

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 084 833**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **18 57373**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 36/18 (2018.01), A 61 P 17/00, A 61 Q 19/00**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 08.08.18.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.02.20 Bulletin 20/07.

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

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE
INDERMA — FR.

⑦2 Inventeur(s) : BONY PAULINE, FAVARD JEAN-
PIERRE, LECLERE JACQUES et SOFTA MOHAMED.

⑦3 Titulaire(s) : LABORATOIRE DERMATOLOGIQUE
INDERMA.

⑦4 Mandataire(s) : IPSILON Société par actions simpli-
fiée.

⑤4 **COMPLEXE VEGETAL A BASE D'EXTRAITS DE NENUPHAR BLANC ET D'ARGOUSIER ET APPLICATIONS
EN COSMETIQUE.**

⑤7 La présente invention est relative à un complexe vé-
gétal comprenant au moins un extrait de fleurs de nénuphar
blanc, au moins un extrait de rhizome de nénuphar blanc et
au moins un extrait d'argousier, et à ses applications en cos-
métique pour les soins de la peau, notamment pour protéger
la peau des effets néfastes des agressions extérieures
telles que les rayonnements ultraviolets, la pollution, etc...

FR 3 084 833 - A1



La présente invention se rapporte au domaine technique général des produits cosmétiques de soin, à usage topique, utilisables notamment sur la peau.

Plus précisément, la présente invention est relative à un complexe végétal comprenant au moins un extrait de fleurs de nénuphar blanc, au moins
5 un extrait de rhizomes de nénuphar blanc et au moins un extrait d'argousier, à son utilisation cosmétique et non thérapeutique à titre d'ingrédient actif ayant des propriétés anti-âge et anti-pollution dans une composition cosmétique destinée à prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané, ainsi qu'à
10 une composition cosmétique à application topique comprenant un tel complexe végétal à titre d'ingrédient actif, en particulier d'ingrédient actif anti-âge et anti-pollution. Elle se rapporte également à un procédé cosmétique non thérapeutique pour les soins de la peau mettant en œuvre une telle composition, ainsi qu'à l'utilisation cosmétique et non thérapeutique d'une telle
15 composition cosmétique pour les soins de la peau, et notamment pour protéger la peau des effets néfastes des agressions extérieures telles que les rayonnements ultraviolets, la pollution, etc...

La peau est le principal organe du corps humain avec une surface totale d'environ 2 m². La peau comprend plusieurs couches intégrées, allant de la
20 couche superficielle, l'épiderme, jusqu'aux couches plus profondes, le derme et l'hypoderme, et chacune de ces couches possède des propriétés spécifiques permettant à l'ensemble de réagir et de s'adapter aux conditions de son environnement.

L'épiderme, principalement composé de kératinocytes, de mélanocytes
25 et de cellules de Langerhans, joue un rôle fondamental pour assurer la protection et le maintien d'une bonne trophicité. Les kératinocytes sont des cellules extrêmement dynamiques qui subissent une prolifération et une différenciation permanentes aux termes desquelles elles se transforment en cellules mortes (cornéocytes), s'éliminant régulièrement par desquamation.

Le derme se compose principalement de collagène, d'élastine et de
30 protéoglycanes, molécules synthétisées par les fibroblastes dermiques. Les fibres de collagène assurent la résistance mécanique et la texture de la peau, l'élastine est responsable de l'élasticité, et les protéoglycanes, combinant protéines et glycosaminoglycane, jouent un rôle majeur de structure et
35 d'hydratation de la peau. Les glycosaminoglycanes, tels que l'acide hyaluronique, sont des molécules très hygroscopiques qui sont capables de retenir des quantités importantes d'eau. D'autres cellules, comme les

macrophages et les leucocytes, sont également présentes dans la couche du derme.

L'hypoderme, qui est la couche la plus profonde de la peau, contient les adipocytes qui produisent des lipides pour que le tissu sous-cutané fabrique
5 une couche lipidique protégeant les muscles, les os et les organes internes contre les chocs.

La peau protège l'organisme des agressions extérieures, contribue à la respiration et est le principal organe jouant sur l'immunité.

Les agressions de l'environnement, y compris les agressions climatiques
10 telle que l'exposition au soleil, les variations de températures, la pollution, jouent un rôle néfaste sur la peau en générant des radicaux libres qui sont des espèces réactives de l'oxygène (ou ROS, de l'expression anglophone « *Reactive oxygene species* ») telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). L'attaque par voie radicalaire initie des réactions en chaîne qui ne s'arrêtent que lorsque deux
15 radicaux libres s'inactivent mutuellement. En particulier, les radicaux libres génèrent un stress oxydant altérant les lipides membranaires des cellules de la peau et les cellules elles-mêmes, non seulement au niveau de l'ADN mitochondrial et des mitochondries, qui sont le centre énergétique des cellules et « l'atelier » de réparation cellulaire, provoquant un vieillissement prématuré
20 et/ou accéléré de la peau, mais également au niveau de l'ADN cellulaire, c'est-à-dire de l'ADN contenu dans le noyau des cellules.

Il est donc important de protéger les cellules de la peau des effets néfastes des agressions de l'environnement, et en particulier du stress oxydatif
25 généré notamment par les rayonnements UV afin de prévenir et/ou retarder l'apparition de signes de vieillissement cutanés tels que rides et ridules.

Des compositions cosmétiques ayant des propriétés antiradicalaires ont déjà été proposées, notamment des compositions comprenant de la superoxyde dismutase qui est une métalloprotéine possédant une activité
30 enzymatique catalysant la dismutation des anions superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène. Pour cette raison, cette enzyme est une composante essentielle du mécanisme d'élimination des radicaux libres (voir par exemple la demande de brevet FR2287899).

Par ailleurs, au regard de certains composés synthétiques, incorporés dans les compositions cosmétiques, les produits d'origine naturelle ou
35 contenant des composés naturels sont de plus en plus appréciés par les consommateurs(trices) et ont amené l'industrie cosmétique à proposer des

produits contenant des substances naturelles ou d'origine naturelle présentant des propriétés anti-radicalaires. C'est ainsi que l'on connaît déjà des compositions cosmétiques contenant des substances d'origine végétale, telles que par exemple des polyphénols, capables de piéger les radicaux libres produits en excès par l'organisme lors d'agressions externes.

A titre d'exemple, la demande de brevet EP 0 629 397 décrit une composition cosmétique ou pharmaceutique pour application topique ayant une action antiradicalaire et anti-inflammatoire, comprenant un extrait hydroglycolique de microalgues *Chlorella*, *Scenedesmus* et *Spiruline* en association avec un extrait de café vert.

Un autre exemple est donné par la demande de brevet EP 1 787 970 qui décrit une composition cosmétique à application topique ayant des propriétés anti-radicalaires comprenant des polyphénols extraits de fèves de cacao.

Par ailleurs, la demande de brevet JP 2008 037812 décrit des compositions cosmétiques renfermant un extrait de fleur de nénuphar blanc (*Nymphaea alba*) en association avec un extrait de fruits d'argousier. Il est mentionné que cette association a des propriétés d'inhibition de l'élastase.

Compte tenu de la demande toujours croissante pour de nouveaux produits et de l'attrait des consommateurs et consommatrices pour les produits d'origine naturelle, il existe toujours un besoin pour des compositions cosmétiques alternatives ayant notamment des propriétés anti-radicalaires et pouvant avantageusement être utilisées pour prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané en protégeant la peau des agressions extérieures telles que des rayonnements ultraviolets et de la pollution.

Les travaux réalisés par la Demanderesse ont montré que l'association d'au moins un extrait de fleurs de nénuphar blanc, d'au moins un extrait de rhizomes de nénuphar blanc et d'au moins un extrait de branches d'argousier présente des propriétés antipollution, antioxydantes et hydratantes de l'épiderme.

De plus, les essais effectués ont montré qu'un tel complexe végétal ne présentait aucune cytotoxicité.

Le nénuphar blanc ou nénufar blanc. (*Nymphaea alba*) est une plante herbacée vivace de la famille des *Nymphaeaceae*. C'est une plante aquatique qui peut atteindre deux mètres de haut et qui se développe dans les eaux dormantes, les bras morts des rivières et sur les lacs. Le nénuphar blanc a la particularité de flotter à la surface de l'eau. Les feuilles circulaires sont

constituées de larges limbes à longs pétioles qui proviennent d'un rhizome charnu fortement ancré en profondeur. Le nénuphar blanc donne des fleurs majestueuses et charnues d'un blanc éclatant qui sont riches en nutriments et en principes actifs hydratants et antioxydants. Les extraits de fleurs de
 5 nénuphar sont ainsi utilisés comme actif cosmétique pour leur action hydratante, notamment pour les soins des peaux sèches. En médecine, les extraits de fleurs et de rhizomes du nénuphar blanc sont connus pour leurs propriétés sédatives, astringentes, antiseptiques et anaphrodisiaques.

L'argousier (*Hippophae rhamnoides L.*) est une espèce d'arbrisseau
 10 dioïque, épineux, originaire des zones tempérées d'Europe et d'Asie. Il est également bien représenté dans les régions subtropicales d'Asie, en altitude. *Hippophae rhamnoides* appartient à la famille des Éléagnacées, (il est parfois orthographié *Hippophaë rhamnoïdes*). Il porte des fruits de forme ovoïde,
 15 jaunes ou oranges à maturité (vers le mois de septembre) et mesurent de 6 à 8 mm de diamètre. Les usages alimentaires, médicaux, horticoles et écologiques sont reconnus depuis au moins 1 200 ans (Li F. & Guo T., 1989 - *Application of Hippophae rhamnoides L. in Tibetan medicine.*, Proc. Int. Symp. Sea-buckthorn (*H. rhamnoides L.*), Xian, China. 409-412). En particulier, en
 20 Grèce antique, l'argousier servait de remède aux chevaux : les feuilles et les jeunes rameaux étaient ajoutés à leurs fourrages pour favoriser une prise de poids rapide et rendre le pelage lustré notamment à l'occasion de courses de chevaux. L'huile des fruits de l'argousier peut être utilisée comme produit alimentaire et comme produit pharmaceutique. Il existe deux sources d'huile
 25 dans les fruits d'argousier : l'huile de pépins d'argousier et l'huile de la pulpe du fruit. Il existe également l'huile de marc (tirée de l'ensemble du fruit et des pépins d'argousier). L'argousier a plusieurs applications médicales (vermifuges, toniques, astringentes, anti-infectieuses et anti-sclérotiques) et notamment contre les brûlures et blessures cutanées. En cosmétique, l'huile d'argousier est utilisée pour cicatriser et réhydrater la peau et les muqueuses.

