

Association d'un rétinoïde et d'un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne une association d'un rétinoïde et d'un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., ainsi qu'une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, contenant une telle association, notamment pour le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

Le nom scientifique *Silybum marianum* (L.) Gaertn. désigne une plante appartenant à la famille des Asteraceae, annuelle ou bisannuelle à tige robuste pouvant atteindre plus de un mètre de hauteur. Ses grandes feuilles luisantes, alternées, sans stipule sont marbrées de blanc et bordées d'épines dures et pointues. Les fleurs sont groupées en capitules terminaux, souvent solitaires. Ils sont entourés de grandes bractées épineuses à l'extrémité très acérée. Les fleurs, tubulées, à cinq lobes, sont de couleur pourpre violacé. Les fruits sont des akènes luisants, noirs ou marbrés de jaune, surmontés d'une aigrette à soies denticulées en anneau à leur base. Le nom vernaculaire de cette plante est Chardon-Marie.

L'akène (souvent dénommé graine de manière erronée dans la littérature) de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. et ses préparations sont traditionnellement utilisés par voie orale, dans le traitement symptomatique des troubles fonctionnels digestifs attribués à une origine hépatique.

Dans la littérature, le principe actif principal de l'akène de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. est la silymarine, mélange de plusieurs flavonolignanes (principalement silybine, isosilybine, silychristine et silydianine). Les akènes contiennent jusqu'à 3% en poids de silymarine. Ils sont également constitués d'huile (20-30% en poids), de mucilages et de protéines.

Par ailleurs, un déficit en vitamine A a été démontré dans la peau des patients acnéiques (Röllman, O., and Vahlquist, A. (1985). Vitamin A in skin and serum--studies of acne vulgaris, atopic dermatitis, ichthyosis vulgaris and lichen planus. Br. J. Dermatol. 113(4), 405-413) et une déficience de son métabolisme a été décrit dans

l'épithélium pilosébacé (Everts, H. B. (2012). Endogenous retinoids in the hair follicle and sebaceous gland. *Biochim. Biophys. Acta* 1821(1), 222-229). Le rétinaldéhyde en application topique permet de délivrer les différents composants de la Vitamine A dans la peau humaine (Sorg, O., and Saurat, J. H. (2014). Topical retinoids in skin ageing : A focused update with reference to sun induced epidermal vitamin A deficiency. *Dermatology* 228(4), 314-325), propriété qui est déjà utilisée dans la prévention et le traitement des peaux à tendance acnéique.

RESUME DE L'INVENTION

Dans ce contexte, la Demanderesse a mis en évidence de manière surprenante qu'un rétinoïde, tel que le rétinaldéhyde (encore appelé rétinol), en association avec un extrait de *Silybum marianum*, présentait des propriétés améliorées pour le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée ou de la dermite séborrhéique. Plus particulièrement, les résultats d'études obtenus ont démontré le rôle synergique du rétinaldéhyde associé à un extrait de *Silybum marianum* dans la production d'acides rétinoïdes par les cellules de la peau.

Un objet de l'invention concerne donc une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn..

Un autre objet de l'invention concerne une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pour son utilisation comme médicament.

Un autre objet de l'invention concerne une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pour son utilisation dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pour la fabrication d'un médicament destiné au le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique comprenant l'administration à une personne en ayant besoin d'une quantité efficace d'une association comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn..

Un autre objet de l'invention concerne une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable.

Un autre objet de l'invention concerne une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable pour son utilisation dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique comprenant l'administration, de préférence par voie topique, à une personne en ayant besoin d'une quantité efficace d'une composition dermatologique ou dermo-cosmétique comprenant un rétinoïde et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable.

Un autre objet de l'invention concerne une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, comprenant :

- (i) un rétinoïde, et
- (ii) un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

comme produits de combinaison, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps.

Un autre objet de l'invention concerne une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, de préférence topique, comprenant :

- (i) un rétinoïde, et
- (ii) un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

comme produits de combinaison, pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps d'un rétinoïde et d'un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique comprenant l'administration de manière simultanée, séparée ou étalée dans le temps d'une quantité efficace d'un rétinoïde et d'une quantité efficace d'un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. à une personne en ayant besoin.

DESCRIPTION DETAILLEE

Définitions

Dans la présente description, la plante *Silybum marianum* (L.) Gaertn. pourra être désignée de manière abrégée par le terme *Silybum marianum* et le rétinaldéhyde pourra être désigné de manière abrégée par RAL.

Par « acide gras », on entend, au sens de la présente invention, un acide carboxylique $R1CO_2H$ dont la chaîne R1 est une chaîne hydrocarbonée linéaire ou ramifiée, saturée ou comprenant des doubles liaisons $C=C$, l'acide carboxylique comprenant de 16 à 22 atomes de carbone (incluant l'atome de carbone de la fonction acide carboxylique).

Par acide gras (incluant l'acide linoléique) « libre », on entend, au sens de la présente invention, un acide gras non lié à d'autres molécules (par ex. à du glycérol ou des dérivés de celui-ci pour donner des glycérides ou à un alcool pour donner un ester gras).

