



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2007/07/18
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2008/01/24
 (45) Date de délivrance/Issue Date: 2015/11/24
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2009/01/09
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2007/057441
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2008/009709
 (30) Priorité/Priority: 2006/07/18 (FR0606780)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A61K 8/64* (2006.01),
A61Q 17/04 (2006.01), *A61Q 19/04* (2006.01),
A61Q 5/10 (2006.01)
 (72) Inventeurs/Inventors:
MSIKA, PHILIPPE, FR;
NAAIMI, DALALE, FR
 (73) Propriétaire/Owner:
LABORATOIRES EXPANSCIENCE, FR
 (74) Agent: NORTON ROSE FULBRIGHT CANADA
LLP/S.E.N.C.R.L., S.R.L.

(54) Titre : UTILISATION D'UN HYDROLYSAT DE PROTEINES DE RIZ EN TANT QUE PRINCIPE ACTIF PIGMENTANT
 (54) Title: USE OF A RICE PROTEIN HYDROLYSATE AS PIGMENTING ACTIVE PRINCIPLE

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne l'utilisation d'un hydrolysat de protéines de riz pour pigmenter la peau et les phanères. Il est ainsi possible d'intensifier la pigmentation normale de la peau sans soleil. Les applications préférées sont la repigmentation des taches blanches cutanées, la repigmentation des taches blanches cutanées consécutives à un pityriasis ou dues à l'utilisation de dermo-corticoïdes, l'accélération et l'intensification du bronzage, la stimulation de la photoprotection constitutive et le renforcement du phototype, la prévention de la photocarcinogénèse cutanée. L'hydrolysat de protéines de riz comprend avantageusement des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3 500 Da.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
24 janvier 2008 (24.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/009709 A1(51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/04 (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01) A61Q 5/10 (2006.01)

(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.

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2007/057441

(22) Date de dépôt international : 18 juillet 2007 (18.07.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0606780 18 juillet 2006 (18.07.2006) FR

(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).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-
RATOIRES EXPANSCIENCE [FR/FR]; 10, avenue de
l'Arche, F-92400 Courbevoie (FR).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MSIKA,
Philippe [FR/FR]; 32 rue de la Paroisse, F-78000 Versailles
(FR). NAAÏMI, Dalale [FR/FR]; 18 rue Henri Dunant,
F-21000 Dijon (FR).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(74) Mandataire : CABINET REGIMBEAU; 20, rue de
Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

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

(54) Title: USE OF A RICE PROTEIN HYDROLYSATE AS PIGMENTING ACTIVE PRINCIPLE

(54) Titre : UTILISATION D'UN HYDROLYSAT DE PROTEINES DE RIZ EN TANT QUE PRINCIPE ACTIF PIGMENTANT

(57) Abstract: The present invention concerns the use of a rice protein hydrolysate in order to pigment the skin and skin appendages. Thus, it is possible to intensify the normal pigmentation of the skin without sunlight. Preferred areas of applications are repigmentation of white patches of the skin, repigmentation of white patches of the skin as a consequence of pityriasis or due to the use of dermocorticoids; acceleration and intensification of the tanning process, stimulation of the constitutive photoprotection and improvement of the phototype, prevention of skin photocarcinogenesis. Advantageously, the rice protein hydrolysate comprises peptides of which at least 50 % have a molecular mass in the range of between 300 and 3,500 Da.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'un hydrolysat de protéines de riz pour pigmenter la peau et les phanères. Il est ainsi possible d'intensifier la pigmentation normale de la peau sans soleil. Les applications préférées sont la repigmentation des tâches blanches cutanées, la repigmentation des tâches blanches cutanées consécutives à un pityriasis ou dues à l'utilisation de dermo-corticoïdes, l'accélération et l'intensification du bronzage, la stimulation de la photoprotection constitutive et le renforcement du phototype, la prévention de la photocarcinogénèse cutanée. L'hydrolysat de protéines de riz comprend avantageusement des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3 500 Da.

WO 2008/009709 A1

Utilisation d'un hydrolysat de protéines de riz en tant que principe actif pigmentant

La présente invention se rapporte à l'utilisation d'au moins un hydrolysat de protéines de riz, en tant que principe actif pigmentant, dans une composition dermatologique, cosmétique ou nutraceutique.

La mélanine est un pigment responsable, chez l'homme, de la coloration de la peau, des cheveux, des yeux. La mélanine est produite par les mélanocytes, cellules qui se trouvent dans l'épiderme à partir d'un acide aminé : la Tyrosine. La tyrosinase transforme la tyrosine en DOPA puis DOPAquinone. De nombreuses enzymes interviennent ensuite pour former la mélanine.

Dans le mélanocyte, la mélanine se trouve dans des organites intra-cellulaires (les mélanosomes). Ces mélanosomes sont transférés par les mélanocytes grâce à leurs ramifications (dendrites) vers les kératinocytes voisins. Le mélanosome assure sa fonction protectrice vis à vis des UV en se plaçant au dessus du noyau du kératinocyte à la manière d'un parasol.

Les mélanocytes se situent au niveau de la jonction dermo-épidermique et s'insèrent entre les kératinocytes de la couche basale. 1 mélanocyte protège 36 kératinocytes, c'est ce qu'on appelle l'unité mélanique.

Chez l'homme, la mélanine est responsable de la pigmentation constitutive et du bronzage. Via le bronzage, elle protège l'ADN des cellules de la peau des rayons ultraviolets (UV) du soleil, UVA et UVB. Lors d'une exposition prolongée au soleil, le corps bronze car il fabrique plus de mélanine, il est ainsi mieux protégé contre les UV. La mélanine agit en absorbant les radiations ultraviolettes en restituant sous forme de chaleur l'énergie reçue. La définition des phototypes humains intègre la notion de couleur de peau initiale et de capacité à bronzer et rougir au soleil. Il y a donc un intérêt pour un phototype donné d'accéder à un phototype supérieur qui lui confèrera une photoprotection plus importante via un taux de pigmentation supérieur.

En raison d'une surexposition solaire et/ou d'antécédents familiaux génétiques ou d'une maladie de peau, des tâches blanches inesthétiques, consistant en une perte de

pigmentation de la peau, peuvent apparaître. L'affection de la peau de ce type la plus connue est le vitiligo.

Des tâches blanches peuvent également apparaître sur la peau (de patients bronzés principalement) dans le cas du *Pityriasis versicolor*, affection due à la prolifération excessive d'un champignon appartenant au groupe des levures du genre *Malassezia*. De nos jours, on sait traiter ces levures. Toutefois, le traitement arrête l'infection mais les tâches blanches persistent, normalement jusqu'à une prochaine exposition au soleil. De même, il peut apparaître des hypochromies après des cicatrices post traumatiques ou après brûlures, lors de l'installation de vergetures dites anciennes (vergetures blanches non inflammatoires) et enfin après le traitement des dartres. Pour accélérer la disparition de ces tâches blanches, un traitement favorisant la pigmentation peut être conseillé.

