

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la
Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2018/206751 A1

(43) Date de la publication internationale
15 novembre 2018 (15.11.2018)

WIPO | PCT

(51) Classification internationale des brevets :

A61Q 19/00 (2006.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61Q 19/08 (2006.01) *A61Q 5/00* (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2018/062186

(22) Date de dépôt international :

11 mai 2018 (11.05.2018)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

1770486 12 mai 2017 (12.05.2017) FR
1870189 22 février 2018 (22.02.2018) FR

(71) Déposants : **ISP INVESTMENTS LLC** [US/US] ; 1011 Centre Road, Suite 315, Wilmington, Delaware 19805 (US).
JALA GROUP CO. [CN/CN] ; No. 12 Lifeng Road, Fengxian District, SHANGHAI (CN).

(72) Inventeur; et

(71) **Déposant (pour BZ seulement) : OGER, Elodie** [FR/FR] ; 410 Chemin du Puissanton, 06220 VALLAURIS (FR).

(72) **Inventeurs : BONNANS, Magali** ; 67 route de l'Esteron, 06830 GILETTE (FR). **BOTTO, Jean-Marie** ; 2 Porte Dorée, GARBEJAIRE, 06560 VALBONNE (FR). **CHABERT, Rachel** ; 99 AV Sidi Brahim, 06130 GRASSE (FR). **DOS SANTOS, Morgan** ; 20 Allée des Lauriers La Maladière, 38160 SAINT-VERAND (FR). **JIANG, Shanshan** ; 789 Fuzhuo Road, Building 59, Room 2202, Minhang District, SHANGHAI, 201111 (CN).

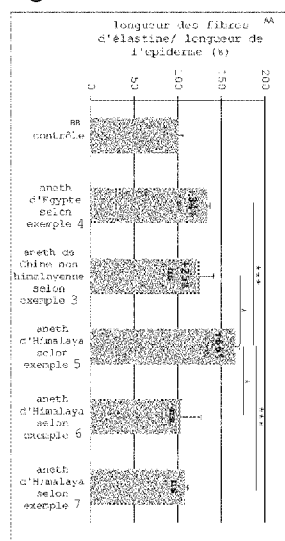
(74) **Mandataire : AXE PI** ; 7 Place Ile de Beauté, 06300 NICE (FR).

(81) **États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

(54) **Title:** COMPOSITION COMPRISING A SMALL-RNA-ENRICHED AQUEOUS EXTRACT OF ANETHUM GRAVEOLENS, AND COSMETIC USES THEREOF

(54) **Titre :** COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT AQUEUX D'ANETHUM GRAVEOLENS ENRICHI EN PETITS ARN ET SES UTILISATIONS COSMETIQUES

Fig. 4



AA length of elastin fibres / length of epidermis (%)
BB control
4 Dill from Egypt according to example 4
3 Dill from non-Himalayan parts of China, according to example 3
aneth. c'Himalaya selon exemple 5
aneth. c'Himalaya selon exemple 6
aneth. c'Himalaya selon exemple 7

(57) **Abstract:** The invention relates to a cosmetic composition comprising, as an active agent, in a physiologically acceptable medium, an effective amount of an aqueous extract of shoots of dill (*Anethum graveolens*), enriched with small RNAs having a maximum length of 150 nucleotides, obtained from a plant material according to the following steps: a) shoots of *Anethum graveolens* are brought into contact with water; b) tetrasodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is added to the mixture obtained in step (a) at a pH of between 10.5 and 11; c) the pH of the mixture obtained in step (b) is then adjusted to a value of between 6 and 8; d) the mixture obtained in step (c) is purified such as to remove residual solid plant material and obtain a purified aqueous crude extract; and e) the pH is checked and readjusted if necessary to a value of between 6 and 8, preferably between 6 and 6.5. The invention also relates to the cosmetic use of a composition according to the invention, used to care for the skin, scalp and skin appendages.

(57) **Abrégé :** L'invention concerne une composition cosmétique comprenant, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes suivantes selon lesquelles : a) on met en présence des parties aériennes d'*Anethum graveolens* avec de l'eau; b) on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a) à un pH compris entre 10,5 et 11; c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8; d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale solide résiduelle et obtenir un extrait brut aqueux purifié; et e) on contrôle le pH et on le réajuste si nécessaire à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5. L'invention concerne également l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

- *relative au droit du déposant de demander et d'obtenir un brevet (règle 4.17(ii))*
- *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17(iv))*

Publiée:

- *avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))*

COMPOSITION COMPRENANT UN EXTRAIT AQUEUX D'ANETHUM GRAVEOLENS
ENRICHI EN PETITS ARN ET SES UTILISATIONS COSMETIQUES

L'invention concerne un procédé d'obtention d'un extrait
5 d'*Anethum graveolens* aqueux enrichi en petits ARN (acides
ribonucléiques) d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides (nt)
ainsi que les extraits obtenus par le procédé et les compositions
cosmétiques comprenant de tels extraits et leurs utilisations
cosmétiques.

10 La famille des Apiacées (*Apiaceae*), appelées aussi Ombellifères,
est constituée de plantes dicotylédones et comprend près de 3
000 espèces réparties en 420 genres surtout présentes dans les
régions tempérées du monde. Cette famille inclut aussi des herbes
comme le persil, la coriandre, le fenouil. *Anethum graveolens*,
15 fait partie de la famille des *Apiaceae*. Son nom d'espèce admet
plusieurs synonymes tels que *Anethum sowa*, *Peucedanum graveolens*
et *Peucedanum sowa* (Janeen et al ; The Herb Society of America's
Essential Guide to Dill. Kirtland, Ohio: The Herb Society of
America, 2009). L'aneth odorant (*Anethum graveolens*) est
20 largement répandue dans le monde et est une espèce très riche en
différentes familles de molécules telles que des huiles
essentielles, des acides gras, des protéines, des carbohydrates,
de la furanocoumarine, des polyphénols, des minéraux et encore
beaucoup d'autres molécules biologiquement actives. Elle est
25 notamment très utilisée en médecine traditionnelle. Le nom de
l'aneth dérive d'un mot grec «aneeson» ou « aneeton » et signifie
« forte odeur ». Cette plante a une histoire longue et ancienne
dans de nombreux pays comme une herbe culinaire et médicinale.
Son utilisation est commune en médecine ayurvédique (médecines
30 traditionnelles de l'Inde), principalement pour lutter contre
l'inconfort abdominal et l'indigestion) (Jana et Shekhawat
Shekhawat GS. Phytochemical Analysis and Antibacterial Screening
of in vivo and in vitro Extracts of Indian Medicinal Herb:
Anethum graveolens. Res. J. Med. Plant. 2010a; 4(4):206-212.
35 2010; Janeen et al., The Herb Society of America's Essential

Guide to Dill. Kirtland, Ohio: The Herb Society of America, 2009). En France et dans plusieurs autres pays de l'Europe de l'ouest cette plante fait partie de nombreuses préparations médicinales traditionnelles pour ses propriétés digestives et fortifiantes qui subsistent encore aujourd'hui. La littérature scientifique décrit notamment des effets antimicrobien, anti-inflammatoire, analgésique, une protection des muqueuses respiratoires et des effets comme relaxant musculaire.

De nombreux extraits de graines d'aneth sont décrits dans la littérature en partie pour l'utilisation de ses huiles essentielles, en revanche peu d'études ont été réalisées sur des extraits issus des parties aériennes de l'aneth. De plus la plupart des extractions décrites d'aneth sont effectuées avec des solvants organiques de type apolaire et peu sont issus d'extraction avec un solvant polaire comme l'eau. De plus très peu de ces extraits sont revendiqués pour une utilisation cosmétique.

Malgré les différents produits cosmétiques anti-âge sur le marché pour le traitement de la peau, il reste un besoin de compositions cosmétiques efficaces appliquées topiquement qui présentent des effets anti-âges pour la peau et les cheveux en utilisant des ingrédients naturels comme agent actif.

Les produits dits « non naturels » et synthétisés chimiquement peuvent être perçus comme dangereux pour l'environnement ainsi que pour les personnes. En revanche, les produits naturels sont perçus comme supérieurs aux produits synthétisés chimiquement. De nombreux produits naturels extraits de plantes ou d'herbes sont connus pour contenir des agents antioxydants / radicaux libres qui peuvent neutraliser les effets des dégâts des radicaux libres tels que les polyphénols. L'aneth est une plante très riche en composés phénoliques et d'autres familles de molécules reconnues pour leurs effets bénéfiques sur la peau. En particulier, le procédé d'extraction décrit dans l'invention

permet d'enrichir l'extrait final avec des ARN de petit poids moléculaire.

Les protocoles d'extraction des acides ribonucléiques (ARN de petit poids moléculaire) classiquement décrits sont adaptés aux pratiques de laboratoire, et donc réalisés à petite échelle. Ils utilisent des solvants qui ne sont pas considérés comme des solvants cosmétiques (Zumbo, P. 2014 "Phenol-chloroform Extraction", 2014). De plus, ces protocoles d'extraction et purification ne permettent d'obtenir que la fraction d'acides nucléiques purifiée. Cette fraction d'acides nucléiques ARN ou ADN ou petits ARN est dépourvue de toute autre molécule d'intérêt telle que les métabolites secondaires, vitamines, sucres, peptides, etc. qui peuvent avoir des effets bénéfiques pour la peau et présentent donc un intérêt cosmétique.

L'invention a pour premier objet un procédé d'obtention d'un extrait aqueux d'*Anethum graveolens* enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides à partir d'une matière végétale comprenant les étapes suivantes :

a) Solubilisation des parties aériennes d'aneth avec de l'eau ;

b) auquel on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a), le pH du mélange étant compris entre 10,5 et 11 ;

c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en séparant la matière soluble de celle qui est insoluble c) de manière à récupérer un extrait brut aqueux ; et

e) on réalise au moins une filtration de l'extrait brut aqueux pour obtenir l'extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides dont le pH est contrôlé et si nécessaire réajusté à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

De plus, l'invention a pour deuxième objet un extrait aqueux des parties aériennes d'*Anethum graveolens* enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et dépourvu d'ADN, obtenu par le procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend en poids du poids total de l'extrait, de 5 à 30 g/kg d'extrait sec, 0,5 à 10 g/kg de fragments protéiques, 0,5 à 10 g/kg de sucres, 0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 50 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

L'invention a pour troisième objet une composition comprenant, en tant qu'agent actif anti-âge, un extrait selon l'invention, et un milieu physiologiquement acceptable.

L'invention a plus particulièrement pour objet une composition cosmétique comprenant, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes suivantes selon lesquelles :

a) on met en présence des parties aériennes d'*Anethum graveolens* avec de l'eau ;

b) on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a) à un pH compris entre 10,5 et 11 ;

c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale solide résiduelle et obtenir un extrait brut aqueux purifié ; et

e) on contrôle le pH et on le réajuste si nécessaire à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

L'invention a également pour objet l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

L'invention et les avantages qui en découlent seront mieux compris à la lecture de la description et des modes de réalisation non limitatifs qui suivent, au regard des dessins annexés dans lesquels :

5 - la Figure 1 est un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu selon l'exemple 5 ;

10 - la Figure 2 représente un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu après étape de précipitation des petits ARN selon l'exemple 6 ;

15 - la Figure 3 représente un graphique résultant d'une analyse au Bioanalyseur® représentant la quantification des ARN d'un extrait d'aneth provenant de Chine d'Himalaya obtenu par extraction conventionnelle selon l'exemple 7 ;

20 - la Figure 4 représente la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% ;

 - la Figure 5 représente la quantification du marquage de l'acide hyaluronique (HA) sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% ; et

25 - la Figure 6 représente la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1%.

 - la Figure 7 représente la quantification du marquage d'E-cadhérine sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1%.

30 L'invention concerne un procédé mis en œuvre pour l'obtention d'un extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides à partir des parties aériennes séchées ou fraîches d'aneth.

L'invention concerne plus particulièrement une composition cosmétique comprenant, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes du procédé selon l'invention.

Par aneth (*Anethum graveolens*), on entend par exemple les espèces provenant d'Himalaya, d'Egypte et de Chine non himalayenne ; préférentiellement l'extrait est obtenu à partir d'aneth d'Himalaya.

Par « parties aériennes » on entend les feuilles, tiges et fleurs de l'aneth.

Les graines ne sont pas comprises dans les « parties aériennes » au sens de l'invention.

Dans le cours de la description les termes « aneth » et « *Anethum graveolens* » seront utilisées indifféremment, avec la même signification.

