

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ EXTRAIT D'HELICHRYSUM ITALICUM OBTENU AU MOYEN DE SOLVANTS EUTECTIQUES PROFONDS.

②② Date de dépôt : 06.10.16.

③③ Priorité :

⑥① Références à d'autres documents nationaux apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : LABORATOIRES M&L Société anonyme — FR.

④③ Date de mise à la disposition du public de la demande : 13.04.18 Bulletin 18/15.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 25.10.19 Bulletin 19/43.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦② Inventeur(s) : PORTES PASCAL, CENIZO VALERIE, COMBES CHARLINE et ROUQUET VIRGINIE.

⑦③ Titulaire(s) : LABORATOIRES M&L Société anonyme.

⑦④ Mandataire(s) : CABINET BECKER ET ASSOCIES.



Extrait d'*Helichrysum italicum* obtenu au moyen de solvants eutectiques profonds

OBJET DE L'INVENTION

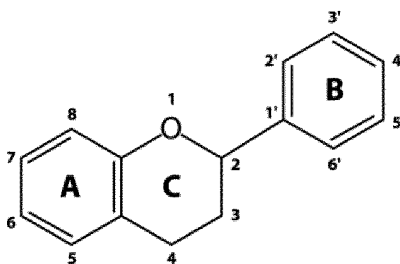
- 5 La présente invention concerne un extrait particulier d'*Helichrysum italicum*, ainsi qu'une composition cosmétique le contenant et ses utilisations, notamment dans le traitement des signes cutanés du vieillissement.

ARRIERE-PLAN DE L'INVENTION

10

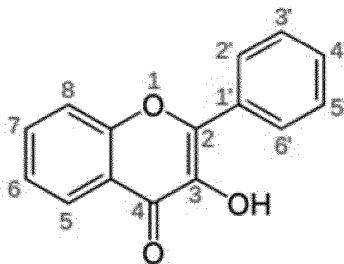
- Les plantes du genre *Helichrysum* rassemblent différentes espèces d'immortelle, dont l'immortelle d'Italie ou *Helichrysum italicum* (également désignée par *Helichrysum angustifolium* D.C.). Plusieurs extraits d'immortelle ont déjà été décrits comme présentant des propriétés anti-âge. En particulier, il a été démontré dans la demande WO 03/018730 qu'une
- 15 huile essentielle d'immortelle renfermant de l'acétate de néryle présentait notamment un effet anti-radicalaire. Un effet anti-oxydant et/ou anti-inflammatoire a par ailleurs été mis en évidence pour d'autres extraits d'*Helichrysum* contenant des flavonoïdes, obtenus notamment par chromatographie liquide à haute performance (Maffei et al., *Journal of Chromatography*, 537 (1991) 449-452) ou par extraction à l'aide d'huile de jojoba (WO 2013/050902). Il est en
- 20 outre connu que des extraits aqueux d'*Helichrysum italicum*, riches en acide caféique, permettent de restructurer l'épiderme et de lisser la surface de la peau (FR 2 975 006).

Les flavonoïdes constituent une classe de polyphénols renfermant le squelette ci-dessous :



- 25 Ils peuvent eux-mêmes être subdivisés en différentes catégories en fonction du carbone du cycle C sur lequel est fixé le cycle B, de la présence ou non d'une ou plusieurs insaturations sur le cycle C et/ou d'un groupement oxo en position 4 et/ou d'un groupement hydroxyle en position 3 du cycle C.

Une catégorie particulière de flavonoïdes est constituée des flavonols ayant la structure suivante :



Parmi ceux-ci, on compte notamment les flavonols non substitués sur le cycle B, tels que la
 5 baicaléine, les flavonols mono-hydroxylés sur le cycle B, tels que le kaempférol, et les flavonols
 di-hydroxylés sur le cycle B, tels que la quercétine et la quercétagétine. A la connaissance de
 la Demanderesse, ces flavonoïdes et leurs dérivés glycosylés ne sont pas présents en quantité
 détectable dans les huiles essentielles d'*Helichrysum*. En outre, les extraits d'*Helichrysum*
 contenant des flavonoïdes, tels que mentionnés précédemment, renferment uniquement des
 10 flavonols des deux premiers types précités ou leurs glycosides.

La Demanderesse a mis en évidence qu'un nouvel extrait d'*Helichrysum*, renfermant de manière
 caractéristique des hétérosides de flavonols dihydroxylés sur le cycle B, présentait non
 seulement des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires, mais également d'autres
 15 propriétés biologiques avantageuses lui permettant d'exercer une activité anti-âge complète.

Cet extrait peut être obtenu par extraction des parties aériennes, comprenant notamment les
 sommités fleuries, d'*Helichrysum italicum* à l'aide d'un mélange de solvants eutectiques
 profonds (ou NaDES pour "Natural Deep Eutectic Solvent").

20

Les solvants de type NaDES sont des mélanges de composés d'origine naturelle présentant la
 propriété d'avoir une température de fusion unique et définie pour une composition déterminée ;
 le mélange eutectique présente alors certaines propriétés physiques qui sont celles des corps
 purs, et notamment la propriété d'avoir la même composition en phase liquide et en phase solide.
 25 La température de fusion de l'eutectique est inférieure à la température de fusion du mélange
 des mêmes corps dans d'autres proportions. Les constituants des solvants eutectiques profonds
 sont capables de former ensemble des liaisons hydrogène fortes. On pense que les solvants de
 type NaDES sont présents dans les cellules végétales où ils permettent de synthétiser et stocker
 une diversité de métabolites non hydrosolubles tels que les flavonoïdes (Y. DaI et al., *Analytica*
 30 *Chimica Acta* (2013) 766:61-68). Il a déjà été suggéré de les utiliser comme solvants

d'extraction de matières végétales (Y. H. Choi et al., *Plant Physiology* (2011) 156:1701-1705 ; WO 2011/155829) ou pour protéger des aliments contre l'oxydation ou la dégradation acide (WO 2015/165738). Toutefois, à la connaissance de la Demanderesse, il n'a encore jamais été suggéré d'utiliser ces solvants pour extraire des flavonoïdes d'*Helichrysum italicum*.

5

RESUME DE L'INVENTION

L'invention a ainsi pour objet un extrait d'*Helichrysum italicum*, caractérisé en ce qu'il renferme des hétérosides de flavonols dont le cycle B est dihydroxylé.

10

Elle a également pour objet une composition cosmétique comprenant cet extrait dans un milieu physiologiquement acceptable.

15

Elle a encore pour objet l'utilisation cosmétique de cet extrait, par application topique sur la peau, pour prévenir ou traiter les signes du vieillissement cutané et/ou comme agent apaisant.

