

19 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

11 N° de publication : **3 134 515**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)
21 N° d'enregistrement national : **22 03447**

51 Int Cl⁸ : **A 61 K 36/18 (2022.01), A 61 K 8/97, A 61 Q 11/00,
A 61 P 17/00**

12 **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION** **A1**

22 Date de dépôt : 14.04.22.

30 Priorité :

43 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 20.10.23 Bulletin 23/42.

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

60 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

Demande(s) d'extension :

71 Demandeur(s) : *ISP Investments LLC Entreprise
(Société droits US LLC) — US.*

72 Inventeur(s) : Garcia Imane, CAPALLERE
Christophe, OGER Elodie, MOURET Laura et PINA-
COLO Sandrine.

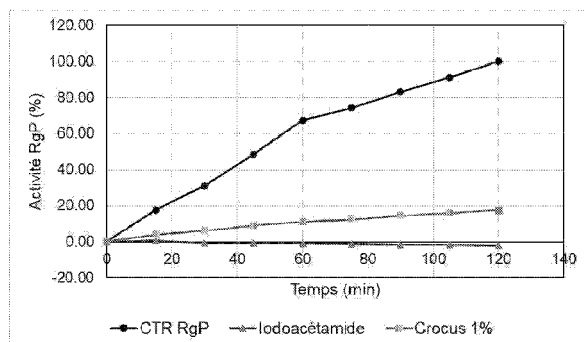
73 Titulaire(s) : *ISP Investments LLC Entreprise (Société
droits US LLC).*

74 Mandataire(s) : Ashland Specialties France.

54 Extraits de fleurs de *Crocus sativus*, compositions les comprenant et leurs utilisations dans les soins
buccaux.

57 La présente invention concerne des compositions pour l'hygiène buccale comprenant des extraits de fleurs de
Crocus sativus et leurs utilisations pour protéger la cavité buccale. L'invention porte encore sur des compositions thé-
rapeutiques pour leurs utilisations dans la prévention et le traitement des affections de la cavité buccale, notamment
les parodontites et les gingivites.

Figure pour l'abrégé: Fig. 1



FR 3 134 515 - A1



Description

Titre de l'invention : Extraits de fleurs de *Crocus sativus*, compositions les comprenant et leurs utilisations dans les soins buccaux

Domaine technique

[0001] La présente invention relève du domaine technique de l'hygiène buccale et du traitement thérapeutique des pathologies buccales. Elle concerne plus particulièrement des compositions comprenant des extraits de fleurs de *Crocus sativus* pour l'hygiène buccale ou la protection de la cavité buccale. L'invention concerne également des compositions comprenant des extraits de fleurs de *Crocus sativus* pour leurs utilisations thérapeutiques dans la prévention et le traitement des affections de la cavité buccale, notamment les saignements, l'inflammation, le déchaussement dentaire ou la perte de substance conjonctivale associés aux parodontites et aux gingivites provoquées par la bactérie *Porphyromonas gingivalis*.

Arrière-plan technique de l'invention

[0002] La cavité buccale est colonisée par de très nombreux micro-organismes composant le microbiome oral. Dans une cavité buccale saine, les micro-organismes sont essentiellement des bactéries commensales qui s'organisent pour maintenir l'équilibre de cet écosystème, ce qui n'exclue pas la présence de bactéries pathogènes.

[0003] La cavité buccale est très fréquemment le siège de pathologies telles que la gingivite et la parodontite. La gingivite est une affection inflammatoire réversible, généralement provoquée par une accumulation de biofilm bactérien, qui se manifeste par des rougeurs gingivales, un œdème, quelquefois des saignements, mais sans déchaussement dentaire. Si la gingivite n'est pas traitée à temps, l'inflammation peut devenir chronique et évoluer en parodontite, caractérisée par une résorption de l'os alvéolaire, une destruction du ligament parodontal et *in fine* le déchaussement des dents.

[0004] Une des causes majeures de la parodontite est le déséquilibre du microbiome buccal, associé à une faiblesse de la réponse immunitaire. Certaines bactéries pathogènes s'associent alors pour supplanter les bactéries commensales. Cette association de bactéries a été décrite sous le nom de « red complex » et se compose des espèces *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola* (Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. in J Clin Periodontol. 1998 ;25(2):134-144).

[0005] *Porphyromonas gingivalis* joue un rôle prépondérant dans la formation d'un biofilm (Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA., Nat Rev Microbiol. 2012;10(10):717-725) et dans la stratégie d'évitement du système immunitaire (Hajishengallis G., J Oral Biosci. 2011 ;53(3):233-240).

- [0006] *Porphyromonas gingivalis* sécrète une enzyme appelée gingipaïne permettant à la bactérie de capter le fer contenu dans l'hème des tissus hôtes. Cette enzyme est également impliquée dans la dégradation des jonctions cellulaires de l'épithélium gingival, l'induction de l'inflammation, l'œdème des gencives, une tendance au saignement et une destruction des fibres de collagène de type I et III du tissu conjonctif gingival.
- [0007] Le problème que l'invention se propose de résoudre est de fournir un nouvel ingrédient actif capable de cibler l'activité de l'enzyme gingipaïne, afin de limiter spécifiquement l'activité pathogène de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* tout en préservant le microbiome oral et de limiter les conséquences de la parodontite et de la gingivite.
- [0008] Les inventeurs ont en effet découvert qu'un extrait de fleurs de *Crocus sativus* avait un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de la gingipaïne et pouvait limiter efficacement le développement de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* associée à la parodontite et à la gingivite.
- [0009] *Le Crocus sativus* est une plante herbacée de la famille des Iridaceae surtout cultivée pour le pistil de ses fleurs appelé safran, utilisé dans l'alimentation comme épice ou pour ses propriétés antioxydante et antiinflammatoire, en particulier dans les affections buccales ou dentaires (Forouzanfar A. et al., Iran J Med Sci. 2016 May ;41).
- [0010] La plupart des extraits décrits dans l'art antérieur sont des extraits de pistils ou de fleurs entières, comprenant donc le pistil. Ces extraits présentent l'inconvénient de contenir une quantité élevée de composés tels que le safranal, substance classée irritante cutanée, irritante oculaire et sensibilisante cutanée selon le système harmonisé de classification mondiale (UN-GHS).
- [0011] Les documents de brevet CN11330420A, CN102657747A et CN109646535A décrivent des extraits obtenus à partir de fleurs dépourvues de pistils obtenus en utilisant de l'éthanol absolu ou des solvants hydro-éthanoliques.
- [0012] On citera encore le brevet FR2928835B1 qui décrit la préparation d'un extrait de pétales de *Crocus sativus* obtenu par une macération de plusieurs jours dans de l'éthanol à 70%. L'extrait obtenu contient environ 50% de polyphénols de type flavonoïdes dont une quantité importante de kaempférol, ce qui lui confère des propriétés dépigmentantes de la peau.
- [0013] Les solvants hydro-alcooliques à forte teneur en alcool tels qu'utilisés dans le document brevet FR2928835B1 sont également susceptibles d'extraire des composés allergéniques tels que le géraniol ou le linalol car ce sont des molécules ayant une forte affinité pour ce type de solvant.
- [0014] La présente invention décrit l'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique principalement aqueux. Ainsi, l'extraction de ces composés indésirables est réduite. Les in-

venteurs ont montré que l'extrait de l'invention ne contient aucune des 57 substances identifiées comme allergènes cosmétiques potentiels, par le Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs. De plus le rendement d'extraction de phytoconstitués polaires, tels que les protéines, les acides aminés ou les acides phénoliques est amélioré, comparativement à une extraction hydro-éthanolique.

[0015] Un autre problème que se propose donc de résoudre l'invention est de fournir un nouvel extrait aqueux de *Crocus sativus* préparé à partir des fleurs entières dépourvues de pistils et ne comprenant pas de molécules allergéniques, irritantes ou potentiellement toxiques, pour son utilisation dans les soins d'hygiène buccales ou la prévention et le traitement des pathologies buccales.

[0016] L'utilisation d'un solvant hydro-alcoolique principalement aqueux présente également l'avantage d'augmenter le rendement d'extraction de phytoconstitués d'intérêt tels que les sucres, les acides aminés, les protéines, les vitamines et les acides organiques, que l'on ne retrouve pas ou peu dans les extraits de l'art antérieur.

[0017] La matière première de l'invention, ne comprend que les fleurs de *Crocus sativus* dépourvues de pistils répondant à l'exigence de naturalité du marché de l'hygiène et des soins oraux-buccaux actuel tout en présentant une efficacité biologique remarquable.