Par « petits ARN » ou « ARN de petit poids moléculaire », on entend des ARN (acides ribonucléiques) non codants de petit poids moléculaire, d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides, tels que tous types de petits ARN non messenger, simple et/ou double brins, par exemple les micro-ARN, les ARN interférents, les introns, les petits ARN nucléaires ou encore tous fragments d'ARN.

Dans une première étape a) du procédé selon l'invention, on met en présence la matière végétale soit les parties aériennes broyées séchées d'aneth avec de l'eau, préférentiellement dans un rapport matière végétale / eau de 4 à 20% en poids/poids, plus préférentiellement dans un rapport de 5 à 10%, par exemple dans un rapport de 5,7 ou 10 en poids/poids.

L'eau utilisée est une eau distillée, déminéralisée ou encore une eau riche en sels minéraux et/ou oligo-éléments, préférentiellement une eau distillée.

De préférence les parties aériennes de l'aneth sont sous forme sèche.

Préférentiellement, la matière végétale est broyée avant d'être mise en présence d'eau dans l'étape a). Le broyage est
5 une action mécanique qui permet une meilleure extraction. Le broyage mécanique, suivi d'une lyse alcaline en présence d'EDTA favorise la complète déstructuration de la membrane cellulaire et notamment de la membrane nucléaire.

On ajoute ensuite dans une étape b) de l'EDTA tétrasodique
10 dans le mélange obtenu en a). Le pH à cette étape est basique et doit être ajusté, si nécessaire, à une valeur comprise entre 10,5 et 11 par l'ajout de soude (NaOH). Lors de l'étape b) il est essentiel de maintenir le pH basique entre 10,5 et 11. En effet, ce niveau de pH, associé à l'action de l'EDTA, provoque
15 la déstructuration de la membrane cellulaire, y compris la membrane nucléaire, la lyse des cellules et la dénaturation de l'ADN (les 2 brins de la double hélice sont séparés). Le contrôle du pH lors de l'étape b) montre que celui-ci reste basique et se stabilise entre 9 et 11.

20 La concentration en EDTA tétrasodique est préférentiellement comprise entre 2 et 15 mM, et plus préférentiellement de 10 mM.

Cette concentration est choisie pour optimiser le rendement d'extraction des ARN de petit poids moléculaire dans l'extrait
25 final. L'EDTA tétrasodique va fragiliser, déstructurer les membranes pecto-cellulosiques des cellules végétales en séquestrant par complexation les ions divalents tels que les ions calcium qui forment des ponts ioniques entre les molécules de pectines entourant les microfibrilles de cellulose. Ceci a
30 pour conséquence de favoriser la libération du contenu cellulaire au cours de l'extraction. L'étape de traitement par EDTA est essentielle pour enrichir l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

L'étape de traitement par l'EDTA dure préférentiellement au moins 1h, à une température comprise entre 20 et 80°C. Pendant cette étape, le mélange obtenu en a) est avantageusement mis sous agitation.

5 Dans une étape c), on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8.

Par exemple, on ajuste le pH par ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou encore n'importe quel acide pouvant réguler le pH qui soit compatible avec une utilisation
10 cosmétique tel que l'acide citrique ou lactique.

Cette étape d'acidification provoque la renaturation brutale de l'ADN (réappariement des brins du duplex). Néanmoins l'ADN chromosomique, très long, ne parvient pas à se réappairier complètement et forme des enchevêtrements insolubles. Au
15 contraire, les petits ARN, beaucoup plus courts, restent en solution. L'ADN et les petits ARN sont ainsi séparés en deux phases distinctes ; une phase solide contenant entre autres l'ADN chromosomique, et une phase liquide contenant, entre autres, les petits ARN.

20 Dans une étape d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale et récupérer un extrait brut aqueux. Toute méthode connue par l'homme du métier pourra être utilisée. Préférentiellement le mélange obtenu en c) est centrifugé à faible vitesse, par exemple pendant au moins 10 min
25 à 4000 g, de manière à sédimenter la matière végétale résiduelle dans le culot et récupérer un extrait brut aqueux dans le surnageant.

Dans une étape d) on contrôle le pH et on le réajuste à une valeur comprise entre 6 et 8. Préférentiellement le pH est
30 réajusté à une valeur comprise entre 6 et 6,5, encore plus préférentiellement à 6,5. Le pH est réajusté par l'ajout d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) ou de soude (NaOH).

En effet, un pH inférieur à 6 peut entraîner la précipitation des acides nucléiques en général, donc celle des

ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

L'étape d'ajustement du pH à l'étape d) du procédé selon l'invention est une étape indispensable à l'extraction optimale
5 des ARN de petit poids moléculaire.

Avantageusement le réajustement du pH de l'étape d) est précédé par au moins une filtration de l'extrait brut aqueux obtenu en d). Préférentiellement des filtrations successives seront réalisées en abaissant le seuil de filtration de 50 à 20
10 μm jusqu'à 0,4, 0,3, 0,2, ou 0,1 μm .

L'invention a pour deuxième objet un extrait aqueux d'aneth enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides de l'invention obtenu par le procédé décrit ci-dessus.

Cet extrait ne contient pas d'ADN (acide
15 désoxyribonucléique).

Un tel extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides comprend, avant dilution, en poids du poids total de l'extrait, 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres,
20 0,2 à 3 g/kg d'acides aminés, 100 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait ainsi obtenu est considéré comme concentré. Il peut être ensuite dilué dans un solvant physiologiquement acceptable pour un usage
25 cosmétique, de telle sorte que la concentration de l'extrait est alors ajustée à un poids en extrait sec particulier d'intérêt.

A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs de solvants physiologiquement acceptables, on peut citer l'eau, le glycérol, l'éthanol, le propanediol ainsi que sa version
30 naturelle appelée Zemea® issue du maïs, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques ou tout mélange de ces solvants.

Préférentiellement, l'extrait obtenu par le procédé selon l'invention est dilué dans un solvant tel que 30% de glycérol et

de l'eau, et comprend en poids du poids total de l'extrait. L'extrait obtenu par le procédé selon l'invention comprend en outre de 5-15 g/kg d'extrait sec, de 50 à 1000 mg/kg de polyphénols 0,5-10 g/kg de fragments protéiques, 0,5-10 g/kg de sucres, de 0,1 à 1 g/kg d'acides aminés et 10-100 mg/kg de petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

A titre illustratif, des exemples préférés de mode de réalisation du procédé selon l'invention sont décrits ci-dessous.

Exemple 1 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN

Un extrait aqueux enrichi en ARN de petit poids moléculaire (d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides) est obtenu à partir d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*.

Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth sous forme de poudre sont placés dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Le mélange est ensuite chauffé 2h à 55°C sous agitation.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration stérilisante à 0,2 µm.

Exemple 2 : Caractérisation de l'extrait d'aneth

D'une manière générale, on obtient un extrait aqueux d'aneth de couleur vert clair titrant de 10 à 30 g/kg d'extrait de poids

sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres, 0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 300 à 750 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

5 Néanmoins, pour des parties aériennes d'aneth de l'espèce *Anethum graveolens*, les extraits obtenus peuvent présenter une variabilité importante en fonction de facteurs tels que le lieu de récolte, l'année de récolte, la saison, les conditions climatiques, etc.

10 Dans l'extraction de l'exemple 1, on a obtenu un extrait aqueux titrant 12 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 2,55 g/kg de fragments protéiques, 3 g/kg de sucres, 340 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés
15 phénoliques et 50 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une concentration de 1,7 g/kg de fragments protéiques,
20 2 g/kg de sucres, 240 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés phénoliques et 35 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Méthodes utilisées dans le dosage de spectrophotométrie pour déterminer la quantité de composés différents dans l'extrait
25 d'aneth :

La teneur totale en protéines de l'extrait d'aneth a été déterminée par un dosage de protéines de Lowry (Lowry et al, 1951). L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 550 nm. La teneur en protéines est déterminée
30 à l'aide d'une courbe standard de BSA.

La teneur en acides aminés de l'extrait a été déterminée à partir d'un protocole publié par Moore et al (1948), la teneur en acides aminés libre de l'extrait a été évaluée par la formation d'un complexe coloré, suite à la rupture des fonctions

amine et carboxylique par le Réactif ninhydrine. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 570 nm. La teneur totale en acide aminées est déterminée par rapport à un pool d'acide aminés comme standard.

5 La teneur totale en sucres de l'extrait a été déterminée par une adaptation du dosage décrit par Dubois et al. (1956) (Dubois et al., "Méthode colorimétrique pour la détermination des sucres et des substances apparentées", Anal. Chem., 1956, 28 (3), 350-356). Cette analyse consiste en la dissolution de la
10 matière première dans l'acide sulfurique concentré puis en réagissant avec du phénol pour former un complexe coloré. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 490 nm. La teneur en sucre est déterminée à l'aide d'une courbe standard de glucose.

15 La teneur en polyphénols de l'extrait a été déterminée à l'aide du dosage de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., Analyse des phénols totaux et d'autres substrats d'oxydation et antioxydants au moyen du réactif folin-ciocalteu, 1999, 299: 152). Les composés de type polyphénols dans l'échantillon
20 réagissent avec le réactif Folin-Ciocalteu, l'oxydation du réactif donne une couleur bleue. L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 760 nm. Le contenu a été exprimé en équivalents d'acide gallique à l'aide d'une courbe standard d'acide gallique.

25 La quantification des ARN de bas poids moléculaires au moyen d'un Bioanalyseur® (Agilent) qui permet de réaliser des électrophorèses miniaturisées grâce à des puces électroniques spécifiques de l'analyse des acides nucléiques telle que celle des ARN de petit poids moléculaire. Il permet de déterminer la
30 taille et la concentration contenues dans un extrait à partir de quelques microlitres. Le résultat se présente sous forme d'un graphique avec une unité arbitraire de fluorescence en ordonnée (FU) et en abscisse le nombre de nucléotides (nt). Un marqueur interne est ajouté à chaque analyse (pic à 25 nt sur la figure

1, 2 et 3), et sert de contrôle interne pour valider le bon déroulement de l'analyse.

Exemple 3 : Préparation d'un extrait d'aneth provenant de
5 Chine région non himalayenne (*Anethum graveolens*) de la famille
des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN

Un extrait aqueux enrichi en ARN de petit poids moléculaire (d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides) est obtenu à partir d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*.

10 Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth provenant de Chine région non himalayenne sous forme de poudre sont placés dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH
15 à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous agitation.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour
20 ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité
25 décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration de 0,2 µm.

D'une manière générale, on obtient un extrait aqueux d'aneth de couleur vert clair titrant de 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres,
30 0,1 à 3 g/kg d'acides aminés, 300 à 750 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Néanmoins, pour des parties aériennes d'aneth de l'espèce *Anethum graveolens*, les extraits obtenus peuvent présenter une

variabilité importante en fonction de facteurs tels que le lieu de récolte, l'année de récolte, la saison, les conditions climatiques, etc.

Dans cet exemple, on a obtenu un extrait aqueux titrant à 12 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 2,5 g/kg de fragments protéiques, 3 g/kg de sucres, 340 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés phénoliques et 50 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange eau et un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol pour obtenir un extrait à 8 g/Kg en poids sec. Après dilution, l'extrait présente une concentration de 1,7 g/kg de fragments protéiques, 2 g/kg de sucres, 240 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés phénoliques et 35 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

Méthodes utilisées dans le dosage de spectrophotométrie pour déterminer la quantité des différents composés dans l'extrait d'aneth selon l'exemple 3 :

La teneur totale en protéines de l'extrait d'aneth a été déterminée par un dosage de protéines de Lowry (Lowry et al, 1951). L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 550 nm. La teneur en protéines est déterminée à l'aide d'une courbe standard de BSA.

La teneur en acides aminés de l'extrait a été déterminée à partir d'un protocole publié par Moore et al (1948), la teneur en acides aminés libre de l'extrait a été évaluée par la formation d'un complexe coloré, suite à la rupture des fonctions amine et carboxylique par le Réactif ninhydrine. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 570 nm. La teneur totale en acide aminées est déterminée par rapport à un pool d'acide aminés comme standard.

La teneur totale en sucres de l'extrait a été déterminée par une adaptation du dosage décrit par Dubois et al. (1956) (Dubois et al., "Méthode colorimétrique pour la détermination des sucres et des substances apparentées", Anal. Chem., 1956, 28
5 (3), 350-356). Cette analyse consiste en la dissolution de la matière première dans l'acide sulfurique concentré puis en réagissant avec du phénol pour former un complexe coloré. L'absorbance du complexe est lue sur le spectrophotomètre à 490 nm. La teneur en sucre est déterminée à l'aide d'une courbe
10 standard de glucose.

