

ROYAUME DU MAROC  
-----  
OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)  
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE  
-----



المملكة المغربية  
-----  
المكتب المغربي  
للملكية الصناعية و التجارية  
-----

## (12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication :  
**MA 32839 B1**

(51) Cl. internationale :  
**A61K 36/899; A61K 8/97;  
A61P 37/08**

(43) Date de publication :  
**01.11.2011**

---

(21) N° Dépôt :  
**33900**

(22) Date de Dépôt :  
**31.05.2011**

(30) Données de Priorité :  
**14.11.2008 FR 0857755**

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :  
**PCT/EP2009/061971 15.09.2009**

(71) Demandeur(s) :  
**PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE, 45, PLACE ABEL GANCE-92100  
BOULOGNE- BILLANCOURT (FR)**

(72) Inventeur(s) :  
**MANDEAU, Anne ; FABRE, Bernard ; TEYSSEYRE, Valérie ; BOE, Jean-  
François ; CREBASSA TRIGUEROS, Véronique**

(74) Mandataire :  
**CABINET PATENTMARK**

---

(54) Titre : **COMPOSTION DERMATOLOGIQUE HYPOALLERGENIQUE**

(57) Abrégé : La présente invention concerne une composition dermatologique hypoallergénique contenant un extrait de partie aérienne de céréale ou de pseudocéréale, à l'exclusion des graines, destinée à être utilisée chez des personnes allergiques aux céréales.

**BREVET D'INVENTION**

**Déposant : PIERRE FABRE DERMO-COSMETIQUE**

**TITRE**

Composition dermatologique hypoallergénique.

**ABREGE DESCRIPTIF**

L'invention concerne une composition dermatologique hypoallergénique comprenant un extrait de partie aérienne de céréale ou de pseudo-céréale, à l'exclusion des graines, pour utilisation chez les personnes allergiques aux céréales.

01 NOV 2011

32839

5 La présente invention concerne les allergies aux céréales.

Au sens de la présente invention, les céréales comprennent les Poacées et les pseudo-céréales.

On désigne par « céréales » les Graminées dont le « grain » (caryopse) mûr est utilisé comme aliment, surtout en raison de sa richesse en amidon (Paris R.R.,

10 Moyse H. Précis de matière médicale. II Pharmacognosie spéciale. Spermaphytes (suite) : Angiospermes. Monocotylédones – Dicotylédones. Apétales et Diapétales. 2<sup>ième</sup> édition. Paris : Masson, 1981, p16). Le terme « céréale » désigne aussi, spécifiquement la graine de ces plantes.

15 Sur le plan botanique, les céréales appartiennent à la famille des *Poacées* (ou *Graminées*).

Lesdites Graminées sont des Monocotylédones en général herbacées avec une tige creuse entre les nœuds (chaume) portant des feuilles distiques à gaine souvent fendue et ligulée. L'inflorescence est en épillets, groupés, le plus souvent, en épi composé, ou en grappe dite « panicule ». La fleur est réduite aux étamines et à 20 l'ovaire : deux bractées foliaires ou glumes protègent l'épillet et deux glumelles, ont une antérieure adossée, enveloppante, souvent aristée accompagne la fleur. Les trois étamines exsertes sont oscillantes, attachées par le dos. L'ovaire a 1 carpelle avec deux styles plumeux, intimement soudés à l'ovule et se développant en un fruit particulier dénommé caryopse ; l'albumen abondant est amylacé.

25 Cette famille regroupe près de 700 genres et 12000 espèces.

La plupart des graminées sont utilisées en alimentaire (blé, orge, seigle, avoine, sorgho, mil, maïs, riz...).

Les espèces de céréales les plus classiquement consommées sont répertoriées dans le tableau 1 ci-dessous.

