(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

COURBEVOIE

(11) **N° de publication :** ***3 098 713***

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

(21) **N° d'enregistrement national :** **19 08026**

(51) Int Cl[8] : ***A 61 K 8/19*** *(2019.01), A 61 Q 19/00*

(12) **BREVET D'INVENTION** **B1**

(54) NANOPARTICULES D'OR COMPRENANT UN EXTRAIT DE PLANTES ET LEUR UTILISATION COSMETIQUE.

(22) **Date de dépôt :** 16.07.19.

(30) **Priorité :**

(43) **Date de mise à la disposition du public de la demande :** 22.01.21 Bulletin 21/03.

(45) **Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention :** 29.04.22 Bulletin 22/17.

(56) **Liste des documents cités dans le rapport de recherche :**

Se reporter à la fin du présent fascicule

(60) **Références à d'autres documents nationaux apparentés :**

◯ **Demande(s) d'extension :**

(71) **Demandeur(s) :** *TORSKAL Société par actions simplifiée* — FR.

(72) **Inventeur(s) :** MOREL Anne-Laure et GIRAUD Sophie.

(73) **Titulaire(s) :** TORSKAL Société par actions simplifiée.

(74) **Mandataire(s) :** IP TRUST.

FR 3 098 713 - B1

Description

Titre de l'invention : NANOPARTICULES D'OR COMPRENANT UN EXTRAIT DE PLANTES ET LEUR UTILISATION COSMETIQUE

[0001] La présente invention a trait au domaine des nanoparticules d'or utilisées en cosmétique. Elle concerne plus particulièrement l'utilisation de nanoparticules obtenues à partir d'un mélange d'or et d'extrait de plantes, et leur utilisation en cosmétique.

Domaine technique

[0002] *Hubertia ambavilla* est une plante endémique originaire de La Réunion, dans l'océan Indien, traditionnellement utilisée à la fois en usage interne et externe. Les principaux composés de *Hubertia ambavilla* sont les flavonoïdes, les tanins, les proanthocyanidines et le complexe glucidique conduisant à des activités thérapeutiques de la peau telles que des propriétés anti-inflammatoires et cicatrisantes, ainsi que d'autres activités thérapeutiques utilisées pour traiter les infections rénales, l'asthme et le diabète (6, 7, 8).

[0003] Les nanoparticules sont largement utilisées et étudiées dans plusieurs domaines tels que la médecine, l'environnement ou les cosmétiques (1, 2, 3). Leur taille et leur forme peuvent être ajustées en modifiant les produits chimiques et en modifiant leur rapport. La Commission européenne définit le nanomatériau comme "une particule naturelle, accidentelle ou manufacturée et lorsque, pour 50% ou plus des particules dans la répartition de la taille, une ou plusieurs dimensions extérieures sont comprises entre 1 et 100 nm" (4).

[0004] Les nanoparticules d'or sont également bien décrites dans la littérature en tant qu'ingrédients anti-âge aux États-Unis. Elles sont utilisées notamment pour la désinfection des plaies cutanées, crème anti-inflammatoire et anti-âge. Ces nanoparticules sont obtenues par la méthode de Turkevich selon laquelle il est nécessaire de sélectionner avec soin les produits chimiques ou le produit naturel utilisés pour le revêtement de nanoparticules pour éviter les risques de toxicité.

[0005] Deux protocoles différents ont été décrits dans des études antérieures (5) pour la synthèse de nanoparticules d'or extraites de l'extrait brut hydrosoluble de plantes médicinales ou du totum de flavonoïdes. Le premier protocole a conduit à des particules de forme nanofleurs à partir d'extrait brut, le deuxième a la préparation de nanoparticules sphériques plus petites et monodispersées obtenues avec le totum. La nature et le rapport des fractions phytochimiques sont d'une grande importance pour la formation de nanoparticules.

[0006] La peau est l'organe le plus exposé aux facteurs extérieurs qui l'endommagent. Ces facteurs sont la pollution, l'exposition aux rayons ultraviolets solaires (UV), la fumée de cigarette, etc. Ces facteurs sont responsables de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Un excès de ROS induit un stress oxydatif qui endommage les cellules, l'ADN et les protéines, conduisant ainsi au vieillissement cutané. Dans le cas d'une exposition au soleil, les écrans solaires sont généralement recommandés pour la protection de la peau, mais leur efficacité est réduite si l'application est inadéquate et si la protection spectrale est incomplète. L'organisme dispose d'antioxydants naturels pour éliminer ces radicaux libres, mais dans le cas d'une surexposition, ces systèmes peuvent être facilement dépassés. Il est donc important d'aider la peau à se protéger en apportant une autre source d'antioxydants.

Exposé de l'invention

[0007] Dans la présente étude, l'application potentielle de nanoparticules d'or vert en tant qu'ingrédient cosmétique a été étudiée. Ainsi, des tests pour évaluer les effets sur les cellules de fibroblastes humains normaux, ainsi que les activités antioxydantes et anti-collagénase de ces nanoparticules ont été réalisés et comparés aux résultats obtenus avec des nanoparticules d'or synthétisées par la méthode la plus ancienne et la plus utilisée : la synthèse de Turkevich (11).

[0008] De manière très intéressante, les inventeurs ont validé l'intérêt d'utiliser des nanoparticules comprenant un extrait de plantes en cosmétique.

[0009] L'invention concerne donc l'utilisation d'une nanoparticule d'or comprenant un mélange d'or et un extrait de plantes pour la préparation d'un ingrédient cosmétique.

[0010] Elle concerne aussi une composition cosmétique comprenant au moins une nanoparticule d'or comprenant un mélange d'or et un extrait de plantes.

[0011] L'invention concerne l'utilisation d'une composition comprenant des nanoparticules d'or telle que décrites précédemment pour la prévention des dommages dus aux UV et la prévention des dommages cutanés dus aux radicaux libres.

[0012] Dans un mode de réalisation préféré, l'extrait de plante utilisé est un extrait brut de *Hubertia Ambavilla*.

Avantages de l'invention

[0013] Les inventeurs étudié et caractérisé les nanoparticules d'or comprenant un extrait de plante. Ils ont ainsi démontré que celles-ci présentent des propriétés très intéressantes pour une utilisation en cosmétique.

[0014] En effet, ces nanoparticules d'or sont stables du fait que les extraits de plantes, notamment les polyphénols permet leur stabilisation.

[0015] De plus, elles présentent des propriétés anti-oxydantes qui peuvent être attribuées à l'enrobage d'extrait de plante. Le pouvoir antioxydant des nanoparticules comprenant

un extrait brut *d'Hubertia ambavilla* est particulièrement remarquable puisqu'il est supérieur à celui de la vitamine E. Ces nanoparticules permettent en particulier d'inhiber l'oxydation induite par les irradiations UV-A par piégeage des radicaux libres, offrant une protection anti-oxydante dans le derme.

[0016] L'innocuité de ces nanoparticules a été validé en conformité avec les règlementations en vigueur, ce qui est un point important. Il a été démontré qu'elles ne sont pas photo-toxiques, ne sont pas sensibilisantes pour la peau, ni irritantes pour la peau et les yeux. Elles ne sont pas non plus génotoxiques.

[0017] De plus, ces nanoparticules sont obtenues par un procédé « vert », respectueux de l'environnement et ne mettant pas en œuvre de produits toxiques.

DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

[0018] Un premier objet de l'invention concerne l'utilisation d'une nanoparticule d'or comprenant un mélange d'or et un extrait de plantes pour la préparation d'un ingrédient cosmétique.

[0019] Les nanoparticules d'or utilisée dans cette invention sont obtenues par un procédé écologique comprenant : (a) la préparation d'au moins un extrait de plante riche en flavonoïdes et (b) le mélange d'au moins un desdits extraits de plante avec une solution aqueuse d'au moins un sel d'or. L'extrait de plante riche en flavonoïdes peut-être un extrait total brut de ladite plante ou un totum de flavonoïdes de ladite plante.

[0020] Lorsque les nanoparticules sont obtenues par mélange d'un totum de flavonoïdes de plante

[0021] avec une solution aqueuse d'au moins un sel d'or, elles sont sphériques.

[0022] Lorsque les nanoparticules sont obtenues par mélange d'un extrait total brut de plante avec une solution aqueuse d'au moins un sel d'or, elles ont une forme de fleur et sont appelées « nanofleurs ».

[0023] Des nanoparticules selon l'invention et leur procédé de préparation sont décrites dans la demande WO2017/125695.

[0024] L'extrait de plante est choisi parmi un extrait de *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum, Aphloia theiformis, Ayapana triplinervis, Camellia sinensis var. assamica, Citrus hystrix, Curcuma longa, Cryptomeria japonica, Dodonaea viscosa, Mussaenda arcuate, Nuxia verticillate, Olea europea Africana, Phyllanthus casticum, Pittosporum senacia, Psidium cattleianum, Psiloxylon mauritianum, Terminalia bentzoe* ou *Vepris lanceolata.*

[0025] De préférence, l'extrait est choisi parmi les extraits de *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum, Aphloia theiformis, Camellia sinensis var. assamica, Citrus hystrix, Cryptomeria japonica, Mussaenda arcuate, Psidium cattleianum, Psiloxylon mauritianum, Terminalia bentzoe* ou *Vepris lanceolata.*

[0026] Dans un mode de réalisation tout à fait préféré, l'extrait est un d'extrait brut de *Hubertia ambavilla* ; la nanoparticule est alors en forme de fleur et son diamètre est compris entre 40 et 80 nm. L'intérêt particulier de cette plante a été validé par des expériences approfondies, présentées dans la partie expérimentale de ce texte.

[0027] Dans un autre mode réalisation préféré, l'extrait est un totum de *Hypericum lanceolatum*; la nanoparticule est alors sphérique et son diamètre est d'environ 15 nm et est caractérisée par un ratio réducteur/oxydant de 21.