La teneur en polyphénols de l'extrait a été déterminée à l'aide du dosage de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., Analyse des phénols totaux et d'autres substrats d'oxydation et antioxydants au moyen du réactif folin-ciocalteu, 1999, 299:
15 152). Les composés de type polyphénols dans l'échantillon réagissent avec le réactif Folin-Ciocalteu, l'oxydation du réactif donne une couleur bleue. L'absorbance de l'échantillon est lue sur le spectrophotomètre à 760 nm. Le contenu a été exprimé en équivalents d'acide gallique à l'aide d'une courbe
20 standard d'acide gallique.

Exemple 4 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN provenant d'Egypte.

25 Le procédé d'extraction est le même que dans l'exemple 3, seule l'origine géographique de provenance de l'aneth est différente ici l'Egypte.

Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth d'Egypte sous forme de poudre sont placés dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g
30 de poudre d'aneth séchée dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous agitation.
Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution
5 éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration à 0,2 µm de porosité.

10 Dans cet exemple on a obtenu un extrait aqueux titrant 20,4 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 4,3 g/kg de fragments protéiques, 3,1 g/kg de sucres, 650 g/kg d'acides aminés, 720 mg/kg de composés
15 phénoliques et 46 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange d'eau et d'un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une
20 concentration de 1,8 g/kg de fragments protéiques, 1,5 g/kg de sucres, 360 g/kg d'acides aminés, 490 mg/kg de composés phénoliques et 32 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

25 Exemple 5 : Préparation d'un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) de la famille des *Apiaceae*, enrichi en petits ARN provenant de Chine, région Himalayenne.

Le procédé d'extraction est le même que dans l'exemple 3 (et 4) seule l'origine géographique de provenance de l'aneth est
30 différente ici la région Himalayenne.

Dans une première étape, 5% de parties aériennes séchées d'aneth provenant de Chine, région Himalayenne, sous forme de poudre sont placées dans de l'eau distillée et 10 mM d'EDTA tétrasodique sont ajoutés, soit 50 g de poudre d'aneth séchée

dans 950 g d'eau distillée et 3,8 g d'EDTA tétrasodique. Le pH à cette étape doit être basique et compris entre 10,5 et 11 pour un enrichissement optimal de l'extrait en ARN de petit poids moléculaire. Le mélange est ensuite chauffé 1h à 55°C sous agitation.

Le mélange est ensuite centrifugé 10 min à 4000 g, pour ôter la matière solide.

A l'issue de cette étape, le pH est contrôlé, avant dilution éventuelle, afin de le placer si nécessaire entre 6 et 6,5 et préserver les petits ARN de l'extrait.

Des filtrations séquentielles sur filtres de porosité décroissante sont alors réalisées afin de clarifier l'extrait végétal jusqu'à une filtration à 0,2 µm de porosité.

Dans cet exemple on a obtenu un extrait aqueux titrant 20 g/kg d'extrait de poids sec.

L'analyse physico-chimique montre que cet extrait présente une concentration de 4,5 g/kg de fragments protéiques, 2,8 g/kg de sucres, 670 g/kg d'acides aminés, 650 mg/kg de composés phénoliques et 90 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides. L'extrait est ensuite dilué avec de l'eau ou un mélange eau et un solvant cosmétique notamment avec 30% de glycérine ou de butylène glycol ou propanediol. Après dilution l'extrait présente une concentration de 2,3 g/kg de fragments protéiques, 1,7 g/kg de sucres, 470 g/kg d'acides aminés, 455 mg/kg de composés phénoliques et 65 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

La quantification des ARN de bas poids moléculaires a été réalisée au moyen d'un Bioanalyseur® (Agilent) qui permet de réaliser des électrophorèses miniaturisées grâce à des puces électroniques spécifiques de l'analyse des acides nucléiques telle que celle des ARN de petit poids moléculaire. Il permet de déterminer la taille et la concentration contenues dans un extrait à partir de quelques microlitres. Le résultat se présente

sous forme d'un graphique avec une unité arbitraire de fluorescence en ordonnée (FU) et en abscisse le nombre de nucléotides (nt) tel qu'illustré par la Figure 1. Un marqueur interne est ajouté à chaque analyse (pic à 25 nt sur la Figure 1, 2 et 3), et sert de contrôle interne pour valider le bon déroulement de l'analyse.

Exemple 6 : Etude de l'influence du pH final dans la préparation d'extraits d'aneth (*Anethum graveolens*) provenant de Chine, région Himalayenne, afin d'obtenir un extrait d'aneth dépourvu de petits ARN

Le procédé d'extraction est réalisé dans les mêmes conditions opératoires que l'exemple 3, 4 et 5, pour enrichir un extrait en ARN de petit poids moléculaire, hormis l'étape finale d'ajustement du pH.

Ce procédé d'extraction est réalisé avec une étape de traitement par EDTA tétrasodique, mais avec un ajustement final de l'extrait à un pH acide compris entre 4 et 4,5 au lieu d'un pH compris entre 6 et 8.

Ceci entraîne la précipitation des ARN de petit poids moléculaire, résultats confirmés par l'analyse au Bioanalyseur® qui donne une concentration nulle en ARN de petit poids moléculaire (tel qu'illustré à la Figure 2).

Exemple 7 : Réalisation d'un extrait conventionnel obtenu par macération d'aneth (*Anethum graveolens*) provenant de Chine, région Himalayenne. Mise en évidence du rôle d'une étape de traitement par EDTA pour la mise en œuvre d'un procédé d'extraction de petits ARN

Dans le but de mettre en évidence le rôle d'une étape de traitement par EDTA lors de l'extraction des ARN de petit poids moléculaire, un extrait d'aneth (*Anethum graveolens*) a également été obtenu, en modifiant certaines étapes essentielles du

procédé selon l'invention, ne permettant pas d'enrichir l'extrait en ARN de petit poids moléculaire.

Dans une première étape, 5% d'aneth sont broyés puis de l'eau est ajoutée, soit 50 g d'aneth dans 950 g d'eau distillée.

5 Le pH est mesuré et est de 5,5, le mélange est mis sous agitation pendant 1h à 55°C.

Ensuite, l'extrait est centrifugé 10 min à 4000 g pour ôter la matière solide.

10 Des filtrations séquentielles sont alors réalisées sur des filtres de porosité décroissante de taille comprise entre 50 et 20 µm puis jusqu'à une porosité de 0,4 à 0,3 µm.

On obtient alors un extrait aqueux de couleur vert clair titrant à 13 g/kg d'extrait de poids sec, contenant 3,3 g/kg de fragments protéiques, 2,2 g/kg de sucres, 380 mg/kg d'acides aminés, et 410 mg/kg de composés phénoliques.

L'extrait est alors dilué pour être à 8 g/Kg en poids sec, par seul ajout d'eau.

L'analyse physico-chimique montre qu'après dilution l'extrait végétal présente une concentration en fragments
20 protéiques de 2,8 g/kg, et en sucres de 1,7 g/kg, en acides aminés de 240 mg/kg, et en composés phénoliques de 280 mg/kg. Dans ces conditions d'extraction dite conventionnelle (absence de traitement par EDTA), l'analyse au Bioanalyseur® indique que la concentration en ARN de petit poids moléculaire est nulle
25 pour cet extrait (tel qu'illustré à la Figure 3). Ce résultat confirme qu'un extrait obtenu à partir d'un procédé d'extraction en l'absence de traitement par EDTA (à pH basique) ne contient pas d'ARN de petit poids moléculaire. L'étape de traitement par EDTA est essentielle pour obtenir un extrait riche en ARN de
30 petit poids moléculaire selon l'invention.

Plus particulièrement, selon un troisième aspect de l'invention, les extraits aqueux enrichis en petits ARN obtenus selon l'invention sont avantageusement utilisés dans la préparation de compositions cosmétiques comprenant, à titre

d'agent actif, une quantité efficace d'un tel extrait de petits ARN selon l'invention, et un milieu physiologiquement acceptable.

Par quantité efficace, on désigne la quantité minimum
5 d'extrait selon l'invention qui est nécessaire pour obtenir l'activité de l'extrait, en particulier cosmétique et plus particulièrement pour améliorer l'aspect de la peau, lutter contre les signes du vieillissement cutané ou pour l'amélioration de l'hydratation de la peau, sans que cette
10 quantité soit toxique.

Avantageusement, l'extrait de petits ARN selon l'invention est utilisé, de préférence dilué dans un solvant cosmétique, à un poids sec compris entre 5 à 15 g/kg.

Avantageusement, l'extrait de petits ARN selon l'invention
15 est présent dans la composition à une concentration de 0,1 à 5% en poids par rapport au poids total de la composition, et de préférence à une concentration comprise entre 0,5% et 2,5% en poids par rapport au poids total de la composition.

Un milieu physiologiquement acceptable désigne un véhicule
20 adapté pour une mise en contact avec les couches externes de la peau ou des muqueuses, sans toxicité, irritation, réponse allergique induite et similaire ou réaction d'intolérance, et proportionné à un rapport avantage/risque raisonnable.

La composition utilisable selon l'invention pourra être
25 appliquée par toute voie appropriée, notamment orale, ou topique externe, et la formulation des compositions sera adaptée par l'homme du métier.

La composition selon l'invention peut être formulée pour être administrée par voie orale. Les formes galéniques utilisées
30 peuvent être sous forme solide ou liquide. Les formes orales solides sont généralement des comprimés, capsules dures (gélules), capsule molle, sachets comprenant une poudre ou des granulés. Les formes orales liquides sont généralement des

solutions buvables, sirops, élixirs, émulsions buvables, suspensions buvables, gouttes buvables.

Préférentiellement, les compositions selon l'invention se présentent sous une forme adaptée à l'application par voie
5 topique. Ces compositions doivent donc contenir un milieu physiologiquement acceptable, c'est-à-dire compatible avec la peau et les phanères, sans risque d'inconfort lors de leur application et couvrent toutes les formes cosmétiques adaptées.

Par application topique, on désigne le fait d'appliquer ou
10 d'étaler l'extrait aqueux enrichi en petits ARN selon l'invention, et plus particulièrement une composition le contenant, à la surface de la peau ou d'une muqueuse.

« Peau » désigne la peau du visage, notamment le contour des yeux et la bouche, le nez, le front, le cou, les mains, mais
15 aussi la peau de l'ensemble du corps.

Les compositions pour la mise en œuvre de l'invention pourront notamment se présenter sous forme d'une solution aqueuse, hydro-alcoolique ou huileuse, d'une émulsion huile-
dans-eau, eau-dans-huile ou émulsions multiples ; elles peuvent
20 aussi se présenter sous forme de suspensions, ou encore poudres, adaptées à une application sur la peau, les muqueuses, les lèvres et/ou les cheveux.

Ces compositions peuvent être plus ou moins fluides et avoir également l'aspect d'une crème, d'une lotion, d'un lait, d'un
25 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.

A titre de milieu physiologiquement acceptable communément utilisé dans le domaine d'application envisagé, on peut citer
30 par exemple des adjuvants nécessaires à la formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des antioxydants, des colorants, des filtres solaires, des agents auto-bronzants, des pigments, des charges, des conservateurs, des parfums, des absorbeurs d'odeur, 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 0,01 à 20% du poids total de la composition. Lorsque la composition selon 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 sont 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.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, l'extrait aqueux enrichi en petits ARN selon l'invention peut être encapsulé ou inclus dans un vecteur cosmétique tels que les liposomes ou toute autre nanocapsule ou microcapsule utilisée dans le domaine de la cosmétique ou adsorbé sur des polymères organiques poudreux, des supports minéraux comme les talcs et bentonites.

Avantageusement, la composition selon l'invention peut comprendre, outre l'agent actif selon l'invention, au moins un autre agent actif présentant des effets cosmétiques similaires et/ou complémentaires à ceux de l'invention. Selon l'invention, cet agent actif est défini comme un « agent actif additionnel ».

Par exemple, le ou les agents actifs additionnels peuvent être choisis parmi : les agents anti-âge, raffermissants, éclaircissants, hydratants, drainants, favorisant la microcirculation, exfoliants, desquamants, stimulant la matrice extracellulaire, activant le métabolisme énergétique, antibactériens, antifongiques, apaisants, anti-radicalaires, anti-UV, anti-acné, anti-inflammatoires, anesthésiques,

procurant une sensation de chaleur, procurant une sensation de fraîcheur, amincissants.