30

| Nom latin  | Nom vernaculaire  |
|--|---|
| <i>Avena abyssinica</i> Hochst.  |   |
| <i>Avena brevis</i> Roth   |   |
| <i>Avena nuda</i> L.   | Avoine nue  |
| <i>Avena sativa</i> L.   |   |
| <i>Bromus mango</i> E. Desv.   |   |
| <i>Coix lacryma-jobi</i> var. <i>ma-yuen</i> (Rom. Caill.) Stapf             |   |
| <i>Dendrocalamus strictus</i> (Roxb.) Nees                                   |   |
| <i>Digitaria exilis</i> (Kippist) Stapf                                      |   |
| <i>Digitaria iburua</i> Stapf  |   |
| <i>Echinochloa esculenta</i> (A. Braun) H. Scholz                            | millet japonais   |
| <i>Eleusine coracana</i> subsp. <i>coracana</i>                              | mil rouge   |
| <i>Eragrostis tef</i> (Zuccagni) Trotter                                     | Tef   |
| <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>                                 | orge vulgaire   |
| <i>Oryza glaberrima</i> Steud.   | riz de Casamance  |
| <i>Oryza sativa</i> L.   | riz   |
| <i>Panicum hirticaule</i> J. Presl   |   |
| <i>Panicum miliaceum</i> subsp. <i>miliaceum</i>                             | millet commun   |
| <i>Panicum sumatrense</i> Roth   |   |
| <i>Paspalum scrobiculatum</i> L.   |   |
| <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br.  | millet à chandelles<br>millet perle                                 |
| <i>Phalaris canariensis</i> L.   | alpiste des Canaries  |
| <i>Secale cereale</i> subsp. <i>cereale</i>                                  | seigle cultivé  |
| <i>Secale strictum</i> subsp. <i>africanum</i> (Stapf) K. Hammer             |   |
| <i>Setaria italica</i> subsp. <i>italica</i>                                 | millet d'Italie, millet des oiseaux<br>petit mil, séttaire-d'Italie |
| <i>Setaria palmifolia</i> (J. Koenig) Stapf                                  |   |
| <i>Setaria pumila</i> subsp. <i>pumila</i>                                   | séttaire glauque  |
| <i>Sorghum bicolor</i> subsp. <i>bicolor</i>                                 | gros mil<br>sorgho  |
| × <i>Triticosecale</i> spp.  | triticale   |
| <i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>aestivum</i>                              | blé ordinaire, froment  |
| <i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>spelta</i> (L.) Thell.                    | épeautre  |
| <i>Triticum aestivum</i> subsp. <i>sphaerococcum</i> (Percival) Mackey       |   |
| <i>Triticum monococcum</i> subsp. <i>monococcum</i>                          | Engrain, petit épeautre   |
| <i>Triticum timopheevii</i> subsp. <i>timopheevii</i>                        |   |
| <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>carthlicum</i> (Nevski) A. Love & D. Love | blé persan  |
| <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i> (Desf.) Husn.                   | blé dur   |
| <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>polonicum</i> (L.) Thell.                 | blé de Pologne  |
| <i>Triticum zhukovskyi</i> A. M. Menabde & Eritzjan                          |   |
| <i>Urochloa deflexa</i> (Schumach.) H. Scholz                                |   |
| <i>Urochloa ramosa</i> (L.) T. Q. Nguyen                                     |   |
| <i>Zizania palustris</i> L.  |   |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> L.  | maïs  |

**Tableau 1** : Principales espèces de céréales consommées,  
appartenant à la famille des Poacées

Certaines graines d'autres familles botaniques sont assimilées aux céréales et  
5 appelées pseudo-céréales. Ces espèces apparentées aux céréales mais ne faisant pas  
partie de la famille des Poacées, qui sont également consommées et qui peuvent faire  
l'objet d'allergies alimentaires sont exemplifiées, entre autres, dans le tableau 2 ci-  
dessous :

| Nom latin   | Nom vernaculaire   | Famille        |
|---|--|----------------|
| Amaranthus caudatus L.  | amarante caudée<br>amarante queue-de-renard<br>discipline des religieux<br>queue de renard | Amaranthaceae  |
| Amaranthus cruentus L.  | amarante étalée  | Amaranthaceae  |
| Amaranthus hypochondriacus L.   |  | Amaranthaceae  |
| Chenopodium album L.  | ansérine blanche   | Chenopodiaceae |
| Chenopodium berlandieri subsp.<br>nuttalliae (Saff.) H. D. Wilson &<br>Heiser |  | Chenopodiaceae |
| Chenopodium pallidicaule Aellen   |  | Chenopodiaceae |
| Chenopodium quinoa subsp.<br>quinoa   | quinoa, petit riz, riz du<br>Pérou   | Chenopodiaceae |
| Fagopyrum esculentum Moench   | blé noir, bouquette,<br>sarrasin   | Polygonaceae   |
| Fagopyrum tataricum (L.) Gaertn.  | sarrasin de Tartarie   | Polygonaceae   |
| Helianthus annuus L.  | tournesol  | Asteraceae     |
| Sesamum indicum L.  | sésame   | Pedaliaceae    |

10

**Tableau 2** : Principales espèces consommées apparentées aux céréales,  
n'appartenant pas à la famille Poacées

Les graines de céréales et pseudo-céréales renferment un grand nombre de  
15 protéines : des protéines de structure, des protéines biologiquement fonctionnelles et  
des protéines de réserve. Osborne (1907) les a classées selon leurs solubilités :

- Albumines solubles dans l'eau
- Globulines solubles dans les solutions salines
- Prolamines solubles dans l'éthanol aqueux

- Glutélines insolubles dans les solvants précédents, partiellement solubles dans les solutions d'urée ou de guanidines.