FIGURES

La Figure 1 représente la variation d'induction d'IL-8 par un extrait selon l'invention, testé à deux concentrations.

20

DESCRIPTION DETAILLEE

25

Comme indiqué précédemment, la présente invention porte sur un nouvel extrait d'*Helichrysum italicum*, qui se caractérise en ce qu'il renferme des hétérosides de flavonols dont le cycle B est dihydroxylé. Ces hétérosides de flavonols comprennent en particulier au moins un hétéroside, en particulier un O-hexoside, de quercétagétine et/ou de quercétine, plus particulièrement un O-hexoside de quercétagétine et un O-hexoside-O-rhamnoside de quercétine. L'extrait selon l'invention peut renfermer au moins 50 ppm d'hétérosides de flavonols, tel que mesuré par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

30

Un tel extrait est notamment susceptible d'être obtenu par extraction des parties aériennes d'*Helichrysum italicum* à l'aide d'un mélange de solvants eutectiques profonds (ci-après désigné par "solvant NaDES").

Dans une forme d'exécution préférée de l'invention, ce mélange de solvants est constitué de :
 (a) au moins deux solvants respectivement choisis dans au moins deux groupes distincts constitués (i) des acides carboxyliques, (ii) du glucose, (iii) du fructose, (iv) du sucrose, (v) du lactose, (vi) du tréhalose, (vii) des polyols et (viii) des composés azotés constitués de la choline,
 5 de ses sels inorganiques et des acides aminés et (b) éventuellement de l'eau.

Parmi les solvants précités, l'acide carboxylique est avantageusement choisi dans le groupe constitué par les oxo-acides, tels que l'acide pyruvique ; les mono- ou polyhydroxyacides, tels que les acides malique, citrique, lactique, tartrique, ascorbique, glucuronique et neuraminique ;
 10 et les acides dicarboxyliques, tels que les acides oxalique, adipique, maléique, fumarique, succinique, aconitique, malonique et oxalique.

De son côté, le polyol est de préférence choisi dans le groupe constitué par les alcools de sucre tels que le mannitol, le sorbitol, l'inositol, le ribitol, le galactitol, l'érythritol et le xylitol ; la
 15 glycérine ; le 1,3-propanediol ; et le propylène glycol.

En outre, des exemples d'acides aminés peuvent être choisis dans le groupe constitué par la proline et l'alanine.

20 Dans une forme d'exécution particulièrement préférée de l'invention, le mélange de solvants formant le solvant NaDES est constitué de fructose, de glycérine et d'eau, de préférence dans un rapport massique de 50:25:25.

Avant sa mise en œuvre dans la préparation de l'extrait selon l'invention, le solvant NaDES peut
 25 être lui-même préparé par chauffage du mélange des solvants jusqu'à faire fondre ses constituants solides, par exemple pendant une durée de 0,5 à 3h à une température de 50 à 80°C, généralement sous agitation, pour obtenir un liquide fondu, puis éventuellement refroidissement à température ambiante. En outre, les parties aériennes d'*Helichrysum italicum* peuvent être préalablement broyées et/ou séchées. L'extraction peut être effectuée par mise en
 30 contact de la plante éventuellement séchée et/ou broyée avec le solvant NaDES à une température de 25°C à 95°C, par exemple de 60 à 80°C, pendant une durée allant de 0,5 à 24h, par exemple de 2 à 4 h. Le rapport massique de la plante éventuellement séchée et/ou broyée au solvant NaDES peut aller de 1:99 à 50:50, par exemple de 1:99 à 10:90. A l'issue de cette étape d'extraction, le liquide et le résidu solide obtenus peuvent être séparés par toute technique

connue de l'homme de l'art et notamment par centrifugation, décantation ou pressage, de préférence par essorage centrifuge. L'extrait brut ainsi obtenu peut ensuite être clarifié par filtration et éventuellement stérilisé.

- 5 La présente invention porte également sur une composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, un extrait d'*Helichrysum italicum* tel que défini précédemment.

L'extrait selon l'invention peut avantageusement représenter de 0,001 à 5% en poids et
10 préférentiellement de 0,01 à 2% en poids, par rapport au poids total de la composition.

Cette composition renferme généralement un milieu physiologiquement acceptable, en particulier cosmétiquement acceptable, c'est-à-dire qui ne génère pas de picotements ou de rougeurs incompatibles avec une utilisation cosmétique. Ce milieu renferme de préférence une
15 phase aqueuse et éventuellement une phase grasse. On préfère que la composition se présente sous forme d'émulsion huile-dans-eau ou eau-dans-huile.

La phase aqueuse peut notamment contenir, outre de l'eau, au moins un constituant choisi parmi les gélifiants aqueux et les actifs hydrophiles tels que les humectants.

20

Par "gélifiant aqueux", on désigne un composé polymérique capable d'immobiliser des molécules d'eau en s'hydratant et d'augmenter ainsi la viscosité de la phase aqueuse. Un tel gélifiant peut être choisi parmi : les polysaccharides, tels que : la cellulose et ses dérivés, les amidons modifiés, le carraghénane, l'agar agar, la gomme de xanthane et les gommes végétales
25 telles que la gomme de guar ou de caroube ; les polymères synthétiques et notamment les homopolymères d'acrylate de sodium avantageusement réticulés, ainsi que les copolymères acryliques, en particulier les copolymères d'acrylate de sodium et/ou de (méth)acrylate d'alkyle et/ou de (méth)acrylate d'hydroxyalkyle et/ou de (méth)acrylate de (polyéthoxy)alkyle, avec au moins un autre monomère, avantageusement l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropane sulfonique
30 (AMPS), ces copolymères étant de préférence réticulés; et leurs mélanges.

De son côté, la phase grasse peut comprendre une ou plusieurs huiles volatiles et/ou non volatiles. Des exemples d'huiles volatiles sont les alcanes ramifiés, tels que l'isododécane, et les alcanes linéaires en C₁₀-C₁₃. Comme huiles non volatiles, on peut citer notamment :

- les esters d'acides et de mono-alcool choisis parmi : les mono- et polyesters d'acides linéaires saturés en C2-C10 (de préférence en C6-C10) et de mono-alcools linéaires saturés en C10-C18 (de préférence C10-C14), les mono- et polyesters d'acides linéaires saturés en C10-C20 et de mono-alcools ramifiés ou insaturés en C3-C20 (de préférence C3-C10) ; les mono- et polyesters d'acides ramifiés ou insaturés en C5-C20 et de mono-alcools ramifiés ou insaturés en C5-C20 ; les mono- et polyesters d'acides ramifiés ou insaturés en C5-C20 et de mono-alcools linéaires en C2-C4 ;
- les triglycérides d'acides gras en C6-C12, tels que les triglycérides d'acides caprylique et caprique et la triheptanoïne ;
- les acides gras ramifiés et/ou insaturés en C10-C20 (tels que les acides linoléique, laurique et myristique) ;
- les alcools gras ramifiés et/ou insaturés en C10-C20 (tels que l'octyldodécanol et l'alcool oléique) ;
- les hydrocarbures tels que le squalane (C30), notamment le squalane végétal extrait de l'huile d'olive, et l'hémisqualane (C15) ;
- les carbonates de dialkyle, tels que le dicaprylyl carbonate et le diéthylhexyl carbonate ;
- les dialkyléthers tels que le dicaprylyl éther ; et
- leurs mélanges.