Résumé de l'invention

[0018] Les inventeurs ont développé un nouvel extrait de *Crocus sativus* comprenant de 9 à 13 g/Kg de matière sèche, de 5,5 à 8,5 g/kg de sucres totaux, de 2,5 à 5,5 g/kg de protéines, de 0,35 à 0,55 g/Kg d'acides aminés, de 0,6 à 1,2 g/kg d'acides organiques, de 0,4 à 12 g/kg de constitués phénoliques totaux dont de 150 à 450 mg/kg de kaempférol sophoroside, de 5 à 30 mg/kg de kaempférol glucoside et de 10 à 40 mg/kg de quercétine diglucoside.

[0019] Dans un mode de réalisation particulier, l'extrait ci-dessus est obtenu par macération de fleurs dépourvues de pistils dans un solvant hydro-polyalcoolique majoritairement aqueux comprenant de 20 à 50 % d'alcool en poids par rapport au poids total de solvant, l'alcool pouvant être choisi parmi le propanediol, le propylène glycol, le butylène glycol et le pentanediol.

[0020] L'invention a pour deuxième objet une composition d'hygiène buccale ou thérapeutique comprenant, en tant qu'ingrédient actif, une quantité efficace de l'extrait de *Crocus sativus*, et un milieu physiologiquement acceptable.

[0021] L'invention a pour troisième objet l'utilisation non thérapeutique de la composition pour l'hygiène buccale.

[0022] L'invention a pour quatrième objet une composition comprenant un extrait de fleurs de *Crocus sativus* pour son utilisation thérapeutique dans la prévention ou le traitement des affections de la cavité buccale et notamment la gingivite et/ou la parodontite.

Brève description des dessins

- [0023] L'invention et les avantages qui en découlent seront mieux compris à la lecture de la description et des modes de réalisation non limitatifs qui suivent, illustrés au regard des figures annexées dans lesquelles :
- [0024] [Fig.1] Modulation de l'activité de la gingipaïne spécifique de l'arginine, par un extrait de *Crocus sativus* à 1%.
- [0025] [Fig.2] Modulation de l'activité de la gingipaïne spécifique de la lysine par un extrait de *Crocus sativus* à 1%
- [0026] [Fig.3] Test d'inhibition de l'hémolyse induite par la bactérie *Porphyromonas gingivalis* en présence d'un extrait de *Crocus sativus* à 1%.
- [0027] [Fig.4] Mesure de l'expression des marqueurs CD14+ et CD163 à la surface des macrophages de type 2, traités ou non avec l'extrait *Crocus sativus* à 1%.
- [0028] [Fig.5] Mesure de la fluorescence relative moyenne des marqueurs CD14 et CD163 à la surface des macrophages de type 2, traités ou non avec l'extrait *Crocus sativus* à 1%.

Description détaillée de l'invention

Définitions

- [0029] Tous les termes utilisés dans la présente description ont le sens le plus largement connus sauf mention contraire. Pour les besoins de l'invention les termes suivants sont définis comme suit :
- [0030] On entend par « cavité buccale » la zone délimitée par les dents, la langue, le palais dur et le palais mou et essentiellement revêtue d'une muqueuse. On distingue la muqueuse masticatoire (gencive et palais dur), la muqueuse de recouvrement (labiale, palatine, vestibulaire, du plancher de la bouche, et des faces latérales de la langue), tandis que la muqueuse des lèvres et celle de la face dorsale de la langue constituent les éléments composants la muqueuse spécialisée.
- [0031] On entend par « hygiène buccale » des soins préventifs ou de protection, non thérapeutiques, concernant la cavité buccale saine.
- [0032] On entend par « fleur de *Crocus sativus* », la fleur entière constituée par les pétales et les étamines mais dépourvue de pistils.
- [0033] On entend par « hydro-polyalcoolique » le mélange d'au moins un polyol et d'eau, ce dernier comprenant au moins deux radicaux alcool, plus précisément de 2 à 9 radicaux alcool et de 3 à 12 atomes de carbone.
- [0034] Par « acides organiques » on entend des dérivés du catabolisme des acides aminés, des acides gras et des sucres comprenant une fonction acide. Ce groupe comprend les acides carboxyliques α -hydroxylés (AHA) ou polyhydroxylés tels que les acides lactique, malique, citrique, les acides carboxyliques dérivés de sucres de fruits ou de

toutes autres parties de plantes tels que les acides uroniques, ou encore les diacides tels que l'acide succinique

- [0035] Par « composés phénoliques » ou « polyphénols » on entend les molécules d'origine végétale qui possèdent un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes ou leurs dérivés, les tannins et tous autres polyphénols.
- [0036] Par « flavonoïdes » on entend, les composés phénoliques partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones.
- [0037] Par « flavonoïdes glycosylés » on entend les flavonoïdes liés à un ou plusieurs sucres tels que le kaempférol sophoroside, le kaempférol glucoside et la quercétine diglucoside.
- [0038] Par « phytocomposés d'intérêt », on entend l'ensemble des molécules présentes dans l'extrait de fleur de *Crocus sativus* de l'invention et notamment, les sucres, les composés phénoliques, les protéines, les acides aminés, les vitamines et les acides organiques, potentiellement responsables des effets biologiques bénéfiques observés.
- [0039] Quand une gamme de valeur est décrite, les bornes de cette gamme doivent être comprises comme incluant explicitement toutes les valeurs intermédiaires de la gamme. Par exemple, une gamme de valeur comprise entre 1% et 10% doit être comprise comme incluant 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, et 10 %, ainsi que toutes les valeurs décimales entre 1 % et 10 %.
- [0040] Les valeurs numériques en pourcentage sont des pourcentages en poids, c'est-à-dire le poids d'un composé par rapport au poids total du mélange envisagé, sauf spécifié autrement.
- [0041] Les compositions décrites dans la présente demande peuvent « comprendre », « consister en » ou « consister essentiellement en », les composés essentiels ou les ingrédients optionnels.
- [0042] « Consister essentiellement en » signifie que la composition ou le composant peut inclure des ingrédients additionnels, si ces ingrédients additionnels ne modifient pas les caractéristiques de bases ou les nouvelles caractéristiques de la composition ou de l'utilisation décrite dans la présente demande.
- [0043] Un « milieu physiologiquement acceptable » désigne un véhicule adapté pour une mise en contact avec les muqueuses, sans toxicité, irritation, réponse allergique induite et similaire ou réaction d'intolérance, et proportionné à un rapport avantage/risque raisonnable.
- [0044] Par « application topique » on désigne le fait d'appliquer à la surface d'une muqueuse la composition comprenant l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* selon l'invention.
- [0045] On entend par « anti-hémolytique » un composé qui a la propriété d'empêcher la des-

truction des globules rouges induite par la bactérie *Porphyromonas gingivalis*.

[0046] On entend par « orientation de la réponse inflammatoire » : la stimulation d'une catégorie particulière de la population de macrophages dans le but d'obtenir une réponse de type anti inflammatoire ou pro inflammatoire.

[0047] Par « quantité efficace » on désigne la quantité minimum d'extrait selon l'invention nécessaire pour obtenir au moins une des activités biologiques recherchées, notamment diminuer l'activité enzymatique des gingipaïnes, diminuer l'hémolyse, présenter une activité anti-inflammatoire ou tout autre marqueur biologique étudié, sans que cette quantité ne soit toxique.

[0048] Il est bien entendu que l'invention concerne les mammifères et plus particulièrement l'être humain.

Procédé d'extraction des fleurs de *Crocus sativus*

[0049] L'invention a pour premier objet un extrait de fleurs de l'espèce *Crocus sativus*, obtenu par le procédé suivant :

[0050] A l'étape a), les fleurs fraîches ou sèches dépourvues de pistils, sont mises en présence d'un solvant hydro-polyalcoolique majoritairement aqueux comprenant de 20 à 50 % d'alcool en poids par rapport au poids total du solvant.

[0051] Au sens de l'invention, le solvant hydro-polyalcoolique est donc un mélange compris entre 20 et 50 % (p/p) de polyalcool dans l'eau.

[0052] Les fleurs de *Crocus sativus* utilisées sont dépourvues de pistils, c'est-à-dire qu'on leur a retiré manuellement les trois stigmates rouges du pistil qui constitue le safran.

[0053] On utilise de préférence des fleurs de *Crocus sativus* séchées.

