

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :

2 944 527

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national :

09 01823

⑤1 Int Cl⁸ : **C 07 K 4/00** (2006.01), C 07 K 5/083, 5/09, 5/11, 7/06,
A 61 K 38/03, 38/06, 38/07, 38/08, 8/64, A 61 P 17/00, A 61 Q
17/00, 19/08

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.04.09.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 22.10.10 Bulletin 10/42.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *ISP INVESTMENTS INC. — US.*

⑦2 Inventeur(s) : *DAL FARRA CLAUDE, DOMLOGE
NOUHA et BOTTO JEAN MARIE.*

⑦3 Titulaire(s) : *ISP INVESTMENTS INC..*

⑦4 Mandataire(s) : *SOCIETE D'EXTRACTION DES
PRINCIPES ACTIFS ISP VINCIENCE.*

⑤4 COMPOSITION COSMETIQUE ET/OU PHARMACEUTIQUE COMPRENANT UN HYDROLYSAT PEPTIDIQUE
CAPABLE DE RENFORCER LA FONCTION BARRIERE.

⑤7 L'invention concerne un hydrolysat peptidique enrichi
en peptide bioactif, capable de renforcer la fonction barrière
cutanée et de stimuler la différenciation épidermique. L'in-
vention est également relative à une composition cosméti-
que et/ou pharmaceutique comprenant, dans un milieu
physiologiquement acceptable, ledit hydrolysat en tant que
principe actif. L'invention concerne encore l'utilisation, dans
une composition cosmétique, du principe actif selon l'inven-
tion pour activer la HMG-CoA réductase dans les cellules
cutanées, et pour prévenir et lutter contre les signes cuta-
nés du vieillissement et du photo-vieillissement.

FR 2 944 527 - A1



La présente invention se situe dans le domaine cosmétique et pharmaceutique, et plus particulièrement dans le domaine de la dermatologie. L'invention concerne un hydrolysât peptidique enrichi en peptide bioactif, capable de renforcer la fonction barrière cutanée et de stimuler la différenciation épidermique. Le peptide bioactif est caractérisé en ce qu'il comprend de 3 à 5 acides aminés dont au moins un résidu glycine et un résidu lysine. De préférence, le principe actif provient de l'hydrolyse de protéines de plantes choisies parmi l'épeautre, la pomme de terre, le maïs, le pois, le soja, ou de protéines de levures du genre *Saccharomyces*. L'invention est également relative à une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, un hydrolysât peptidique enrichi en peptide bioactif en tant que principe actif capable de renforcer la fonction barrière de l'épiderme. L'invention est également relative à une composition pharmaceutique comprenant ce nouveau principe actif à titre de médicament. L'invention concerne enfin l'utilisation dudit hydrolysât peptidique, en tant que principe actif pour activer la HMG-CoA réductase. L'invention concerne encore l'utilisation dudit hydrolysât peptidique, en tant que principe actif pour renforcer la fonction barrière cutanée et stimuler la différenciation épidermique. L'invention porte encore sur un procédé de traitement cosmétique destiné à prévenir et/ou à lutter contre les agressions extérieures et les manifestations du vieillissement cutané.

La fonction première de l'épiderme est de constituer une barrière entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. C'est la couche la plus externe de l'épiderme, le *stratum corneum*, qui assure cette fonction. Il est composé de kératinocytes au stade ultime de leur différenciation, les cornéocytes, scellés les uns aux autres par un épais ciment intercellulaire, à la fois souple et imperméable. On distingue ainsi dans le *stratum corneum* un compartiment cellulaire, constitué des cornéocytes et un compartiment extracellulaire principalement constitué de lipides, organisés en structures multilamellaires.

Le contenu lipidique du *stratum corneum* humain est estimé à 15 % d'ester de cholestérol, 16 % d'acides gras libres saturés à longues chaînes, 32 % de cholestérol, 37 % de céramides, bien que les variations inter-individuelles soient assez importantes (Norlen L. et al. J. Invest. Dermatol. 1999; 112(1) p. 72-77). Ces lipides sont synthétisés par les kératinocytes des couches intermédiaires de l'épiderme, et sécrétés dans des organites spécialisés appelés « corps lamellaires » ou corps de Odland. En particulier,

l'épiderme est un site très actif pour la synthèse du cholestérol. L'étape limitante de cette synthèse, et la plus finement régulée, est la conversion du 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) en mévalonate. Cette étape est catalysée par une enzyme membranaire dénommée HMG-CoA-réductase (E.C. 1.1.1.34). Les données de séquençage du génome humain montrent qu'il existe au moins 2 isoformes de HMG-CoA réductase, codées par un gène unique, localisé sur le chromosome 5 (Luskey et al., J Biol Chem., 1985 260(18), p.10271-7).

Dans la peau, le cholestérol joue un rôle dans la fluidité des membranes et en particulier, il semble assurer la mobilité des chaînes hydrocarbonées dans les bicouches lipidiques (Martini M.C., Pathol. Biol. 2003, (51), p. 267-270). Ainsi, en situation physiologique, le cholestérol est synthétisé à un niveau nécessaire pour maintenir une homéostasie. En revanche, à la suite d'une altération brutale de la barrière cutanée, on observe une augmentation importante et rapide de la synthèse de cholestérol, associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de la HMG-CoA réductase (Menon G.K. et al., J. Lipid, Res., 1985, (26), P. 418-427).

Le rôle clé de l'HMG-CoA réductase en a fait une cible de choix pour moduler l'expression du cholestérol dans l'organisme. On a ainsi développé une classe de composés pharmacologique, dénommés statines destinés à inhiber l'HMG-CoA réductase dans le but d'abaisser le cholestérol circulant. Cet effet inhibiteur des statines se manifeste également dans la peau humaine. En effet, l'administration expérimentale de statines par voie topique perturbe la fonction barrière de la peau (Proksch E. et al., British J. Dermatol., 1993, (128), p. 473-482). Ces résultats confirment l'importance du cholestérol dans la fonction barrière épidermique et le rôle central de l'HMG-CoA réductase dans la modulation de sa synthèse.

Au cours du vieillissement cutané, l'intégrité de la barrière cutanée ainsi que ses capacités de réparation s'altèrent. On observe une déficience globale en lipides, aboutissant à une diminution des multicouches lipidiques du compartiment extracellulaire du *stratum corneum*. Ces changements fonctionnels sont en corrélation avec une susceptibilité accrue des peaux âgées aux agressions extérieures (Ghadially R. et al., J Clin Invest., 1995 (95) (5), p. 2281-90).

Indépendamment du vieillissement intrinsèque ou photo-induit, des altérations de la barrière cutanée peuvent se produire lors d'agressions extérieures.

Dans ce contexte, il est souhaitable de chercher à prévenir l'altération ou à rétablir la fonction barrière de l'épiderme. Dans ce domaine particulier, l'apport direct de substituts lipidiques, tels que les céramides (EP 1272148, US2007576937) ou certains dérivés du cholestérol (FR 2 789 312) a largement été décrit. D'autre part, l'utilisation d'huiles végétales pour activer la synthèse des lipides cutanés a également été décrite (EP 1 707 189). Dans le domaine de la cosmétique, le ciblage moléculaire de l'HMG-CoA réductase a déjà été exploité mais dans le but d'inhiber cette enzyme-clé, par exemple en utilisant des statines, déjà connues pour leurs propriétés inhibitrices de HMGCOA, dans le but d'obtenir un effet antiveillessement, (EP 0738510). Toutefois, à ce jour, aucun document ne décrit ou ne suggère l'objet de l'invention ; c'est-à-dire qu'un hydrolysate peptidique enrichi en peptide bioactif selon l'invention peut avoir des propriétés intéressantes pour renforcer la fonction barrière cutanée et pour stimuler la différenciation épidermique. Il est également possible d'améliorer par cette action certains dysfonctionnements pathologiques liés à la fonction barrière (peaux hypersensibles, irritées, ou réactives, eczéma atopique).

Le premier objet de la présente invention est un hydrolysate peptidique enrichi en peptide bioactif capable de renforcer la fonction barrière de l'épiderme, caractérisé en ce qu'il comprend de 3 à 5 acides aminés dont au moins un résidu glycine et un résidu lysine.

Les inventeurs ont en effet mis en évidence une activité cosmétique et thérapeutique, notamment dermatologique, d'hydrolysats peptidiques contenant certains peptides particuliers, dénommés peptides bioactifs ci-après.

Il ont en particulier mis en évidence que l'hydrolysate peptidique, enrichi en peptide bioactif, lorsqu'il est appliqué sur la peau, renforce la fonction barrière de l'épiderme et stimule la différenciation épidermique. Ces propriétés ont été démontrées par une meilleure protection du tissu cutané vis-à-vis des agressions extérieures et une augmentation de la production de lipides constitutifs de la couche cornée.

On entend par « peptide bioactif » selon l'invention un enchaînement d'au moins quatre acides aminés, liés entre eux par des liaisons peptidiques ou par des liaisons peptidiques modifiées et qui possède une activité *in vivo* ou *in vitro* caractéristique de l'activité du principe actif selon l'invention ».

L'activité biologique caractéristique selon l'invention est définie *in vitro* par la capacité du peptide à activer l'HMG-CoA réductase, soit par l'augmentation de la synthèse protéique de la HMG-CoA réductase (par modulation directe ou indirecte de l'expression génique de la HMG-CoA réductase), soit par l'augmentation de l'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase, soit par d'autres processus biologiques tels que la stabilisation de la protéine HMG-CoA réductase ou encore la stabilisation des transcrits d'ARN messenger.

On entend par peau, l'ensemble des tissus de recouvrement constituant la peau et les muqueuses, y compris les phanères (cheveux, cils, poils, sourcils).

On entend par « hydrolysats peptidiques », un mélange de composés majoritairement représentés par des peptides ou des oligopeptides. Selon l'invention, on utilisera indifféremment les termes « hydrolysats peptidiques » ou « principe actif ».

On entend par « composés de nature peptidique », les fragments de protéines, les peptides et les acides aminés libres présents dans l'hydrolysats peptidique selon l'invention.

On entend par « application topique », le fait d'appliquer ou d'étaler le principe actif selon l'invention, ou une composition le contenant, à la surface de la peau ou d'une muqueuse. On entend par « physiologiquement acceptable », que l'hydrolysats peptidique selon l'invention, ou une composition le contenant, est approprié pour entrer en contact avec la peau ou une muqueuse sans provoquer de réactions de toxicité ou d'intolérance.