Exemples :

|            | Blé        | Avoine     | Orge       | Maïs     |
|------------|------------|------------|------------|----------|
| Albumines  | Leukosines |            |            |          |
| Globulines | Edestines  | Avenalines |            |          |
| Prolamines | Gliadines  | Gliadines  | Hordéines  | Zéïnes   |
| Glutélines | Gluténines | Avenines   | Hordenines | Zéanines |

- 5 En revanche, le contenu protéique des parties aériennes, et des feuilles en particulier, consiste notamment en :
- des protéines membranaires des chloroplastes (protéines souvent liées aux lipides et pigments)
  - des protéines solubles du chloroplaste (stroma) : RuBPCase
- 10 Les feuilles de quinoa, de tournesol, d'avoine, d'orge, de *Zizania palustris*, les jeunes pousses de blé ainsi que les germes de sésame, riz, blé et maïs sont d'ores et déjà utilisés en cosmétique. Les jeunes pousses d'Orge vertes sont par exemple utilisées comme anti-âge.
- Il a également été décrit dans l'art antérieur :
- 15 - un extrait de feuilles d'Amaranthus utilisé comme anti-inflammatoire, en particulier pour traiter la dermatite atopique (brevet JP2000143524).
- Une composition contenant un extrait de paille d'avoine associé à un extrait d'épilobe dans le but de traiter les réactions inflammatoires de la peau dans le cadre d'un usage topique (EP1474159).
- 20 - Une composition cosmétique protégée de l'oxydation par de l'huile de germe de riz (EP1704898)
- Une composition cosmétique comprenant un extrait de pousse de blé (WO9526183)
  - Un produit cosmétique présentant des effets de régénération sur la peau
- 25 contenant un extrait de tiges de tournesol (FR2487674)

Les farines de céréales, en particulier de blé, sont connues pour être à l'origine de l'asthme du boulanger et de rhinites allergiques par inhalation. La réponse IgE la plus forte a été observée avec les albumines et les globulines, des protéines solubles en solutions neutres. Cependant certaines études ont également démontré une réactivité aux protéines solubles dans l'éthanol ou en milieu acide (glutenines et gliadines). Plus récemment, des études d'immunoblot ont montré que les allergènes majeurs dans les fractions neutres de la farine de blé et d'orge étaient localisés dans la partie de bas poids moléculaire (autour de 20 kDa), dans le sérum de patients atteints de l'allergie du boulanger.

10 A l'ingestion, les céréales sont parfois responsables de la maladie cœliaque et de dermatite herpétiforme. Plusieurs études ont montré que l'antigène le plus impliqué serait la fraction gliadine des protéines solubles dans l'éthanol.

Malgré l'importance des céréales dans l'alimentation humaine, elles sont suspectées de détériorer les cas de dermatite atopique, notamment chez les enfants.

15 De la même façon, des études immunologiques (essentiellement tests SPT – Skin Prick Test - et RAST – Radioallergosorbent Test) ont conduit à l'identification des protéines impliquées dans le blé, l'avoine, le seigle, l'orge, le riz, le millet et le maïs et ont mis en évidence des réactions croisées entre le blé et l'orge ou le seigle (Varjonen E, Vainio E, Kalimo K, Juntunen-Backman K, Savolainen J Skin-prick test and RAST responses to cereals in children with atopic dermatitis. Characterization of IgE-binding components in wheat and oats by an immunoblotting method. Clin Exp Allergy 1995, 25:1100-1107) (Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Kalkkinen N, Reunala T. Rye  $\gamma$ -70 and  $\gamma$ -35 secalins and barley  $\gamma$ -3 hordein cross-react with  $\omega$ -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent, exercise-induced anaphylaxis. Clin Exp Allergy, 2001, 31 :466-473). Les protéines les moins solubles (gliadines et glutenines) paraissent être impliquées lorsque des céréales ingérées sont à l'origine de dermatite atopique. De nombreuses études préliminaires ont montré que l'hypersensibilité alimentaire jouait un rôle important chez les enfants atteints de dermatite atopique, et que l'élimination des allergènes de l'alimentation entraînait

25

30 une amélioration clinique.

Certains cas d'allergie de contact ont été reportés avec des cosmétiques à base d'extraits de graines de céréales (essentiellement protéines de blé hydrolysées ou non mais aussi sésame) chez des personnes sensibilisées. L'hydrolyse des protéines de blé, qui aurait pu être une solution pour éviter les problèmes d'allergie s'est avéré au contraire beaucoup plus sensibilisant, les modifications de structure induites par l'hydrolyse démasquant de nouveaux sites antigéniques (Pecquet C, Laurière M. New allergens in hydrolysates of wheat proteins. Rev Fr Allerg Immunol Clin 2003, 43: 21-23).