[0054] De préférence, les fleurs sont broyées avant la mise en présence du solvant hydro-polyalcoolique, afin d'optimiser les échanges entre la solution extractives et la matière végétale.

[0055] De préférence, le rapport matière végétale / solution d'extraction est de préférence compris entre 0,5 à 20 % en poids/poids, plus préférentiellement compris entre 2 et 10 % et encore plus préférentiellement ce ratio est de 2,5 %.

[0056] Les solvants hydro-polyalcooliques utilisés possèdent un paramètre de solubilité ainsi qu'une viscosité dynamique trois fois plus élevée que les solvants mono-alcooliques. L'extraction de molécules plus complexes de type protéines, polysaccharides et polyphénols est donc favorisée en comparaison avec un solvant mono-alcoolique tout en permettant d'entraîner également dans le processus d'extraction de petites molécules tels que sucres et acides organiques.

[0057] En comparaison d'une extraction réalisée dans de l'eau pure, le rendement d'extraction selon le procédé de l'invention est amélioré et se situe à environ 40%, ce qui est un rendement difficilement atteignable par des techniques d'extraction par macération.

- [0058] Dans un mode de réalisation avantageux le polyalcool est choisi parmi le propanediol, le propylène glycol, le butylène glycol ou le pentanediol, ou tout mélange de ces solvants.
- [0059] Dans un mode de réalisation préféré, le solvant hydro-polyalcoolique est le propanediol ou le butylène glycol à un ratio de 25 % à 35 % d'alcool.
- [0060] Dans un autre mode de réalisation préféré le solvant hydro-polyalcoolique comprend de préférence 30% d'alcool.
- [0061] Dans un autre mode de réalisation préféré, le solvant hydro-polyalcoolique est le propanediol à un ratio de 30%.
- [0062] La présence de propanediol dans le solvant d'extraction présente également l'avantage de stabiliser les phytoconstitués de l'extrait final tout au long de l'extraction et contribue à protéger l'extrait des contaminations par les microorganismes.
- [0063] A l'étape b), le mélange est mis sous agitation douce pendant 30 minutes à deux heures à une température comprise entre la température ambiante et 80°C.
- [0064] Avantageusement, l'agitation modérée est de type brassage.
- [0065] La température est ajustée et maintenue de préférence entre 20 et 60°C, plus préférentiellement entre 30 et 50°C, encore plus préférentiellement à 45°C.
- [0066] Avantageusement, le temps de macération est compris entre 30 minutes et 1,5 heures et encore plus préférentiellement le temps de macération est de 1 heure.
- [0067] A la fin de l'étape b) le pH est contrôlé et doit se situer entre 4,0 et 7,0.
- [0068] A l'étape c), le mélange obtenu en b) est purifié pour éliminer la matière solide végétale et récupérer la partie liquide.
- [0069] Cette étape de purification peut être effectuée par toute méthode connue de l'homme du métier, mais de préférence la purification est effectuée par centrifugation et en particulier par centrifugation à 4000g pendant 10 min.
- [0070] A l'étape d), on réalise une clarification de l'extrait obtenu à l'étape précédente par au moins six étapes de filtrations séquentielles en utilisant des filtres de porosités décroissantes allant de 30 à 0,2µm.
- [0071] A l'étape e), une filtration stérilisante est réalisée sur un filtre de porosité 0,22µm stérile.
- [0072] Le pH est mesuré mais il n'est pas ajusté et doit se trouver entre 4,5 et 6,5.

Extrait de fleurs de *Crocus sativus*

- [0073] L'extrait obtenu par le procédé décrit ci-dessus est analysé et présente les caractéristiques suivantes, il a une couleur ambrée à ambrée foncée, l'extrait a une consistance légèrement visqueuse et d'aspect légèrement opalescent à opalescent. La densité est de 1.01 à 1.04 g/cm³, le pH se situe entre 4,5 et 6,5. Cet extrait contient de 9 à 13 g/Kg de matière sèche, et comprend de 5,5 à 8,5 g/kg de sucres totaux, de 2,5 à 5,5 g/kg de protéines, de 0,35 à 0,55 g/Kg d'acides aminés, de 0,6 à 1,2 g/kg des acides or-

ganiques, de 0,4 à 1,2g/kg de composés phénoliques totaux dont de 150 à 450 mg/kg de kaempférol sophoroside, de 5 à 30 mg/kg de kaempférol glucoside et de 10 à 40 mg/kg de quercétine diglucoside.

- [0074] L'extrait obtenu comprend donc de 0,17 g/kg à 0,55 g/kg de polyphénols de type flavonoïdes.
- [0075] L'extrait obtenu comprend également de 1,2 à 3,4 mg/kg de vitamines B dont 0,5 à 1,5 mg/kg de vitamine B5.
- [0076] L'extrait ainsi obtenu peut optionnellement être dilué dans un solvant physiologiquement acceptable pour un usage thérapeutique. A titre d'exemples illustratifs et non limitatifs de solvants physiologiquement acceptables, on peut citer l'eau, le glycérol, l'éthanol, le propanediol ainsi que sa version naturelle issue du maïs, le butylène glycol, le dipropylène glycol, les diglycols éthoxylés ou propoxylés, les polyols cycliques ou tout mélange de ces solvants. L'ajout de conservateurs peut également être envisagé pour garantir la conservation optimale de l'extrait dans le temps. De la glycérine associée à tous types de conservateurs hydrosolubles tels que du sodium benzoate ou du potassium sorbate à la concentration finale de 0,5 % ou encore du phénoxyéthanol à la concentration finale de 1,5 %.
- [0077] Un des avantages d'une telle dilution, outre d'obtenir exactement les concentrations en phytoconstitués recherchés, est d'améliorer la stabilité et la conservation de l'extrait végétal ou tout mélange de ces solvants.
- [0078] **Compositions comprenant un extrait de fleurs de *Crocus sativus***
- [0079] Un deuxième aspect de l'invention est une composition d'hygiène buccale ou thérapeutique comprenant, en tant qu'ingrédient actif, une quantité efficace de l'extrait de fleurs *Crocus sativus*, et un milieu physiologiquement acceptable.
- [0080] Dans un mode de réalisation avantageux, la quantité efficace de l'extrait de fleurs *Crocus sativus* de l'invention correspond à une concentration comprise entre 0,5 % et 10 %, de préférence à une concentration comprise entre 0,8 % et 2 %, et encore plus préférentiellement à une concentration de 1%.
- [0081] La composition utilisable selon l'invention pourra être appliquée par toute voie appropriée, notamment orale, ou topique externe, et la formulation des compositions sera adaptée par l'homme du métier.
- [0082] Préférentiellement, les compositions selon l'invention se présentent sous une forme adaptée à l'application par voie topique pouvant être sous forme plus ou moins fluide que ce soit un bain de bouche ou un gel. Ces compositions doivent donc contenir un milieu physiologiquement acceptable avec un pH adapté, c'est-à-dire compatible avec la muqueuse orale, la peau et les phanères, sans risque d'inconfort lors de leur application et couvrent toutes les formes cosmétiques adaptées.
- [0083] A titre de milieu physiologiquement acceptable communément utilisé dans le

domaine d'application envisagé, on peut citer par exemple des adjuvants nécessaires à la formulation, tels que des solvants, des épaississants, des diluants, des antioxydants, des conservateurs, des parfums, des absorbeurs d'odeur, etc.