Selon une méthode particulièrement avantageuse de réalisation de l'invention, le peptide bioactif contenu dans l'hydrolysats possède une séquence de formule générale (I)



Dans laquelle,

X_1 est la lysine ou l'arginine ou aucun acide aminé,

X_2 est la sérine ou la thréonine,

X_3 est la leucine, l'isoleucine ou aucun acide aminé,

Selon une méthode de réalisation de l'invention tout particulièrement préférée, le peptide bioactif est de séquence :

(SEQ ID n°1) Lys-Gly-Lys-Thr-Ile

(SEQ ID n°2) Arg-Gly-Lys-Ser-Leu

- (SEQ ID n°3) Arg-Lys-Gly-Ser-Ile
(SEQ ID n°4) Arg-Gly-Lys-Thr
(SEQ ID n°5) Arg-Gly-Lys-Ser
(SEQ ID n°6) Gly-Lys-Thr
5 (SEQ ID n°7) Lys-Gly-Ser

Selon un mode de réalisation particulièrement intéressant, le peptide biologiquement actif correspond à la séquence SEQ ID n°5.

- 10 Le principe actif selon l'invention peut être obtenu par extraction de protéines d'origine végétale ou de levure, suivie d'une hydrolyse contrôlée qui libère des composés de nature peptidique, parmi lesquels se trouvent les peptides bioactifs.

- L'utilisation d'hydrolysats peptidiques, et en particulier d'hydrolysats peptidiques de bas poids moléculaires, présente de nombreux avantages en cosmétique. Outre le fait de
15 générer des composés de nature peptidique qui ne préexistaient pas dans le mélange protéique de départ, l'hydrolyse et la purification permettent d'obtenir des mélanges plus stables, plus facilement standardisables et ne provoquant pas de réactions allergiques en dermato-cosmétique.

- Il est également possible d'utiliser certains extraits hydrolysés sans en purifier les
20 composés de nature peptidique correspondant aux peptides bioactifs selon l'invention, mais en s'assurant toutefois de la présence desdits peptides par des moyens analytiques appropriés.

- De très nombreuses protéines trouvées dans les plantes et les levures sont susceptibles de contenir des peptides bioactifs au sein de leur structure. L'hydrolyse ménagée permet
25 de dégager ces composés de nature peptidique particuliers. Il est possible, mais non nécessaire pour réaliser l'invention, d'extraire soit les protéines concernées d'abord et de les hydrolyser ensuite, soit d'effectuer l'hydrolyse d'abord sur un extrait brut et de purifier les composés de nature peptidique ensuite.

- 30 Selon un mode de réalisation préférée, ledit principe actif provient de l'hydrolyse de protéines de plantes choisies parmi l'épeautre, la pomme de terre, le maïs, le pois, le soja, ou de protéines de levures de l'espèce *saccharomyces*. De préférence, les plantes utilisées ne sont pas soumises à une fermentation préalable.

Ainsi, l'invention peut être réalisée en utilisant des graines d'engrain ou petit épeautre (*Triticum monococcum*), qui est un blé diploïde très ancien contenant un taux particulièrement élevé en protéines (Vallega 1992).

5 L'invention peut également être réalisée en utilisant des tubercules de pomme de terre du genre *Solanum* et plus particulièrement de l'espèce *Solanum tuberosum*. Le tubercule n'appartient pas à la racine de la plante, mais à sa tige enterrée, dont partent des rameaux plus grêles appelés rhizomes, à l'extrémité desquels se forment les tubercules.

10 L'invention peut également être réalisée en utilisant les graines d'une des nombreuses plantes du genre *Zea* et préférentiellement l'espèce *Zea mays* L. Selon l'invention le matériel végétal utilisé sera le grain et préférentiellement le grain débarrassé de son enveloppe par une étape de décortilage.

15 L'invention peut également être réalisée en utilisant l'une des nombreuses plantes de la famille des pois (Fabacées). Selon l'invention on utilise les plantes de l'espèce des pois *Pisum sativum* L. Le terme pois désigne aussi la graine, elle-même riche en protéines (25 %). L'invention peut également être réalisée en utilisant les graines de Fabacées, du genre *Glycine* (le soja) ou le tourteau de soja, et préférentiellement l'espèce *Glycine Max.* L. Selon l'invention, le matériel végétal utilisé sera le grain et préférentiellement le grain débarrassé de son enveloppe par une étape de décortilage.

20 L'invention peut également être réalisée en utilisant des levures du genre *Saccharomyces* ; et d'une manière préférentielle de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Toute méthode d'extraction ou de purification connue de l'homme du métier peut être utilisée afin de préparer l'hydrolysate selon l'invention.

25 Dans une première étape, les graines, ou une partie spécifique de la plante (feuilles, tubercules, racines, etc.) sont broyées à l'aide d'un broyeur à plantes. La poudre ainsi obtenue peut ultérieurement être "délipidée" à l'aide d'un solvant organique classique (comme par exemple un alcool, l'hexane ou de l'acétone).

30 Lorsqu'il s'agit de levures, dans une première étape, celles-ci sont mises en culture de manière classique dans un milieu adapté à leur développement, de préférence en présence de lactose. Elles sont récoltées par centrifugation puis mises en suspension dans une solution tampon, préférentiellement un tampon phosphate. Dans une seconde étape, ces cellules sont éclatées à l'aide d'une presse de French ou à l'aide d'un broyeur à bille, la majorité des composants membranaires insolubles étant écartés par centrifugation ou par filtration.

On réalise ensuite l'extraction des protéines suivant le procédé classique (Osborne, 1924) modifié ; le broyat de plante ou le lysat de levures est mis en suspension dans une solution alcaline contenant un produit adsorbant de type polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) insoluble (0,01 -20 %) ; en effet il a été observé que les opérations d'hydrolyses et de purifications ultérieures étaient facilitées par ce moyen. En particulier, la concentration en substances de type phénoliques, interagissant avec les protéines, se trouve nettement réduite.

La fraction soluble, contenant les protéines, les glucides et éventuellement des lipides, est recueillie après des étapes de centrifugation et de filtration. Cette solution brute est ensuite hydrolysée dans des conditions ménagées pour générer des peptides solubles. L'hydrolyse se définit comme étant une réaction chimique impliquant le clivage d'une molécule par de l'eau, cette réaction pouvant se faire en milieu neutre, acide ou basique. Selon l'invention, l'hydrolyse est réalisée par voie chimique et/ou de façon avantageuse par des enzymes protéolytiques. On peut alors citer l'utilisation des endoprotéases d'origine végétale (papaïne, bromelaïne, ficine) et de micro-organismes (*Aspergillus*, *Rhizopus*, *Bacillus*, etc.). Les conditions d'hydrolyses sont choisies pour favoriser l'enrichissement en peptide bioactif.

Pour les mêmes raisons que précédemment, c'est-à-dire l'élimination des substances polyphénoliques, une quantité de polyvinylpolypyrrolidone est additionnée au milieu réactionnel lors de cette étape d'hydrolyse ménagée. Après filtration, permettant d'éliminer les enzymes et les polymères, le filtrat (solution) obtenu constitue une première forme du principe actif selon l'invention.

L'hydrolysate obtenu à ce stade peut être encore purifié afin de sélectionner les fractions de bas poids moléculaires, préférentiellement inférieures à 6 kDa, et les peptides générés selon leur nature. Le fractionnement peut s'effectuer avantageusement par des étapes d'ultrafiltrations successives à travers des filtres de porosité décroissante, en conservant les filtrats à chaque étape et/ ou par une méthode de type chromatographique, afin d'enrichir spécifiquement l'hydrolysate en peptide bioactif.

On procède à une phase de dilution dans de l'eau ou dans tout mélange contenant de l'eau, puis stérilisée par ultrafiltration afin d'obtenir un hydrolysate peptidique caractérisé par une teneur en protéines de 0,5 à 5,5 g/l. Cet hydrolysate peptidique correspond à la forme la plus purifiée du principe actif selon l'invention.

L'hydrolysate peptidique obtenu selon l'invention est analysé qualitativement et quantitativement en chromatographie liquide haute pression (CLHP), permettant d'analyser les protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon un gradient de solvants approprié). Les différentes fractions peptidiques qui ont pu être isolées sont
5 ensuite analysées pour leur efficacité biologique. Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

L'hydrolysate obtenu est composé de peptides de poids moléculaire inférieur à 6 kDa
10 préférentiellement inférieure à 6 kDa, et enrichi en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant au moins un résidu glycine et un résidu lysine.

Le deuxième objet de la présente invention est une composition comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, en tant que principe actif capable de renforcer la
15 fonction barrière de l'épiderme, l'hydrolysate peptidique enrichi en peptide bioactif selon l'invention.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le principe actif selon l'invention est présent dans les compositions de l'invention à une concentration comprise entre 0,0001 % et 20 % environ, et préférentiellement à une concentration comprise entre
20 0,05 % et 5 % environ par rapport au poids total de la composition finale.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, le principe actif selon l'invention est solubilisé dans un ou plusieurs solvants physiologiquement acceptables, classiquement utilisés par l'homme du métier, comme l'eau, le glycérol, l'éthanol, le propylène glycol, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou
25 propoxylés, les polyols cycliques, la vaseline, une huile végétale ou tout mélange de ces solvants.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, le principe actif selon l'invention est préalablement solubilisé dans un vecteur cosmétique ou pharmaceutique comme les liposomes ou adsorbé sur des polymères organiques
30 poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites, et plus généralement solubilisé dans, ou fixé sur, tout vecteur physiologiquement acceptable.

La composition utilisable selon l'invention peut en particulier consister en une composition pour soins capillaires, et notamment un shampoing, un après-shampoing,

une lotion traitante, une crème ou un gel coiffant, une lotion restructurante pour les cheveux, un masque, etc. La composition peut également se présenter sous forme de teinture ou de mascara à appliquer au pinceau ou au peigne, en particulier sur les cils, les sourcils ou les cheveux.

- 5 La composition utilisable selon l'invention pourra être appliquée par toute voie appropriée, notamment orale, parentérale ou topique, et la formulation des compositions sera adaptée par l'homme du métier, en particulier pour des compositions cosmétiques ou dermatologiques. Avantageusement, les compositions selon l'invention sont destinées à une administration par voie topique. Ces compositions doivent donc contenir un milieu
- 10 physiologiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau et les phanères, et couvrent toutes les formes cosmétiques ou dermatologiques.