L'apparition de cheveux blancs (canitie) provient d'un arrêt de production de mélanine au niveau de leur bulbe. On ne connaît pas encore très bien le mécanisme de cet arrêt de production. En revanche, il s'agit d'un mécanisme héréditaire et lié à l'âge.

De nos jours, on cherche à avoir une peau bronzée tout en limitant ou annulant les durées d'exposition aux UV (naturels ou non) et en préservant la peau du vieillissement cutané précoce et autres effets secondaires dus aux UV.

Les inventeurs ont découvert, de manière surprenante et inattendue, que des hydrolysats de protéines de riz (également appelés peptides de riz) avaient la propriété de stimuler la pigmentation cutanée. L'application de l'actif permet une pigmentation constitutive plus importante et un bronzage plus rapide et plus intense pour un temps d'exposition plus court. Par conséquent, l'apparition des facteurs du vieillissement cutané et autres désagréments dus aux UV se trouverait ralentie. De plus, le patient accéderait à un phototype supérieur, ce qui permet de diminuer les risques de photocarcinogénèse cutanée.

L'invention a donc pour premier objet l'utilisation d'un hydrolysat de protéines de riz pour la fabrication d'une composition pigmentante, cosmétique, dermatologique ou nutraceutique pour l'homme et les animaux.

Cette composition est destinée à stimuler la pigmentation cutanée (qui peut être constitutive ou acquise), elle peut donc être utilisée en tant qu'accélérateur de bronzage.

La composition peut être utilisée dans les cabines de bronzage soit dans un but purement esthétique (bronzer) soit dans un but dermatologique (renforcer le phototype de patients ayant une peau claire et sensible au soleil).

5 Ainsi, selon des variantes avantageuses de l'invention, la composition selon l'invention est destinée à augmenter et intensifier la pigmentation normale de la peau sans soleil. Elle est également destinée à accélérer et intensifier le bronzage. Elle peut également être destinée à stimuler la photoprotection constitutive et à renforcer le phototype. Elle est également destinée à prévenir le photovieillissement. Elle est enfin également destinée à prévenir la photocancérogénèse cutanée.

10 Dans le cadre de la présente invention, on entend par photoprotection constitutive le phototype c'est-à-dire la capacité innée à se protéger du soleil par la sensibilité à la rougeur aux UV, la pigmentation génétiquement acquise sans soleil (carnation de la peau normale) et le bronzage consécutif aux expositions (carnation de la peau après soleil).

15 L'invention a également pour objet une méthode de traitement cosmétique pour stimuler la pigmentation constitutive ou acquise, caractérisée en ce que l'on applique par voie topique une composition comprenant au moins un hydrolysate de protéines de riz. Cette méthode de traitement cosmétique permet notamment d'accélérer le bronzage et la couleur naturelle de la peau sans soleil ou d'acquérir un bronzage sans ou avec peu
20 de soleil.

Cette composition peut également être utilisée dans le traitement des tâches de dépigmentation (tâches blanches) de la peau, telles que le vitiligo ou les hypopigmentation iatrogènes (dermo-corticoïdes). La composition peut être également utilisée pour repigmenter la peau chez des patients ayant développé un pityriasis, en
25 particulier un *Pityriasis versicolor*. Elle pourrait aussi permettre aux personnes atteintes de la pathologie dite des enfants de la lune d'avoir une stimulation sans soleil de la pigmentation cutanée.

Cette composition peut être destinée à stimuler la photoprotection constitutive et à renforcer le phototype.

30 L'invention a donc aussi pour objet l'utilisation d'un hydrolysate de protéines de riz pour la fabrication d'une composition ou d'un médicament destiné au traitement et à la prévention des tâches de dépigmentation (repigmenter les tâches blanches cutanées).

Les tâches de dépigmentation peuvent être dues ou consécutives à une affection ou une sensibilisation choisie dans le groupe constitué par un vitiligo, un pityriasis (*Pityriasis versicolor*), une utilisation de dermo-corticoïdes, une cicatrice ou une exposition solaire intensive. Les tâches de dépigmentation peuvent être dues à un photovieillissement
5 important.

L'invention a également pour objet l'utilisation d'un hydrolysate de protéines de riz pour la fabrication d'un soin capillaire pour la prévention et le traitement des cheveux blancs.

L'invention a enfin pour objet l'utilisation d'un hydrolysate de protéines de riz
10 pour la fabrication d'une composition ou d'un médicament destiné à la prévention de la photocarcinogénèse cutanée.

Dans le cadre de la présente invention, les expressions « hydrolysats de protéines de riz » et « peptides de riz » désignent toutes deux le produit résultant de l'hydrolyse
15 enzymatique de protéines de riz.

Les peptides de riz sont déjà connus de l'art antérieur et des procédés d'obtention de ces peptides ont déjà été décrits (EP 575 452, WO 02/102347).

Des hydrolysats de protéines de riz sont disponibles dans le commerce auprès de la société SILAB sous la dénomination Nutriskin. Ces hydrolysats comprennent des
20 peptides de faible poids moléculaire (inférieur à 1400 daltons). Ils peuvent être obtenus comme décrit dans la demande internationale WO 02/102347.

Un procédé de préparation d'un hydrolysate de protéines de riz comprend par exemple les étapes consistant à :

- solubiliser des protéines de riz dans l'eau pour obtenir une suspension,
- 25 - hydrolyser cette suspension en présence d'une ou plusieurs protéases,
- avantageusement filtrer sur membrane pour éliminer les composés insolubles, l'enzyme résiduelle et les peptides de haut poids moléculaire (supérieur à 10 000 daltons) ;
- et éventuellement, réaliser une filtration stérilisante du concentrat obtenu
30 précédemment.

Les protéines de riz utilisées peuvent être obtenues par broyage des grains de riz (ex : *Oryza sativa*). Des concentrats de protéines de riz sont également disponibles dans le commerce (commercialisés par la société REMY Industries, par exemple).

Avantageusement, le procédé de préparation de l'hydrolysat de protéines de riz ne comprend pas d'étape de fermentation ou de germination. En outre, le riz utilisé dans la composition selon l'invention et/ou mis en oeuvre dans le procédé ci-dessus appartient de préférence au genre *Oryza* et est plus préférentiellement de l'espèce *Oryza sativa* L. Avantageusement, l'hydrolysat de riz utilisé dans la composition selon l'invention, et celui obtenu dans le procédé de préparation ci-dessus, sont issus d'une fraction de riz exempte de son de riz

L'hydrolysat de protéines de riz utilisé dans le procédé de l'invention pourra comprendre des peptides ayant une masse moléculaire moyenne allant de moins de 300 daltons à plus de 10.000 daltons, de préférence une masse moléculaire moyenne allant de 300 daltons à 3500 daltons.