- [0084] Dans tous les cas, l'homme de métier veillera à ce que ces adjuvants ainsi que leurs proportions soient choisis de telle manière à ne pas nuire aux propriétés avantageuses recherchées de la composition selon l'invention. Ces adjuvants peuvent, par exemple, correspondre à 0,1 à 25 % du poids total de la composition. Lorsque la composition selon l'invention est un gel, l'agent épaississant peut représenter de 10 à 25 % en poids et de préférence de 20 à 25 % en poids par rapport au poids total de la composition.
- [0085] **Utilisations des compositions comprenant un extrait de fleurs de *Crocus sativus***
- [0086] L'invention a pour troisième objet l'utilisation non thérapeutique de la composition pour l'hygiène buccale.
- [0087] Ce mode de réalisation particulier de l'invention, concerne un sujet ayant des muqueuses buccales saines et souhaitant appliquer des soins pour prévenir l'apparition de pathologies de type parodontite ou gingivite ou protéger leur cavité buccale et notamment les gencives.
- [0088] Ce mode de réalisation particulier de l'invention, concerne un sujet ayant des muqueuses buccales saines et souhaitant y appliquer des soins pour prévenir l'apparition de pathologies de type parodontite ou gingivite ou protéger sa cavité buccale et notamment ses gencives.
- [0089] Un quatrième aspect de l'invention est une composition comprenant l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention pour son utilisation thérapeutique pour la prévention ou le traitement des affections de la cavité buccale.
- [0090] Dans ce mode de réalisation de l'invention l'application est de préférence une application par voie topique.
- [0091] Dans un mode de réalisation particulier, les affections de la cavité buccale concernées sont les saignements, l'inflammation, la récession gingivale, le déchaussement dentaire ou la perte de substance conjonctivale associés aux parodontites et aux gingivites.
- [0092] La présente invention a pour objet de fournir un nouvel ingrédient actif capable de cibler l'activité de l'enzyme gingipaïne, afin de limiter spécifiquement l'activité de la bactérie *Porphyromonas gingivalis* tout en préservant le microbiome oral.
- [0093] Dans un mode de réalisation particulier, les affections de la cavité buccale concernées sont les parodontites et/ou les gingivites, lorsque ces pathologies sont provoquées par la bactérie *Porphyromonas gingivalis*.
- [0094] La spécificité du potentiel antibactérien d'une composition comprenant l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention, jusqu'à une concentration de 10% (v/v), a été testée en utilisant les bactéries commensales *Streptococcus mutans* et *Streptococcus*

gordoni. Aucune inhibition de croissance de ces deux souches bactériennes n'a été observée.

- [0095] La spécificité de l'inhibition de l'activité gingipaine a été évaluée en mesurant l'activité collagénase de la gingipaine en présence de l'extrait de *Crocus sativus* de l'invention à 1%. Aucune réduction d'activité collagénase n'a été observée.
- [0096] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a été testé sur certains marqueurs biologiques associés à la virulence de la bactérie *Porphyromonas gingivalis*, aux mécanismes de lyse cellulaire ainsi qu'à la réponse inflammatoire.
- [0097] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a démontré son efficacité dans l'inhibition de l'activité des gingipaines sécrétées par *Porphyromonas gingivalis* et plus particulièrement les gingipaines spécifiques de l'arginine.
- [0098] L'invention a ainsi encore pour objet une composition comprenant un extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention pour son utilisation thérapeutique dans laquelle les enzymes gingipaines et plus particulièrement les enzymes gingipaines spécifiques de l'arginine sont inhibées.
- [0099] L'inhibition de l'activité des enzymes gingipaines sur le tissu gingival permet de limiter la destruction de l'épithélium gingival et de la matrice conjonctivale.
- [0100] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a également démontré son efficacité sur la prévention de la lyse des globules rouges.
- [0101] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a également démontré son efficacité sur l'orientation et l'augmentation de la réponse anti-inflammatoire.
- [0102] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a également une action anti-saignement, démontrée par une activité anti hémolytique sur des hématies humaines.
- [0103] L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'invention a permis une augmentation du recrutement des macrophages impliqués dans la réponse anti inflammatoire, et en particulier les macrophages de type M2.

Exemples

- [0104] A titre illustratif, des exemples de mode de réalisation du procédé selon l'invention sont décrits ci-dessous.

[0105] **Exemple 1 : Préparation d'un extrait de fleurs de *Crocus sativus***

Procédé d'extraction

- [0106] Dans une première étape a), 25g de fleurs *Crocus sativus* dépourvues de pistils et séchées sont broyées puis mélangées à 975 g d'un mélange d'eau distillée et propanediol à un ratio de 70/30%, soit 2,5 % de matière première engagée dans le procédé et 97,5 % du mélange eau/propanediol pour un poids total de 1 kg.
- [0107] b) Le mélange est mis sous agitation douce pendant une heure à une température de 45°C afin que le processus de macération se déroule.

- [0108] c) Le mélange obtenu en b) est ensuite purifié par centrifugation à 4000g pendant 10 min, de manière à sédimenter la matière végétale résiduelle dans le culot et récolter le surnageant.
- [0109] d) On réalise une clarification du surnageant obtenu à l'étape précédente par des étapes de filtrations séquentielles au moins six filtrations de porosité décroissante allant de 30 à 0.2 μ m.
- [0110] e) Une dernière étape de filtration stérilisante est réalisée à 0,22 μ m.
- [0111] f) Le pH est mesuré mais ne doit pas être ajusté.
- [0112] L'extrait de fleur de *Crocus sativus* ainsi obtenu est caractérisé par une couleur ambrée à ambrée foncée, présentant une consistance légèrement visqueuse et opalescente pour une densité de 1.03 g/cm³ dont le pH est à 5,7 Cet extrait a été analysé par des méthodes standards et contient une quantité de matière sèche de 12 g/Kg, un taux de sucre à 8,7g/kg, des acides aminés à 0,55 g/kg, des composés phénoliques de 0,85 g/kg et des protéines de 4,5 g/kg.
- [0113] **Caractérisation de l'extrait de fleurs de *Crocus sativus***
- [0114] Les analyses ont été réalisées sur plusieurs extraits afin d'établir une gamme de concentration pour chaque molécule analysée.
- Méthodes utilisées :**
- [0115] La composition globale de l'extrait est présentée dans le tableau 1.
- [0116] Le poids sec de l'extrait a été mesuré après évaporation (12h d'étuvage à 105°C).
- [0117] La teneur totale en sucres a été mesurée par la méthode suivante : dissolution de l'extrait dans l'acide sulfurique concentré puis réaction avec du phénol pour former un complexe coloré. L'absorbance du complexe est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm. La teneur en sucre est déterminée à l'aide d'une courbe standard de glucose.
- [0118] La teneur en acides aminés libres de l'extrait a été évaluée par la méthode suivante : rupture des fonctions amine et carboxylique par le réactif ninhydrine. L'absorbance du complexe coloré est mesurée par spectrophotométrie à 570 nm. La quantification est déterminée en utilisant une courbe standard réalisée à partir d'un pool d'acides aminés
- [0119] La teneur totale en composés phénoliques a été évaluée par la méthode suivante : réduction de l'extrait par le réactif de Folin-Ciocalteu et mesure spectrophotométrique à 760 nm. La quantification des molécules phénoliques est effectuée à l'aide d'une courbe standard d'acide gallique.
- [0120] La teneur en protéines a été évaluée par la méthode suivante : réaction colorimétrique par le réactif de Biuret combiné au réactif de Folin et Ciocalteu et mesure spectrophotométrique à 550nm. La quantification est effectuée à l'aide d'une courbe standard de BSA (Bovine Sérum Albumine).

[0121] [Tableaux1]

	Extrait de fleurs de <i>Crocus sativus</i>
Poids sec (g/kg)	9 - 13
Sucres totaux (g/kg)	5,5 - 8,5
Acide aminés libres (mg/kg)	350 - 550
Composés phénoliques totaux (g/kg)	0,4 - 1,2
Proteines (g/kg)	2,5 - 5,5
Vitamines (mg/kg)	1,2-3,4

[0122] L'identification et la quantification détaillée des sucres présents a été effectuée par analyse chromatographique liquide haute performance (HPLC), couplée à un spectromètre de masse ACQUITY Qda (WATERS) équipé d'une sonde electrospray en mode négatif. Les échantillons ont été séparés sur une colonne Luna Omega SUGAR 100A 3µm (150x4,6 mm) (Phenomenex: H21-180323) par un système HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies). Le débit était de 0,8 ml / min. Les phases mobiles consistaient en une solution aqueuse 20 mmol d'acétate d'ammonium et 95/5 (ACN/H2O) 20 mmol acétate d'ammonium.

[0123] [Tableaux2]

	Xylitol (mg/Kg)	Fructose (mg/Kg)	Glucose (mg/Kg)
Extrait de fleurs de <i>Crocus sativus</i>	<LD-20	180-540	2800-4800

[0124] L'identification et la quantification détaillée des acides aminés présents dans l'extrait a été effectuée par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV fixé à la longueur d'onde 254nm. Les échantillons sont séparés sur une colonne Uptisphere Strategy C18-2 5µm (250 x4.6 mm) US5C182-250/046 (Interchim: UE2.6AQ-100/046). Le débit était de 1mL/min. Les phases mobiles consistaient en une solution d'acide phosphorique (H3PO4) à 0,1 % et d'acétonitrile. Les échantillons et standards sont dérivés avec du phenylisothiocyanate.

