

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

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

2 863 484

②① N° d'enregistrement national :

03 51029

⑤① Int Cl⁷ : A 61 K 7/075, A 61 K 7/06

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 11.12.03.

③① Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 17.06.05 Bulletin 05/24.

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

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦① Demandeur(s) : L'OREAL Société anonyme — FR.

⑦② Inventeur(s) : BERNARD BRUNO et COMMO STEPHANE.

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : L'OREAL.

⑤④ UTILISATION DE COMPOSES CAPABLES D'AGIR SUR LA VOIE METABOLIQUE CONTROLEE PAR LA DOPACHROME TAUTOMERASE TRP-2 COMME AGENT PROTECTEUR DES MELANOCYTES DU FOLLICULE PILEUX ET APPLICATIONS.

⑤⑦ La présente invention se rapporte à l'utilisation cosmétique d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2), en tant qu'agent protecteur des mélanocytes du follicule pileux et à son utilisation, notamment pour lutter contre la canitie.

L'invention concerne également des compositions cosmétiques particulières pour lutter contre la canitie comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) et à leurs utilisations.

L'invention se rapporte également à un procédé de traitement de la canitie ainsi qu'à un procédé de maintien de la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs par l'application d'une composition cosmétique comprenant au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

L'invention se rapporte en outre à une méthode pour identifier un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) ainsi qu'à une méthode d'évaluation de son activité cytoprotectrice.

FR 2 863 484 - A1



La présente invention se rapporte à l'utilisation cosmétique d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase, en tant qu'agent protecteur des mélanocytes du follicule pileux. En particulier, ce composé est destiné à lutter contre la disparition des mélanocytes du follicule pileux en maintenant et/ou régénérant la population des mélanocytes actifs du bulbe et des mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux.

Le follicule pileux est une invagination tubulaire de l'épiderme qui s'enfonce jusqu'aux couches profondes du derme. La partie inférieure, ou bulbe pileux, comporte elle-même une invagination dans laquelle se trouve la papille dermique. La partie inférieure du bulbe est une zone de prolifération cellulaire où se trouvent les précurseurs des cellules kératinisées constituant le cheveu. Les cellules en ascension issues de ces précurseurs se kératinisent progressivement dans la partie supérieure du bulbe, et cet ensemble de cellules kératinisées formera la tige pileuse.

La couleur des cheveux et des poils repose notamment sur la présence en quantités et ratios variables de deux groupes de mélanines : les eumélanines (pigments bruns et noirs) et les phéomélanines (pigments rouges et jaunes). La pigmentation du cheveu et des poils requiert la présence de mélanocytes au niveau du bulbe du follicule pileux. Ces mélanocytes sont dans un état actif, c'est-à-dire qu'ils synthétisent des mélanines. Ces pigments sont transmis aux kératinocytes destinés à former la tige pileuse ce qui conduira à la pousse d'un cheveu ou d'un poil pigmenté. Cette structure est appelée ci-après « unité folliculaire de pigmentation ».

Chez les mammifères, la mélanogénèse implique au moins trois enzymes : la tyrosinase, la DOPAchrome tautomérase (TRP-2, pour Tyrosinase Related Protein 2) et la DHICAoxydase (TRP-1, pour Tyrosinase Related Protein 1).

La tyrosinase est l'enzyme qui initie la biosynthèse des mélanines. Elle est également décrite comme étant l'enzyme limitante de la mélanogénèse.

La TRP-2 catalyse la tautomérisation du DOPAchrome en acide 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylique (DHICA). En l'absence de TRP-2, le DOPAchrome subit une décarboxylation spontanée pour former le 5,6-dihydroxyindole (DHI).

DHICA et DHI sont tous deux des précurseurs de pigments, TRP-1 oxyde les molécules de DHICA pour former des dérivés de quinones (Pawelek JM and Chakraborty AK. The enzymology of melanogenesis. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. New York: Oxford university press; 1998. p. 391-400).

Les trois enzymes, tyrosinase, TRP-2 et TRP-1, apparaissent spécifiquement impliquées dans la mélanogénèse. De plus, l'activité de ces trois enzymes a été décrite comme nécessaire à l'activité maximale de biosynthèse des eumélanines.

5 L'expression de TRP-2 a été observée dans les poils de souris noires, à la fois dans les mélanocytes actifs du bulbe et dans les mélanocytes quiescents de la gaine épithéliale externe. De plus, il est connu que l'activité DOPAchrome tautomérase est augmentée pendant la phase anagène chez la souris noire. Cependant aucune corrélation claire n'a été établie entre l'expression de TRP-2 et l'intensité de la pigmentation (Sturm et al. 1995).

10 Par ailleurs, TRP-2 a également été décrite comme conférant aux mélanocytes qui l'expriment une résistance à des agents endommageant l'ADN tel que le cis-diamminedichloroplatinum(II) (Chu et al. 2000 et Pak et al. 2000). Ces résultats suggèrent que TRP-2 serait aussi impliquée dans une fonction indépendante de la mélanogénèse, l'enzyme pourrait jouer un rôle cytoprotecteur.

15 Le cheveu et le poil subissent un cycle. Ce cycle comprend une phase de croissance (phase anagène), une phase de dégénérescence (phase catagène) et une phase de repos (phase télogène) à la suite de laquelle une nouvelle phase anagène se développera. En raison de ce cycle pileux, et contrairement à l'unité de pigmentation épidermique, l'unité folliculaire de pigmentation doit également être cycliquement renouvelée.

Ce processus a été récemment décrit chez l'homme (Commo S. et Bernard B., 2000, Pigment Cell Res. 13:253-259). Il a plus particulièrement été montré qu'au cours de la transition télogène-anagène, une partie des mélanocytes inactifs contenus dans la capsule télogène prolifère, se positionne autour de la papille dermique du bulbe naissant et commence à exprimer des enzymes nécessaires à la synthèse de mélanines : cette population de mélanocytes correspond aux mélanocytes actifs du bulbe. En parallèle, l'autre partie des mélanocytes reste inactive dans la région supérieure du follicule pileux : cette population de mélanocytes correspond aux mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux.

35 Ces enzymes mélanogènes seront exprimées dans les mélanocytes du bulbe pendant toute la durée de la phase anagène mais ne seront plus exprimées pendant les phases catagène et télogène. Le cycle normal des mélanocytes dans le follicule pileux humain requiert la présence de mélanocytes quiescents dans la région supérieure du follicule pileux, région autrement nommée « réservoir », qui seront cycliquement activés pour

régénérer l'unité folliculaire de pigmentation. Ce mécanisme de renouvellement cellulaire participant au maintien de la pigmentation est spécifique de l'unité folliculaire de pigmentation ; on ne le retrouve pas dans l'unité épidermique de pigmentation.

- 5 Il est admis que la canitie (blanchissement naturel des cheveux) est associée à une diminution de mélanine dans la tige pileaire. La cause de cette diminution n'est pas à ce jour élucidée. Plusieurs hypothèses sont avancées, elle pourrait être liée à une diminution de l'activité mélanogène, par analogie au mécanisme de pigmentation de la peau, mais également à une altération du transfert des mélanines ou à une diminution
10 du nombre de mélanocytes dans le bulbe (Tobin et Paus, 2001) ; aucune démonstration n'a permis à ce jour de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Or la Demanderesse a mis en évidence deux résultats qui valident pour la première fois l'hypothèse selon laquelle la canitie serait liée à une diminution du nombre de
15 mélanocytes actifs dans le bulbe et une diminution du nombre de mélanocytes quiescents dans la région supérieure du follicule pileux. Cette diminution et/ou disparition précoce des mélanocytes est spécifique au follicule pileux et n'affecte pas de façon visible l'épiderme.