En particulier, on utilisera de préférence un hydrolysat de protéines de riz comprenant des peptides ayant une masse moléculaire inférieure ou égale à 10 000 daltons, ou préférentiellement une masse moléculaire inférieure ou égale à 3 500 Daltons. Selon un mode particulier de l'invention, au moins 75% en masse, avantageusement au moins 80% en masse, plus avantageusement au moins 85% en masse, de peptides ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3 500 Da. En particulier, au moins 50% en masse des peptides, avantageusement au moins 55% en nombre des peptides, ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 1 200 Da.

La concentration en peptides de riz dans la composition (cosmétique, dermatologique ou nutraceutique) selon l'invention est avantageusement comprise entre environ 0,1% et environ 20% en poids, plus avantageusement entre environ 1% et environ 10% en poids, encore plus avantageusement entre environ 4% et environ 6% en poids, par rapport au poids total de la composition.

La composition utilisée selon l'invention peut contenir d'autres actifs à action pigmentante (protection UV en plus) ou colorante de la peau, conduisant à un effet complémentaire ou synergique.

Comme exemple d'agents pigmentants ou colorants, on peut notamment citer

- les agents qui colorent la peau : le dihydroxyacétone, les mélanines ;
 - les agents qui stimulent le procédé de pigmentation naturelle : les psolarènes (8-méthoxypsolarène, 5-méthoxypsolarène, 4,5',8-triméthylpsolarène ou des extraits végétaux de *Psorelea corylifolia* et de *Ammi majus*), les caroténoïdes (lycopène, canthaxanthine), les agents stimulant la voie de l'AMP cyclique (1. les analogues de l'AMPc, tels que le 8-bromo-AMPc ou le dibutiryl-AMPc, 2. la forskoline, 3. l'isobutyl-méthyl-xanthine ou la théophylline), les activateurs des protéines kinase C (diacylglycérols, en particulier oléyl-acétyl-glycérol), diols aliphatiques ou cycliques (1,2-propandiol, 5-norbomane-2,2-diméthanol, norbomane-2,2-diméthano), les diols bicycliques monoterpène, les dérivés de tyrosine (L-tyrosine, L-DOPA), le diméthylsulfoxyde, les agents lysomotropiques, les dinucléotides thymidine, les fragments d'ADN, les analogues de l'hormone stimulant les mélanocytes, le 3-isobutyl-1-méthylxanthine, les donneurs d'acide nitrique (David A, Brown, Journal of photochemistry and photobiology B :biology 63 (2001) 148-161) ;
 - les extraits végétaux, en particulier les algues, démontrant une activité promélanogène : *Laminaria digitata* (Thalitan de Codif).
- La tyrosinase est une enzyme impliquée dans la mélanogénèse. Ainsi, les peptides de riz selon l'invention peuvent être associés avec des actifs capables :
- d'activer les facteurs inducteurs de synthèse de tyrosinase ;
 - de promouvoir l'activité enzymatique de la tyrosinase ;
 - de promouvoir la glycosilation de la tyrosinase (permet son absorption par les mélanosomes) ;
 - d'augmenter l'activité globale des mélanocytes ;
 - de promouvoir le transfert de la tyrosinase dans les prémélanosomes ;
 - de favoriser les précurseurs de la mélanine ;
 - de restreindre l'activité cellulaire, ce qui permet de conserver les kératinocytes chargés en mélanine.

Les peptides de riz peuvent également être associés à des agents oxydants ou anti-oxydants, conduisant à un effet complémentaire ou synergique. Comme exemple

d'agents anti-oxydants, on peut notamment citer la vitamine C, la vitamine E, les polyphénols (notamment ceux extraits du thé vert ou de raisin ou de pin), les dérivés soufrés.

Les peptides de riz peuvent également être associés à des protecteurs cellulaires de l'agression solaire, autres que les anti-oxydants, agissant sur les cellules coup de soleil, la p53, les protéines de stress (heat shock proteins), l'apoptose, la lyse des membranes, la libération de cytokines ou de médiateurs cellulaires.

Selon un autre aspect de l'invention, les compositions selon l'invention contiennent également au moins un filtre ou un écran solaire UVB et/ou UVA ; tels les écrans ou filtres minéraux et/ou organiques connus de l'homme du métier qui adaptera leur choix et leurs concentrations en fonction du degré de protection recherché.

Les compositions selon l'invention peuvent en outre contenir des agents exfoliants ou hydratants tels que les alpha-hydroxyacides et salicylique et leurs dérivés sous forme d'ester par exemple.

Les compositions selon l'invention peuvent également contenir des agents anti-inflammatoires ou apaisants, des agents désensibilisants cutanés tels que des AINS (Anti-inflammatoires non stéroïdiens), des dermocorticoïdes, des agonistes PPAR (peroxysme proliferator activated receptor : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes), des dérivés de réglisse, de bisabolol, d'isoflavones (de soja par exemple) glycosilés ou non, du palmitoyléthanolamide, des insaponifiables à base de phytostérols et de vitamines E, des anti-COX et/ou LOX (inhibiteur de cyclo-oxygénase et/ou de lipoxydase), des eaux thermales, marines ou reconstituées à partir d'oligoéléments exogènes.

Enfin, les compositions selon l'invention peuvent également contenir des anti-ages : rétinol, vitamines B3, C, A, du lycopène ou des carotènes ou tous caroténoïdes des acides alpha-hydroxy (AHA), des acides bêta-hydroxy (BHA), libres, estérifiés ou greffés, des protéines de la matrice extra-cellulaire (glucosamine, chondroïtine sulfate), du collagène, de l'élastine et leurs activateurs, des dérivés furaniques de l'avocat, des phytosterols, des acides gras insaturés et polyinsaturés, des isoflavones de plantes (soja, trèfle), des lactobacillus et autres pré et probiotiques.

Dans le cadre du traitement ou de la prévention des cheveux blancs, la composition peut en outre comprendre des activateurs de la repousse du poil et des

cheveux (minoxidil, aminexil...) ou des actifs inhibant ou ralentissant leurs chutes. Les compositions peuvent aussi comprendre des agents de permanentes et colorants du cheveux, des agents filmogènes et fixant, des coiffants capillaires.

