

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 143 369**

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

②1 N° d'enregistrement national : **22 13461**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **A 61 K 8/972 (2023.01), A 61 K 36/00, A 61 Q 19/00,  
A 61 P 17/00**

⑫

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 15.12.22.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la  
demande : 21.06.24 Bulletin 24/25.

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 :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : LVMH RECHERCHE GROUPEMENT  
D'INTERET ECONOMIQUE — FR.

⑦2 Inventeur(s) : FRANCHI Jocelyne, VERT Laure,  
JEANNETON Olivier et GOURGUILLON Lorène.

⑦3 Titulaire(s) : LVMH RECHERCHE GROUPEMENT  
D'INTERET ECONOMIQUE.

⑦4 Mandataire(s) : REGIMBEAU.

⑤4 Composition cosmétique comprenant un extrait de levure *Metschnikowia rubicola*.

⑤7 Composition cosmétique comprenant un extrait de le-  
vure *Metschnikowia rubicola*

La présente invention concerne une composition cos-  
métique comprenant, dans un milieu physiologiquement ac-  
ceptable, au moins un extrait de levure *Metschnikowia*  
*rubicola* et au moins un adjuvant cosmétique choisi dans le  
groupe constitué par les agents antioxydants, les parfums,  
les vitamines, les huiles, les agents épaississants, les  
agents émoullissants, les agents hydratants, les agents anti-  
âge, et leurs mélanges.

FR 3 143 369 - A1



## Description

### **Titre de l'invention : Composition cosmétique comprenant un extrait de levure *Metschnikowia rubicola***

#### **DOMAINE DE L'INVENTION**

[0001] La présente invention concerne le domaine de la cosmétique. Elle concerne notamment une composition cosmétique comprenant un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* destinée, notamment, à améliorer la fonction barrière, l'hydratation cutanée, l'équilibre du microbiote cutané et/ou la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

#### **ETAT DE LA TECHNIQUE**

[0002] Le tissu cutané est la première barrière de protection de l'organisme vis-à-vis de l'environnement. Il est ainsi quotidiennement soumis à des facteurs d'origine externe ou interne susceptibles de fragiliser la barrière cutanée, favoriser la déshydratation de la peau et/ou des lèvres, fragiliser l'équilibre du microbiote cutané et altérer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

[0003] La peau du visage est une partie du corps tout particulièrement sensible à la perte d'eau. Une bonne hydratation de la peau et des lèvres est indispensable au confort, qui influence notamment la sensibilité au toucher [1].

[0004] De nombreuses solutions cosmétiques ont été proposées pour agir sur la fonction barrière et pour améliorer l'hydratation de la peau, mais il demeure un besoin constant de trouver de nouveaux agents capables de nourrir et hydrater la peau et/ou les lèvres, de rétablir la barrière cutanée et ainsi de prévenir et/ou diminuer les effets délétères subis quotidiennement par notre peau et qui favorisent l'altération de l'équilibre du microbiote cutané et de la synthèse de matrice extra-cellulaire.

[0005] De manière inattendue, la Demanderesse a mis en évidence les effets *in vitro* d'un extrait de levure *Metschnikowia rubicola*, aussi appelé extrait de levure de rose ou « Nectarosa » dans la présente description. Cet extrait de levure permet notamment de favoriser et/ou stimuler la synthèse de la matrice extra-cellulaire, l'hydratation de la peau, la barrière cutanée et son film hydrolipidique ainsi que l'équilibre du microbiote cutané. Il est donc envisagé d'utiliser cet extrait de levure comme actif cosmétique pour stimuler et/ou favoriser la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

#### **Exposé de l'invention**

[0006] Le premier objet de l'invention concerne une composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un extrait de levure *Met-*

*schnikowia rubicola* et au moins un adjuvant cosmétique choisi dans le groupe constitué par les agents antioxydants, les parfums, les vitamines, les huiles, les agents épaississants, les agents émoullissants, les agents hydratants, les agents anti-âge, et leurs mélanges.

- [0007] Par « milieu physiologiquement acceptable », on entend un milieu compatible avec les matières kératiniques, en particulier la peau et/ou les lèvres.
- [0008] On entend par « matières kératiniques » selon l'invention la peau et/ou ses phanères, et les lèvres. En particulier, il s'agira de la peau du visage, du cou et/ou du corps, et des lèvres.
- [0009] Par « adjuvant cosmétique » on entend une substance dépourvue d'effet cosmétique en tant que telle, mais utile à l'incorporation de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* dans la composition cosmétique de l'invention ou à la mise en forme de celle-ci.
- [0010] De préférence, ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est obtenu par un procédé comprenant au moins les étapes de :
- [0011] a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau,
- [0012] b) Hydrolyse(s) enzymatique(s),
- [0013] c) Inactivation enzymatique par traitement thermique,
- [0014] d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
- [0015] e) Concentration(s),
- [0016] f) Filtration(s), et
- [0017] g) Filtration(s) stérilisante(s).
- [0018] L'invention porte encore sur un procédé cosmétique de soin et/ou de maquillage des matières kératiniques, plus particulièrement de la peau et/ou des lèvres et notamment de la peau du visage et/ou du cou, comprenant l'application topique sur lesdites matières kératiniques, d'une composition cosmétique selon l'invention.
- [0019] Le procédé cosmétique de l'invention est notamment destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.
- [0020] Par « favoriser et/ou stimuler l'équilibre du microbiote cutané » on entend favoriser et/ou stimuler l'équilibre de la population de micro-organismes qui, de par leur diversité, participent au contrôle de l'équilibre qui caractérise une peau saine et participent à la protection de l'organisme en limitant le risque de colonisation de la peau par des bactéries pathogènes.
- [0021] Par « peau saine » selon l'invention, on entend des peaux ne présentant pas de lésion, de troubles ou de désordres qui relèveraient d'un état pathologique (sujets 'non sains', atteints d'une pathologie).

[0022] La présente invention porte encore sur l'utilisation cosmétique d'un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* selon l'invention, en tant qu'actif destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

### **DESCRIPTION DES FIGURES**

[0023] [Fig.1] La [Fig.1] est un graphique montrant la quantité de *S. epidermidis* obtenue après culture en conditions irradiée (UVA à 1 J/cm<sup>2</sup>) ou non, en présence ou non de Nectarosa à une concentration de 0.278% ou 2.5% (% en poids d'extrait dilué dans le milieu).

[0024] [Fig.2] La [Fig.2] est un graphique indiquant la dilution minimale nécessaire pour éviter un effet cytotoxique des sécrétomes de *S. aureus* et *S. epidermidis* sur des kératinocytes est de 1/16 pour *S. aureus* et 1/2 pour *S. epidermidis*.

[0025] [Fig.3] La [Fig.3] est un graphique montrant la quantification relative de l'expression de gènes cibles (transglutaminase I, Claudine I, Hyaluronan Synthase 3et Aquaporine 3) par PCR quantitative dans des kératinocytes humains normaux traités avec le sécrétome de *S. epidermidis* seul (SE) ou le sécrétome de *S. epidermidis* cultivées en présence de Nectarosa à 0.278% (% en poids d'extrait dilué dans le milieu) (SE+NTS).

### **DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION**

[0026] Extrait de levure *Metschnikowia rubicola*

[0027] Les compositions cosmétiques de l'invention utilisent comme actif cosmétique un extrait de levure *Metschnikowia rubicola*.

[0028] Par « *Metschnikowia rubicola* » au sens de l'invention, on entend toute levure de la famille des *Metschnikowiaceae*, du genre *Metschnikowia* et de l'espèce *Metschnikowia rubicola*. Préférentiellement, une souche de la levure *Metschnikowia rubicola* a été enregistrée dans une collection de levures (CIRM), sous le numéro CLIB n°2141. Cette levure *Metschnikowia rubicola* a été isolée à partir de plantes de la famille des *Rosaceae*, de préférence à partir d'une plante de la variété Evanrat, encore plus préférentielle à partir du nectar de rose de Granville.

[0029] Par « nectar de rose » au sens de l'invention, on entend le suc sécrété par les nectaires de la rose, et isolé à partir de fleurs de rose. Le nectaire est un organe nourricier, constitué d'une glande, dont sont pourvues nombre de plantes et qui sécrète le nectar. Le nectar possède, par son goût ou son odeur, un pouvoir d'attraction sur les insectes et animaux pollinisateurs. La composition des nectars de fleurs peut être influencée par différents facteurs : la saisonnalité, l'espèce de plante étudiée, la fleur sélectionnée mais aussi par les micro-organismes qu'il contient [2]. Les micro-organismes jouent un rôle dans la composition et la concentration des métabolites

primaires (notamment sucres et acides aminés) et des métabolites spécialisés présents dans le nectar mais aussi sur sa température et son pH.