On peut également citer les huiles végétales qui contiennent un ou plusieurs des constituants précités.

Comme esters d'acides et de monoalcools, on peut notamment citer les monoesters tels que le mélange de caprate et caprylate de coco, le macadamiate d'éthyle, l'ester éthylique de beurre de karité, l'isostéarate d'isostéaryle, l'isononanoate d'isononyle, l'isononanoate d'éthylhexyle, le néopentanoate d'hexyle, le néopentanoate d'éthylhexyle, le néopentanoate d'isostéaryle, le néopentanoate d'isodécyle, le myristate d'isopropyle, le myristate d'octyldodécyle, le palmitate d'isopropyle, le palmitate d'éthylhexyle, le laurate d'hexyle, le laurate d'isoamyle, le nonanoate de cétoatéaryle, le caprylate de propylheptyle et leurs mélanges. D'autres esters utilisables sont les diesters d'acides et de monoalcools tels que l'adipate de diisopropyle, l'adipate de diéthylhexyle, le sébaate de diisopropyle et le sébaate de diisoamyle.

Des exemples d'huiles végétales sont notamment les huiles de germe de blé, de tournesol, d'argan, d'hibiscus, de coriandre, de pépins de raisin, de sésame, de maïs, d'abricot, de ricin, de karité, d'avocat, d'olive, de soja, l'huile d'amande douce, de palme, de colza, de coton, de

noisette, de macadamia, de jojoba, de luzerne, de pavot, de potimarron, de sésame, de courge, de cassis, d'onagre, de lavande, de bourrache, de millet, d'orge, de quinoa, de seigle, de carthame, de bancoulier, de passiflore, de rosier muscat, d'Echium, de cameline ou de camélia.

- 5 La phase grasse peut en outre comprendre au moins un structurant de phase grasse.

Par "structurant de phase grasse", on entend un composé capable d'épaissir les huiles contenues dans la composition, choisi notamment parmi les cires, les gélifiants de phase grasse et les corps gras pâteux, ainsi que leurs mélanges.

10

Le terme "cire" désigne, dans le contexte de cette description, un corps gras solide à 25°C, à changement d'état solide / liquide réversible, ayant un point de fusion généralement compris entre 30 et 160°C, de préférence entre 50 et 90°C, tel que mesuré par Calorimétrie à Balayage Différentiel (DSC). Des exemples de cires sont en particulier les cires d'origine animale ou
 15 végétale, telles que les cires d'abeille, de candelilla, de carnauba ou d'acacia ; les huiles végétales hydrogénées et éventuellement modifiées par l'acide isostérique, notamment les huiles de colza, de soja, de tournesol, de jojoba, de coprah et de ricin hydrogénées ; les esters d'acides gras linéaires saturés en C₁₄-C₃₀ et d'alcools gras linéaires saturés en C₁₆-C₃₆ ; les acides linéaires et saturés en C₁₀-C₃₀ ; les alcools linéaires et saturés en C₈-C₃₀ ; et leurs mélanges. Ces
 20 cires peuvent se trouver sous forme micronisée, c'est-à-dire sous la forme d'une poudre dont les particules présentent une taille moyenne en nombre inférieure ou égale à 50 µm, et notamment allant de 0,5 à 50 µm, de préférence allant de 1 à 30 µm, voire allant de 3 à 20 µm, où la « taille moyenne en nombre » correspond à la dimension donnée par la distribution granulométrique statistique à la moitié de la population, dite D50.

25

Par "gélifiants de phase grasse", il est fait référence aux composés modifiant la rhéologie de la phase grasse par formation d'un réseau tridimensionnel. Comme composés de ce type, on peut notamment citer les argiles (en particulier les bentonites et les hectorites) modifiées hydrophobes, notamment par du chlorure de di-stéaryl di-méthyl ammonium ; les silices
 30 pyrogénées modifiées hydrophobes ; le palmitate et le myristate de dextrine ; les polyamides, les copolymères oléfine(s) / styrène, les poly(acrylates d'alkyle) ; les glycérides d'acides gras (de préférence linéaires et saturés) en C₁₆-C₂₆ tels que le composé Nomcort[®] HKG ; les dérivés de cellulose et les mélanges en contenant ; et leurs mélanges. Certaines huiles végétales hydrogénées peuvent également être considérées comme des gélifiants de phase grasse.

Enfin, les corps gras pâteux utilisables comme structurants de phase grasse sont définis comme des corps gras à changement d'état liquide / solide réversible, présentant à l'état solide une organisation cristalline anisotrope et comportant à une température de 23°C une fraction liquide et une fraction solide. On préfère utiliser les beurres végétaux. Les beurres de karité, de cacao et de mangue constituent des exemples de tels corps gras pâteux.

La composition utilisée selon l'invention peut par ailleurs comprendre un ou plusieurs émulsionnants, parfums, conservateurs, séquestrants, anti-oxydants, ajusteurs de pH, filtres UV, charges pulvérulentes, pigments, colorants et leurs mélanges.

Selon une forme d'exécution préférée, cette composition renferme en outre au moins un actif anti-âge, en particulier un actif adapté à prévenir et/ou traiter les rides, le relâchement cutané et/ou la formation de taches pigmentaires, qui peut notamment être choisi parmi les agents anti-radicalaires, les agents stimulant la différenciation et/ou la prolifération des kératinocytes et/ou des fibroblastes ; les agents stimulant la synthèse de glycosaminoglycanes et/ou de collagène et/ou de fibrilles d'ancrage dermo-épidermique ; les agents prévenant la dégradation du collagène et/ou des glycosaminoglycanes et/ou des fibrilles d'ancrage dermo-épidermique ; les agents anti-glycation ; les agents dépigmentants et/ou inhibant la mélanogénèse ; et leurs mélanges. En variante et/ou en plus, la composition selon l'invention peut comprendre au moins un actif à effet neuronal.