[0028] Un second objet de l'invention concerne une composition cosmétique comprenant au moins une nanoparticule d'or comprenant un mélange d'or et un extrait de plantes.

[0029] Les nanoparticules d'or d'intérêt sont les nanoparticules décrites précédemment.

[0030] Une telle composition peut comprendre en outre au moins un autre ingrédient cosmétique. En effet, les nanoparticules peuvent être combinées à d'autres ingrédients cosmétiques pour augmenter, renforcer ses propriétés.

[0031] Cette composition cosmétique peut se présenter sous forme de crème, de lotion ou toute autre forme appropriée.

[0032] Un troisième objet de l'invention concerne l'utilisation d'une composition comprenant des nanoparticules d'or telles que décrites précédemment pour la prévention des dommages dus aux UV et la prévention des dommages cutanés dus aux radicaux libres.

BREVE DESCRIPTION DES FIGURES

[0033] [Fig.1] [Fig.1] : (a) Spectre d'absorption d'une solution aqueuse de GAuNPs dispersés et (b) sa caractérisation par TEM.

[0034] [Fig.2] [Fig.2] **:** Spectres XPS des régions (a) Au4f et (b) O1s.

[0035] [Fig.3] [Fig.3] : Chromatogramme HPLC d'un extrait de plante *d'Hubertia Ambavilla* par détection de l'aérosol chargé. L'extrait a été séparé en 5 fractions notées de A à E.

[0036] [Fig.4] [Fig.4] : Chromatogrammes LC-MS / MS et UV de l'extrait aqueux de plante.

[0037] [Fig.5] [Fig.5] : Schéma de synthèse conventionnelle de nanoparticules d'or à l'aide de citrate (méthode de Turkevich) et conduisant à une AuNP sphérique de 15 nm entourée de citrate.

[0038] [Fig.6] [Fig.6] : (a) Cytotoxicité de l'AuNP sur les cellules NHDF après 72h d'incubation. (b) Effets de l'AuNP sur la production de MMP-1 induite par les UV-A. Les résultats sont exprimés en moyenne ± ET de trois expériences distinctes. Une solution de vitamine E (VE 1 mM) a été utilisée comme étalon de référence. * $p < 0{,}001$ (test de Student).

[0039] [Fig.7] [Fig.7] : Activité antioxydante par la méthode DPPH mesurée sur (a) GAuNP et (b) CAuNP.

EXEMPLES

A – Matériels et méthodes

1.Synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs)

[0040] **1.1Synthèse de nanoparticules d'or à l'aide d'extraits de plantes (5)**

[0041] **1.1.1Préparation des extraits de plantes de *Hubertia ambavilla* et de *Hypericum lanceolatum***

[0042] La préparation de nanoparticules à partir de deux espèces de plantes est illustrée ici. La première plante est *Hubertia ambavilla* qui est un arbuste endémique de l'île de la Réunion. La deuxième est *Hypericum lanceolatum* qui est une espèce de millepertuis arborescent originaire de l'île de la Réunion. Ces deux plantes sont particulièrement riches en flavonoïdes dont la rutine et la quercétine pour *Hypericum lanceolatum* et l'isoquercétine et l'hyperoside pour *Hubertia ambavilla*.

[0043] **1.1.2Préparation d'un extrait total brut de plantes**

[0044] Des plantes fraîchement récoltées sont lavées à l'eau déionisée. 3 grammes sont mélangés à 50 mL d'eau déionisée puis le mélange est chauffé à 60°C pendant 5 min, ce qui permet de libérer la matière biologique par lyse des cellules végétales. Le surnageant est ensuite refroidi à température ambiante puis sur la glace pendante 10 minutes. Le surnageant refroidi est ensuite filtré sur un filtre de porosité de grade 2.

[0045] Lorsque le matériel de départ est *Hubertia ambavilla*, l'extrait obtenu est vert.

[0046] Lorsque le matériel de départ est *Hypericum lanceolatum*, l'extrait obtenu est marron.

[0047] Aucun solvant organique n'est utilisé dans cette préparation.

[0048] **1.1.3 Isolement du totum de flavonoïdes de plantes**

[0049] La méthode d'extraction utilisée est une méthode de macération à froid. Les plantes sont écrasées sur un tamis à pores de diamètre de 10 mm puis laissées à macérer sous agitation à 150 rpm pendant 20h à température ambiante. Un mélange à quantité égale d'eau et d'éthanol est ajouté au mélange dans un ratio solide/solvant de 1:20 pour obtenir le meilleur rendement possible en composés phénoliques (Cujic N et al). Après extraction, les macéras sont filtrés, séchés à basse pression (température maximale du bain : 45°C, pression entre 50 et 150 bars) puis lyophilisés pendant 48h.

[0050] Le rendement d'extraction pour *Hubertia ambavilla* dans ces conditions est proche de 50%.

[0051] **1.1.4 Préparation des nanoparticules d'or par mélange avec des extraits de plantes *Hubertia ambavilla* et de *Hypericum lanceolatum***

[0052] a)Préparation des nanoparticules d'or en forme de fleur avec les extraits totaux bruts

[0053] 50 mL d'une solution aqueuse d'acide chloraurique (HAuCl4) à 1 mM sont refluées sous agitation vigoureuse dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant à reflux à l'abri de la lumière. Lorsque de fines gouttelettes apparaissent sur les parois, 20 mL

d'une solution aqueuse d'extraits totaux brut de plantes sont ajoutés très rapidement. La solution devient alors rapidement bleu-nuit en 1 minute. Le ballon est ensuite retiré du bain d'huile et la solution est maintenue sous agitation vigoureuse pendant 15 minutes supplémentaires. La solution est finalement maintenue à 4°C à l'abri de la lumière.

[0054] Les nanoparticules obtenues ont un diamètre mesuré en MET d'environ 40 nm.

[0055] b)Préparation des nanoparticules d'or sphériques avec un totum de flavonoïdes

[0056] 4 mL d'une solution aqueuse de totum de flavonoïdes sont refluées sous agitation vigoureuse dans un ballon bicol surmonté d'un réfrigérant à reflux à l'abri de la lumière. Lorsque de fines gouttelettes apparaissent sur les parois, 4 mL d'une solution aqueuse de HAuCl4 sont ajoutés très rapidement. La solution devient alors rapidement rouge brun en 1 minute. Le ballon est ensuite retiré du bain d'huile et la solution est maintenue sous agitation vigoureuse pendant 15 minutes supplémentaires. La solution est finalement maintenue à 4°C à l'abri de la lumière.

[0057] Les nanoparticules obtenues ont un diamètre mesuré en MET d'environ 15 nm.

[0058] Un ratio molaire spécifique entre les réactifs permet d'obtenir des nanoparticules d'or sphériques. Ce ratio est le suivant :

[0059] [Math.1]

$$n(\text{flavonoïdes})/n(HAuCl4) = 21$$

[0060] **1.2 Synthèse de nanoparticules d'or par la méthode de Turkevich (CAuNP)**

[0061] On a chauffé au reflux sous agitation vigoureuse 100 ml d'une solution aqueuse de HAuCl4 1 mM dans un ballon équipé d'un réfrigérant à reflux et protégé de la lumière. Ensuite, une fois que les fines gouttelettes sont apparues sur les parois, 10 ml de citrate de potassium (38,8 mM) ont été ajoutés. 30 minutes plus tard, le ballon a été retiré du bain d'huile et la solution est restée sous agitation vigoureuse pendant 15 minutes supplémentaires. La solution rouge a été centrifugée et redispersée dans de l'eau désionisée. La solution a finalement été maintenue à 4° C, à l'abri de la lumière.

2. Caractérisation des AuNPs

[0062] Les analyses ont été réalisées de la manière suivante : l'extrait (10 mg) a été repris dans 500 µl d'un mélange eau / acétone 4/1 v: v, l'addition d'eau seule laissant des résidus non dissous. 1 µL de cet extrait a été injecté dans notre machine LC-MS / HRMS (chaîne HPLC Dionex Ultimate 3000 avec détecteur de réseaux de diodes UV-visible et spectromètre de masse Q-TOF Impact II Bruker) sur une colonne de 50 mm × 4 mm Nucleoshell RP18, 2,7 µm, avec un gradient entre les phases mobiles suivantes: H2O + 0,1% acide formique / acétonitrile + 0,1% acide formique.

[0063] L'analyse a été effectuée en mode négatif avec une source d'électrospray. Deux injections ont été effectuées une analyse en mode MS simple et une analyse en mode dépendant des données, appelée « autoMS / MS » (c'est-à-dire en alternance entre MS

unique et MS / MS sur les ions majoritaires du spectre MS précédent).

2.1Méthode

[0064] Toutes les mesures ont été effectuées au moins en triple afin de valider la reproductibilité des procédures synthétiques et analytiques.

[0065] Le spectre d'absorption UV-Vis de la solution AuNPs a été enregistré par un appareil Perkin Elmer Lambda UV / Vis 950 en utilisant des cellules en plastique standard de 1 cm à la température ambiante. Les mesures ont été effectuées dans la gamme spectrale 200-900 nm.

[0066] Les images au microscope électronique à transmission (TEM) des AuNPs ont été acquises sur un microscope TEM / STEM Technai Osiris (FEI) équipé d'un détecteur de champ noir à grand angle fonctionnant à 200 kV. Pour effectuer l'analyse TEM, une goutte de 3 µl de solution AuNP préalablement traitée pendant 5 min dans un bain à ultrasons a été déposée sur une grille de cuivre recouverte de carbone. L'échantillon a été laissé sécher pendant 30 minutes à l'air ambiant.

[0067] La distribution granulométrique hydrodynamique et le potentiel zêta ont été mesurés sur un Zetasizer NanoZSP (Malvern Instruments). Les mesures ont été réalisées à 25° C.