De tels agents actifs additionnels peuvent être choisis dans les groupes comprenant :

- 5 - la vitamine A et notamment l'acide rétinoïque, le rétinol, le rétinol proprionate, le rétinol palmitate ;
- la vitamine B3 et plus particulièrement le niacinamide, le nicotinate de tocophérol ;
- la vitamine B5, la vitamine B6, la vitamine B12, le
10 panthénol ;
- la vitamine C, notamment l'acide ascorbique, l'ascorbyl glucoside, l'ascorbyl tétrapalmitate, magnésium et sodium ascorbyl phosphate ;
- les vitamines E, F, H, K, PP, le coenzyme Q10 ;
- 15 - les inhibiteurs de métalloprotéinase, ou un activateur des TIMP ;
- la DHEA, ses précurseurs et dérivés ;
- les acides aminés tels que l'arginine, ornithine, hydroxyproline, hydroxyproline dipalmitate, palmitoylglycine,
20 hydroxylysine, méthionine et ses dérivés, composés acides aminés N-acylés ;
- les peptides naturels ou de synthèse, incluant les di-, tri-, tetra-, penta- et hexapeptides et leurs dérivés lipophiles, isomères et complexés avec d'autres espèces telles
25 qu'un ion métal (par exemple cuivre, zinc, manganèse, magnésium, et autres). A titre d'exemples, on peut citer les peptides commercialement connus sous le nom de MATRIXYL® (SEDERMA®), ARGIRELINE® (LIPOTEC®), CHRONOGEN™, LAMINIXYL IS™, PEPTIDE Q10™, COLLAXYL™ (brevet FR2827170, ASHLAND®), PEPTIDE VINCI 01™
30 (brevet FR2837098, ASHLAND®), PEPTIDE VINCI 02™ (brevet FR2841781, ASHLAND®), ATPeptide™ (brevet FR2846883, ASHLAND®) ou encore le peptide de synthèse de séquence Arg-Gly-Ser-NH₂, commercialisé sous le nom ATPeptide™ par ASHLAND® ;

- l'extrait d'*Artémia salina*, commercialisé sous le nom GP4G™ (FR2817748, ASHLAND®) ;

- les extraits peptidiques végétaux tels que les extraits de lin (Lipigénine™, brevet FR2956818, ASHLAND®), les extraits
5 de soja, d'épeautre, de vigne, de colza, de lin, de riz, de maïs, de pois ;

- les extraits de levures, par exemple le Dynagen™, (brevet FR2951946, ASHLAND®) ou l'Actopontine™ (brevet FR2944526, ASHLAND®) ;

10 - l'acide déhydroacétique (DHA) ;

- les phytostérols d'origine synthétique ou naturelle ;

- l'acide salicylique et ses dérivés, les alpha- et bêta-hydroxyacides, les silanols ;

- les sucres aminés, glucosamine, D-glucosamine, N-acetyl
15 glucosamine, N-acetyl-D-glucosamine, mannosamine, N-acetyl mannosamine, galactosamine, N-acetyl galactosamine ;

- les extraits de polyphénols, isoflavones, flavonoïdes, tels que les extraits de raisin, les extraits de pin, les extraits d'olive ;

20 - les lipides tels que les céramides ou les phospholipides, les huiles d'origine animale, telles que le squalène ou le squalane ; les huiles végétales, telles que l'huile d'amande douce, de coprah, de ricin, de jojoba, d'olive, de colza, d'arachide, de tournesol, de germes de blé, de germes de maïs,
25 de soja, de coton, de luzerne, de pavot, de potiron, d'onagre, de millet, d'orge, de seigle, de carthame, de passiflore, de noisette, de palme, de noyau d'abricot, d'avocat, de calendula ; les huiles végétales éthoxylées, le beurre de karité ;

- tous écrans UV et filtres solaires ;

30 - l'AMP cyclique et ses dérivés, les agents activateurs de l'enzyme adénylate cyclase et les agents inhibiteurs de l'enzyme phosphodiesterase, l'extrait de *Centella asiatica*, l'asiaticoside et l'acide asiatique, les méthyls xanthines, la théine, la caféine et ses dérivés, la théophylline, la

théobromine, la forskoline, l'esculine et l'esculoside, les inhibiteurs d'ACE, le peptide Val-Trp, l'inhibiteurs du neuropeptide Y, l'enkephaline, l'extrait de *Ginkgo biloba*, l'extrait de *dioscorea*, la rutine, l'extrait de yerba mate, l'extrait de guarana, les oligosaccharides, les polysaccharides, la carnitine, l'extrait de lierre, l'extrait de fucus, l'extrait hydrolysé de *Prunella vulgaris*, l'extrait hydrolysé de *Celosia cristata*, l'extrait d'*Anogeissus leiocarpus*, l'extrait de feuilles de *Manihot utilissima*, la palmitoylcarnitine, la carnosine, la taurine, l'extrait de sureau, les extraits d'algue tel que l'extrait de *Palmaria Palmata*.

A titre d'illustration, il est mentionné ci-après des exemples de formulations d'une composition cosmétique contenant un extrait aqueux enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu selon l'invention :

Exemple 8 : Baume pour le contour des yeux

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
EDTA tétrasodique	Tetrasodium EDTA	0,01
Phase B		
RapiThix™ A-100 polymer	Sodium Polyacrylate	1,80
Phase C		
Cegesoft VP	Vegetable oil (and) Hydrogenated vegetable oil (and) <i>Euphorbia Cerifera</i> (Candelilla) Wax	3,00
Si-Tec™ GF 3096 silicone	Dimethicone (and) Dimethiconol	10,00
Phase D		
DC 9701 Cosmetic Powder	Dimethicone/Vinyl Dimethicone Crosspolymer (and) Silica	1,00
Phase E		
Optiphen™ preservative	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	0,50
Phase F		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dill) extract	1,00
Zemea®	Propanediol	5,00
Timiron Splendid Violet	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Silica	1,00

Procédé de préparation:

1. Homogénéiser la phase A dans le récipient principal jusqu'à ce qu'elle soit claire ;
2. A 25°C, saupoudrer dans la Phase B et homogénéiser pendant 10 minutes jusqu'à homogénéité ;
3. A 25°C, préparer la phase C dans un bécher à part, mélanger jusqu'à homogénéité. Saupoudrer dans la phase D et bien mélanger jusqu'à homogénéité ;
4. A 25°C, ajouter la phase C + D dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
5. À 25°C, ajouter la phase E dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
6. A 25°C, Prémélanger la phase F, l'ajouter dans le récipient principal et mélanger jusqu'à homogénéité ;
7. Arrêter à 25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'un gel crème nacré violet, avec un pH compris entre 5,70 et 6,20 et une viscosité (D0) de 80000 - 130000 cps (Brookfield RVT/Spindle C/5 RPM/1 minute/25°C).

Exemple 9 : Crème riche

Ingrédients (Nom de marque)		INCI	% w/w
Phase A			
Eau purifiée		Aqua	Qsp 100
Optiphen™ Plus preservative		Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol (and) Sorbic Acid	1,50
Phase B			
Stabileze™ QM polymer		PVM/MA Decadiene Crosspolymer	0,15
Phase C			
ProLipid™ 141 lamellar gel		Glyceryl Stearate (and) Behenyl Alcohol (and) Palmitic Acid (and) Stearic Acid (and) Lecithin (and) Lauryl Alcohol (and) Myristyl Alcohol (and) Cetyl Alcohol	5,00
Ceraphyl™ 494 ester		Isocetyl Stearate	4,00
Ceraphyl™ SLK ester		Isodecyl Neopentanoate	4,00
DC 580 Wax		Stearoxytrimethylsilane (and) Stearyl Alcohol	2,00
Emulsynt™ GDL ester		Glyceryl Dilaurate	3,00

Phase D		
Gransil DM-5	Dimethicone (and) Polysilicone-11	3,00
Phase E		
Hydroxyde de sodium	Sodium Hydroxide	0,04
Eau purifiée	Aqua	0,50
Phase F		
PF Bois Précieux	Parfum/Fragrance	0,30
Unipure* Red LC 381 ADT-C	CI 77491 (Iron oxides) (and) Isopropyl Titanium Triisostearate (and) Bis-Hydroxyethoxypropyl Dimethicone (and) PEG-2-Soyamine (and) Isophorone Diisocyanate	0,03
Phase G		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dill) extract	3,00
Ronaflair Balance Gold	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Tin Oxide	0,30
Covabead Velvet 10	Polymethyl Methacrylate	1,00
Ronaflair Balance Red	CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Mica (and) Tin Oxide	1,20
Phase H		
Eau purifiée	Aqua	15,00
Natrosol™ Plus 330 CS	Cetyl Hydroxyethylcellulose	0,50

Procédé de préparation:

1. Homogénéiser la phase A dans le récipient principal et commencer à chauffer à 75-80°C ;
2. A 30°C, saupoudrer dans la Phase B et homogénéiser tout en chauffant ;
3. Dans un bécher à part, préparer la phase C, chauffer à 75-80°C jusqu'à homogénéité ;
4. A 75°C, ajouter la phase C dans le récipient principal et homogénéiser pendant 10 minutes ;
5. Laisser refroidir la température et ajouter la phase D à 65°C. Bien mélanger pour homogénéiser pendant 10 minutes ;
6. Prémélanger la phase E avant de l'ajouter dans le récipient principal ;
7. Ajouter la phase E à 60°C. Bien mélanger pour homogénéiser pendant 10 minutes ;
8. A 35°C, prémélanger la phase F avant de l'ajouter et de bien mélanger ;
9. Prémélanger la phase G avant de l'ajouter dans le récipient principal ;

10. Ajouter la phase G à 35°C. Bien mélanger pour homogénéiser ;
 11. Dans un b cher à part, préparer la phase H: saupoudrer Natrosol™ dans l'eau à température ambiante et homogénéiser tout en chauffant à 60°C ;

- 5 12. Ajouter la phase H   30°C. Bien mélanger pour homogénéiser ;
 13. Arrêter   25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'une crème beurre rose, avec un pH compris entre 4,90 et 5,40 et une viscosité (D0) de 160000 - 210000 cps (Brookfield RVT/Spindle D/5 RPM/1
 10 minute/25°C).

Exemple 10: Sérum visage

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau purifiée	Aqua	Qsp 100
Propylène Glycol	Propylene Glycol	35,10
SD Alcohol 40B Absolute	Alcohol	10,00
Butylène Glycol	Butylene Glycol	5,00
EDTA disodique	Disodium EDTA	0,10
Phase B		
Flexithix™ polymer	PVP	2,00
Phase C		
Gomme xanthane	Xanthan Gum	0,25
Phase D		
Rapithix™ A-60 polymer	Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	1,00
Rokonsal™/LiquaPar™ MEP preservative	Phenoxyethanol (and) Methylparaben (and) Ethylparaben (and) Propylparaben	0,70
Phase E		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	5,00
Phase F		
Cyclopentasiloxane	Cyclopentasiloxane	6,00
DM 350	Dimethicone	3,00
Gransil* DMCM-5	Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) Polysilicone-11	1,50
KSP* 100	Vinyl Dimethicone/Methicone Silsesquioxane Crosspolymer	1,00
Phase G		
Unicert* Yellow 08006-J	Water/Aqua (and) CI 15985 (Yellow 6)	0,60

Procédé de préparation :

1. Dans un bécher à température ambiante, peser les ingrédients de la phase A et mélanger. Saupoudrer la phase B et homogénéiser ;
- 5 2. A température ambiante, saupoudrer dans la phase C et continuer à homogénéiser l'ensemble ;
3. A température ambiante, ajouter la phase D à la phase ABC et continuer à homogénéiser ;
4. A température ambiante, ajouter la phase E et homogénéiser ;
- 10 5. A température ambiante, ajouter la phase F et homogénéiser l'ensemble ;
6. A température ambiante, ajouter la phase G et mélanger jusqu'à homogénéité ;
7. Arrêter à 25°C.
- 15 La composition se présente ainsi sous forme d'un gel lisse, translucide, jaune crème, avec un pH compris entre 6,30 et 7,10 et une viscosité (D0) de 10000 - 15000 cps (Brookfield RVT/Spindle B/5 RPM/1 minute/25°C).