Il est bien entendu que le principe actif selon l'invention peut être utilisé seul ou bien en association avec d'autres principes actifs.

- Avantageusement, les compositions utilisables selon l'invention contiennent, en outre,
- 15 divers principes actifs protecteurs ou anti-âge, destinés à favoriser et à compléter l'action dudit principe actif. On peut citer, de manière non limitative, les ingrédients suivants : des agents cicatrisants, anti-âge, antirides, apaisants, anti-radicalaires, anti-UV, des agents stimulant la synthèse de macromolécules dermiques ou le métabolisme énergétique, des agents hydratants, antibactériens, antifongiques, anti-
- 20 inflammatoires, anesthésiques, des agents modulant la différenciation, la pigmentation ou la dépigmentation cutanée, des agents stimulant la pousse des ongles ou des cheveux. Préférentiellement, on utilisera un agent présentant une activité antiride, tel qu'un agent anti-radicalaire ou antioxydant, ou un agent stimulant la synthèse de macromolécules dermiques, agent stimulant le métabolisme énergétique, inhibiteur de métalloprotéinase.

- 25 Par exemple, il peut être ajouté d'autres principes actifs ayant une action anti-radicalaire ou antioxydante, choisis parmi la vitamine C, la vitamine E, le coenzyme Q10 et les extraits polyphénoliques de plantes, les rétinoïdes.

- La composition selon l'invention peut encore associer au principe actif selon l'invention, d'autres principes actifs stimulant les synthèses des macromolécules dermiques (laminine, fibronectine, collagène), par exemple le peptide de collagène
- 30 commercialisé sous le nom « Collaxyl® » par la société Vincience.

La composition selon l'invention peut également associer au principe actif selon l'invention, d'autres principes actifs stimulant le métabolisme énergétique, comme le principe actif commercialisé sous la dénomination « GP4G[®] » par la société Vincience.

Il est bien évident que l'invention s'adresse aux mammifères en général, et plus particulièrement aux êtres humains.

Ces compositions pourront notamment se présenter sous forme d'une solution aqueuse, hydroalcoolique ou huileuse ; d'une émulsion huile-dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples ; elles peuvent aussi se présenter sous forme de crèmes, de suspensions, ou encore de poudres, adaptées à une application sur la peau, les muqueuses, les lèvres et/ou les phanères. Ces compositions peuvent être plus ou moins fluides et avoir l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un sérum, d'une pommade, d'un gel, d'une pâte ou d'une mousse. Elles peuvent aussi se présenter sous forme solide, comme un stick ou être appliquées sur la peau sous forme d'aérosol. Elles peuvent être utilisées comme produit de soin et/ou comme produit de maquillage de la peau.

L'ensemble de ces compositions comprennent, en outre, tout additif communément utilisé dans le domaine d'application envisagé ainsi que les adjuvants nécessaires à leur formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des anti-oxydants, des colorants, des filtres solaires, des agents auto-bronzants, des pigments, des charges, des conservateurs, des parfums, des absorbeurs d'odeur, d'autres principes actifs cosmétiques, des huiles essentielles, des vitamines, des acides gras essentiels, des tensioactifs, des polymères filmogènes, etc.

Dans tous les cas, l'homme de métier veillera à ce que ces adjuvants ainsi que leurs proportions soient choisis de telle manière à ne pas nuire aux propriétés avantageuses recherchées de la composition selon l'invention. Ces adjuvants peuvent, par exemple, correspondre à une concentration allant de 0,01 à 20 % du poids total de la composition. Lorsque la composition de l'invention est une émulsion, la phase grasse peut représenter de 5 à 80 % en poids et de préférence de 5 à 50 % en poids par rapport au poids total de la composition. Les émulsionnants et co-émulsionnants utilisés dans la composition seront choisis parmi ceux classiquement utilisés dans le domaine considéré. Par exemple, ils peuvent être utilisés en une proportion allant de 0,3 à 30 % en poids, par rapport au poids total de la composition.

L'invention a pour troisième objet une composition pharmaceutique comprenant une quantité efficace d'hydrolysate peptidique selon l'invention, à titre de médicament. Par exemple la composition pharmaceutique pourra être destinée à prévenir ou traiter les pathologies caractérisées par une altération de la fonction barrière, telles que les peaux hypersensibles, irritées, ou réactives et l'eczéma atopique.

Selon cette forme de l'invention, les compositions seront appropriées à une administration orale pour un usage pharmaceutique. Ainsi les compositions pourront notamment se présenter sous forme de comprimés, capsules, gélules, pâtes à mâcher, poudres à consommer telles quelles ou à mélanger extemporanément avec un liquide, sirop, gels, et toute autre forme connue de l'homme du métier. Ces compositions comprennent, en outre, tout additif communément utilisé dans le domaine d'application envisagé ainsi que les adjuvants nécessaires à leur formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des antioxydants, des conservateurs, d'autres principes actifs pharmaceutiques, des huiles essentielles, des vitamines, des acides gras essentiels, etc.

15

L'invention a pour quatrième objet l'utilisation, dans une composition cosmétique, d'une quantité efficace d'hydrolysate peptidique, en tant que principe actif activateur de la HMG-CoA réductase humaine.

La quantité efficace de principe actif correspond à la quantité nécessaire pour obtenir le résultat recherché, à savoir, activer la HMG-CoA réductase, dans le but d'améliorer la fonction barrière de l'épiderme et de stimuler la différenciation épidermique.

On entend par « renforcer la fonction barrière cutanée et stimuler la différenciation épidermique », l'amélioration de la capacité de protection de la couche cornée et l'augmentation de l'expression de marqueurs biologiques de différenciations, tels que les kératines.

25

Ainsi, ledit principe actif, grâce à ses propriétés particulières, pourra être utilisé dans une composition cosmétique destinée à renforcer la fonction barrière cutanée et à stimuler la différenciation épidermique.

D'autre part, l'hydrolysate peptidique pourra être utilisé avantageusement, en tant que principe actif, dans une composition cosmétique destinée à lutter de manière préventive et/ou curative contre les signes du vieillissement cutané, et plus particulièrement du vieillissement cutané photo-induit (photo-vieillessement). Par signes cutanés du vieillissement ou du photo-vieillessement, on entend toutes modifications de l'aspect

30

extérieur de la peau et des phanères dues au vieillissement comme, par exemple, les rugosités superficielles de la couche cornée, les rides et ridules, mais également toute modification interne de la peau qui ne se traduit pas systématiquement par un aspect extérieur modifié comme, par exemple, l'amincissement de l'épiderme ou toute autre
5 dégradation interne de la peau consécutive à une exposition aux rayonnements ultraviolets (UV).

Selon un autre aspect de l'invention, l'hydrolysate peptidique pourra être utilisé avantageusement, en tant que principe actif, dans une composition cosmétique destinée à protéger la peau contre tous types d'agressions extérieures.

10 On entend par l'expression « agression extérieure », les agressions que peut produire l'environnement. A titre d'exemple, on peut citer des agressions telles que la pollution, les UV, ou encore les produits à caractère irritant tels que les tensioactifs, les conservateurs ou les parfums, les agressions mécaniques, telles que les abrasions, le rasage ou l'épilation. Par pollution, on entend aussi bien la pollution « extérieure » due
15 par exemple aux particules de diesel, à l'ozone ou aux métaux lourds, que la pollution « intérieure » qui peut être due notamment aux émissions de solvants de peintures, de colles, ou de papier-peints (tels que toluène, styrène, xylène ou benzaldéhyde), ou bien encore la fumée de cigarette. La sécheresse de l'atmosphère est également une cause importante d'agression cutanée. Ces agressions extérieures aboutissent à une altération de
20 la fonction barrière qui se traduit par un inconfort cutané, des phénomènes sensoriels désagréables, tels que des tiraillements ou des démangeaisons, voire des fragilités excessives et des rougeurs.

En particulier, l'invention a pour objet l'utilisation de l'hydrolysate selon l'invention dans une composition cosmétique destinée à prévenir ou traiter les dommages causés à la
25 peau par des agressions extérieures de la peau, choisies parmi les traitements mécaniques tels que le rasage ou l'épilation, les lessivages trop intenses par les détergents, les conditions climatiques extrêmes ou les variations brutales de température et d'hygrométrie.

30 L'invention a pour cinquième objet un procédé de traitement cosmétique destiné à prévenir et/ou à lutter contre les signes cutanés du vieillissement et/ou du photo-vieillissement, selon lequel on applique une composition comprenant une quantité efficace d'hydrolysate peptidique selon l'invention sur les zones à traiter.

Des modes de réalisation particuliers de ce procédé de traitement cosmétique résultent également de la description précédente. D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples donnés à titre illustratif et non limitatif.

Liste des figures

Figure 1 : Exemple de chromatogramme obtenu par CLHP, avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif dans un hydrolysats d'épeautre

10 Figure 2 : Exemple de chromatogramme obtenu par CLHP, avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif dans un hydrolysats de pomme de terre

Figure 3 : Exemple de chromatogramme obtenu par CLHP, avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif dans un hydrolysats de maïs

Exemple 1 : Préparation d'un hydrolysats peptidique à partir d'épeautre (*Triticum monococcum*)

Les grains d'épeautre (*Triticum monococcum*) sont mis en solution dans 10 volumes d'eau en présence de 2 % de POLYCLAR® 10 (polyvinylpyrrolidone – PVPP - insoluble). Le mélange est ajusté à un pH compris entre 6 et 8 avec une solution aqueuse de soude 1 M.

20 Après ajustement du pH, une amylase (hasidase®) et une protéase (papaïne à 2 %) sont ajoutées dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est obtenue après 2 heures d'agitation à 50°C. On procède ensuite à l'inactivation de l'enzyme par chauffage de la solution à 80°C pendant 2 heures. Après centrifugation, la solution aqueuse surnageante correspondant à un hydrolysats brut d'épeautre est récupérée. Les conditions d'hydrolyse
25 ont été choisies de façon à permettre un enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

Le procédé de purification de l'hydrolysats brut commence par des filtrations successives à l'aide de filtres-plaques Seitz-Orion de porosité décroissante (jusqu'à 0,2 µm) afin d'obtenir une solution brillante et limpide, qualifié d'hydrolysats 1.

30 A cette étape, l'hydrolysats 1 d'épeautre est caractérisé par une couleur jaune clair et par un extrait sec titrant de 20 à 25 g/kg, un taux de protéines de 10 à 12 g/l et un taux de sucres de 5 à 8 g/l.