[0068] Un spectromètre ThermoFisher Scientific K-ALPHA a été utilisé pour l'analyse XPS avec une source d'AlKα monochromatisée (hν = 1486,6 eV). La taille du spot de rayons X était de 400 microns pour l'acquisition de points de surface et de 200 microns lors de la pulvérisation. Une pression de 10 à 7 Pa a été atteinte dans la chambre lors du transfert de gouttes de liquide sur une feuille d'indium. Les spectres complets (0-1100 eV) ont été obtenus avec une énergie de passe constante de 200 eV et des spectres haute résolution à une énergie de passe constante de 40 eV. La neutralisation de la charge a été appliquée pendant l'analyse. Les spectres haute résolution C1s, O1s, Au4f ont été ajustés et quantifiés à l'aide du logiciel AVANTAGE fourni par ThermoFisher Scientific (facteurs de sensibilité Scofield utilisés pour la quantification).

2.2 Stabilité de la suspension AuNP

[0069] La stabilité de la suspension AuNP stockée à 4°C pendant plus d'un mois a été évaluée sur la base des modifications du spectre d'absorption de la solution AuNP. Ainsi, la distribution granulométrique hydrodynamique d'une suspension fraîche d'AuNP et d'une suspension âgée (âgée de 4 mois stockée à 4°C pendant toute la période) a été comparée.

3 Activités biologiques in vitro et ex vivo

3.1 Culture de cellules

[0070] Des fibroblastes du derme humain normal (NHDF) isolés à partir du prépuce du nouveau-né ont été utilisés. Les NHDF ont été cultivés dans du DMEM (GIBCO®, In-

vitrogen ™) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et d'antibiotiques dans une atmosphère humidifiée à 37°C et à 5% de CO2. Les cellules ont été cultivées en routine dans des flacons de culture de 25 à 75 cm² et sous-cultivées régulièrement avant la confluence.

3.2 Cytotoxicité

[0071] La toxicité de AuNP a été évaluée dans du NHDF ensemencé dans des microplaques à 96 puits à raison de 20 x 10^3 cellules par puits. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test de neutralisation du rouge (NRU). Des solutions de AuNP ont été préparées dans un milieu complet (DMEM + 1% de FCS) après homogénéisation par ultrasons (3 cycles de 5 secondes à 20 kHz). Une large gamme de concentrations (de 0,005 à 100 µg / ml) exprimées en poids / volume de matière active a été testée. Le dosage du NRU a été effectué après 24h et 72h d'incubation.

3.3 Dosage DPPH

[0072] Le pourcentage d'activité antioxydante a été évalué par dosage des radicaux libres au DPPH. Cette méthode est basée sur le changement de couleur de la solution de DPPH du violet au jaune pâle lorsque ce radical libre stable se convertit en une forme réduite par la réaction d'une substance capable de donner un atome d'hydrogène.

[0073] Des solutions de AuNP ont été préparées dans de l'éthanol après homogénéisation par ultrasons (3 cycles de 5 secondes à 20 kHz). Plusieurs concentrations allant de 0,05 à 10% ont été testées. La réduction de DPPH est évaluée par le changement d'absorbance à 540 nm d'une solution de DPPH (0,126 Mm dans de l'éthanol) après 30 minutes d'incubation à 37°C avec l'AuNP. Chaque mesure a été réalisée en triple et un contrôle positif (α-tocophérol à 50 µM) a été inclus dans le test. L'activité DPPH (%) a été calculée selon la formule suivante:

[0074] [Math.2]

[DPPH] = [Abs traité / contrôle absolu] x 100.

3.4 Activité anti-collagénase

[0075] Le test est basé sur l'évaluation de la production de métalloprotéinase 1 de matrice (MMP-1 ou collagénase) par culture de NHDF en l'absence ou en présence de AuNP et exposée aux UV-A.

[0076] La NHDF des cultures-mère a été récoltée avec de la trypsine provenant de flacons de culture tissulaire. Après comptage, les cellules ont été mises en suspension dans du milieu complet (DMEM + FCS) et ensemencées dans des plaques à 24 puits à une densité de 75 x $I0^3$ cellules par puits. 72 heures après le placage, le milieu a été retiré et remplacé par un milieu frais additionné de 1% de SVF et contenant diverses concentrations de AuNP. Les cellules NHDF ont ensuite été incubées pendant 24h. Avant l'irradiation, les monocouches de cellules ont été lavées avec du HBSS et exposées aux

UV-A en présence de HBSS contenant la solution AuNP à différentes concentrations avec une rangée parallèle de tubes Philips TL-K 40W ACTINIC BL REFLECTOR. Immédiatement après l'irradiation, les solutions de HBSS ont été retirées et remplacées par du milieu frais additionné de 1% de FCS et contenant la solution de AuNP. Les cellules NHDF ont ensuite été replacées dans l'incubateur à 37°C pendant 24h. À la fin de l'analyse, les milieux conditionnés provenant de cultures de NHDF ont été recueillis et stockés à -20°C jusqu'à l'analyse de la MMP-1. En même temps, les monocouches de NHDF correspondantes ont été extraites pour quantifier la teneur en protéines.

[0077] Les niveaux de protéines ont été déterminés en utilisant le kit de dosage de protéines BCA. Après rinçage des cellules avec HBSS, une solution de NaOH (0,1 N) a été ajoutée dans chaque puits. Après une incubation de 10 min à la température ambiante, des aliquotes de lysats ont été transférées dans une microplaque à 96 puits et du réactif BCA a été ajouté. Après une période de temps de 30 minutes, les densités optiques ont été mesurées à 570 nm.

[0078] L'activité de la MMP-1 a été déterminée à l'aide d'un dosage ELISA (Human Pro-MMP-1 Quantikine; R & D Systems®) pour la détection et la mesure quantitative de la MMP-1 dans des surnageants de culture cellulaire, conformément aux instructions du fabricant. Chaque mesure a été effectuée en triple et un contrôle positif (α-tocophérol à 1 mM) a été inclus dans le test.

[0079] **3.5 Evaluation ex vivo de l'activité antioxydante des GAuNPs sur des explants de peau humaine**

[0080] 15 explants de peau ont été préparés à partir d'une abdominoplatie d'une femme de type européenne blanche, phototype II, âgée de 55 ans. Ils ont été cultivés dans du BEM dans une atmosphère humidifiée à 37°C et 5% de CO_2. L'application topique de GAuNPs a été réalisée avec 2 µL de solution par explant (2 mg / cm²). Au bout de 4 jours, certains explants ont été placés dans du HBSS et exposés à des UV-A (18 J / cm²). Immédiatement après l'irradiation, les solutions de HBSS ont été retirées et remplacées par du milieu frais, puis replacées dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures. Les explants ont ensuite été coupés en deux. Une partie a été fixée dans une solution de formol tamponnée et la seconde partie a été congelée et stockée à -80°C. Après 24h, des tranches de 5 µm ont été préparées afin d'observer la viabilité cellulaire (coloration au trichrome de Masson) et les protéines oxydées (immunomarquage).

4.Etudes de sécurité

4.1Études de toxicité

4.1.1Toxicité aiguë

[0081] L'étude de toxicité aiguë AuNP est basée sur le document d'orientation n°129 de l'OCDE. La toxicité a été évaluée sur des fibroblastes de souris Balb/c 3T3 ensemencés

dans des microplaques à 96 puits à raison de $2x10^3$ cellules par puits. La viabilité cellulaire a été évaluée par un test de neutralisation du rouge (NRU). Des solutions de AuNP ont été préparées dans du DMEM après homogénéisation aux ultrasons. Une large gamme de concentrations (de 0,01 à 125 000 µg / ml) a été testée. Le dosage du NRU a été effectué après 48h d'incubation.

4.1.2Test de phototoxicité 3T3 NRU

[0082] Le test compare la cytotoxicité de produits chimiques appliqués à des fibroblastes de souris (Balb / c 3T3, clone A31) en présence ou en l'absence d'exposition à un niveau non cytotoxique de lumière UV-A (5 J / cm2). La cytotoxicité a été mesurée en tant qu'inhibition de la capacité à absorber le colorant essentiel, le rouge neutre (NR), un jour après le traitement UV-A. Cette étude était basée sur les lignes directrices de l'OCDE n°432. La phototoxicité a été évaluée dans des fibroblastes de souris Balb/c 3T3 ensemencés dans des microplaques à 96 puits à $1x10^4$ cellules par puits. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures, puis le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été lavées avec du HBSS préchauffé. Ensuite, pour chaque plaque, huit concentrations de AuNP et de CPZ (témoin positif) ont été appliquées aux cellules (six réplicats / concentration). Les cellules ont été exposées au produit pendant 1 heure. À la fin de la période de traitement, une plaque par condition de test ou contrôle positif a été exposée aux rayons ultraviolets, tandis que l'autre plaque est restée dans l'obscurité. Pour les plaques irradiées, les cellules ont été irradiées avec 5 J / cm^2 à température ambiante dans un UVACUBE 400 (Sol-500) équipé d'un filtre H1 à travers le couvercle de la plaque à 96 puits. 50 minutes après le début des traitements légers, les solutions de chaque puits de toutes les plaques ont été retirées et les cellules ont été lavées deux fois avec du HBSS préchauffé. Le dosage du NRU a été utilisé pour évaluer les changements de la viabilité cellulaire après l'incubation de cellules de NHDF avec de l'AuNP à diverses concentrations (de 0,01 à 200 µg / ml) pendant 24 ou 72 heures d'incubation. Les cellules témoins ont été incubées avec du milieu complet (DMEM + 1% de SVF) et les expériences ont été répétées six fois.

4.2Test de sensibilisation

4.2.1Test Keratinosens

[0083] Les cellules KeratinoSens ont d'abord été étalées sur des plaques à 96 puits et cultivées pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, le milieu a été retiré et les cellules ont été exposées au véhicule témoin ou à différentes concentrations de AuNP et de témoins positifs. Les plaques traitées ont ensuite été incubées pendant 48 heures à 37°C. A la fin du traitement, les cellules ont été lavées et la production de luciférase a été mesurée par luminescence éclair. Parallèlement, la cytotoxicité a été mesurée par un test de réduction au MTT et prise en compte dans l'interprétation des résultats de sensibi-

lisation. Quatre analyses indépendantes ont été réalisées dans le cadre de cette étude.