Par « alcool en C_1 en C_3 », on entend, au sens de la présente invention, un alcool $R2OH$ dont la chaîne R2 est une chaîne hydrocarbonée saturée, linéaire ou ramifiée, comprenant 1 à 3 atomes de carbone. Il pourra s'agir du méthanol, de l'éthanol, du *n*-

propanol ou de l'isopropanol, en particulier du méthanol, de l'éthanol ou de l'isopropanol. De préférence, il s'agira de l'isopropanol.

Par « dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable », on entend désigner, dans la présente invention, ce qui est utile dans la préparation d'une composition dermatologique ou dermo-cosmétique, qui est généralement sûr, non toxique et ni biologiquement ni autrement non souhaitable et qui est acceptable pour une utilisation thérapeutique ou cosmétique, notamment par application topique.

Par « environ », on entend dans la présente description que la valeur concernée peut être inférieure ou supérieure de 10%, notamment de 5%, en particulier de 1%, à la valeur indiquée.

Par « extrait sec », on entend, au sens de la présente invention, un extrait dépourvu de solvant d'extraction ou en contenant uniquement à l'état de trace non significative. Un tel extrait sec contient ainsi uniquement de la matière issue de *Silybum marianum* (L.) Gaertn.. Il peut contenir également des traces non significatives de solvant d'extraction.

Par « isosilybine », on entend, au sens de la présente invention, les deux diastéréoisomères isosilybine A et isosilybine B.

Par « silybine », encore appelée dans l'art silibinine, on entend, au sens de la présente invention, les quatre diastéréoisomères silybine A, silybine B, 2,3-cis-silybine A et 2,3-cis-silybine B.

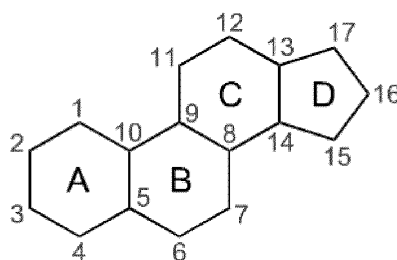
Par « silychristine », on entend, au sens de la présente invention, les deux diastéréoisomères silychristine A et silychristine B.

Par « silymarine », on entend au sens de la présente invention un extrait purifié d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. comprenant majoritairement (au moins 95% en poids) un mélange des quatre flavonolignanes suivants : silybine, isosilybine, silychristine et silydianine (Kuki *et al.* 2012). Une teneur en silymarine inférieure à 0,2% en poids signifie donc que la quantité totale des constituants de la silymarine est inférieure à 0,2% en poids. Une telle teneur peut être déterminée notamment par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) ou UPLC (chromatographie en phase liquide à ultra haute performance) en calculant l'aire totale des pics correspondant à tous les constituants de la silymarine, notamment en utilisant un échantillon de

silymarine de référence, qui peut être obtenu par exemple auprès de Sigma Aldrich, pour déterminer la position de ces pics.

Par « solvant organique non miscible à l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. », on entend, au sens de la présente invention, un solvant organique qui n'est pas capable de se mélanger, ou seulement partiellement, avec l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., de sorte que le mélange du solvant organique et de l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. donne un mélange hétérogène dans lequel il peut être observé au moins deux phases distinctes.

Par « stérol », on entend, au sens de la présente invention, une molécule possédant un noyau de stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle OH, le stérane ayant la structure suivante :



Par « tocophérol », on entend, au sens de la présente invention, l' α -tocophérol, le β -tocophérol, le γ -tocophérol et le δ -tocophérol.

Rétinoïde

Le rétinoïde utilisé dans le cadre de la présente invention pourra être choisi parmi le rétinol, le rétinaldéhyde et l'acide rétinoïque sous ses différentes formes isomères (en particulier tout-trans, 13-cis et 9-cis). Avantageusement, le rétinoïde sera le rétinol ou le rétinaldéhyde. De préférence, le rétinoïde est le rétinaldéhyde.

Extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

L'extrait utilisé dans le cadre de la présente invention est un extrait de *Silybum marianum*, et notamment un extrait d'akènes de *Silybum marianum*.

Selon un mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec.

Selon un mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient au moins 0,5% en poids, de préférence au moins 1,0% en poids de bêta-sitostérol par rapport au poids de l'extrait sec. En particulier, l'extrait selon l'invention contient entre 0,5% et 2,5% en poids, notamment entre 1,0% et 2,0% en poids, par exemple environ 1,5% en poids de bêta-sitostérol par rapport au poids de l'extrait sec. Avantageusement, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec. Le rapport massique silymarine/bêta-sitostérol de l'extrait selon l'invention pourra être en particulier inférieur à 0,4, notamment inférieur à 0,07. L'extrait selon l'invention pourra comprendre par ailleurs entre 2 et 7% en poids, notamment entre 3 et 6% en poids, par exemple entre 3 et 5% en poids de stérols par rapport au poids de l'extrait sec.