La nature protéique de l'hydrolysats 1 est mise en évidence après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris Pre-cast (Invitrogen). L'hydrolysats protéique d'épeautre est chauffé à 70°C pendant 10 minutes dans des conditions réductrices dénaturantes dans un tampon de préparation d'échantillon
5 NuPAGE® LDS. Une solution de NuPAGE® Antioxydant est ajoutée dans la cuve intérieure (cathode) pour éviter que les protéines réduites ne se ré-oxydent durant l'électrophorèse. La migration des protéines est réalisée dans du tampon de migration NuPAGE® MES avec le standard SeeBlue Plus2 comme marqueur de poids moléculaire. La coloration des protéines est effectuée à l'aide de Bleu de Coomassie® R-250. Dans ces
10 conditions, on observe une bande à 24 kDa, correspondant à l'enzyme, puis des protéines inférieures à 6 kDa.

L'hydrolysats 1 est ensuite purifié par ultrafiltration à l'aide de la cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa afin d'éliminer toutes traces d'enzymes. En fin de purification, on obtient un hydrolysats peptidique jaune-orangé, brillant et limpide. On procède à une phase de
15 dilution afin d'obtenir un hydrolysats peptidique caractérisé par une teneur en protéines de 1,5 à 3,5 g/l. Cet hydrolysats peptidique correspond au principe actif selon l'invention. Cet hydrolysats peptidique est alors analysé en chromatographie liquide haute pression (HPLC) à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'hydrolysats est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm),
20 permettant de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0.2 à 25 kDa dans les conditions suivantes :

Un gradient acétonitrile

- Colonne Uptisphere OPB 125 x 3 mm
- Solvant A: eau grade HPLC contenant 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA)
- 25 - Solvant B: acétonitrile
- Gradient: 100% à 15% solvant A en 35 min

Dans ces conditions chromatographiques, plusieurs fractions peptidiques ont pu être isolées. Un exemple de chromatogramme obtenu par CLHP (chromatographie en phase liquide à haute pression), avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif
30 est donné à la figure 1.

Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a également été

réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et
5 identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate).

Un exemple de composition en acides aminés de l'hydrolysate est donné dans le tableau suivant (en %) :

Acides aminés	%
Alanine	3,1
Acide Aspartique	4,7
Arginine	3,1
Acide Glutamique	32,8
Glycine	3,1
Histidine	< 3,0
Isoleucine	< 5,5
Leucine	6,2
Lysine	< 2,2
Phénylalanine	4,5
Proline	10,9
Serine	4,7
Thréonine	3,1
Tyrosine	< 3,6
valine	4,7
Tryptophane	< 1,5

Exemple 2 : Préparation d'un hydrolysate peptidique à partir de tubercules appartenant à l'espèce *Solanum tuberosum*
10

Les tubercules de pomme de terre (*Solanum tuberosum*) sont mis en solution dans 10 volumes d'eau en présence de 2 % de POLYCLAR® 10 (polyvinylpyrrolidone – PVPP - insoluble). Le mélange est ajusté à un pH compris entre 6 et 8 avec une solution aqueuse de soude 1 M. Une précipitation en milieu acide est ensuite réalisée. Le culot est remis en
15 solution et après ajustement du pH, de la papaine à 2 % est ajoutée dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est obtenue après 2 heures d'agitation à 55°C. On procède ensuite à l'inactivation de l'enzyme par chauffage de la solution à 80°C pendant 2 heures. Après centrifugation, la solution aqueuse surnageante correspondant à un hydrolysate brut de pomme de terre est récupérée. Les conditions d'hydrolyse ont été choisies de façon à
20 permettre un enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés contenant comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

Le procédé de purification de l'hydrolysate brut commence par des filtrations successives à l'aide de filtres-plaques Seitz-Orion de porosité décroissante (jusqu'à 0,2 μm) afin d'obtenir une solution jaune brillante et limpide, qualifié d'hydrolysate 1.

5 A cette étape, l'hydrolysate 1 de pomme de terre est caractérisé par un extrait sec titrant de 40 à 60 g/kg, un taux de protéines de 20 à 25 g/l et un taux de sucres de 1 à 3 g/l.

La nature protéique de l'hydrolysate 1 est mise en évidence après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris Pre-cast (Invitrogen). L'hydrolysate protéique de pomme de terre est chauffé à 70°C pendant 10 minutes dans des conditions réductrices dénaturantes dans un tampon de préparation d'échantillon
10 NuPAGE® LDS. Une solution de NuPAGE® Antioxydant est ajoutée dans la cuve intérieure (cathode) pour éviter que les protéines réduites ne se ré-oxydent durant l'électrophorèse. La migration des protéines est réalisée dans du tampon de migration NuPAGE® MES avec le standard SeeBlue Plus2 comme marqueur de poids moléculaire. La coloration des protéines est effectuée à l'aide de Bleu de Coomassie® R-250. Dans ces
15 conditions, on observe que les protéines obtenues ont un poids moléculaire inférieur à 6 kDa.

L'hydrolysate 1 est ensuite purifié afin de ne conserver que les peptides de poids moléculaire inférieur à 5 kDa, à l'aide d'une filtration à flux tangentiel. Pour cela, l'hydrolysate 1 est pompé sous pression à travers un support Pellicon® équipé de cassette
20 Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. En fin de purification, on obtient un hydrolysate peptidique brillant et limpide. On procède ensuite à une phase de dilution afin d'obtenir un hydrolysate peptidique caractérisé par une teneur en protéines de 3,5 à 5,5 g/l. Cet hydrolysate peptidique correspond au principe actif selon l'invention.

Cet hydrolysate peptidique est alors analysé en chromatographie liquide haute pression
25 (HPLC) à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'hydrolysate est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), permettant de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon des conditions identiques à l'exemple 1). Dans ces conditions chromatographiques, plusieurs fractions peptidiques ont pu être isolées.

30 Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

Un exemple de chromatogramme obtenu par CLHP (chromatographie en phase liquide à haute pression), avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif est donné à la figure 2.

La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate).

Un exemple de composition en acides aminés de l'hydrolysats est donné dans le tableau suivant (en %) :

Acides aminés	%
Alanine	7,8
Acide Aspartique	20,1
Arginine	7,3
Acide Glutamique	17,4
Glycine	7,3
Histidine	3,2
Isoleucine	9,1
Leucine	15,1
Lysine	11,4
Phénylalanine	8,7
Proline	7,7
Serine	8,7
Thréonine	9,1
Tyrosine	8,2
valine	10,5
Tryptophane	1,4

10 **Exemple 3 : Préparation d'un hydrolysats peptidique à partir de tourteaux de maïs (*Zea mays L.*)**

Le tourteau de maïs (*Zea mays L.*) est mis en solution dans 10 volumes d'eau en présence de 2 % de POLYCLAR® 10 (polyvinylpyrrolidone – PVPP - insoluble). Le mélange est ajusté à un pH compris entre 6 et 8 avec une solution aqueuse de soude 1 M.

15 Après ajustement du pH, de la papaine à 2 % est ajoutée dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est obtenue après 2 heures d'agitation à 55°C. On procède ensuite à l'inactivation de l'enzyme par chauffage de la solution à 80°C pendant 2 heures. Après centrifugation, la solution aqueuse surnageante correspondant à un hydrolysats brut de maïs est récupérée. Les conditions d'hydrolyse ont été choisies de façon à permettre un
20 enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

Le procédé de purification de l'hydrolysate brut commence par des filtrations successives à l'aide de filtres-plaques Seitz-Orion de porosité décroissante (jusqu'à 0,2 µm) afin d'obtenir une solution jaune, brillante et limpide, qualifié d'hydrolysate 1.

A cette étape, l'hydrolysate 1 de maïs est caractérisé par un extrait sec titrant de 20 à 30 g/kg, un taux de protéines de 20 à 25 g/l et un taux de sucres de 2 à 5 g/l.

La nature protéique de l'hydrolysate 1 est mise en évidence après analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide NuPAGE® Bis-Tris Pre-cast (Invitrogen). L'hydrolysate protéique de maïs est chauffé à 70°C pendant 10 minutes dans des conditions réductrices dénaturantes dans un tampon de préparation d'échantillon NuPAGE® LDS. Une solution de NuPAGE® Antioxydant est ajoutée dans la cuve intérieure (cathode) pour éviter que les protéines réduites ne se ré-oxydent durant l'électrophorèse. La migration des protéines est réalisée dans du tampon de migration NuPAGE® MES avec le standard SeeBlue Plus2 comme marqueur de poids moléculaire. La coloration des protéines est effectuée à l'aide de Bleu de Coomassie® R-250. Dans ces conditions, on observe des protéines de poids moléculaire inférieur à 6 kDa.

L'hydrolysate 1 est ensuite purifié en éliminant les protéines de haut poids moléculaire par ultrafiltration à l'aide de la cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa afin de ne conserver que les composés de nature peptidique inférieurs à 5 kDa.

Après cette purification finale, on procède à une phase de dilution afin d'obtenir un hydrolysate peptidique caractérisé par un taux de protéines compris entre 3,5 et 5,5 g/l. Cet hydrolysate peptidique correspond au principe actif selon l'invention.

Cet hydrolysate peptidique est alors analysé en chromatographie liquide haute pression (CLHP) à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'hydrolysate est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm), permettant de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon un gradient de solvants approprié, identique à l'exemple 1). Dans ces conditions chromatographiques, plusieurs fractions peptidiques ont pu être isolées.

Un exemple de chromatogramme obtenu par CLHP (chromatographie en phase liquide à haute pression), avec mise en évidence du pic correspondant au peptide bioactif est donné à la figure 3

Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a

également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate). Un exemple de composition en acides aminés de l'hydrolysate est donné dans le tableau suivant (%) :

Acides aminés	%
Alanine	9,4
Acide Aspartique	7,2
Arginine	3,6
Acide Glutamique	23,7
Glycine	3,6
Histidine	2,2
Isoleucine	4,5
Leucine	16,1
Lysine	2,2
Phénylalanine	6,7
Proline	10,3
Serine	6,3
Thréonine	4,0
Tyrosine	5,8
valine	5,4
Tryptophane	< 0,5

Exemple 4 Préparation d'un hydrolysate peptidique à partir de pois (*Pisum sativum* L.)