20 Exemple 11 : Masque anti-âge

Ingrédients (Nom de marque)		INCI	% w/w
Phase A			
Eau purifiée		Aqua	Qsp 100
EDTA tétrasodique		Tetrasodium EDTA	0,05
Phase B			
N-Hance™ HP40S guar		Hydroxypropyl Guar	0,10
Phase C			
Lubrajel™ DV Free hydrogel		Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer	6,00
Phase D			
Si-Tec™ GF 3096 silicone		Dimethicone (and) Dimethiconol	12,00
RapiThix™ A-60 polymer		Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	2,40
Phase E			
Optiphen™ preservative	Plus	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol (and) Sorbic Acid	1,50
Phase F			

Surfin* 96	Alcohol Denat.	3,50
PF Cucumber & Aloe	Parfum/Fragrance	0,50
Phase G		
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	1,00
Achromaxyl™ ISR biofunctional	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Hydrolyzed Brassica Napus Seedcake Extract	3,00
Xirona Carribean Blue	Mica (and) CI 77891 (Titanium Dioxide) (and) Silica (and) Tin Oxide	1,00

Procédé de préparation:

1. A 25°C, homogénéiser la phase A dans le récipient principal ;
2. A 25°C, saupoudrer dans la phase B et bien mélanger jusqu'à
- 5 homogénéité ;
3. A 25°C, ajouter la phase C et bien mélanger jusqu'à homogénéité ;
4. Prémélanger la phase D dans un bêcher à part et ajouter dans le récipient principal à 25°C ;
- 10 5. A 25°C, ajouter la phase E dans le récipient principal et bien mélanger ;
6. Prémélanger la phase F et l'ajouter lentement. Bien mélanger bien jusqu'à homogénéité ;
7. Prémélanger la phase G dans un bêcher à part et ajouter dans
- 15 le récipient principal jusqu'à homogénéité ;
8. Arrêter à 25°C.

La composition se présente ainsi sous forme d'un gel crème avec des effets vert scintillant, avec un pH compris entre 5,30 et 5,80 et une viscosité (D0) de 70000 - 100000 cps (Brookfield

20 RVT/Spindle C/5 RPM/1 minute/25°C).

Exemple 12 : Sérum

Ingrédients (Nom de marque)	INCI	% w/w
Phase A		
Eau déminéralisée	Aqua	87,40
Sodium Hyaluronate	Sodium Hyaluronate	0,20
RapiThix™ A-60 polymer	Sodium Polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6	0,40

Lubrajel™ DV hydrogel	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer (and) Propylene Glycol	6,00
Lubrajel™ Oil hydrogel	Glycerin (and) Glyceryl Acrylate/Acrylic Acid Copolymer (and) Propylene Glycol (and) PVM/MA Copolymer	1,00
Wacker-Belsil* DM 100	Dimethicone	2,00
Cyclopentasiloxane NF	Cyclopentasiloxane	0,50
Extrait selon l'exemple 1	Water/Aqua (and) Glycerin (and) Peucedanum Graveolens (Dil) extract	1,00
Optiphen™ preservative	Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol	1,50

Procédé de préparation :

1. Ajouter de l'eau dans le récipient principal et de commencer le mélange avec une pale d'hélice hi-lo ;
- 5 2. Ajouter le reste des ingrédients, un après l'autre tout en mélangeant entre chaque addition.

La composition se présente ainsi sous forme d'un sérum lisse, semi-opaque, avec un pH compris entre 5,75 et 6,25 et une viscosité (D0) de 1,100 - 1,400 cps (Brookfield RVT/spindle 3/20
10 rpm/25° C/1 minute).

Selon un quatrième aspect, l'invention concerne l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.
15 L'invention concerne notamment l'utilisation cosmétique de la composition selon l'invention pour améliorer l'aspect de la peau, lutter contre les signes du vieillissement cutané ou améliorer l'hydratation cutanée.

Par phanères, on entend des substances naturellement
20 présentes dans l'organisme humain ou l'organisme animal riches en kératine, et plus particulièrement les cheveux, les poils, les cils, les sourcils et les ongles. L'utilisation et les compositions selon la présente invention sont particulièrement destinées aux cheveux.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour améliorer l'hydratation de la peau et renforcer la fonction barrière.

5 L'invention concerne également plus particulièrement l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour lutter contre les signes du vieillissement cutané et améliorer la fermeté et l'élasticité de la peau.

10 Enfin, l'invention concerne aussi l'utilisation cosmétique d'une composition selon l'invention pour améliorer la santé du cheveu.

On entend par « améliorer l'aspect de la peau » que le grain de la peau apparaît plus fin, la luminosité plus intense et le teint plus homogène.

15 Par « signes du vieillissement cutané » on entend toutes modifications de l'aspect extérieur de la peau dues au vieillissement comme, par exemple, les rides et ridules, les crevasses, les poches sous les yeux, les cernes, le flétrissement, la perte d'élasticité, de fermeté et/ou de tonus de la peau, mais également toutes modifications internes de la
20 peau qui ne se traduisent pas systématiquement par un aspect extérieur modifié comme, par exemple, l'amincissement de la peau, ou toutes dégradations internes de la peau consécutives à des stress environnementaux tels que la pollution et les rayonnements UV.

25 On entend par « amélioration de l'hydratation cutanée », toutes améliorations des modifications de l'aspect extérieur de la peau dues à la déshydratation comme, par exemple, la sécheresse, les tiraillements et l'inconfort.

30 Par « améliorer la santé du cheveu » on entend un renforcement de la structure du cheveu permettant d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.

A ce titre, l'invention est illustrée ci-après, par des résultats de tests d'activité pour le soin de la peau et du cuir chevelu.

Exemple 13 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur la matrice extracellulaire du derme par l'étude du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine

5 Le but de cette étude est de comparer les effets sur la matrice extracellulaire du derme de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon
10 l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines collagène I, dermatopontine et élastine impliquées dans la structure de la
15 matrice extracellulaire. Le collagène et l'élastine sont très importants pour le maintien de l'élasticité et de la fermeté de la peau. La dermatopontine est localisée sur les fibres de collagène (Forbes EG, Cronshaw AD, MacBeath JRE, Hulmes DJS. Tyrosine-rich acidic matrix protein (TRAMP) is a tyrosine-
20 sulphated and widely distributed protein of the extracellular matrix. *FEBS Lett.* 1994 351(3):433-6). Elle facilite la fibrogénèse, stabilise les fibres de collagène et régule leur diamètre (Macbeath J, Shackleton D, and Hulmes D. Tyrosine-rich Acidic Matrix Protein (TRAMP) accelerates collagen fibril
25 formation in vitro. *J. Biol. Chem.* 1993 268:19826-32).

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture ex vivo en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts.
30 Les biopsies sont cultivées pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de

PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les marquages du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine sont effectués après démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du collagène I (Rockland, Réf. 600-401-103-0.5), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la dermatopontine (Santa Cruz, Réf. Sc-376863), d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'élastine (Abcam, Réf. Ab21610), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206 et A21202). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification du contenu de dermatopontine dans le derme est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage de l'élastine est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 1 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de collagène I et de dermatopontine et de la longueur des fibres d'élastine comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus

sur la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau *ex vivo* traitée pendant 72h avec les différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 1) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 4, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3 ; ***: hautement significatif, *: significatif, ns: non significatif, avec le test t de Student.

Tableau 1 :

	Expression du col I (%)	Contenu en DPT (%)	Longueur des fibres d'élastine (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	164	165	166
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	133	141	105
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	128	139	108

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). Ces protéines sont impliquées dans la fermeté et l'élasticité de la peau, leur synthèse permet donc un effet raffermissant. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané en améliorant la fermeté et l'élasticité de la peau.

Exemple 14 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur la matrice extracellulaire du derme par l'étude du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la matrice extracellulaire du derme de trois extraits d'aneth

obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines collagène I, dermatopontine et élastine impliquées dans la structure de la matrice extracellulaire.

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les marquages du collagène I, de la dermatopontine et de l'élastine sont effectués après démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique du collagène I (Rockland, Réf. 600-401-103-0.5), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la dermatopontine (Santa Cruz, Réf. Sc-376863), d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'élastine (Abcam, Réf. Ab21610), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin ou anti-souris couplé à un fluorochrome (Invitrogen,

Réf. A21206 et A21202). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification du contenu de dermatopontine dans le derme est réalisée, à l'aide du logiciel Velocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage de l'élastine est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

10 Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 2 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (dermatopontine) ou 72h (collagène I et élastine) permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de collagène I et de dermatopontine et de la longueur des fibres d'élastine comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification de la longueur des fibres après marquage immunofluorescent de l'élastine sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec les différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 2) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 4.

Tableau 2 :

	Expression du col I (%)	Contenu en DPT (%)	Longueur des fibres d'élastine (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	139	119	134
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	81	115	125

Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	164	165	166
---	-----	-----	-----

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression du collagène I et de l'élastine dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Ces protéines sont impliquées dans la fermeté et l'élasticité de la peau, leur synthèse permet donc un effet raffermissant. L'extrait d'aneth, et notamment d'aneth provenant d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané en améliorant la fermeté et l'élasticité de la peau.

Exemple 15 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur l'hydratation par l'étude de l'acide hyaluronique

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la synthèse de l'acide hyaluronique de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

L'étude de l'expression de l'acide hyaluronique est un moyen de juger de l'effet hydratant de l'invention. En effet, l'acide hyaluronique est un composant majoritaire de la matrice extracellulaire du derme, également présent dans l'épiderme, et est impliqué dans l'hydratation cutanée.

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture ex vivo en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h et reçoivent 2

applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Le marquage de l'acide hyaluronique est réalisé à l'aide d'une protéine de liaison spécifique de l'acide hyaluronique, biotinylé (Coger-Seikagaki, Réf. 400-763-1A), et de streptavidine couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. S32354). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage de l'acide hyaluronique est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 3 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une augmentation significative de la synthèse d'acide hyaluronique aussi bien dans le derme que dans l'épiderme, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de l'acide hyaluronique sur peau ex vivo traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 3) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 5, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3 ; ***: hautement significatif, **: très significatif, ns: non significatif, avec le test *t* de Student.

Tableau 3 :

	Synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme (%)	Synthèse d'acide hyaluronique dans le derme (%)
Contrôle	100	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	171	175
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	133	134
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	107	94

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage la synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme et le derme de la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). L'acide hyaluronique est impliqué dans l'hydratation de la peau.

Exemple 16 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur l'hydratation par l'étude de l'acide hyaluronique

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la synthèse de l'acide hyaluronique de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

L'étude de l'expression de l'acide hyaluronique est un moyen de juger de l'effet hydratant de l'invention. En effet, l'acide hyaluronique est un composant majoritaire de la matrice

extracellulaire du derme, également présent dans l'épiderme, et est impliqué dans l'hydratation cutanée.

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont
5 maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la
10 concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm
15 d'épaisseur sont ensuite réalisées. Le marquage de l'acide hyaluronique est réalisé à l'aide d'une protéine de liaison spécifique de l'acide hyaluronique, biotinylé (Coger-Seikagaki, Réf. 400-763-1A), et de streptavidine couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. S32354). Les biopsies sont alors examinées au
20 microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

25 Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 4 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une augmentation significative de la synthèse d'acide hyaluronique
30 aussi bien dans le derme que dans l'épiderme, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification du

marquage de l'acide hyaluronique sur peau *ex vivo* traitée pendant 72h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 4) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 5.

Tableau 4 :

	Synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme (%)	Synthèse d'acide hyaluronique dans le derme (%)
Contrôle	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	133	157
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	89	109
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	171	175

5 Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage la synthèse d'acide hyaluronique dans l'épiderme et le derme de la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. L'acide hyaluronique est impliqué dans l'hydratation de la peau.

Exemple 17 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur le vieillissement de la peau par l'étude de P16, de la kératine 14 et de la fibrilline 1

Le but de cette étude est de comparer les effets sur le vieillissement de la peau de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines p16, kératine 14 (K14) et fibrilline 1, impliquées dans le vieillissement cutané. p16 est un régulateur du cycle cellulaire qui augmente avec l'âge

(Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell*. 2006 5(5):379-89). La kératine 14 est un composant du cytosquelette des kératinocytes de la lame basale de l'épiderme, qui disparaît avec la différenciation de ces cellules. La fibrilline 1 est un composant des fibres élastiques particulièrement sensible au vieillissement photoinduit (Watson RE, Griffiths CE, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol*. 1999 112(5):782-7).

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite congelées (fibrilline 1) ou fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine (p16 et K14). Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite réalisées. Les marquages p16, kératine 14 et fibrilline 1 sont effectués après un éventuel démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de p16 (Abcam, Réf. Ab54210), d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la fibrilline 1 (Abcam, Réf. Ab3090), puis d'un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21202 et A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence

(Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage p16 et K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage fibrilline 1 est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 5 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une diminution significative de l'expression de p16 et une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 72h permettent d'observer une augmentation significative de la longueur des fibres comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec l'extrait d'aneth obtenu selon l'exemple 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 5) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 6, dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3-6 ; ***: hautement significatif, **: très significatif, *: significatif, ~: presque significatif (p=0.055), ns: non significatif, avec le test t de Student.