- 20 Jusqu'à présent, on pensait en effet que des mélanocytes quiescents étaient présents dans les follicules pileux de cheveux blancs (Takada et al. 1992, Horikawa et al. 1996, Jenner et Randall 2000).

Or, la Demanderesse a constaté que la progression de la canitie est associée à une diminution du nombre de mélanocytes dans les bulbes pileux, qui, bien qu'en nombre restreint, synthétisent et transfèrent les mélanines. La Demanderesse a également
25 observé de façon inattendue et surprenante que la population de mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux humain (encore appelée « réservoir ») est également diminuée au cours du processus de canitie, les cheveux blancs ne possédant plus que quelques - voire plus aucun - mélanocytes, contrairement
30 à l'infundibulum et l'épiderme avoisinant ces cheveux blancs. Cette disparition affecte prématurément et spécifiquement les mélanocytes contenus dans les cheveux.

Il apparaît donc nécessaire de lutter contre la disparition des mélanocytes des follicules pileux humains, processus affectant à la fois les mélanocytes actifs des bulbes et les
35 mélanocytes quiescents de la région supérieure des follicules pileux, pour lutter contre la canitie.

Par ailleurs, la Demanderesse a également constaté de façon inattendue que l'enzyme TRP-2 n'est pas exprimée dans les mélanocytes des follicules pileux humains pigmentés (bruns, noirs et roux) chez l'individu caucasien, asiatique et africain. Cette enzyme n'est détectée ni dans les mélanocytes actifs du bulbe, ni dans les mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux humain alors qu'elle est exprimée dans l'épiderme et l'infundibulum de l'individu caucasien, africain et asiatique. L'absence de TRP-2 est associée à la disparition précoce des mélanocytes qui ne l'expriment pas, c'est-à-dire, les mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux et les mélanocytes actifs du bulbe.

La Demanderesse a donc mis en évidence que TRP2, qui joue un rôle dans la mélanogénèse (synthèse de mélanine) au niveau de l'unité épidermique de pigmentation, joue un rôle différent et méconnu jusqu'ici, à savoir un rôle cytoprotecteur : la présence d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de TRP2 permet de maintenir et/ou régénérer la population de mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux et la population de mélanocytes actifs du bulbe et favoriser ainsi le renouvellement cyclique de l'unité folliculaire garant du maintien de la pigmentation des cheveux, cils et/ou poils.

La Demanderesse a identifié un moyen de maintenir et/ou régénérer la population de mélanocytes du follicule pileux responsables de la pigmentation des cheveux : en effet, elle a montré qu'il était possible d'agir sur la voie métabolique contrôlée par TRP-2.

TRP-2 a une activité métabolique qui permet de protéger les mélanocytes suivant trois processus distincts :

- (i) TRP-2 transforme un métabolite M1 toxique en un métabolite M'1 non toxique ;
- (ii) TRP-2 transforme un métabolite M2 non toxique en un autre métabolite M'2 non toxique empêchant ainsi la production d'un métabolite M"2 toxique qui serait produit à partir de M2 sans l'intervention de TRP-2 ;
- (iii) TRP-2 transforme un métabolite M3 non toxique en un métabolite M'3 bénéfique à la survie des mélanocytes.

Ainsi selon l'invention, un composé capable d'agir sur la voie métabolique de TRP-2 pour protéger les mélanocytes du follicule pileux peut agir de trois façons :

- (1) par des composés capables de dégrader ou capter le métabolite M1 toxique ;
- (2) par des composés capables de capter le métabolite M'2 toxique et/ou capables de freiner sa production ;
- 5 (3) par des composés capables de favoriser la production du métabolite M'3.

Par ailleurs, la Demanderesse a évalué l'activité cytoprotectrice de composés capables d'agir sur la voie métabolique de TRP2 dans des conditions induisant l'apoptose et/ou la
10 sénescence des mélanocytes du follicule pileux.

Elle a ainsi mis au point un moyen pour prévenir et/ou limiter et/ou stopper le développement de la canitie et même de maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs.

15 Ainsi un premier objet de l'invention se rapporte à l'utilisation cosmétique d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase, en tant qu'agent protecteur des mélanocytes du follicule pileux.

Par 'agent protecteur des mélanocytes du follicule pileux', on entend un agent capable
20 de protéger les mélanocytes du follicule pileux notamment contre des agents cytotoxiques responsables de la sénescence et/ou de l'apoptose des mélanocytes du follicule pileux. Parmi les agents cytotoxiques, on peut citer des molécules à caractères génotoxiques et des molécules induisant un stress oxydatif comme le TNF alpha, les lipofuscines, les céroïdes, le TGF beta, le ligand de Fas/CD95, L'IL1 beta, les ions
25 ferreux et cuivreux, des composés chimiques génotoxiques comme le cisplatine et l'oxaloplatine, ou encore des composés comme le cyclophosphamide.

En particulier, le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase tel que défini selon l'invention est destiné à lutter contre la disparition des
30 mélanocytes du follicule pileux en maintenant et/ou en régénérant la population des mélanocytes actifs du bulbe et des mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux.

Le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase
35 selon l'invention est également destiné à favoriser le renouvellement cyclique de l'unité folliculaire de pigmentation.

En particulier, l'objet de l'invention concerne l'utilisation d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase pour prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie.

5

L'objet de l'invention se rapporte aussi à l'utilisation d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris.

10 Le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) pourra notamment être le PBA (L-P-boronophénylalanine) qui réagit avec le DHI en complexant le catechol du DHI évitant ainsi l'oxydation du DHI en dérivés cytotoxiques.

15 Un autre objet de l'invention est une composition pour lutter contre la canitie, comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable, au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) tel que défini précédemment.

20 La composition selon l'invention comprend une quantité de composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase comprise entre 0.001 % et 10 % en poids par volume, préférentiellement entre 0,01 et 5% en poids par volume et encore plus préférentiellement entre 0,1 et 1% en poids par volume.

25 La composition selon l'invention peut être administrée par voie orale ou appliquée sur la peau (sur toute zone cutanée du corps recouverte de poils) et/ou le cuir chevelu.

Par voie orale, la composition selon l'invention peut contenir, le ou les composés capables d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase en solution dans un liquide alimentaire tel qu'une solution aqueuse ou hydroalcoolique, éventuellement aromatisée. Ils peuvent également être incorporés dans un excipient solide ingérable et se présenter par exemple sous forme de granulés, de pilules, de comprimés ou de dragées. Ils peuvent également être placés en solution dans un liquide alimentaire conditionné lui-même éventuellement dans des capsules ingérables.

35

Selon le mode d'administration, la composition de l'invention peut se présenter sous

toutes les formes galéniques normalement utilisées, particulièrement en cosmétologie.
Une composition préférée de l'invention est une composition cosmétique adaptée à une application topique sur le cuir chevelu et/ou la peau.

5 Pour une application topique, la composition utilisable selon l'invention peut être notamment sous la forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse ou de dispersion du type lotion ou sérum, d'émulsions de consistance liquide ou semi-liquide du type lait, obtenues par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse (H/E) ou inversement (E/H), ou de suspensions ou émulsions de consistance molle du type
10 crème ou gel aqueux ou anhydres, ou encore de microcapsules ou microparticules, ou de dispersions vésiculaires de type ionique et/ou non ionique. Elle peut ainsi se présenter sous forme d'onguent, de teinture, de crème, de pommade, de poudre, de timbre, de tampon imbibé, de solution, d'émulsion ou de dispersion vésiculaire, de lotion, de gel, de spray, de suspension, de shampooing, d'aérosol ou de mousse. Elles peuvent
15 être anhydres ou aqueuses. Elle peut également consister en des préparations solides constituant des savons ou des pains de nettoyage.