4.2.2SENS-IS test

[0084] La solution AuNP est déposée à la surface de l'épiderme et est doucement étendue sur toute la surface. Après 15 minutes d'exposition, EpiskinTM a été rincé avec du PBS, puis incubé à 37° C pendant 6 heures. Après incubation, l'épiderme reconstruit a été retiré des inserts avec une pince et placé dans un cryotube pour la congélation dans de l'azote liquide. L'épiderme a ensuite été transféré dans un tube contenant 1 ml de réactif Qiazol et 2 billes d'acier. L'épiderme a été homogénéisé au moyen du TissueLyser II. Après centrifugation, le surnageant a été recueilli et stocké à -20°C jusqu'à l'extraction de l'ARN et l'analyse de 61 gènes liés au processus d'irritation, SENS-IS et ARE.

4.3Tests d'irritation

4.3.1Test In vitro d'irritation de la peau

[0085] Le plan de l'étude repose sur les lignes directrices de l'OCDE n ° 439. Le potentiel d'irritation cutanée de l'AuNP a été évalué à l'aide du modèle de l'épiderme humain reconstruit Episkin™. Les AuNP et les contrôles négatifs et positifs ont été appliqués localement sur des tissus en triple exemplaire et incubés à température ambiante pendant 15 minutes. À la fin de la période de traitement, chaque tissu a été rincé avec du D-PBS et incubé pendant 42 heures à + 37°C, 5% de CO_2 dans un incubateur humidifié. La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée au moyen du test colorimétrique de réduction au MTT. Les valeurs de viabilité relative ont été calculées pour chaque tissu et exprimées sous forme de pourcentage de la viabilité moyenne des tissus de contrôle négatifs qui a été fixée à 100% (en tant que viabilité de référence).

4.3.2Test In vitro d'irritation des yeux

[0086] Le potentiel d'irritation oculaire aiguë de l'AuNP a été évalué par la mesure de leur effet cytotoxique sur le modèle épithélial cornéen EpiOcular™. Les AuNP et les contrôles négatifs et positifs ont été appliqués localement sur des tissus en double et incubés à + 37°C pendant 30 minutes. À la fin de la période de traitement, chaque tissu a été rincé avec du D-PBS, incubé pendant 12 minutes à température ambiante pour éliminer tout élément de test restant du tissu, appliqué sur un matériau absorbant, puis incubé pendant 2 heures supplémentaires à 37°C, 5% de CO_2 dans un incubateur humidifié. La viabilité cellulaire a ensuite été évaluée au moyen du test colorimétrique de réduction au MTT. Les valeurs de viabilité moyenne ont été calculées pour chaque tissu et exprimées sous forme de pourcentage de la viabilité moyenne des tissus de contrôle négatifs qui a été fixée à 100% (comme viabilité de référence).

4.4Tests micronucléaire et mutations

[0087] **4.4.1Test *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères**

[0088] Le plan de l'étude repose sur les lignes directrices de l'OCDE n°490. Les AuNP, diluées dans de l'eau pour préparation injectable, ont été testées au cours d'une expérience unique, avec et sans système d'activation métabolique (S9 mix) préparé à partir d'une fraction de microsomes hépatiques (fraction S9) de rats induits avec Aroclor 1254. Des cultures de 20 mL à 5 x 10^5 cellules de lymphome de souris L5178Y TK +/- / mL ont été exposées à l'AuNP ou aux éléments de contrôle, en présence ou en l'absence du mélange S9 (concentration finale de la fraction S9 de 2%). Au cours de la période de traitement de 3 heures, les cellules ont été maintenues sous forme de culture en suspension dans un milieu de culture RPMI 1640 complété par du sérum de cheval inactivé par la chaleur à 5% dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% de CO_2. La cytotoxicité a été mesurée par évaluation de la croissance totale relative ajustée, de la croissance relative de la suspension relative ajustée et de l'efficacité du clonage après le temps d'expression. Le nombre de clones mutants (différenciant petites et grandes colonies) a été évalué après expression du phénotype mutant.

4.4.2Test In vitro micronucléaire

[0089] L'objectif de cette étude était d'évaluer le potentiel des AuNP à induire une augmentation de la fréquence des cellules micronucléées dans la lignée cellulaire de souris L5178Y TK +/-. Le plan de l'étude repose sur les directives de l'OCDE n°487. Après un test préliminaire de cytotoxicité, les AuNP diluées dans de l'eau pour préparations injectables ont été testées au cours d'une seule expérience cytogénétique, avec et sans système d'activation métabolique, le mélange S9, préparé à partir d'une fraction microsomique hépatique (fraction S9) de rats induite par Aroclor 1254. Chaque traitement a été associé à une évaluation de la cytotoxicité aux mêmes doses. La cytotoxicité a été évaluée en déterminant le PD (doublage de population) des cellules. Après le comptage final des cellules, les cellules ont été lavées et fixées. Ensuite, des cellules provenant de trois niveaux de dose de cultures traitées avec AuNP ont été déposées sur des lames de verre propres. Les lames ont été séchées à l'air avant d'être colorées dans du Giemsa à 5%. Les lames de cultures témoins et positives ont également été préparées comme décrit ci-dessus. Pour chaque expérience principale (avec ou sans mélange S9), les micronoyaux ont été analysés pour trois doses d'AuNP, pour le véhicule et les témoins positifs, dans 1000 cellules mononucléées par culture (total de 2000 cellules mononucléées par dose). Le nombre de cellules avec des micronoyaux et le nombre de micronoyaux par cellule ont été enregistrés séparément pour chaque culture traitée et témoin.

B-RESULTATS

1.Synthèse et caractérisation des GAuNPs

[0090] Les GAuNP ont été synthétisées comme décrit précédemment par Morel *et al* (5).

L'ajout d'extraits de plantes aux solutions de précurseurs d'or chauffées a provoqué un changement de couleur du jaune pâle au bleu. Ce changement de couleur, attribué à l'excitation de la bande de plasmons de surface (SP), constitue la première preuve de la formation d'AuNPs. Nous avons observé dans les spectres UV-Vis la disparition de la bande de plasmons de surface (SP) de Au (III) à 290 nm au profit de SP à 524 nm, ce qui est dû à la réduction des sels d'or et à la formation de Au (0), présence d'agents de bioréduction qui sont des extraits de plantes (14).

[0091] La spectroscopie UV-Vis permet d'évaluer la formation et la stabilité de nanoparticules en solution aqueuse. La [Fig.1] montre un spectre typique obtenu avec des extraits bruts ; la bande de plasmon de surface (SP) est large et comprise entre 550 et 590 nm avec un maximum à 550 nm ; ce qui est caractéristique des nanoparticules anisotropiques où l'on retrouve différentes contributions de SP.

[0092] Le tableau 1 ci-dessous indique que le diamètre hydrodynamique moyen des GAuNPs est de 97,7 ± 7,1 nm. Ce diamètre est le mouvement brownien et prend en compte la couche d'extrait de plante formée autour de la nanoparticule. Le diamètre hydrodynamique est plus grand que le diamètre « sec » en raison des effets de solvatation, de liaison hydrogène et de van der Waals. Le potentiel zêta des GAuNPs est de -33,8 ± 7,4 mV en raison de la charge négative du groupe hydroxyle des flavonoïdes recouvrant les NP et responsable de leur stabilité.

[0093] [Tableaux1]

Sample	**R_H (nm)**	**PDI**	**ZP (mV)**
GAuNP	97.7 ± 7.1	0.25 ± 0.04	-33.8 ± 7.4

[0094] **Tableau 1** : Diamètre hydrodynamique (R_H), indice de polydispersité (PDI) et potentiel zêta (ZP) mesurés sur une solution de GAuNP. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD de cinq expériences distinctes.

[0095] Ces résultats corroborent les données TEM et XPS des figures 1 et 2.

[0096] En effet, les AuNPs apparaissaient dans le TEM sous forme d'une population polydispersée constituée de particules en forme de fleur de 40 nm associées à des composants organiques provenant d'extraits de plantes. Les flavonoïdes présents dans l'extrait de plante sont capables de réduire les ions d'or et d'agir comme agents de coiffage efficaces, stabilisant les GAuNPs. Les images TEM montrent des nanoparticules entourées d'une couche mince avec une densité électronique médiocre attribuée à une couche organique, qui stabilise les nanoparticules d'or.

[0097] La région Au4f présente les composantes spin-orbite bien séparées: Au4f7 / 2 et Au4f5 / 2 à respectivement 84,2ev et 87,89ev. Selon Casaletto *et al.*, le pic Au4f7 / 2 peut être une référence d'énergie de liaison utile à 84,00eV. Des changements d'énergie de liaison peuvent être observés avec des nanoparticules d'Au, mais deux

états d'or, Au (0) et Au (I) ont été rapportés. L'état Au (I) a été décalé de 2eV de l'état Au (0). D'après la [Fig.2] et le tableau 2 ci-dessous, aucun pic de Au4f n'a été observé à 86,2ev. Le tableau 2 indique également la présence de pics majeurs Au4f 7/2 à 84,2ev et 86,5 ev, ce qui correspond à Au (0).