Selon un mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient au moins 3% en poids, de préférence au moins 4% en poids d'acide linoléique libre par rapport au poids de l'extrait sec. En particulier, l'extrait selon l'invention contient entre 3% et 15% en poids, notamment entre 4% et 10% en poids, en particulier entre 4% et 6% en poids, par exemple environ 5% en poids d'acide linoléique libre par rapport au poids de l'extrait sec. Avantageusement, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec. L'extrait selon l'invention pourra comprendre par ailleurs entre 10% et 70%, en particulier entre 10% et 30% en poids, notamment entre 15% et 25% en poids d'acides gras libres par rapport au poids de l'extrait sec.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient entre 0,5% et 2,5% en poids, notamment entre 1,0% et 2,0% en poids, par exemple environ 1,5% en poids de bêta-sitostérol par rapport au poids de l'extrait sec et entre 3% et 15% en poids, notamment entre 4% et 10% en poids, en particulier entre 4% et 6% en poids, par exemple environ 5% en poids d'acide linoléique libre par rapport au poids de l'extrait sec. Avantageusement, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec. Le rapport massique silymarine/bêta-sitostérol de l'extrait selon l'invention pourra être en particulier inférieur à 0,4, notamment inférieur à 0,07. L'extrait selon l'invention pourra comprendre par ailleurs entre 2 et 7% en poids, notamment entre 3 et 6% en poids, par exemple entre 3 et 5% en poids de stérols par rapport au poids de l'extrait sec.

et entre 10% et 50%, en particulier entre 10% et 30% en poids, notamment entre 15% et 25% en poids d'acides gras libres par rapport au poids de l'extrait sec.

Selon un mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient au moins 0,01% en poids, notamment au moins 0,05% en poids de tocophérols par rapport au poids de l'extrait sec. En particulier, l'extrait selon l'invention contient entre 0,01% et 0,5% en poids, notamment entre 0,05% et 0,2% en poids, par exemple environ 0,1% en poids de tocophérols par rapport au poids de l'extrait sec. Avantageusement, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec. Le rapport massique silymarine/tocophérols de l'extrait selon l'invention pourra être en particulier inférieur à 1, notamment inférieur à 0,1.

Selon un autre mode de réalisation particulier, l'extrait selon l'invention contient moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec ; entre 0,5% et 2,5% en poids, notamment entre 1,0% et 2,0% en poids, par exemple environ 1,5% en poids de bêta-sitostérol par rapport au poids de l'extrait sec ; entre 3% et 15% en poids, notamment entre 4% et 10% en poids, en particulier entre 4% et 6% en poids, par exemple environ 5% en poids d'acide linoléique libre par rapport au poids de l'extrait sec ; et entre 0,01% et 0,5% en poids, notamment entre 0,05% et 0,2% en poids, par exemple environ 0,1% en poids de tocophérols par rapport au poids de l'extrait sec. L'extrait selon l'invention pourra comprendre par ailleurs entre 2 et 7% en poids, notamment entre 3 et 6% en poids, par exemple entre 3 et 5% en poids de stérols par rapport au poids de l'extrait sec et entre 10% et 50%, en particulier entre 10% et 30% en poids, notamment entre 15% et 25% en poids d'acides gras libres par rapport au poids de l'extrait sec. Le rapport massique silymarine/bêta-sitostérol de l'extrait selon l'invention pourra être en particulier inférieur à 0,4, notamment inférieur à 0,07. Le rapport massique silymarine/tocophérols de l'extrait selon l'invention pourra être en particulier inférieur à 1, notamment inférieur à 0,1.

De préférence, l'extrait selon la présente invention sera un extrait sec.

L'extrait selon la présente invention pourra être obtenu par extraction d'une huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. par un solvant d'extraction

comprenant, notamment constitué par, une solution aqueuse hydrotropique, de l'eau subcritique ou un solvant organique non miscible à l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. éventuellement en mélange avec de l'eau ; en particulier un solvant organique non miscible à l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., tel qu'un alcool en C₁ en C₃, éventuellement en mélange avec de l'eau.

En particulier, le solvant d'extraction comprendra, notamment sera constitué par, le méthanol, l'éthanol ou l'isopropanol, éventuellement en mélange avec de l'eau, notamment dans un rapport volumique solvant organique/eau compris entre 80/20 et 100/0, notamment compris entre 85/15 et 95/5, en particulier d'environ 90/10. Avantageusement, il s'agira d'un mélange isopropanol / eau, notamment dans un rapport volumique d'environ 90/10.

L'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* peut être avantageusement obtenue par extraction à partir d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. (les akènes pourront être entiers ou en morceaux), notamment par pression, avantageusement par pression à froid (c'est-à-dire sans chauffage, à température ambiante).

L'étape d'extraction de l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* peut être effectuée par mélange de l'huile avec le solvant d'extraction durant 1 à 12 h et en particulier à une température comprise entre 15 et 25°C, notamment d'environ 20°C. La quantité de solvant d'extraction utilisé pour effectuer cette extraction sera avantageusement de 0,5 à 3 g, en particulier de 1 à 3 g pour 1 g d'huile.

La phase d'extraction ainsi obtenue est ensuite séparée de la phase lipidique, avant d'être séchée et évaporée, partiellement ou totalement, notamment sous vide, pour éliminer plus ou moins le solvant d'extraction et obtenir soit l'extrait sec si on élimine totalement le solvant, soit l'extrait concentré qui est dilué dans du solvant résiduel.