30 Il n'était cependant pas connu que l'association d'au moins un extrait de fleur de nénuphar blanc, d'au moins un extrait de rhizome de nénuphar blanc et d'au moins un extrait de branches d'argousier aurait notamment des propriétés antipollution, antioxydantes et hydratantes de l'épiderme, pouvant
 35 avantageusement être mises à profit dans des compositions cosmétiques à application topique pour prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané et lutter contre les agressions extérieures telle que les effets néfastes des rayonnements ultraviolets et de la pollution.

Ainsi, la présente invention a pour premier objet un complexe végétal comprenant au moins un extrait de fleurs de nénuphar blanc (*Nymphaea alba*), au moins un extrait de rhizome de nénuphar blanc (*Nymphaea alba*) et au moins un extrait de branches d'argousier (*Hippophae rhamnoides L.*).

5 Un second objet de l'invention est l'utilisation cosmétique et non thérapeutique d'un complexe végétal tel que défini selon le premier objet de l'invention, à titre d'ingrédient actif ayant des propriétés anti-âge et anti-pollution, dans une composition cosmétique destinée à prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané et à lutter contre les agressions extérieures.

10 Un troisième objet de l'invention est une composition cosmétique à application topique comprenant, dans un support cosmétiquement acceptable, au moins un complexe végétal tel que défini selon le premier objet de l'invention, à titre d'ingrédient actif anti-âge et anti-pollution.

15 Un quatrième objet de l'invention est un procédé cosmétique non thérapeutique pour les soins de la peau, pour prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané, en particulier pour protéger la peau des effets néfastes des agressions extérieures telles que les rayonnements ultraviolets, la pollution, etc..., comprenant au moins une étape d'application sur la peau d'une composition cosmétique à application topique telle que définie selon le
20 troisième objet de l'invention, c'est-à-dire comprenant au moins un complexe végétal tel que défini selon le premier objet de l'invention.

Enfin, un cinquième objet de l'invention est l'utilisation cosmétique et non thérapeutique d'une composition cosmétique à application topique telle que définie selon le second objet de l'invention pour les soins de la peau,
25 notamment pour protéger la peau des effets néfastes des agressions extérieures telles que les rayonnements ultraviolets, la pollution, etc...

L'extrait de fleur de nénuphar blanc est de préférence un extrait aqueux. Il peut être obtenu par extraction aqueuse à partir des fleurs sèches entières, par exemple macération dans l'eau chaude (40 à 60°C) pendant environ 24
30 heures, puis filtration et concentration dans un évaporateur. L'extrait ainsi obtenu peut être conservé dans la glycérine, par exemple à raison de 80 % de glycérine pour 20 % d'extrait de fleur de nénuphar. Un tel extrait comprend, entre autres ingrédients, des polyphénols tels que des catéchines et des polysaccharides.

35 L'extrait de rhizomes de nénuphar blanc peut être obtenu à partir des rhizomes séchés puis broyés par extraction à chaud (environ 50 à 60°C) dans

un solvant d'extraction composé d'un mélange de glycérine (58% en volume), de bétaine (36% en volume) et d'eau (6 % en volume) pendant environ 24 heures puis filtration. Un tel extrait comprend, entre autres ingrédients, des polyphénols tels que des catéchines et des polysaccharides. Un tel extrait

5 présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- Liquide jaune ambré à brun,
- Odeur caractéristique,
- Soluble à 10 % dans l'eau,
- pH direct : 4 à 6,

- 10
- Indice de réfraction : 1,410 à 1,470,
 - Densité : 1,200 à 1,300,
 - Polyphénols (exprimés en catéchine) 3,1 g/l,
 - Polysaccharides : 3,1 g/l.

L'extrait de branches d'argousier peut être obtenu à partir des rameaux

15 feuillus séchés et broyés par extraction dans un solvant d'extraction composé d'acide malique (35 % en volume), de propanediol (60 % en volume) et d'eau (5 % en volume). Le broyat est mélangé au solvant d'extraction dans une proportion de 20 % de broyat pour 80 % de solvant d'extraction puis laissé à macérer pendant 24 heures environ à une température d'environ 40 à 60 °C.

20 Le mélange est ensuite filtré. Un tel extrait est également disponible dans le commerce auprès de la société Greentech, sous la dénomination commerciale HIPPOPHAE RHAMNOIDES EXTRACT. Un tel extrait comprend, entre autres ingrédients, des polyphénols tels que des catéchines et des polysaccharides. Un tel extrait présente les caractéristiques physico-chimiques suivantes :

- 25
- Liquide jaune ambré à brun,
 - Odeur caractéristique,
 - Soluble à 10 % dans l'eau,
 - pH direct : 1,5 à 3,5,
 - Indice de réfraction : 1,400 à 1,460,
- 30
- Densité : 1,100 à 1,200,
 - Polyphénols (exprimés en catéchine) 13,8 g/l,
 - Polysaccharides : 3,3 g/l.

Le complexe végétal conforme à l'invention peut par exemple se présenter sous la forme d'un kit à plusieurs compartiments dans lequel un premier compartiment contient ledit extrait de fleur de nénuphar blanc, un deuxième compartiment contient ledit extrait de rhizomes de nénuphar blanc et un troisième compartiment contient ledit extrait de branches d'argousier.

Au sein du complexe végétal de l'invention, les extraits de fleur de nénuphar blanc et de rhizome de nénuphar blanc sont de préférence présents en quantités massiques égales (50/50, m/m).

Au sein du complexe végétal conforme à la présente invention, la quantité totale d'extraits de nénuphar blanc (fleur et rhizome) représente de préférence de 65 à 70 % en masse environ par rapport à la masse totale dudit complexe, la différence en masse à 100 % étant apportée par la quantité de l'extrait de branches d'argousier.

Selon une forme de réalisation particulièrement préférée de la présente invention, la quantité totale d'extraits de nénuphar blanc (fleur et rhizome) représente environ 70 % en masse et l'extrait de branches d'argousier représente environ 30 % en masse, lesdits pourcentage étant exprimés par rapport à la masse totale dudit complexe.

Ainsi selon cette forme de réalisation particulière, ledit complexe comprend :

- environ 35 % en masse d'extrait de fleur de nénuphar blanc,
- environ 35 % en masse d'extrait de rhizome de nénuphar blanc, et
- environ 30 % en masse d'extrait de branches d'argousier.

La quantité de complexe végétal à utiliser dans la composition cosmétique conforme à la présente invention peut varier de 0,5 à 15 % en masse environ par rapport à la masse totale de ladite composition cosmétique.

Selon une forme de réalisation particulière et préférée de l'invention, la quantité de complexe végétal à utiliser dans la composition cosmétique est de 3 % en masse environ, ce qui correspond de préférence dans ce cas à 1 % en masse d'extrait de fleur de nénuphar blanc, 1 % en masse d'extrait de rhizome de nénuphar blanc et 1 % en masse d'extrait de branches d'argousier, par rapport à la masse totale de la composition cosmétique.

Au sens de la présente invention, on entend par « support cosmétiquement acceptable », les supports et excipients habituellement utilisés dans les compositions cosmétiques et/ou dermatologiques et qui sont

compatibles avec la peau et/ou ses phanères, qui présentent une couleur, une odeur et un toucher agréables et qui ne génèrent pas d'inconforts inacceptables (picotements, tiraillements, rougeurs pour les utilisatrices et utilisateurs de ces compositions). A titre d'exemple, de tels supports comprennent généralement de l'eau, un mélange d'eau et d'un ou plusieurs solvants organiques, ou un solvant ou un mélange de solvants organiques cosmétiquement et/ou dermatologiquement acceptables.

Suivant une forme avantageuse de réalisation, la composition cosmétique conforme à la présente invention peut contenir, outre le complexe végétal décrit ci-dessus, un ou plusieurs actifs supplémentaires renforçant ou complétant avantageusement leur activité, et compatibles, c'est-à-dire non susceptibles de réagir les uns avec les autres ou de masquer ou limiter leurs effets. De tels ingrédients actifs peuvent par exemple être choisis parmi tout type de composés habituellement utilisés dans les compositions cosmétiques et tels que des émoullissants, des agents hydratants des couches supérieures de l'épiderme, des correcteurs de teint, des vitamines, des agents kératolytiques, des alpha-hydroxyacides, des agents stimulants de la circulation tels que par exemple des extraits de marron d'inde, de vigne rouge, de cyprès, etc...

La composition cosmétique conforme à la présente invention peut se présenter sous les formes galéniques classiquement utilisées pour une application par voie topique, notamment sous forme de gel, d'émulsion biphasique huile-dans-eau ou eau-dans-huile (crème, lait ou baume), de masque, de pommade, lesdites formes galéniques contenant en outre des excipients et supports usuels et acceptables sur le plan cosmétologique. La composition cosmétique conforme à l'invention est de préférence utilisée sous forme de crème, de sérum, de lotion ou de gel.

Ces formes d'application par voie topique sont préparées par les techniques usuelles, et par exemple, dans le cas d'une crème, par dispersion d'une phase grasse dans une phase aqueuse pour obtenir une émulsion huile-dans-eau, ou inversement pour préparer une émulsion eau-dans-huile dans les cas de crèmes.