[0125] [Tableaux3]

	Histidine (ppm)	Arginine (ppm)	Serine (ppm)	Glycine (ppm)	Acide glutamique (ppm)	Thréonine (ppm)	Proline (ppm)	Alanine (ppm)	Valine (ppm)
Extrait	25-75	5-20	<LD-100	<LD-40	20-60	10-40	70-190	15-45	10-30

[0126] La teneur en flavonoïdes glycosylés a été déterminée par chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV fixé à 254 nm. Les échantillons sont séparés sur une colonne Uptisphere CS evolution 100 mm x 4.6 mm x 2.6 µm (Interchim, UE2-6AQ-100046) par un système Agilent 1200 (Agilent technologies). Le débit était de 0.8mL/min. Les phases mobiles consistaient en une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1 % et de méthanol.

[0127] [Tableaux4]

	Kaempferol sophoroside (mg/kg)	Kaempferol glucoside (mg/kg)	Quercetine diglucoside (mg/kg)
Extrait	150 - 450	5 - 30	10 - 40

[0128] La caractérisation et la quantification des acides organiques a été effectuée par analyse chromatographique liquide haute performance, couplée à un spectromètre de masse ACQUITY Qda (WATERS) équipé une source d'ions électrospray en mode négatif. Les échantillons ont été séparés sur une colonne EC 150 / 4,6 Nucleoshell RP 18plus-5µm (150x4,6 mm) (Macherey Nagel : 763236.46) par un système HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies). Le débit était de 0,3 ml / min. Les phases mobiles consistaient en une solution d'acide formique (HCOOH) à 0,01 % et d'acétonitrile.

[0129] [Tableaux5]

	Acide citrique (mg/Kg)	Acide lactique (mg/kg)	Acide succinique (mg/kg)	Acide malique (mg/kg)	Acide uronique (mg/kg)
Extrait	20-80	<LD-10	30-90	200-600	50-150

[0130] La caractérisation et la quantification des vitamines a été effectuée par analyse chromatographique liquide haute performance, couplée à un spectromètre de masse ACQUITY Qda (WATERS) équipé d'une source d'ions électrospray en mode positif. Les échantillons ont été séparés sur une colonne EC 150 / 4,6 Nucleoshell RP

18plus-5µm (150x4,6 mm) (Macherey Nagel : 763236.46) par un système HPLC Agilent 1260 (Agilent Technologies). Le débit était de 0,5 ml / min. Les phases mobiles consistaient en une solution aqueuse 20 mmol d'acétate d'ammonium, 0.1% acide formique et une solution 65/35 méthanol/acétonitrile à 20 mmol d'acétate d'ammonium, 0.1% acide formique.

[0131] [Tableaux6]

	B2-Riboflavine (mg/kg)	B3-a-Nicotinamide (mg/kg)	B3-b-Acide nicotinique (mg/kg)	B5-Acide pantothenique (mg/kg)
Extrait	0,06-0,18	0,3-0,9	0,2-0,6	0,5-1,5

[0132] **Exemple 2 : Evaluation de l'extraits de fleurs de sativus de l'exemple 1 sur l'activité des enzymes gingipaines KgP et RgP.**

[0133] **Principe :** Les enzymes gingipaines font partie des facteurs de virulence de la bactérie *Porphyromonas gingivalis*. Les gingipaines ont la capacité de digérer un large spectre de protéines de l'hôte. Il existe des enzymes gingipaine spécifiques de la lysine (KgP) ou spécifiques de l'arginine (RgP).

[0134] **Protocole :** La bactérie *Porphyromonas gingivalis* est cultivée dans un bouillon Shaedler supplémenté en vitamine K pendant quarante-huit heures. Le bouillon contenant les bactéries est ensuite centrifugé à 10000 x g, 5 minutes à 4°C et le culot de bactéries est rincé deux fois avec du PBS 1X. Les bactéries sont ensuite reprises dans du PBS 1X de manière à obtenir un aliquote de densité optique (DO) égale à 1 et un aliquote de DO = 2. Les aliquotes de DO=1 et DO=2 sont incubés à 37°C pendant 1h puis centrifugés à 10000 x g, 10 minutes à température ambiante. Le surnageant est mis en présence d'un substrat chromogénique spécifique de l'activité des gingipaines RgP ou KgP (respectivement le benzoyl-arginine-p-nitroanilide (TGPPNA) ou le benzoyl-lysine-p-nitroanilide (BAPNA). L'hydrolyse de la liaison arginine ou lysine, libère le chromophore p-nitroaniline qui peut être quantifié par colorimétrie.

[0135] Les mesures sont réalisées en présence ou absence de l'extraits de fleurs de *Crocus sativus* de l'exemple 1 à 1% final dans l'eau (volume/volume) ou en présence d'un inhibiteur de référence ; l'iodoacétamide à 10 mM.

La libération du chromophore p-nitroaniline est quantifié toutes les 15 minutes pendant 2 heures par spectrophotométrie à 405 nm. L'activité de la gingipaine est calculée en pourcentage de la DO maximale obtenue pour le contrôle (CTR) RgP ou le contrôle (CTR) KgP à 2h.

[0136] **Résultats :** En présence de l'extraits de fleurs de *Crocus sativus* de l'exemple 1 à 1%, on observe une baisse de l'activité enzymatique allant jusqu'à 85,5% par rapport au CTR RgP pour le temps 2h comme illustré à la [Fig.1]. En revanche, il n'y a aucune

baisse d'activité par rapport au CTR KgP en présence de l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* à 1% ([Fig.2]).

[0137] **Conclusion** : L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* à 1% a un effet inhibiteur des gingipainés spécifiques de l'arginine et n'a pas d'effet sur les gingipainés spécifiques de la lysine. En inhibant l'activité des gingipainés les bactéries *Porphyromonas gingivalis* n'ont plus l'outil qui leur permet de lyser les jonctions cellulaires mais aussi de détériorer les protéines de la matrice extracellulaire. Les gingipainés étant l'un des facteurs de virulence les plus importants de *P.gingivalis*, leurs inhibitions ont pour effet de limiter le développement de ces bactéries et ainsi prévenir l'apparition des gingivites et des parodontites.

[0138] **Exemple 3 : Evaluation de l'extrait de fleurs de sativus de l'exemple 1 de l'activité anti hémolytique sur des globules rouges humain.**

[0139] **Principe** : Certains agents pathogènes sécrètent des enzymes qui possèdent une capacité à lyser la membrane des globules rouges (hématies) et provoquer ainsi une libération de l'hémoglobine dans le milieu : c'est l'activité hémolytique.

[0140] **Protocole** : Du sang frais humain conservé à température ambiante est centrifugé à 1500 x g pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et les hématies contenues dans le culot sont reprises avec 50 ml d'une solution de PBS – 0.05% BSA. Le milieu est agité par retournement. L'opération est répétée 3 fois afin de bien laver les cellules pour éliminer l'hémoglobine extracellulaire. Après le dernier rinçage, le maximum de surnageant est éliminé puis le culot est repris avec la solution de PBS-0.05%BSA afin d'avoir une solution d'hématies à 1%. La bactérie *Porphyromonas Gingivalis* est cultivée dans un bouillon Shaedler supplémenté en vitamine K pendant 24 à 48 heures, en présence ou en absence de l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* à 1% de l'exemple 1. Les bouillons contenant les bactéries sont ensuite centrifugés à 10000 x g, 5 minutes à 4°C. Les bactéries sont reprises dans du PBS 1X de manière à obtenir un aliquote ayant une DO comprise entre 0.5 et 1.0 UDO. Dans un puits d'une plaque 96 puits, 100 µL de suspension bactérienne sont mis en contact avec 100 µL de solution d'hématies à 1% et 50 µL d'extrait de *Crocus sativus* à la concentration testée (1% dans PBS volume/volume) ou 50µL de PBS pour les conditions contrôle. Ce mélange est ensuite placé sous agitation à 37°C pendant 24h, suivi d'une centrifugation à 1500 x g. L'absorbance du surnageant est lue avec un lecteur de microplaque à une longueur d'onde de 410 nm. Les échantillons sont déposés en cinq répliquats par essai, avec deux essais indépendants (essai 1 et essai 2).

[0141] **Résultat** : L'application de l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'exemple 1 à 1% induit une baisse de l'hémolyse comprise entre 48 et 78% par rapport au contrôle négatif après une incubation de 24 heures. Lorsque les bactéries *P.gingivalis* sont pré-incubées avec l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* à 1% pendant 24 heures, la baisse de

l'hémolyse est comprise entre 88 et 99%. Les résultats sont illustrés par la [Fig.3].