Tableau 5 :

	Expression de p16 (%)	Expression de K14 (%)	Longueur des fibres de fibrilline 1 (%)
Contrôle	100	100	100

Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	65	122	138
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	83	113	162
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	89	108	98

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) limite l'expression de p16 et stimule davantage l'expression de K14 dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule également davantage l'expression de la fibrilline 1 en comparaison de la macération, non enrichis en petits ARN, d'aneth d'Himalaya (exemple 7) mais pas en comparaison de l'extrait ne contenant pas de petits ARN (exemple 6). Ces protéines sont impliquées dans le vieillissement de la peau. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané.

Exemple 18 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur le vieillissement de la peau par l'étude de P16, de la kératine 14 et de la fibrilline 1

Le but de cette étude est de comparer les effets sur le vieillissement de la peau de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression des protéines p16, kératine 14 (K14) et fibrilline 1, impliquées dans le vieillissement cutané.

Protocole:

5 Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait
10 d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite
15 congelées (fibrilline 1) ou fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine (p16 et K14). Des coupes de peau sont ensuite réalisées. Les marquages p16, kératine 14 et fibrilline 1 sont effectués après un éventuel démasquage des sites spécifiques. Les immunomarquages sont réalisés à l'aide d'un
20 anticorps monoclonal de souris spécifique de p16 (Abcam, Réf. Ab54210), d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de la fibrilline 1 (Abcam, Réf. Ab3090), puis d'un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à un
25 fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21202 et A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage du collagène I est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification
30 de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage p16 et K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision). Une quantification de la longueur des fibres obtenues après marquage fibrilline 1 est réalisée, à l'aide du logiciel ImageJ.

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 6 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h (p16 et K14) ou 72h (fibrilline 1) permettent d'observer une diminution significative de l'expression de p16, une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 et une augmentation de la longueur des fibres comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage de p16 sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 6) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 6.

Tableau 6 :

	Expression de p16 (%)	Expression de K14 (%)	Longueur des fibres de fibrilline 1 (%)
Contrôle	100	100	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	79	115	116
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	102	104	93
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	65	122	138

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) limite l'expression de p16 et stimule davantage l'expression de K14 et de fibrilline 1 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Ces protéines sont impliquées dans le vieillissement de la peau. L'extrait d'aneth, et notamment d'aneth provenant d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de lutter efficacement contre les signes du vieillissement cutané.

Exemple 19 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur la fonction barrière de la peau par l'étude de l'E-cadhérine

Le but de cette étude est de comparer les effets sur la fonction barrière de la peau de trois extraits d'aneth d'Himalaya. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression d'E-cadhérine, protéine des jonctions serrées, impliquée dans l'adhésion cellulaire (Contreras RG, Shoshani L, Flores-Maldonado C, Lazaro A, Monroy AO, Roldan ML, Fiorentino R, Cereiido M. E-cadherin and tight junctions between epithelial cells of different animal species. *Eur J Physiol.* 2002 444 :467-475).

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture ex vivo en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont réalisées. Après démasquage, l'immunomarquage est réalisé à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'E-cadhérine (Abcam, Réf. Ab15148), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss

Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

5 Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 7 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une augmentation significative de l'expression d'E-cadhérine comparé à la
10 condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage d'E-cadhérine sur peau *ex vivo*
15 traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 7) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 7 dans laquelle : moyenne +/- sem ; n=3 ; *: significatif, ~: presque significatif (p=0.057), ns: non significatif, avec le test *t* de Student.

20 Tableau 7 :

	Expression d'E-cadhérine (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	116
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	98
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	98

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule l'expression d'E-cadhérine dans la peau *ex vivo* humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non
25 enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). Cette protéine étant impliquée dans l'adhésion cellulaire, l'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet de renforcer la barrière cutanée.

Exemple 20 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur la fonction barrière de la peau par l'étude de l'E-cadhérine

5 Le but de cette étude est de comparer les effets sur la fonction barrière de la peau de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non
10 himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois
15 extraits d'aneth sur l'expression d'E-cadhérine, protéine des jonctions serrées, impliquée dans l'adhésion cellulaire.

Protocole:

Des biopsies de peau humaine de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique
20 (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle
25 est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont réalisées. Après démasquage, l'immunomarquage est réalisé à
30 l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin spécifique de l'E-cadhérine (Abcam, Réf. Ab15148), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de

l'intensité de la fluorescence obtenue est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 8 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une augmentation significative de l'expression d'E-cadhérine comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Les résultats obtenus sur la quantification du marquage d'E-cadhérine sur peau ex vivo traitée pendant 48h avec différents extraits d'aneth à 1% (Tableau 8) sont plus particulièrement illustrés dans la Figure 7,

Tableau 8 :

	Expression d'E-cadhérine (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	101
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	101
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	116

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule l'expression d'E-cadhérine dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. Cette protéine étant impliquée dans l'adhésion cellulaire, l'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet de renforcer la barrière cutanée.

Exemple 21 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur la fonction barrière de la peau par l'étude de la pénétration du Lucifer Yellow dans des épidermes reconstruits (RHE) stressés

Le but de cette étude est de comparer les effets de trois extraits d'aneth d'Himalaya sur le maintien de la fonction barrière d'une peau reconstruite stressée par du SDS et des particules grossières de pollution (PM10). Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

L'étude de la pénétration du colorant fluorescent, Lucifer Yellow, est un moyen de juger de l'état de la barrière cutanée.

Protocole:

Des épidermes reconstruits de peau humaine (RHE) de 8 mm de diamètre sont maintenues en culture en présence d'un milieu spécifique sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h. Elles reçoivent 2 applications par jour pendant 48h d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume, puis 1 application de SDS à 0,15% pendant 3h, puis 1 application de PM10 à 100 µg/ml pendant 24h. Deux conditions contrôles sont réalisées à l'aide de PBS 1X, suivi, ou non, de l'application de SDS et de PM10. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 150 µl déposée à la surface des RHE. Après les traitements le Lucifer Yellow est appliqué sur les RHE à 0,5 mg/ml pendant 1h. Les RHE sont ensuite fixés dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les RHE sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de la pénétration de la fluorescence obtenue après application du Lucifer Yellow est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

L'application des stress SDS et PM10 induit une perméabilisation de la barrière cutanée qui laisse pénétrer le Lucifer Yellow.

- 5 Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 9 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h avant stress SDS et PM10 permettent d'observer une pénétration du Lucifer Yellow moins profonde,
- 10 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X avant stress SDS et PM10 et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention
- 15 permet donc de renforcer la fonction barrière de la peau.

Tableau 9 :

	Pénétration du Lucifer Yellow (%)
Contrôle stressé	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5 + stress	77
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6+ stress	103
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7+ stress	112

Conclusion:

- L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) permet de limiter la pénétration du Lucifer Yellow, donc de
- 20 renforcer la fonction barrière, dans des RHE stressés au SDS et PM10. Les extraits d'aneth d'Himalaya non enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7) ne permettent pas ce renforcement.

- Exemple 22 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de
- 25 différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur la

fonction barrière de la peau par l'étude de la pénétration du Lucifer Yellow dans des épidermes reconstruits (RHE) stressés

Le but de cette étude est de comparer, sur le maintien de la fonction barrière d'une peau reconstruite stressée par du SDS et des particules grossières de pollution (PM10), les effets de trois extraits d'aneth obtenu selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

L'étude de la pénétration du colorant fluorescent, Lucifer Yellow, est un moyen de juger de l'état de la barrière cutanée.

Protocole:

Des épidermes reconstruits de peau humaine (RHE) de 8 mm de diamètre sont maintenues en culture en présence d'un milieu spécifique sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 72h. Elles reçoivent 2 applications par jour pendant 48h d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume, puis 1 application de SDS à 0,15% pendant 3h, puis 1 application de PM10 à 100 µg/ml pendant 24h. Deux conditions contrôles sont réalisées à l'aide de PBS 1X, suivi, ou non, de l'application de SDS et de PM10. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 150 µl déposée à la surface des RHE. Après les traitements le Lucifer Yellow est appliqué sur les RHE à 0,5 mg/ml pendant 1h. Les RHE sont ensuite fixés dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de 4 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées. Les RHE sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de la pénétration de la fluorescence

obtenue après application du Lucifer Yellow est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

L'application des stress SDS et PM10 induit une perméabilisation de la barrière cutanée qui laisse pénétrer le Lucifer Yellow.

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 10 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h avant stress SDS et PM10 permettent d'observer une pénétration du Lucifer Yellow moins profonde, comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X avant stress SDS et PM10 et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte.

Tableau 10 :

	Pénétration du Lucifer Yellow (%)
Contrôle stressé	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4 + stress	108
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3 + stress	87
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5 + stress	77

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) permet de limiter la pénétration du Lucifer Yellow, donc de renforcer la fonction barrière, dans des RHE stressés au SDS et PM10. Les extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte ne permettent pas ou moins ce renforcement. L'extrait d'aneth, et notamment d'aneth provenant d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la fonction barrière de la peau.

Exemple 23 : Evaluation des effets des extraits d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 sur le cuir chevelu

Le but de cette étude est de comparer les effets de trois extraits d'aneth d'Himalaya sur le cuir chevelu. Le premier
5 extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 5, le deuxième extrait ne contenant pas d'ARN de petit poids moléculaire, obtenu selon l'exemple 6 et le dernier extrait obtenu après macération selon l'exemple 7.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois
10 extraits d'aneth sur l'expression de la kératine 14 (K14) qui est exprimée dans l'épiderme et dans les cheveux. Cette protéine est remplacée par d'autres kératines avec la différenciation des cellules de l'épiderme. Dans les cheveux, elle est exprimée dans la gaine externe (Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E. Expression of
15 keratin K14 in the epidermis and hair follicle: insights into complex programs of differentiation. JCB 1989 109(5): 2295-312) et est un marqueur de bonne santé du cheveux.

Protocole:

Des biopsies de cuir chevelu humain de 6 mm de diamètre
20 sont maintenues en culture ex vivo en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth selon les exemples 5, 6 et 7 dilué au 1/100eme dans du PBS, soit à la concentration
25 finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite
30 réalisées. Le marquage de la kératine 14 est effectués après démasquage des sites spécifiques. L'immunomarquages est réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf.

A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

5 Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 11 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une
 10 augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 6 (absence d'ARN de petit poids moléculaire) et 7 (macération) à partir de plantes provenant d'Himalaya.

15 Tableau 11 :

	Expression de K14 (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	123
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 6	104
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 7	93

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression de K14 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth d'Himalaya non
 20 enrichis en petits ARN (exemples 6 et 7). La kératine 14 est impliquée dans la bonne santé des cheveux. L'extrait d'aneth obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la structure du cheveu, d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.

25

Exemple 24 : Evaluation des effets des extraits d'aneth de différentes origines (Chine non himalayenne, Egypte, Chine

d'Himalaya) respectivement selon les exemples 3, 4 et 5 sur le cuir chevelu

Le but de cette étude est de comparer les effets sur le cuir chevelu de trois extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3, 4 et 5 ayant des origines géographiques différentes. Le premier extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant de Chine non himalayenne, le deuxième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Egypte et le troisième extrait enrichi en ARN de petit poids moléculaire, obtenu à partir d'aneth provenant d'Himalaya.

Le but de cette étude est d'évaluer les effets de ces trois extraits d'aneth sur l'expression de la kératine 14 (K14) qui est exprimée dans l'épiderme et dans les cheveux.

Protocole:

Des biopsies de cuir chevelu humain de 6 mm de diamètre sont maintenues en culture *ex vivo* en présence d'un milieu spécifique (DMEM 1 g/L, HAM'S F12, SVF et antibiotiques) sur des inserts. Les biopsies sont cultivées pendant 48h et reçoivent 2 applications par jour d'un extrait d'aneth de différentes origines géographiques, dilué au 1/100ème dans du PBS, soit à la concentration finale de 1% volume/volume. La condition contrôle est réalisée à l'aide de PBS 1X. Les applications sont réalisées sous forme d'une goutte de 10 µl déposée à la surface de la biopsie. Les biopsies sont ensuite fixées dans le formaldéhyde puis incluses dans la paraffine. Des coupes de peau de 4 µm sont ensuite réalisées. Le marquage de la kératine 14 est effectué après démasquage des sites spécifiques. L'immunomarquage est réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal de lapin spécifique de la kératine 14 (Abcam, Réf. Ab51054), puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome (Invitrogen, Réf. A21206). Les biopsies sont alors examinées au microscope à Epi-fluorescence (Zeiss Axiovert 200M). Une quantification de

l'intensité de la fluorescence obtenue après marquage K14 est réalisée, à l'aide du logiciel Volocity® (Improvision).