Les protéines de graines de céréales seraient donc à éviter chez des personnes allergiques, tant par voie orale que topique, et à plus forte raison chez des enfants.

Il existe ainsi un besoin et une forte demande en cosmétique chez des personnes sensibilisées ou allergiques aux graines de céréales.

De manière inattendue et surprenante, les inventeurs ont mis en évidence qu'une composition cosmétique comprenant un extrait de partie aérienne de céréales ou de pseudo-céréales récoltées de préférence avant formation des épis (épiaison), n'entraîne pas de réactions croisées avec les protéines responsables des allergies aux graines de céréales.

La présente invention a ainsi pour objet un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale et/ou pseudo-céréale, à l'exclusion des graines, pour utilisation chez les personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.

Par partie aérienne de céréale et/ou pseudo-céréale, on entend toute partie située au-dessus du sol, à l'exclusion des graines.

De préférence, les « parties aériennes de céréales et/ou pseudo-céréales » comprennent les feuilles et/ou tiges et/ou épillets et/ou fleurs, à l'exclusion des graines.

Avantageusement, l'extrait selon l'invention est un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale et/ou pseudo-céréale récoltées avant épiaison.

Au sens de la présente invention, on appelle « parties aériennes de céréale et/ou pseudo-céréale récoltées avant épiaison » les parties aériennes de céréale ou pseudo-céréale récoltées après germination (environ 2 semaines à 2 mois après germination) durant le stade de la montaison jusqu'à l'épiaison non comprise.



Au sens de la présente invention, on appelle « montaison » la phase de croissance qui correspond à l'élongation de la tige et à la montée de l'épi en formation, avant floraison.

Préférentiellement, l'extrait selon l'invention est obtenu à partir de partie(s) aérienne(s) de blé, de riz, d'orge ou d'avoine, de façon particulièrement préférée d'avoine.

Un extrait de partie(s) aérienne(s) d'avoine avantageusement utilisé selon l'invention chez les personnes allergiques aux protéines de graines de céréales comprend 2 à 15% de flavonoïdes et 0,2 à 2% d'avenacosides A et B, de préférence 5 à 10% des flavonoïdes isovitexin-2''-O-arabinopyranoside et isoorientin-2''-O-arabinopyranoside et/ou moins de 1 ppm de protéines, préférentiellement moins de 0,5 ppm et encore plus préférentiellement moins de 0,3 ppm de protéines.

L'extrait de partie(s) aérienne(s) d'avoine utilisé se caractérise par sa teneur en flavonoïdes et en saponines d'intérêt. Ces dernières sont analysées par chromatographie liquide à haute pression, par deux méthodes différentes, appropriées à chaque type de composés.

Les teneurs en ces différentes molécules varient en fonction des conditions d'extraction. Les flavonoïdes principaux sont l'isovitexin-2''-O-arabinopyranoside et l'isoorientin-2''-O-arabinopyranoside. Les avenacosides A et B sont les principales saponines. Ce sont des saponines stéroïdiques bisdesmosidiques.

Avantageusement, l'extrait selon l'invention est un extrait de partie(s) aérienne(s) de blé, de riz ou d'avoine récoltées avant épiaison, et préférentiellement de partie(s) aérienne(s) d'avoine récoltée(s) avant épiaison.

Avantageusement, l'extrait selon l'invention est un extrait obtenu en solvant organique.

L'extrait selon l'invention peut être préparé par extraction en solvant organique de partie(s) aérienne(s) de céréale ou pseudo-céréale (environ 2 semaines à 2 mois après germination durant le stade de la montaison jusqu'à l'épiaison non comprise) après séchage et broyage. En particulier, on utilise un solvant organique choisi dans le groupe constitué des cétones, des esters, des alcools en C1 à C4 et des mélanges en toute proportion miscibles de ces solvants. Avantageusement, on utilise

un solvant organique choisi dans le groupe constitué de l'acétone, la méthyl éthyl cétone, la méthyl isobutyl cétone, l'acétate d'éthyle, un alcool en C1 à C4 et un mélange en toute proportion miscible de ces solvants.

L'extraction est réalisée sous agitation ou de façon statique.

5 L'extraction est réalisée à reflux ou à température ambiante.

Avantageusement, l'extraction est réalisée dans un ratio plante/solvant pouvant varier de 1/7 à 1/20, de préférence de 1/8 à 1/12.

Préférentiellement, l'extraction est réalisée pendant une durée de 30 minutes à 48 heures, de manière particulièrement préférée de 60 à 120 minutes.