Association selon l'invention

L'association selon l'invention comprend un rétinolide tel que défini ci-dessus et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. tel que défini ci-dessus.

L'association selon l'invention sera de préférence une association du rétinolaldéhyde comme rétinolide avec un extrait de *Silybum marianum*, notamment un extrait d'akènes de *Silybum marianum*, essentiellement dépourvu de silymarine, c'est-à-

dire comprenant moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec.

Compositions dermatologiques et dermo-cosmétiques selon l'invention

La présente invention a également pour objet une composition dermatologique ou dermo-cosmétique comprenant au moins une association telle que définie ci-dessus en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable, plus particulièrement destinée à une application topique, notamment sur la peau.

Les compositions dermatologiques et dermo-cosmétiques selon l'invention pourront se présenter sous les formes qui sont habituellement connues pour une administration topique, c'est à dire notamment les lotions, les mousses, les gels, les dispersions, les émulsions, les sprays, les sérums, les masques ou les crèmes, avec des excipients permettant notamment une pénétration cutanée afin d'améliorer les propriétés et l'accessibilité du principe actif. Avantageusement, il s'agira d'une crème.

Ces compositions contiennent généralement, outre les ingrédients de l'association selon la présente invention, un milieu physiologiquement acceptable, en général à base d'eau ou de solvant, par exemple des alcools, des éthers ou des glycols. Elles peuvent également contenir des agents tensioactifs, des agents complexant, des conservateurs, des agents stabilisants, des émulsifiants, des épaississants, des gélifiants, des humectants, des émollients, des oligo-éléments, des huiles essentielles, des parfums, des colorants, des agents matifiants, des filtres chimiques ou minéraux, des agents hydratants, des eaux thermales, etc.

Ces compositions peuvent en outre contenir d'autres principes actifs conduisant à un effet complémentaire ou éventuellement synergique.

Avantageusement, les compositions selon la présente invention comprendront 0,01 à 10% en poids, de préférence 0,05 à 5% en poids, d'un extrait de *Silybum marianum* selon l'invention (de préférence en poids d'extrait sec) par rapport au poids total de la composition.

Avantageusement, les compositions selon la présente invention comprendront 0,001 à 5% en poids, de préférence 0,01 à 1% en poids, du rétinol par rapport au poids total de la composition.

Applications thérapeutiques

Les associations selon l'invention et les compositions dermatologiques ou dermo-cosmétiques selon l'invention sont utiles dans le traitement de l'acné (par ex. acné juvénile, encore appelée acné de l'adolescent, ou acné tardive, pouvant être kystique), de la séborrhée, de la dermite séborrhéique et/ou de la rosacée, de préférence par application topique, en particulier sur la peau.

La présente invention est illustrée par les exemples non limitatifs qui suivent.

FIGURES

La Figure 1 représente le chromatogramme UPLC de l'extrait I de *Silybum marianum* obtenu selon le Protocole 1.

Les Figures 2A, 2B et 2C représentent respectivement un chromatogramme UPLC de l'extrait M, de l'extrait E et de l'extrait I de *Silybum marianum* obtenu selon le Protocole 2.

Les Figures 3A, 3B et 3C représentent respectivement la zone 10-22 min (correspondant à la zone des acides gras) d'un chromatogramme GC / MS de l'extrait E, de l'extrait M et de l'extrait I de *Silybum marianum* obtenu selon le Protocole 3.

Les Figures 4A, 4B et 4C représentent respectivement la zone 22-28 min (correspondant à la zone des stérols) d'un chromatogramme GC / MS de l'extrait E, de l'extrait M et de l'extrait I de *Silybum marianum* obtenu selon le Protocole 3.

La Figure 5 représente la quantité produite par les cellules de la peau de rétinoides totaux en fonction du traitement reçu, à savoir le véhicule seul (EtOH), du rétinaldéhyde à 2 μ M (RAL 2 μ M), un extrait de *Silybum marianum* à 50 μ g/mL (SYL 50 μ g/mL) ou l'association du rétinaldéhyde à 2 μ M et de l'extrait de *Silybum marianum* à 50 μ g/mL (RAL + SYL).

La Figure 6 représente la quantité produite par les cellules de la peau de rétinoides totaux en fonction du traitement reçu, à savoir le véhicule seul (EtOH), du rétinol à 2 μ M (ROL 2 μ M), un extrait de *Silybum marianum* à 50 μ g/mL (SYL 50 μ g/mL) ou l'association du rétinol à 2 μ M et de l'extrait de *Silybum marianum* à 50 μ g/mL (ROL + SYL).

EXEMPLES

I - Exemples de préparations d'extraits selon l'invention

Extrait isopropanolique 90 (**extrait I**) obtenu selon le procédé suivant :

- pression à froid d'akènes de *Silybum marianum* pour obtenir une huile issue d'akènes de *Silybum marianum*,
- extraction de l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* par un mélange isopropanol/eau (90/10 v/v) avec 1 gramme du mélange isopropanol / eau par gramme d'huile pendant 2 heures à 20°C,
- récupération de la phase isopropanolique, et
- évaporation du solvant.