Des exemples de tels actifs anti-âge et/ou à effet neuronal sont notamment : l'acide ascorbique, ses sels, ses éthers et ses esters, notamment le glucoside d'ascorbyle ; l'adénosine ; le ribose ; les extraits de miel ; les protéines et glycoprotéines, extraites notamment d'amande douce ; les protéines végétales hydrolysées, notamment issues du riz, des graines d'hibiscus ou du lupin ; les polypeptides et les pseudodipeptides, tels que le chlorhydrate de carcinine, le palmitoyl pentapeptide-4 (Pal-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser) et le palmitoyl tripeptide-38 commercialisés notamment par SEDERMA sous les dénominations commerciale Matrixyl® 3000 et Matrixyl® Synthe'6, respectivement, le palmitoyl tripeptide-8 commercialisé par la société LUCAS MEYER sous la référence commerciale Nutrazen®, le pentapeptide-18 commercialisé par la société LIPOTEC sous la dénomination commerciale Leuphasyl® Solution, le sh-decapeptide-9 commercialisé par la société SANDREAM sous la dénomination commerciale Neoendorphin® et le palmitoyl hexapeptide-52 commercialisé par la société INFINITEC sous

la référence commerciale X50 Myocept® Powder ; les silanes tels que le mannuronate de méthylsilanol ; les arabinoxylanes, extraits en particulier de farine de seigle et les galactoarabinanes, issus notamment du mélèze ; l'acide hyaluronique et ses sels ; les polyphénols, extraits en particulier de mimosa ; les alpha-hydroxyacides, dont ceux extraits de citron; les extraits aqueux de plantes telles que le trèfle d'eau, la pensée sauvage, la prêle des champs, le chardon aux ânes (*Onopordum acanthium*), le millefeuille (*Achillea millefolium*, contenu notamment dans le produit Neurobiox® de la société BASF), l'embelia (*Embelia concinna*, telle que commercialisée par la société SEPPIC), le figuier de Barbarie (*Opuntia ficus indica*, commercialisé notamment par MIBELLE AG BIOCHEMISTRY sous la dénomination commerciale AquaCacteen®), la sauge (*Salvia officinalis*, vendue notamment par PROVITAL GROUP), Vitex negundo (commercialisé notamment par les LABORATOIRES EXPANSCIENCE sous la référence commerciale Neurovity®), la châtaigne, la papaye, l'arganier, l'avoine, le tournesol, la pâquerette, la pivoine ou l'aneth ; les extraits aqueux d'algues et notamment de coralline, de janie rouge, d'*Ungaria pinnatifada*, d'*Alaria esculenta* ou de *Nannochlorosis oculata* ; les huiles essentielles, notamment d'immortelle ou de myrte ; les gluconates de zinc et/ou de cuivre ; et leurs mélanges.

En variante ou en plus, la composition utilisée selon l'invention peut comprendre au moins un polymère tenseur, c'est-à-dire capable de tendre la peau par action mécanique et de réduire ainsi l'apparence des rides et des ridules. Il peut s'agir d'un polymère synthétique ou naturel, en particulier d'un polysaccharide, notamment d'un extrait d'algue ou de plancton marin ou d'une gomme végétale.

Cette composition peut se présenter sous toute forme adaptée à une application topique sur la peau et notamment sous forme de lait, de crème, de lotion, de gel ou de masque. Il s'agit généralement d'une composition non rincée.

Elle peut être utilisée, par application topique sur la peau, pour prévenir ou traiter les signes du vieillissement cutané et/ou comme agent apaisant. Il est ainsi possible de prévenir et/ou réduire la formation de rides et ridules, le relâchement cutané et/ou la perte d'éclat du teint, notamment en renforçant la barrière cutanée, en augmentant la différenciation des kératinocytes, en protégeant la peau contre le stress oxydant et en prévenant la glycation des protéines cutanées. Pour ce faire, la composition selon l'invention peut être appliquée sur la peau du visage et/ou

du corps, plus particulièrement sur le visage et/ou le décolleté, à raison d'une à deux fois par jour, de préférence matin et/ou soir.

EXEMPLES

5

L'invention sera mieux comprise à la lumière des exemples suivants, qui sont donnés à titre purement illustratif et n'ont pas pour but de limiter la portée de l'invention, définie par les revendications annexées.

10 **Exemple 1 : Préparation d'un extrait selon l'invention**

On a préparé un extrait selon l'invention suivant le procédé décrit ci-dessous.

Les parties aériennes fleuries sèches d'*Helichrysum italicum* ont été broyées à l'aide d'un broyeur à couteaux équipé d'une grille de maille 12 mm. Le solvant d'extraction a séparément
15 été préparé par mélange pendant 1 à 2h à 70°C de fructose, de glycérine et d'eau dans un rapport
massique de 50:25:25, conduisant à un liquide limpide et incolore. Le solvant a été introduit
dans un réacteur auquel la plante broyée a été ajoutée dans un rapport massique plante sèche
broyée / solvant de 5/95. L'extraction a été effectuée pendant 3h à 70°C sous agitation continue.
On a ensuite procédé à une séparation liquide / solide au moyen d'uneessoreuse centrifuge, puis
20 l'extrait brut a été clarifié par filtration frontale sur différents grades de plaques de filtration en
profondeur. L'extrait clarifié a alors été filtré sur une cartouche contenant une membrane ayant
un seuil de coupure de 0,22 µm. On a ainsi obtenu un extrait sous forme de liquide ambré.

Exemple 2 : Caractérisation de l'extrait

On a comparé la composition en polyphénols de l'extrait de l'Exemple 1 avec celle d'extraits huileux et aqueux d'*Helichrysum italicum*. L'extrait huileux a été obtenu comme suit. On a
 5 mélangé 9% en poids de poudre de plante séchée et broyée avec 91% d'une huile de tournesol désodorisée à l'aide d'ultrasons, dans un récipient refroidi à 10°C. L'extraction a été réalisée pendant 30 min, sous ultrasons, avec une agitation de 500 tours/min. L'extraction a été poursuivie au micro-ondes sous un flux d'azote de 0,4 L/min. Les phases solide et liquide
 10 huileuse obtenues ont été séparées par décantation, puis la phase huileuse a été filtrée et stockée sous atmosphère inerte, à l'abri de la lumière.

Matériel

- Chromatographie liquide ultra haute performance (Agilent Technologies, USA)
- Injecteur automatique 1290 series
- 15 - Détecteur à barrette de diodes (DAD) 1260 series
- Spectromètre de Masse : Esquire 6000 (Bruker Daltonics, Bremen) équipé d'une source d'ionisation Electrospray (ESI).