[0142] L'hémolyse des globules rouges libère de l'hémoglobine riche en groupements hème dont la bactérie *P.gingivalis* a besoin pour se développer. L'inhibition de l'hémolyse induit la privation de *P.gingivalis* en hème, ce qui a pour conséquence de freiner le développement de cette bactérie et de prévenir les saignements des gencives observés lors de gingivites et parodontite.

[0143] **Exemple 4 Evaluation de l'extrait de fleurs de sativus de l'exemple 1 de l'orientation de la réponse inflammatoire impliquant des macrophages dérivés de cellules PBMC**

[0144] **Principe :** le but de cette expérience est de tester un actif pour déterminer si cet extrait possède un potentiel d'orientation de la réponse immunitaire. Par orientation on entend la capacité de l'extrait à favoriser une réponse pro inflammatoire (impliquant les macrophages de type M1) ou une réponse anti inflammatoire (impliquant les macrophages de type M2). Cette orientation est mesurée par l'analyse de cluster présent à la surface des cellules macrophages spécifique de la réponse inflammatoire à l'aide d'un cytomètre de flux. Une population de macrophages comprenant peu de cluster CD14 et CD163 étant spécifique d'une réponse de type M1 et à l'inverse une population riche en CD14 et CD163 étant spécifique d'une réponse de type M2.

[0145] **Protocole :** A partir de sang frais, des cellules spécialisées PBMC (cellules mononucléaires périphériques du sang) sont isolées par centrifugation sur gradient de Ficoll. Après centrifugation, les cellules PBMC sont récupérées par aspiration d'un anneau cellulaire présent entre les différentes phases. Les cellules CD14 sont isolées par sélection positive sur billes magnétiques marquées CD14. Après isolement, les cellules sont rincées par une solution de PBS/BSA/EDTA froid répété plusieurs fois. Les cellules ainsi obtenues sontensemencées dans des boîtes de cultures ou des flacons de culture contenant un milieu spécifique d'accrochage. Après 2 à 3 heures d'incubation, le milieu est aspiré et remplacé par un milieu de culture favorisant la prolifération et la différenciation des cellules PBMC en cellules macrophages de type M1 et M2. La différenciation spécifique des cellules en type macrophages M1 se fait grâce à l'apport de GM-CSF dans le milieu et en type macrophage M2 avec du MCSF pendant 24h. L'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'exemple 1 ou le contrôle PBS à une concentration finale de 1% (volume/volume) est ajouté 24h avant le début de la différenciation terminale des cellules. Les cellules sont ensuite détachées de leur support après l'action de trypsine pour analyse par cytométrie de flux.

[0146] **Résultats :** l'application de l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'exemple 1 à 1% dans le milieu de culture des macrophages pendant 24h a induit une augmentation de la réponse anti inflammatoire de type M2 se traduisant par une augmentation du nombre de cellules présentant le cluster CD14 à sa surface (passant de 69,3% à 95,9% de la po-

pulation totale soit une augmentation de 37.6%), tel qu'illustré dans la [Fig.4] ainsi qu'une augmentation du MFI (passant de 115,3 à 489,1 soit une augmentation de 324,2%) tel qu'illustré dans la [Fig.5]. De plus le cluster CD163, spécialisé de la réponse anti inflammatoire, est aussi augmenté (passant de 81,1% à 92.9% soit une augmentation de 14.7%) ainsi que son MFI (passant de 129,9% à 303.3% soit une augmentation de 134.2%).

[0147] Les résultats ci-dessus indiquent que l'extrait de fleurs de *Crocus sativus* à 1% permet une régulation de la réponse immunitaire favorisant ainsi la réponse anti inflammatoire.

[0148] **Exemple 5 Formulation d'un bain de bouche contenant l'extrait de fleurs de *Crocus sativus***

[0149] [Tableaux7]

Ingredients	% (v/v)
Extrait de fleurs de <i>Crocus sativus</i> de l'exemple 1	1.0
Sorbitol 70%	10
Glycérine	10
Propylene glycol	5.0
Xylitol	2.0
Erythritol	1.0
Sodium cocamidopropyl betaine	0.30
Arome naturel de menthe poivrée	0.1
Benzyl alcool	0.50
Cetone de Framboise	0.50
eau	q.s.p 100 ml

[0150] **Exemple 6 Formulation d'un gel contenant l'extrait de fleurs de *Crocus sativus***

[0151] [Tableaux8]

Ingredients	% (v/v)
Extrait de fleurs de <i>Crocus sativus</i> de l'exemple 1	1.0
NatraThix™ Bio cellulose	1.2
Glycérine	25
Sorbitol solution (70%)	20
Propylene glycol	5.0
Xylitol	2.0
Erythritol	1.0
Menthol	0.40
Benzyl alcool	0.50
Cetone de framboise	0.50
Eau	q.s.p 100

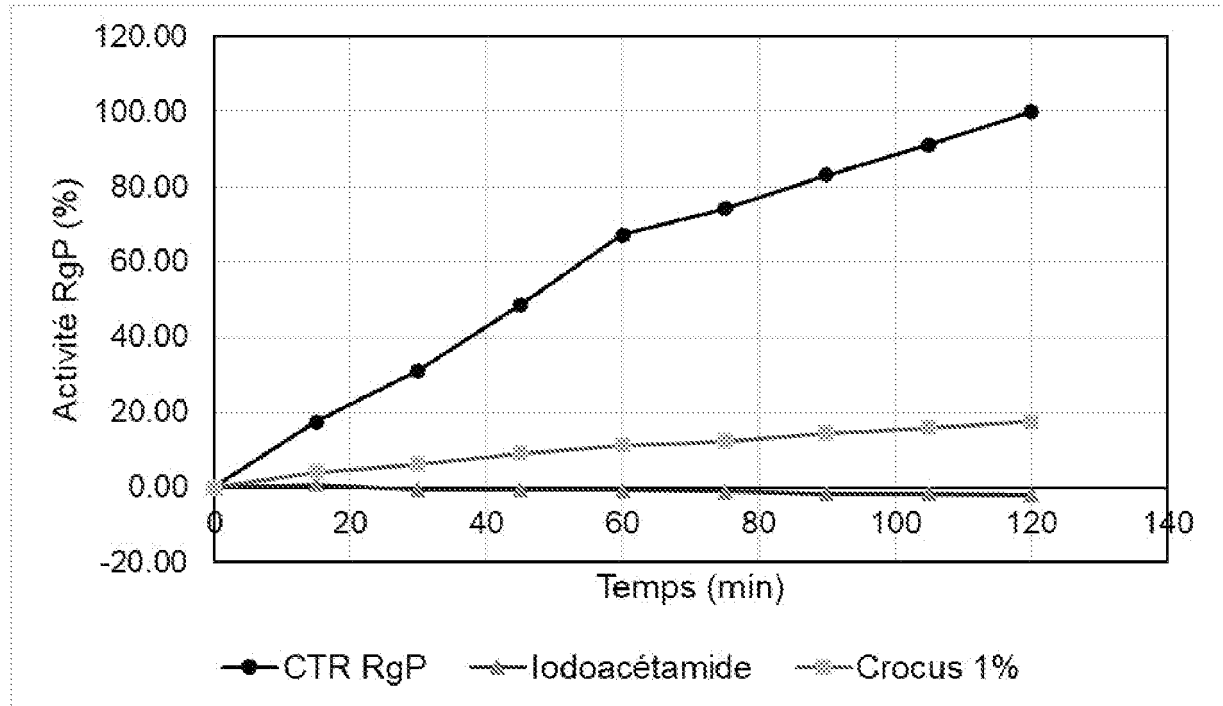
Revendications

- [Revendication 1] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* comprenant de 9 à 13 g/Kg de matière sèche, de 5,5 à 8,5 g/kg de sucres totaux, de 2,5 à 5,5 g/kg de protéines, de 0,35 à 0,55 g/Kg d'acides aminés, de 0,6 à 1,2 g/kg d'acides organiques, de 0,4 à 12 g/kg de composés phénoliques totaux dont de 150 à 450 mg/kg de kaempférol sophoroside, de 5 à 30 mg/kg de kaempférol glucoside et de 10 à 40 mg/kg de quercétine diglucoside.
- [Revendication 2] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* de la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est obtenu par le procédé comprenant les étapes suivantes :
- a) Les fleurs fraîches ou sèches dépourvues de pistils, sont mises en présence d'un solvant hydro-polyalcoolique majoritairement aqueux comprenant de 20 à 50 % d'alcool en poids par rapport au poids total du solvant,
 - b) Le mélange est mis sous agitation douce pendant 30 minutes à deux heures à une température comprise entre la température ambiante et 80°C,
 - c) le mélange obtenu en b) est purifié pour éliminer la matière solide végétale et récupérer la partie liquide,
 - d) l'extrait obtenu à l'étape précédente est clarifié par au moins six étapes de filtrations séquentielles en utilisant des filtres de porosités décroissantes allant de 30 à 0,2µm,
 - e) une filtration stérilisante est réalisée en utilisant un filtre de porosité de 0,22µm.
- [Revendication 3] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'à l'étape a) les fleurs sont séchées et broyées.
- [Revendication 4] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le solvant hydro-polyalcoolique est le propanediol ou le butylène glycol à un ratio compris entre 25 % et 35 %.
- [Revendication 5] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'à l'étape a), le solvant hydro-polyalcoolique est le propanediol à un ratio de 30 %.
- [Revendication 6] Extrait de fleurs de *Crocus sativus* de l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'à l'étape b), le mélange est mis sous agitation douce pendant 30 minutes à une heure trente à une température comprise entre 30°C et 50°C
- [Revendication 7] Composition d'hygiène buccale ou thérapeutique comprenant, en tant