5 La composition selon l'invention peut être administrée par voie topique ou par voie orale.

Dans le cadre d'une application topique, la composition selon l'invention comprend un support dermatologiquement et/ou cosmétiquement acceptable, c'est à dire un support compatible avec la peau. Elle peut avantageusement 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 (nanosphères, nanocapsules, vésicules lipidiques), d'un dispositif trans-dermique ou sous toute autre forme pour application topique.

15 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.

20 Dans le cadre d'une administration orale, la composition peut se présenter sous forme de capsule, gélule, comprimé, granule, spray ou solution buvable. Lorsque la composition se présente sous forme de capsule molle ou de gélule, l'enveloppe de ces capsules molles ou de ces gélules peut contenir notamment de la gélatine animale telle que la gélatine de poisson, de la glycérine, ou un matériau d'origine végétale tel qu'un dérivé de cellulose ou d'amidon, ou une protéine végétale. Lorsque la composition se présente sous forme de gélule, de comprimé, ou de granule, les actifs peuvent être fixés sur un support pulvérulent tel que la silice, la cellulose, et la maltodextrine.

30 La composition selon l'invention peut contenir également les adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les stabilisants, 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 ou exfoliantes.

Les exemples qui suivent ont pour but l'évaluation des effets d'un actif à base de peptides de riz sur la pigmentation et la photoprotection cutanée.

Pigmentation : évaluation multiparamétrique dans les axes suivants :

- 5 - Effets sur la production de mélanine par des mélanocytes normaux humains en co-culture avec des kératinocytes (NHEM-NHEK) irradiés ou non (exemple 2)
 - Effets sur l'activité de la tyrosinase dans les cultures de mélanocytes (NHEM) (exemple 3)
 - Effets sur la dendricité de mélanocytes en co-culture avec des kératinocytes
10 (NHEM-NHEK) (exemple 4)
 - Effet sur le transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes voisins (exemple 5)
 - Effets sur la pigmentation de peau en survie (exemple 6)
- 15 Photoprotection : effet sur la synthèse du glutathion (GSH) par des fibroblastes cutanés humains irradiés aux UVA (exemple 7)

Exemple 1 : Peptides de riz selon l'invention

20 Des peptides de riz sont obtenus par hydrolyse enzymatique de protéines de riz. Les protéines résiduelles sont éliminées par ultrafiltration avec un seuil de coupure à 10 000 Da. Les peptides sont concentrés par évaporation de l'eau sous vide ou par nanofiltration (200 Da) jusqu'à 5% de matière sèche. La matière sèche peut être obtenue par évaporation à sec, par lyophilisation ou par atomisation.

25 Les caractéristiques des peptides de riz obtenus sont résumées dans le tableau 1 suivant :

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------|
| Degré d'hydrolyse | 30%-40% |
| % de matière sèche (MS) | 4-6 % ou > 80 % si atomisé |
| PH | 4-7 |
| Teneur en protéines / MS | 80%-95 % |
| Teneur en azote alpha aminé / MS | 15%-25% |
| Teneur en acides aminés libres | <4% |
| Teneur en acides aminés soufrés | <3% |
| <u>Répartition en masse molaire</u> | |
| | > 3500 Da : <2% |
| | 3500 – 1200 Da : 20-35% |
| | 1200 – 300 Da : 50-65% |
| | < 300 Da : 5-15% |

Tableau 1 : caractéristiques des peptides de riz

Ces peptides de riz sont ensuite testés dans les exemples 2 à 7 qui suivent.

5

Exemple 2 : Dosage de la mélanine produite par des mélanocytes normaux humains en co-culture avec des kératinocytes (NHEM/NHEK), irradiés ou non.

Des co-cultures NHEM / NHEK ont étéensemencées en plaques 24 puits. Trois
10 séries de plaques identiques ont été réalisées afin d'évaluer :

- a. La quantité de mélanine par spectrophotométrie ;
- b. La viabilité des cellules à la fin de l'expérience (test au MTT) ;
- c. La quantité de protéines.

Après incubation 24 heures à 37°C, le milieu de culture a été éliminé et
15 remplacé par du milieu contenant ou non (témoin) les peptides de riz (à 0,1 ; 0,5 et 2 mg/ml) ou la molécule de référence pro-pigmentante (IBMX = Isobutylmethylxanthine à 200 µM) puis les co-cultures ont été incubées à 37°C pendant 10 jours.

Un lot de plaques n'a pas été irradié (lot co-culture NHEM / NHEK non irradiée).

20 Le second lot a été irradié : 4 jours consécutifs par une dose de 25 mJ/cm² d'UVB + 300 mJ/cm² d'UVA puis le milieu de culture contenant ou non les produits (peptides de riz ou IBMX) a été renouvelé, les co-cultures ont été cultivées 72 h sans irradiation puis à nouveau irradiées à 25 mJ/cm² UVB + 300 mJ/cm² d'UVA pendant 4 jours consécutifs (avec changement du milieu au bout de 48 h).

A la fin du traitement, les milieux de culture ont été éliminés et la mélanine contenue dans les cellules a été extraite par une solution de NaOH 0,5 N, puis la quantité de mélanine produite dans chaque condition de co-culture a été évaluée par mesure de la densité optique des échantillons à 405 nm contre une gamme de mélanine exogène.

Viabilité cellulaire et quantité de protéines

Les résultats du test au MTT sont présentés dans le tableau 2 suivant :

| Echantillon | % de viabilité dans les co-cultures non irradiées | % de viabilité dans les co-cultures irradiées |
|-----------------------------|---|---|
| Témoin | 100 | 100 |
| IBMX à 200 μ M | 118 | 111 |
| Peptides de riz à 0,1 mg/ml | 122 | 112 |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 131 | 122 |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | 138 | 126 |

10 Tableau 2 : Evaluation de la viabilité cellulaire dans les co-cultures NHEM/NHEK

Les résultats du dosage des protéines sont présentés dans le tableau 3 suivant :

| Echantillon | Protéines (mg/ml) dans les co-cultures non irradiées | Protéines (mg/ml) dans les co-cultures irradiées |
|-----------------------------|--|--|
| Témoin | 0,828 | 0,767 |
| IBMX à 200 μ M | 0,933 | 0,833 |
| Peptides de riz à 0,1 mg/ml | 0,864 | 0,742 |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 0,890 | 0,774 |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | 0,942 | 0,973 |

Tableau 3 : Dosage des protéines totales dans les co-cultures

15 Les peptides de riz ne présentent aucune toxicité sur les co-cultures NHEM / NHEK (même remarque pour l'IBMX). Au contraire, une augmentation de la quantité de protéines et de l'activité métabolique des cellules en présence des peptides de riz comme de l'IBMX a été mise en évidence.