Préparation des échantillons

- 20 - L'extrait aqueux a été dilué au 10^{ème} dans un mélange MeOH/H₂O (50/50).
- L'extrait selon l'invention été dilué au 5^{ème} dans un mélange MeOH/H₂O (50/50).
- L'extrait huileux a été préparé par dissolution de 2g de d'extrait huileux dans 1mL d'hexane. Cette solution huileuse a été extraite 3 fois par 2mL d'un mélange MeOH/H₂O (60/40). Les phases MeOH/H₂O ont ensuite été regroupées.

25

Méthode d'analyse

Les solutions obtenues après dilution/extraction ont été filtrées sur filtre PTFE (0,45 µm) puis injectées (1µL) sur une colonne Agilent C18 (2,1 mm x 100 mm ; 1,8 µm) à une température maintenue à 25°C et à un débit de 0,4 mL/min. On a utilisé comme solvants : A = H₂O/HCOOH
 30 (0,1%) et B = ACN/HCOOH (0,1%). Le gradient d'élution des polyphénols était le suivant :

Temps (min.)	% Solvant B
0	5
2	18,3
6	29
6,5	31,7
9,5	38,3
11,5	71
15	95
16	100
17	100
17,2	5
20,2	5

Tableau 1 : gradient d'élution des polyphénols

- 5 A la sortie du détecteur à barrette de diode, l'éluant a été injecté dans le spectromètre de masse. Les analyses ont été réalisées en mode négatif ou positif.
- Les spectres de LC-MS ont été acquis sur l'ensemble de la gamme des masses (m/z) allant de 100 à 1400. L'ensemble des données a ensuite été collecté et traité par le logiciel Hystar version 3.0.

10

Résultats

Composé	Extrait huileux	Invention	Extrait aqueux
Isomère d'acide chlorogénique	n.d	22,8 ± 0,7	17,7 ± 0,5
Acide chlorogénique	n.d	68,9 ± 1,5	9,6 ± 0,3
Isomère d'acide chlorogénique	n.d	17,2 ± 0,9	10,3 ± 0,5
Acide dicaféoyl glucarique	n.d	31,0 ± 0,8	2,4 ± 0,1
Acide caféique	n.d	18,8 ± 0,9	38,1 ± 0,3
Acide dicaféoyl glucarique	n.d	n.d	n.d
Quercetagétine-O-hexoside	n.d	49,4 ± 1,9	n.d
Flavonoïde-O-hexoside	n.d	28,4 ± 1,3	n.d
Acide dicaféoyl quinique	n.d	75,0 ± 2,6	n.d
Acide dicaféoyl quinique	n.d	32,4 ± 1,3	<LQ
Acide dicaféoyl quinique	n.d	417,2 ± 12,8	<LQ

Acide dicaféoyl quinique	n.d	163,0 ± 4,9	n.d
Acide dicaféoyl quinique	n.d	<LQ	n.d
Quercétine-O-hexoside-O-rhamnoside	n.d	8,3 ± 0,3	n.d
Arzanol	43.1 ± 0.8	56,3 ± 1,7	n.d
Méthylarzanol	4.6 ± 0.4	5,6 ± 0,9	n.d
Diméthylarzanol	<LQ	<LQ	n.d
Hydroxytrémétone	Présence	Présence	Présence
Dérivés d'hydroxytrémétone	Présence		

n.d : non détecté ; <LQ : détecté mais inférieur à la limite de quantification

Tableau 2 : composition majoritaire de la fraction polyphénolique des extraits d'Immortelle

Comme il ressort de ce tableau, l'extrait selon l'invention se caractérise par une teneur élevée en hétérosides de flavonoïdes, en particulier en O-hexosides de flavonols dihydroxylés sur le cycle B. Ils sont également plus riches en acide chlorogénique et en acide dicaféoyl quinique que les extraits aqueux. Il a par ailleurs été confirmé par chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse que le "flavonoïde O-hexoside" ne correspondait à aucun autre des composés cités ci-dessus.

Exemple 3 : Test *in vitro* sur explant de peau humaine

3.1 Matériels & Méthodes

Traitement des explants

3 explants de peau provenant de plastie abdominale d'un donneur féminin ont été incubés indépendamment en présence de l'extrait préparé dans l'Exemple 1, pendant 72h dans un milieu de culture de peau (Biopredic) à 37°C et à 5% de CO₂ à l'interface air-liquide. L'extrait selon l'invention a été directement dilué dans le milieu de culture à la concentration de 0,5%.

3 explants de peau non traités ont été incubés dans les mêmes conditions.

Extraction des protéines

Le pool de 3 explants non traités ou traités avec l'extrait selon l'invention à 0,5% a été broyé à l'aide d'un mixeur à immersion (Kinematica, Polytron PT1200E) équipé d'un axe de 5 mm dans un tampon contenant du DTT, de l'EDTA et un cocktail d'antiprotéases. Les protéines des homogénats ont été extraites par chauffage puis sonication sur glace en présence de 2% de SDS. Les lysats ont été centrifugés (15000 g, 10 minutes). Les protéines ont été dosées à l'aide du kit Pierce 660nm Protein Assay (Thermo, Cat N°22660).

Préparation des peptides

Les extraits peptidiques ont été préparés selon la méthode FASP (Filter Aided Sample Preparation). 250 µg de protéines de chaque extrait ont été chargés sur un ultrafiltre (Amicon Ultra 0.5, 10kDa MWCO). Les protéines ont été réduites (Dithiothréitol), alkylées (Iodoacétamide) et digérées (Trypsine). Les peptides issus de cette digestion ont été dessalés

5 par SPE (SepPak C18), séchés et solubilisés dans 100 µl d'une solution contenant 5% d'acétonitrile et 0.1% d'acide formique.

Les peptides ont été dosés par la méthode BCA.

Analyse par spectrométrie de masse / chromatographie en phase liquide en tandem (LC-MS/MS)

10 Pour chaque échantillon, 2,5 µl d'extrait peptidique ajusté à 100 ng/µl ont été injectés en triplicat. La chromatographie a été réalisée avec Ultimate 3000 (Dionex). La colonne chromatographique utilisée était une colonne C18 (75 µm x 50 cm, 3 µm). Après une période de 2 minutes de piégeage sur pré-colonne, un gradient de 5 à 35% d'acétonitrile a été appliqué pendant 60 minutes avec un débit de 300 nl/min.

15 Les données ont été acquises avec un Q-Exactive HF (Thermo). Le scan MS a été réalisé à 60000 de résolution avec un délai transitoire de 100 ms. Le scan MS/MS a été réalisé à 17500 de résolution sur les 20 ions les plus intenses avec un temps d'accumulation de 60 ms. 2800 cycles ont été réalisés soit 23 cycles (mesures) par pic chromatographique.