La composition cosmétique conforme à l'invention peut en outre renfermer un ou plusieurs excipients acceptables sur le plan cosmétologique. Ces excipients appropriés pour la formulation sont bien connus de l'homme du métier et comprennent en particulier les agents de pénétration tels que le phytantriol, l'octyl dodécanol et l'escine ; les épaississants tels que les gommes naturelles et les polymères de synthèse ; les tensioactifs ; les émulsionnants

tels que des dérivés de polyglycérol ; les conservateurs tels que le phénoxyéthanol et l'acide déhydroacétique ; les colorants ; les parfums ; etc...

On peut également ajouter à la composition cosmétique des agents de protection contre les rayons ultraviolets, et par exemple des filtres solaires UV-
5 A et UV-B hydrophiles ou lipophiles, ou des pigments formant écran anti-ultraviolet.

L'utilisation non thérapeutique de la composition cosmétique conforme à l'invention comprend tous les soins du corps et de la peau y compris les produits solaires, protecteurs et bronzants, les produits anti-âges, anti-
10 séborrhéiques, toniques, les produits assurant l'amélioration de l'aspect de la peau y compris le traitement acnéique et les rougeurs cutanées, les agents dépigmentants et/ou de blanchiment de la peau, etc...

La composition cosmétique conforme à la présente invention est parfaitement tolérée par la peau, elle ne présente aucune phototoxicité et son
15 utilisation sur des périodes, même prolongées, ne génère aucun effet systémique.

De préférence, le procédé de traitement cosmétique non thérapeutique pour prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané, et en particulier pour protéger la peau des effets néfastes des agressions extérieures telles que
20 les rayonnements ultraviolets, la pollution, comprend une à deux applications par jour de la composition cosmétique conforme à l'invention sur les zones à traiter, principalement sur le visage et le cou.

Les exemples suivants illustrent l'invention sans pour autant en limiter la portée.

25 **EXEMPLES**

EXEMPLE 1 : Préparation d'une crème de jour comprenant un complexe végétal conforme à l'invention

On a préparé une crème de jour hydratante et anti-oxydante pour le soin de la peau ayant la composition massique indiquée ci-après :

30	<u>Composant A :</u>	
	- Eau	53,26 g
	- Gomme de xanthane	0,20 g
	- Glycérine	10,00 g
	- EDTA disodique	0,10 g
35	- Chlorphenesin	0,27 g

Composant A' :

- 5 - Mélange Hydroxyethylacrylate/sodium acryloyldimethyl Taurate copolymer/aqua squalene/polysorbate 60/sorbitan isostearate vendu sous la dénomination commerciale SIMULGEL NS par la société SEPPIC 0,75 g

Composant B :

- 10 - Cyclopentasiloxane 7,00 g
- Mélange cetearyl alcohol/cetearylglucoside vendu sous la dénomination commerciale MONTANOV 68 par SEPPIC 5,00 g
- Hexyldecyl stearate 1,00 g
- Alcool cétéarylique 0,60 g
- 15 - Polycédène hydrogéné vendu sous la dénomination commerciale DEKANEX 2004 FG par INDERMA/IMCD 5,50 g
- Mélange Glyceryl stearate/PEG-100 stearate vendu sous la dénomination commerciale SP ARLACEL 165 FP MBAL-PA-(RB) par la société CRODA 0,50 g
- 20 - PPG-15 stearyl ether vendu sous la dénomination commerciale ARLAMOL PS15-LQ-(RB) par la société CRODA 6,00 g
- Mélange de beurre de *Butyrospermum parkii* et d'acide citrique vendu sous la dénomination commerciale LIPEX-SHEA par la société UNIPEX 1,50 g

25 Composant C :

- Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v) 1,00 g
- Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine 1,00 g
- 30 - Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v) 1,00 g
- Mélange eau/urée/tréhalose/glycérine/pentylène glycol/sérine/caprylyl glycol/hyaluronate de sodium/alginate de sodium/glycéril polyacrylate/pullulane/phosphate disodique/phosphate de potassium vendu sous la dénomination commerciale PATCH20 par la société AMI 3,00 g
- 35 - Mélange eau/extrait de fruits de *Citrus paradisi* vendu sous la dénomination commerciale JAMONG 500G par MACREPOS 0,48 g
- Mélange eau/propanediol/extrait de *Buddleja officinalis*

	vendu sous la dénomination commerciale SOLIBERINE (NAT)	
	par la société GREENTECH	1,00 g
	- Hydroxyde de sodium	Q.S pH 6,5-7,2
	- Eau	q.s.p 100,00 g

5 Les ingrédients du composant A ont été mélangés ensemble puis chauffés à une température de 80°C avant d'y incorporer le composant A'. On a obtenu un mélange (A+A').

Les ingrédients du composant B ont été mélangés ensemble puis chauffés à une température de 82°C.

10 Le mélange (A+A') et le composant B ont ensuite été mélangés et émulsionnés pendant 30 minutes en maintenant la température à 80°C.

Le mélange résultant a ensuite été refroidi jusqu'à une température d'environ 40°C puis on y a ajouté un par un les ingrédients du composant C.

15 Le pH a été ajusté entre 6,5 et 7,2 avec l'hydroxyde de sodium, puis le complément à 100 % en masse a été fait par ajout d'eau.

Cette crème de jour peut être utilisée une à deux fois par jour par application sur les zones de la peau à traiter. Elle permet de lutter contre les effets du vieillissement cutané.

20 **EXEMPLE 2 : Préparation d'une essence ultra-hydratante et anti-oxydante comprenant un complexe végétal conforme à l'invention**

On a préparé la composition suivante par simple mélange des ingrédients suivants :

25	- Ammonium acryloyldimethyl taurate/VP copolymer vendu sous la dénomination commerciale ARISTOFLEX AVC par la société SCD-CLARIANT	0,70 g
	- EDTA disodique	0,10 g
	- Chlorphénésine	0,27 g
30	- Mélange acide lévulinique/glycérine/eau/lévulinate de sodium vendu sous la dénomination commerciale DERMOSOFT 700 B par la société ADARA	0,50 g
	- Méthylpropanediol	2,00 g
	- Propanediol	10,00 g
35	- Mélange eau/urée/tréhalose/glycérine/pentylène glycol/sérine/caprylyl glycol/hyaluronate de sodium/alginat de sodium/glycéryl polyacrylate/pullulane/phosphate disodique/phosphate	

	de potassium vendu sous la dénomination commerciale PATCH20 par la société AMI	3,00 g
	- Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v)	1,00 g
5	- Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine	1,00 g
	- Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v)	1,00 g
	- Hydroxyde de sodium	Q.S pH 6,5-7,2
	- Hyaluronate de sodium	??
10	- Eau	q.s.p. 100,00 g

Cette composition peut être utilisée une à deux fois par jour par application sur les zones de la peau à traiter. Elle permet de lutter contre les effets du vieillissement cutané et de réhydrater la peau

EXEMPLE 3 : Préparation d'un gel aqueux ultra-hydratant et anti-oxydant comprenant un complexe végétal conforme à l'invention

	<u>Composant A :</u>	
	- Eau	60,50 g
	- Mélange acide lévulinique/glycérine/eau/lévulinate de sodium vendu sous la dénomination commerciale DERMOSOFT 700 B par la société ADARA	0,50 g
20	- EDTA disodique	0,10 g
	- Chlorphenesin	0,25 g
	<u>Composant B :</u>	
25	- Carbomer vendu sous la dénomination commerciale CARBOPOL ULTREZ 10 par GATTEFOSSE	0,60 g
	<u>Composant C :</u>	
	- Glycérine	8,00 g
30	- Gomme de xanthane	0,20 g
	<u>Composant D :</u>	
	- Eau	10,00 g
	- Hyaluronate de sodium	0,10 g
35	<u>Composant E :</u>	
	- Cétyl phosphate de potassium	0,75 g

- Huile de graines de *Simmondsia chinensis* vendue sous la dénomination commerciale HV-HUILE DE JOJOBA GOLDEN par la société BIOCOSMETHICS 0,50 g
- Cyclopentasiloxane 6,50 g
- 5 - Mélange de tocophérol et d'huile de graines d'*Helianthus annuus* vendu sous la dénomination commerciale BIOXAN SF T50 par la société QUIMASSO 0,10 g

Composant F :

- 10 - Mélange Hydroxyethylacrylate/sodium acryloyldimethyl Taurate copolymer/aqua squalene/polysorbate 60/sorbitan isostearate vendu sous la dénomination commerciale SIMULGEL NS par la société SEPPIC 0,50 g
- Silice vendue sous la dénomination commerciale
- 15 SUNSIL – 150 H par la société IMPAG 2,00 g
- Mélange eau/urée/tréhalose/glycérine/pentylène glycol/sérine/caprylyl glycol/hyaluronate de sodium/alginate de sodium/glycéril polyacrylate/pullulane/phosphate disodique/phosphate de potassium vendu sous la dénomination commerciale
- 20 PATCH20 par la société AMI 3,00 g
- Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v) 1,00 g
- Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine 1,00 g
- Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un
- 25 mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v) 1,00 g
- Mélange eau/propanediol/extrait de *Buddleja officinalis* vendu sous la dénomination commerciale SOLIBERINE (NAT) par la société GREENTECH 1,00 g
- Hydroxyde de sodium Q.S pH 6,5-7,2
- 30 - Eau q.s.p. 100,00 g

Les ingrédients du composant A ont été mélangés ensemble puis chauffés à une température de 80°C avant d'y incorporer le composant B pour former un gel.

35 Les ingrédients du composant C ont ensuite été ajoutés dans le gel ainsi obtenu et le mélange a été homogénéisé.

Les ingrédients du composant D ont été ajoutés, puis ceux du composant E sous agitation et à une température de 80°C pour former une émulsion.

L'émulsion ainsi obtenue a été refroidie à 40°C puis on y a ajouté un par un les ingrédients du composant F.