Ces compositions sont préparées selon les méthodes usuelles.

La composition utilisable selon l'invention peut en particulier être une composition pour
20 soins capillaires, et notamment un shampooing, une lotion de mise en plis, une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une composition de teintures (notamment teintures d'oxydation) éventuellement sous forme de shampooings colorants, des lotions restructurantes pour les cheveux, de masque.

25 La composition cosmétique selon l'invention sera préférentiellement une crème, une lotion capillaire, un shampooing ou un après-shampooing.

Les quantités des différents constituants des compositions utilisables selon l'invention sont celles classiquement utilisées dans les domaines considérés.

30

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une émulsion, la proportion de la phase grasse peut aller de 5% à 80% en poids, et de préférence de 5% à 50% en poids par rapport au poids total de la composition. Les huiles, les cires, les émulsionnants et les co-émulsionnants utilisés dans la composition sous forme d'émulsion sont choisis
35 parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine cosmétique. L'émulsionnant et le co-émulsionnant sont présents, dans la composition, en une proportion allant de 0,3% à

30% en poids, et de préférence de 0,5 à 20% en poids par rapport au poids total de la composition. L'émulsion peut, en outre, contenir des vésicules lipidiques.

Lorsque la composition utilisable selon l'invention est une solution ou un gel huileux, la
5 phase grasse peut représenter plus de 90% du poids total de la composition.

Dans une variante de l'invention, la composition sera telle que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est encapsulé dans un enrobage tel que des microsphères, des nanosphères, des oléosomes ou des
10 nanocapsules, l'enrobage sera choisi selon la nature chimique du composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

A titre d'exemple, les microsphères pourront être préparées selon la méthode décrite dans la demande de brevet EP 0 375 520.

15

Les nanosphères pourront se présenter sous forme de suspension aqueuse et être préparées selon les méthodes décrites dans les demandes de brevet FR 0015686 et FR 0101438.

20 Les oléosomes consistent en une émulsion huile dans eau formée par des globules huileux pourvus d'un enrobage cristal liquide lamellaire dispersé dans une phase aqueuse (voir les demandes de brevet EP 0 641 557 et EP 0 705 593).

Le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase
25 pourra aussi être encapsulé dans des nanocapsules consistant en un enrobage lamellaire obtenu à partir d'un tensio-actif siliconé (voir la demande de brevet EP 0 780 115), les nanocapsules pourront également être préparées à base de polyesters sulfoniques hydrodispersibles (voir la demande de brevet FR 0113337).

30 Le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase pourra également être complexé à la surface de globules huileux cationiques, quelques soit leur taille (voir les demandes de brevet EP 1 010 413, EP 1 010 414, EP 1 010 415, EP 1 010 416, EP 1 013 338, EP 1 016 453, EP 1 018 363, EP 1 020 219, EP 1 025 898, EP 1 120 101, EP 1 120 102, EP 1 129 684, EP 1 160 005 et
35 EP 1 172 077).

Le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase peut enfin être complexé à la surface de nanocapsules ou nanoparticules pourvues d'un enrobage lamellaire (Voir EP 0 447 318 et EP 0 557 489) et contenant un tensio-actif cationique à la surface (voir les références citées précédemment pour les tensio-actifs cationiques).

En particulier, on préférera une composition telle que l'enrobage contenant le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase a un diamètre inférieur ou égale à 10 μm . Lorsque l'enrobage ne forme pas une vésicule sphérique, on entend par diamètre la dimension la plus grande de la vésicule.

De façon connue, la composition selon l'invention peut contenir également des adjuvants habituels dans le domaine cosmétique, tels que les gélifiants hydrophiles ou lipophiles, les additifs hydrophiles ou lipophiles, les conservateurs, les antioxydants, les solvants, les parfums, les charges, les filtres, les absorbeurs d'odeur et les matières colorantes. Les quantités de ces différents adjuvants sont celles classiquement utilisées dans le domaine cosmétique, et par exemple de 0,01% à 10% du poids total de la composition. Ces adjuvants, selon leur nature, peuvent être introduits dans la phase grasse, dans la phase aqueuse et/ou dans les sphérules lipidiques.

Comme huiles ou cires utilisables dans l'invention, on peut citer les huiles minérales (huile de vaseline), les huiles végétales (fraction liquide du beurre de karité, huile de tournesol), les huiles animales (perhydrosqualène), les huiles de synthèse (huile de Purcellin), les huiles ou cires siliconées (cyclométhicone) et les huiles fluorées (perfluoropolyéthers), les cires d'abeille, de carnauba ou paraffine. On peut ajouter à ces huiles des alcools gras et des acides gras (acide stéarique).

Comme émulsionnants utilisables dans l'invention, on peut citer par exemple le stéarate de glycérol, le polysorbate 60 et le mélange de PEG-6/PEG-32/Glycol Stéarate vendu sous la dénomination de Tefose[®] 63 par la société Gattefosse.

Comme solvants utilisables dans l'invention, on peut citer les alcools inférieurs, notamment l'éthanol et l'isopropanol, le propylène glycol.

Comme gélifiants hydrophiles utilisables dans l'invention, on peut citer les polymères carboxyvinyliques (carbomer), les copolymères acryliques tels que les copolymères d'acrylates/alkylacrylates, les polyacrylamides, les polysaccharides tels que l'hydroxypropylcellulose, les gommes naturelles et les argiles, et, comme gélifiants

lipophiles, on peut citer les argiles modifiées comme les bentones, les sels métalliques d'acides gras comme les stéarates d'aluminium et la silice hydrophobe, éthylcellulose, polyéthylène.

- 5 Les compositions utilisables selon l'invention peuvent associer au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de TRP-2 à d'autres agents actifs. Parmi ces agents actifs, on peut citer à titre d'exemple :
- les agents modulant la différenciation et/ou la prolifération et/ou la pigmentation des cellules de la peau tels que le rétinol et ses esters, la vitamine D et ses dérivés, les oestrogènes tels que l'oestradiol, les modulateurs de l'AMPc tels que les dérivés de POMC, l'adénosine, ou la forskoline et ses dérivés, les prostaglandines et leurs dérivés, la triiodotrionine et ses dérivés ;
 - des extraits de végétaux tels que ceux d'Iridacées ou de soja, extraits pouvant alors contenir ou non des isoflavones ;
 - 15 - des extraits de micro-organismes ;
 - les agents anti-radicaux libres tels que l' α -tocophérol ou ses esters, les superoxyde dismutases ou ses mimétiques, certains chélatants de métaux ou l'acide ascorbique et ses esters ;
 - les anti-séborrhéiques tels que certains acides aminés soufrés, l'acide 13-cis rétinolique, l'acétate de cyprotérone ;
 - 20 - les autres agents de lutte contre les états desquamatifs du cuir chevelu comme le zinc pyrithione, le disulfure de sélénium, le climbazole, l'acide undécylénique, le Kétoconazole, la piroctone olamine (octopirox) ou la ciclopiroctone (ciclopirox) ;
en particulier, il pourra s'agir d'actifs stimulant la repousse et/ou favorisant le ralentissement de la chute des cheveux, on peut plus particulièrement citer à titre non
 - 25 limitatif :
 - les esters d'acide nicotinique, dont notamment le nicotinate de tocophérol, le nicotinate de benzyle et les nicotinates d'alkyles en C₁-C₆ comme les nicotinates de méthyle ou d'hexyle ;
 - 30 - les dérivés de pyrimidine, comme le 2,4-diamino 6-piperidinopyrimidine 3-oxyde ou "Minoxidil" décrit dans les brevets US 4,139,619 et US 4,596,812 ; l'Aminexil ou 2,4 diamino pyrimidine 3 oxyde décrit dans WO96/09048 ;
 - les agents inhibiteur de la lipoxygénase ou inducteur de la cyclooxydase favorisant la repousse des cheveux comme ceux décrits par la Demanderesse dans la demande de
 - 35 brevet européen EP 0 648 488 ;
 - les agents antibactériens tels que les macrolides, les pyranosides et les tétracyclines,

et notamment l'Erythromycine ;