10 L'extraction peut être renouvelée 2 ou 3 fois.

Le marc obtenu par l'étape d'extraction est ensuite séparé de l'extrait par centrifugation ou filtration et la solution peut être plus ou moins concentrée jusqu'à l'obtention d'un extrait sec.

15 Un traitement de décoloration peut être réalisé soit par délipidation par concentration, précipitation et filtration, soit en rajoutant à la solution extraite concentrée ou non un support absorbant comme le charbon actif ou une résine absorbante.

20 Un support peut être rajouté lors de l'étape de séchage dans des proportions massiques par rapport à la matière sèche extraite pouvant varier de 1 à 75%. Le support peut être un sucre comme la maltodextrine, le lactose, de la silice ou tout autre support cosmétologiquement acceptable.

25 Avantageusement, cet extrait est obtenu par extraction acétonique ou acétone/eau jusqu'à 20% d'eau. Un extrait de type acétone ou acétone / eau jusqu'à 20% d'eau comporte les molécules d'intérêt, flavonoïdes et saponines, et est très largement appauvri en protéines. En effet, les méthodes de dosage de protéines décrites dans la Pharmacopée Européenne ne donnent aucun résultat, et une migration sur gel SDS-Page par électrophorèse après précipitation à l'acétone et révélation au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent montre l'absence de bande signalant la présence de protéine. Le dépôt d'un témoin sur cette même  
30 électrophorèse permet d'évaluer la limite de détection de protéine à environ 1 ng, cet extrait possède donc une teneur en protéine inférieure à 1 ppm(ramenée à la quantité

d'extrait déposée sur le gel). Préférentiellement, ladite teneur en protéines est inférieure à 0,5 ppm et encore plus préférentiellement inférieure à 0,3 ppm de protéines.

5 Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréales et/ou pseudo-céréales, à l'exclusion des graines, chez les personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.

10 Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréales et/ou pseudo-céréales, à l'exclusion des graines, pour la préparation d'une composition dermatologique hypoallergénique, c'est-à-dire minimisant et/ou prévenant les risques de réactions allergiques chez des personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.

15 Un autre objet de la présente invention concerne l'utilisation d'une composition cosmétique hypoallergénique comprenant un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréales et/ou pseudo-céréales chez les personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.

La composition dermatologique ou cosmétique utilisée selon l'invention peut en particulier contenir des additifs et aides à la formulation, tels que des émulsionnants, des épaississants, des gélifiants, des fixateurs d'eau, des agents d'étalement, des stabilisants, des colorants, des parfums et des conservateurs.

20 La composition dermatologique ou cosmétique utilisée selon l'invention comprend, en outre, des excipients usuels dermatologiquement compatibles.

25 Elle peut être préparée sous la forme d'une émulsion eau dans huile (E/H) ou huile dans eau (H/E), d'une émulsion multiple comme par exemple, une émulsion eau dans huile dans eau (E/H/E) ou une émulsion huile dans eau dans huile (H/E/H), ou encore sous la forme d'une hydrodispersion ou une lipodispersion, un gel ou un aérosol.

30 Les excipients dermatologiquement compatibles peuvent être tout excipient parmi ceux connus de l'homme de l'art en vue d'obtenir une composition pour l'application topique sous forme de crème, d'une lotion, d'un gel, d'une pommade, d'une émulsion, d'une microémulsion, d'un spray, d'un shampoing etc.

Avantageusement, la composition dermatologique ou cosmétique utilisée selon l'invention comprend 0,1 à 10% d'un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale ou pseudo-céréale à l'exclusion des graines, exprimé en poids par rapport au poids total de la composition. De préférence, ladite composition comprend une quantité  
5 d'extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale selon l'invention comprise entre 0,1 et 5% en poids par rapport au poids total de la composition.

### **Figures**

**Figure 1** : Comparaison des profils des protéines totales de graines et de jeunes pousses d'avoine, révélation au bleu de Coomassie par électrophorèse SDS-  
10 Page (Gel polyacrylamide 12.5%).

**Figure 2** : Western Blot, révélation enzymatique avec anticorps polyclonaux anti-protéines de parties aériennes.

**Figure 3** : Western Blot, révélation enzymatique avec anticorps polyclonaux anti-protéines de graines. Les exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter  
15 la portée.

### **Exemple 1 : préparation d'un extrait de parties aériennes d'avoine avant épiaison par extraction acétonique**

400 kg de parties aériennes d'avoine avant épiaison, séchés sont broyés puis placés dans un réacteur avec 10 volumes du mélange acétone /eau, sous agitation  
20 pendant une heure à température ambiante.