Après refroidissement à température ambiante (environ 25°C), le pH a été ajusté à 6,5-7,2 avec l'hydroxyde de sodium, puis le complément à 100 % en masse a été fait par ajout d'eau.

Ce gel aqueux peut être utilisé une à deux fois par jour par application sur les zones de la peau à traiter. Il permet de lutter contre les effets du vieillissement cutané tout en réhydratant la peau.

EXEMPLE 4 : Préparation d'une crème aqueuse ultra-hydratante et anti-oxydante comprenant un complexe végétal conforme à l'invention

Composant A :

	- Eau	65,79 g
	- EDTA disodique	0,10 g
15	- Chlorphenesin	0,20 g
	- Glycérine	2,00 g

Composant B :

20	- Mélange dipropylène glycol/eau vendu sous la dénomination commerciale DIPROPYLENE GLYCOL CARE par BASF/AMI	2,50 g
	- Gomme de xanthane	0,05 g
	- Gomme de sclerotium vendue sous la dénomination commerciale AMIGEL GRANULE par ALBAN MULLER	0,06 g

Composant C :

25	- Cétyl phosphate de potassium	1,00 g
	- Stéarate de glycéryl	0,50 g
30	- Mélange huile de graines de Macadamia polyglyceryl-6 esters béhénate/tocophérol vendu sous la dénomination commerciale S FACE VL 211 par la société ROSSOW	0,22 g
	- Mélange de beurre de <i>Butyrospermum parkii</i> et d'acide citrique vendu sous la dénomination commerciale LIPEX-SHEA par la société UNIPEX	0,70 g
35	- Mélange hexyldécanol/hexyldécyl laurate vendu sous la dénomination commerciale CETIOL PGL par BASF/AMI	2,00 g

Composant D :

	- Eau	10,00 g
	- Mélange de Lécithine et de tocophérol vendu sous la dénomination commerciale LIPOID P45 par la société LIPOID	0,50 g
5	- Ammonium acryloyldimethyl taurate/VP copolymer vendu sous la dénomination commerciale ARISTOFLEX AVC par la société SCD-CLARIANT	1,50 g
10	- Mélange dicaprylyl ether/tocophérol/Glycine soja (<i>soybean</i>) oil vendu sous la dénomination commerciale CETIOL OE par la société BASF	7,40 g

Composant E :

	- Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v)	1,00 g
15	- Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine	1,00 g
	- Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v)	1,00 g
20	- Mélange eau/urée/tréhalose/glycérine/pentylène glycol/sérine/caprylyl glycol/hyaluronate de sodium/alginate de sodium/glycéril polyacrylate/pullulane/phosphate disodique/phosphate de potassium vendu sous la dénomination commerciale PATCH20 par la société AMI	2,00 g
	- Mélange eau/extrait de fruit de Citrus paradisi vendu sous la dénomination commerciale JAMONG 500G par MAPRECOS	0,48 g

25 Les ingrédients du composant A ont été mélangés ensemble puis chauffés à une température de 80°C avant d'y incorporer le composant B pour former un gel.

Les ingrédients du composant C ont été mélangés entre eux, chauffés à 82°C puis émulsionnés pendant 30 minutes pour former une émulsion.

30 Les ingrédients du composant D ont été mélangés entre eux dans un récipient séparé et le mélange a été porté à 40°C. On a alors ajouté au composant D, le gel formé par mélange des composants A et B, puis l'émulsion formée à partir du composant C. Le mélange résultant a été refroidi puis les ingrédients du composant E ont été ajoutés les uns après les autres en maintenant le mélange à 40°C.

35 Le pH a ensuite été ajusté à 6,5-7,2, puis le complément à 100 % en masse a été fait par ajout d'eau.

Cette crème aqueuse peut être utilisée une à deux fois par jour par application sur les zones de la peau à traiter. Elle permet de lutter contre les effets du vieillissement cutané tout en réhydratant la peau.

EXEMPLE 5 : Evaluation de l'activité anti-pollution d'un complexe végétal conforme à l'invention sur des explants de peau humaine ex vivo

Dans cet exemple, on a testé l'activité anti-oxydante du complexe végétal conforme à la présente invention sur des explants de peau humaine en induisant une oxydation à l'aide d'un mélange de plusieurs polluants composé d'hydrocarbures, de métaux lourds et de particules de diesel.

5.1. Contexte scientifique

5.1.1. Gène γ H2AX

Le gène γ H2AX est une protéine histone de la famille des histones H2 impliquées dans la formation du nucléosome. γ H2AX est un marqueur de cassure double brin de l'ADN. La formation de la cassure double brin, par des radiations ionisantes ou des agents cytotoxiques tels que des polluants, entraîne rapidement la phosphorylation de l'histone H2AX. Ceci est la première étape pour le recrutement et la localisation des protéines de réparation de l'ADN (Kuo and Yang, *In vivo*, 2008, May-Jun ; 22(3), 305-9 ; Sharma A. et al., *Methods Mol. Biol.*, 2012, 920, 613-626).

5.1.2. NrF2

Le facteur de transcription « *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* » (NrF2) contrôle l'expression des gènes antioxydants et cytoprotecteurs. Il est exprimé dans un large groupe de cellules et de tissus. C'est donc un facteur de transcription ayant un rôle clé dans la réponse aux stress oxydatifs (Tia et al., 2011. *BioScience Trends*. 5:23-29). En particulier, en réponse à l'action d'un stress oxydatif, y compris une exposition aux UVs ou à un polluant, le NrF2 est phosphorylé en favorisant sa translocation successive du cytoplasme au noyau. Une fois transloqué dans le noyau, NrF2 est capable de se lier à l'ADN au niveau d'une région spécifique connue sous le nom d'hARE (« *Human Antioxidant Response Element* ») et régulatrice majeure du système de détoxification cellulaire.

5.2. Matériel et méthodes

5.2.1. Produit testé

Dans cet exemple on a testé le complexe végétal conforme à l'invention, lui-même composé des trois extraits suivants :

- 5 - Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine : 16,66 % en masse,
- Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v) : 16,66 % en masse,
- 10 - Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v) : 66,68 % en masse.

Ledit complexe a été dilué dans de l'eau à une concentration finale de 3 % en masse. La solution diluée a été stockée à 4°C et à l'abri de la lumière, pendant la durée de l'étude. Cette solution a été dénommée **solution A**.

5.2.2. Polluants

- 15 Les polluants utilisés ont été fournis par le Laboratoire BIO-EC et sont répertoriés dans le Tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

Polluant	Identification	Référence	Aspect
A	ICP Etalon multiéléments, solution V	1.10714.0500 (MERCK)	Liquide
B	Benzène	12550 (FLUKA)	Liquide
C	Xylène	95673 (FLUKA)	Liquide
D	Toluène	34866 (SIGMA)	Liquide
PD	Particules de diesel	SRM 1650b (NIST)	Poudre

- La solution A est un mélange de métaux lourds auquel a été ajouté un mélange d'hydrocarbures (B+C+D) et des particules de diesel à 0,01% (PD).
 20 Ce mélange de polluants (métaux lourds + hydrocarbures + particules de diesel) a été dénommé « **ML** ». La composition et les concentrations finales de chaque composante du **mélange ML** appliqué sur les explants sont indiquées ci-après :

Métaux lourds :

- 25 Al : 0,01 mg/mL ; As : 0,01 mg/mL ; B : 0,001 mg/mL ; Ba : 0,001mg/mL ; Be : 0,0005 mg/mL ; Ca : 0,005 mg/mL ; Cd : 0,001 mg/mL ; Cr : 0,001 mg/mL ; Cu : 0,001 mg/mL ; Fe : 0,001 mg/mL ; Hg : 0,0025 mg/mL ; K : 0,0495 mg/mL ; Li : 0,001 mg/mL ; Mg : 0,0005 mg/mL ; Mn : 0,0005 mg/mL ; Na : 0,01 mg/mL ;

Ni : 0,0025 mg/mL ; P : 0,005 mg/mL ; Pb : 0,01 mg/mL ; Sc : 0,0005 mg/mL ;
Sa : 0,01 mg/mL ; Sr : 0,0005 mg/mL ; Te : 0,01 mg/mL ; Ti : 0,001 mg/mL ;
Y : 0,0005 mg/mL ; Zn : 0,001 mg/mL.

Hydrocarbures :

5 Benzène : 1 µL/mL ; Xylène : 1 µL/mL ; Toluène : 1 µL/mL ;

Particules de diesel : 0,01 % en masse

5.2.3 Préparation des explants

19 explants de 14±1 mm de diamètre ont été préparés à partir d'une
plastie d'une femme de type caucasien âgée de 48 ans (référence P1975-
10 AB48). Les explants ont été mis en survie en milieu BEM (BIO-EC's Explants
Medium) à 37°C en atmosphère humide, enrichie de 5 % de CO₂.

5.2.4 Répartition des explants

Les explants ont été répartis en 5 lots comme indiqué dans le Tableau 2
ci-après :

15

TABLEAU 2

Lots	Désignation	Traitement	Nombre d'explants	Arrêt
T0	Témoin plastie	Aucun	3	J0
T	Témoin non traité	Aucun	4	J5
P	Solution A	Solution A	4	J5
ML	Contrôle Polluants + UV	Mélange ML + UV	4	J5
PML	Solution A + Polluants + UV	Solution A + mélange ML + UV	4	J5

5.2.5 Application du produit à tester

A J0, J2, J3 et J4 (avant l'exposition aux polluants et aux UV), la solution
A a été appliquée en topique, à raison de 2 µl par explant (2 mg/cm²) et étalée
à l'aide d'une spatule.

20 Les explants des lots T n'ont reçu aucun traitement, excepté le
renouvellement du milieu.

Le milieu a été renouvelé pour moitié (1 ml par puits) à J3 et
complètement (2 ml) à J4.