Des extraits méthanolique (**extrait M**) et éthanolique 90 (**extrait E**) ont été obtenus de manière similaire en remplaçant le mélange isopropanol/eau (90/10 v/v) respectivement par du méthanol et un mélange éthanol/eau (90/10 v/v). L'extraction de l'huile issue d'akènes de *Silybum marianum* se fait respectivement par 3 volumes de méthanol et par 3 volumes du mélange éthanol/eau (90/10 v/v) pour 1 volume d'huile pendant 2 heures à 20°C.

Ces différents extraits ont été caractérisés par UPLC (chromatographie en phase liquide à ultra haute performance) ou par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) selon les protocoles détaillés ci-dessous.

Protocoles d'évaluation des extraits obtenus :1. Protocole 1 : Evaluation de la teneur en Silymarine par UPLC○ Préparation de l'échantillon et du témoin:

- Témoin silymarine : Préparer une solution de silymarine à 5 mg dans 10 ml d'un mélange méthanol / eau (60:40) (v/v).
- Echantillon :
 - Extrait A : Préparer une solution à 100 mg d'extrait à analyser dans 10 ml d'un mélange méthanol / dichlorométhane (70:30) (v/v)
 - Extraits M, E, I : Chauffer l'extrait sec à analyser à 35°C sous agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène et limpide. Peser exactement 200 mg (*pe*)

de l'extrait, le solubiliser dans 10 ml d'un mélange méthanol / dichlorométhane permettant la solubilisation totale de l'extrait et homogénéiser la solution. Ce mélange va du ratio méthanol / dichlorométhane (1:1) (v/v) au méthanol pur.

○ **Conditions analytiques :**

- *Colonne* : Acquity BEH Shield C18 150 mm x 2,1 mm - 1,7µm (Waters)
- *Phase mobile* :
 - A : Eau + 0,1% d'acide formique
 - B : Acétonitrile + 0,1% d'acide formique
- *Gradient* :

T (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
15	60	40
20	0	100
39,5	0	100
40	90	10
45	90	10

- *Température de la colonne* : 40°C
- *Débit* : 0,4 ml/min
- *Détection* : 287 nm
- *Volume d'injection* : 1 µL

2. Protocole 2 : Evaluation de la teneur en Acide linoléique par UPLC

○ **Préparation de l'échantillon et du témoin**

- Témoin Acide linoléique : Préparer une solution d'acide linoléique à 10 mg dans 10 ml d'un mélange méthanol / dichlorométhane (1:1) (v/v).
- Echantillon :
 - Extraits M, E, I : Chauffer l'extrait sec à analyser à 35°C sous agitation jusqu'à obtention d'une solution homogène et limpide. Peser exactement 50 mg (*pe*) de l'extrait, le solubiliser dans 1 ml d'un mélange méthanol / dichlorométhane permettant la solubilisation totale de l'extrait et homogénéiser la solution. Ce mélange va du ratio méthanol / dichlorométhane (1:1) (v/v) au méthanol pur.
- **Conditions analytiques**
 - *Colonne* : Acquity BEH Shield C18 150 mm x 2,1 mm - 1,7µm (Waters)

- *Phase mobile :*
 - A : Eau + 0,1% d'acide formique
 - B : Acétonitrile + 0,1% d'acide formique
- *Gradient :*

T (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
1	50	50
10	0	100
15	0	100
15,5	50	50
20	50	50

- *Température de la colonne :* 40°C
- *Débit :* 0,4 ml/min
- *Détection :* 215 nm
- *Volume d'injection :* 1 µL

3. Protocole 3 : Evaluation de la teneur en Acides gras et Stérois par GC-MS

- **Préparation de l'échantillon**
 - Chauffer l'extrait sec à analyser à 35°C en agitant jusqu'à obtention d'un liquide homogène limpide
 - Solubiliser 20 mg de l'extrait dans 800 µL d'un mélange méthanol / dichlorométhane (1:1) (v/v)
 - Ajouter 200 µL du dérivatisant *N,O*-Bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) + Triméthylchlorosilane (TMCS) (99:1) (Supelco – Sigma Aldrich)
 - Agiter 1 minute au Vortex
- **Conditions de la chromatographie en phase gazeuse (CPG)**
 - *Colonne :* DB-5ms (Agilent technologies) ; 30 m x 0,25 mm ; 0,25 µm
 - *Injection :* T = 300°C ; Mode = Split ; Split ratio = 100 : 1
 - *Four :* Gradient de température (°C) :
 - Température initiale = 150°C
 - Gradient = 7°C / min jusqu'à Température finale = 340°C
 - Maintenir à 340°C pendant 10 minutes
 - *Débit gaz vecteur :* 1 mL/min

- *Détection* : MS - EI; T = 300°C ; Scan Time = 0,2 sec. ; Full Scan Start Mass = 40 ; Full Scan End Mass = 600
- *Volume d'injection* : 1µL

Résultats :

L'extrait I contient majoritairement des substances ayant un temps de rétention entre 13 et 30 minutes par UPLC (cf. Figure 1). Il présente les caractéristiques suivantes :

Composants	% en poids
Silymarine	0,06
Acides gras libres (principalement acides palmitique, oléique et linoléique) <i>dont acide linoléique</i>	24,6 5,1
Stérols <i>dont bêta-sistérol</i>	3,6 1,5

Les chromatogrammes UPLC et GC / MS des 3 extraits (extraits I, M et E) de *Silybum marianum* sont similaires (cf. Figures 2 et 3).