Une séparation solide / liquide permet d'obtenir un premier jus d'extraction. Le marc est extrait une seconde fois avec 10 volumes du mélange acétone / eau pendant une heure à température ambiante, sous agitation. Une séparation solide / liquide permet d'obtenir un second jus d'extraction qui est rassemblé avec le  
25 premier. La solution obtenue est concentrée sur eau à 1,33 volumes / kg puis filtrée. L'extrait ainsi obtenu est séché par micro-onde après ajout d'un support maltodextrine (qsp 25% / extrait natif).

On obtient ainsi 36 kg d'une poudre marron clair titrant à 6% de flavonoïdes (isovitexine-2"-O-arabinopyranoside et isoorientine-2"-O-arabinopyranoside) et  
30 0.6% d'avenacoside B et la teneur en protéine de l'extrait ainsi obtenu est inférieure à 0.3 ppm.

**Exemple 2 : Comparaison biochimique et immunologique d'un extrait de graine de céréale et d'un extrait de parties aériennes de la même céréale avant épiaison.**

5 La démonstration de l'absence de croisement entre des extraits provenant de graines de céréales et des extraits provenant de parties aériennes a été réalisée grâce à des techniques biochimiques (extraction et mise en évidence de protéines) et immunoenzymatique (détection spécifique, grâce à la fabrication d'anticorps, de la présence d'une protéine).

10 La préparation de l'extrait de protéines de graines peut être réalisée comme suit :

Les graines sont broyées et extraites à la soude à pH 8. Après filtration, le filtrat est précipité à l'acide chlorhydrique jusqu'à un pH de 5,4. Après centrifugation, le précipité est repris, solubilisé dans l'eau et dialysé contre l'eau dans un boudin de dialyse de seuil de coupure 6-8kDa à 4°C pendant une nuit.

La préparation de l'extrait de parties aériennes peut être réalisée comme suit :

A partir de matériel frais :

- Extraction par solubilisation dans un tampon Tris, HCl pH8.0, filtration suivie de deux précipitations consécutives à l'acétone afin d'éliminer les sels

OU :

- Extraction par solubilisation dans un tampon de Laemmli pH 7.5 réducteur renfermant urée et thiourée , filtration suivie de deux précipitations consécutives à l'acétone afin d'éliminer les sels

25 A partir de matériel sec :

Extraction pendant 27 heures par solubilisation dans un tampon de Laemmli pH7.5 réducteur renfermant urée et thiourée, filtration suivie de deux précipitations consécutives à l'acétone afin d'éliminer les sels

Etude biochimique et immunologique

30 **Techniques biochimiques**

**I. Electrophorèse**

**Principe** : La technique permettant de mettre en évidence spécifiquement les protéines est l'électrophorèse SDS-Page : en présence de SDS les protéines chargées négativement migrent dans un gel de polyacrylamide vers la cathode en fonction de leur masse uniquement, et les protéines sont détectées par des révélateurs colorés tels que le bleu de Coomassie ou le nitrate d'argent.

Les témoins positifs utilisés correspondent à un extrait de protéines totales de parties aériennes d'avoine avant épiaison ainsi qu'à un extrait de protéines totales de graines préparés comme indiqué précédemment.

## II. Exemple de résultat – figure 1

10 Comparaison des profils des protéines totales de graines et de parties aériennes d'avoine avant épiaison par électrophorèse SDS-Page (gel polyacrylamide 12.5%) révélé au bleu de Coomassie.

Le profil électrophorétique présenté sur la figure 1 fait clairement apparaître une différence significative de la composition protéique des deux extraits analysés, et principalement pour les protéines majoritaires. Mais la seule façon d'avoir la certitude d'une différence qualitative entre ces deux lots de protéines est de recourir à des techniques immunologiques, avec une reconnaissance antigène / anticorps spécifique.

### Techniques immunochimiques

20 Ces techniques nécessitent au préalable l'obtention d'anticorps dirigés contre les protéines totales de parties aériennes ou de graines. Pour cela, les extraits de protéines totales des parties aériennes et de graines d'une même espèce sont administrés à des lapins. Les anticorps polyclonaux sont ensuite préparés à partir des sérums des animaux.

25 L'objectif est de démontrer que les protéines de parties aériennes d'avoine avant épiaison sont différentes de celles des graines, et qu'il n'y a pas de réaction croisée entre les protéines de graines et de parties aériennes.

- Anticorps dirigés contre les protéines de parties aériennes d'avoine avant épiaison versus les protéines de graines d'avoine
- 30 – Anticorps dirigés contre les protéines de graines d'avoine versus les protéines des parties aériennes d'avoine avant épiaison

à l'aide de techniques ELISA et Western Blot

### **I. ELISA Direct**

L'ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immunochimique permettant de détecter la présence d'un antigène dans une solution.