[0098] [Tableaux2]

Name	Peak BE	FWHM eV	Area (P) CPS.eV	Atomic %
$Au4f_{7/2}$	84,24	0,91	478,63	0,02
$Au4f_{7/2}$	86,51	1,52	313,6	0,01
$Au4f_{5/2}$	87,89	1,09	483,09	0
$Au4f_{5/2}$	90,16	1,6	278,16	0
Si2p	101,96	1,56	839,38	0,39
Cl2p	200,54	1,42	985,84	0,17
C1s	286,28	2,96	149842,02	61,42
N1s	399,89	1,24	2046,27	0,49
In3d5	445,85	1,33	1779,81	0,06

[0099] **Tableau 2** : Pics d'énergie de liaison obtenus en XPS pour GAuNP

[0100] Tanaka et Negishi (15) ont attribué la haute énergie de liaison Au4f à la liaison des atomes d'or de surface des nanoparticules aux molécules entourant les nanoparticules d'or qui les stabilisent. Ce décalage est attribué à une électrodonation des NP vers les agents stabilisants. Les polyphénols sont des ligands bidentés qui se chélatent en Au (III) en formant un cycle stable. Les hydroxyles orthophénoliques peuvent chélater en Au (III), conduisant à la formation d'un complexe stable Au (III).

[0101] Ensuite, le complexe est réduit à Au (0) *in situ*. Les autres parties des groupes hydroxyle orthophénoliques sont oxydées en quinone correspondante, à savoir l'orthoquinone. La stabilisation peut être effectuée via OH libre ou carbonyl quinones.

[0102] Le changement d'énergie de liaison est attribué à l'effet chélateur entre les ions Au et les ligands.

[0103] On peut en conclure que l'or Au (III) a été réduit par des extraits de plantes, ce qui a donné des nanoparticules d'or Au (0) stabilisées par des polyphénols.

[0104] La région O1 présente un pic unique à 532,94 eV, démontrant une liaison de coordination carbonyle à l'atome d'or de surface de la nanoparticule.

[0105] Des études de stabilité ont été effectuées sur la suspension de nanoparticules. Pendant un mois, des spectres d'absorption sur une suspension d'AuNP stockées à 4°C ont été régulièrement mesurés pour analyser la présence d'agrégats. Le pic d'absorption était

similaire pendant toute cette période, indiquant une absence d'agrégation. De plus, le diamètre hydrodynamique a été mesuré sur une solution fraîche et 4 mois plus tard. Les valeurs obtenues pour la suspension fraîche et la suspension vieillie étaient comparables et presque inchangées.

[0106] **2.Composition chimique de l'extrait de plante médicinale utilisé comme agent de bioréduction**

[0107] L'extrait brut de plante médicinale présente une solubilité dans l'eau supérieure à celle des flavonoïdes isolés lorsqu'il est introduit dans le mélange réactionnel. Ceci suggère une interaction synergique entre les flavonoïdes qui conduit par conséquent à une réaction de réduction efficace, à la nucléation et à la croissance des nanoparticules.

[0108] L'extrait aqueux obtenu avec des feuilles séchées a été analysé par spectroscopie LCR, LC-MS / MS et RMN 1H en phase inverse. La nature complexe de ce mélange est attribuée à la grande variété de composés chimiques appartenant tous à la famille des flavonoïdes. Cela pourrait être considéré comme un mélange complet comprenant un agent réducteur et un agent coiffant.

[0109] Le chromatogramme HPLC, utilisant la détection des aérosols chargés (CAD) sur la [Fig.3], a montré 21 pics majeurs. L'extrait a été séparé en 5 fractions A-E.

[0110] L'analyse LC-MS / MS de l'extrait aqueux de la [Fig.4] permet l'identification et la quantification relative de 18 composés. Cette quantification a été établie en utilisant l'apigénine comme référence. Nous en avons déduit que les 18 composés identifiés représentaient 7,7% de l'extrait sec. À partir de cette première information, des hypothèses structurelles pourraient être formulées, en référence à la bibliographie (4, 16).

3.Synthèse et caractérisation de CAuNP

[0111] Les CAuNPs ont été préparées selon la méthode de Turkevich. Une solution rouge a été obtenue à la fin de la synthèse. Cette méthode est la plus ancienne et la plus utilisée (11), ce qui permet de simplifier la mise au point de nanoparticules d'or de 15 nm fonctionnalisées par échange de ligand ([Fig.5]). Les nanoparticules obtenues sont stabilisées par du citrate en solution aqueuse.

4.Activités biologiques

[0112] Le dosage du NRU a été utilisé pour évaluer les changements de la viabilité cellulaire. Après 24h d'incubation, GAuNP et CAuNP n'avaient pas d'effet cytotoxique significatif sur la viabilité du NDHF à des concentrations comprises entre 0,005 et 50 µg / ml. Après 72h d'incubation, comme le montre la figure 7a, GAuNP n'avait pas d'effet cytotoxique significatif sur la viabilité des cellules NHDF jusqu'à 25 µg / ml, alors qu'un effet cytotoxique dépendant de la dose était observé à partir de 50 µg / ml. La concentration de 30 µg / ml a été retenue comme dose maximale testée pour étudier l'activité biologique du GAuNP. En ce qui concerne CAuNP, après 72h d'incubation,

aucun effet cytotoxique significatif sur la viabilité n'a été observé jusqu'à 40 µg / ml, tandis qu'un effet cytotoxique a été observé à 80 µg / ml.

[0113] Les propriétés anti-radicalaires de l'AuNP ont été évaluées à l'aide d'une méthode basée sur le balayage du radical DPPH. Différentes concentrations de AuNP ont été testées de 0,05 à 10% et chaque mesure a été réalisée en triple. Un contrôle positif (α-tocophérol à 50 µM) a été inclus dans le test. Comme le montre la figure 7a, GAuNP possède une activité de piégeage radical des DPPH. Une inhibition dépendante de la dose de DPPH a été observée dans la plage des concentrations testées, ce qui a permis de déterminer la CI50 à partir de la courbe de régression [DPPh (%) = f (concentration)]. La valeur IC50 pour l'activité antioxydante de GAuNP s'est avérée être de 3,29%, soit 16,5 µg / ml. Dans les mêmes conditions expérimentales, le signal DPPH était inhibé à 96% avec 50 µM d'α-tocophérol (VE) et aucune inhibition n'était observée avec CAuNP (Figure 7b). Les CAuNPs synthétisées avec le protocole standard n'ont pas d'activité antioxydante. Donc, obtenir de « simples » nanoparticules d'or ne suffit pas pour obtenir des propriétés antioxydantes. L'enrobage d'extrait de plante améliore la propriété d'élimination des radicaux libres des nanoparticules d'or. De plus, les interactions électrostatiques entre les composés phytochimiques chargés négativement et les GAuNP semblent contribuer de manière synergique à l'amélioration de la bioactivité inhérente des plantes médicinales (17, 18). Nous pouvons en conclure que l'extrait de plante a permis la formation de nanoparticules hautement antioxydantes, beaucoup plus élevées que la vitamine E.

[0114] Afin d'évaluer le potentiel dermoprotecteur des NP dans les cellules de la peau humaine, une approche expérimentale *in vitro* basée sur la mesure de l'activité de la métalloprotéinase I (MMP-1 ou collagénase) de la matrice dans des cellules NHDF exposées au rayonnement UV-A a été réalisée. Les taux de MMP-1 ont été quantifiés dans le milieu de culture après traitement et irradiation UV-A. Les cellules NDHF ont été traitées avec AuNP avant (24h) et après (24h) irradiation UV. Chaque condition expérimentale a été analysée trois fois et un contrôle positif (α-tocophérol à 1 mM) a été inclus dans l'essai. Les concentrations de MMP-1 dans les différents échantillons (ng / puits) ont été corrigées par les teneurs en protéines (µg / puits) dans les puits de culture correspondants. Comme le montre la figure 6b, l'irradiation UV-A a nettement augmenté la production de MMP-1 dans les cellules NHDF témoins. Une augmentation de 8 fois de la MMP-1 de base a été observée après une exposition aux UV-A. Le traitement des cellules avec GAuNP et CAuNP a montré une diminution significative de la production de MMP-1 de manière dépendante de la dose. La valeur IC50 de l'activité antioxydante de GAuNP et CAuNP s'est avérée être de 9,25 µg / ml et de 30,1 µg / ml, respectivement. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'α-tocophérol réduit de 52% la collagénase induite par l'irradiation UV-A.

[0115] L'application topique de GAuNPs n'a pas modifié la viabilité cellulaire par rapport aux explants témoins (non exposés ou exposés aux UV-A sans GAuNPs), mais la formation de protéines oxydées a été réduite. En l'absence d'irradiation UV-A, les GAuNPs ont diminué le taux de protéines oxydées endogènes dans le derme. En outre, ils ont totalement inhibé la formation de protéines oxydées induites par les irradiations UV-A, offrant ainsi une protection antioxydante dans le derme. Les GAuNPs ont donc une bonne activité antioxydante.

5.Etudes de sécurité

[0116] Les objectifs de ces tests étaient d'évaluer l'innocuité des AuNP en tant que matière première pour les cosmétiques. Depuis l'entrée en vigueur de l'interdiction mondiale des tests sur les produits cosmétiques pour animaux, plusieurs tests *in vitro* ont été réalisés pour évaluer : la toxicité, la sensibilisation cutanée *in vitro*, l'irritation *in vitro* et la toxicologie génétique.

[0117] Pour l'essai de toxicité aiguë, après 48 incubations avec AuNP, aucune diminution de la viabilité cellulaire n'a été constatée, quelle que soit la concentration ; par conséquent, aucune CI_{50} et donc aucune DL_{50} n'a été estimée. Donc, selon cette étude, les AuNP ne sont pas considérés comme cytotoxiques. Plusieurs concentrations comprises entre 0,32 et 1 000 µg / ml ont ensuite été utilisées pour évaluer la photo-toxicité. La phototoxicité est définie comme une réponse toxique d'une substance qui est soit déclenchée, soit augmentée après une exposition à la lumière. 24 heures après l'exposition à la lumière, aucune modification de la morphologie des cellules n'a été observée et il n'y avait aucune diminution de l'absorption de NR à aucune des concentrations testées dans les plaques irradiées et non irradiées. Dans les conditions expérimentales de cette étude, il a été déterminé que les AuNP testées jusqu'à 1 000 µg / ml n'étaient pas phototoxiques, conformément aux classifications présentées dans la directive 432 de l'OCDE.