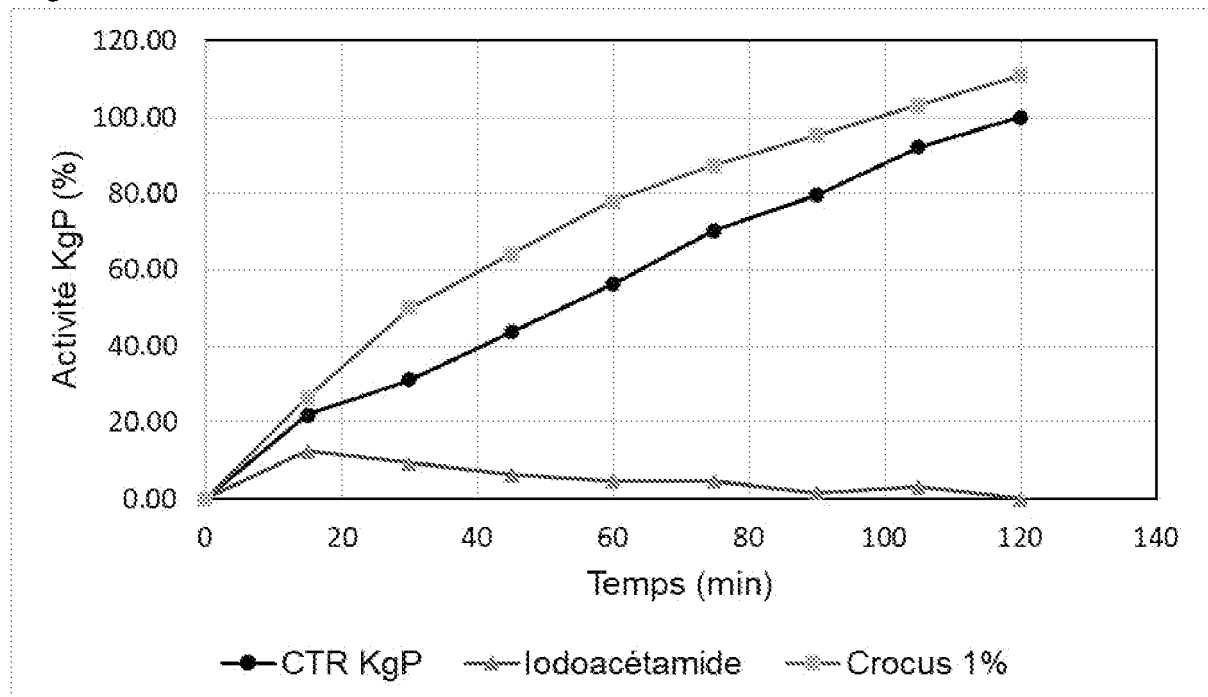
qu'ingrédient actif, une quantité efficace de l'extraits de fleurs de *Crocus sativus* de l'une des revendications 1 à 6, et un milieu physiologiquement acceptable

- [Revendication 8] Composition selon la revendication 7, dans laquelle la quantité efficace d'extrait de fleurs *Crocus sativus* correspond est à une concentration comprise entre 0,5 % et 10 %, de préférence à une concentration comprise entre 0,8 % et 2 % et encore plus préférentiellement à une concentration de 1%.
- [Revendication 9] Composition selon la revendication 7, pour son utilisation pour l'hygiène buccale.
- [Revendication 10] Composition selon la revendication 7, pour son utilisation thérapeutique dans la prévention et le traitement des affections de la cavité buccale.
- [Revendication 11] Composition pour son utilisation thérapeutique selon la revendication 10, dans laquelle les affections de la cavité buccale sont les saignements, l'inflammation, la récession gingivale, le déchaussement dentaire ou la perte de substance conjonctivale associés aux parodontites et aux gingivites.
- [Revendication 12] Composition pour son utilisation thérapeutique selon la revendication 10, dans laquelle les affections de la cavité buccale sont provoquées par la bactérie *Porphyromonas gingivalis*.
- [Revendication 13] Composition pour son utilisation thérapeutique selon la revendication 12, dans laquelle l'activité des enzymes gingipaines sécrétées par la bactérie *Porphyromonas gingivalis* est inhibée.
- [Revendication 14] Composition pour son utilisation thérapeutique selon la revendication 13, dans laquelle les enzymes gingipaines sont les gingipaines spécifiques de l'arginine.

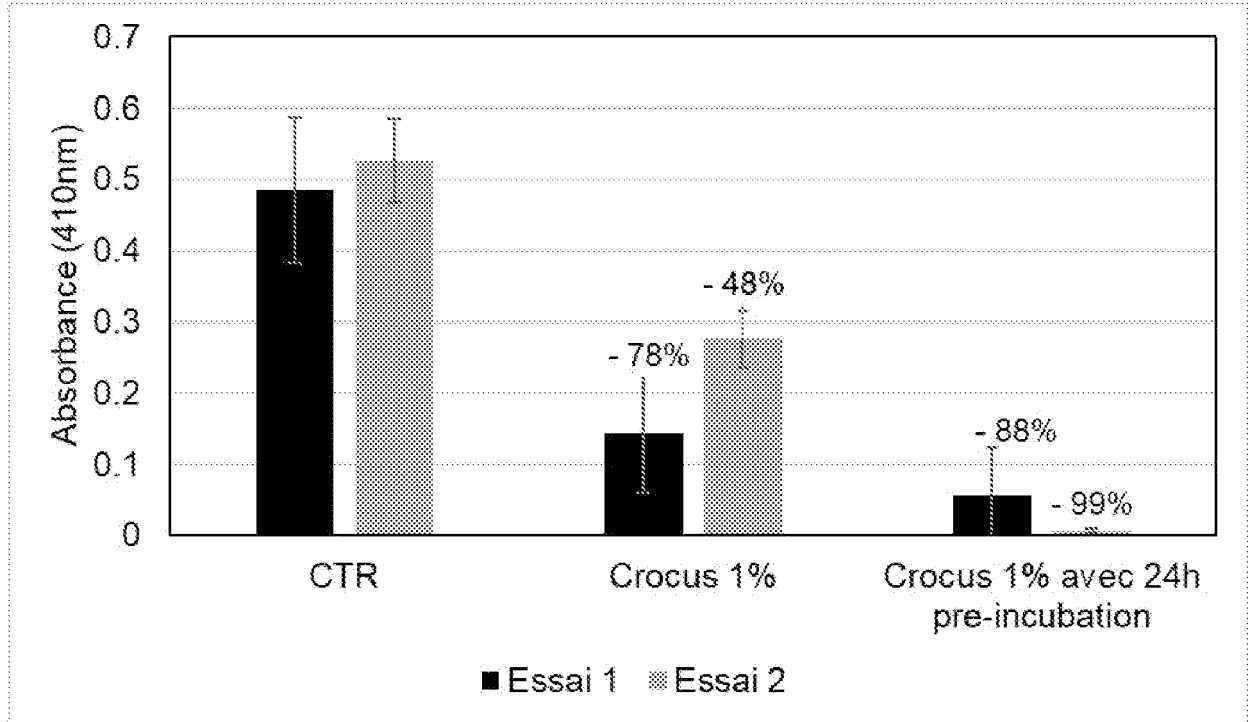
[Fig. 1]