5.2.6 Exposition des explants aux polluants

25 A J4, les explants des lots « ML » et « PML » ont été placés sur des grilles
3D contenant 900 µl de milieu HBSS puis, placés dans un dispositif d'exposition

aux polluants Pollubox® développé par la société BIO-EC. Ce dispositif 1 est représenté sur la figure 1 annexée. Il comprend une grille 2 comprenant une pluralité de trous 2' venant se placer en regard des puits d'une plaque multi puits 3, ainsi qu'une chambre de nébulisation 4 comportant sur sa face supérieure un orifice 4' sur lequel est fixé un réservoir 5 permettant d'accueillir un mélange de polluants 6, ainsi qu'un système 7 permettant de nébuliser le mélange de polluants 6 à l'intérieur de la chambre 4 afin que celui-ci entre en contacts avec les explants placés dans les puits de la plaque multi-puits 3 par l'intermédiaire des trous 2'.

10 Sur la figure 1a, le dispositif 1 n'est pas encore assemblé, sur la figure 1b, le dispositif 1 est assemblé et le réservoir 5 contient le mélange de polluants 6, et sur la figure 1c, on peut voir que le mélange de polluants 6 a été nébulisé à l'intérieur de la chambre de nébulisation 4 et est en contact avec les explants contenus dans les puits de la plaque multi puits 3 par l'intermédiaire des trous 2' de la grille 2 disposée au-dessus de la plaque multi puits 3.

3 mL du mélange ML (complétés par 150 µL/ml de NaCl à 0,9 %) ont ensuite été nébulisés dans la chambre de nébulisation 4 et laissés en contact avec les explants pendant 1h30. Pendant l'exposition aux polluants, les explants des lots T et p non exposés ont été placés dans 1 mL de milieu HBSS.

5.2.7 Irradiation aux UVs

A J4, après l'exposition aux polluants, les explants des lots ML et PML ont été placés dans 1 mL de milieu HBSS frais et irradiés avec un simulateur UV vendu sous la référence RMX 3W par la société Vibert Lourmat, avec une dose de 13,5 J/cm² d'UVA, correspondant à 3 doses érythémateurs minimale (DEM) pour un individu de phototype II/III.

Les lots non irradiés ont été conservés dans du milieu HPSS dans le noir pendant toute la durée des irradiations.

A la fin de l'exposition aux polluants et aux UVs, les explants de tous les lots ont été placés dans 2 mL de milieu BEMc frais dans des boites de culture classique à 6 puits.

5.2.8 Prélèvements

A J0, les 3 explants du lot T0 ont été prélevés et coupés en deux. Une partie a été fixée dans une solution de formol tanponnée, et l'autre a été congelée à -80°C.

A J5, les 3 explants de chaque lot ont été prélevés et traités de la même façon qu'à J0 ; le 4^{ème} explant a été congelé entier à -80°C.

A J4, les milieux HBSS à la fin des irradiations UV (1 mL par puits) de chaque explants ont été prélevés et congelés à -20°C pour le dosage MDA.

5 5.2.9.Traitements histologiques

Après 24 heures dans le formol tamponné, les prélèvements ont été déshydratés et imprégnés en paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation Leica PEARL. Ils ont été mis en bloc à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG 1160.

10 Des coupes de 5 µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome type Minot, Leica RM 2125 et montées sur des lames de verre histologiques Superfrost®.

Les échantillons congelés ont été coupés à 7 µm d'épaisseur avec un cryostat Leica CM 3050. Les coupes ont ensuite été montées sur des lames de verre silanisées Superfrost® Plus.

15 Les observations microscopiques ont été réalisées en microscopie optique, à l'aide d'un microscope Leica type DMLB ou Olympus BX43. Les prises de vue ont été réalisées avec une caméra Olympus DP72 et le logiciel Cell^D.

20 Pour chaque lot d'explants, le pourcentage de surface de la région d'intérêt couverte par le marquage (pourcentage de surface marquée) a été déterminé (Surf%) et comparé à la condition non traitée (P vs T). Les mêmes comparaisons ont été effectuées pour les lots exposés avec ou sans traitement (PML vs ML).

5.2.10 Contrôles de la viabilité cellulaire

25 La viabilité cellulaire des structures épidermiques et dermiques a été observée sur coupes en paraffine après coloration au trichrome de Masson variante de Goldner.

Elle a été évaluée par un examen microscopique.

Lots concernés : tous.

5.2.11 Immunomarquage de γ H2AX

30 γ H2AX a été marqué sur coupes en paraffine formol avec un anticorps monoclonal anti- γ H2AX (Abcam, ref. ab26350, clone 9F3), dilué au 1/400^{ème} dans du PBS-BSA 0,3%-Tween 20 à 0,05% pendant 1h à température ambiante, avec un système amplificateur biotine/ streptavidine et révélé en VIP, un substrat violet de peroxydase (Vector, ref. SK-4600).

L'immunomarquage a été réalisé en utilisant un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

L'immunomarquage a été évalué par un examen microscopique et par une analyse d'images.

5 Lots concernés : tous.

5.2.12 Immunomarquage de NRF2

10 NRF2 a été marqué sur coupes en paraffine formol avec un anticorps monoclonal anti- NRF2 (Abcam, ref. ab76026, clone EP1809Y), dilué au 1/200ème dans du PBS-BSA 0,3%-Tween 20 à 0,05% pendant 1h à température ambiante, avec un système amplificateur biotine/ streptavidine et révélé en VIP, un substrat violet de peroxydase (Vector, ref. SK-4600).

L'immunomarquage a été réalisé en utilisant un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

15 L'immunomarquage a été évalué par analyse d'images à l'aide du logiciel Cell^D® Olympus.

Pour chacun des lots, le pourcentage de la surface de la région d'intérêt couverte par le marquage (pourcentage de surface marquée) par rapport à la surface d'intérêt total a été déterminé à J5.

20 Le pourcentage de surface marquée (Surf%) pour chaque traitement a été comparé à la condition non traitée (Lot P vs. Lot T). Les mêmes comparaisons ont été effectuées pour les lots exposés aux polluants et aux UV avec ou sans traitement (Lot PML vs. Lot ML).

25 Pour prendre en compte les niveaux d'exposition concernant les conditions exposées aux polluants et aux UV, un ΔML a été calculé comme indiqué ci-après : pour la condition non traitée, la valeur moyenne Surf% de la condition non exposée (Lot T) a été soustraire à chaque valeur des conditions exposées aux polluants et aux UV (Lot ML). Cette variation de S% induite par les polluants et les UV correspond à ΔML .

30 Le ΔML pour chaque traitement avec le complexe végétal conforme à la présente invention a été calculé en utilisant la même méthode, afin d'obtenir un ΔPML , c'est-à-dire la variation de surface Surf% induite par les polluants et les UV en présence du complexe végétal conforme à l'invention.

Ainsi, la moyenne ΔML a pu être comparée à la moyenne ΔPML .

5.3. Résultats

5.3.1 Viabilité cellulaire

Les résultats de viabilité cellulaire des différents lots sont donnés dans le tableau 3 ci-après :

5

TABLEAU 3

Lot	Viabilité cellulaire	
	Epiderme	Derme
T0	Bonne	Bonne
TJ5	Assez bonne	Bonne
PJ5	Assez bonne	Bonne
MLJ5	Assez bonne	Bonne
PMLJ5	Assez bonne	Bonne

Ces résultats montrent qu'à J0, sur le lot témoin J0, la viabilité cellulaire est bonne dans le derme et l'épiderme et qu'à J5, sur le lot TJ5, la viabilité cellulaire est bonne dans le derme et assez bonne dans l'épiderme.

10 Ces résultats montrent également que l'application du complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas de modification de la viabilité cellulaire (PJ5 vs TJ5).

15 Après exposition aux polluants et aux UVA (PLJ5 vs TJ5), la viabilité des cellules épidermiques et dermique est inchangée comparé au témoin TJ5 et l'application du complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas non plus de modification de la viabilité cellulaire (MLPJ5 vs MLJ5).

5.3.2 Analyse d'images de γ H2AX

Les pourcentages de surface (surf %) de γ H2AX de tous les lots sont donnés dans le tableau 4 ci-dessous :

TABLEAU 4

	γ H2AX (Surf %)				
	T0	TJ5	PJ5	MLJ5	MLPJ5
Moyenne	18,8	20,9	17,6	24,8	15,8
Ecart-type	2,7	4,6	2,6	2,6	3,1

20 Les pourcentages de surface occupée par γ H2AX dans l'épiderme en absence de polluant (TJ5 vs PJ5) et en présence de polluants (MLJ5 vs à PMLJ5) sont également reportés sur la figure 2 annexée.

Ces résultats montrent qu'à J0, sur le lot témoin T0, 18,8 % de la surface de l'épiderme sont marqués par γ H2AX.

A J5, sur le lot témoin TJ5, γ H2AX représente 20,9 % de la surface de l'épiderme.

5 A J5 et sans exposition aux polluants et aux UVAs, comparativement au lot TJ5, le complexe végétal conforme à la présente invention induit une diminution non significative de 16 % de la surface occupée par γ H2AX (TJ5 vs PJ5).

10 Après exposition aux polluants et aux UVAs, et en l'absence de traitement (PLJ5), la formation de γ H2AX est augmentée significativement de 19% comparé au témoin TJ5. Par contre, en présence du complexe végétal conforme à la présente invention (PMLJ5), on observe une diminution significative de 36% comparativement au lot MLJ5.

5.3.3 NRF2

15 Les résultats de marquage de NrF2 sont reportés sur la figure 3 annexée. Sur cette figure, le % de surface marquée, mesuré à J5, est donné pour les lots TJ5, PJ5, MLJ5 et PMLJ5.