- les agents antagonistes de calcium, comme la Cinnarizine, la Nimodipine et la Nifedipine ;

- des hormones, telles que l'estriol ou des analogues, ou la thyroxine et ses sels ;

5 - des agents antiandrogènes, tels que l'oxendolone, la spironolactone, le diéthylstilbestrol et la flutamide ;

- des inhibiteurs stéroïdiens ou non stéroïdiens des 5- α -réductases tels que ceux décrits par la Demanderesse dans les demandes de brevet européen EP 0 964 852 et EP 1 068 858 ou encore le finastéride ;

10 - des agonistes des canaux potassiques dépendant de l'ATP tels que la cromakalim et le nicorandil ;

- des extraits végétaux à activité pro-pigmentante comme les extraits de chrysanthème tels que décrits dans FR 2768343 et les extraits de Sanguisorba décrits dans FR 2782920A1.

15

De préférence, le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est associé à un autre actif choisi parmi les agents de lutte des états desquamatifs du cuir chevelu, des agents favorisant la repousse des cheveux, des extraits végétaux à activité propigmentante.

20

Un autre objet de la présente invention se rapporte à un procédé de traitement cosmétique de la canitie caractérisé en ce qu'on administre ou qu'on applique sur la zone à traiter une composition telle que définie précédemment comprenant au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

25

L'invention se rapporte aussi à un procédé de traitement cosmétique destiné à maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs caractérisé en ce qu'on administre ou qu'on applique sur la zone à traiter une composition telle que définie précédemment comprenant au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

30

Les procédés de traitement de la canitie et de pigmentation des cheveux et/ou des poils gris ou blancs peuvent également consister en l'ingestion d'une composition comprenant au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

35

Les zones à traiter peuvent être, par exemple et sans aucune limitation, le cuir chevelu, les sourcils, la moustache et/ou la barbe et toute zone de la peau recouverte de poils.

5 Plus particulièrement, les procédés de traitement cosmétique de la canitie et de pigmentation naturelle des cheveux et/ou poils gris ou blancs consistent à appliquer une composition comprenant au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

10 Les procédés de traitement cosmétique pour lutter contre la canitie et/ou pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs peut par exemple consister à appliquer la composition sur les cheveux et le cuir chevelu, le soir, garder la composition toute la nuit et éventuellement effectuer un shampoing le matin ou laver les cheveux à l'aide de cette composition et à laisser à nouveau en contact quelques minutes avant de rincer. La composition conforme à l'invention s'est révélée
15 particulièrement intéressante lorsqu'elle est appliquée sous forme de lotion capillaire, éventuellement rincée ou même sous forme d'un shampoing.

Dans un autre de ses objets, la présente invention se rapporte à une méthode d'identification d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.
20

Cette méthode comprend l'étape préalable d'identification des métabolites impliqués dans la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase qui est décrite à l'exemple 3 ci-après.
25

La méthode d'identification d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase comprend les étapes suivantes :

- a- mise en culture d'une population cellulaire, de préférence une population de mélanocytes, de préférence qui n'exprime pas ou peu la DOPAchrome tautomérase ;
- 30 b- ajout dans le milieu de culture d'un composé pour lequel on souhaite tester la capacité d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase ;
- c- incubation de la population cellulaire un temps suffisamment long pour permettre au composé évalué d'être actif ;
- d- extraction des métabolites cellulaires ;
- 35 e- analyse du ou des métabolites recherchés ;
- f- sélection des composés qui agissent sur le taux des métabolites recherchés.

Dans un mode de réalisation particulière de la méthode d'identification d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase, les cultures cellulaires sont réalisées en étuve, à 37°C, 5% CO₂.

5

En particulier l'étape (a) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sontensemencés à J0 avec du milieu RPMI-1640 (Gibco BRL - 42401) contenant 5% de sérum de vœu foetal, 1 % glutamine et 0,5% d'antibiotiques. Les cellules sont maintenues dans ces conditions 12 à 72 heures avant d'être traitées.

10

L'étape (b) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sont traités en culture par le composé pour lequel on souhaite tester la capacité d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase pendant un temps nécessaire pour révéler cette propriété, ce temps peut-être compris entre 1 heure et 72 heures.

15

Dans un mode particulier de réalisation de l'étape (b), les cellules sont exposées à une condition induisant un stress oxydatif ou encore l'apoptose ou encore la sénescence, il pourra s'agir, par exemple, d'un facteur pro-apoptotique (TNF α), de l'absence d'un facteur de survie (IGF-1), d'un traitement par le cis-platine (Pak B.J. et al., 2000, Melanoma Res. 10 :499-505) ou l'oxaliplatine, d'un agent toxique (cyclophosphamide), d'un stress oxydatif (H₂O₂, diethylmaleate) (voir Vaux D.L. & Strasser A., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci. 93 :2239-2244), peu de temps après l'ajout du composé pour lequel on souhaite tester la capacité d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

20

25

L'étape (e) pourra être réalisée à l'aide de n'importe quelle méthode d'analyse adaptée à la caractérisation ou à la quantification du ou des métabolites recherchés, par exemple chromatographie liquide à haute performance (HPLC), résonance magnétique nucléaire (NMR), chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), ou encore spectrométrie infra rouge.

30

35

L'invention se rapporte aussi à l'utilisation d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase susceptible d'être identifié par la méthode décrite ci-dessus dans un procédé de traitement cosmétique pour prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie et/ou pour maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs.

L'invention se rapporte enfin à l'utilisation d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase susceptible d'être identifié par la méthode décrite ci-dessus pour la préparation d'une composition cosmétique destinée à prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie et/ou à maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris ou blancs.

L'invention se rapporte encore à une méthode d'évaluation de l'activité cytoprotectrice d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase susceptible d'être identifié par la méthode décrite précédemment, comprenant les étapes suivantes :

- a- mise en culture d'une population de mélanocytes dans un milieu limitant l'expression de la TRP-2 à une expression basale faible ;
- b- ajout d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase au milieu de culture ;
- c- exposition des cellules à une condition induisant l'apoptose ou la sénescence ;
- d- mesure de la cytotoxicité ;
- e- sélection des composés capables d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase avec un effet cytoprotecteur.

20

Dans un mode de réalisation particulier, les cultures cellulaires sont réalisées en étuve, à 37°C, 5% CO₂.

En particulier, l'étape (a) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sontensemencés à J0 avec du milieu M2 (PromoCell, Heidelberg, D). Après un temps nécessaire à l'adhérence des cellules compris entre 2 et 18 heures, le milieu est remplacé par un milieu dans lequel les mélanocytes expriment peu ou pas la TRP-2 (expression faible basale) :DMEM :F12 (Gibco BRL - 42400-044), Ultrosér G (Gibco BRL - 15950-017) 0,5%, PC-1 (BioWhittaker 344022) 0,5%, bFGF (Pepro Tech Inc 100-18B) 5 ng/ml, héparine (Sigma H-3149) 75 ng/ml, 1% antibiotiques, 1% glutamine. Les cellules sont maintenues dans ce milieu de culture le temps compris entre 12 et 72 heures nécessaire à la diminution de l'expression de TRP-2.