II – Exemples de compositions comprenant un rétinoïde et/ou un extrait de *Silybum marianum* selon l'invention

COMPOSITION 1 (crème) à base de rétinaldéhyde = RAL1

INCI désignation	Pourcentage en poids
Oléamide de glycylglycine	0,1%
Tocophéryl glucoside	0,1%
rétinaldéhyde	0,05%
Gélifiant Carbomer	0,35%
Squalane	15%
Mineral Oil	
Caprylic capric triglycérides	
Eau	Qsp 100%

COMPOSITION 2 (crème) à base de rétinaldéhyde = RAL2

INCI désignation	Pourcentage en poids
Eau	QSP 100%
Sorbate Potassium	0,3
Ethanol	3
Glycolic Acid	6
Ceteareth 33 & cetearyl alcool	3
Polysorbate 60	6
Cetylic Alcol	11
Butylhydroxytoluene	0,01
Cyclopentasiloxane	10
Hydroxyde Sodium	qs
Rétinaldéhyde	0,1
Undecyl Rhamnoside	0,2

COMPOSITION 3 (crème) à base de rétinaldéhyde = RAL3

INCI désignation	Pourcentage en poids
Eau	QSP 100%
Glycérine	6
Disodium EDTA	0,1
Pentylène glycol	3
Glyceryl Stearate & PEG-100 Stearate	3
Isododecane	7
Butylhydroxytoluene	0,02
Carbomer Papaine Crosspolymer	1
Rétinaldéhyde	0,1
Caprylic/Capric Triglycerides	7
1 α -linoléate de 2-hydroxy-octyle	0,6

COMPOSITION 4 (crème) à base de rétinaldéhyde = RAL4

Le rétinaldéhyde a été formulé à 0,1% (p/p) dans un mélange comprenant :

Glycérine 5%

Gélifiant 1,5%

Silice 1%

Eau qs.

COMPOSITION 5 (crème) à base d'extrait de *Silybum marianum* = SYL1

L'extrait I préparé à l'exemple 1 a été formulé à 7% (p/p) dans un mélange isopropanol / PEG 300 (1:1) (p/p).

COMPOSITION 6 (crème) à base d'extrait de *Silybum marianum* = SYL2
(pourcentage p/p)

SYL1 25%

Glycérine 5%

Gélifiant 1,5%

Silice 1%

Eau qs.

COMPOSITION 7 (crème) comprenant l'association d'un extrait de *Silybum marianum*
et de rétinaldéhyde = ASSO1 (pourcentage p/p)

SYL1 25%

Rétinaldéhyde 0,1%

Glycérine 5%

Gélifiant 1,5%

Silice 1%

Eau qs.

COMPOSITION 8 (crème) comprenant l'association d'un extrait de *Silybum marianum*
et de rétinaldéhyde = ASSO2 (Pourcentage p/p)

SYL1 12,5%

Rétinaldéhyde 0,1%

Glycérine 5%

Gélifiant 1,5%

Silice 1%

Eau qs.

III - Etudes cliniques

Les différentes crèmes testées ont été appliquées sur le visage (peau nettoyée), 2 applications/jour matin et soir par massage doux sauf pour les compositions comprenant du RAL : le soir uniquement.

L'analyse des effets thérapeutiques obtenus a été effectuée selon la méthode d'analyse globale de l'état clinique IGA (Investigator Global Assessment) acceptée par la FDA (Food and Drug Administration) - pour l'acné et adaptée à la rosacée et à la dermite séborrhéique - et appliquée par un dermatologue expert clinique (Guidance for Industry Acne Vulgaris: Developing Drugs for Treatment).

Avec une telle méthode les Grades IGA suivants sont attribués selon la sévérité de l'acné observée :

Grade IGA	Etat du patient
0	Peau nette sans lésions inflammatoires ou non inflammatoires
1	Peau quasiment nette avec de rares lésions non inflammatoires et pas plus d'une petite lésion inflammatoire
2	Acné légère de sévérité supérieure au grade 1 : quelques lésions non inflammatoires avec pas plus de quelques lésions inflammatoires (papules et pustules, pas de lésion nodulaire)
3	Acné modérée de sévérité supérieure au grade 2 : jusqu'à de nombreuses lésions non inflammatoires et potentiellement quelques lésions inflammatoires mais pas plus d'une petite lésion nodulaire
4	Acné sévère de sévérité supérieure au grade 3 : jusqu'à de nombreuses lésions non inflammatoires et inflammatoires mais pas plus de quelques lésions nodulaires

Les résultats des différentes analyses sont présentés ci-dessous.