Les pourcentages de surface marquée pour chacun des lots (Surf%) est également indiqué dans le tableau 5 ci-après :

20

TABLEAU 5

Lots	% de surface marquée (Surf%)				
	T0	TJ5	PJ5	MLJ5	PMLJ5
Moyenne	18,4	14,7	13,6	18,3	14,3
Ecart Type	1,8	2,5	1,4	1,6	2,6

A J5, sur le lot témoin, 14,7% de la surface de l'épiderme vivant est marquée par NrF2. L'application du complexe végétal conforme à l'invention en l'absence d'exposition aux polluants et aux UV induit une diminution non significative de 8 % (PJ5 vs. TJ5).

25 Après exposition aux polluants et aux UV et en l'absence de traitement (MLJ5 vs TJ5), l'expression de NrF2, est augmentée significativement de 24 %. L'application du complexe végétal conforme à l'invention, comparativement au lot MLJ5 induit une diminution significative de 22 % (PMLJ5 vs MLJ5).

30 La figure 4 annexée donne les variations du pourcentage de surface marquée pour les lots MLJ5 et PMLJ5, respectivement Δ ML et Δ PML.

Ces résultats montrent que l'induction moyenne de NrF2 dans l'épiderme vivant induite par l'exposition aux polluants et aux UV (Δ ML) est de 3,6.

Par contre, en présence du complexe végétal conforme à la présente invention, cette induction n'est que de 0,7 (Δ PML). L'application dudit complexe permet donc de réduire significativement de 80% l'induction de NrF2.

L'ensemble des résultats présentés dans cet exemple démontre par conséquent que l'application du complexe végétal conforme à la présente invention permet de lutter efficacement contre les effets néfastes des polluants.

10 **EXEMPLE 6 : Mise en évidence de l'activité réparatrice d'un complexe végétal conforme à l'invention sur des explants de peau humaine ex vivo**

Dans cet exemple, on a testé l'activité réparatrice du complexe végétal conforme à la présente invention sur des explants de peau humaine délipidés.

15 6.1. Contexte scientifique

La filaggrine est synthétisée initialement sous forme de son précurseur, la pro-filaggrine, une protéine d'environ 400 kDa hautement phosphorylée et insoluble et qui représente le constituant principal des grains de kératohyaline de la couche granuleuse. Pendant la phase tardive de la différenciation épidermique, la pro-filaggrine est déphosphorylée et clivée, par la caspase-14, en plusieurs monomères de filaggrine. La filaggrine se lie ainsi aux filaments intermédiaires de kératine, en participant à leur agrégation en microfibrilles et à la formation de l'enveloppe cornée. Au niveau de la zone intermédiaire du stratum corneum, les monomères de filaggrine sont ensuite protéolysés. Cette protéolyse participe à la formation d'un complexe très hygroscopique, le facteur naturel d'hydratation (« *Natural Moisturing Factor* » ou NMF).

Le NMF permet le maintien de l'hydratation de la couche cornée et la souplesse de la peau.

6.2. Matériel et méthodes

30 6.2.1. Produit testé

Dans cet exemple on a testé le complexe végétal conforme à l'invention, lui-même composé des trois extraits suivants :

- Extrait de fleurs de nénuphar 20 % en masse dans la glycérine : 16,66 % en masse,

- Extrait de rhizomes de nénuphar à 20 % en masse dans un mélange glycérine/bétaïne/eau 58/36/6 (v/v/v) : 16,66 % en masse,

- Extrait de branches d'argousier à 20 % en masse dans un mélange propanediol/acide malique/eau 60/35/5 (v/v/v) : 66,68 % en masse.

5 Ledit complexe a été dilué dans de l'eau à une concentration finale de 3 % en masse. La solution diluée a été stockée à 4°C et à l'abri de la lumière, pendant la durée de l'étude. Cette solution a été dénommée **Solution A**.

6.2.3 Préparation des explants

10 27 explants de 12±1 mm de diamètre (dont 15 délipidés), ont été préparés à partir d'une plastie d'une femme de type africain âgée de 39 ans (référence P1980-AB39).

Les explants ont été mis en survie en milieu BEM (BIO-EC's Explants Medium) à 37°C en atmosphère humide, enrichie de 5 % de CO₂.

6.2.4 Délipidation

15 A J0, une zone délimitée de la plastie a été délipidée par application d'un mélange éther/acétone (1:1, v/v) à la surface de la peau pendant 2 fois 2 minutes, puis essuyé. Sur cette zone, 15 explants notés « D », de 12±1 mm de diamètre, ont été préparés et mis en survie comme indiqué précédemment au point 6.2.3 ci-dessus.

20 6.2.5 Répartition des explants

Les explants ont été répartis comme indiqués dans le tableau 6 ci-après :

TABLEAU 6

Lots	Désignation	Traitement	Nombre d'explants	Arrêt
T0	Contrôle plastie	Aucun	3	J0
D0	Délipidation	Ether/acétone	3	J0
T	Contrôle non traité	Aucun	3	24 h
P	Solution A	Solution A	6	3h, 24 h
D	Délipidation	Ether/acétone	6	3h, 24 h
DP	Délipidation + Solution A	Ether/acétone + Solution A	6	3h, 24 h

6.2.6 Application du produit à tester

25 A J0, immédiatement après délipidation, la solution A a été appliquée en topique, à raison de 2 µl par explant (2 mg/cm²) et étalée à l'aide d'une spatule.

Les explants des lots D n'ont reçu aucun traitement en dehors de la délipidation.

Les explants des lots T n'ont reçu aucun traitement.

6.2.7. Prélèvements

5 A J0, les 3 explants du lot T0 ont été prélevés et coupés en deux. Une partie a été fixée dans une solution de formol tamponnée, et l'autre a été congelée à -80°C .

A J0+3h et J0+24h (respectivement 3h et 24h après délipidation), les 3 explants de chaque lot ont été prélevés et traités de la même façon qu'à J0.

10 6.2.8. Traitements histologiques

Après 24h dans le formol tamponné, les prélèvements ont été déshydratés et imprégnés en paraffine à l'aide d'un automate de déshydratation Leica PEARL. Ils ont été mis en bloc à l'aide d'une station d'enrobage Leica EG 1160.

15 Des coupes de $5\ \mu\text{m}$ ont été réalisées à l'aide d'un microtome type Minot, Leica RM 2125 et montées sur des lames de verre histologiques Superfrost®.

Les observations microscopiques ont été réalisées en microscopie optique, à l'aide d'un microscope Leica type DMLB ou Olympus BX43. Les prises de vue ont été réalisées avec une caméra Olympus DP72 et le logiciel Cell^D.

20 6.2.9. Contrôles de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire des structures épidermiques et dermiques a été observée sur coupes en paraffine après coloration au trichrome de Masson variante de Goldner.

Elle a été évaluée par un examen microscopique.

25 Lots concernés : tous.

6.2.10. Immunomarquage de la filaggrine

30 La filaggrine a été marquée sur coupes en paraffine avec un anticorps monoclonal anti-filaggrine (Santa Cruz, ref. sc-66192, clone AKH1), dilué au $1/2000^{\text{ème}}$ dans du PBS-BSA 0,3%-Tween 20 à 0,05% pendant 1h à température ambiante, et révélé en AlexaFluor 488 (Lifetechnologies, ref. A11001). Les noyaux ont été contre-colorés à l'iodure de propidium.

L'immunomarquage a été réalisé en utilisant un automate d'immunomarquage (Dako, AutostainerPlus).

L'immunomarquage a été évalué par un examen microscopique.

Lots concernés : tous.

6.3. Résultats

6.3.1 Viabilité cellulaire

- 5 Les résultats de viabilité cellulaire des différents lots sont donnés dans le tableau 7 ci-après :

TABLEAU 7

Lot	Viabilité cellulaire	
	Epiderme	Derme
T0	Bonne	Bonne
D0	Bonne	Bonne
P3h	Bonne	Bonne
D3h	Bonne	Bonne
DP3h	Bonne	Bonne
T24h	Bonne	Bonne
P24h	Bonne	Bonne
D24h	Bonne	Bonne
DP24h	Bonne	Bonne

Ces résultats montrent qu'à J0, sur le lot témoin T0, la viabilité cellulaire est bonne dans l'épiderme et dans le derme.

- 10 La délipidation D (D0) n'induit aucune modification de la viabilité cellulaire de l'épiderme et du derme.

A J0+3h, et comparativement au lot T0, le complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas de modification.

- 15 La délipidation D (D3h) n'induit aucune modification de la viabilité des cellules de l'épiderme et du derme.

Après délipidation (DP3h), le complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas de modification, comparativement au lot délipidé n'ayant reçu aucun traitement (D3h).

- 20 A J0+24h, sur le lot témoin T24h, la viabilité cellulaire est bonne dans l'épiderme et dans le derme.

A J0+24h, et comparativement au lot T24h, le complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas de modification.

La délipidation D (D24h) n'induit aucune modification de la viabilité des cellules de l'épiderme et du derme.

Après délipidation (DP24h), le complexe végétal conforme à la présente invention n'induit pas de modification, comparativement au lot délipidé n'ayant
5 reçu aucun traitement (D24h).

6.3.2 Expression de la filaggrine

Les résultats concernant l'expression de la filaggrine sont reportés sur la figure 5 annexée. Sur cette figure, les résultats obtenus pour chacun des lots sont évalués comme suit : TF : Très Faible ; F : Faible ; M : Modéré ; AN :
10 Assez Net ; N : Net ; TN : Très Net ; Fo : Fort.

Ces résultats montrent que sur le lot témoin (T0), l'expression de la filaggrine est faible à la base du stratum corneum.

La délipidation D (D0) induit une légère diminution de l'expression de la filaggrine à la base du stratum corneum.

15 A 3h, l'application du complexe végétal conforme à la présente invention (P3h) induit une augmentation modérée de l'expression de la filaggrine, comparativement au lot témoin à J0 (P3h vs T0).

Sur le lot délipidé (D3h), l'expression de la filaggrine est faible à modérée à la base du stratum corneum.