30

L'étape (b) pourra être réalisée selon le protocole suivant : les mélanocytes sont traités en culture par le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

35

L'étape (c) pourra être réalisée par exemple selon le protocole suivant : les cellules sont traitées au cis-platine (par exemple entre 5 et 50 μM) dans le milieu de culture pendant le temps nécessaire à l'induction de l'apoptose, ce temps est généralement compris entre 12 et 24 heures.

5

L'étape (d) pourra être réalisée par exemple selon le protocole suivant : la cytotoxicité peut être mesurée à l'aide du kit « Cell Proliferation Kit II (XTT) » mis en œuvre selon le protocole donné par le fournisseur (Roche 1-465-015). L'apoptose peut être quantifiée à l'aide du kit "Cell Death Detection ELISA plus", mis en œuvre selon le protocole donné

10

Figures :

15 **Figure 1** : cette figure rassemble différentes photographies représentant la distribution de mélanocytes dans le follicule pileux lors de la phase anagène visualisée au microscope.

Légendes :

(A) est une série de clichés de la gaine épithéliale externe grossie 40 fois, (B) est une

20

série de clichés de la gaine épithéliale externe (centrés sur la tige) grossie 20 fois et (C)

est une série de clichés du bulbe grossie 20 fois.
(1) représente un cheveu très foncé, (2) un cheveu modérément pigmenté, (3) à (5) des

25 **Figure 2** : Ces photographies permettent de visualiser l'expression de TRP-2 dans les mélanocytes de l'épiderme et du cheveu (gaine épithéliale externe et bulbe pileux).

Etude immunohistologique analysée en microscopie confocale laser.

30 **Figure 3** : Ces photographies représentent les résultats obtenus après la mise en œuvre des essais de Western Blot décrits à l'exemple 2B.

Exemple 1 – révélation immunohistochimique des mélanocytes dans les follicules pileux à différents stades de blanchissement, par marquage de la protéine pMel-17.

5 Plus de 120 follicules pileux isolés à partir de biopsies issues de 8 donneurs âgés de 49 à 71 ans ont été étudiés.

A - Protocole d'isolement des follicules pileux entiers (Commo S and Bernard BA Pigment Cell Res 2000 ;13 :253-259)

10 Des fragments de biopsie sont incubés dans la dispase (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, D) la nuit à +04°C. Les cheveux sont ensuite isolés à l'aide de pinces sous binoculaires.

B - Protocole d'immunomarquage sur follicules pileux entiers (Commo S and Bernard BA Pigment Cell Res 2000 ;13 :253-259)

15 Les cheveux entiers sont fixés dans l'éthanol à -20°C pendant 10 minutes. Chaque étape des procédures de fixation et de marquage est suivie de lavages au tampon phosphate (pH 7,4 (PBS))-Tween20 0,05%. Sauf précision, toutes les étapes se font à température ambiante. Les peroxydases endogènes de l'échantillon sont neutralisées en incubant l'échantillon dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,1% pendant 10 minutes. Pour bloquer les sites de fixation non spécifiques, l'échantillon est incubé avec du lait écrémé 1%, 15 minutes. L'anticorps (Ac) primaire NK1-beteb reconnaissant spécifiquement la protéine pMel-17 (Monosan, Paris, F) est dilué au 1/40 dans du PBS – Tween 0,05%, contenant 10 % de sérum normal (X0907, DAKO, Trappes, F). L'Ac primaire est incubé 18 heures sur les cheveux à +04°C. L'Ac secondaire couplé à la biotine (E-433, DAKO, Trappes, F) est dilué au 1/400 et incubé 30 minutes. Le cheveu est ensuite incubé en présence de streptavidine–biotine–peroxydase (K-0377, DAKO, Trappes, F), et finalement l'immunomarquage est révélé en présence de 3-amino-9-éthylcarbazole (AEC) (AEC kit-101, Sigma, Saint Quentin Fallavier, F).

30

En comparant les clichés (B1) à (B5) de la figure 1, on constate que la diminution de pigmentation du cheveu est associée à une diminution de mélanine dans le bulbe et à une diminution de mélanocytes dans le bulbe (voir C1 à C5). Le cheveu blanc dont la tige est dépourvue de mélanine (B6) ne contient pas de mélanocyte dans le bulbe (C6).

35

Les cheveux gris et blanc contiennent une quantité variable de mélanocytes dans la

partie haute de la gaine épithéliale externe, cette quantité pouvant même être nulle dans le cas du cheveu blanc (A3 à 6) à la différence des cheveux pigmentés (A1 et 2).

5 **Exemple 2 - mise en évidence de l'expression différentielle de la DOPAchrome tautomérase dans les mélanocytes de follicules pileux et de l'épiderme chez l'individu caucasien.**

A – Etude immunohistologique analysée en microscopie confocale laser

10

A.1 - Obtention de coupes congelées de follicule pileux (Commo S and Bernard BA Pigment Cell Res 2000 ;13 :253-259)

Un fragment de biopsie de scalp contenant des follicules pileux est inclus dans du tissu-Tek-OCT (Miles, Naperville, IL, USA) et ensuite congelé sur de la carbo-glace. La
15 biopsie congelée est ensuite coupée (7 µm) à l'aide d'une cryostat (CM3050, Leica, Rueil-Malmaison, F).

A.2 - Protocole d'isolement des follicules pileux entiers et des lambeaux épithéliaux de peau (Commo S and Bernard BA Pigment Cell Res 2000 ;13 :253-259)

20 Des fragments de biopsie sont incubés dans la dispase (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, D) la nuit à +04°C. Le compartiment épithélial est séparé du derme à l'aide de pinces sous binoculaire. Les structures épithéliales sont ensuite micro-disséquées pour séparer les follicules pileux et l'épiderme, puis triées.

25 A.3 - Protocole d'immunomarquage sur follicules pileux entiers, lambeau de peau et coupe congelée

Les cheveux entiers, les lambeaux épithéliaux de peau et les coupes congelées sont fixés dans l'éthanol à -20°C pendant 10 minutes. Chaque étape des procédures de fixation et de marquage est suivie de lavages au tampon phosphate (pH 7,4 (PBS))-
30 Tween20 0,05%. Sauf précision, toutes les étapes se font à température ambiante. Les peroxydases endogènes de l'échantillon sont neutralisées en incubant l'échantillon dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 0,1% pendant 10 minutes. Pour bloquer les sites de fixation non spécifiques, l'échantillon est incubé avec du lait écrémé 1%, 15 minutes. Les anticorps (Ac) primaires sont dilués dans du PBS – Tween 0,05%,
35 contenant 10 % de sérum normal (X0907, DAKO, Trappes, F). Les Ac primaires NK1-beteb reconnaissant spécifiquement la protéine pMel-17 (1/40, Monosan, Paris, F), et

α PEP8h (1/2000, Dr VJ.Hearing, NIH, Bethesda, MD, USA) reconnaissant spécifiquement la protéine TRP2 humaine (Virador et al. 2001) sont incubés simultanément 18 heures à +04°C sur les cheveux entiers et les lambeaux épithéliaux de peau, et 30 minutes à température ambiante sur les coupes congelées. L'Ac secondaire de chèvre dirigé contre les immunoglobulines (Ig) G2b couplé à la Cy3 (M32410, TEBU, le Perray en Yveline, F) est dilué au 1/80, et l'Ac secondaire dirigé contre les Ig couplé à la Cy5 (111-175-144, Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. West Grove, PA, USA) est dilué au 1/500 sont incubés simultanément 30 minutes sur les échantillons. Les immunomarquages sont analysés en microscopie confocale laser (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, D).