10 L'hydrolysate peptidique est obtenu à partir d'un extrait de plantes de l'espèce *Pisum sativum* L. Bien entendu l'extrait peut être préparé à partir de plantes d'au moins l'une quelconque des nombreuses variétés et espèces appartenant au genre *Pisum*.

Dans une première étape, 1 kg de pois décortiqués sont délipidés par l'action d'un solvant organique : l'hexane.

15 La farine de pois ainsi obtenue est mise en solution dans 10 volumes d'eau en présence de 2 % de POLYCLAR® 10 (polyvinylpyrrolidone – PVPP - insoluble). Le mélange est ajusté à un pH compris entre 6 et 7 avec une solution aqueuse de soude 1 M.

Après ajustement du pH, il est rajouté 2 % de flavourzym® dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est obtenue après 2 heures d'agitation à 50°C. On procède à l'inactivation de l'enzyme en chauffant la solution à 80°C pendant 2 heures. Le mélange réactionnel ainsi
20 obtenu correspond à l'extrait de pois. Les conditions d'hydrolyse ont été choisies de façon

à permettre un enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

Le procédé de purification commence par des filtrations successives à l'aide de filtres-plaques Seitz-Orion de porosité décroissante (jusqu'à 0,2 μm) afin d'obtenir une solution
5 brillante et limpide. A cette étape, l'hydrolysate de pois est caractérisé par un sec de 70-80 g/kg, un taux de protéines de 55-65 g/l, un taux de sucres de 2-5 g/l et un taux de polyphénol de 1-3 g/l.

La nature protéique de cet hydrolysate est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Pour cette analyse, on utilise les gels NuPAGE® Bis-Tris Pre-cast
10 (Invitrogen). L'hydrolysate peptidique de pois est chauffé à 70°C pendant 10 minutes dans des conditions réductrices dénaturantes dans un tampon de préparation d'échantillon NuPAGE® LDS. Une solution de NuPAGE® Antioxydant est ajoutée dans la cuve intérieure (cathode) pour éviter que les protéines réduites se ré-oxydent durant l'électrophorèse. La migration des protéines est réalisée à l'aide du tampon de migration
15 NuPAGE® MES avec le standard SeeBlue Plus2 comme marqueur de poids moléculaire. La coloration des protéines est effectuée à l'aide de Bleu de Coomassie® R-250. Dans ces conditions, on observe 2 grandes familles de protéines : la 1ère famille correspond à des protéines de poids moléculaire de 25 à 20 kDa et la dernière famille à des protéines de poids moléculaires inférieurs à 5kDa.

20 Cette solution est alors purifiée en éliminant les protéines de poids moléculaires supérieurs à 5 kDa à l'aide de filtration à flux tangentiel.

Pour cela, l'hydrolysate de pois est pompé sous pression à travers un support Pellicon® équipé de cassette Pellicon® 2 Biomax 30 kDa. Ce 1er filtrat est récupéré pour être ensuite filtré à travers une autre cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. En fin de
25 purification, on obtient un hydrolysate peptidique de pois jaune-beige, brillant et limpide. Il est caractérisé par un sec de 50 à 55 g/kg, une teneur en protéines de 50 à 52 g/l.

Cette solution est alors analysée en chromatographie liquide haute pression à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'extrait de pois est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm). Cette
30 colonne permet de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon un gradient de solvants approprié, identique à l'exemple 1). Dans ces conditions chromatographiques, plusieurs fractions peptidiques ont pu être isolées.

Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

- 5 La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate).

Exemple 5 : Préparation d'un hydrolysat peptidique à partir de tourteau de soja

(Glycine Max. L.)

- Le principe actif est obtenu à partir de plantes de l'espèce *Glycine max L.* Bien entendu l'extrait peut être préparé à partir de plantes d'au moins l'une quelconque des nombreuses variétés et espèces appartenant au genre *Glycine*. Les tourteaux sont les résidus solides obtenus après extraction de l'huile des graines de soja. Ils représentent de
15 50 à 75 % de la masse des graines.

- Dans une première étape, 1 kg de tourteau de soja est broyé dans un broyeur à céréales. La farine obtenue est délipidée par l'action d'un solvant organique, l'hexane. Après filtration et séchage sous vide, la poudre obtenue est mise en suspension dans une solution aqueuse alcaline (dilution au 1/10) pH 10, contenant 1 % de
20 polyvinylpolypyrrolidone (Polyclar V ISP). Ce mélange est maintenu sous agitation pendant un temps suffisamment long pour permettre la solubilisation des fractions solubles. La température d'extraction est variable (comprise entre 4 et 80°C) ; préférentiellement l'opération sera réalisée à froid. Après cette phase d'extraction, le milieu est clarifié par centrifugation puis filtré sur filtre à plaque. Ce filtrat qui contient
25 les fractions solubles du soja est ensuite soumis à une précipitation des protéines en faisant varier la force ionique en milieu neutre ou acide, ce qui permet d'éliminer les composants glucidiques solubles, les lipides et les acides nucléiques. Le milieu est amené à pH 3,5. Le surnageant est éliminé et le précipité est ensuite lavé à l'aide d'un solvant tel que, par exemple, l'éthanol ou le méthanol, puis le solvant est évaporé par séchage sous
30 vide.

A ce stade, on obtient environ 50 grammes de poudre de couleur jaune clair d'extrait protéique brut contenant :

- Protéines : 75 %
- Glucides : 20 %
- Lipides : 5 %

Le précipité riche en protéines est remis en solution dans l'eau ou un autre solvant.

5 L'extrait protéique brut est alors soumis à une série d'hydrolyses ménagées et sélectives consistant en des hydrolyses chimiques et enzymatiques en présence de 0,5 % de PVPP (Polyclar V) et d'endopeptidases à cystéine (papaine, ficine). Après réaction l'hydrolysate est filtré sur plaque puis sur cartouche stérilisante (0,2 µm).

On obtient alors un hydrolysate de couleur claire, titrant de 15 à 30 g/l d'extrait sec, qui
10 est alors dilué de telle sorte que la concentration en composés de nature peptidique déterminée, par la méthode de Lowry, soit comprise entre 0,1 et 5g/l et préférentiellement entre 0,5 et 2 g/l. L'analyse physico-chimique de l'hydrolysate peptidique, qui constitue le principe actif, montre que son pH est compris entre 4 et 7, et préférentiellement entre 5 et 6, l'extrait sec titre de 1 à 8 g/l et de manière préférée de 2 à 5 g/l, sa teneur en composés
15 de nature peptidique est comprise entre 0,1 et 5g/l, et préférentiellement, entre 0,5 et 2 g/l et sa teneur en sucres entre 0,5 à 2,5 g/l. Les conditions d'hydrolyse ont été choisies de façon à permettre un enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

On procède ensuite à une ultrafiltration de la solution sur une cartouche de filtration
20 Millipore Helicon (seuil de coupure 1 kDa). Les hauts poids moléculaires contenus dans le retentat sont écartés, le filtrat est conservé.

Cette solution est alors analysée en chromatographie liquide haute pression à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'hydrolysate de soja est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm). Cette
25 colonne permet de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon un gradient de solvants approprié, identique à l'exemple 1). Dans ces conditions chromatographiques, plusieurs fractions peptidiques ont été isolées.

Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a
30 également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif. La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et

identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate).

Une variante du protocole consiste à effectuer une purification du principe actif, obtenu selon le protocole précédent, par chromatographie d'échange d'ions, sur une
5 colonne TSK gel (TosoHaas) avec un tampon phosphate pH 7, afin d'enrichir l'hydrolysate peptidique en peptide bioactif.

Exemple 6 : Préparation d'un hydrolysate peptidique à partir de levures *Saccharomyces cerevisiae*

L'hydrolysate peptidique peut être obtenu à partir d'un extrait de levures de l'espèce
10 *Saccharomyces cerevisiae*. Les levures sont cultivées dans un milieu adapté à leur développement, de préférence en présence de lactose, puis centrifugées pour récupérer une biomasse. La biomasse de *saccharomyces* est mise en solution dans 10 volumes d'eau en présence de 2 % de POLYCLAR® 10 (polyvinylpyrrolidone – PVPP - insoluble) et 0,2 % de charbon actif. Le mélange est ajusté à un pH compris entre 6 et 7,5 avec une
15 solution aqueuse de soude 1 M.

Après ajustement du pH, il est rajouté 2 % de papaïne dans le milieu réactionnel. L'hydrolyse est obtenue après 2 heures d'agitation à 55°C. On procède à l'inactivation de l'enzyme en chauffant la solution à 80°C pendant 2 heures. Après centrifugation, le mélange réactionnel correspondant à l'extrait de *saccharomyces* est alors obtenu. Les
20 conditions d'hydrolyse ont été choisies de façon à permettre un enrichissement en peptide bioactif de 3 à 5 acides aminés comprenant un résidu glycine et un résidu lysine.

Le procédé de purification commence par des filtrations successives à l'aide de filtres-plaques Seitz-Orion de porosité décroissante (jusqu'à 0,2 µm) afin d'obtenir une solution brillante et limpide. A cette étape, l'extrait de *saccharomyces* est caractérisé par un sec de
25 25 à 35 g/kg, un taux de protéines de 10 à 15 g/l et un taux de sucres de 5-10 g/l.

La nature protéique de cet extrait est mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Pour cette analyse, les gels NuPAGE® Bis-Tris Pre-cast (Invitrogen) sont utilisés. L'hydrolysate peptidique est chauffé à 70°C pendant 10 minutes dans des conditions réductrices dénaturantes dans un tampon de préparation d'échantillon
30 NuPAGE® LDS. Une solution de NuPAGE® Antioxydant est ajoutée dans la cuve intérieure (cathode) pour éviter que les protéines réduites se ré-oxydent durant l'électrophorèse. La migration des protéines est réalisée à l'aide du tampon de migration

NuPAGE® MES avec le standard SeeBlue Plus2 comme marqueur de poids moléculaire. La coloration des protéines est effectuée à l'aide de Bleu de Coomassie® R-250. Dans ces conditions, on observe 3 grandes familles de protéines : la 1ère famille correspond à des protéines de poids moléculaire supérieur à 75 kDa, la 2ème famille à des protéines de 20 à 25 kDa et la dernière famille à des protéines de poids moléculaire inférieur à 5kDa.

Cette solution est alors purifiée en éliminant les protéines de poids moléculaire supérieur à 5 kDa à l'aide de filtration à flux tangentiel.