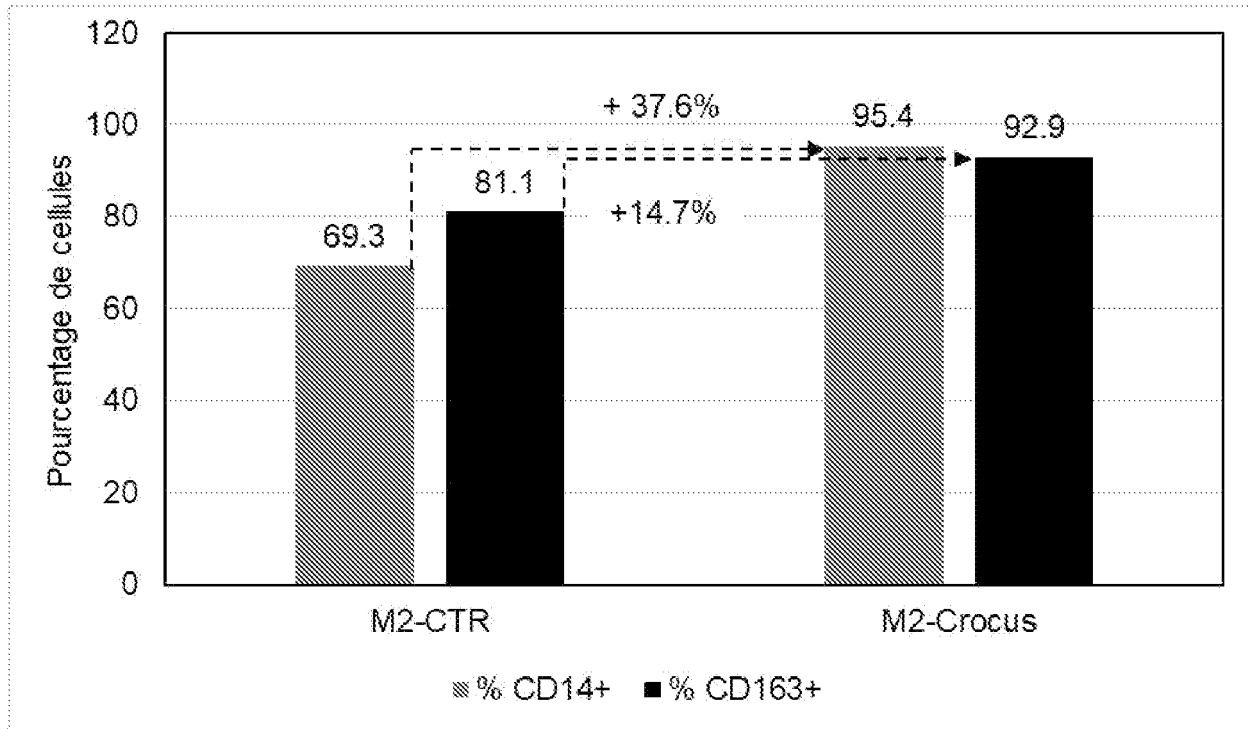
[Fig. 2]



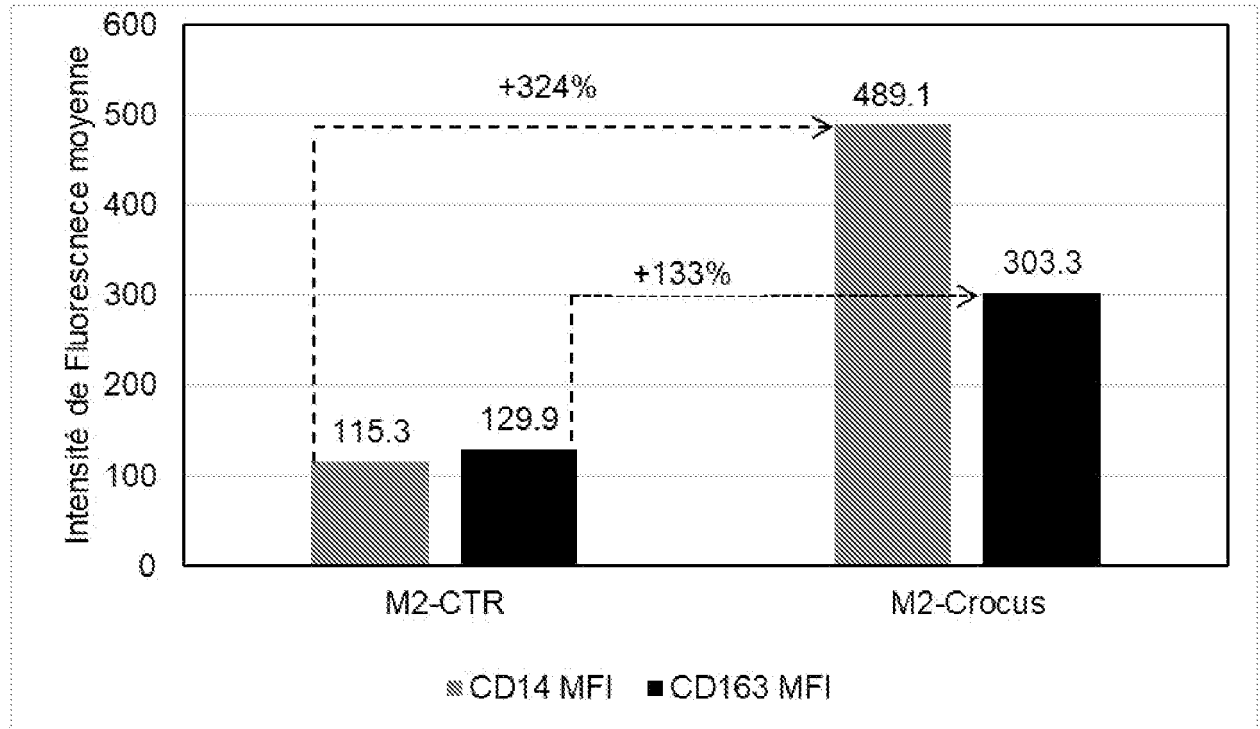
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 907287
FR 2203447

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	FR 3 019 740 A1 (OREAL [FR]) 16 octobre 2015 (2015-10-16)	1-9	A61K36/18 A61K8/97
Y	* page 3, ligne 25 - page 5, ligne 31 * * page 12, ligne 32 - page 13, ligne 3 * * revendications *	10-14	A61Q11/00 A61P17/00
X	FR 3 032 115 A1 (OREAL [FR]) 5 août 2016 (2016-08-05) * page 10, ligne 26 - page 12, ligne 34 * * revendications *	1-9	
X,D	FR 2 928 835 A1 (NUXE SOC PAR ACTIONS SIMPLIFIE [FR]) 25 septembre 2009 (2009-09-25) * revendications *	1-9	
X	CN 109 303 823 A (ZHEJIANG SHOUXIANGU PHARMACEUTICAL CORP ET AL.) 5 février 2019 (2019-02-05)	1-14	
Y	* abrégé *	10-14	
Y	CHEN K ET AL: "In vitro Antimicrobial and Free Radical Scavenging Activities of the Total Flavonoid in Petal and Stamen of Crocus sativus", INDIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, vol. 79, no. 3, 1 janvier 2017 (2017-01-01), XP093002641, IN ISSN: 0250-474X, DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000254 * page 3, colonne de gauche, ligne 4 - ligne 22 * * page 5, colonne de gauche, dernière ligne - colonne de droite, ligne 11 * * tableau 1 *	10-14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC) A61K A61P A61Q
		----- -/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
29 novembre 2022		Fey-Lamprecht, F	
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	

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

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

FA 907287
FR 2203447

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		
Y	<p>RASHIDI MAYBODI FAHIMEH ET AL: "The Effect of Aqueous Extract of Crocus sativus L. (Saffron) on Periodontal Indices of Patients with Generalized Periodontitis", TRADITIONAL AND INTEGRATIVE MEDICINE, 29 mars 2022 (2022-03-29), XP093002634, ISSN: 2476-5104, DOI: 10.18502/tim.v7i1.9059 * le document en entier * -----</p>	10-14	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
		29 novembre 2022	Fey-Lamprecht, F
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>			

1

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2203447 FA 907287**

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 **29-11-2022**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 3019740	A1	16-10-2015	AUCUN	

FR 3032115	A1	05-08-2016	AUCUN	

FR 2928835	A1	25-09-2009	EP 2282717 A1	16-02-2011
			FR 2928835 A1	25-09-2009
			WO 2009122046 A1	08-10-2009

CN 109303823	A	05-02-2019	AUCUN	