- [0030] Par « actif cosmétique » au sens de l'invention, on entend un extrait comprenant au moins un ensemble de molécules présentant un effet cosmétique sur la peau. Préférentiellement l'effet est un effet hydratant et le principe actif améliore la fonction barrière de la peau.
- [0031] L'extrait selon l'invention peut être un extrait de toute souche de *Metschnikowia rubicola*, de préférence de la souche déposée dans la collection CIRM sous le numéro CLIB n°2141.
- [0032] Selon un mode de réalisation, la composition cosmétique de l'invention est caractérisée en ce que la levure est la souche identifiée par le numéro CLIB n°2141.
- [0033] *Metschnikowia rubicola* est une levure ascomycètes classée dans le clade de *Metschnikowia pulcherrima*, classe qui présente un intérêt particulier pour l'agriculture car *Metschnikowia pulcherrima* et *Metschnikowia fructicola* sont efficaces comme agents de biocontrôle pour inhiber les pourritures de stockage des fruits [3]. *Metschnikowia rubicola* forme des colonies blanches, semi-éclatantes, de texture butyreuse, avec un bord lisse et légèrement irrégulier. Les cellules sont de formes ellipsoïdales allongées. *Metschnikowia rubicola* a des ascus aussi de forme ellipsoïdales allongées, contenant un ou deux ascospores en forme d'aiguilles.
- [0034] A la connaissance de la Demanderesse, aucun extrait de levure *Metschnikowia rubicola* n'a été décrit dans l'art antérieur pour une utilisation comme actif cosmétique présentant des propriétés remarquables au niveau des matières kératiniques chez l'Homme.
- [0035] Selon un autre mode de réalisation, la composition cosmétique de l'invention est caractérisée en ce que ladite levure *Metschnikowia rubicola* est isolée à partir du nectar de rose de la variété Evanrat.
- [0036] Par « extrait de *Metschnikowia rubicola* » ou « extrait de levure de rose » ou encore « Nectarosa » au sens de l'invention, on entend un extrait comprenant au moins un ensemble de molécules, préférentiellement un extrait de la biomasse de la levure *Metschnikowia rubicola*, ledit extrait étant un hydrolysate, comprenant, préférentiellement au moins des sucres représentant au moins 15% en poids du poids total de l'extrait. Ledit extrait constituant un ingrédient dérivé de matériaux naturels, selon la définition de la norme ISO 16128.
- [0037] Par « ingrédient cosmétique dérivé de matériaux naturels » au sens de l'invention, on entend un ingrédient cosmétique provenant de matériaux issus de l'agriculture biologique, ou de matériaux en partie d'origine naturelle et en partie issus de l'agriculture biologique, obtenu par des procédés chimiques et/ou biologiques définis visant à le modifier chimiquement mais ne comprenant aucun fragment de molécule

issu d'un combustible fossile. Ces modifications chimiques sont intentionnelles, associées au procédé réalisé, les structures et les ratios des molécules obtenues ne sont plus identiques à ce que la personne du métier sait présent naturellement dans la levure.

- [0038] L'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans la présente invention peut être inclus dans les compositions cosmétiques de l'invention sous une forme vivante, semi-active ou inactivée, morte. Il peut être inclus sous forme de fractions de composants cellulaires ou sous la forme de métabolites. Le microorganisme, métabolite(s) ou fraction(s) peu(ven)t également être introduit(s) sous la forme d'une poudre lyophilisée, d'un surnageant de culture et/ou le cas échéant sous une forme concentrée.
- [0039] Selon un mode de réalisation, ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé par l'invention est un hydrolysate.
- [0040] Par « hydrolysate de *Metschnikowia rubicola* » au sens de l'invention, on entend tout extrait issu de la levure *Metschnikowia rubicola*, obtenu par un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse, préférentiellement au moins une étape d'hydrolyse enzymatique.
- [0041] Selon un mode de réalisation particulier, la levure *Metschnikowia rubicola* est mise en œuvre sous une forme inactivée, voire morte, et plus particulièrement sous la forme d'un lysat.
- [0042] Par « lysat », on entend notamment un matériau obtenu par lyse cellulaire des cellules du microorganisme considéré provoquant ainsi la libération des constituants biologiques intracellulaires naturellement contenus dans lesdites cellules. Le lysat mis en œuvre est formé en tout ou partie des constituants biologiques intracellulaires et des constituants des parois et membranes cellulaires. La présente invention concerne donc la mise en œuvre d'un lysat probiotique et/ou une de ses fractions et/ou un de ses métabolites.
- [0043] Procédé d'obtention de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola*
- [0044] L'extrait peut être préparé par différents procédés d'extraction connus de la personne du métier, mettant en œuvre des étapes de : lyse, de préférence hydrolyse, desdites levures *Metschnikowia rubicola*, séparation des phases soluble et insoluble, concentration, filtration et stérilisation, optionnellement séchage et éventuellement remise en solution.
- [0045] Selon certains modes de réalisation, une culture de levures *Metschnikowia rubicola* est réalisée préalablement à la mise en œuvre du procédé d'extraction. Cette culture est notamment conduite, de manière classique pour la personne du métier, sur un milieu adapté à son développement (par exemple, milieu de culture pour levures ATCC Medium : 1245 YPD Medium), afin d'obtenir une biomasse de levures en quantité in-

dustrielle. Une fois la biomasse produite, les molécules produites ainsi que la biomasse sont récupérées par centrifugation.

- [0046] La matière récupérée suite à cette étape de centrifugation est désignée de façon générique par le terme « biomasse ».
- [0047] Selon un mode de réalisation, l'invention utilise un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* obtenu par la mise en œuvre d'un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :
- [0048] a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau,
- [0049] b) Hydrolyse(s) enzymatique(s),
- [0050] c) Inactivation enzymatique par traitement thermique,
- [0051] d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
- [0052] e) Concentration(s),
- [0053] f) Filtration(s), et
- [0054] g) Filtration(s) stérilisante(s).
- [0055] *Solubilisation de la biomasse*
- [0056] La biomasse préalablement obtenue par la culture de levures *Metschnikowia rubicola* est solubilisée dans l'eau, à raison d'au moins 80g de levures *Metschnikowia rubicola* par litre d'eau (80g/L), en particulier à raison de 80-90g/L.
- [0057] *Hydrolyse*
- [0058] L'extrait selon l'invention peut être obtenu par tout type de procédé d'extraction ou de transformation des molécules de la levure comprenant au moins une étape d'hydrolyse.
- [0059] Aussi, selon un aspect l'extrait est un hydrolysate, c'est-à-dire qu'il est obtenu par hydrolyse de la levure. Par « hydrolysate », on entend que la lyse cellulaire est effectuée dans de l'eau. On parlera indifféremment d'hydrolysate ou d'extrait aqueux dans le reste de la description.
- [0060] Selon un autre aspect, l'hydrolysate est obtenu par au moins une hydrolyse enzymatique. Ainsi, Par « hydrolysate de levure *Metschnikowia rubicola* » au sens de l'invention, on entend tout extrait de levure *Metschnikowia rubicola* obtenu par un procédé comprenant au moins une étape d'hydrolyse enzymatique de la biomasse de *Metschnikowia rubicola*. De façon particulièrement avantageuse, l'extrait est obtenu par deux hydrolyses enzymatiques simultanées.
- [0061] Ainsi, selon un mode particulier et préféré, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé par l'invention est un hydrolysate de levure *Metschnikowia rubicola*. Lesdites levures étant hydrolysées, il s'agit donc d'un extrait de levures *Metschnikowia rubicola* non vivantes.
- [0062] Selon un mode de réalisation particulier, la composition cosmétique selon l'invention est caractérisée en ce que l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est un hydrolysate

de levure *Metschnikowia rubicola*.

- [0063] Selon un autre mode particulier, il s'agit d'un hydrolysate de levure *Metschnikowia rubicola* (non vivante) de la souche déposée dans la collection CIRM sous le numéro CLIB n°2141.
- [0064] *Inactivation enzymatique par traitement thermique*
- [0065] En outre, le procédé peut éventuellement comprendre une étape de traitement thermique de l'extrait pour inactiver les enzymes. La température utilisée dépendra de la nature de l'enzyme à inactiver. De manière préférée la température utilisée pour inactiver les enzymes est comprise dans la gamme allant de 65°C à 95°C et de préférence dans la gamme allant de 75°C à 85°C.
- [0066] *Séparation des phases soluble et insoluble*
- [0067] La séparation de la phase soluble et insoluble est réalisée par tout moyen connu de la personne du métier. Selon un mode de réalisation, l'étape de séparation est effectuée par centrifugation, filtration ou décantation. Préférentiellement, la séparation des phases soluble et insoluble est réalisée pour récupérer la phase soluble contenant entre autres les sucres solubles, tels que les oligosaccharides et les polysaccharides et la fraction peptidique.
- [0068] *Concentration*
- [0069] Selon encore un autre mode de réalisation, le procédé comprend une ou des étapes de concentration et/ou purification, préférentiellement par des étapes d'ultrafiltrations successives à travers des filtres de porosité différentes, en conservant les filtrats à chaque étape et/ou par une méthode de type chromatographique.
- [0070] *Filtrations*
- [0071] Selon un autre mode de réalisation, le procédé comprend une ou des étapes de filtration, et optionnellement une ou des filtrations stérilisantes. De manière préférée, la filtration est effectuée par tri moléculaire adapté, par exemple par ultrafiltration ou chromatographie ionique. En fin de procédé, on utilisera avantageusement des filtrations stérilisantes pour éviter toute contamination de l'extrait produit.
- [0072] *Autres étapes optionnelles*
- [0073] Des étapes de décoloration ou désodorisation peuvent aussi être ajoutées.
- [0074] Selon un mode de réalisation, l'extrait obtenu à l'issue de ce procédé d'extraction est un extrait se présentant sous une forme aqueuse.
- [0075] Selon un autre mode de réalisation, l'extrait peut ensuite éventuellement être associé à un support d'atomisation et séché, à la fin du procédé décrit ci-dessus pour se présenter sous forme solide. Cette phase peut être réalisée par la mise en œuvre des étapes suivantes :
- [0076] - un support d'atomisation, de préférence la maltodextrine, est ajouté dans l'extrait de
- [0077] *Metschnikowia rubicola*, d'au plus 90% (en masse/volume) ;