Dosage de la mélanine

Les résultats sont présentés dans le tableau 4 suivant :

| Echantillon | % d'augmentation de la quantité de mélanine par rapport au témoin, dans les co-cultures non-irradiées | % d'augmentation de la quantité de mélanine par rapport au témoin, dans les co-cultures irradiées |
|-----------------------------|---|---|
| IBMX à 200 μ M | +18 % * | +14 % * |
| Peptides de riz à 0,1 mg/ml | +15 % * | +7 % \$ |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | +12 % * | +5 % |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | +29 % * | +11 % * |

Tableau 4 : Modulation de la production de la mélanine dans les co-cultures NHEM/NHEK

5

* Statistiquement différent du témoin ($p < 0,01$, test Dunnett)

\$ Statistiquement différent du témoin ($p < 0,05$; test Dunnett)

Dans les conditions non irradiées, les peptides de riz testés à 0,1, 0,5 et 2,0 mg/ml ont significativement augmenté la quantité de mélanine (respectivement +15 %, +12 % et +29 % par rapport au témoin, $p < 0,01$).

10

Dans les conditions irradiées, les peptides de riz testés à 2 mg/ml ont significativement augmenté la quantité de mélanine (+11 % par rapport au témoin, $p < 0,01$). A 0,5 mg/ml et 0,1 mg/ml, cette stimulation était moins marquée.

Les peptides de riz agissent sur la synthèse de mélanine de la même manière que la molécule de référence pro-pigmentante (IBMX).

15

De plus, comme pour l'IBMX, la stimulation de la synthèse de mélanine par les peptides de riz est à corrélérer avec une augmentation de la quantité de protéines et de l'activité métabolique des cellules (% viabilité) (cf. tableaux 2 et 3).

20

Exemple 3 Effets sur l'activité de la tyrosinase dans des cultures de mélanocytes (NHEM).

Les mélanocytes (NHEM) ont été pré-cultivés en plaques 96 puits pendant 24 heures, puis les cellules ont été traitées par les peptides de riz ou l'IBMX (200 μ M), pendant 72 heures à 37°C.

A la fin du traitement, la tyrosinase contenue dans les cellules a été extraite, la réaction d'oxydation de la L-DOPA en DOPAquinone a été suivie après ajout de la L-DOPA (substrat de la réaction) pendant 1 heure à 37°C. L'activité tyrosinase a ensuite été évaluée par mesure de la densité optique des échantillons à 450 nm, contre une

5 gamme étalon de tyrosinase.

Les résultats sont présentés dans le tableau 5 suivant :

| Echantillon | Activité tyrosinase (unité/ml) | % d'augmentation par rapport au témoin |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| Témoin | 29,12 | - |
| IBMX à 200 µM | 60,88 * | +109 % |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 46,29 * | +59 % |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | 79,18 * | +172 % |

Tableau 5: Effets des traitements sur l'activité tyrosinase de mélanocytes humains

* Statistiquement différent du témoin ($p < 0,01$, test Dunnett)

Les peptides de riz, testés à 0,5 mg/ml et 2 mg/ml, ont significativement stimulé

10 l'activité tyrosinase de mélanocytes humains, suivant un effet dose-dépendant (respectivement +59% et +172% par rapport au témoin, $p < 0,01$).

Exemple 4 : Evaluation de la dendricité de mélanocytes en co-culture avec des kératinocytes (NHEM / NHEK)

15

Les co-cultures NHEM / NHEK ont étéensemencées 24 heures avant le test en plaques 96 puits, puis ont été incubées pendant 72 heures en présence ou non (témoin) des peptides de riz (à 0,1 ; 0,5 et 2,0 mg/ml) ou de l'IBMX (à 200 µM).

La dendricité a été mise en évidence par un marquage fluorescent à l'aide d'un

20 anticorps anti-MEL5 (ou TRP1 - Tyrosinase Related Protein 1) spécifique des mélanosomes). Le marquage a été révélé par un anticorps secondaire GAM-FITC.

Cette analyse a permis de déterminer la densité des prolongements des mélanocytes (nombre et longueur totale des dendrites par mélanocytes).

Effet sur la dendricité de mélanocytes en co-culture avec des kératinocytes

| Traitement | Nombre moyen de dendrites par mélanocyte | % d'augmentation par rapport au témoin |
|-----------------------------|--|--|
| Témoin | 12,18 | - |
| IBMX à 200 μ M | 15,30 * | + 26 % |
| Peptides de riz à 0,1 mg/ml | 12,73 | + 4 % |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 14,52 * | + 19 % |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | 15,43 * | + 27 % |

Tableau 6 : Mesure de la dendricité des mélanocytes dans des co-cultures NHEM / NHEK : Analyse du nombre de dendrites par mélanocytes.

* Statistiquement différent du témoin ($p < 0,01$, test Dunnett)

| Traitement | Longueur moyenne des dendrites par mélanocyte | % d'augmentation par rapport au témoin |
|-----------------------------|---|--|
| Témoin | 228,18 | - |
| IBMX à 200 μ M | 402,50 \$ | + 76 % |
| Peptides de riz à 0,1 mg/ml | 276,09 | + 21 % |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 285,20 | + 25 % |
| Peptides de riz à 2,0 mg/ml | 381,82 * | + 67 % |

Tableau 7 : Mesure de la dendricité des mélanocytes dans des co-cultures

NHEM / NHEK : Analyse de la longueur des dendrites.

\$ Statistiquement différent du témoin ($p < 0,01$, \$ $p < 0,05$, test Dunnett)

Les peptides de riz testés à 2 mg/ml et 0,5 mg/ml ont augmenté de façon dose-dépendante le nombre et la longueur des prolongements des mélanocytes. A 0,1 mg/ml, l'effet sur le nombre de dendrites n'est plus visible par contre on observe encore un léger effet sur la longueur.

Exemple 5 : Effet sur le transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes voisins.

Protocole:

Avant ensemencement, les mélanocytes ont été « chargés » avec la sonde fluorescente traceuse du transfert de mélanosomes « succinimidyl ester of carboxy fluorescein diacetate » (CFDA, en français : diacétate de carboxyfluorescéine, succinimidyl ester).

5 Les mélanocytes « chargés » ont ensuite été incubés en co-culture avec les kératinocytes à 37°C (NHEM/NHEK). Plusieurs contrôles ont été réalisés afin de procéder aux réglages des paramètres d'acquisition par cytométrie de flux :

- Co-culture NHEM / NHEK « non chargés ».
- Cultures NHEK seuls.
- 10 - Cultures NHEM « chargés » ou non, testés seuls.

A 60-80% de confluence, le milieu de culture a été remplacé par du milieu contenant ou non (témoin) les peptides de riz (0,5 et 2 mg/ml) ou l'IBMX, puis les cellules ont été cultivées à 37°C. Après 72h d'incubation, le traitement des cellules a été renouvelé comme précédemment et les cellules ont été à nouveau incubées 72h à
15 37°C. Chaque condition de traitement a été réalisée en triplicata.