Les paramètres expérimentaux suivants ont été appliqués à cette analyse :

20

Voltage source	Gaz de balayage	Température tube de transfert	Energie de collision
1300V	0 psi	250°C	variable*

* L'énergie de collision est déterminée automatiquement en fonction de la masse et de la charge du composé analysé.

25 Analyse des données

Identification des protéines : L'identification a été effectuée à l'aide de l'algorithme MASCOT (version 2.4) contre une base de données Uniprot KB regroupant le protéome de référence humain et la protéase utilisée pour la digestion (trypsine de porc).

Quantification des protéines : l'analyse a été réalisée grâce aux logiciels Skyline 3.5.1 et

30 Marker View 1.2.1.

Une bibliothèque de peptides identifiés par leur masse exacte et leur temps de rétention a été générée à partir des interrogations MASCOT. Les XIC (Extract Ion Chromatograms) ont été générés par le logiciel Skyline 3.5.0 avec pour paramètre une précision en masse de +/- 10 ppm et une précision en temps de rétention de +/- 2,5 minutes. L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel Marker View 1.2.1. Pour pallier aux variations expérimentales, les aires de chaque protéine ou peptide ont été normalisées par la somme des aires de toutes les protéines ou tous les peptides. Deux tests statistiques ont été effectués : une analyse en composante principale (ACP Pareto) pour évaluer graphiquement l'homogénéité des résultats pour un même échantillon et les différences entre échantillons et un test de Student pour déterminer si les différences observées entre échantillons sont statistiquement significatives (seuil : $p < 0,05$).

Résultats

619 protéines ont été identifiées dans les échantillons traités et non traités parmi lesquelles 240 protéines sont significativement régulées ($p < 0,05$) par traitement avec l'extrait selon l'invention à 0,5%. Sur ces 240 protéines, 106 protéines sont régulées avec un facteur de variation ("fold change" en anglais) supérieur ou égal à 1,3 ou inférieur ou égal à 0,77 comparativement au contrôle non traité ($p < 0,05$).

Les voies de signalisation qui ont été mises en évidence à l'aide de l'analyse CORAVALID comme enrichies par traitement avec l'extrait selon l'invention à 0,5% sont :

- Mécanisme de réparation de l'ADN
- Mécanisme de protection contre le stress oxydant
- Prévention de la glycation
- Différenciation épidermique : fonction barrière
- Adhésion cellulaire
- Synthèse protéique : Prolifération cellulaire
- Régénération tissulaire

Mécanisme de réparation de l'ADN:

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
XRCC5_HUMAN	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5	P13010	1,44	0,0401
CTNB1_HUMAN	Catenin beta-1 (Beta-catenin)	P35222	1,33	0,0012
HMGB1_HUMAN	High mobility group protein B1	P09429	2,38	0,0180

Mécanisme de protection contre le stress oxydant :

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
CATA_HUMAN	Catalase	P04040	1,44	0,0040
PARK7_HUMAN	Protein deglycase DJ-1	Q99497	1,39	0,0451
HEMO_HUMAN	Hemopexin	P02790	1,61	0,00002

5 Prévention de la glycation

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
PARK7_HUMAN	Protein deglycase DJ-1	Q99497	1,39	0,0451

Différenciation épidermique: Fonction barrière

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
DCD_HUMAN	Dermcidin	P81605	1,87	0,0143
FABP4_HUMAN	Fatty acid-binding protein 4	P15090	1,87	0,0012
CNFN_HUMAN	Cornifelin	Q9BYD5	1,32	0,0156
FILA2_HUMAN	Filaggrin-2	Q5D862	1,58	0,0000
CTNB1_HUMAN	Catenin beta-1 (Beta-catenin)	P35222	1,33	0,0012
XP32_HUMAN	Skin-specific protein 32	Q5T750	2,90	0,0002
BBC3_HUMAN	Bcl-2-binding component 3	Q9BXH1	4,31	0,0294
CYC_HUMAN	Cytochrome c	P99999	1,34	0,0017
DMKN_HUMAN	Dermokine	Q6E0U4	1,54	0,0069
FHL1_HUMAN	Four and a half LIM domains protein 1	Q13642	1,50	0,0020
K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B	P04259	0,47	0,0002

Adhésion cellulaire:

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
ACTN2_HUMAN	Alpha-actinin-2	P35609	1,33	0,0027
TLN1_HUMAN	Talin-1	Q9Y490	1,32	0,0018
VINC_HUMAN	Vinculin	P18206	1,34	0,0138

Synthèse protéique (transcription/traduction/modification des protéines): Prolifération cellulaire

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
RAIL2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	Q32P51	1,63	0,0007
RSMB_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B'	P14678	1,99	0,0331
RS11_HUMAN	40S ribosomal protein S11	P62280	2,52	0,0461
RS28_HUMAN	40S ribosomal protein S28	P62857	1,73	0,0001
RS18_HUMAN	40S ribosomal protein S18	P62269	1,70	0,0278
RS30_HUMAN	40S ribosomal protein S30	P62861	1,57	0,0041
RS7_HUMAN	40S ribosomal protein S7	P62081	1,45	0,0046
RS3A_HUMAN	40S ribosomal protein S3a	P61247	1,35	0,0029
RS26L_HUMAN	Putative 40S ribosomal protein S26-like 1	Q5JNZ5	1,34	0,0242
RL19_HUMAN	60S ribosomal protein L19	P84098	1,77	0,0104
RL4_HUMAN	60S ribosomal protein L4	P36578	1,46	0,0054
RL31_HUMAN	60S ribosomal protein L31	P62899	1,44	0,0449
RL3_HUMAN	60S ribosomal protein L3	P39023	1,41	0,0037
RL35A_HUMAN	60S ribosomal protein L35a	P18077	1,38	0,0204
RL27_HUMAN	60S ribosomal protein L27	P61353	1,32	0,0041
PIAS4_HUMAN	E3 SUMO-protein ligase PIAS4	Q8N2W9	0,20	0,0005
K1C15_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 15	P19012	1,36	0,0005

Réponse régénérative (cicatrisation tissulaire):

Désignation	Nom anglais de la protéine		Variation	p
A1AG1_HUMAN	Alpha-1-acid glycoprotein 1	P02763	2,30	0,0197
A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	P01009	1,42	0,0000
CATB_HUMAN	Cathepsin B	P07858	1,59	0,0083
FIBG_HUMAN	Fibrinogen gamma chain	P02679	1,88	0,0000
FIBB_HUMAN	Fibrinogen beta chain	P02675	1,66	0,0002
FIBA_HUMAN	Fibrinogen alpha chain	P02671	1,58	0,0016
TPM1_HUMAN	Tropomyosin alpha-1 chain	P09493	1,33	0,0093
AACT_HUMAN	Alpha-1-antichymotrypsin	P01011	1,56	0,0043
TRFE_HUMAN	Serotransferrin	P02787	1,38	0,0000
APOH_HUMAN	Beta-2-glycoprotein 1	P02749	1,72	0,0195

Conclusion

L'extrait d'immortelle selon l'invention permet d'augmenter la différenciation des cellules épidermiques, de renforcer la fonction barrière de la peau et de maintenir une meilleure hydratation. Il permet également une meilleure adhésion cellulaire associée à des capacités accrues de régénération tissulaire et à une augmentation de la synthèse protéique. Par ailleurs, l'extrait d'immortelle selon l'invention stimule les défenses de la peau contre le stress oxydant et accroît les capacités de réparation de l'ADN, ainsi que la prévention de la glycation. Il peut donc avantageusement être utilisé dans une composition cosmétique pour prévenir ou traiter les signes cutanés du vieillissement.