- [0078] - cette solution est ensuite concentrée sous vide ;
- [0079] - une élimination des bactéries éventuellement présentes est réalisée par traitement thermique ;
- [0080] - l'atomisation permet d'obtenir une poudre.
- [0081] Les étapes des procédés décrits ci-avant, prises individuellement, sont usuelles dans le domaine des extractions d'actifs à partir de matières premières naturelles et la personne du métier est à même d'en ajuster les paramètres réactionnels sur la base de ses connaissances générales.
- [0082] De manière avantageuse, ce procédé d'extraction permet d'obtenir un extrait de levure ne présentant pas de caractéristiques olfactives gênantes pouvant limiter son utilisation dans des produits de soins cosmétiques ce qui est généralement le cas pour des extraits de levure.
- [0083] *Composition du produit obtenu*
- [0084] Selon un mode particulier et préféré, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans les compositions de l'invention comprend entre 10 g/L et 40 g/L de matière active (matière sèche), de préférence encore entre 15 g/L et 38 g/L de matière active, de manière encore préférée entre 20 g/L et 32 g/L de matière active par rapport au poids total de l'extrait. Celle-ci peut être déterminée par la pesée des résidus issus du séchage de l'extrait selon l'invention à 105°C dans une étuve jusqu'à l'obtention d'un poids constant.
- [0085] Selon un mode particulier, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans les compositions de l'invention comprend au moins 15% de sucres en poids de matière active (matière sèche) de l'extrait, et préférentiellement entre 28% et 75% de sucres en poids de matière active de l'extrait. La teneur en sucres dans l'extrait peut être déterminée par la méthode de DUBOIS [4].
- [0086] La fraction glucidique de l'extrait utilisé dans les compositions de l'invention comprend préférentiellement au moins des oligosaccharides. De façon préférée la fraction glucidique comprend au moins 50 % d'oligosaccharides en poids de matière sèche de la fraction glucidique, de préférence au moins 70 % d'oligosaccharides en poids de matière sèche de la fraction glucidique. Ces oligosaccharides sont préférentiellement constitués de molécules de masses molaires comprises entre 180 et 3 600 Da. Ces oligosaccharides sont préférentiellement constitués de glucose et de mannose.
- [0087] L'extrait utilisé dans les compositions de l'invention comprend également des peptides. Préférentiellement, l'extrait de *Metschnikowia rubicola* comprend des peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 10 kDa (10000 Da), préférentiellement inférieur à 3500 Da, très préférentiellement inférieur à 2000 Da. La répartition et la quantité de la fraction protéique peut être déterminée par le dosage de l'azote total selon la méthode de KJELDHAL [5]. De façon préférée, les peptides ayant un poids

moléculaire inférieur à 3500 Da représentent au moins 90% en poids de la fraction protéique de l'extrait, encore plus préférentiellement les peptides ayant un poids moléculaire inférieur à 2000Da représentent au moins 75% en poids de la fraction protéique de l'extrait, selon la méthode de KJELDHAL. L'extrait utilisé dans les compositions de l'invention comprend au moins 20% de peptides en poids de matière active (matière sèche) de l'extrait, préférentiellement entre 20 et 60%.

- [0088] L'extrait utilisé dans les compositions de l'invention comprend également d'autres constituants, comme des minéraux qui se mesurent par un taux de cendres. Le taux de cendres est préférentiellement compris entre 10 et 40% en poids de matière sèche (matière active) de l'extrait. La teneur en cendres brutes peut être déterminée par la pesée des résidus issus de l'incinération des échantillons de l'extrait selon l'invention à 550°C dans un four à moufle électrique.
- [0089] De préférence, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé par l'invention est un extrait comprenant de 0,25 % à 2,5 % de matière sèche (matière active) dans de l'eau.
- [0090] Le nom INCI (International Nomenclature Cosmetics Ingrédients) de cet extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est : WATER, PENTYLENE GLYCOL, YEAST EXTRACT AND POTASSIUM SORBATE.
- [0091] Selon un mode particulier, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans la composition cosmétique selon l'invention est un hydrolysate obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :
- [0092] a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau à raison de 80g/L,
- [0093] b) Hydrolyse(s) enzymatique(s) par des carbohydrases,
- [0094] c) Inactivation enzymatique par traitement thermique, notamment à une température allant de 65°C à 95°C, de préférence allant de 75°C à 85°C,
- [0095] d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
- [0096] e) Concentration(s) ou purification(s), en particulier par tri moléculaire ou ultra-filtration, et
- [0097] f) Filtration(s) et filtration(s) stérilisante(s).
- [0098] Selon un mode particulier, l'extrait de *Metschnikowia rubicola* utilisé dans la composition cosmétique selon l'invention est caractérisé par :
- [0099] - Une teneur en matières sèches de 32 g/L,
- [0100] - Une quantité de sucres (méthode de Dubois) de 15,4 g/L (soit 48 % en poids par rapport à la matière sèche),
- [0101] - Une teneur en peptides (méthode de KJEDHAL) de 11,3 g/L (soit 35,3 % en poids par rapport à la matière sèche).
- [0102] L'extrait peut aussi être caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un liquide

limpide, jaune clair, a une odeur faible, et que la fraction saccharidique du principe actif soit composée de glucose et de préférence au moins 20% de mannose. Selon un autre mode préféré, la fraction saccharidique peut n'être composée que de glucose.

[0103] Selon un autre mode particulier, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans la composition cosmétique selon l'invention est un hydrolysate obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :

[0104] a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau à raison de 90g/L,

[0105] b) Hydrolyse(s) enzymatique(s) par une protéase,

[0106] c) Inactivation enzymatique par traitement thermique, notamment à une température allant de 65°C à 95°C, de préférence allant de 75°C à 85°C,

[0107] d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,

[0108] e) Concentration(s) ou purification(s), en particulier par tri moléculaire ou ultra-filtration, et

[0109] f) Filtration(s) et filtration(s) stérilisante(s).

[0110] Selon un autre mode particulier, l'extrait de *Metschnikowia rubicola* utilisé dans la composition cosmétique selon l'invention est caractérisé par :

[0111] - Une teneur en matières sèches de 24,6 g/L,

[0112] - Une quantité de sucres (méthode de Dubois) de 6,1 g/L (soit 24,8 % en poids par rapport à la matière sèche),

[0113] - Une teneur en peptides (méthode de KJEDHAL) de 10,2 g/L (soit 41,5 % en poids par rapport à la matière sèche), et

[0114] - Une teneur en cendres minérales de 8,3 g/L (soit 33,7 % en poids par rapport à la matière sèche).

[0115] Selon cet autre mode préféré, la fraction saccharidique est composée de glucose.

[0116] *Composition et Galéniques*

[0117] Dans le cadre de la présente invention, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est utilisé pour la préparation de compositions, notamment la préparation de compositions cosmétiques pour application topique sur les matières kératiniques.

[0118] Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention porte sur une composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* et au moins un adjuvant cosmétique choisi dans le groupe constitué par les agents antioxydants, les parfums, les vitamines, les huiles, les agents épaississants, les agents émoullissants, les agents hydratants, les agents anti-âge, et leurs mélanges.

[0119] De préférence, les compositions cosmétiques de l'invention comprennent un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* tel que décrit ci-dessus.

[0120] Ainsi, selon un mode de réalisation préféré, la composition cosmétique de l'invention

se caractérise en ce ladite levure *Metschnikowia rubicola* est isolée à partir du nectar de rose de la variété Evanrat.