A la fin du traitement, les cellules ont été trypsinées, fixées, perméabilisées, puis marquées avec un anticorps anti-cytokératines (spécifique des kératinocytes). Le marquage a été révélé à l'aide d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps anti-cytokératines et couplé à la phycoérythrine. Les paramètres de fluorescence ont été
20 mesurés par cytométrie de flux.

Analyse des résultats par cytométrie de flux :

L'analyse cytométrique a été paramétrée (grâce aux différents contrôles réalisés) afin de sélectionner dans la population cellulaire totale (NHEM/NHEK) uniquement les kératinocytes positifs ; c'est à dire ayant incorporé la sonde fluorescente CFDA
25 (indiquant le transfert des mélanosomes) et présentant un marquage anti-cytokératines (spécifique des kératinocytes). Cette population de kératinocytes « doublement marquée » est obligatoirement le résultat d'un transfert de mélanosomes du mélanocyte vers les kératinocytes.

Résultats et conclusions :

30 Les résultats sont présentés dans le tableau 8 suivant :

| Echantillon | % moyen de cellules positives (double marquage CFDA/Cytokératines) | % d'augmentation par rapport au témoin |
|-----------------------------|--|---|
| Témoin | 18,1 | - |
| IBMX à 200 μ M | 26,7 * | + 48 % |
| Peptides de riz à 0,5 mg/ml | 23,3 * | +29 % |
| Peptides de riz à 2 mg/ml | 23,1 \$ | +28 % |

Tableau 8 : effet des traitements sur le transfert de melanosomes des mélanocytes aux kératinocytes

\$ Statistiquement différent du témoin ($p < 0,01$, \$ $p < 0,05$, test Dunnett)

5 Les peptides de riz testés à 0,5 mg/ml et 2 mg/ml ont induit une augmentation significative du transfert de mélanosomes (respectivement 29% et 28% par rapport au témoin). Les peptides de riz présentent donc un effet stimulant sur le transfert des mélanosomes.

10 **Exemple 6** : Effets sur la pigmentation de peau en survie

Des échantillons de peau obtenus à partir d'une biopsie mammaire ont été traités par application topique des peptides de riz (à 0,1 ; 0,5 et 2,0 mg/ml) ou de l'IBMX (à 200 μ M) (dépôt de 20 μ l, soit 5 mg/cm² environ). Les explants ont ensuite été
15 maintenus pendant 144 heures à 37°C.

Les zones traitées et contrôles ont été photographiées à la fin du traitement et la coloration de la peau a été analysée visuellement.

L'IBMX a légèrement augmenté la pigmentation de la peau après 144 heures de culture.

20 Les peptides de riz ont augmenté de façon dose dépendante la pigmentation de la peau après 144h de culture. L'actif présente un effet pro-pigmentant en accord avec les résultats obtenus dans les autres tests réalisés.

CONCLUSION DES EXEMPLES 2 à 6 :

Les exemples précédemment cités ont permis de mettre en évidence un effet pro-pigmentant des peptides de riz. En effet, il a été démontré que les peptides de riz
5 augmentent la synthèse de mélanine dans des co-cultures NHEM / NHEK irradiées ou non ; augmentent l'activité tyrosinase (enzyme clé dans la mélanogénèse) ; augmentent le nombre et la longueur des prolongements des mélanocytes ; augmentent le transfert de mélanosomes des mélanocytes aux kératinocytes et augmentent la pigmentation d'explants de peau.

10 De plus l'activité des peptides de riz, dans les différentes études réalisées, est comparable à l'activité de l'IBMX, utilisé ici comme molécule de référence pro-pigmentante.

L'actif à base de peptides de riz est donc un accélérateur de bronzage. En effet, avec ou sans exposition aux UV, il induit une forte stimulation de la pigmentation
15 cutanée.

Exemple 7 : effet sur la synthèse du glutathion (GSH) par des fibroblastes cutanés humains irradiés aux UVA

20 Les fibroblastes dermiques ont étéensemencés en boîtes de Pétri d'un diamètre de 60 mm. Les cellules ont été pré-traitées pendant 18 heures par les peptides de riz ou la N-Acétyl Cystéine à 5 mM (NAC = molécule anti-oxydante de référence), puis irradiées par une dose de 15 J/cm² d'UVA. Après irradiation, les fibroblastes ont été incubés 3 heures supplémentaires à 37°C.

25 A la fin du traitement, deux séries d'échantillons ont été récoltées afin d'évaluer :

- a. La quantité de protéines totales selon la méthode de Lowry
- b. Le taux de glutathion intracellulaire par dosage (kit commercialisé)

Les résultats sont exprimés dans le tableau 9 suivant :

| | GSH (μM) | Protéines totales (g/l) | GSH ($\mu\text{mol/g}$ protéines) | % d'augmentation/cellules contrôles irradiées) |
|---|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|--|
| Cellules contrôles | 18,30 | 0,764 | 23,95 | - |
| Cellules contrôles + UVA $15\text{J}/\text{cm}^2$ | 15,50 | 0,708 | 21,89 | -8,60% vs cellules contrôles |
| NAC (5 mM) | 21,10 | 0,748 | 28,209 | 29 |
| Peptides de riz 0,5% MS | 17,70 | 0,718 | 24,65 | 13 |
| Peptides de riz 1% MS | 18,70 | 0,714 | 26,19 | 20 |
| Peptides de riz 1,5% MS | 21,20 | 0,753 | 28,15 | 29 |

Tableau 9 : modulation du glutathion intracellulaire de fibroblastes dermiques irradiés aux UVA.

Une irradiation à la dose de $15\text{ J}/\text{cm}^2$ fait chuter de presque 9% le taux de GSH intracellulaire des fibroblastes par rapport aux cellules non irradiées.

La NAC, à la dose de 5 mM, augmente de 29% le contenu en GSH des cellules irradiées.

Les peptides de riz aux concentrations de 0,5-1 et 1,5% MS augmentent de respectivement 13, 20 et 29% le contenu en GSH de fibroblastes soumis à un stress UVA.

En d'autres termes, les peptides de riz sont capables de compenser la diminution des taux intracellulaires de GSH suite à une irradiation UVA.

CONCLUSION GENERALE :

Les peptides de riz permettent de stimuler le bronzage tout en protégeant la peau des effets nocifs du soleil.