Résultats:

Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 12 ci-après. Les traitements avec l'extrait d'aneth enrichi en petits ARN, obtenu selon l'exemple 5 à partir d'aneth provenant d'Himalaya à 1% pendant 48h permettent d'observer une augmentation significative de l'expression de la kératine 14 comparé à la condition contrôle traitée avec du PBS 1X et comparé aux traitements avec les extraits d'aneth obtenus selon les exemples 3 et 4 à partir de plantes provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte.

Tableau 12 :

	Expression de K14 (%)
Contrôle	100
Extrait d'aneth d'Egypte selon l'exemple 4	121
Extrait d'aneth de Chine non himalayenne selon l'exemple 3	117
Extrait d'aneth d'Himalaya selon l'exemple 5	123

Conclusion:

L'extrait d'aneth d'Himalaya enrichi en petits ARN (exemple 5) stimule davantage l'expression de K14 dans la peau ex vivo humaine en comparaison des extraits d'aneth enrichi en petits ARN (exemples 3 et 4) provenant de Chine non himalayenne et d'Egypte. La kératine 14 est impliquée dans la bonne santé des cheveux. L'extrait d'aneth, et notamment provenant d'aneth d'Himalaya, obtenu selon l'invention permet donc de renforcer la structure du cheveu, d'améliorer leur apparence et de favoriser leur lissage et leur résistance.

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend, en tant qu'agent actif, dans un milieu physiologiquement acceptable, une quantité efficace d'un extrait aqueux des parties aériennes d'aneth (*Anethum graveolens*) enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides obtenu à partir d'une matière végétale suivant les étapes suivantes selon lesquelles :

a) on met en présence des parties aériennes d'*Anethum graveolens* avec de l'eau ;

b) on ajoute de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) tétrasodique dans le mélange obtenu en a) à un pH compris entre 10,5 et 11 ;

c) on ajuste ensuite le pH du mélange obtenu en b) à une valeur comprise entre 6 et 8 ;

d) on purifie le mélange obtenu en c) de manière à éliminer la matière végétale solide résiduelle et obtenir un extrait brut aqueux purifié ; et

e) on contrôle le pH et on le réajuste si nécessaire à une valeur comprise entre 6 et 8, préférentiellement entre 6 et 6,5.

2. Composition cosmétique selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'extrait aqueux de partie aérienne d'aneth enrichi en petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et dépourvu d'ADN, comprend en poids du poids total de l'extrait, 10 à 30 g/kg d'extrait de poids sec, 2 à 10 g/kg de fragments protéiques, 2 à 10 g/kg de sucres, 0,2 à 3 g/kg d'acides aminés, 100 à 2000 mg/kg de composés phénoliques et 10 à 100 mg/kg d'ARN de petit poids moléculaire d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides et ne comprend pas d'ADN.

3. Composition cosmétique selon la revendication 2, caractérisée en ce que l'extrait est dilué dans un solvant et comprend en poids du poids total de l'extrait, 5-15 g/kg

d'extrait sec, de 50 à 1000 mg/kg de polyphénols 0,5-10 g/kg de fragments protéiques, 0,5-10 g/kg de sucres, de 0,1 à 1 g/kg d'acides aminés et 10-100 mg/kg de petits ARN d'une longueur d'au maximum 150 nucléotides.

5 4. Composition cosmétique selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'extrait est obtenu à partir d'aneth d'Himalaya.

10 5. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'extrait est présent à une concentration comprise entre 0,1 et 5% en poids du poids total de la composition.

15 6. Composition cosmétique selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'extrait est présent à une concentration comprise entre 0,5 et 2,5% en poids du poids total de la composition.

7. Composition cosmétique selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle est formulée pour être administrée par voie orale ou être appliquée topiquement sur la peau.

20 8. Utilisation cosmétique d'une composition selon l'une des revendications 1 à 7 pour le soin de la peau, du cuir chevelu et des phanères.

25 9. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour améliorer l'hydratation de la peau et renforcer la fonction barrière.

10. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour lutter contre les signes du vieillissement cutané et améliorer la fermeté et l'élasticité de la peau.

30 11. Utilisation cosmétique selon la revendication 8, pour améliorer la santé du cheveu.