- [0121] Selon un autre mode de réalisation préféré, la composition cosmétique de l'invention se caractérise en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est un extrait aqueux de levure *Metschnikowia rubicola*.
- [0122] Selon un autre mode de réalisation préféré, la composition cosmétique de l'invention se caractérise en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est un hydrolysate de levure *Metschnikowia rubicola*.
- [0123] Par « extrait aqueux » selon l'invention, on entend que l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est un extrait dans de l'eau.
- [0124] Selon un mode de réalisation préféré, l'invention porte sur une composition cosmétique caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est obtenu par un procédé comprenant au moins les étapes de :
- [0125] a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau, en particulier à raison de 80-90g/L
- [0126] b) Hydrolyse(s) enzymatique(s),
- [0127] c) Inactivation enzymatique par traitement thermique, notamment à une température allant de 65°C à 95°C, de préférence allant de 75°C à 85°C,
- [0128] d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
- [0129] e) Concentration(s),
- [0130] f) Filtration(s), et
- [0131] g) Filtration(s) stérilisante(s).
- [0132] Selon un mode de réalisation particulier, l'invention porte sur une composition cosmétique comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un extrait de levure *Metschnikowia rubicola*, en particulier un extrait de la souche déposée dans la collection CIRM sous le numéro CLIB n°2141.
- [0133] Dans le cadre de l'invention, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est incorporé dans une composition adaptée à une application topique sur les matières kératiniques. Il est notamment utilisé dans une quantité efficace pour obtenir l'effet recherché.
- [0134] Selon un mode de réalisation préféré, la composition cosmétique de l'invention est caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est présent en une teneur allant de 0,01 % à 10 %, de préférence de 0,5 % à 5 %, de préférence encore de 0,1 % à 3 % en poids de matière première (extrait aqueux) par rapport au poids total de la composition.
- [0135] Selon un mode de réalisation préféré, la composition cosmétique de l'invention est caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est présent en une teneur allant de 0,00005 % à 0,25 %, de préférence de 0,0005 % à 0,125 %, de préférence encore de 0,005 % à 0,075 % en poids de matière sèche (active) par rapport

au poids total de la composition.

- [0136] Selon un autre mode de réalisation particulier, l'invention porte sur une composition cosmétique comprenant dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un extrait de levure *Metschnikowia rubicola*, en particulier un extrait de la souche déposée dans la collection CIRM sous le numéro CLIB n°2141 en une teneur allant 0,01 % à 10 %, de préférence de 0,5 % à 5 %, de préférence encore de 0,1 % à 3 % en poids de matière première par rapport au poids total de la composition, et au moins un adjuvant cosmétique choisi dans le groupe constitué par les agents antioxydants, les parfums, les vitamines, les huiles, les agents épaississants, les agents émoullissants, les agents hydratants, les agents anti-âge, et leurs mélanges.
- [0137] Dans un mode de réalisation préféré, ladite composition cosmétique comprenant l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* de l'invention est une composition de soin et/ou de maquillage des matières kératiniques, en particulier de la peau et/ou des lèvres et notamment de la peau du visage et/ou du cou.
- [0138] Selon un autre mode de réalisation, ladite composition cosmétique comprenant l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* de l'invention est caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'une crème, émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile ou émulsion multiple, solution, huile, suspension, gel, lait, lotion, sérum, baume, stick ou poudre
- [0139] De préférence, l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* de l'invention est mis en œuvre dans la phase aqueuse de la composition de l'invention.
- [0140] Ainsi, selon un mode particulier, la composition de l'invention comprend au moins une phase aqueuse.
- [0141] La phase aqueuse de la composition selon l'invention comprend de l'eau et éventuellement un solvant hydrosoluble.
- [0142] On entend par « solvant hydrosoluble » selon l'invention, un composé liquide à température ambiante et miscible à l'eau (miscibilité dans l'eau supérieure à 50 % en poids à 25 °C et pression atmosphérique). On peut citer notamment :
- [0143] - les mono-alcools inférieurs en C1-C5 tels que l'éthanol, l'isopropanol et leurs mélanges,
- [0144] - les glycols en C2-C8 tels que l'éthylène glycol, le propylène glycol, le 1,3-butylène glycol, le dipropylène glycol, et leurs mélanges,
- [0145] - les polyols en C2-C32 tels que les polyglycérols, les polyéthylènes glycols, et leurs mélanges,
- [0146] - et leurs mélanges.
- [0147] Elle peut comprendre également des gélifiants hydrophiles, des antioxydants, des conservateurs et leurs mélanges.
- [0148] A titre de « gélifiants hydrophiles », on peut citer notamment les polymères d'acide acrylique, les copolymères d'acides acrylique et méthacrylique, les polymères car-

boxyvinyliques, les gélifiants polysaccharidiques, les gommes naturelles ou modifiées, les gélifiants minéraux, et leurs mélanges.

- [0149] La teneur en gélifiant(s) hydrophile(s) dans la composition cosmétique de l'invention ira généralement de 0,01 % à 5 %, notamment de 0,1 % à 4 %, de préférence de 0,2 % à 3 % et de préférence encore de 0,5 % à 2 % en poids par rapport au poids total de ladite composition.
- [0150] *Procédés cosmétiques et utilisations*
- [0151] Les procédés cosmétiques et utilisations cosmétiques décrits ci-dessous sont destinés à une application sur des matières kératiniques, notamment sur des matières kératiniques saines, de préférence des peaux et/ou des lèvres saines, en particulier sur une peau fatiguée, une peau atone, impactée par un contexte nutritionnel défavorable ou déséquilibré, de stress émotionnel ou de manque de sommeil, une peau sèche et/ou une peau exposée à un stress oxydant.
- [0152] Par « matières kératiniques saines » selon l'invention on entend des matières kératiniques ne présentant pas de troubles ou de désordres qui relèveraient d'un état pathologique (sujets 'non sains', atteints d'une pathologie).
- [0153] Un autre objet de l'invention porte donc sur un procédé cosmétique de soin et/ou de maquillage des matières kératiniques, plus particulièrement de la peau et/ou des lèvres et notamment de la peau du visage et/ou du cou, comprenant l'application topique sur lesdites matières kératiniques, d'une composition cosmétique selon l'invention.
- [0154] Dans le cadre de la présente invention, ledit procédé cosmétique est destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.
- [0155] Dans un mode de réalisation particulier, les procédés cosmétiques selon l'invention sont caractérisés en ce que ladite composition cosmétique selon l'invention est appliquée sur une peau fatiguée, une peau atone, impactée par un contexte nutritionnel défavorable ou déséquilibré, de stress émotionnel ou de manque de sommeil, une peau sèche et/ou une peau exposée à un stress oxydant.
- [0156] Selon un autre mode de réalisation, l'utilisation cosmétique d'un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* selon l'invention est caractérisée en ce que l'extrait est utilisé en tant qu'actif destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.
- [0157] La présente invention va désormais être illustrée dans les exemples non limitatifs suivants.
- [0158] Les % sont exprimés en poids de matière première par rapport au poids total de la

composition, sauf indication contraire.

## EXEMPLES

- [0159] Les études menées par la Demanderesse et illustrées dans les exemples ci-après visent à évaluer les différentes activités biologiques de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans les compositions selon la présente invention. Notamment l'extrait de levure utilisé dans ces exemples et désigné indifféremment « extrait de levure *Metschnikowia rubicola* », « extrait de levure de rose » ou « Nectarosa », correspond à l'extrait obtenu selon le procédé d'extraction illustré à l'Exemple 1.
- [0160] Exemple 1 : Extrait de levure *Metschnikowia rubicola* utilisé dans les compositions selon l'invention
- [0161] L'extrait de levure utilisé dans les exemples ci-après est un hydrolysate obtenu par la mise en œuvre des étapes suivantes :
- [0162] - Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau à raison de 80-90 g/L,
- [0163] - Hydrolyse enzymatique,
- [0164] - Inactivation enzymatique par traitement thermique, notamment à une température allant de 65°C à 95°C, de préférence allant de 75°C à 85°C,
- [0165] - Séparation des phases soluble et insoluble,
- [0166] - Purification par ultracentrifugation de la phase soluble pour éliminer les molécules de tailles supérieures à 5 kDa, et
- [0167] - Filtration et filtration stérilisante.
- [0168] A l'issue de ce procédé, on obtient un extrait aqueux caractérisé par :
- [0169] - Une teneur en matières sèches de 24,6 à 32 g/L,
- [0170] - Une quantité de sucres (mesurée selon la méthode de Dubois) de 6,1 à 15,4 g/L (environ 24,8%-48% de l'extrait sec) dont une partie se présente sous forme d'oligosaccharides constitués de glucose et de mannose,
- [0171] - une quantité de peptides (mesurée selon la méthode KJELDHAL) de 10,2 à 11,3 g/L (environ 35,3 à 41,5%, de l'extrait sec), et
- [0172] - une quantité de cendres minérales de 7,8 à 8,8 g/L (environ 30% à 40% de l'extrait sec).
- [0173] Exemple 2 : Effets de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* sur l'expression de gènes dans des kératinocytes humains normaux
- [0174] Cette étude, menée sur des cultures de kératinocytes, illustre les effets de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* sur l'expression de gènes clés impliqués dans plusieurs processus cutanés d'intérêt tels que la fonction barrière, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, et l'amélioration de la synthèse de matrice

extra-cellulaire de l'épiderme.