Exemple 8 : formulations8a – crème visage

| | | |
|----|------------------------------------|--------------|
| 5 | | % |
| | Isononyl Isononanoate | 6,000 |
| | Di-C ₁₂₋₁₃ Alkyl Malate | 3,000 |
| | Stéarate isocétyle | 4,000 |
| | Butylène glycol | 1,000 |
| 10 | Peptides de riz | 3,000 |
| | Dicaprylyl Ether | 5,000 |
| | Salicylate de Silanediol | 1,000 |
| | Alcool arachique | 1,650 |
| | Trométhamine | 1,180 |
| 15 | Alcool cétylique | 0,5 |
| | Acide salicylique | 1,000 |
| | Glucoside ascorbyl | 1,000 |
| | Glycine | 1,000 |
| | Acétate de tocopheryl | 1,000 |
| 20 | Alcool béhénylique | 0,900 |
| | Squalane | 0,790 |
| | Citrate de Sodium | 0,660 |
| | Copolymère PPG-12/SMDI | 0,100 |
| | Arachidyl Glucoside | 0,350 |
| 25 | Parfum | 0,400 |
| | Gomme sclerotium | 0,300 |
| | Alcool cétéarylique | 0,430 |
| | Acide citrique | 0,110 |
| | Sepigel 305* | 0,100 |
| 30 | Système conservateur | QS |
| | Eau | QSP 100 |

*produit commercialisé par la société Seppic

8b - Cosmétique anti age solaire et bronzante (Quantité : 100g)

| | | % |
|----|--|-------|
| | Eau | 64,83 |
| 5 | Peptides de de riz | 7 |
| | Insaponifiable d'avocat furanique | 2 |
| | Butylène glycol | 3 |
| | Alcool cétylique | 6 |
| | Alkyl lactate C12-13 | 2 |
| 10 | Huile minérale | 7 |
| | Ceteth 20 | 2 |
| | Acide stéarique | 1 |
| | Cinnamate | 5 |
| | Mexoryl SX | 3 |
| 15 | Mexoryl XL | 4 |
| | Dioxyde de titane ultrafin | 7 |
| | Oxyde de zinc | 2 |
| | Tinosorb M et S | 4 |
| | Acétate de Tocophérol | 0,50 |
| 20 | Proplène glycol | 0,56 |
| | EDTA dissodique | 0,52 |
| | Triéthanolamine | 0,80 |
| | Conservateur | 0,30 |
| | Acide citrique | 0,25 |
| 25 | Methyl paraben | 0,11 |
| | Steareth -20 | 1 |
| | Metabisulfite de sodium | 0,05 |
| | Sulfite de sodium | 0,05 |
| | Propyl paraben | 0,03 |

8c – rollon anti tâche blanche (Quantité : 100g)

| | % | |
|----|------------------------------------|-------------|
| | Vaseline officinale | 6,00 |
| 5 | Huile palmiste hydrogénée | 4,00 |
| | Caprylo caprate de glycérol | 2,00 |
| | Sucro ester 7 (Distérate sucrose)) | 6,00 |
| | Squalane | 1,00 |
| | Cire de candelilla | 2,00 |
| 10 | Sucro ester 11 (Stéarate sucrose) | 0,50 |
| | Peptides de riz | 2,00 |
| | Concentrat de tournesol | 2,00 |
| | Glycérol | 5,00 |
| | Glucodextrine | 1,00 |
| 15 | Trométamine | 0,01 |
| | Gomme xanthane | 0,20 |
| | Hydroxyméthylglycinate A | 0,60 |
| | Acide citrique | 0,32 |
| | Cyclométhiconol | 5,00 |
| 20 | Céramide/Cholestérol | 0,60 |
| | Eau purifiée | 5,00 |

8d - crème d'entretien du hâle d'été (Quantité : 100g)

| | % | |
|----|---------------------|------|
| 25 | Squalane | 1,00 |
| | Erythrityl ester | 4,00 |
| | Decyl pentanoate | 4,00 |
| | Cetearyl glucoside | 2,00 |
| | Lauryl ether 23 OE | 1,00 |
| 30 | Cutina CBSV | 1,00 |
| | Cire d'abeille | 0,50 |
| | Myristate myristyle | 1,00 |

| | | |
|----|------------------------|-------------|
| | Conservateur | 0,30 |
| | Vaseline épaisse | 5,00 |
| | Squalane gelifiée | 3,00 |
| | Peptides de riz | 5,00 |
| 5 | Eau purifiée | 56,51 |
| | Phenoxyéthanol | 0,80 |
| | EDTA de sodium | 0,10 |
| | Acide citrique | 0,14 |
| | Sorbate de potassium | 0,45 |
| 10 | Glycérine | 5,00 |
| | Epaississant | 0,50 |
| | Lessive de soude | 0,30 |
| | Polyacrylamide gel 60° | 1,00 |
| | Acétate vitamine E 35° | 0,50 |
| 15 | Parfum | 0,50 |
| | Peptide de lupin | 1,00 |
| | Cyclométhyconol | 7,00 |
| | Silice TIO2 | 1,00 |
| | Génisteine 85% | 0,10 |
| 20 | PEG 300 | 0,90 |

8e - Crème bronzante pour le vitiligo et les hypopigmentations (Quantité : 100g)

| | | % |
|----|------------------------|------------|
| | Montanov 68 | 3 |
| 25 | Amphisol K | 0,50 |
| | Miglyol 812 | 6 |
| | Conservateur | 0,30 |
| | Beurre de karité | 1 |
| | Peptides de riz | 1 |
| 30 | polyphénol | 0,5 |
| | DHA | 2 |
| | EDTA Na ₂ | 0,10 |

| | | |
|----|---|---------------|
| | Acide citrique | 0,01 |
| | Conservateur | 0,40 |
| | Butylène glycol | 1 |
| | Gélifiant | 0,25 |
| 5 | Lessive de soude | 0,4 |
| | Gluconate manganèse | 0,05 |
| | Zinc de sel | 0,10 |
| | Eau purifiée | QSP |
| 10 | <u>8f - Capsule molle nutraceutique capillaire autobronzant et fortifiant</u> | |
| | | % |
| | Cystéine ou dérivés acides aminés soufrés | 0,100 |
| | Peptides de riz | 500 |
| | Vitamine du groupe B | 1 |
| 15 | Hydrolysats de pois | 50 |
| | Hydrolysats de plume de canard | 50 |
| | Excipient | QS |
| 20 | <u>8g - Traitement des hypopigmentations par voie orale</u> | |
| | | % |
| | Mucilage (alginate de sodium) | 500 mg |
| | Huile de poisson | 500 mg |
| | Peptides de riz | 100 mg |
| 25 | Sel de zinc | 1 mg |
| | Extrait de carotte | 325 mg |
| | lycopène | 50 mg |
| | Excipient capsule molle | QS |