Pour cela, l'hydrolysate peptidique de saccharomyces est pompé sous pression à travers un support Pellicon® équipé de cassette Pellicon® 2 Biomax 50 kDa. Ce 1er filtrat est récupéré pour être ensuite filtré à travers une seconde cassette Pellicon® 2 Biomax 10 kDa. Il est alors récupéré un second filtrat qui est encore élué à travers une dernière cassette Pellicon® 2 Biomax 5 kDa. En fin de purification, on obtient un extrait végétal de saccharomyces beige, brillant et limpide. Il est caractérisé par un sec de 35 à 45 g/kg, une teneur en protéines de 30 à 40 g/l.

Cette solution est alors analysée en chromatographie liquide haute pression à l'aide d'un appareil HP1100 piloté par le logiciel ChemStation. La colonne utilisée lors de l'élution de l'hydrolysate de saccharomyces est une Nucleosil® 300-5 C4 MPN (125 x 4 mm). Cette colonne permet de chromatographier des protéines ayant des poids moléculaires de 0,2 à 25 kDa (selon un gradient de solvants approprié, identique à l'exemple 1) Dans ces conditions chromatographiques, il a été isolé plusieurs fractions peptidiques.

Ces diverses fractions sont ensuite analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier spécifiquement le contenu en acides aminés des peptides de chaque pic. Il a également été réalisé une analyse de séquençage, pour déterminer la séquence peptidique du peptide bioactif.

La détermination de la composition en acides aminés du principe actif selon l'invention a également été réalisée. Celle-ci est réalisée après hydrolyse acide et identification par chromatographie liquide haute pression à l'aide d'une pré-dérivation au PICT (phenylisothiocyanate).

Exemple 7 : Etude ultrastructurale des corps lamellaires dans des kératinocytes humains traités par l'hydrolysate selon l'exemple 1

Le but de cette étude est d'étudier de manière ultrastructurale, en microscopie électronique à transmission, des kératinocytes traités par l'hydrolysate selon l'exemple 1 à 1 %.

Protocole : Des kératinocytes humains normaux en culture sont traités avec une solution à 1 % d'hydrolysate selon l'exemple 1 pendant 48 heures (le milieu en présence de l'actif est changé tous les 24 heures). Les cellules sont lavées au PBS, puis sont fixées par la fixation hypertonique de Karnosky (4 % Paraformaldéhyde, 5 % glutaraldéhyde dans un tampon 0,08M Phosphate) 1 heure à température ambiante puis 24 heures à 4°C. Les cellules sont détachées du support par grattage, centrifugées 5 minutes à 1000 rpm. Le surnageant est éliminé et un tampon de 1M sodium cacodylate est déposé sur le culot. Les cellules sont mélangées à 2 % d'agar puis post-fixées par le tétroxyde d'osmium 1 heure. Les spécimens sont alors déshydratés par passages successifs dans une série d'alcool (de 50 à 100 %). Les cellules sont ensuite enrobées dans une résine. La polymérisation s'effectue pendant environ 12 heures à 60°C. Des coupes semi fines de 0,5 µm sont réalisées à l'ultra-microtome. Les coupes sont déposées sur une lame collée à la chaleur puis colorée au bleu de toluidine. Les lames sont ensuite déshydratées de nouveau et montées dans un milieu adéquat. Après avoir choisi la zone d'étude optimale, le bloc est retaillé à la taille désirée et des coupes ultrafines sont alors réalisées, seules les coupes qui ont une couleur « gris-argent » et une taille adéquate sont montées sur la grille de microscopie électronique doublement marquée par de l'uranyl acétate et du citrate de plomb, et sont examinées au microscope à transmission à 60 ou 80 KV.

Résultats : L'étude ultrastructurale montre que l'appareil de Golgi est sensiblement plus développé que dans les cellules témoins. Cette augmentation est liée à une surproduction des corps lamellaires (ou corps d'Odland) qui est le signe d'une augmentation de la synthèse lipidique.

Conclusions : L'hydrolysate selon l'exemple 1 à 1 % est capable d'induire une augmentation de la synthèse lipidique dans les kératinocytes humains normaux.

Exemple 8 : Etude ultrastructurale des « caveolae » dans des fibroblastes humains traités par l'hydrolysate selon l'exemple 2

Le but de cette étude est d'étudier au niveau ultrastructural les cavéoles dans les fibroblastes dermiques humains.

- 5 Protocole : Des fibroblastes dermiques humains normaux en culture sont traités avec l'hydrolysate selon l'exemple 2 à 1 % pendant 48 heures (le milieu contenant l'actif est changé tous les 24 heures).

- 10 Résultats : l'étude ultrastructurale montre une augmentation importante des cavéoles dans les cellules traitées par l'hydrolysate selon l'exemple 2 à 1 %, en comparaison des cellules témoins non traitées. Ces résultats sont le signe d'un effet positif du principe actif, puisque les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique qui permettent l'externalisation de molécules telles que le cholestérol.

Conclusion : L'hydrolysate selon l'exemple 2 à 1 % provoque l'augmentation des structures membranaires d'externalisation du cholestérol.

15 **Exemple 9 : Etude de la différenciation des kératinocytes humains traités par l'hydrolysate selon l'exemple 2**

- 20 Le but de cette étude est de déterminer l'influence de l'hydrolysate selon l'exemple sur la différenciation épidermique, et plus particulièrement sur l'expression de l'ensemble des cytokératines (ou pankératines), qui sont des marqueurs de la différenciation kératinocytaire.

- 25 Protocole : Des kératinocytes humains normaux en culture sont traités avec l'hydrolysate selon l'exemple 2 à 1 % pendant 48 heures (le milieu en présence de l'actif est changé tous les 24 heures). Les cellules sont ensuite lavées, fixées au méthanol froid pendant 4 minutes à 4°C. Les cellules sont incubées en présence d'un anticorps anti-cyto-
pankératines monoclonal au 1/200^{ème} pendant 1 heure à température ambiante puis
révélées par un second anticorps au 1/50^{ème} pendant 1 heure à température ambiante,
couplées à un marqueur fluorochrome « Alexa 488 ». Après montage dans un milieu *ad hoc*, les lames sont observées au microscope à épifluorescence.

- 30 Résultats : l'hydrolysate selon l'exemple 2 augmente l'expression des pankératines dans les cellules traitées.

Conclusion : l'hydrolysat selon l'exemple 2 à 1 % augmente l'expression des cytokératines dans les kératinocytes humains normaux. En présence de l'hydrolysat selon l'exemple 2, les cellules sont stimulées et en voie de différenciation.

5 **Exemple 10 : Etude de l'effet protecteur de l'hydrolysat selon l'exemple 2 sur les cellules cutanées soumises à des rayonnements ultraviolet (UVB)**

Le but de cette étude est de déterminer l'effet protecteur de l'hydrolysat selon l'exemple 2 vis-à-vis de kératinocytes humains normaux soumis à un stress par des rayonnements UVB. Pour cela, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés par la technique au MTT.

10 Protocole : Les kératinocytes humains normaux sont traités avec l'hydrolysat selon l'exemple 2 à 0,5 %, pendant 24 heures, irradiés par des UVB (50 mJ/cm²) puis cultivés encore 24 heures en présence de la même concentration d'hydrolysat selon l'exemple 2. Des contrôles non traités et irradiés sont réalisés dans les mêmes conditions. A la fin de l'expérimentation, les cellules sont incubées dans une solution contenant 0,1 mg/ml de
15 MTT (3-[4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2, 5-diphényltétrazolium, bromure). Ce composé est absorbé par les cellules vivantes puis métabolisé par les enzymes mitochondriales en un composé bleu violet, le formazan, qui sera dosé par spectrophotométrie à 540 nm. La densité optique (D.O.) est alors directement proportionnelle à l'activité enzymatique mitochondriale ainsi qu'au nombre de cellules vivantes.

20 Résultats : L'évaluation de la viabilité cellulaire par la technique du MTT montre que l'hydrolysat selon l'exemple 2 augmente la viabilité cellulaire après irradiation par les UVB de 16 %.

Conclusion : L'hydrolysat selon l'exemple 2 à 0,5 %, augmente la viabilité cellulaire et protège efficacement les cellules cutanées contre les effets cytotoxiques des
25 rayonnements UVB.

Exemple 11 : Etude de l'expression de la HMG-CoA réductase dans des biopsies de peau, en présence de l'hydrolysat selon l'exemple 1

Le but de cette étude est de déterminer l'influence l'hydrolysat selon l'exemple 1 à 0,5 % sur l'expression de la HMG-CoA réductase.

Protocole : Des échantillons de peau humaine sont mis en culture à l'interface air/liquide. L'hydrolysate selon l'exemple 1 à 0,5 % est appliqué topiquement, puis les échantillons sont incubés durant 24 heures ou 48 heures.

Ces échantillons de peau sont ensuite fixés avec du formaldéhyde puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 2 à 3 μm sont alors réalisées. L'immunomarquage est effectué après démasquage des sites spécifiques par traitement micro-onde puis incubation dans de la trypsine. L'immunomarquage est réalisé à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de la HMG-CoA réductase (Millipore, Upstate), puis d'un anticorps secondaire, couplé à un marqueur fluorescent. Les coupes de peau sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Nikon Eclipse E600 microscope).

Résultats : Les observations microscopiques montrent une fluorescence plus forte dans les couches supérieures de l'épiderme des peaux traitées par l'hydrolysate selon l'exemple 1 à 0,5 %, par rapport au contrôle non traité.

Conclusion : L'hydrolysate selon l'exemple 1, stimule l'expression de la HMG-CoA réductase, dans les couches supérieures de l'épiderme.

Exemple 12 : Etude de l'expression de la HMG-CoA réductase dans les kératinocytes humains normaux, en présence de l'hydrolysate selon l'exemple 2

Le but de cette étude est de déterminer l'influence de l'hydrolysate selon l'exemple 2 sur l'expression de la HMG-CoA réductase dans les kératinocytes humains normaux.

Protocole : Des kératinocytes humains normaux en culture sont traités avec l'hydrolysate selon l'exemple 2 à 0,5 % pendant 24 ou 48 heures (le milieu contenant l'actif est changé toutes les 24 heures). Les cellules sont ensuite lavées, fixées au méthanol froid pendant 4 minutes à 4°C. Les cellules sont incubées en présence d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de la HMG-CoA réductase (Millipore, Upstate), puis d'un anticorps secondaire, couplé à un marqueur fluorescent. Les cellules sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Nikon Eclipse E600 microscope).