Conclusion des observations : on constate sur la figure 2 la présence de TRP-2 dans les mélanocytes de l'épiderme, en revanche, cette enzyme n'est exprimée ni dans les mélanocytes de la gaine épithéliale du follicule pileux, ni dans les mélanocytes du bulbe pileux.

B – étude biochimique par analyse en Western Blot

B.1 - Protocole d'extraction de protéine de follicules pileux humains et de mélanocytes

(Commo S et al. Differentiation 2000 ;66 :157-164)

- Extraction protéique à partir de bulbes pileux : les follicules pileux sont isolés après traitement de biopsies de scalp à la dispase (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, D) la nuit à +04°C. Après isolement, les follicules pileux sont micro-disséqués pour isoler la partie du bulbe pileux. 80 bulbes pileux ainsi isolés sont placés dans un tampon de lyse approprié pour extraction protéique et analyse en *western blot*.

- Extraction protéique à partir de culture de mélanocytes : Les mélanocytes cultivés en milieu M2 (PromoCell, Heidelberg, D) sont lysés avec un même tampon de lyse approprié pour extraction protéique et analyse en *western blot*.

Le *Western blot* (voir protocole dans Maniatis *et al.*) est réalisé avec les anticorps suivants : α PEP8h, anticorps polyclonal spécifique de la TRP-2 humaine donné par Dr VJ Hearing (NIH, Bethesda, USA), et T311, anticorps monoclonal spécifique de la tyrosinase humaine (Novocastra, New Castle, UK).

On observe (figure 3) que la tyrosinase est détectée dans les extraits de bulbe pileux. L'enzyme n'est pas détectée dans les extraits de gaine épithéliale externe. L'expression

de la tyrosinase est régulée. Cette enzyme n'est pas ou peu exprimée dans les mélanocytes inactifs (ne produisant pas de mélanine), c'est le cas des mélanocytes contenus dans le scalp inter folliculaire d'individu caucasien.

Par ailleurs, la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) n'est détectée ni dans les extraits de bulbe ni dans les extraits de gaine épithéliale externe. L'expression de la TRP-2 ne suit pas celle de la tyrosinase et l'induction de la mélanogénèse, elle n'est pas exprimée dans les mélanocytes actifs des bulbes pileux.

10 **Exemple 3 – Identification des métabolites impliqués dans la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.**

L'identification des métabolites modulés par la DOPAchrome tautomérase (TRP-2) est obtenue en comparant le métabolome de deux lignées mélanocytaires distinctes uniquement par l'expression différentielle de la TRP-2. L'expression différentielle spécifique de TRP-2 est obtenue :

- a- soit par expression ectopique de TRP-2 obtenue après transfection de n'importe que vecteur approprié contenant la région codant du gène humain TYRP2 (par exemple tel que décrit dans genebank n°S69231, n°NM_001922, n°AJ000503) dans une lignée de mélanocytes qui n'exprime pas de façon constitutive TRP-2 ;
- b- soit par neutralisation de l'expression de TRP-2 par exemple par la méthode du siRNA dans une lignée de mélanocytes qui exprime de façon constitutive TRP-2.

Comme oligonucléotide double brin capable de provoquer l'extinction de l'ARN messenger codant pour la TRP2, on pourra utiliser les 3 séquences nucléotidiques suivantes (positions 838, 1589 et 2164 respectivement du gène codant pour TRP2) :

Les SEQ ID de numéro impair correspondent au brin 5' antisens ; les SEQ ID de numéro pair correspondent au brin 5' sens.

838

- 30 SEQ ID N°1 : 5'- AACATCCATTCCCTTGAGTCCTCCTGTCTC -3'
- SEQ ID N°2 : 5'- AAAGGACTCAAGGAATGGATGCCTGTCTC -3'

1589

- SEQ ID N°3: 5'- AAGTGATGAGCCTTCATAATTCCTGTCTC -3'
- 35 SEQ ID N°4: 5'- AAAATTATGAAGGCTCATCACCCCTGTCTC -3'

2164

SEQ ID N°5 : 5'- AATCCTCACTGTTTCCTTCTTGCCTGTCTC -3'

SEQ ID N°6 : 5'- AACAAAGAAGGAACAGTGAGGACCTGTCTC -3'

- 5 La fonctionnalité de ces séquences siRNAs, comme inhibiteurs spécifiques de la TRP2, est vérifiée par une mesure en Western blot de l'extinction de l'expression de la TRP2 dans des mélanocytes en présence de ces siRNAs sous forme de duplex (brin antisens et brin sens).
- 10 A partir d'une population de mélanocyte Mel-A on obtient ainsi une deuxième population cellulaire Mel-A1 distincte uniquement par l'expression de TRP-2.

Les deux populations Mel-A et Mel-A1 sont cultivées strictement dans les mêmes conditions de milieu, de température, etc...pendant 24 à 48 heures. Dans une condition
15 particulière les deux populations cellulaires sont cultivées dans des conditions de stress oxydatifs ou dans des conditions favorisant l'apoptose ou encore dans des conditions favorisant le sénescence en utilisant par exemple, d'un facteur pro-apoptotique (TNF α), de l'absence d'un facteur de survie (IGF-1), d'un traitement par le cis-platine (Pak B.J. et al., 2000, Melanoma Res. 10 :499-505) ou l'oxaliplatine, d'un agent toxique
20 (cyclophosphamide), d'un stress oxydatif (H₂O₂, diethylmaleate) (voir Vaux D.L. & Strasser A., 1996, Proc.Natl.Acad.Sci. 93 :2239-2244).

On réalise ensuite une extraction des métabolites cellulaires dans des conditions adaptées, par exemple telles que décrites dans Lazzarino G et al. Analytical Biochemistry 2003,322 :51-59, ou encore dans Gonzalez B et al. Yeast 1997,13 :1347-
25 1355, ou encore Raamsdonk LM et al. Nat Biotechnol. 2001,19 ;45-50.

Les métabolites extraits sont ensuite analysés par une méthode adaptée par exemple chromatographie liquide à haute performance (HPLC), résonance magnétique nucléaire (NMR), chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), ou encore
30 spectrométrie infra rouge.

Les taux différents de certains métabolites identifiés entre les populations Mel-A et Mel-A1 caractérisent les métabolites impliqués dans la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.

35

Exemple 4 - Compositions- lotion capillaire

Composé capable d'agir sur la voie métabolique

5	de la DOPAchrome tautomérase	0,5 g
	Propylène glycol	20 g
	Ethanol 95°	30 g
	Eau	qsp
		100 g

- 10 Cette lotion est appliquée quotidiennement sur les zones à traiter et de préférence sur l'ensemble du cuir chevelu pendant au moins 10 jours et préférentiellement 1 à 2 mois. On constate alors une diminution de l'apparition des cheveux blancs ou gris et une repigmentation des cheveux gris.

15 - shampooing traitant

Composé capable d'agir sur la voie métabolique

	de la DOPAchrome tautomérase	1,5 g
	Polyglycéryl 3-hydroxylarylether	26 g
	Hydroxy propyl cellulose vendue sous la dénomination	
20	de Klucell G par la société Hercules	2 g
	Conservateurs	ps
	Ethanol 95°	50 g
	Eau	qsp
		100 g

- 25 Ce shampooing est utilisé à chaque lavage avec un temps de pose d'environ d'une minute. Un usage prolongé, de l'ordre de deux mois, conduit à la repigmentation progressive des cheveux gris. Ce shampooing peut également être utilisé à titre préventif afin de retardé le blanchiment des cheveux.