Exemple 4 : Test *in vitro* sur culture de kératinocytes humains**Matériels & Méthode****Culture cellulaire**

Des kératinocytes, provenant d'une biopsie mammaire réalisée sur un donneur féminin de 60 ans, ont étéensemencés dans des plaques 96 puits (Nunc) à raison de 8000 cellules par puits dans un milieu de croissance de kératinocytes (KGM Gold, Lonza) supplémenté d'extrait pituitaire bovin, d'EGF, d'insuline, d'épinephrine et de calcium. Les cellules ont été maintenues 3 jours en culture à 37°C et sous 5% de CO₂. A la fin de ce temps de culture de 3 jours, le

milieu de culture a été remplacé par du milieu KGM Gold (Lonza) sans hydrocortisone qui est un anti-inflammatoire pouvant interférer avec le test.

Evaluation de la production d'IL-8 induite par un stress inflammatoire

- 5 Après 24h de privation en hydrocortisone, les cellules ont été stressées à l'aide de 200 ng/ml de flagelline (Invivogen) et traitées en même temps avec l'extrait d'immortelle selon l'Exemple 1 à différentes concentrations ou avec des molécules anti-inflammatoires de référence : le gallate d'épigallocatechine (EGCG ; Enzo LifeSciences) à 10 μ M ou l'hydrocortisone (HC, Sigma-Aldrich) à 500 ng/ml. Un contrôle « non traité » sans addition de flagelline ni traitement a été
10 réalisé. Il représente le niveau basal d'IL-8 en conditions non inflammatoires.

La culture a été maintenue pendant 2 jours sans changement de milieu.

- Après 2 jours de culture, les milieux de culture ont été prélevés pour doser la production de la
15 cytokine IL-8 induite par la flagelline à 200 ng/ml.

- Le dosage de l'IL-8 dans les milieux de culture a été réalisé à l'aide du kit « IL8 single analyte ELISArray kit » (Qiagen). Le protocole de dosage d'IL-8 utilisé était celui du fournisseur. Brièvement, le tampon de dilution contenant 1% de BSA (concentration finale) a été préparé pour diluer les échantillons au 1/5 et la gamme d'étalonnage effectuée en dilution sérielle de
20 moitié de 200 pg/ml à 31,3 pg/ml. Le tampon d'essai contenant 0,2% de BSA a également été préparé. Ensuite, sur la plaque revêtue de l'anticorps IL-8 (fournie dans le kit), 50 μ l de tampon d'essai ont été ajoutés puis 50 μ l d'échantillons dilués au 1/5 ou la gamme ont été ajoutés dans chaque puits et incubés à température ambiante pendant 2h. Après ces 2h d'incubation, la solution d'anticorps de détection a été ajoutée, suivie de 3 lavages de la plaque avec une solution
25 de tampon de lavage. Une solution de conjugué « Avidin-HRP » a été ajoutée dans chaque puits et incubée pendant 30 minutes à l'obscurité, suivie de 4 lavages avec la solution de tampon de lavage. Une solution de développement a été ajoutée à chaque puits et incubée pendant 15 min. Puis une solution d'arrêt a été ajoutée pour arrêter la réaction. L'absorbance a été lue à 450 nm puis corrigée par celle lue à 470 nm. La valeur obtenue à 470 nm a été soustraite de la valeur
30 obtenue à 450 nm.

En parallèle, la viabilité cellulaire a été évaluée de la manière suivante.

Après avoir prélevé les milieux de culture pour le dosage d'IL-8, les cellules ont été incubées avec une solution de XTT à 0,3 mg/ml (Roche Diagnostics) pendant 2h à 37°C et sous 5% de CO₂.

A la fin de la période d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

- 5 La viabilité cellulaire a été calculée de la manière suivante :

$$\% \text{ viabilité} = (\text{moyenne des DO mesurées dans les puits traités} - \text{blanc}) / (\text{moyenne des DO mesurées dans les puits non traités} - \text{blanc}) \times 100$$

Le seuil de toxicité était fixé à 80% de viabilité cellulaire.

10 Etudes statistiques

Les études statistiques ont été faites par le test One Way ANOVA.

Résultats

Cytotoxicité de l'extrait selon l'invention

- 15 L'extrait d'immortelle selon l'invention n'était pas toxique pour les kératinocytes humains aux concentrations évaluées.

Production d'IL-8 induite par un stress inflammatoire

- 20 Le traitement avec la flagelline à 200 ng/ml pendant 48h a induit une augmentation de production d'IL-8 par les kératinocytes. Cette augmentation était de $789,2 \pm 344,9\%$ ($p < 0,001$) par rapport au contrôle non traité ($100 \pm 4,1\%$). Ce résultat a permis de valider le stress inflammatoire induit par la flagelline à 200 ng/ml.

- 25 En présence d'HC à 500 ng/ml ou d'EGCG à 10 μ M (témoins positifs), la production d'IL-8 par les kératinocytes était respectivement diminuée de 58,4% ($p < 0,05$) et de 89,2% ($p < 0,005$) par rapport à la production induite par la flagelline à 200 ng/ml. Ce résultat a permis de valider l'expérience.

L'extrait d'immortelle selon l'invention aux concentrations de 0,1% et 0,05% diminuait également significativement la production d'IL-8 de 68,4% ($p < 0,01$) et de 86,4% ($p < 0,005$).

30 **Conclusion**

Cet exemple démontre que l'extrait d'immortelle selon l'invention diminue la production d'IL-8 induite par un stress inflammatoire dans des kératinocytes humain en culture. Il est ainsi possible d'envisager son utilisation comme agent apaisant dans des compositions cosmétiques, notamment dans le traitement des peaux sensibles.

Exemple 4 : Composition cosmétique

La composition suivante a été préparée de manière classique pour l'homme de l'art, en
 5 mélangeant les ingrédients ci-dessous dans les proportions pondérales indiquées.

