interne de EV (1%) et de la photoprotection externe de LST est de 80,6%. Ces résultats montrent donc que l'effet photoprotecteur des extraits est maintenu même en présence des filtres UVA et UVB présents dans le Lait Sun Trainer.

Exemple 3 : détermination du SPF in vitro et in vivo du mélange d'extraits EV de l'exemple 1 dilué à 4% au lieu de 1%

Des tests ont été effectués pour démontrer l'efficacité des extraits de la présente invention lorsqu'il sont utilisés in vivo : détermination du SPF in vitro (réalisé selon la méthode décrite dans la publication du magazine Cosmetics ans Toiletries, vol 118, N° 10/Octobre 2003 : Determination of the in vitro SPF) et détermination du SPF in vivo (réalisé selon la méthode COLIPA COLIPA (The European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association), CTFA (Cosmetic, Toiletry & Fragrance Association of South Africa), JCIA (Japan Cosmetic Industry association) : International Sun protection factor (SPF) Test method. February 2003), avec un extrait végétal à 4%.

La formule testée (Base + EVà 4%) est la suivante et les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 3.

Dicapryl carbonate (Cetiol CC)	17,00 %
Na acrylate/Na acryloyl-dimethyl taurate copolymer isohexadecane pollysorbate (Simulgel EG)	3,00 %
Water	2,40%
Peptide de blé selon l'invention	0.15 %
Peptides de soja selon l'invention	0.25 %
Water	qsp 100 %
Conservateurs (Phenonip)	0,45 %

Tableau 3

Condition	SPF in vitro	SPF in vivo
Base + EVà 4%	1.0	16.0

Le SPF ou Sun Protecting Factor, est un indice permettant d'apprécier l'efficacité de protection d'un produit solaire. Plus le SPF est élevé et meilleure sera la protection.

La valeur de 1 du SPF in vitro démontre que l'extrait n'a aucune activité anti UVA ou anti UVB sur la peau in vitro. En revanche, on obtient un effet biologique de l'extrait végétal de la présente invention in vivo qui est caractérisé par un SPF de 16. Il y a donc bien un effet de l'extrait vis-à-vis des cellules de la peau in vivo qui s'activent en réponse au rayonnement UVA/UVB.

Exemple 4 protection solaire EV + filtre

Des tests permettant de montrer l'efficacité de protection des extraits EV de l'exemple 1 dilués à 1% ou 4% ont été réalisés : détermination du SPF in vitro (réalisé selon la méthode décrite dans la publication du magazine Cosmetics ans Toiletries, vol 118, N° 10/Octobre 2003 : Determination of the in vitro SPF) et détermination du SPF in vivo selon la méthode précédemment identifiée.

Le tableau 3 illustre les résultats obtenus pour des formulations comprenant l'extrait peptidique végétal EV et un oxyde minéral

Tableau 4.

Condition Base + EV	SPF in vitro	SPF in vivo	Amélioration Apportée par l'extrait végétal
Oxyde de titane seul 3%	6.1	6.4	
EV à 4%	1.0	16.0	
Oxyde de titane 3% + Extrait EV à 1%	6.4	10.2	59%
Oxyde de titane 3% EV à 4%	5.8	25.5	298%

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une amélioration synergique de la protection solaire lorsqu'on associe l'extrait végétal avec l'oxyde minéral (le SPF de chacun des éléments pris indépendamment est respectivement de 6.4 et de 16.0, alors que le SPF obtenu avec l'ensemble est de 25.5, ce qui est supérieur à l'addition des SPF de deux éléments, soit 22.4).

Par ailleurs, sachant qu'un SPF de 6 correspond à environ100% d'absorption des UVA s'il n'y a pas d'absorption UVB, et qu'un SPF supérieur caractérise forcément une filtration complémentaire des UVB, le tableau 3 montre que l'extrait de l'invention a également un effet sur les UVB lorsqu'il est appliqué in vivo.

Exemple 5 : Composition perfectionnée à base de constituants agissant biologiquement (protection interne) et d'un filtre (protection externe)

La composition testée dans cet exemple comprend le noyau d'actifs suivant en % en poids:

Octyl Butyl Salicylate (BHB)	8%
Peptide de blé selon l'invention	0.075%
Peptides de soja selon l'invention	0.125%
Tocotrienol (oryza tocotrienol 90)	0.3%
Créatine	0.5%
Vit PP	0.3%
Epigallocathéchine gallate	0.05%
EDTA	0.2%
C20-22 Alkyl Phosphate and C20-22 Alcohols (Sensanov WR)	3,0%
Palmitate d'ethyl hexyl2 hexyle	7,0%
Nacol 16-98	1,0%
BHT	0,1%
Eau	70,12
NaOH	0,08%
Hydroxyethyl Acrylate/Sodium Acryloyldimethyl Taurate Copolymer and Squalane and Polysorbate 60 (Simulgel NS)	3,0%
Eau	Qsp 100

Des tests ont été effectués pour démontrer l'efficacité de cette formule : détermination du SPF in vivo selon la même méthode que précédemment indiquée.