[0175] Cellules étudiées

[0176] Les cellules utilisées sont des kératinocytes humains normaux (ou KHN) issus d'une plastie abdominale. Les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture EpiLife® complémenté avec du HKGS (Human Keratinocytes Growth Supplement) à une densité d'ensemencement de 50 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits.

[0177] Traitement des cellules avec l'extrait de levure de rose

[0178] A 50 % de confluence, les cellules KHN ont été traitées avec l'extrait de levure de rose préparé extemporanément à la concentration finale d'utilisation dans du milieu EpiLife® complémenté avec du HKGS. Après 24 heures de traitement, les cellules sont récupérées afin d'en extraire les ARN totaux.

[0179] Mesure de l'expression génique par RT-PCR quantitative

[0180] - Obtention des ARN totaux à l'aide du MicrolabSTAR (Hamilton)

[0181] Le milieu de culture des cellules a été éliminé et les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit Nucleospin RNA (Macherey-Nagel). Les cellules ont été raclées à l'aide d'un Cell Scraper puis, le lysat cellulaire a été récupéré dans une deepwell 1,2 mL (fourni dans le kit Nucleospin RNA). Les ARN totaux ont été extraits selon les protocoles mis au point.

[0182] Les solutions d'ARN totaux obtenues sont dosées, et leur qualité vérifiée, à l'aide d'un lecteur de microplaques, le DropSense96 (Unchained Labs) couplé au MicrolabSTAR. Cet appareil est relié à l'ordinateur pilotant la plateforme Robotique et possède le logiciel spécifique d'analyse des résultats (Lunatic Analysis). La technique nécessite une microplaque de 96 puits (Lunatic plate).

[0183] - Synthèse des ADN complémentaires

[0184] Le kit de reverse transcription (RT) High Capacity Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) est utilisé selon le protocole fourni. 500 ng d'ARN totaux ont été dilués dans de l'eau pour un volume final de 25µL. Ils ont ensuite été incubés pendant 10 minutes à 25°C puis 2 heures à 37°C en présence de 25 µL de mélange réactionnel de High Capacity Reverse Transcription Kit 2X préalablement préparé comme indiqué dans le tableau 1. Les différentes incubations sont faites au sein du TRobot (Biométra).

[0185] [Tableaux1]

Réactifs	RT buffer	dNTP	Random Primer	RNase OUT	RT	H2O
Volume	5 µL	2 µL	5 µL	0,5 µL	2,5 µL	10 µL

[0186] - Réalisation de la PCR-TaqMan Low Density Array

[0187] Pour chaque RT, 25 µL du mélange d'ARN totaux avec les composants du kit RT ont été mélangés à 100 µl d'eau puis 125 µL de TaqMan Gene Expression master mix 2X

(ThermoFisher) ont été ajoutés. Après homogénéisation, 100 µL ont été déposés sur des cartes de microfluidiques de 96 gènes spécifiques pour les KHN. Après remplissage des différentes cupules, ces cartes ont été centrifugées puis scellées.

[0188] Le CD correspondant au profil des gènes déposés sur les plaques et précisant l'emplacement de chaque gène est chargé dans l'appareil QuantStudio 7 FLEX (Thermo Fisher). Le gène contrôle (ou « endogeneous » gene) à utiliser pour la normalisation des résultats a été indiqué avant le lancement de la PCR. Cette dernière est réalisée selon le protocole fourni par LifeTechnologies. Les étapes de la qPCR sont 2 min à 50°C, 10 min à 94,5°C puis 30s à 97°C et 1 min à 59,7°C pour 40 cycles.

[0189] *Analyse statistique*

[0190] La PCR quantitative en temps réel peut être exploitée si son efficacité est comprise entre 90 % et 110 %. Pour chaque échantillon, le nombre de cycles auquel apparaît le signal a été déterminé par le logiciel SDS 2.4. Pour un même essai, les niveaux d'expression des transcrits d'intérêt obtenus ont été normalisés par rapport à la valeur obtenue pour le gène de ménage Beta-2-microglobuline. Ce gène dont l'expression est constitutive et invariante permet de s'affranchir toutes variations induites au cours de l'expérience (dosage des ARNs totaux, pipetages, étape de reverse transcription, PCR dans l'appareillage).

[0191] Dans la méthode de RT-PCR TLDA, la quantification est effectuée en utilisant la méthode comparative de  $\Delta\Delta Ct$ . Les valeurs de quantification relative (RQ) obtenues correspondent au niveau d'amplitude (x fois plus ou moins que le contrôle) de l'expression par rapport à notre contrôle, ici le non irradié. Le RQ est obtenu par le calcul suivant où le contrôle est égal à 1 :  $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ traité} - \Delta Ct \text{ non traité})}$

[0192]  $\Delta Ct \text{ traité} = Ct \text{ gène cible traité} - Ct \text{ gène de ménage traité}$

[0193]  $\Delta Ct \text{ non traité} = Ct \text{ gène cible non traité} - Ct \text{ gène de ménage non traité}$

[0194] Afin d'évaluer des variations d'activité transcriptionnelle statistiquement significative, le test t de Student a été utilisé. Chaque condition a été réalisée en triplicat (3 non traités et 3 traités dans les mêmes conditions). Le test-F de Fischer a tout d'abord été appliqué en comparant les deux matrices de données. Lorsque la valeur est supérieure à  $\alpha > 0,05$  alors la variance pour le test t de Student est de 2, lorsque le test-F de Fischer est inférieur à  $\alpha < 0,05$  alors la variance sera égale à 3. Les variations transcriptionnelles retenues sont celles un test t de Student inférieur ou égal à  $p = 0,05$  et dont les valeurs de RQ sont soit inférieures à 0,75 soit supérieures à 1,5.

[0195] Résultats

[0196] [Tableaux2]

Voie biologique	Symbole	Gène	Effet extrait levure de rose comparé au control non traité
Différenciation ; Formation de la barrière cutanée	TGM1	Transglutaminase 1	+127%
	SPRR	Cornifin/ Small Proline Rich Protein	+190%
	ZNF750	Zinc finger Protein 750	+210%
Cohésion ; jonctions cellulaires ; commu- nication	OCN	Occludin	+57%
	CLDN1	Claudin 1	+66%
	DSG	Desmoglein	+265%
Synthèse de la Matrice extracellulaire ; Flux hydriques ; Hy- dratation	AQP3	Aquaporin 3 (Gill Blood Group)	+94%
	AQP9	Aquaporin 9	+205%
	FABP5	Fatty Acid Binding Protein 5	+69%
	HAS-3	Hyaluronan Synthase 3	+51%

[0197] Tableau 2 : Expression génique dans des cultures de KHN

[0198] Ces résultats montrent donc que l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* stimule l'expression de gènes clefs impliqués dans plusieurs processus cutanés d'intérêt tels que la fonction barrière, l'hydratation de la peau et l'amélioration de la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

[0199] Exemple 3 : Effets de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* sur *S. epidermidis*

[0200] Cette étude, menée sur des cultures de *S. epidermidis*, illustre les effets de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* sur la survie des souches bactériennes et donc l'équilibre du microbiote cutané, en condition de stress UV ou non.

[0201] 3.1. Matériel et méthodes

[0202] Souche bactérienne utilisée

[0203] La souche bactérienne utilisée est :

[0204] - *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990, *S. epidermidis*), cultivé dans du milieu EpiLife® sans hydrocortisone et sans antibiotique sur gélose Mueller-Hinton.

[0205] Composés testés

[0206] L'extrait de levure de rose a été utilisé pour étudier ses effets sur les souches bactériennes *S. epidermidis*. Les concentrations utilisées sont soit 2.5% soit 0.278% de matière première (extrait aqueux).