[0118] La deuxième série de tests visait à évaluer le potentiel de sensibilisation de la peau aux AuNP. Avec le test KeratinoSens, le potentiel des AuNP pour activer le facteur de transcription Nrf2 a été évalué. Quatre analyses ont été effectuées en utilisant différentes concentrations de 0,2 à 400 µg / ml. Le résultat final est négatif, en accord avec la directive de l'OCDE, de sorte que les AuNP n'ont pas le potentiel d'activer le facteur de transcription Nrf2. En complément de ce test, un test SENS-IS a été réalisé pour évaluer la capacité des AuNP à induire l'expression de biomarqueurs spécifiques d'irritation et de sensibilisation dans un modèle d'épiderme reconstruit en 3D. Le profil d'expression de 61 gènes divisés en trois ensembles a été analysé : un ensemble de 23 gènes liés au processus d'irritation et les deux autres ensembles de gènes, nommés «SENS-IS» et «ARE», avec 21 et 17 biomarqueurs respectivement, impliqués dans la sensibilisation de la peau (19-20). En présence d'AuNP, moins de 7 gènes des groupes

de gènes «SENS-IS» et «ARE» ont été exprimés, conduisant à un test négatif. En conclusion, les AuNP peuvent être classées comme non sensibilisantes.

[0119] La troisième série d'essais consistait à évaluer l'irritation de la peau et des yeux. Pour les irritations cutanées, le principe de l'essai repose sur le fait que les produits chimiques irritants sont cytotoxiques pour le modèle de l'épiderme reconstruit Episkin ™ après une exposition de courte durée. Les produits chimiques irritants peuvent pénétrer dans la couche cornée et sont suffisamment cytotoxiques pour entraîner la mort cellulaire dans les couches cellulaires sous-jacentes. Après une exposition de 15 minutes et une période de récupération de 42 heures, la viabilité moyenne relative des tissus traités avec les AuNP était de 95% avec un écart type de 3%. Dans les conditions expérimentales de cette étude, les AuNP sont considérées comme non irritantes pour la peau. En ce qui concerne l'irritation oculaire, la viabilité moyenne relative des tissus traités avec les AuNP est de 96%, avec une différence de 4% entre les tissus dupliqués. Comme la viabilité moyenne est supérieure à 60% après la réduction du MTT, les résultats répondent aux critères de réponse « non irritante ». Dans les conditions expérimentales de cette étude, les AuNP sont considérées comme non irritantes pour l'épithélium humain reconstruit ressemblant à la cornée.

[0120] La quatrième série d'essais visait à évaluer la génotoxicité des AuNP. Pour la recherche de mutations de gènes cellulaires, en utilisant une solution d'AuNP à la concentration de 500 mg / mL dans le véhicule et un volume de traitement de 1% (v / v) dans un milieu de culture, les niveaux de dose choisis étaient 156,3, 312,5, 625. 1250, 2500 et 5000 µg / mL, avec et sans mélange S9. Aucun précipité n'a été observé dans le milieu de culture, à quelque dose que ce soit, ni au début ni à la fin de la période de traitement de 3 heures. Aucune augmentation notable de la fréquence de mutation n'a été constatée par rapport au véhicule témoin correspondant, à quelque dose que ce soit, avec ou sans mélange S9 (IMF <FEM de 126 x 10-6). De plus, aucune relation dose-réponse n'a été démontrée par la régression linéaire. Ainsi, ces résultats répondaient aux critères de réponse négative. Dans les conditions expérimentales de cette étude, les AuNP n'ont montré aucune activité mutagène dans le test du lymphome de souris, que ce soit en présence ou en l'absence d'un système de métabolisation du foie chez le rat. Pour l'analyse micronucléaires, les doses choisies pour l'analyse du micronoyau étaient les suivantes : 1250, 2500 et 5000 µg / mL, ce dernier étant le niveau de dose recommandé le plus élevé. Après les traitements de 3 heures avec et sans mélange S9 ou le traitement de 24 heures sans mélange S9, aucune augmentation statistiquement significative ni liée à la dose de la fréquence des cellules micronucléées n'a été notée à aucune des doses analysées par rapport au témoin correspondant. De plus, aucune des doses analysées n'a montré une fréquence de cellules micronuclées des deux cultures répliquées au-dessus de la plage historique du véhicule

correspondante. Ainsi, ces résultats répondaient aux critères d'une réponse négative. Dans les conditions expérimentales de l'étude, l'AuNP n'a provoqué aucun dommage chromosomique ni aucun dommage à l'appareil de division cellulaire, dans des cellules somatiques de mammifères en culture, en utilisant des cellules de lymphome de souris L5178Y TK +/-, en présence ou en l'absence de foie système métabolisant.

C- CONCLUSION

[0121] Cette étude montre l'intérêt des nanoparticules en tant que matériau pour les applications cosmétiques. L'extrait d'*Hubertia ambavilla* contient des constituants bioactifs utilisés pour la synthèse de nanoparticules d'or aux propriétés intéressantes, notamment pour les applications cosmétiques. Les AuNPs vertes ne sont pas toxiques, ni pour les cellules de fibroblastes, ni pour les cellules dermiques, et sont capables de piéger efficacement les radicaux libres. Ils présentent un effet protecteur contre les dommages causés par les UV-A aux cellules de fibroblastes et aux cellules dermiques. Des tests réglementaires visant à garantir la sécurité des nanoparticules d'or en tant qu'ingrédients dans les cosmétiques ont été réalisés et ont démontré que les AuNP ne sont pas toxiques, ni génotoxiques, ni irritants ni sensibilisants, conformément aux directives de l'OCDE. Ces résultats suggèrent que les AuNP vertes sont un ingrédient prometteur dans les cosmétiques.

Références bibliographiques

[0122] 1. Ben Haddada M, Gerometta E, Bialecki A, Fu W, Zhang Y, Lamy de La Chapelle, Djaker N, Pesnel S, Morel AL, Spadavecchia J. (2018) Endemic Plants: From Design to a New Way of Smart Hybrid Nanomaterials for Green Nanomedicine Applications. J Nanomed Nanotechnol 9: 518.

[0123] 2. V. Kumar, S. C. Yadav and S. K. Yadav, "Syzygium Cumini Leaf and Seed Extract Mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Their Characterization," Journal of Chemical Technology & Biotechnology, Vol. 85, No. 10, 2010, pp. 1301-1309.

[0124] 3. M.S. Akhtar, J. Panwar, Y.S. Yun, Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. ACS Sustain. Chem. Eng. 1 (2013) 591–602.

[0125] 4. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial, Off. J. EU 2011, L275, 38.

[0126] 5. Morel AL, Giraud S, Bialecki A, Moustaoui H, Lamy de La Chapelle M, Spadavecchia J. Green extraction of endemic plants to synthesize gold nanoparticles for theranostic applications. 2017, Frontiers in Laboratory Medicine, 1:158-171.

[0127] 6. Adsersen A, Adsersen H. Plants from Réunion Island with alleged antihypertensive and diuretic effects-an experimental and ethnobotanical evaluation. J Ethnopharmacol, 2017, 53(3):189-206.

[0128] 7. Aruoma OI, Bahorun T, Jen LS. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. Mutat Res, 2003, 544(2):203-15.

[0129] 8. Poullain C, Girard-Valenciennes E, Smadja J. Plants from Reunion Island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities. J Ethnopharmacol, 2004, 95(1):19-22.

[0130] 9. Burke KE, Mechanisms of ageing and development – a new understanding of environmental damage to the skin and prevention with topical antioxidants. https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.12.003.

[0131] 10. Burke KE, Photodamage of the skin: protection and reversal with topical antioxidants. J Cosmet Dermatol, 2004, 3(3):149-55.

[0132] 11. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc, 1951, 11:55-75.

[0133] 12. Haiss W.,Thanh N. T. K.,Aveyard J., Fernig D. G. Anal. Chem., 2007, 79, 4215-4221.

[0134] 13. Wang S, Qian K, Bi X, Huang W. Influence of speciation of aqueous HAuCl4 on the synthesis, structure, and property of Au colloids. The Journal of Physical Chemistry C, 2009, 113(16), 6505-6510.

[0135] 14. Zhu H, Du M, Zou M, Xu C, Li N, Fu Y. Facile and green synthesis of well-dispersed Au nanoparticles in PAN nanofibers by tea polyphenols. Journal of Materials Chemistry, 2012, 22(18), 9301-9307.

[0136] 15. Negishi Y, Nobusada K, Tsukuda T. Glutathione-protected gold clusters revisited: Bridging the gap between gold (I)− thiolate complexes and thiolate-protected gold nanocrystals. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(14), 5261-5270.

[0137] 16. Sprogøe K, Stærk, D, Jäger AK, Adsersen A, Hansen SH, Witt M, Landbo AK, Meyer AS, ,Jaroszewski JW. Targeted natural product isolation guided by HPLC–SPE–NMR: constituents of Hubertia species. Journal of natural products, 2007, 70(9), 1472-1477.

[0138] 17. Kumar B, Smita K, Cumbal L, et al. Synthesis of silver nanoparticles using Sacha inchi (Plukenetia volubilis L.) leaf extracts. Saudi J Biol Sci. 2014, 21:605–609.

[0139] 18. Swamy MK, Akhtar MS, Mohanty SK, et al. Synthesis and characterization of silver nanoparticles using fruit extract of Momordica cymbalaria and assessment of their in vitro antimicrobial, antioxidant and cytotoxicity activities. Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectrosc. 2015, 151:939–944.

[0140] 19. Cottrez F, Boitel E, Aeby P, Groux H. Genes specifically modulated in sensitized skins allow the detection of sensitizers in a reconstructed human skin model. Development of the SENS-IS assy. Toxicology in vitro, 2015, 29, 787-802.