- 5 Le principe consiste à fixer les protéines de la solution à analyser dans un puits puis à mettre en contact les anticorps polyclonaux anti-protéines. Ensuite, un second anticorps anti-IgG de lapin couplé à une enzyme permettra, après lavage, de révéler la présence d'antigène dans le puits par une simple réaction colorimétrique.

### **II. Western Blot**

- 10 **Principe** : La technique de Western Blot consiste en une électrophorèse SDS-Page d'un mélange de protéines suivi d'une révélation par une interaction antigène-anticorps spécifique. Seules les protéines reconnues par les anticorps polyclonaux seront révélées : Les anticorps primaires sont ensuite reconnus par un anticorps secondaire (ici un anticorps anti-IgG de lapin) couplé à une enzyme telle que la
- 15 phosphatase alcaline.

### **Exemple de résultat – figures 2 et 3**

- Croisement entre les protéines de graines et les anticorps dirigés contre les protéines de parties aériennes d'avoine avant épiaison (figure 2) et croisement entre les protéines de parties aériennes d'avoine avant épiaison et les anticorps dirigés
- 20 contre les protéines de graines (figure 3).

La technique de Western Blot confirme les premiers résultats obtenus par ELISA, à savoir que les protéines de parties aériennes d'avoine avant épiaison sont différentes des protéines de graines, mais également qu'il n'y a pas de croisement entre les deux.

- 25 Un patient immunisé contre les protéines de graines d'avoine par l'alimentation ne réagira donc pas à un extrait de partie aérienne (à l'exclusion des graines), même s'il contient des protéines.

### Revendications

1. Extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale ou de pseudo-céréale, à l'exclusion des graines, pour utilisation chez les personnes allergiques aux protéines  
5 de graines de céréales.
2. Extrait selon la revendication 1, la ou les partie(s) aérienne(s) étant récoltée(s) avant épiaison.
- 10 3. Extrait selon l'une quelconque des revendications précédentes, la céréale étant le blé, le riz, l'orge ou l'avoine.
4. Extrait selon la revendication 3, la céréale étant l'avoine.
- 15 5. Extrait selon la revendication 4, comprenant 2 à 15% de flavonoïdes et 0,2 à 2% d'avenacosides A et B.
- 20 6. Extrait selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en une proportion de 5 à 10% des flavonoïdes isovitexin-2''-O-arabinopyranoside et isoorientin-2''-O-arabinopyranoside.
7. Extrait selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, comprenant moins de 1 ppm de protéines.
- 25 8. Extrait selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, la pseudo-céréale étant le sarrasin, le quinoa ou le sésame.
- 30 9. Utilisation d'une composition cosmétique hypoallergénique comprenant un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale ou de pseudo-céréale, à l'exclusion des graines, chez les personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.



10. Utilisation d'un extrait de partie(s) aérienne(s) de céréale ou de pseudo-céréale, à l'exclusion des graines, pour la préparation d'une composition dermatologique hypoallergénique minimisant et/ou prévenant les risques de réactions allergiques chez des personnes allergiques aux protéines de graines de céréales.