- [0207] *Etude de la croissance et de la viabilité bactérienne*
- [0208] - Suspensions bactériennes, culture
- [0209] Après amplification des différentes souches bactériennes en milieu de culture, pour chaque bactérie, des suspensions bactériennes ont été préparées. Chaque souche a été reprise dans le milieu d'essai et ajustée à une densité optique à 600 nm (DO600 nm) égale à 0.1.
- [0210] La suspension bactérienne de chaque souche a été transférée dans des plaques 96 puits et les cultures bactériennes ont été pré-cultivées à 37°C sous agitation dans l'appareil EPOCH2 (BioTek Instruments) à environ 280 rpm (rotation par minute) pendant 4 heures.
- [0211] - Traitement des cultures avec l'extrait de levure de rose
- [0212] • Conditions basales
- [0213] Au temps 4 heures, l'extrait de levure de rose a été ajouté ou non (condition témoin) et les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C sous agitation (EPOCH2, BioTek Instruments) à environ 280 rpm pendant 24 heures.
- [0214] • Conditions irradiées
- [0215] Au temps 4 heures, les cultures bactériennes ont été irradiées avec des UVA à 1 J/cm<sup>2</sup>. La lampe utilisée était la chambre d'irradiation Opsytec BS-02. Après irradiation l'extrait de levure de rose a été ajouté ou non (condition témoin) et les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C sous agitation (EPOCH2, BioTek Instruments) à environ 280 rpm pendant 24 heures.
- [0216] Toutes les conditions expérimentales ont été réalisées en triplicat (n=3) excepté les conditions témoins qui ont été reproduites 12 fois (n=12) pour chaque souche.
- [0217] Tout au long de ces étapes, les densités optiques à 600 nm (DO600nm) ont été lues avec un spectrophotomètre (EPOCH2, BioTek Instruments) en cinétique continue pendant 4 + 24 heures.
- [0218] - Evaluation de la viabilité bactérienne et test XTT
- [0219] Après incubation, la viabilité bactérienne a été évaluée à l'aide d'un kit de réduction du XTT (Cell Proliferation Kit II, Roche) selon les instructions du fournisseur. Ce kit mesure la densité optique à 450 nm avec une longueur d'onde de référence de 620 nm.
- [0220] Les bactéries ont été incubées en présence de XTT (sel de tétrazolium) qui est réduit en cristaux de formazan hydrosolubles oranges par les déshydrogénases de la membrane cytoplasmique bactérienne au cours du métabolisme bactérien. Cette transformation est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et à leur activité métabolique.
- [0221] En parallèle, des puits contenant le milieu d'essai ou l'extrait de levure de rose (sans bactéries) ont été incubés en présence de XTT afin de déterminer l'éventuelle interférence de l'extrait testé avec la méthode d'analyse. Les densités optiques (DO) ont

été enregistrées avec un lecteur de microplaques (VERSAmax, Molecular Devices).

[0222] *Traitement des données*

[0223] Les données brutes ont été transférées et traitées sous le logiciel Microsoft Excel et le logiciel GraphPad PRISM.

[0224] Les comparaisons intergroupes ont été réalisées à l'aide du test t de Student bilatéral non apparié. Les analyses statistiques peuvent être interprétées si  $n \geq 5$  ; cependant pour  $n < 5$ , les données calculées ne sont fournies qu'à titre indicatif.

[0225] *Formules utilisées dans ce rapport*

[0226] Erreur standard de la moyenne :

[0227]  $esm = \text{écarttype (Sd)} / \sqrt{n}$

[0228] L'erreur standard de la moyenne (esm) représente l'écart de la moyenne de l'échantillon par rapport à la moyenne de la vraie population. L'esm est calculé en divisant le Sd par la racine carrée de la taille n de l'échantillon.

[0229] Pourcentage de viabilité :

[0230]  $\text{viabilité (\%)} = (\text{DO composé} / \text{DO témoin}) \times 100$

[0231] *Résultats*

[0232] - L'extrait de levure de rose stimule et protège la croissance de *S. epidermidis*

[0233] Les résultats obtenus pour *S. epidermidis* irradié ou non, traité ou non avec l'extrait de levure de rose ont été analysés et retranscrits à la [Fig.1].

[0234] L'irradiation UV diminue la croissance de *S. epidermidis*, mais l'extrait de levure de rose stimule la croissance de *S. epidermidis* avec ou sans exposition UV. L'extrait de levure de rose a donc un effet de protection de la croissance de *S. epidermidis* en présence d'UV.

[0235] Exemple 4 : Effets du sécrétome des souches bactériennes *S. epidermidis* et *S. aureus* sur la viabilité des kératinocytes

[0236] Cette étude, menée sur des cultures de *S. epidermidis*, *S. aureus* et de kératinocytes, illustre les effets du sécrétome des souches bactériennes sur la viabilité des kératinocytes.

[0237] *4.1. Matériel et méthodes*

[0238] *Souches bactériennes et cellules utilisées*

[0239] Les souches bactériennes utilisées sont :

[0240] - *Staphylococcus aureus* (ATCC 6338, *S. aureus*), cultivé dans du milieu EpiLife® sans hydrocortisone et sans antibiotique sur gélose Mueller-Hinton ;

[0241] - *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990, *S. epidermidis*), cultivé dans du milieu EpiLife® sans hydrocortisone et sans antibiotique sur gélose Mueller-Hinton.

[0242] Les cellules utilisées sont des kératinocytes humains normaux (ou KHN) issus d'une plastie abdominale. Les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture EpiLife® complétementé avec du HKGS (Human Keratinocytes Growth Supplement) à une

densité d'ensemencement de 50 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits.

[0243] *Production de sécrétomes et traitement des kératinocytes*

[0244] - Suspensions bactériennes, culture

[0245] Après amplification des différentes souches bactériennes en milieu de culture, pour chaque bactérie des suspensions bactériennes ont été préparées. Chaque souche a été reprise dans le milieu d'essai et ajustée à une densité optique à 600 nm (DO600 nm) égale à 0.1.

[0246] La suspension bactérienne de chaque souche a été transférée dans des plaques 6 puits et les cultures bactériennes ont été pré-cultivées à 37°C sous agitation dans l'appareil (New Brunswick Scientific Excella E24) à environ 120 rpm pendant 4 heures.

[0247] - Obtention des sécrétomes

[0248] Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 7000 g pendant 7 minutes pour récupérer les sécrétomes qui ont ensuite été filtrés à 0.22 µm.

[0249] - Dosage des protéines totales

[0250] La quantité de protéines totales a été mesurée dans les surnageants des conditions sans bactéries (conditions contrôle) et dans les sécrétomes à l'aide d'un kit DC Protein Assay (Bio-Rad) contre une gamme de BSA (Albumine de serum bovin) avec un lecteur de microplaques à 750 nm (VERSAmax, Molecular Devices). Le kit DC Protein Assay a une limite de détection inférieure de 0,2 mg/mL et une limite de détection supérieure de 2 mg/mL.

[0251] - Traitement des kératinocytes avec les sécrétomes des souches bactériennes

[0252] Des kératinocytes humains normaux sont ensemencés dans des plaques 96 puits à raison de  $15 \times 10^3$  cellules par puit. 24 heures après ensemencement, les cellules sont traitées avec les sécrétomes de *S. epidermidis* à une dilution 1/2 et de *S. aureus* à une dilution 1/16. La cytotoxicité est évaluée après 24 heures de traitement à l'aide d'un test PREMIX WST-1 en suivant les recommandations du fournisseur.

[0253] *Traitement des données*

[0254] Les données brutes ont été transférées et traitées sous le logiciel Microsoft Excel et le logiciel GraphPad PRISM.

[0255] Les comparaisons intergroupes ont été réalisées à l'aide du test t de Student bilatéral non apparié. Les analyses statistiques peuvent être interprétées si  $n \geq 5$  ; cependant pour  $n < 5$ , les données calculées ne sont fournies qu'à titre indicatif.

[0256] *Formules utilisées dans ce rapport*

[0257] Erreur standard de la moyenne :

[0258]  $esm = \text{écarttype (Sd)} / \sqrt{n}$

[0259] L'erreur standard de la moyenne (esm) représente l'écart de la moyenne de l'échantillon par rapport à la moyenne de la vraie population. L'esm est calculé en divisant le Sd par la racine carrée de la taille n de l'échantillon.

[0260] Pourcentage de viabilité :

[0261]  $\text{viabilité (\%)} = (\text{DO composé} / \text{DO témoin}) \times 100$

[0262] 4.2. Résultats

[0263] - Le sécrétome de *S. aureus* est plus cytotoxique pour les kératinocytes, que celui de *S. epidermidis*.

[0264] Les résultats obtenus pour le traitement des kératinocytes avec les sécrétomes de *S. epidermidis* et *S. aureus* ont été analysés et retranscrits à la [Fig.2].

[0265] Il faut diluer le sécrétome de *S. aureus* au seizième (1/16) pour que celui-ci ne présente pas de toxicité pour les kératinocytes humains, tandis que le sécrétome de *S. epidermidis* ne présente pas de toxicité à une dilution au demi (1/2). Ainsi, le sécrétome de *S. aureus* est bien plus cytotoxique pour les cellules de la peau humaine que celui de *S. epidermidis*.

[0266] Exemples 5 : Nectarosa renforce l'écosystème cutané

[0267] Dans cette étude, des cultures de kératinocytes humains ont été traitées avec le sécrétome provenant de souches *S. epidermidis*. Ces souches ont été elles-mêmes cultivées selon deux conditions différentes : en contact ou non avec Nectarosa. Les kératinocytes sont donc traités avec soit des sécrétomes de *S. epidermidis* non traités au préalable avec Nectarosa, soit préalablement traités avec Nectarosa. Cette étude illustre les effets de l'extrait de levure *Metschnikowia rubicola* sur l'impact transcriptionnel du microbiote de la peau humaine sur des kératinocytes humains.