	Emulsionnants non ioniques	6,00 %
	Beurre de karité	2,00 %
	Epaississants de phase grasse	6,50 %
10	Huiles	8,25 %
	Adénosine	0,04 %
	Glycérine	6,00 %
	Epaississants de phase aqueuse	2,50 %
	Extrait selon l'invention	1,00 %
15	Hydroxyde de sodium	1,00 %
	Conservateurs	qs
	Parfum	qs
	Eau	qsp 100,00 %

REVENDECATIONS

1. Extrait d'*Helichrysum italicum*, caractérisé en ce qu'il renferme des hétérosides de flavonols dont le cycle B est dihydroxylé.

5

2. Extrait selon la revendication 1, caractérisé en ce que les hétérosides de flavonols comprennent au moins un hétéroside, notamment un O-hexoside, de quercétagétine et/ou un hétéroside de quercétine.

10

3. Extrait selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 50 ppm d'hétérosides de flavonols.

4. Composition cosmétique comprenant, dans un milieu physiologiquement acceptable, un extrait d'*Helichrysum italicum* selon l'une quelconque des revendications 1 à 3.

15

5. Utilisation cosmétique d'un extrait d'*Helichrysum italicum* selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, par application topique sur la peau, pour prévenir ou traiter les signes du vieillissement cutané et/ou comme agent apaisant.

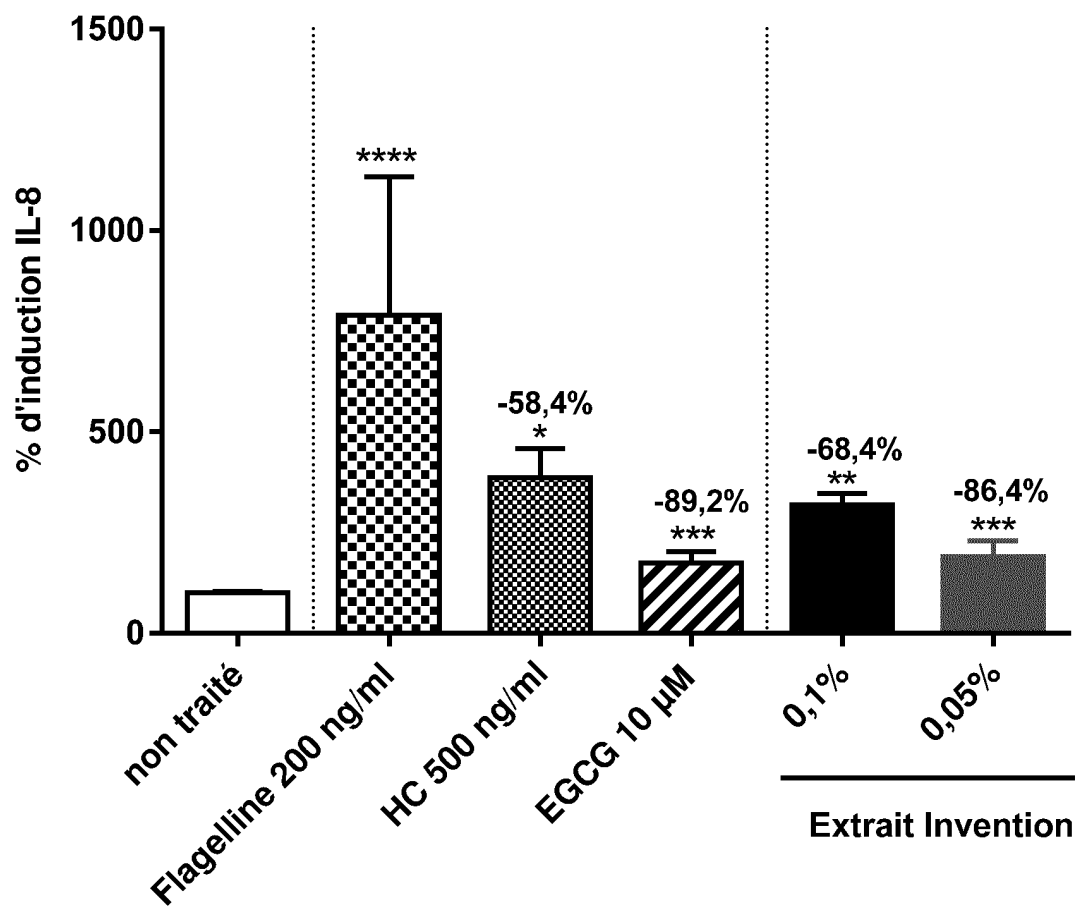


FIGURE 1

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ETABLISSEMENT DU PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

☒ Le demandeur a modifié les revendications.

☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.

☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.

☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITES DANS LE PRESENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.

☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.

☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.

☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; août 2016 (2016-08), "Helichrysum water", XP002770975, Database accession no. 4251589

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; novembre 2015 (2015-11), "L'Eau de Soir et Matin Certified Organic Cleansing Water for Eyes and Face", XP002770976, Database accession no. 3638893

DATABASE GNPD [Online] MINTEL; mai 2016 (2016-05), "Anti-Wrinkle Day Cream", XP002770977, Database accession no. 4023593

PAULINA MALINOWSKA: "Effect of flavonoids content on antioxidant activity of commercial cosmetic plant extracts", HERBA POLONICA, vol. 59, no. 3, septembre 2013 (2013-09), pages 63-75, XP55351400, DOI: 10.2478/hepo-2013-0017

FACINO R M ET AL: "ANTI-ERYTHEMATOUS AND PHOTOPROTECTIVE ACTIVITIES IN GUINEA-PIGS AND IN MAN OF TOPICALLY APPLIED FLAVONOIDS FROM HELICHRYSUM-ITALICUM G. DON", ACTA THERAPEUTICA JOURNAL INTERNAT. DE THERAPEUTIQUE EXPERIMENTALE ET CLIN, BRUXELLES, 1975-, BE, vol. 14, no. 4, 1988, pages 323-346, XP009085079, ISSN: 0378-0619

DATABASE Chemical Abstracts, Chemi [Online] janvier 1991 (1991-01), MAFFEI FACINO R ET AL: "Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from Helichrysum italicum G. Don", XP002197961, extrait de CHEMICAL Database accession no. 115-41926t

2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

PIERGIORGIO PIETTA ET AL: "High-performance liquid chromatographic determination of flavonoid glucosides from Helichrysum italicum", JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, vol. 537, 1991, pages 449-452, XP055380306, AMSTERDAM, NL ISSN: 0021-9673, DOI: 10.1016/S0021-9673(01)88917-2

3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES

NEANT