Le SPF de cette formulation est égal à 9,2 et ce, malgré la faible proportion d'extrait et de filtre. Cela montre donc l'effet de l'ensemble des actifs autres que le filtre, sur les cellules vis à vis des UVA et UVB.

B/ FORMULES DE PRODUITS COSMETIQUES

Exemple 1

EthoxyDiglycol & Cucumber	8,00 %
Peptide de blé selon l'invention	0,15 %
Peptides de soja selon l'invention	0,25 %
Isostearyl Isostearate	5,00 %
Oxyde de Titane (MT100Z)	5,00 %
Benzophenone-3	2,00 %
Dimethicone trimethylsiloxysilicate	3,00 %
Tocopheryl Acetate	0,20 %
Water	qsp 100 %
Sucroester	5,00 %
Glycerin	5,00 %
Butyl, Methyl, Propylparaben + Phenoxyethanol	0,40 %
Fragrance	0,20 %

Exemple 2

Peptide de blé selon l'invention	0,15 %
Peptides de soja selon l'invention	0,25 %
Octyl butyl salicylate	6,00 %
Glyceryl Stearate	4,00 %
Cetyl Alcohol	0,50 %
Dimethicone	0,50 %

Coco Caprylate/Caprate	8,00 %
PVP/Eicosene Copolymer	2,00 %
Potassium Cetyl Phosphate	2,00 %
Methylparaben & Propylparaben	0,25 %
Disodium EDTA	0,10 %
Water	27,05 %
Carbomer	10,00 %
Propylene Glycol	5,00 %
Potassium Hydroxide	0,45 %
Tocopheryl Acetate	2,50 %
Panthenol	1,00 %
Fragrance	qsp 100 %

Exemple 3

Caprylic/Capric Triglyceride	4,00 %
Octyl stearate	3,00 %
Peptide de blé selon l'invention	0,30 %
Fragrance	0,30 %
Polyglyceryl-3 Diisostearate	4,00 %
PEG-20 Glyceryl Laurate	1,00 %
Water	66,95 %
Carbomer	0,4 %
Propylene Glycol	2,00 %
Phenoxyethanol	0,50 %
Methylparaben	0,25 %
Propylparaben	0,10 %
Xanthan Gum	0,30 %
Triethanolamine	0,85 %
Water	3,85 %
Acetyl tyrosine	2 %

REVENDICATIONS

1/ Utilisation topique d'un extrait peptidique de soja et/ou de blé comme agent destiné à lutter contre l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et les UVB.

2/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les extraits peptidiques de soja et de blé sont utilisés ensemble, de préférence dans un rapport en poids respectivement compris entre 80/20 et 20/80, avantageusement 60/40.

3/ Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les extraits peptidiques sont obtenus par hydrolyse enzymatique de graines de soja ou de blé par l'intermédiaire de peptidases, les peptides obtenus ayant une taille moyenne de 700 Daltons.

4/ Composition cosmétique et/ou dermatologique topique comprenant un extrait peptidique de soja et/ou un extrait peptidique de blé représentant de 0,01 à 20 %, avantageusement de 0,1 à 10 % en poids, de préférence de 0,2 à 0,7% du poids total de la composition.

5/ Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient les deux extraits peptidiques, le rapport pondéral extrait peptidique de soja/extrait peptidique de blé étant compris entre 80/20 et 20/80, avantageusement compris entre 70/30 et 30/70, de préférence égal à 60/40.

6/ Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que les extraits peptidiques sont obtenus par hydrolyse enzymatique de graines de soja ou de blé par l'intermédiaire de peptidases, les peptides obtenus ayant une taille moyenne de 700 Daltons.

7/ Composition selon la revendication 4, caractérisée ce qu'elle ne contient pas le tripeptide synthétique GHK (glycyl-histidyl-lysine).

8/ Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un filtre solaire choisi parmi les filtres minéraux, les filtres organiques ou leurs mélanges.

9/ Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient du butyl octyl salicylate, à raison de 7 à 10%.

10/ Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle contient en outre au moins un des éléments suivants :

- tocotrienol, représentant entre 0,001 et 10% en poids de la composition totale,
- créatine, représentant entre 0,1 et 2% en poids de la composition totale,
- vitamine PP, représentant entre 0,001 et 1%, avantageusement de 0,01% à 0,3% en poids de la composition totale,
- EDTA, représentant entre 0,01 et 1%, avantageusement entre 0,2% et 0,5% en poids de la composition totale.

11/ Procédé de traitement cosmétique pour prévenir l'altération des cellules de la peau, des lèvres, des cheveux et/ou des muqueuses provoquée par les UVA et UVB, caractérisé en ce qu'il consiste à appliquer sur la peau, les lèvres, les cheveux et/ou les muqueuses une composition selon l'une des revendications 4 à 10.