[0141] 20. Cottrez F, Boitel E, Ourlin JC, Peiffer JL, Fabre Isabelle, Henaoui IS, Mari B,

Vallauri A, Paquet A, Barbry P, Aurialut C, Aeby P, Groux H. SENS-IS, a 3D re-constituted epidermis based model for quantifying chemical sensitization potency: reproducibility and predictivity results from an inter-laboratory study. Toxicology in vitro, 2016, 32, 248-260.

Revendications

[Revendication 1] Composition comprenant au moins une nanoparticule d'or comprenant un mélange d'or et un extrait de plantes riche en flavonoïdes pour son utilisation dans le traitement préventif des dommages cutanés dus aux UV et/ou aux radicaux libres.

[Revendication 2] Composition selon la revendication 1 pour son utilisation selon la revendication 1, dans laquelle ledit extrait est un extrait brut.

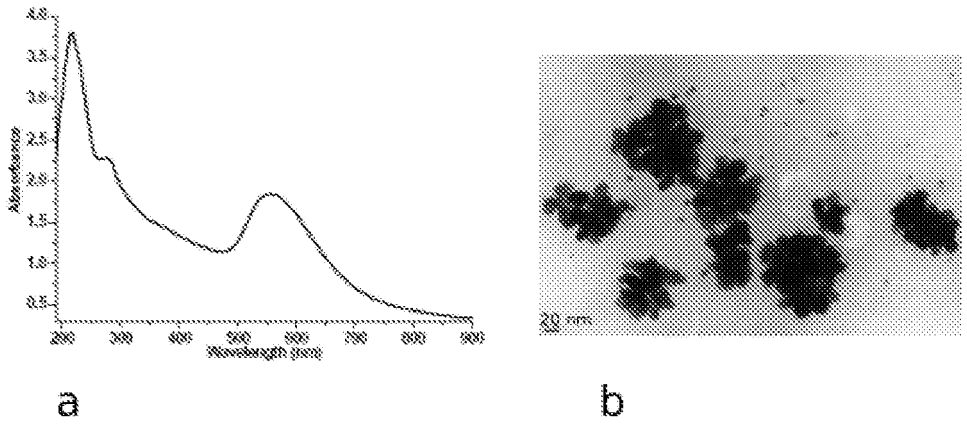
[Revendication 3] Composition selon la revendication 1 pour son utilisation selon la revendication 1, dans laquelle ledit extrait est un totum.

[Revendication 4] Composition selon l'une revendications 1 à 3 pour son utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, dans laquelle l'extrait de plante est choisi parmi un extrait de *Hubertia ambavilla*, *Hypericum lanceolatum, Aphloia theiformis, Ayapana triplinervis, Camellia sinensis var. assamica, Citrus hystrix, Curcuma longa, Cryptomeria japonica, Dodonaea viscosa, Mussaenda arcuate, Nuxia verticillate, Olea europea Africana, Phyllanthus casticum, Pittosporum senacia, Psidium cattleianum, Psiloxylon mauritianum, Terminalia bentzoe* ou *Vepris lanceolata.*

[Revendication 5] Composition selon la revendication 4 pour son utilisation selon la revendication 4, dans laquelle ledit extrait est un d'extrait brut de *Hubertia ambavilla.*

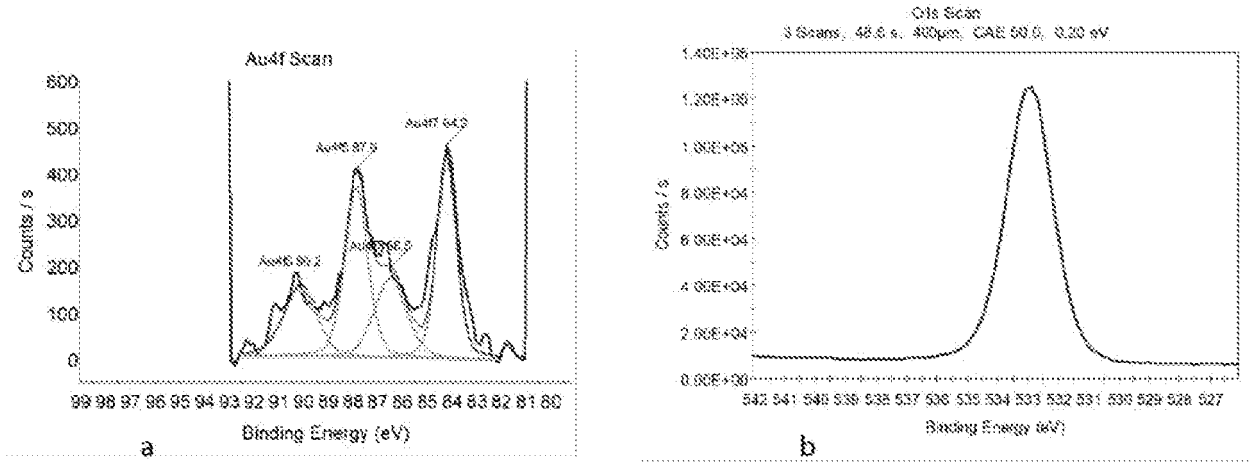
[Revendication 6] Composition selon la revendication 4 pour son utilisation selon la revendication 4, dans laquelle ledit extrait est un totum de *Hypericum lanceolatum.*

[Fig. 1]

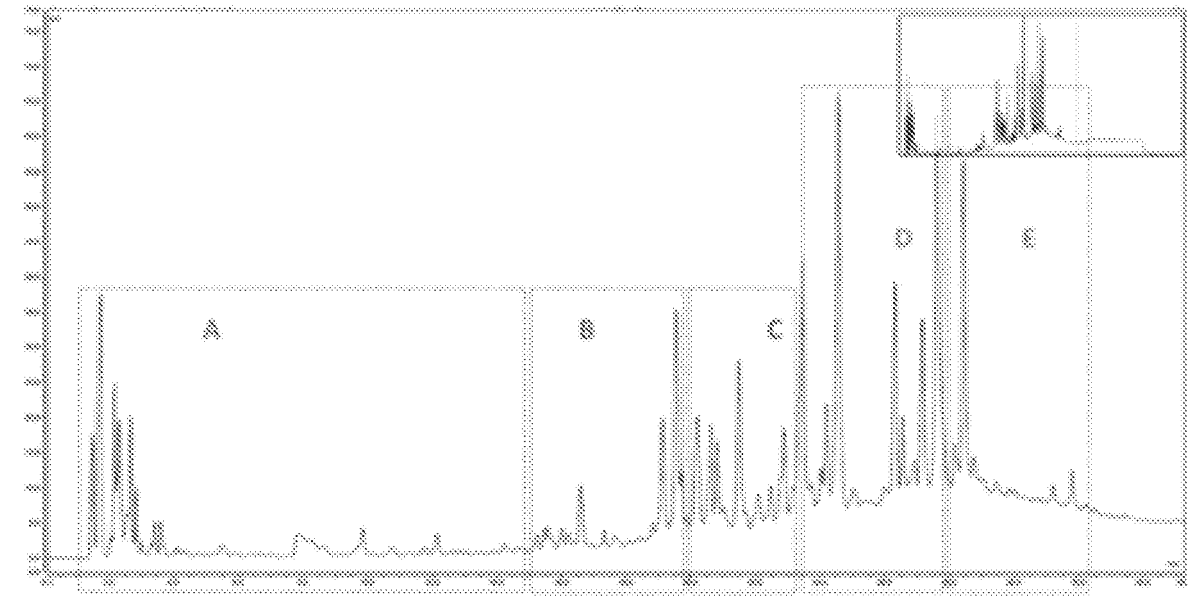


a b

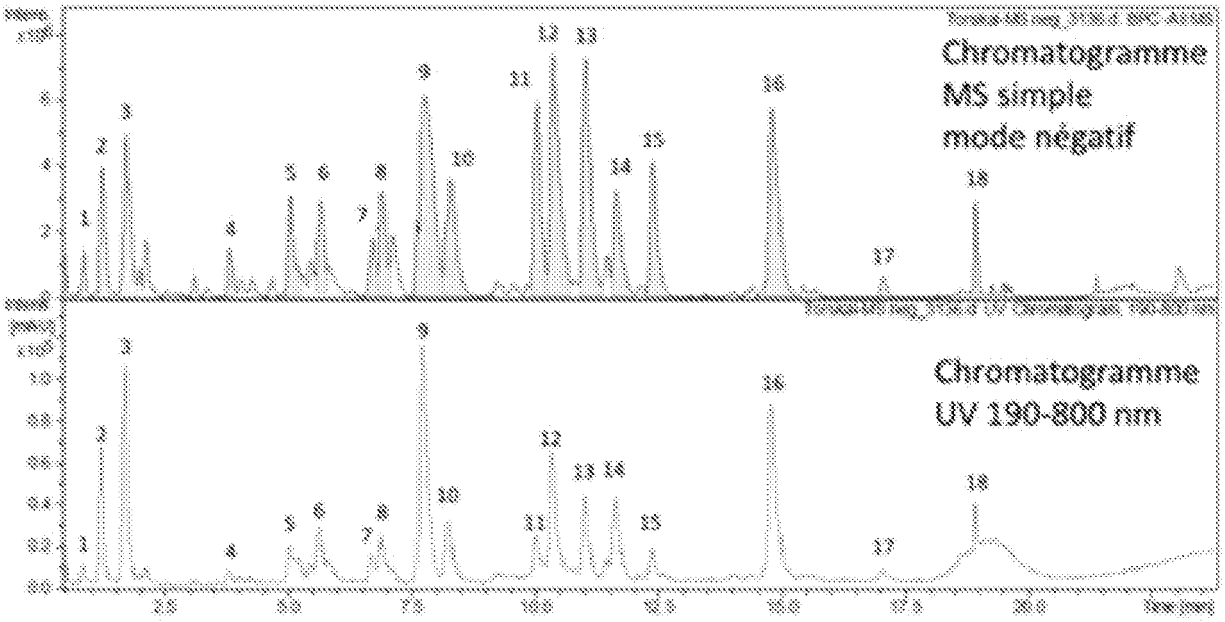
[Fig. 2]