1/3

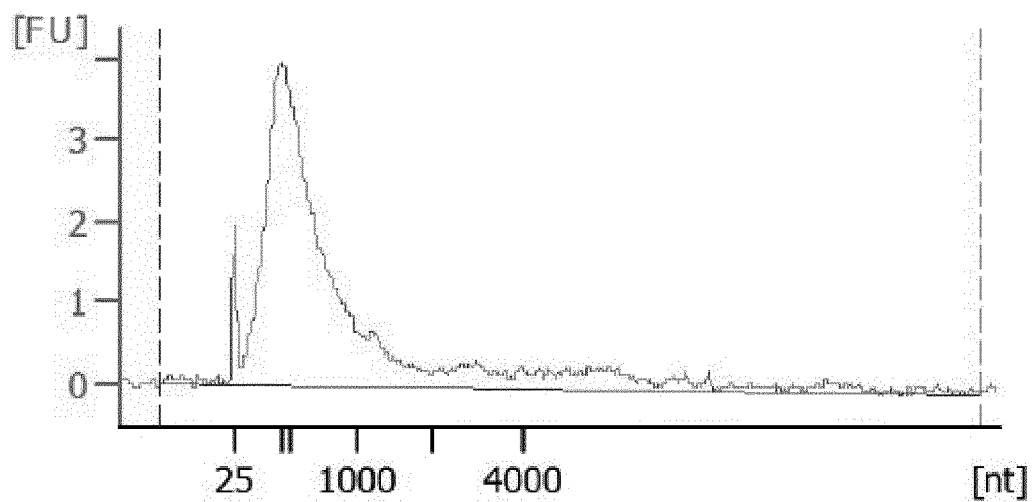


Fig. 1

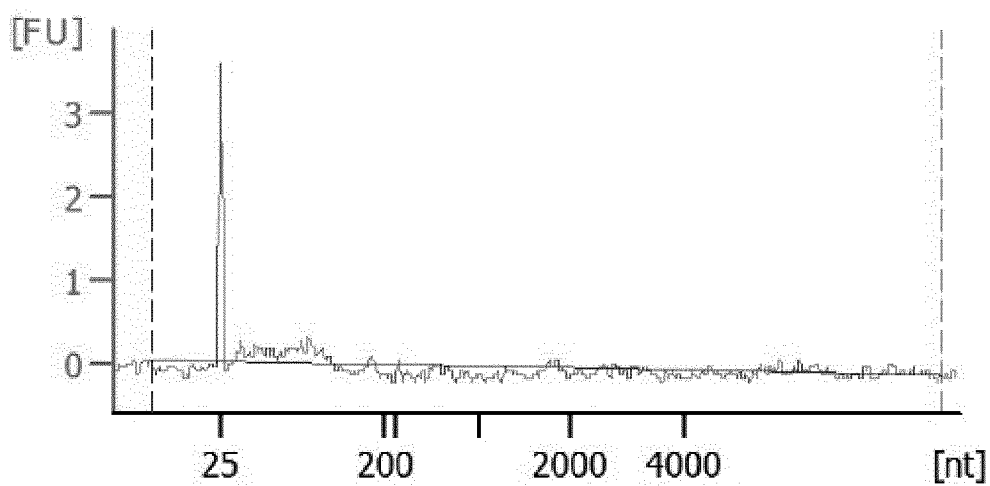


Fig. 2

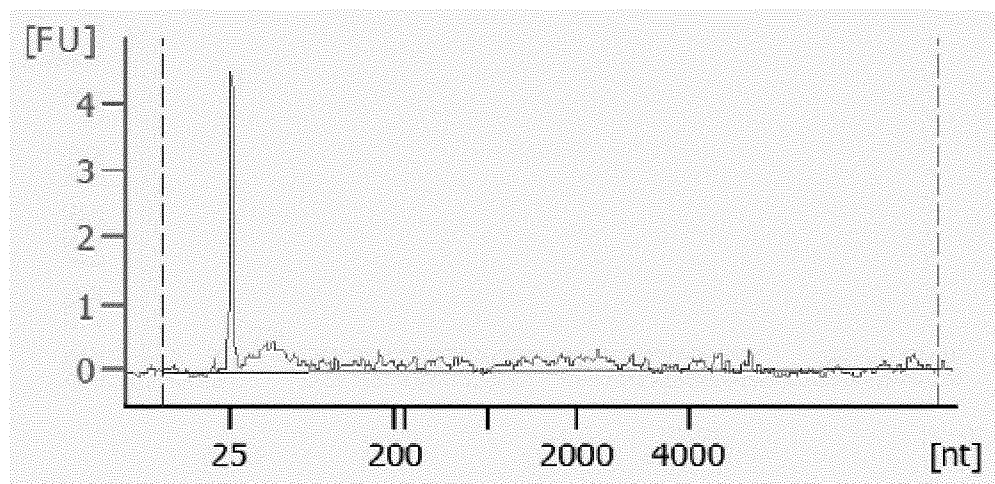


Fig. 3

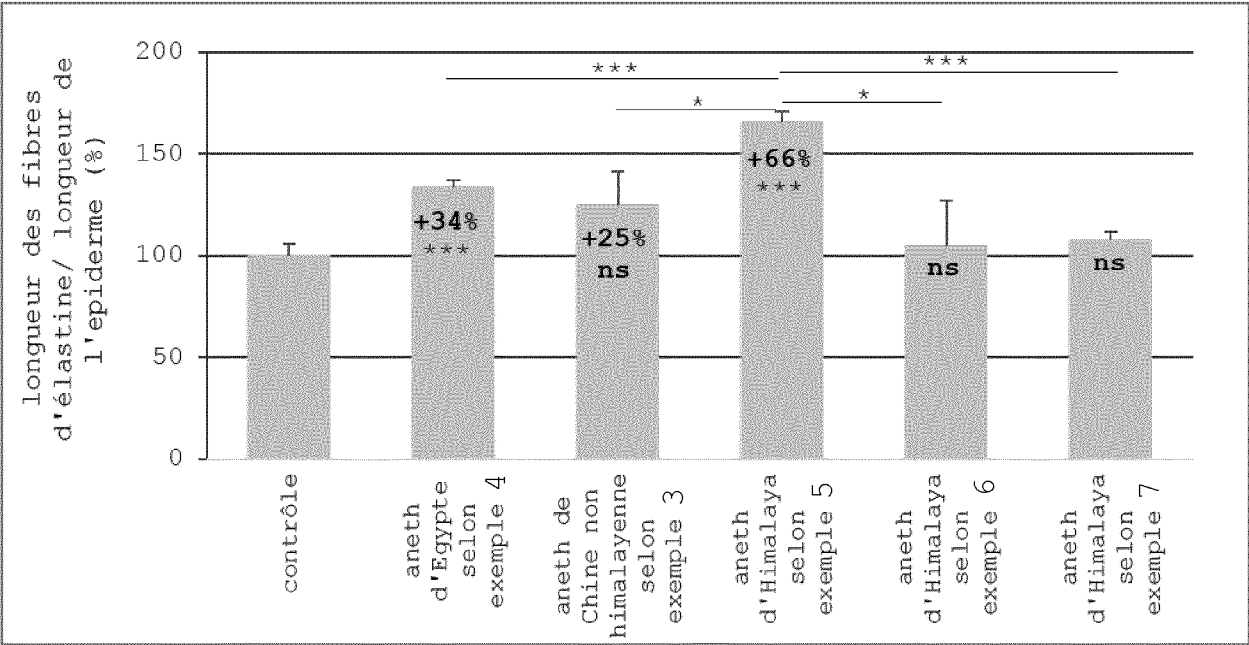


Fig. 4

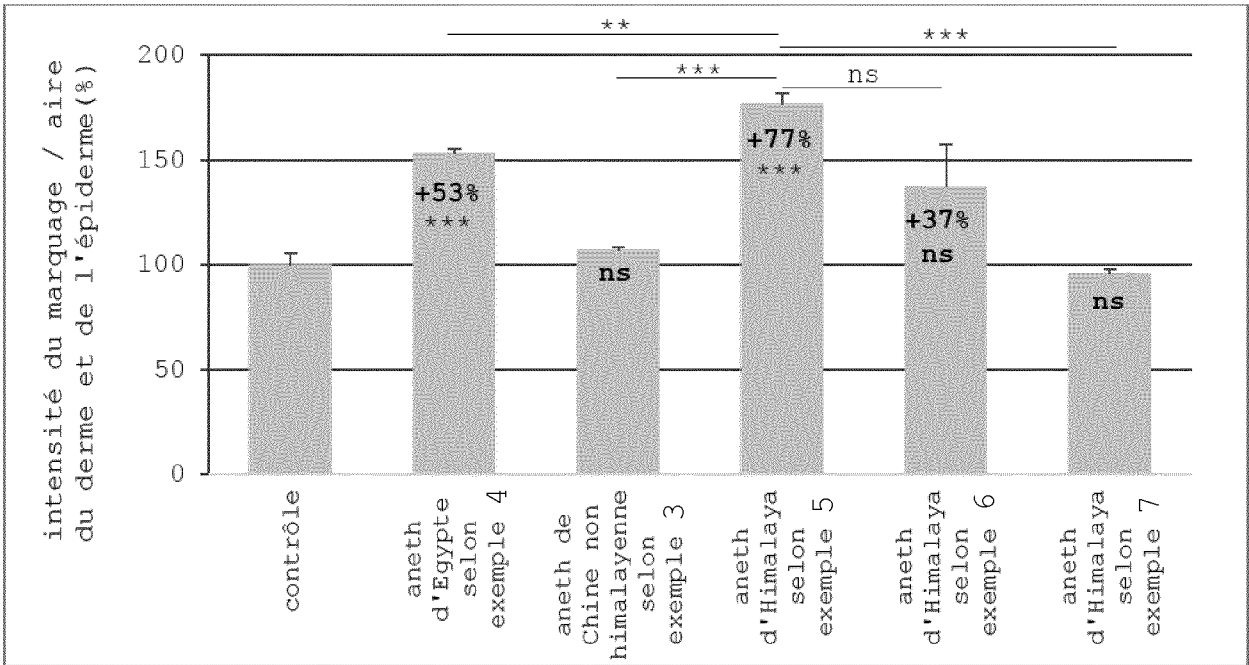


Fig. 5

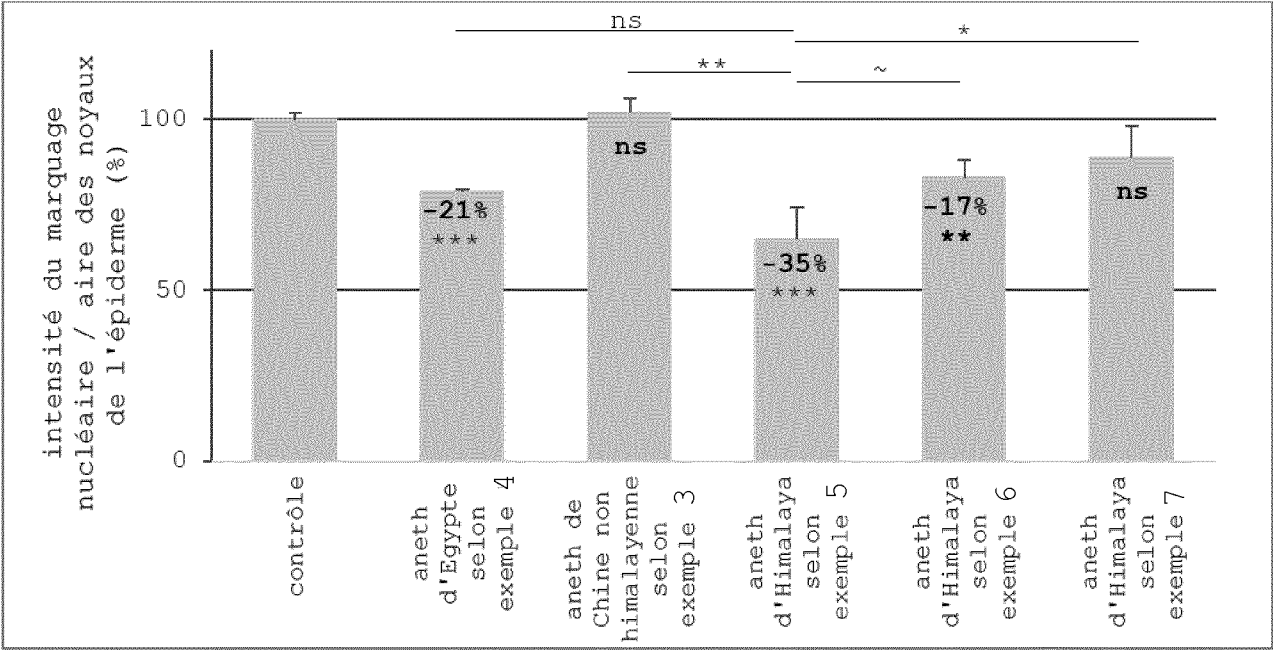


Fig. 6

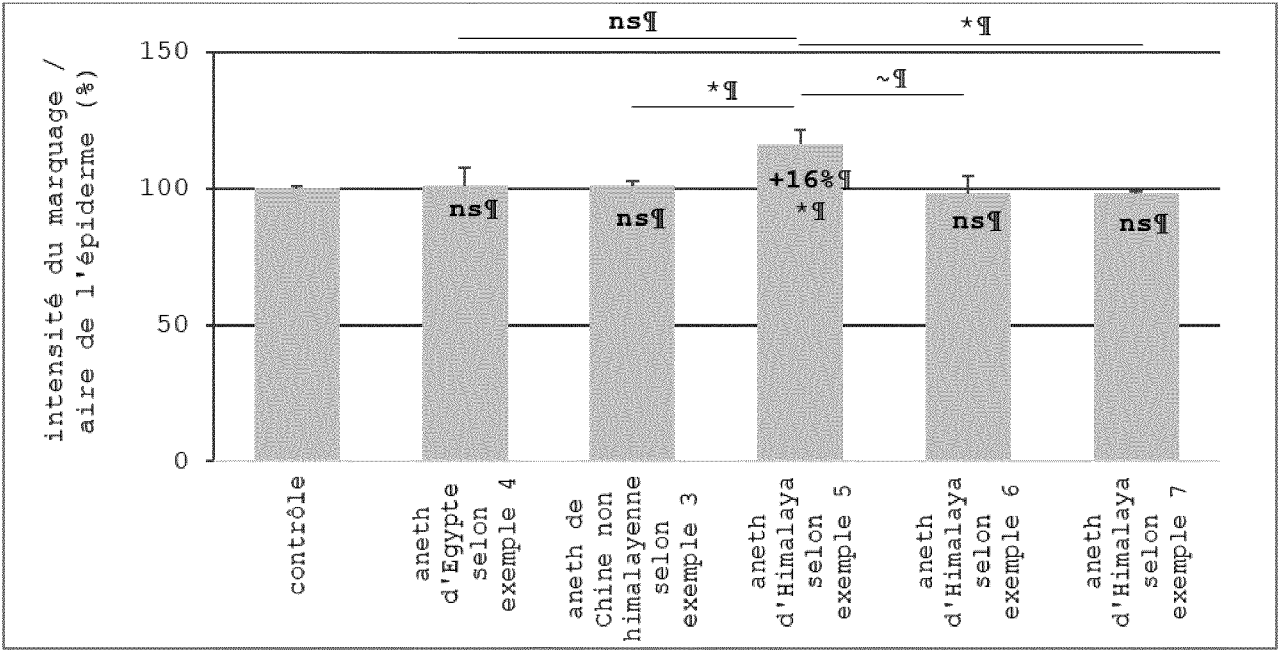


Fig. 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/062186

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61Q19/00 A61Q19/08 C12N15/10 A61K8/9789 A61Q5/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61Q C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 10 2010 027180 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 26 May 2011 (2011-05-26) paragraphs [0001], [0008] - [0010]; claims 1,2	1-11
A	----- US 2010/215785 A1 (KIZOULIS MENAS G [US] ET AL) 26 August 2010 (2010-08-26) paragraph [0001] paragraph [0046] - paragraph [0054]; examples	1-11
A	----- US 2010/239510 A1 (HA ROBERT BAO KIM [US] ET AL) 23 September 2010 (2010-09-23) paragraph [0002] paragraph [0030] - paragraph [0033]; examples	1-11
	----- -/--	



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 June 2018

Date of mailing of the international search report

20/06/2018

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Sala, Nathalie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/062186

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2012/308620 A1 (ZADINI FILIBERTO P [US] ET AL) 6 December 2012 (2012-12-06) paragraph [0002] - paragraph [0010]; claims 2-4	1-11
A	----- Ronald J. Smernik, Ashlea L.Doolette, Sarah R. Noack: "Identification of RNA Hydrolysis Products in NaOH-EDTA extracts using 31P NMR Spectroscopy", Communications in Soil Science and Plant Analysis , 12 October 2015 (2015-10-12), pages 2746-2756, XP002775075, DOI: 10.1080/00103624.2015.1093640 Retrieved from the Internet: URL:http://www.tandfonline.com/doi/full/10 .1080/00103624.2015.1093640 [retrieved on 2017-10-26] abstract -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2018/062186

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 102010027180 A1	26-05-2011	NONE	

US 2010215785 A1	26-08-2010	AU 2010200565 A1	09-09-2010
		BR PI1000320 A2	29-03-2011
		CA 2693706 A1	20-08-2010
		CN 101810552 A	25-08-2010
		EP 2246042 A2	03-11-2010
		KR 20100095395 A	30-08-2010
		NZ 583416 A	30-09-2011
		RU 2010106079 A	27-08-2011
		US 2010215785 A1	26-08-2010
		US 2012064173 A1	15-03-2012
		US 2013071500 A1	21-03-2013

US 2010239510 A1	23-09-2010	US 2010239510 A1	23-09-2010
		WO 2010085532 A2	29-07-2010

US 2012308620 A1	06-12-2012	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/EP2018/062186

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE INV. A61Q19/00 A61Q19/08 C12N15/10 A61K8/9789 A61Q5/00 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61Q C12N A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DE 10 2010 027180 A1 (HENKEL AG & CO KGAA [DE]) 26 mai 2011 (2011-05-26) alinéas [0001], [0008] - [0010]; revendications 1,2 -----	1-11
A	US 2010/215785 A1 (KIZOULIS MENAS G [US] ET AL) 26 août 2010 (2010-08-26) alinéa [0001] alinéa [0046] - alinéa [0054]; exemples -----	1-11
A	US 2010/239510 A1 (HA ROBERT BAO KIM [US] ET AL) 23 septembre 2010 (2010-09-23) alinéa [0002] alinéa [0030] - alinéa [0033]; exemples ----- -/--	1-11
☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents ☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "&" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 6 juin 2018		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 20/06/2018
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Sala, Nathalie

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2018/062186

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 2012/308620 A1 (ZADINI FILIBERTO P [US] ET AL) 6 décembre 2012 (2012-12-06) alinéa [0002] - alinéa [0010]; revendications 2-4	1-11
A	----- Ronald J. Smernik, Ashlea L.Doolette, Sarah R. Noack: "Identification of RNA Hydrolysis Products in NaOH-EDTA extracts using 31P NMR Spectroscopy", Communications in Soil Science and Plant Analysis , 12 octobre 2015 (2015-10-12), pages 2746-2756, XP002775075, DOI: 10.1080/00103624.2015.1093640 Extrait de l'Internet: URL:http://www.tandfonline.com/doi/full/10 .1080/00103624.2015.1093640 [extrait le 2017-10-26] abrégé -----	1-11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2018/062186

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 102010027180 A1	26-05-2011	AUCUN	

US 2010215785 A1	26-08-2010	AU 2010200565 A1	09-09-2010
		BR PI1000320 A2	29-03-2011
		CA 2693706 A1	20-08-2010
		CN 101810552 A	25-08-2010
		EP 2246042 A2	03-11-2010
		KR 20100095395 A	30-08-2010
		NZ 583416 A	30-09-2011
		RU 2010106079 A	27-08-2011
		US 2010215785 A1	26-08-2010
		US 2012064173 A1	15-03-2012
		US 2013071500 A1	21-03-2013

US 2010239510 A1	23-09-2010	US 2010239510 A1	23-09-2010
		WO 2010085532 A2	29-07-2010

US 2012308620 A1	06-12-2012	AUCUN	