8h - Gel crème Antiage et bronzant sans soleil (Quantité : 100g)

| | | % |
|----|------------------------|----------|
| | Carbopol Etd 2020 | 0,6 |
| 5 | Gomme xanthane | 0,15 |
| | Génisteine 85% | 0,1 |
| | Rétinol | 0,5 |
| | NaOH | 0,001 |
| | Conservateur | 0,9 |
| 10 | Peptides de riz | 2 |
| | Glucodextrine | 2 |
| | Parfum | 0,7 |
| | Silicone | 0,3 |
| | Eau purifiée | QSP |
| 15 | | |

8i - Lingettes pigmentantes (Quantité : 100g)

| | | % |
|----|------------------------|---------------|
| | Poloxamer 184 | 1,0000 |
| | Parfum | 0,2000 |
| 20 | Eau purifiée | 91,1550 |
| | PEG - 32 | 4,0000 |
| | Conservateur | 1,0000 |
| | Chlorhexidine | 0,1500 |
| | Phenoxyéthanol | 0,1000 |
| 25 | Allantoine | 0,2000 |
| | peptides de riz | 5,0000 |
| | Solubilisant | 1,0000 |
| | Trométhamine | 0,1950 |

8j - Solution hydro glyco alcoolique pour la repousse et la coloration des cheveux

| | % |
|-----------------|----------|
| Alcool dénaturé | 70% |
| 5 Cyclodextrine | 2% |
| Glycol | 25 % |
| Aminexil | 1% |
| Minoxidil | 0,3% |
| Eau | qsp 100% |

Revendications

1. Utilisation d'un hydrolysate de protéines de riz pour la fabrication d'une composition destinée à pigmenter, hyperpigmenter ou repigmenter la peau et les phanères.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est destinée aux applications choisies dans la groupe constitué par l'augmentation et l'intensification de la pigmentation normale de la peau sans soleil, l'accélération et l'intensification du bronzage, la stimulation de la photoprotection constitutive et le renforcement du phototype, la prévention de la photocarcinogénèse cutanée et la prévention du photovieillessement.
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est destinée à repigmenter les taches blanches cutanées.
4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les taches blanches cutanées sont des tâches consécutives à une affection ou une sensibilisation choisie dans le groupe constitué par un vitiligo, un pityriasis, une utilisation de dermo-corticoïdes, une cicatrice ou une exposition solaire intensive.
5. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition est un soin capillaire pour la prévention et le traitement des cheveux blancs.
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-5, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéines de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 10 000 Da.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-5, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéines de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3500 Da.
8. Utilisation selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce qu'au moins 50% des peptides ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 1 200 Da.
9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-8, caractérisée en ce que la composition comprend 0,1 à 20% en poids, par rapport au poids total de la composition, dudit hydrolysate de protéines de riz.
10. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1-9, caractérisée en ce que la composition comprend en outre des agents antioxydants, photo-protecteurs, hydratants, colorants, hyper-pigmentants, ou anti-âges.
11. Utilisation d'un hydrolysate de protéines de riz pour pigmenter, hyperpigmenter ou repigmenter la peau et les phanères.

12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz est destinée aux applications choisies dans le groupe constitué par l'augmentation et l'intensification de la pigmentation normale de la peau sans soleil, l'accélération et l'intensification du bronzage, la stimulation de la photoprotection constitutive et le renforcement du phototype, la prévention de la photocarcinogénèse cutanée et la prévention du photovieillissement.
13. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz est destinée à repigmenter les taches blanches cutanées.
14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que les taches blanches cutanées sont des taches consécutives à une affection ou une sensibilisation choisie dans le groupe constitué par un vitiligo, une pityriasis, une utilisation de dermo-corticoïdes, une cicatrice ou une exposition solaire intensive.
15. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz est destinée à un soin capillaire pour la prévention ou le traitement des cheveux blancs.
16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11-15, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 10 000 Da.
17. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11-15, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3 500 Da.
18. Utilisation selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce que au moins 50% des peptides ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 1 200 Da.
19. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11-18, caractérisée en ce que l'hydrolysate de protéine de riz est utilisée conjointement avec des agents antioxydants, photo-protecteurs, hydratants, colorants, hyper-pigmentants, ou anti-âges.
20. Utilisation d'au moins un hydrolysate de protéine de riz pour stimuler la pigmentation constitutive ou acquise.
21. Utilisation selon la revendication 20, destinée à accélérer le bronzage et la couleur naturelle de la peau sans soleil.
22. Composition cosmétique pour usage destiné à pigmenter, hyperpigmenter ou repigmenter la peau et les phanères, la dite composition comprenant un hydrolysate de protéines de riz et un excipient cosmétiquement acceptable.

23. Composition selon la revendication 22, caractérisée en ce que la composition est destinée aux applications choisies dans la groupe constitué par l'augmentation et l'intensification de la pigmentation normale de la peau sans soleil, l'accélération et l'intensification du bronzage, la stimulation de la photoprotection constitutive et le renforcement du phototype, la prévention de la photocancérogénèse cutanée et la prévention du photovieillissement.
24. Composition selon la revendication 22, caractérisée en ce que la dite composition est destinée à repigmenter les taches blanches cutanées.
25. Composition selon la revendication 24, caractérisée en ce que les taches cutanées sont des taches consécutives à une affection ou une sensibilisation choisie dans le groupe constitué par un vitiligo, un pityriasis, une utilisation de dermo-corticoïde, une cicatrice ou une exposition solaire intensive.
26. Composition selon la revendication 22, caractérisée en ce que la dite composition est destinée à un soin capillaire pour la prévention ou le traitement des cheveux blancs.
27. Composition selon l'une quelconque des revendications 22 à 26, caractérisée en ce que l'hydrolysat de protéines de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 10 000 Da.
28. Composition selon l'une quelconque des revendications 22 à 26, caractérisée en ce que l'hydrolysat de protéine de riz comprend des peptides dont au moins 50% ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 3 500 Da.
29. Composition selon la revendication 27 ou 28, caractérisée en ce que au moins 50% des peptides ont une masse moléculaire comprise entre 300 et 1 200 Da.
30. Composition selon l'une quelconque des revendications 22 à 29, caractérisée en ce que la dite composition comprend 0,1 à 20% en poids, par rapport au poids total de la composition, dudit hydrolysat de protéine de riz.
31. Composition selon l'une quelconque des revendications 22 à 30, caractérisée en ce que la dite composition comprend en outre des agents antioxydants, photo-protecteurs, hydratants, colorants, hyper-pigmentants ou anti-âges.
32. Composition telle que définie à la revendication 22, caractérisée en ce que la dite composition est destinée à stimuler la pigmentation constitutive ou acquise.
33. Composition selon la revendication 32, destinée à accélérer le bronzage et la couleur naturelle de la peau sans soleil.