5

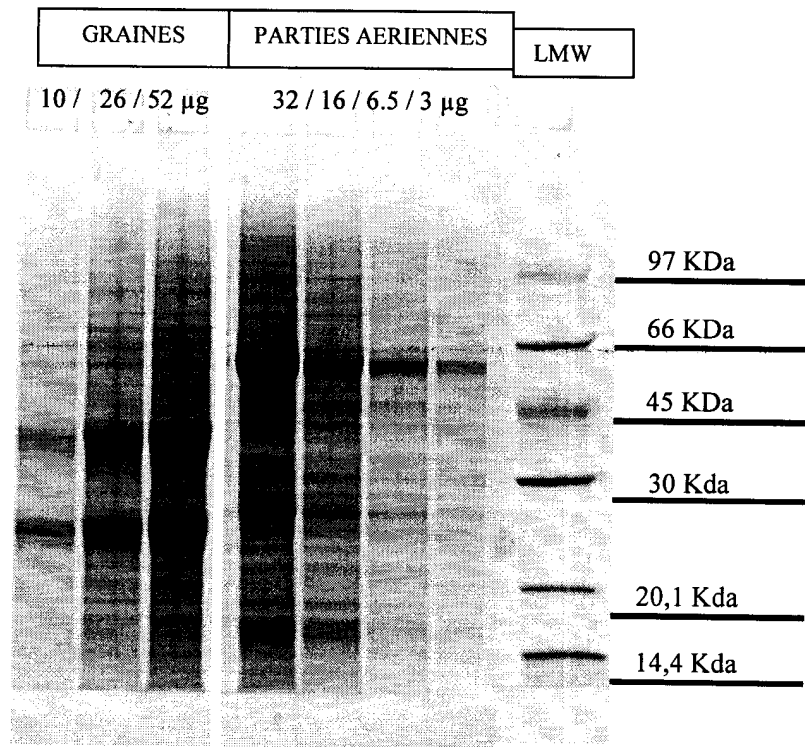


Fig. 1

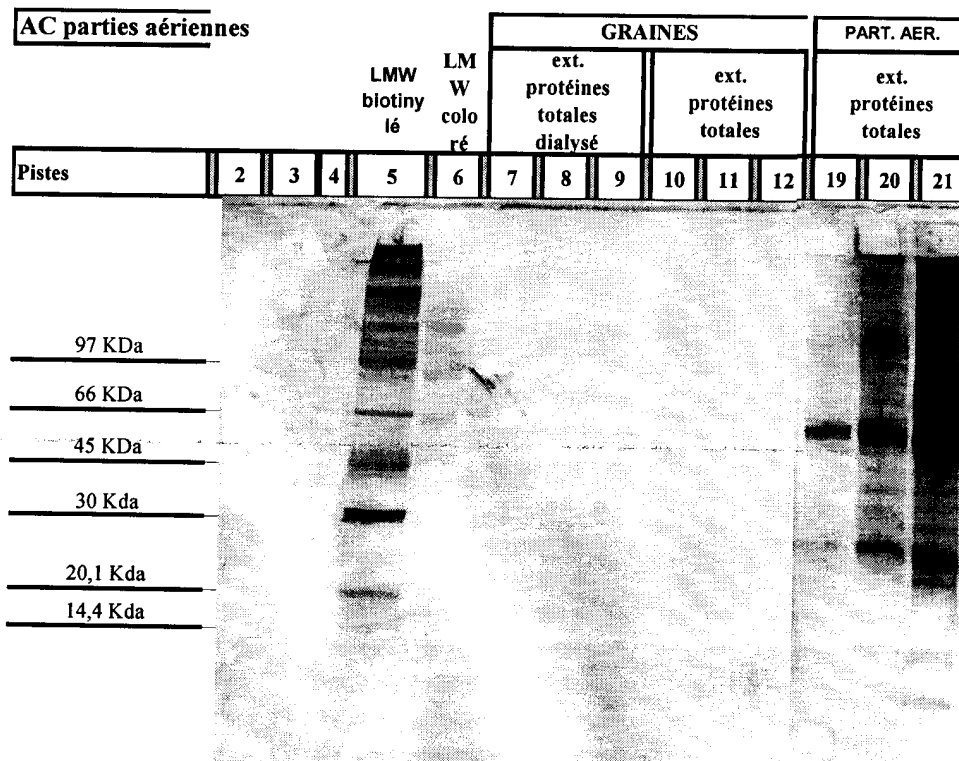


Fig. 2

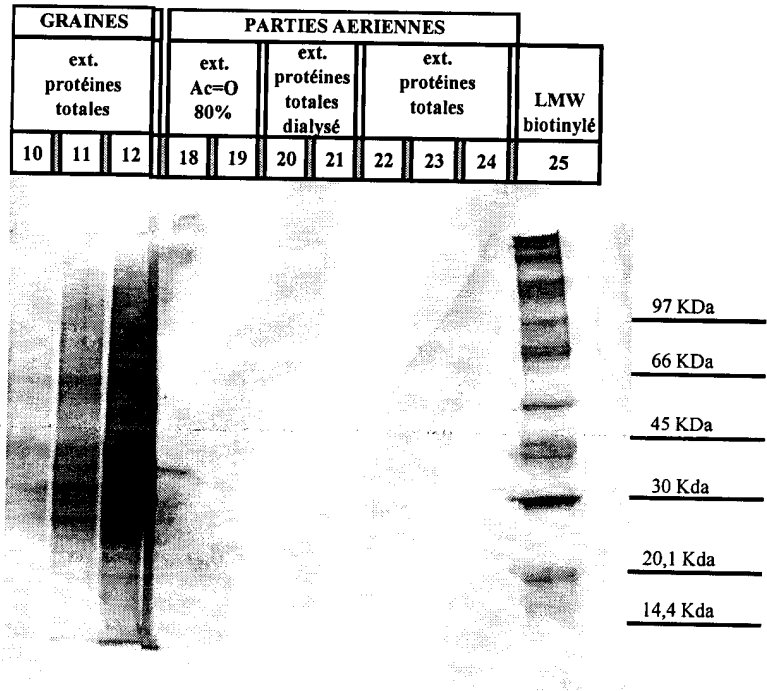


Fig. 3