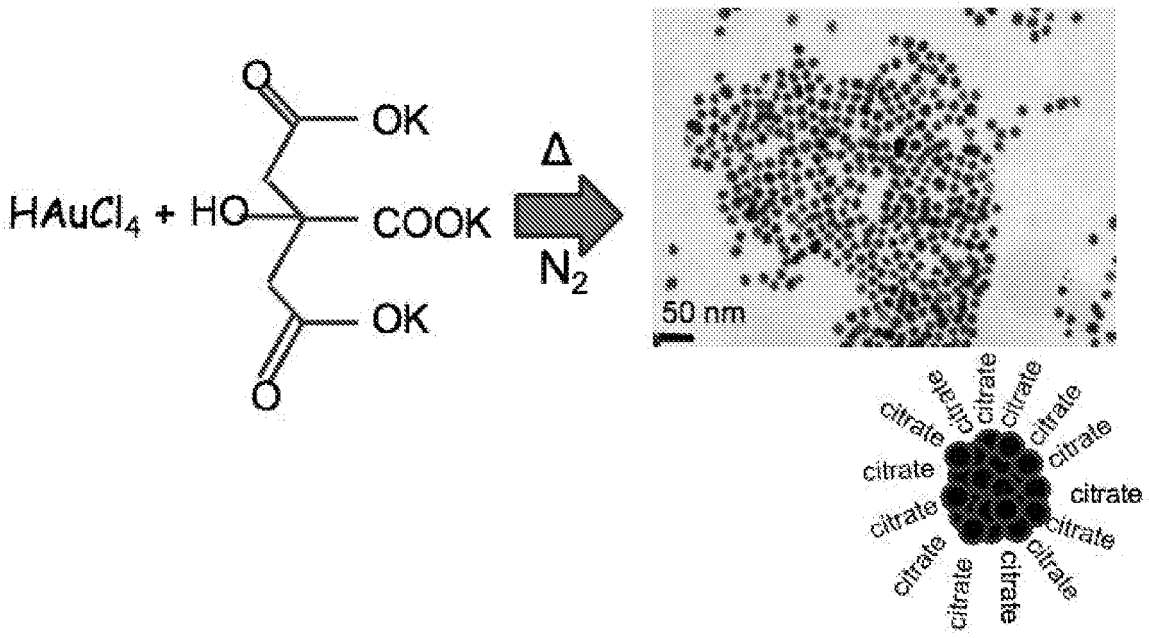
[Fig. 3]



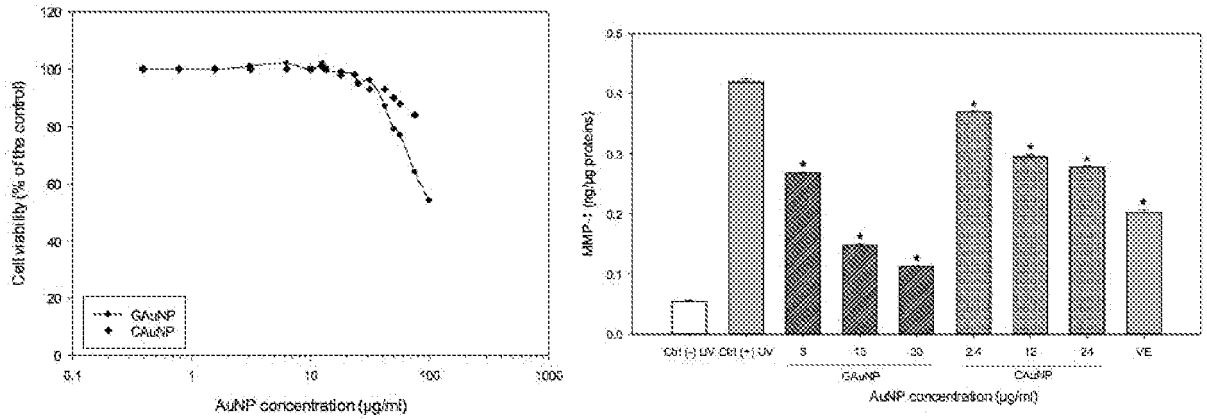
[Fig. 4]


Chromatogramme
MS simple
mode négatif
Chromatogramme
UV 190-800 nm

[Fig. 5]

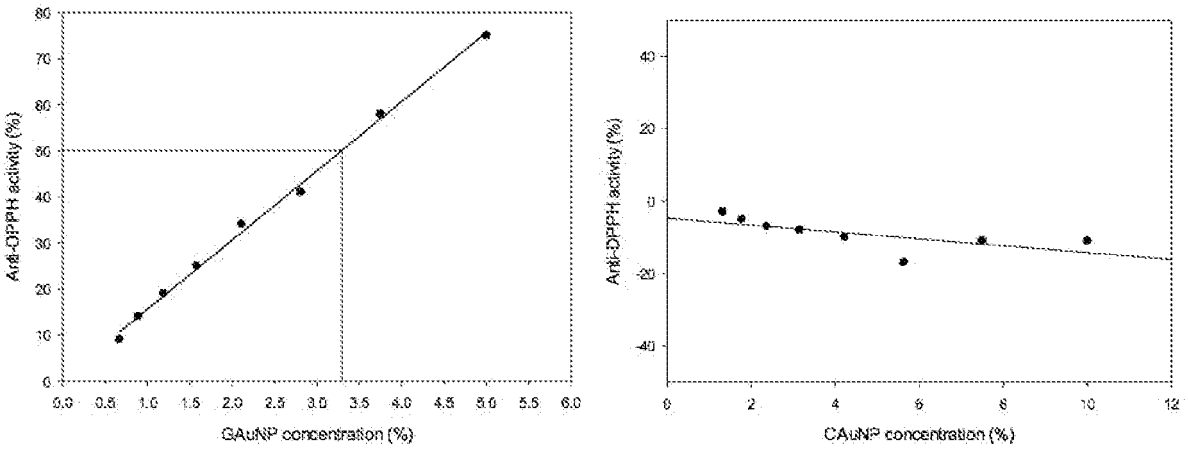

HAuCl4 + HO
OK
COOK
OK
Δ
N2
50 nm
citrate

[Fig. 6]



(a) (b)

[Fig. 7]



(a) (b)

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 (nouveauté) 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

[x] Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.

☐ Le demandeur a maintenu les revendications.

[x] 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.

[x] 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

WO 2017/125695 A1 (TORSKAL [FR]; MOREL ANNE-LAURE [FR])
27 juillet 2017 (2017-07-27)

DATABASE WPI
Week 201833
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2018-33336W
XP002798092,
& KR 2018 0037650 A (UNIV KYUNGHEE IND COOP) 13 avril 2018 (2018-04-13)

DATABASE WPI
Week 201828
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2018-28729S
XP002798093,
& KR 101 843 764 B1 (UNIV PUSAN NAT IND COOP FOUND) 30 mars 2018 (2018-03-30)

DATABASE WPI
Week 201930
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2019-25046E
XP002798094,
& CN 109 431 830 A (CHEN D)
8 mars 2019 (2019-03-08)

DATABASE WPI
Week 201804
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2017-846052
XP002798095,
& KR 2017 0131746 A (UNIV KYUNGHEE IND COOP) 30 novembre 2017 (2017-11-30)

MOHD SAYEED AKHTAR ET AL: "Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts",
ACS SUSTAINABLE CHEMISTRY & ENGINEERING,
vol. 1, no. 6, 3 juin 2013 (2013-06-03),
pages 591-602, XP055673788,
US
ISSN: 2168-0485, DOI: 10.1021/sc300118u

Beom Kim Soo ET AL: "BIOLOGICAL SYNTHESIS OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES USING PLANT LEAF EXTRACTS AND ANTIMICROBIAL APPLICATION"
In: "Biocatalysis and Biomolecular Engineering",

1 janvier 2010 (2010-01-01), John Wiley &
Sons, Inc., XP055673861,
pages 447-457,

SADEGHI BABAK ET AL: "Green synthesis of
gold nanoparticles usingStevia
rebaudianaleaf extracts: Characterization
and their stability",
JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY
B: BIOLOGY, ELSEVIER SCIENCE S.A., BASEL,
CH,
vol. 148, 7 avril 2015 (2015-04-07), pages
101-106, XP029187460,
ISSN: 1011-1344, DOI:
10.1016/J.JPHOTOBIOL.2015.03.025

VINEET KUMAR ET AL: "Plant-mediated
synthesis of silver and gold nanoparticles
and their applications",
JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY,
vol. 84, no. 2,
1 février 2009 (2009-02-01), pages
151-157, XP055306383,
ISSN: 0268-2575, DOI: 10.1002/jctb.2023

DIPESH KR. DAS ET AL: "Biosynthesis of
stabilised gold nanoparticle using an
aglycone flavonoid, quercetin",
JOURNAL OF EXPERIMENTAL NANOSCIENCE,
vol. 8, no. 4, 1 mai 2013 (2013-05-01),
pages 649-655, XP055306388,
GB
ISSN: 1745-8080, DOI:
10.1080/17458080.2011.591001

WO 2007/011103 A1 (KOREA RES INST OF
BIOSCIENCE [KR]; JUNG BONG HYUN [KR] ET
AL.) 25 janvier 2007 (2007-01-25)

DATABASE WPI
Week 201302
Thomson Scientific, London, GB;
AN 2012-R37080
XP002798096,
& WO 2012/173312 A1 (UNIV PUSAN NAT IND
COOP FOUND) 20 décembre 2012 (2012-12-20)

ANNE-LAURE MOREL ET AL: "Green extraction
of endemic plants to synthesize gold
nanoparticles for theranostic
applications",
FRONTIERS IN LABORATORY MEDICINE,
vol. 1, no. 3,
1 septembre 2017 (2017-09-01), pages
158-171, XP055673821,
ISSN: 2542-3649, DOI:

10.1016/j.flm.2017.10.003

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

NEANT

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

NEANT