Résultats : Les observations microscopiques montrent une fluorescence cytoplasmique plus intense dans les cellules traitées par l'hydrolysate selon l'exemple 2 à 0,5 %.

Conclusion : L'hydrolysate selon l'exemple 2 à 0,5 %, stimule l'expression de la HMG-CoA réductase, dans les kératinocytes humains normaux.

Exemple 13 : Préparation de compositions1 - Crème protection solaire:

Noms commerciaux	Noms INCI	% massique
PHASE A		
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	qsp
Pemulen TR1	Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,40
Glycerine	Glycerin	3,00
Nipastat Sodium	Sodium Methylparaben (and) Sodium Ethylparaben (and) Sodium Butylparaben (and) Sodium Propylparaben (and) Sodium Isobutylparaben	0,15
PHASE B		
Parsol MCX	Ethylhexyl Methoxycinnamate	7,50
Eusolex 4360	Benzophenone-3	3,00
Parsol 1789	Butyl Methoxydibenzoylmethane	2,00
Myritol 318	Caprylic/Capric Triglyceride	4,00
Emulgade SEV	Hydrogenated Palm Glycerides (and) Ceteareth-20 (and) Ceteareth-12 (and) Cetearyl Alcohol	5,00
Propylparaben	Propylparaben	0,15
Nacol 16-98	Cetyl Alcohol	1,00
PHASE C		
TEA	Triethanolamine	0,20
PHASE D		
Hydrolysats selon l'exemple 1		0,5 %
Parfum	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorant		qsp

- Les constituants de la phase A et de la phase B sont chauffés séparément entre 70°C et 75°C. La phase B est émulsionnée dans la phase A sous agitation. La phase C est ajoutée, à 45°C, en augmentant l'agitation. La phase D est ensuite additionnée lorsque la température se situe en dessous de 40°C. Le refroidissement est poursuivi jusqu'à 25°C sous vive agitation.

2-Crème anti-âge :

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
Phase A		
Montanov 68	Cetearyl Alcohol (and) Cetearyl Glucoside	6,00
Squalane	Squalane	3,00
Cetiol SB 45	Butyrospermum Parkii (Shea Butter)	2,00
Waglinol 250	Cetearyl Ethylhexanoate	3,00
Amerchol L- 101	Mineral Oil (and) Lanolin Alcohol	2,00
Abil 350	Dimethicone	1,50
BHT	BHT	0,01
Coenzyme Q10	Ubiquinone	0,10
Phase B		
Huile d'Avocat	Persea Gratissima (Avocado) Oil	1,25
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,75
Phase C		
Eau déminéralisée	Aqua (Water)	qsp
Butylene Glycol	Butylene Glycol	2,00
Glucam E10	Methyl Gluceth-10	1,00
Allantoin	Allantoin	0,15
Carbopol Ultrez 10	Carbomer	0,20
Phase D		
TEA	Triethanolamine	0,18
Phase E		
Hydrolysats selon l'exemple 1		1 %

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,50
Collaxyl	Water (and) Butylene Glycol (and) Hexapeptide-9	3,00
Phase F		
Parfum	Parfum (Fragrance)	qsp
Colorant		qsp

Préparer et fondre la phase A à 65-70°C. Chauffer la phase C à 65-70°C. La phase B est ajoutée à la phase A juste avant d'émulsionner A dans B. A environ 45°C, le carbomer est neutralisé par addition de la phase D. La phase E est ensuite additionnée sous légère agitation et le refroidissement est poursuivi jusqu'à 25°C. La phase F est alors additionnée si souhaité.

3 –Crème protectrice de jour :

<i>Noms commerciaux</i>	<i>Noms INCI</i>	<i>% massique</i>
Phase A		
Emulium Delta	Cetyl alcohol (and) Glyceryl Stearate (and) PEG-75 Stearate (and) Ceteth-20 (and) Steareth-20	4,00
Lanette O	Cetearyl Alcohol	1,50
D C 200 Fluid/100cs	Dimethicone	1,00
DUB 810C	Coco Caprylate/Caprates	1,00
DPPG	Propylene Glycol Dipelargonate	3,00
DUB DPHCC	Dipentaerythrityl Hexacaprylate/Hexacaprate	1,50
Cegesoft PS6	Vegetable Oil	1,00
Vitamine E	Tocopherol	0,30
Phenonip	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Butylparaben (and) Propylparaben (and) Isobutylparaben	0,70

<i>Phase B</i>		
Eau déminéralisée	Aqua	qsp 100
Glycerine	Glycerin	2,00
Carbopol EDT 2020	Acrylates/C10-30Alkyl Acrylate Crosspolymer	0,15
Keltrol BT	Xanthan Gum	0,30
<i>Phase C</i>		
Sodium Hydroxide (sol.à 10%)	Sodium Hydroxide	0,30
<i>Phase D</i>		
Eau déminéralisée	Aqua	5,00
Stay-C 50	Sodium Ascorbyl Phosphate	0,50
<i>Phase E</i>		
Butylene Glycol	Butylene Glycol	2,00
Dekaben CP	Chlorphenesin	0,20
<i>Phase F</i>		
GP4G	Water (and) Artemia Extract	1,00
Hydrolysats selon l'exemple 1		2 %

Préparer la phase A et chauffer à 75°C sous agitation. Préparer la phase B en dispersant le carbopol, puis la gomme xanthane sous agitation. Laisser reposer. Chauffer à 75°C.

- 5 A température, émulsionner A dans B sous agitation rotor-stator. Neutraliser avec la phase C sous agitation rapide. Après refroidissement à 40°C, additionner la phase D, puis la phase E. Le refroidissement est poursuivi sous agitation légère et la phase F rajoutée.

REVENDICATIONS

1. Hydrolysats peptidique enrichi en peptide bioactif capable de renforcer la fonction barrière de l'épiderme, caractérisé en ce que ledit peptide bioactif contient de 3 à 5 acides aminés dont au moins un résidu glycine et un résidu lysine.
2. Hydrolysats peptidique selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit peptide bioactif est de formule générale (I)

$$X_1\text{-[Gly, Lys]-}X_2\text{-}X_3$$

Dans laquelle,

X_1 est la lysine ou l'arginine ou aucun acide aminé,

X_2 est la sérine ou la thréonine,

X_3 est la leucine, l'isoleucine ou aucun acide aminé,
3. Hydrolysats peptidique selon la revendication 2, caractérisé en ce que ledit peptide bioactif est de séquence :
 (SEQ ID n°1) Lys-Gly-Lys-Thr-Ile
 (SEQ ID n°2) Arg-Gly-Lys-Ser-Leu
 (SEQ ID n°3) Arg-Lys-Gly-Ser-Ile
 (SEQ ID n°4) Arg-Gly-Lys-Thr
 (SEQ ID n°5) Arg-Gly-Lys-Ser
 (SEQ ID n°6) Gly-Lys-Thr
 (SEQ ID n°7) Lys-Gly-Ser
4. Hydrolysats peptidique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit hydrolysats peptidique provient de l'hydrolyse de plantes choisies parmi l'épeautre (*Triticum monococum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*), le maïs (*Zea mayz L.*), le pois (*Pisum sativum*) ou le soja (*Glycine Max. L.*).
5. Hydrolysats peptidique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que ledit hydrolysats peptidique provient de l'hydrolyse de levures du genre *Saccharomyces*, et plus particulièrement de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

6. Hydrolysats peptidique selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit hydrolysats peptidique contient entre 0,5 et 5,5 g/l de composés de nature peptidique.
- 5 7. Composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, en tant que principe actif capable de renforcer la fonction barrière de l'épiderme, l'hydrolysats peptidique défini selon l'une des revendications précédentes, en une quantité représentant de 0,0001 % à 20 % du poids total de la composition, et
10 préférentiellement en une quantité représentant de 0,05 % à 5 % du poids total de la composition.
8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que ledit hydrolysats peptidique est solubilisé dans un ou plusieurs solvants physiologiquement acceptables, comme l'eau, le glycérol, l'éthanol, le propylène glycol, le butylène glycol, le
15 dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques, la vaseline, une huile végétale ou tout mélange de ces solvants.
9. Composition selon les revendications 7 ou 8, caractérisée en ce qu'elle se présente sous une forme adaptée à l'application par voie topique.
20
10. Composition selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre, au moins un autre principe actif favorisant l'action dudit hydrolysats peptidique.
- 25 11. Composition pharmaceutique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, l'hydrolysats peptidique défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à titre de médicament
12. Utilisation d'une quantité efficace d'hydrolysats peptidique, tel que défini dans l'une
30 des revendications 1 à 6, en tant que principe actif activateur de la HMG-CoA réductase, dans une composition cosmétique.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la composition cosmétique est destinée à renforcer la fonction barrière de l'épiderme et à stimuler la différenciation épidermique.
- 5 14. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la composition cosmétique est destinée à prévenir et à lutter contre les signes cutanés du vieillissement et du photo-vieillissement.
- 10 15. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que la composition cosmétique est destinée à protéger la peau des agressions extérieures.
- 15 16. Procédé de traitement cosmétique destiné à prévenir ou traiter les manifestations cutanées du vieillissement et/ou du photo-vieillissement, caractérisé en ce que l'on applique topiquement sur la peau ou les phanères à traiter, une composition comprenant une quantité efficace d'hydrolysate peptidique tel que défini selon l'une des revendications 1 à 6.