[0268] 5.1. Matériel et méthodes

[0269] Souche bactérienne et cellules utilisées

[0270] La souche bactérienne utilisée est *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990, *S. epidermidis*), cultivée dans du milieu EpiLife® sans hydrocortisone et sans antibiotique sur gélose Mueller-Hinton.

[0271] Les cellules utilisées sont des kératinocytes humains normaux (ou KHN) issus d'une plastie abdominale. Les cellules ont étéensemencées dans du milieu de culture EpiLife® complété avec du HKGS (Human Keratinocytes Growth Supplement) à une densité d'ensemencement de 50 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits.

[0272] Production de sécrétomes et traitement des kératinocytes

[0273] - Suspensions bactériennes, culture

[0274] Après amplification des différentes souches bactériennes en milieu de culture, pour chaque bactérie des suspensions bactériennes ont été préparées. Chaque souche a été reprise dans le milieu d'essai et ajustée à une densité optique à 600 nm (DO600 nm) égale à 0.1.

[0275] La suspension bactérienne de chaque souche a été transférée dans des plaques 6 puits et les cultures bactériennes ont été pré-cultivées à 37°C sous agitation dans l'appareil (New Brunswick Scientific Excella E24) à environ 120 rpm pendant 4 heures.

- [0276] - Traitement des bactéries
- [0277] Au temps 4 heures, l'extrait de levure de rose a été ajouté à une concentration 0.278% (poids d'extrait) ou non (condition témoin) et les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C sous agitation (EPOCH2, BioTek Instruments) à environ 280 rpm pendant 24 heures.
- [0278] - Obtention des sécrétomes
- [0279] Les cultures bactériennes ont été centrifugées à 7000 g pendant 7 minutes pour récupérer les sécrétomes qui ont ensuite été filtrés à 0.22 µm.
- [0280] - Dosage des protéines totales
- [0281] La quantité de protéines totales a été mesurée dans les surnageants des conditions sans bactéries (conditions contrôle), traitées avec le composé, et dans les sécrétomes à l'aide d'un kit DC Protein Assay (Bio-Rad) contre une gamme de BSA (Albumine de serum bovin) avec un lecteur de microplaques à 750 nm (VERSAmax, Molecular Devices). Le kit DC Protein Assay a une limite de détection inférieure de 0,2 mg/mL et une limite de détection supérieure de 2 mg/mL.
- [0282] - Traitement des kératinocytes avec les sécrétomes des souches bactériennes
- [0283] Des kératinocytes humains normaux sontensemencés dans des plaques 96 puits à raison de 15 x 10<sup>3</sup> cellules par puits. 24 heures après ensemencement, les cellules sont traitées avec les sécrétomes de *S. epidermidis* à une dilution 1/2.
- [0284] - Mesure de l'expression génique par RT-PCR quantitative
- [0285] Après 24 heures de traitement, les cellules sont récupérées afin d'en extraire les ARN totaux et de mesurer l'expression génique par RT-PCT, selon le protocole utilisé dans l'exemple 2.
- [0286] 5.2. Résultats
- [0287] - Nectarosa améliore la réponse transcriptionnelle des cellules de la peau humaine en réponse au sécrétome de *S. epidermidis*.
- [0288] Les résultats obtenus pour le traitement des kératinocytes avec le sécrétome de *S. epidermidis*, traités ou non avec Nectarosa, ont été analysés et retranscrits à la [Fig.3].
- [0289] L'expression de la transglutaminase I, Claudine I, HAS-3 et AQP3 est évaluée pour les kératinocytes mis en contact avec le sécrétome de *S. epidermidis* seul (condition SE) ou pour le sécrétome de *S. epidermidis* préalablement traité avec Nectarosa (condition SE + NTS).
- [0290] L'expression de ces différents marqueurs est plus élevée pour la condition SE + NTS que pour la condition SE. Nectarosa améliore la réponse transcriptionnelle des cellules de la peau en réponse au sécrétome de *S. epidermidis*.
- [0291] Exemple 6 : Formulations cosmétiques
- [0292] Les compositions sont préparées selon les méthodes classiques utilisées dans le domaine cosmétique. Les % sont exprimés en poids de matière première par rapport au

poids total de ladite composition.

[0293] *Composition sous forme d'une crème*

[0294] [Tableaux3]

Matière première	Quantité
Extrait de levure <i>Metschnikowia rubicola</i> *	0,5 %
Triclycéride d'acides caprylic/capric	10 %
Glycérine	7 %
Alcool cetearylique	3 %
Hydroxystearate d'isostearyle	2 %
Isononanoate d'isotridécyle	2 %
Steareth-21	1 %
Polyacrylate de sodium	1 %
Gomme de xanthane	0,5 %
Phenoxyéthanol	0,5 %
Hyaluronate de sodium	0,5 %
Acetate de tocopherol (vitamine E)	0,05 %
Palmitate de vitamine A	0,1 %
Glucoside d'ascorbyle (vitamine CG)	2 %
Eau	qsp 100 %

[0295] \*tel que décrit dans le matériel et méthode

[0296] Appliquée sur la peau du visage, la crème améliore la barrière cutanée et l'hydratation de la peau.

[0297] *Composition sous la forme d'un sérum*

[0298] [Tableaux4]

Matière première	Quantité
Extrait de levure <i>Metschnikowia rubicola</i> *	3 %
Alcool	5 %
Glycols	8 %
Isononanoate d'isotridecyle	4 %
Squalane	2 %
Triglycérade d'acides caprylique/caprique	2 %
Methyl gluceth-20	2 %
Steareth-2	0,5 %
Steareth-21	0,5 %
Carbomer	0,3 %
Hyaluronate de sodium	0,2 %
Gomme de xanthane	0,1 %
Hydroxide de sodium	0,1 %
Adénosine	0,04 %
Eau	Qsp 100 %

[0299] \*tel que décrit dans le matériel et méthode

[0300] Appliqué sur la peau du visage, le sérum permet d'améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme, l'équilibre du microbiote cutané et favorise la fonction barrière cutanée.

## REFERENCES

- [0301] 1. S.Guest et al., *Effect of hydration on the tactile and thermal sensitivity of the lip*, , *Physiology & Behavior* 123 (2014), 127-135.
- [0302] 2. Vannette, R.L., Fukami, T.. *Contrasting effects of yeasts and bacteria on floral nectar traits. Annals of Botany* 121, 1343–1349 (2018).
- [0303] 3. Kurtzman et al., *Four new species of Metschnikowia and the transfer of seven Candida species to Metschnikowia and Clavispora as new combinations, Antonie van Leeuwenhoek* 111, 2017–2035 (2018).
- [0304] 4. Dubois M. et al., *Analytical chemistry*, 28, 3, 350-356, 1956.
- [0305] 5. *Official method of analysis of the A.O.C.*, 12th ed. W Horwitz, E.D., New-York, 15-60, 1975.