Analyse 1 : Avant traitement versus Extrait de *Silybum marianum* sans RAL versus association RAL + Extrait de *Silybum marianum*

Patients	Protocole (nombre de semaines successives d'un même traitement et second traitement appliqué le jour suivant la fin du 1 ^{er} traitement)	Grade IGA		
		Avant traitement	Après traitement Extrait de <i>Silybum marianum</i>	Après traitement RAL + Extrait de <i>Silybum marianum</i>
Homme atteint de rosacée et dermite séborrhéique	35 semaines SYL1 puis 15 semaines SYL1 + RAL1	2	1	0
Femme atteinte de rosacée et dermite séborrhéique	9 semaines SYL1 puis 50 semaines SYL1 + RAL1	4	2	0
Homme atteint de rosacée et dermite séborrhéique	3 semaines SYL1 puis 18 semaines SYL1 + RAL1	3	1	0
Femme atteinte d'acné tardive	5 semaines SYL1 puis 8 semaines SYL1 + RAL2	3	2	1
Adolescent atteint d'acné	5 semaines SYL1 puis 5 semaines SYL1 + RAL3	3	1	0
Adolescente atteinte d'acné	4 semaines SYL1 puis 28 semaines SYL1 + RAL3	2	1	0
Adolescent atteint d'acné	52 semaines SYL1 puis 16 semaines SYL1 + RAL3	3	1	0
Femme atteinte d'acné tardive	10 semaines SYL1 puis 20 semaines SYL1 + RAL3	3	2	1
Femme atteinte d'acné tardive	8 semaines SYL1 puis 8 semaines SYL1 + RAL3	3	2	2
Femme atteinte d'acné tardive	24 semaines SYL2 puis 4 semaines ASSO1	3	2	1

Adolescente atteinte d'acné	4 semaines SYL2 puis 6 semaines ASSO1	2	1	0
Adolescent atteint d'acné	16 semaines SYL2 puis 3 semaines ASSO1	3	2	1
Femme atteinte d'acné tardive	6 semaines SYL2 puis 3 semaines ASSO1	3	2	1
Femme atteinte d'acné tardive	8 semaines SYL2 puis 8 semaines ASSO2	3	2	1
Adolescente atteinte d'acné	12 semaines SYL1 puis 10 semaines ASSO2	4	2	1

Analyse 2 : Avant traitement versus RAL sans Extrait de *Silybum marianum* versus association RAL + Extrait de *Silybum marianum*

Patients	Protocole (nombre de semaines successives d'un même traitement et second traitement appliqué le jour suivant la fin du 1 ^{er} traitement)	Grade IGA		
		Avant traitement	Après traitement RAL	Après traitement RAL + Extrait de <i>Silybum marianum</i>
Homme atteint de dermite séborrhéique + scalp chauve	35 semaines RAL1 puis 43 semaines SYL1 + RAL1	3	2	1
Femme atteinte d'acné tardive	6 semaines RAL 3 puis 6 semaines SYL1 + RAL3	4	3	1
Femme atteinte d'acné tardive	8 semaines RAL2 Puis 8 semaines SYL1 + RAL2	3	2	1
Adolescente atteinte d'acné	60 semaines RAL2 Puis 16 semaines SYL1 + RAL2	3	2	1
Adolescent atteint d'acné	6 semaines RAL3 puis 20 semaines SYL1 + RAL3	3	2	1
Femme atteinte d'acné tardive	8 semaines RAL3 Puis 4 semaines ASSO1	4	3	2

Conclusion

Les résultats obtenus avec les différents traitements à base respectivement d'une association rétinaldéhyde / extrait de *Silybum marianum*, du rétinaldéhyde seul ou de l'extrait de *Silybum marianum* seul, dans les études cliniques décrites ci-dessus, montrent que le rétinaldéhyde en association avec l'extrait de *Silybum marianum*, permet d'obtenir un meilleur résultat clinique.

IV – Etudes *in vitro* : évaluation de la correction du déficit en vitamine A grâce à l'association rétinaldéhyde (RAL) ou rétinol (ROL) + extrait de *Silybum marianum* (SYL)

Matériel et méthodes :

Culture :

- 3 jours avant l'expérience, cultiver les cellules A431 de carcinome épidermoïde dans 2 plaques à 6 puits à une densité de 40'000 cellules par puits (2 ml par puits).

Traitement des cellules (3 puits par condition, 2 ml par puits ; concentrations finales) :

- Ethanol (solvant) : éthanol 1% ;
- ROL : ROL 10 μ M dans éthanol 1% ;
- RAL : RAL 2 μ M dans éthanol 1% ;
- SYL : Extrait I de *Silybum marianum* 50 μ g/ml dans éthanol 1% ;
- ROL + SYL : ROL 10 μ M + Extrait de *Silybum marianum* 50 μ g/ml dans éthanol 1% ;
- RAL + SYL : RAL 2 μ M + Extrait de *Silybum marianum* 50 μ g/ml dans éthanol 1%.