Figure 1 Chromatogramme CLHP d'un hydrolysat d'épeautre

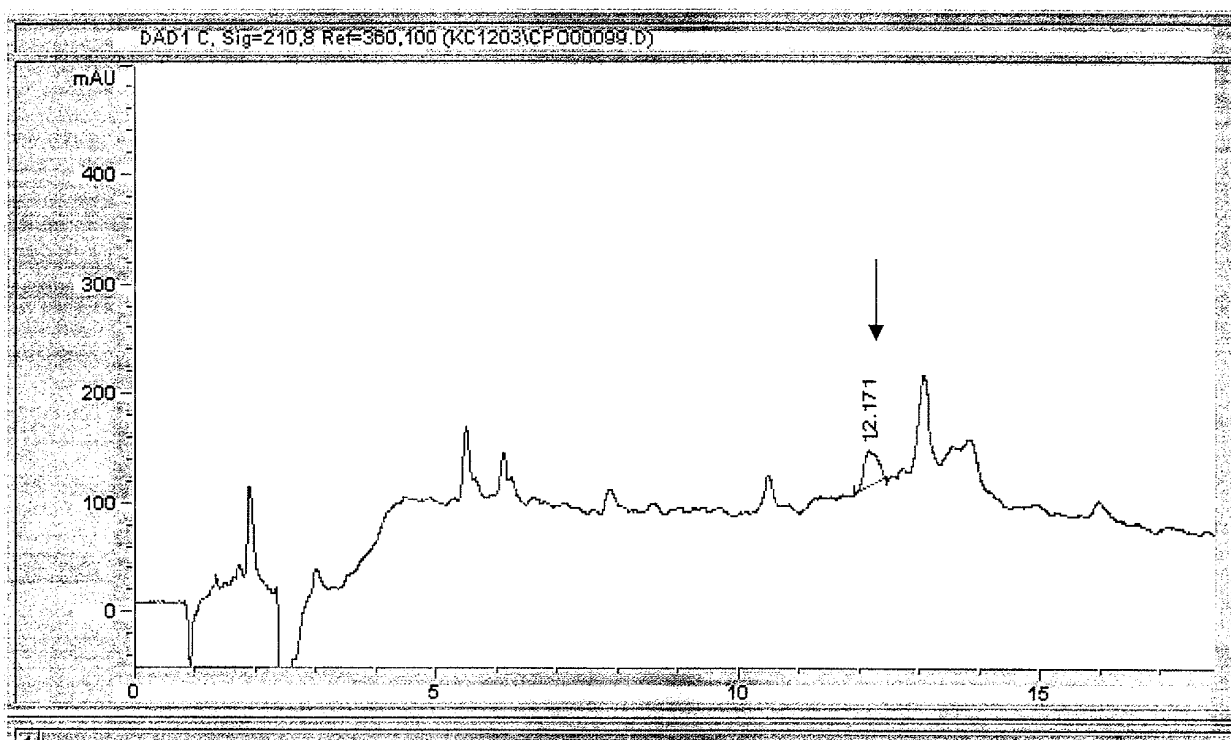


Figure 2 Chromatogramme CLHP d'un hydrolysat de pomme de terre

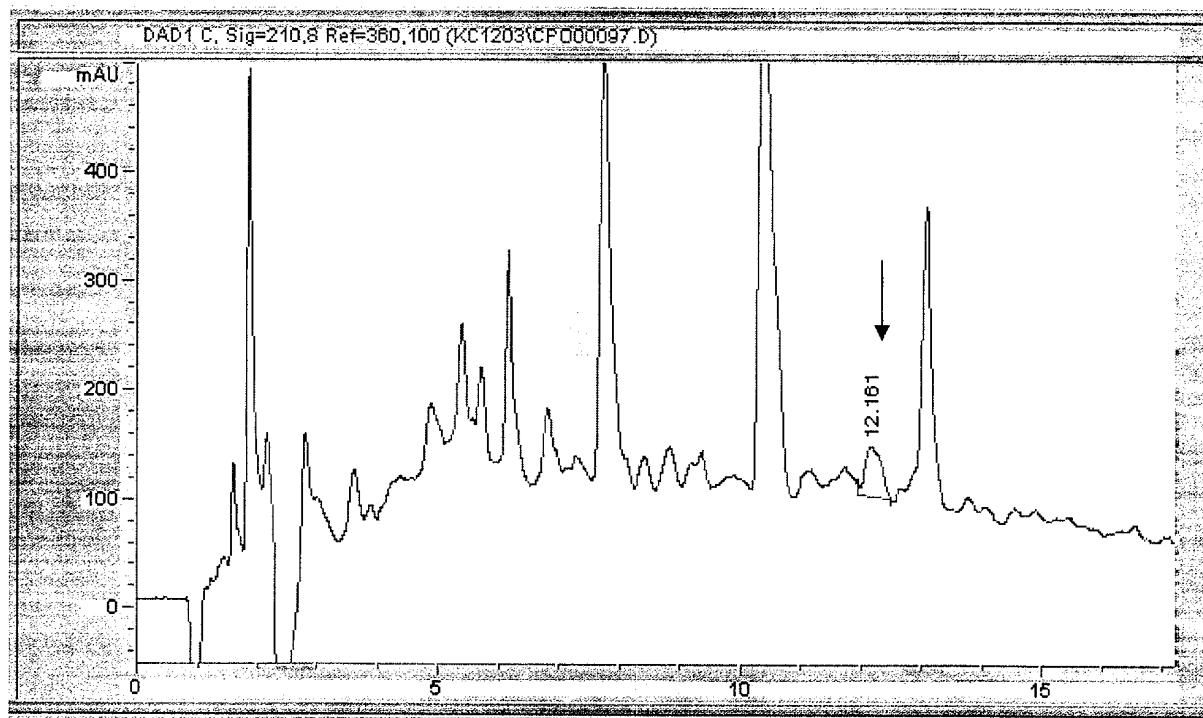
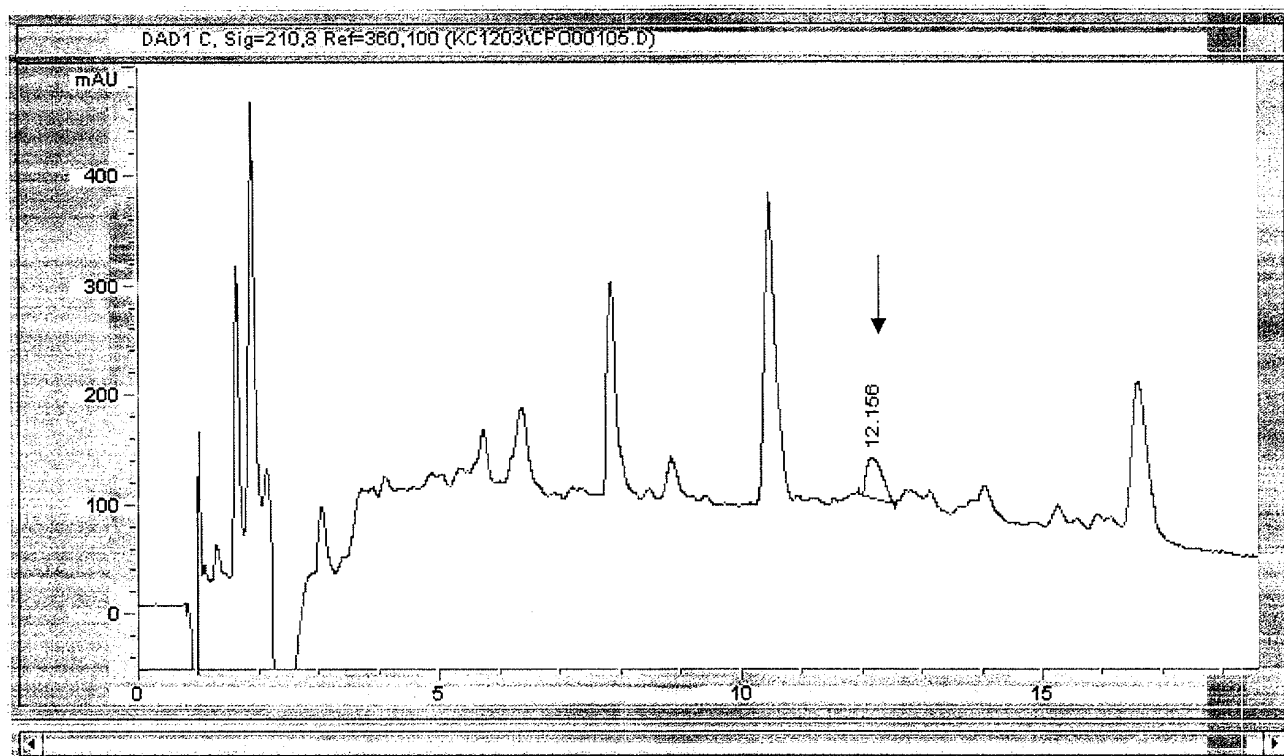


Figure 3 Chromatogramme CLHP d'un hydrolysats de maïs





RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

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

N° d'enregistrement
national

FA 721827
FR 0901823

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 2 915 384 A (VINCIENCE SA [FR]) 31 octobre 2008 (2008-10-31) * page 12, ligne 1 - page 13, ligne 23; revendications 1-8,10-14 *	1-4,6-16	C07K4/00 C07K7/06 C07K5/11 C07K5/083 C07K5/09
X	FR 2 904 552 A (SOC EXTRACTION PRINCIPES ACTIF [FR]) 8 février 2008 (2008-02-08) * page 8, ligne 12 - ligne 23; revendication 7 *	1-3,5-16	A61K38/06 A61K38/07 A61K38/08 A61K8/64 A61K38/03
E	FR 2 925 327 A (VINCIENCE SA [FR]) 26 juin 2009 (2009-06-26) * page 12, ligne 15 - page 14, ligne 1; revendications 1-15 *	1-4,6-16	A61P17/00 A61Q17/00 A61Q19/08
E	FR 2 925 330 A (VINCIENCE SA [FR]) 26 juin 2009 (2009-06-26) * page 12, ligne 7 - page 13, ligne 19 *	1-4,6-16	
E	FR 2 925 326 A (VINCIENCE SA [FR]) 26 juin 2009 (2009-06-26) * page 12, ligne 11 - page 13, ligne 23; revendications 1-15 *	1-4,6-16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	FR 2 911 779 A (LVMH RECH [FR]) 1 août 2008 (2008-08-01) * revendication 1 *	1-4,6-16	C07K A61K
A	WO 2004/096168 A (SILAB SA [FR]; PAUFIQUE JEAN [FR]) 11 novembre 2004 (2004-11-11) * page 3, ligne 3 - ligne 19 * * page 4, ligne 1 - ligne 9 *	1-4,6-16	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
27 août 2009		James, Sonya	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS 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 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 & : membre de la même famille, document correspondant			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0901823 FA 721827**

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 **27-08-2009**
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
FR 2915384	A	31-10-2008	AUCUN	
FR 2904552	A	08-02-2008	AUCUN	
FR 2925327	A	26-06-2009	FR 2925332 A1	26-06-2009
FR 2925330	A	26-06-2009	AUCUN	
FR 2925326	A	26-06-2009	AUCUN	
FR 2911779	A	01-08-2008	DE 102008006404 A1	14-08-2008
			GB 2446260 A	06-08-2008
			JP 2008189669 A	21-08-2008
			KR 20080071517 A	04-08-2008
			US 2008181974 A1	31-07-2008
WO 2004096168	A	11-11-2004	FR 2854069 A1	29-10-2004