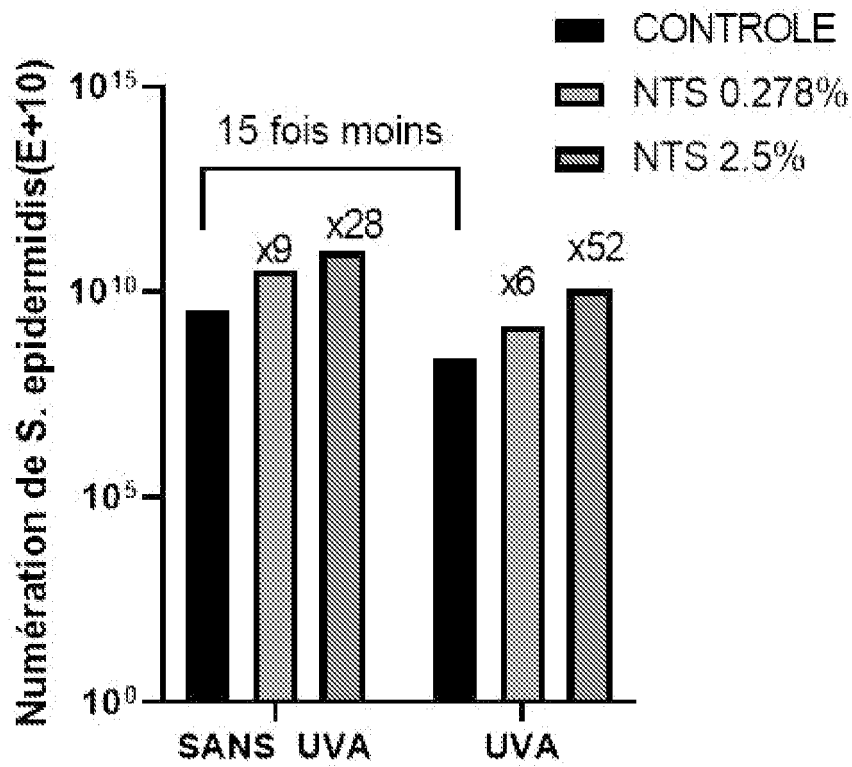
## Revendications

- [Revendication 1] Composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, au moins un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* et au moins un adjuvant cosmétique choisi dans le groupe constitué par les agents antioxydants, les parfums, les vitamines, les huiles, les agents épaississants, les agents émoullissants, les agents hydratants, les agents anti-âge, et leurs mélanges.
- [Revendication 2] Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que la levure est la souche identifiée par le numéro CLIB n°2141.
- [Revendication 3] Composition cosmétique selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce que ladite levure *Metschnikowia rubicola* est isolée à partir du nectar de rose de la variété Evanrat.
- [Revendication 4] Composition cosmétique selon l'une quelconque de revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est un hydrolysate de levure *Metschnikowia rubicola*.
- [Revendication 5] Composition cosmétique selon l'une quelconque de revendications 1 à 4, caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est obtenu par un procédé comprenant au moins les étapes de :
- a) Solubilisation de la biomasse de *Metschnikowia rubicola* dans l'eau,
  - b) Hydrolyse(s) enzymatique(s),
  - c) Inactivation enzymatique par traitement thermique,
  - d) Séparation des phases soluble et insoluble pour récupérer la phase soluble,
  - e) Concentration(s),
  - f) Filtration(s), et
  - g) Filtration(s) stérilisante(s).
- [Revendication 6] Composition cosmétique selon l'une quelconque de revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit extrait de levure *Metschnikowia rubicola* est présent dans la composition en une teneur allant de 0,01 % à 10 %, de préférence de 0,05 % à 5 %, de préférence encore de 0,1 % à 3 % en poids de matière première par rapport au poids total de la composition.
- [Revendication 7] Composition cosmétique selon l'une quelconque de revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est sous la forme d'une crème, émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile ou émulsion multiple, solution, huile, suspension, gel, lait, lotion, sérum, baume, stick ou poudre.
- [Revendication 8] Procédé cosmétique de soin et/ou de maquillage des matières kératiniques saines, plus particulièrement de la peau saine et/ou des lèvres

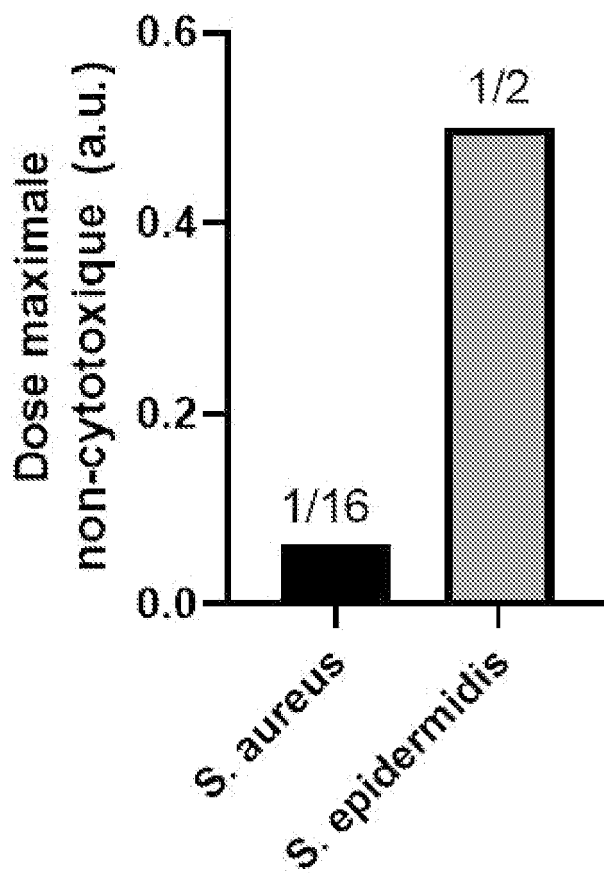
saines et notamment de la peau du visage et/ou du cou, comprenant l'application topique sur lesdites matières kératiniques saines, d'une composition cosmétique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 7.

- [Revendication 9] Procédé cosmétique selon la revendication 8, caractérisé en ce que qu'il destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.
- [Revendication 10] Procédé cosmétique selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que ladite composition cosmétique est appliquée sur une peau fatiguée, une peau atone, impactée par un contexte nutritionnel défavorable ou déséquilibré, de stress émotionnel ou de manque de sommeil, une peau sèche et/ou une peau exposée à un stress oxydant mais saine.
- [Revendication 11] Utilisation cosmétique sur des matières kératiniques saines d'un extrait de levure *Metschnikowia rubicola* tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5, en tant qu'actif destiné à favoriser et/ou stimuler la fonction barrière cutanée, l'hydratation de la peau, l'équilibre du microbiote cutané, notamment de la souche *Staphylococcus epidermidis*, et/ou améliorer la synthèse de matrice extra-cellulaire de l'épiderme.

[Fig. 1]

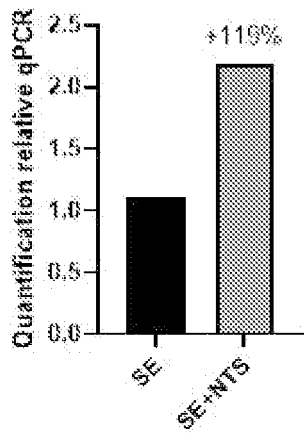


[Fig. 2]

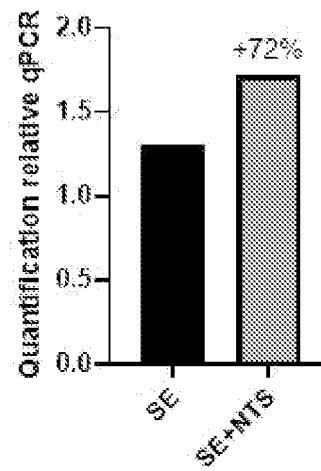


[Fig. 3]

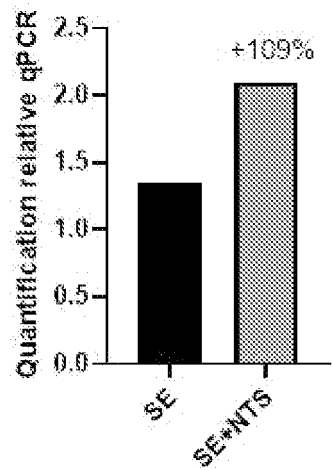
Expression de la Transglutaminase I



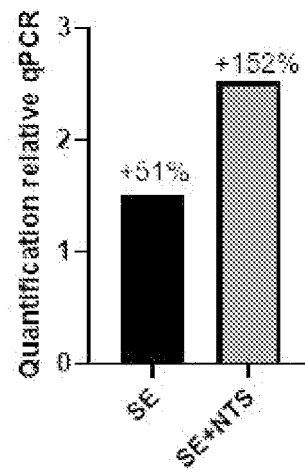
Expression de la Claudine I



expression de HAS-3



Expression de AGP3



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

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

**FA 915455**  
**FR 2213461**

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		
<b>X</b>	<b>FR 3 077 205 A1 (SOC IND LIMOUSINE DAPPLICATION BIOLOGIQUE [FR]) 2 août 2019 (2019-08-02) * le document en entier *</b> -----	<b>1-11</b>	<b>A61K 36/00 A61K 8/9728 A61P 17/00 A61Q 19/00</b>
<b>X</b>	<b>DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 9 octobre 2020 (2020-10-09), anonymous: "Day Hack Matte Moisturiser", XP093032167, Database accession no. 8152363 * abrégé *</b> -----	<b>1-11</b>	
<b>A</b>	<b>WO 2020/126653 A1 (LVMH RECH [FR]) 25 juin 2020 (2020-06-25) * le document en entier *</b> -----	<b>1-11</b>	
			<b>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)</b>
			<b>A61K</b>
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
<b>12 juillet 2023</b>		<b>Merckling-Ruiz, V</b>	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : arrière-plan technologique  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p>			
<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  .....  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2213461 FA 915455**

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 **12-07-2023**  
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	
<b>FR 3077205</b>	<b>A1</b>	<b>02-08-2019</b>	<b>EP 3746185 A1</b>	<b>09-12-2020</b>
			<b>FR 3077205 A1</b>	<b>02-08-2019</b>
			<b>US 2021059928 A1</b>	<b>04-03-2021</b>
			<b>WO 2019149754 A1</b>	<b>08-08-2019</b>
-----				
<b>WO 2020126653</b>	<b>A1</b>	<b>25-06-2020</b>	<b>CN 113316448 A</b>	<b>27-08-2021</b>
			<b>EP 3897566 A1</b>	<b>27-10-2021</b>
			<b>FR 3090380 A1</b>	<b>26-06-2020</b>
			<b>JP 2022515409 A</b>	<b>18-02-2022</b>
			<b>KR 20210107724 A</b>	<b>01-09-2021</b>
			<b>US 2022047495 A1</b>	<b>17-02-2022</b>
			<b>WO 2020126653 A1</b>	<b>25-06-2020</b>
-----				