30

- Gel traitant

Composé capable d'agir sur la voie métabolique

	de la DOPAchrome tautomérase	0,75 g
	Huiles essentielles d'Eucalyptus	1 g
35	Econozole	0,2 g
	Lauryl polyglyceryl 6 cetearyl glycoether	1,9 g

Conservateurs		qs
Carbopol 934P vendu par la société BF Goodrich Corporation		0,3 g
Agent de neutralisation		qs pH 7
Eau	qsp	100 g

5

Ce gel est appliqué sur les zones à traiter deux fois par jour (matin et soir) avec un massage terminal. Après trois mois d'application, on observe une repigmentation des poils ou cheveux de la zone traitée.

REVENDICATIONS

1. Utilisation cosmétique d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase, en tant qu'agent protecteur des mélanocytes du follicule pileux.
5
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est destiné à lutter contre la disparition des mélanocytes du follicule pileux en maintenant et/ou en régénérant la population des mélanocytes actifs du bulbe et des mélanocytes quiescents de la région supérieure du follicule pileux.
10
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est destiné à favoriser le renouvellement cyclique de l'unité folliculaire de pigmentation.
15
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est destiné à prévenir et/ou limiter et/ou arrêter le développement de la canitie.
20
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est destiné à maintenir la pigmentation naturelle des cheveux et/ou des poils gris.
- 25 6. Composition cosmétique pour lutter contre la canitie comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable au moins un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase.
- 30 7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est associé à un autre actif choisi parmi les agents de lutte des états desquamatifs du cuir chevelu, des agents favorisant la repousse des cheveux, des extraits végétaux à activité propigmentante.
- 35 8. Composition selon la revendication 6 ou 7, caractérisée en ce que le composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase est encapsulé

dans un enrobage tel que des microsphères, des nanosphères, des oléosomes ou des nanocapsules.

5 9. Composition selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce qu'elle est adaptée à une application topique sur le cuir chevelu et/ou sur les zones de la peau recouvertes de poils.

10 10. Procédé de traitement cosmétique de la canitie caractérisé en ce qu'on administre ou qu'on applique sur la zone à traiter une composition selon l'une des revendications 6 à 9.

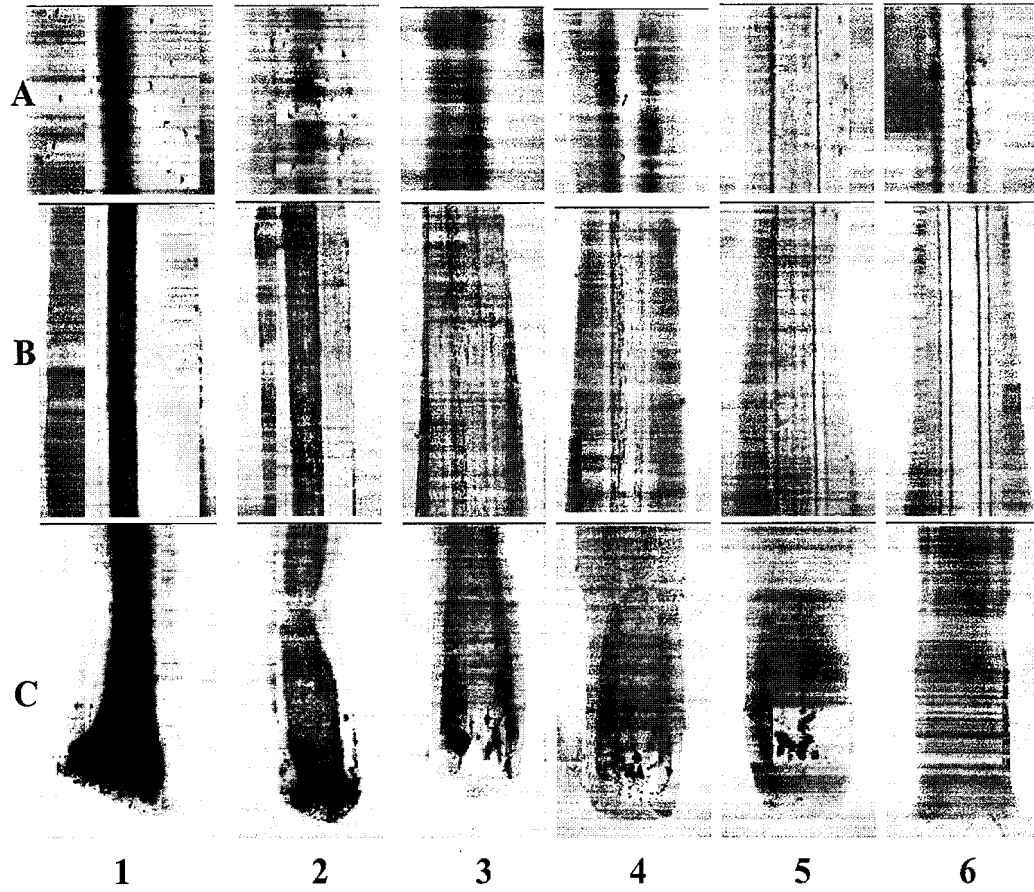


FIGURE 1

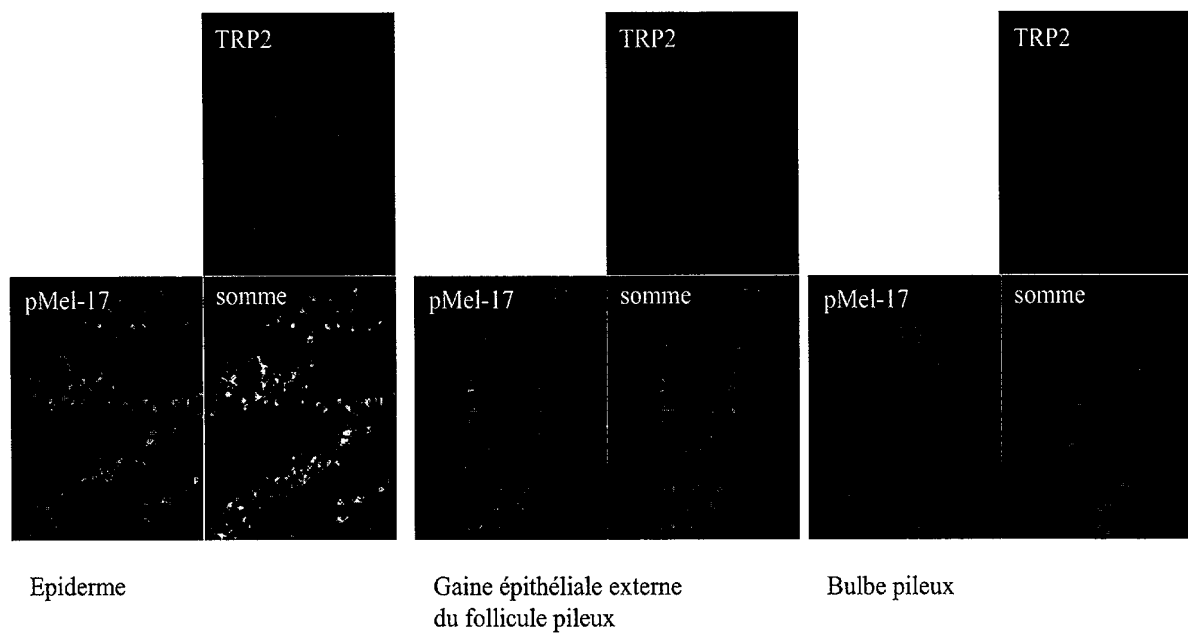
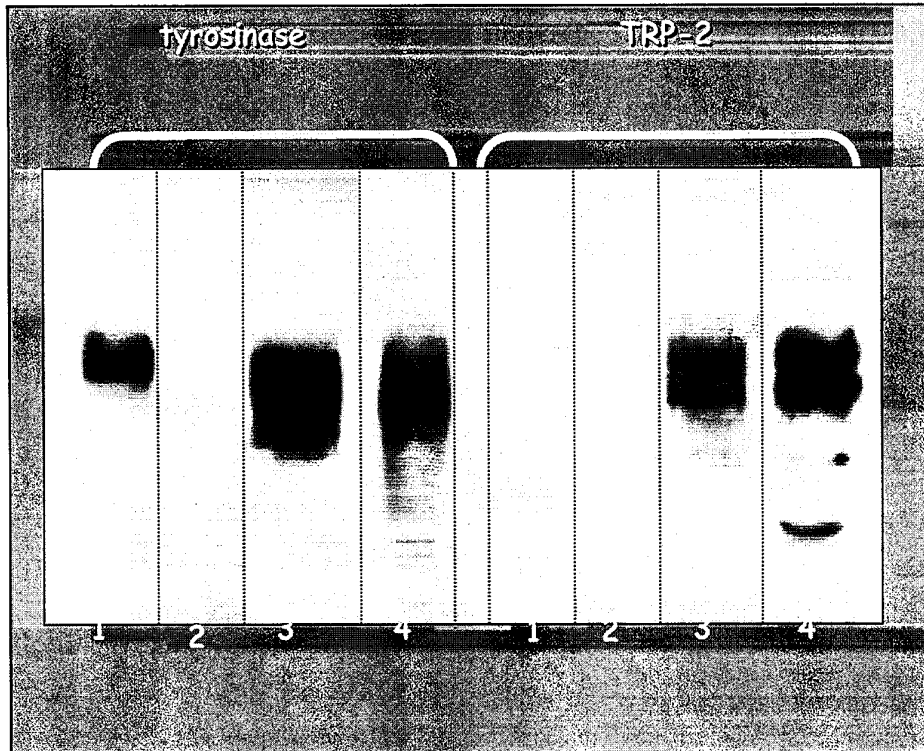