20 Sur les lots délipidés, à 3h, l'application du complexe végétal conforme à la présente invention (DP3h) induit une augmentation modérée de l'expression de la filaggrine, comparativement au lot délipidé n'ayant pas reçu l'application du complexe végétal (D3h).

25 A 24h, sur le lot témoin (T24h), l'expression de la filaggrine est assez nette à nette à la base du stratum corneum.

L'application du complexe végétal conforme à la présente invention n'induit aucune variation (P24h) comparativement au lot témoin à 24h (T24h)

La délipidation D (D24h) induit une nette diminution de l'expression de la filaggrine à la base du stratum corneum.

30 Sur les lots délipidés, à 24h, l'application du complexe végétal conforme à la présente invention (DP24h) induit une nette augmentation de l'expression de la filaggrine, comparativement au lot délipidé n'ayant pas reçu l'application du complexe végétal (D24h).

L'ensemble de ces résultats démontre que le complexe végétal conforme à la présente invention a une action réparatrice en favorisant l'expression de la filaggrine impliquée dans la formation du NMF lui-même impliqué dans le maintien de l'hydratation de la couche cornée et de la souplesse de la peau.

REVENDEICATIONS

1. Complexe végétal comprenant au moins un extrait de fleurs de nénuphar blanc (*Nymphaea alba*), au moins un extrait de rhizome de nénuphar blanc (*Nymphaea alba*) et au moins un extrait de branches d'argousier
5 (*Hippophae rhamnoides L.*).
2. Complexe selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il se présente sous la forme d'un kit à plusieurs compartiments dans lequel un premier compartiment contient ledit extrait de fleur de nénuphar blanc, un deuxième compartiment contient ledit extrait de rhizome de nénuphar blanc et
10 un troisième compartiment contient ledit extrait de branches d'argousier.
3. Complexe selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les extraits de fleur de nénuphar blanc et de rhizome de nénuphar blanc sont présents en quantités massiques égales (50/50, m/m).
3. Complexe selon l'une quelconque des revendications précédentes,
15 caractérisé en ce que la quantité totale d'extraits de nénuphar blanc (fleur et rhizome) représente 70 % en masse et l'extrait de branches d'argousier représente 30 % en masse, lesdits pourcentages étant exprimés par rapport à la masse totale dudit complexe.
4. Utilisation cosmétique et non thérapeutique d'un complexe
20 végétal tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, à titre d'ingrédient actif ayant des propriétés anti-âge et anti-pollution, dans une composition cosmétique destinée à prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané et à lutter contre les agressions extérieures.
5. Composition cosmétique à application topique comprenant, dans
25 un support cosmétiquement acceptable, au moins un complexe végétal tel que défini à l'une quelconque des revendications 1 à 3, à titre d'ingrédient actif anti-âge et antipollution.
6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que la quantité dudit complexe végétal varie de 0,5 à 15 % en masse par rapport à
30 la masse totale de ladite composition cosmétique.
7. Composition selon la revendication 5 ou 6, caractérisée en ce que la quantité dudit complexe végétal est de 3 % en masse par rapport à la masse totale de ladite composition cosmétique.
8. Composition selon l'une quelconque des revendications 5 à 7,
35 caractérisée en ce qu'elle comprend 1 % en masse d'extrait de fleur de

nénuphar blanc, 1 % en masse d'extrait de rhizome de nénuphar blanc et 1 % en masse d'extrait de branches d'argousier, par rapport à la masse totale de la composition cosmétique.

5 9. Composition cosmétique selon l'une quelconque des revendications 5 à 8, caractérisée en ce qu'elle renferme en outre un ou plusieurs actifs supplémentaires choisis parmi des émoullients, des agents hydratants des couches supérieures de l'épiderme, des correcteurs de teint, des vitamines, des agents kératolytiques, des alpha-hydroxyacides et des agents stimulants de la circulation.

10 10. Procédé cosmétique non thérapeutique pour prévenir et/ou traiter les signes du vieillissement cutané comprenant au moins une étape d'application sur la peau d'une composition cosmétique à application topique telle que définie à l'une quelconque des revendications 5 à 9.

15 11. Utilisation cosmétique et non thérapeutique d'une composition cosmétique à application topique telle que définie à l'une quelconque des revendications 5 à 9, pour protéger la peau des effets néfastes des agressions extérieures telles que les rayonnements ultraviolets et la pollution.