Incubation : 1 h

Récolte des cellules :

- Ôter le milieu, laver 2 fois avec PBS (tampon phosphate salin) ;
- Ajouter 500 μ l par puits d'EDTA-NaOH (Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 0,02% + NaOH 200 μ M), laisser reposer 10-15 minutes, puis détacher

les cellules à l'aide d'un grattoir en caoutchouc et les transférer dans des tubes en verre à extraction ;

- Ajouter 10 µl d'HCl 20 mM, soniquer brièvement, puis transférer 10 µl de suspension dans des tubes Eppendorf de 1.5 ml pour le dosage des protéines ;
- Dans les tubes en verre, ajouter 500 µl de BHT (hydroxytoluène butylé) 200 µM/éthanol, 20 µl d'acétate de rétinyle 20 µM (standard interne), puis 4 ml d'hexane ;
- Vortexer vigoureusement 30 sec, puis centrifuger les tubes (900 g, 5 min) ;
- Transférer le surnageant dans des tubes en verre sans bouchon, évaporer à sec sous azote ;
- Reconstituer dans 200 µl de méthanol, puis transférer dans des flacons pour HPLC (chromatographie liquide haute performance).

Analyse des rétinoïdes par HPLC :

- chaîne HPLC Agilent 1100 avec pompe quaternaire et détecteur DAD
- colonne Macherey-Nagel Nucleodur C₁₈ pyramid 3 µm
- phase mobile :
 - 0 - 6 min : méthanol 100%
 - 6 - 8 min : gradient linéaire vers méthanol/THF (4:1)
 - 8 - 18 min : méthanol/THF (4:1)
 - 18 - 20 min : gradient linéaire vers méthanol 100%
 - 20 - 30 min : méthanol 100%
- détection : 325 nm (rétinol, rétinyl esters); 383 nm (rétinal).

Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les Figures 5 et 6.

Conclusion :

L'extrait de *Silybum marianum* ne permet pas à lui seul d'induire une production significative de rétinoïdes.

En revanche, les cellules de la peau fabriquent significativement plus de rétinoïdes en présence de l'association d'un extrait de *Silybum marianum* avec du rétinaldhéide ou du

rétinol qu'en présence du rétinaldéhyde ou du rétinol seul démontrant l'effet synergique de l'association selon l'invention.

REVENDICATIONS

1. Association comprenant un rétinol et un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., caractérisée en ce que l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. est un extrait d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. comprenant moins de 0,2% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec.
2. Association selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. est un extrait d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. comprenant moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec.
3. Association selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. contient entre 0,5% et 2,5% en poids, notamment entre 1,0% et 2,0% en poids, par exemple environ 1,5% en poids de bêta-sitostérol par rapport au poids de l'extrait sec, avec avantageusement un rapport massique silymarine/bêta-sitostérol inférieur à 0,4, notamment inférieur à 0,07, et notamment entre 2 et 7% en poids, en particulier entre 3 et 6% en poids, par exemple entre 3 et 5% en poids de stérols par rapport au poids de l'extrait sec.
4. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. contient entre 3% et 15% en poids, notamment entre 4% et 10% en poids, en particulier entre 4% et 6% en poids, par exemple environ 5% en poids d'acide linoléique libre par rapport au poids de l'extrait sec, et notamment entre 10% et 50%, en particulier entre 10% et 30% en poids, en particulier entre 15% et 25% en poids d'acides gras libres par rapport au poids de l'extrait sec.
5. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. comprend entre 0,01% et 0,5% en poids, notamment entre 0,05% et 0,2% en poids, par exemple environ 0,1% en poids de tocophérols par rapport au poids de l'extrait sec, avec avantageusement un rapport massique silymarine/tocophérols inférieur à 1, notamment inférieur à 0,1.

6. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le rétinol est choisi parmi le rétinol, le rétinaldéhyde et l'acide rétinolique sous ses différentes formes isomères.
7. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le rétinol est le rétinaldéhyde.
8. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le rétinol est le rétinaldéhyde et l'extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. est un extrait d'akènes de *Silybum marianum* (L.) Gaertn. comprenant moins de 0,2%, de préférence moins de 0,1% en poids de silymarine par rapport au poids de l'extrait sec.
9. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour son utilisation comme médicament.
10. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour son utilisation dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermatite séborrhéique.
11. Composition dermatologique ou dermo-cosmétique comprenant au moins une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 en combinaison avec au moins un excipient dermatologiquement ou dermo-cosmétiquement acceptable.
12. Composition dermatologique ou dermo-cosmétique selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'elle comprend 0,01 à 10% en poids, de préférence 0,05 à 5% en poids, d'un extrait de *Silybum marianum* (L.) Gaertn., en poids d'extrait sec par rapport au poids total de la composition.
13. Composition dermatologique ou dermo-cosmétique selon l'une quelconque des revendications 11 et 12, caractérisée en ce qu'elle comprend 0,001 à 5% en poids, de préférence 0,01 à 1% en poids, du rétinol par rapport au poids total de la composition.

14. Composition dermatologique ou dermo-cosmétique selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisée en ce qu'elle est destinée à une application topique, en particulier sur la peau.

15. Composition dermatologique ou dermo-cosmétique selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, pour son utilisation dans le traitement de l'acné, de la séborrhée, de la rosacée et/ou de la dermite séborrhéique.