FIGURE 2

3/3

**FIGURE 3**



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE PARTIEL**

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

N° d'enregistrement
national

FA 641830
FR 0351029

voir FEUILLE(S) SUPPLÉMENTAIRE(S)

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendications concernées	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
E	WO 2004/030661 A (FLOCKHART IAN ; PATEL BIPIN (GB); RICKWOOD KEN (GB); PSIMEI PHARMACEUT) 15 avril 2004 (2004-04-15) * exemples *	1-9	A61K7/075 A61K7/06
E	WO 03/103616 A (BERNARD BRUNO ; OREAL (FR); COMMO STEPHANE (FR); GAILLARD OLIVIER (FR)) 18 décembre 2003 (2003-12-18) * le document en entier *	1-9	
E	WO 03/103568 A (BERNARD BRUNO ; OREAL (FR); COMMO STEPHANE (FR)) 18 décembre 2003 (2003-12-18) * le document en entier *	1-9	
X	EP 0 759 292 A (OREAL) 26 février 1997 (1997-02-26) * exemples 1,2 *	1-9	
X	FR 2 762 784 A (MISHIMA YUTAKA) 6 novembre 1998 (1998-11-06) * exemples 1-9 * * page 2, ligne 20 - ligne 24 *	1-9	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) A61K
X	WO 02/30372 A (OREAL ; PRUCHE FRANCIS (FR)) 18 avril 2002 (2002-04-18) * revendications *	1-9	
X	PROTA ET AL: "Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutans" BIOSIS, 1995, XP002234438 * page 157, colonne de droite * * page 161, colonne de gauche * * page 162, colonne de gauche *	1-9	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
26 juillet 2004		Simon, F	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>..... & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0351029 FA 641830**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 26-07-2004

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004030661 A	15-04-2004	WO 2004030661 A2	15-04-2004
WO 03103616 A	18-12-2003	FR 2840531 A1 WO 03103616 A2	12-12-2003 18-12-2003
WO 03103568 A	18-12-2003	FR 2840530 A1 WO 03103568 A2	12-12-2003 18-12-2003
EP 0759292 A	26-02-1997	FR 2733421 A1 DE 69600011 D1 DE 69600011 T2 EP 0759292 A1 ES 2102921 T3 JP 2880125 B2 JP 8301729 A US 6001812 A US 5739111 A	31-10-1996 07-05-1997 03-07-1997 26-02-1997 01-08-1997 05-04-1999 19-11-1996 14-12-1999 14-04-1998
FR 2762784 A	06-11-1998	JP 10298053 A FR 2762784 A1 US 5993835 A	10-11-1998 06-11-1998 30-11-1999
WO 0230372 A	18-04-2002	FR 2814945 A1 WO 0230372 A1	12-04-2002 18-04-2002

**RECHERCHE INCOMPLÈTE
FEUILLE SUPPLÉMENTAIRE C**

Numéro de la demande

FA 641830
FR 0351029

Certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche parce qu'elles se rapportent à des parties de la demande qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:

Raison pour la limitation de la recherche:

Les présentes revendications 1 à 9 ont trait à l'utilisation d'un composé capable d'agir sur la voie métabolique de la DOPAchrome tautomérase (TPR-2), à une composition comprenant ce composé et à un procédé de traitement de la carie basé sur l'application d'une telle composition. Le composé est donc défini en faisant référence à une propriété souhaitable ou en d'autres termes par une caractéristique fonctionnelle.

La présente demande ne fait référence explicitement qu'à un seul composé ayant cette propriété, à savoir le PBA. Pour le reste, elle se fonde sur une méthode d'identification par dépistage consistant à tester l'activité biologique d'un composé, en l'occurrence sa capacité à agir sur la voie métabolique de la TPR-2. L'homme du métier n'est en mesure de mettre en pratique la définition de l'objet revendiqué directement et avec succès, si tant est, qu'en faisant appel à une somme déraisonnable d'expérimentations, puisque la variation structurelle des composés entrant dans les compositions revendiquées ou employés dans les revendications d'utilisation ou de procédé est potentiellement illimitée. De plus, ces composés incluent en sus du PBA tous les composés qui n'ont pas encore été inventés par le déposant et qui rempliraient cette fonction. Par ailleurs, il ne peut jamais être dit avec certitude et tout en faisant appel à un nombre raisonnable d'expérimentations si les compositions revendiquées se distinguent de toutes celles déjà connues de l'état de la technique puisque cela impliquerait de tester chacun des composés les constituant selon ladite méthode d'identification par dépistage. Les revendications ne sont donc pas claires.

En fait, ce qui est proposé comme solution au problème technique à la base de la demande (i.e. la mise à disposition d'un composé permettant de traiter la carie) et défini dans les revendications est une découverte constituant la traduction en termes "biologiques" de ce problème mais pas, en tant que tel, une solution à ce problème en termes techniques: les revendications ne revendiquent en somme que le problème à résoudre. Il apparaît ainsi que le déposant ne divulgue et en réalité n'a inventé aucun autre composé en dehors du PBA, qui remplisse la caractéristique fonctionnelle définie; une limitation de la portée des revendications à ce dernier ne pourrait donc pas être considérée comme induite.

Par conséquent, la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI que pour un unique composé, à savoir le PBA.

Pour l'ensemble de ces raisons, une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications n'est ni justifiée ni possible. En conséquence, la recherche a été essentiellement basée sur le PBA et le traitement de la carie.