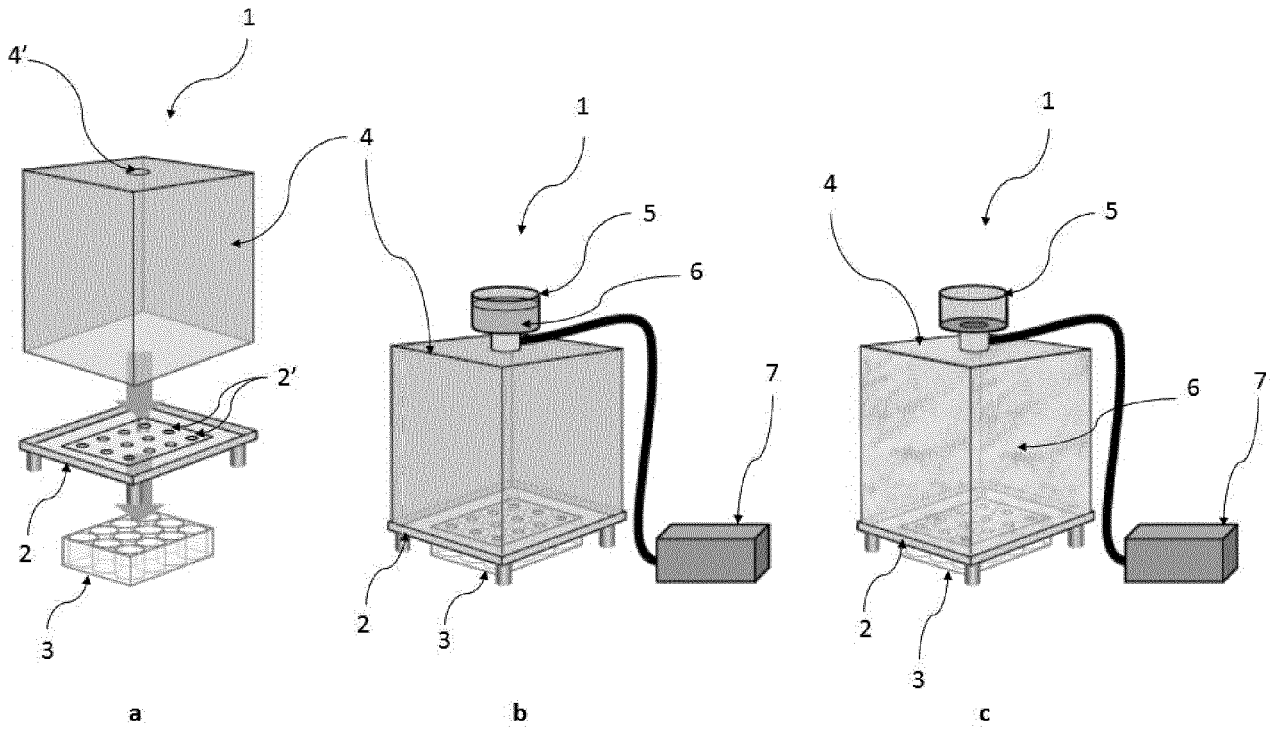


FIG.1

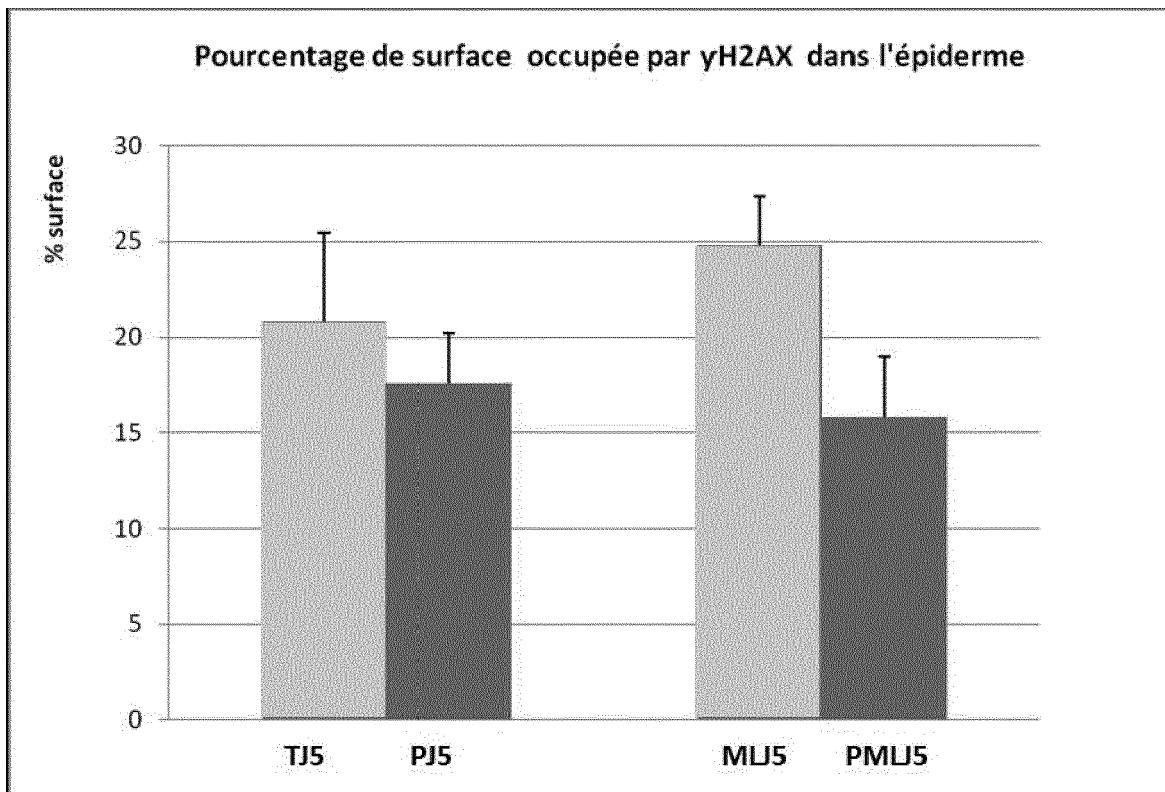


FIG.2

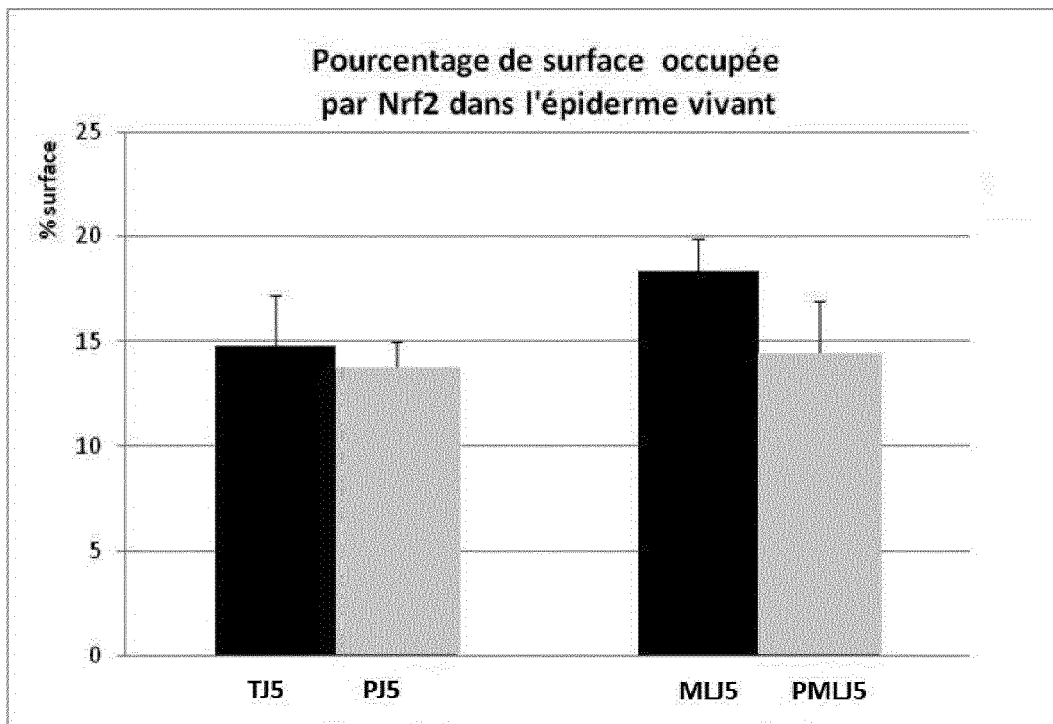


FIG.3

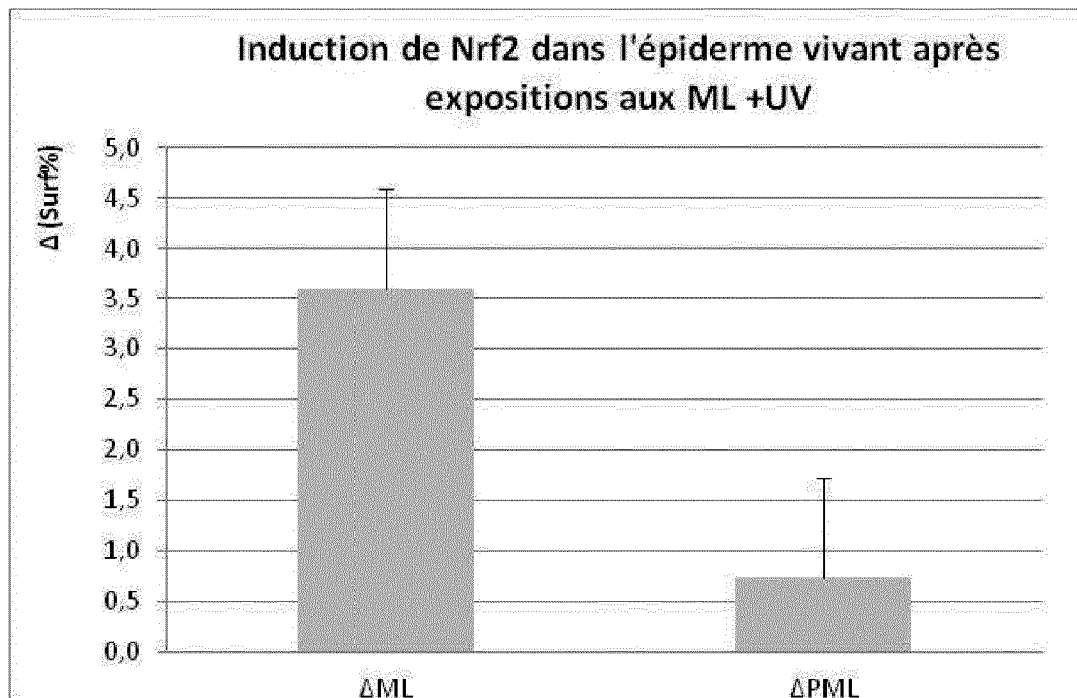


FIG.4

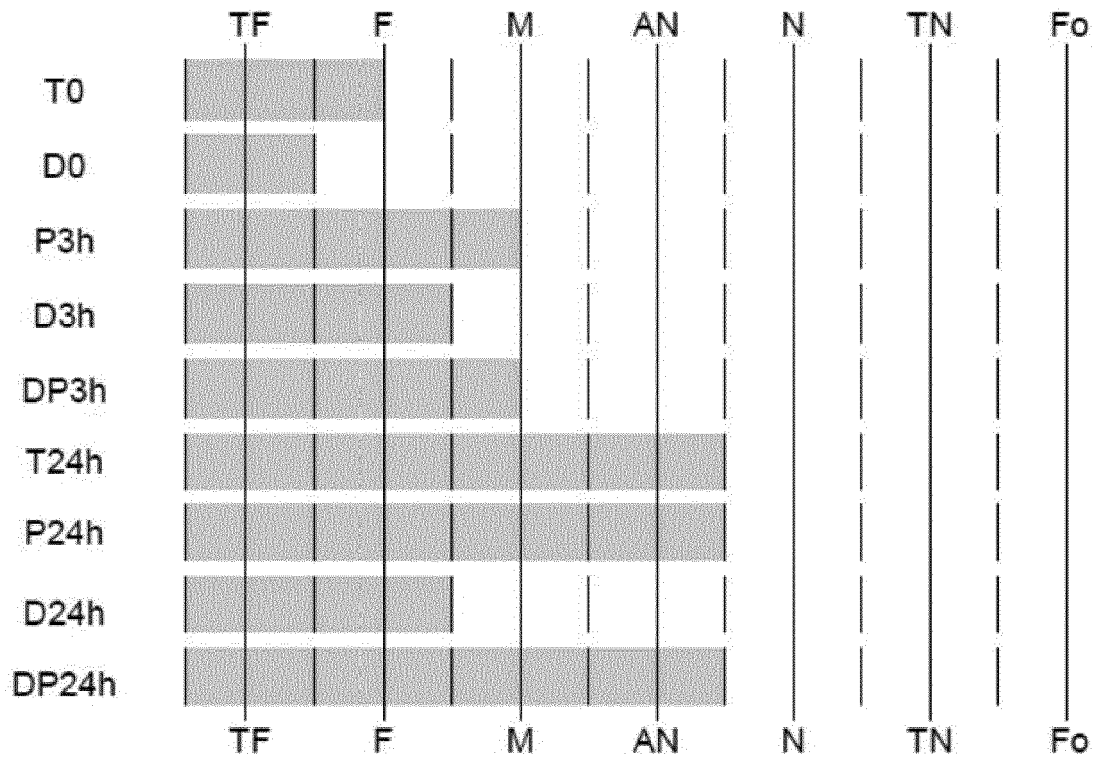


FIG.5

**RAPPORT DE RECHERCHE
 PRÉLIMINAIRE**

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

 N° d'enregistrement
 national

 FA 856763
 FR 1857373

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A,D	JP 2008 037812 A (CRODA JAPAN KK) 21 février 2008 (2008-02-21) * abrégé *	1-11	A61K36/18 A61P17/00 A61Q19/00
A	----- DATABASE BIOSIS, [Online] 1 juin 2009 (2009-06-01), KIM KYUNG MIN ET AL: "Analysis of Chemical Composition and in vitro Anti-oxidant Properties of Extracts from Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides)", XP002661821, extrait de BIOSIS Database accession no. PREV200900488130 PREV200900488130 * abrégé *	1-11	
A	----- THISAYAKORN K ET AL: "Effects of topical administration of Nymphaeae lotus flower extract on UVA-induced photoinflammation in mice", THAI JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES - PROCEEDINGS OF THE 30TH ANNUAL RESEARCH CONFERENCE IN PHARMACEUTICAL SCIENCES 2013, vol. 38, no. SUPPL., 2013, pages 66-68, XP009512071, ISSN: 0125-4685 * le document en entier *	1-11	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61Q A61K
A	----- PARK GUNHYUK ET AL: "Protection on Skin Aging Mediated by Antiapoptosis Effects of the Water Lily (Nymphaea Tetragona Georgi) via Reactive Oxygen Species Scavenging in Human Epidermal Keratinocytes", PHARMACOLOGY (BASEL), vol. 97, no. 5-6, 2016, pages 282-293, XP009512076, * voir abrégé et page 284 *	1-11	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
22 mars 2019		Merckling-Ruiz, V	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 1857373 FA 856763**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **22-03-2019**

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 2008037812	A	21-02-2008	AUCUN
